



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Biología Marina

PROFESOR PATROCINANTE:
DRA. LEYLA C. CÁRDENAS T.
PROFESOR CO-PATROCINANTE:
DR. ROGER D. SEPÚLVEDA.
INSTITUTO DE CS. AMBIENTALES
& EVOLUTIVAS.

“CARACTERIZACIÓN GENÉTICO-POBLACIONAL Y VARIABILIDAD MORFOLÓGICA DE *Pinnaxodes chilensis* (DECÁPODA: PINNOTHERIDAE) EN LA COSTA ORIENTAL DEL PACÍFICO SUR”

Memoria de grado presentada como parte
de los requisitos para optar al Título
profesional de **Biólogo Marino**.

Por

FERNANDO RUNIL OJEDA
VALDIVIA – CHILE
2014

Dedicado A

Mis padres;

Belarmino e Isabel

&

Hermanos;

Lidia, Carolina, Paula, Ángeles y Aarón.

AGRADECIMIENTOS

Después de escribir este encabezado fue imposible no mirar en pretérito y recordar cuantiosos momentos. Forzosamente los sentimientos se confrontan, mayormente cuando parte de ellos han marcado hitos importantes de este trayecto y han tenido espacios paralelos al desarrollo de esta investigación. En este emotivo bamboleo se me fueron “*muchos minutos*”, y con la hoja en blanco, resolví esta era la forma más honesta de comenzar un Gracias.

Al padre de las lumbres, al que no evidencia patrón evolutivo, en quien no hay mudanza ni sombra de variación.... A la roca inamovible cuando el vasto océano fluctúa continuamente. Al **Dios** omnisciente, Gracias por su fidelidad, por darme la esperanza y permanecer cuando todo derredor se derrumba.

A mis padres, que modelan esbozos de mi carácter, la calidad humana, lo que soy y no soy. Por inculcar educación, bondad, respeto y fomentar el crecimiento integral. Gracias por su apoyo y contribuir a materializar esta investigación. A mis hermanos; Lidia, Carolina, Paula, Ángeles y Aarón. Gracias por existir, por la cohesión y por ser la fuerza en el desaliento. Lidia, Gracias por la preocupación y oportuna provisión en mi período de estudiante.

A la Dra. Leyla, por confiarme un espacio de su laboratorio, por creer en mis capacidades, por estimular mi potencial y contribuir grandemente en mi formación como investigador. Gracias por su patrocinio e incansable apoyo, por mi asistencia a congresos, cursos y su gran capacidad humana, siempre dispuesta a conversar, comprender y escuchar.

Al Dr. Roger, por su co-patrocinio y participación directa en esta investigación, por responder y explicar pacientemente mis dudas y fomentar la realización de un buen trabajo.

Al Dr. José Garcés, por su deferencia en temas académicos y ayudarme a caracterizar y confeccionar perfiles de temperatura y salinidad de esta tesis.

Al Dr. Luis Pardo, por su siempre buena disposición a colaborar y sumarse como informante de este trabajo.

Como no agradecer a mis amistades, a los que comparten mis momentos y han estado presentes, no sólo cuando los he necesitado. Zambra L, Minerva G, Daniela M y Gladys C. Horacio, Pili, Javier, Rosita, Nicol, Mabel, Fernanda; Gracias por toda la energía y agradables momentos compartidos. Jonathan C, Gracias por su apoyo en etapas finales de mi defensa de título, por su compañía y preocupación. Marcelo N, Gracias por su tiempo en leer mi tesis y ayudarme a corregir dicción y errores gramaticales.

A mis compañeros de laboratorio con quienes compartí este proceso, a los que permanecen y a los que ya no están; Paulina, Jonathan, Alejandra, Graciela y Gonzalo. Valeria V, agradezco su amabilidad y siempre disposición en responder a mis dudas de laboratorio, sobre todo en mis inicios.

A todos (as) ustedes, un sincero ¡GRACIAS!

... *“A mí me encanta Dios. Ha puesto orden en las galaxias y distribuye bien el tránsito en el camino de las hormigas. Y es tan juguetón y travieso que el otro día descubrí que ha hecho frente al ataque de los antibióticos con ¡bacterias mutantes! Viejo sabio o niño explorador, cuando deja de jugar con sus soldaditos de plomo de carne y hueso, hace campos de flores o pinta el cielo de manera increíble! Mueve una mano y hace el mar, y mueve la otra y hace el bosque. Y cuando pasa por encima de nosotros, quedan las nubes, pedazos de su aliento. Dicen que a veces se enfurece y hace terremotos, y manda tormentas, caudales de fuego, vientos desatados, aguas alevosas, castigos y desastres. Pero esto es mentira! Es la tierra que cambia- y se agita y crece- cuando Dios se aleja. Dios siempre está de buen humor. Por eso es el preferido de mis padres, el más cercano de mis hermanos, la mujer más amada, el perrito y la pulga, la piedra más antigua, el pétalo más tierno, el aroma más dulce, la noche insondable, el borboteo de luz, el manantial que soy. A mí me gusta, a mí me encanta Dios. Que Dios bendiga a Dios”*

Jaime Sabines

1926 - 1999

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1 Características oceanográficas en la costa Oriental del Pacífico Sur.....	8
1.2 Estudios con enfoque filogeográfico en Chile.....	13
1.3 <i>Pinnaxodes chilensis</i> como modelo biológico.....	17
HIPÓTESIS.....	21
OBJETIVO GENERAL.....	22
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	22
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Muestreo.....	23
2.1.1 Área de estudio.....	23
2.1.2 Obtención de material biológico.....	23
2.2 Procesamiento de muestras.....	24
2.2.1 Medición y disección de <i>Loxechinus albus</i>	24
2.2.2 Revisión del intestino de <i>Loxechinus albus</i>	24
2.3 Morfología de <i>Pinnaxodes chilensis</i>.....	25
2.3.1 Características del crecimiento.....	25
2.3.2 Medición de los comensales.....	25
2.4 Caracterización de variables ambientales.....	26
2.4.1 Salinidad.....	26
2.4.2 Temperatura Media Superficial.....	26
2.5 Descriptores poblacionales de <i>Pinnaxodes chilensis</i>.....	27
2.5.1 Prevalencia.....	27
2.5.2 Intensidad Media.....	27
2.5.3 Abundancia Media.....	27
2.5.4 Identificación y frecuencia de sexos.....	27
2.6 Distribución de tallas comensal-hospedero.....	28
2.6.2 <i>Loxechinus albus</i> a nivel latitudinal.....	28
2.6.2 Relación de tamaño comensal-hospedero.....	28
2.6.3 Presencia/Ausencia de <i>P. chilensis</i>	29

2.7	Variabilidad morfológica latitudinal de <i>Pinnaxodes chilensis</i>	29
2.7.1	Análisis de varianza basado en permutaciones (PERMANOVA).....	29
2.7.2	Análisis de dimorfismo sexual en quelíceros.....	30
2.8	Extracción de material genético, PCR y Secuenciación	30
2.8.1	Extracción de ADN.....	30
2.8.2	Amplificación de Citocromo Oxidasa c, Subunidad I (COI).....	31
2.8.3	Secuenciación.....	31
2.9	Análisis de datos moleculares de <i>Pinnaxodes chilensis</i>	32
2.9.1	Diversidad genética.....	32
2.9.2	Diferenciación genética.....	33
2.9.3	Frecuencia de haplotipos a través de Regiones Biogeográficas.....	33
2.9.4	Red de Haplotipos.....	33
2.9.5	Aislamiento por distancia.....	34
2.9.6	Demografía histórica.....	34
2.9.7	Pruebas de Neutralidad (Wright-Fisher).....	34
2.9.8	Distribución mismatch.....	36
2.9.9	Diversidad genética y variables ambientales.....	36
3.	RESULTADOS	45
3.1	Caracterización de la Temperatura Superficial y Salinidad	45
3.2	Análisis de descriptores poblacionales de <i>Pinnaxodes chilensis</i>	46
3.2.1	Prevalencia latitudinal.....	46
3.2.2	Intensidad Media.....	46
3.2.3	Abundancia Media.....	47
3.2.4	Identificación y frecuencia de sexos.....	47
3.3	Distribución de tallas comensal-hospedero	48
3.3.1	<i>Loxechinus albus</i> y latitud geográfica.....	48
3.3.2	Relación de tamaño comensal-hospedero.....	48
3.3.3	<i>Loxechinus albus</i> versus presencia/ausencia de <i>Pinnaxodes chilensis</i>	48
3.4	Variabilidad morfológica latitudinal de <i>Pinnaxodes chilensis</i>	49
3.4.1	Análisis morfológico multivariante.....	49
3.4.2	Análisis de dimorfismo sexual en quelíceros.....	49
3.5	Análisis de datos moleculares	50
3.5.1	Diversidad genética.....	50
3.5.2	Diferenciación genética geográfica.....	51
3.5.3	Distribución espacial de haplotipos.....	51
3.5.3	Red de haplotipos.....	52
3.5.4	Demografía histórica.....	52
3.5.5	Aislamiento por distancia.....	5

4. DISCUSIÓN.....	70
4.1 Descriptores poblacionales de <i>Pinnaxodes chilensis</i>.....	70
4.1.1 Prevalencia, Intensidad media y variables ambientales.....	70
4.1.2 Dimorfismo sexual y ocurrencia de sexos.....	72
4.2 Caracterización comensal – hospedero.....	73
4.3 Variabilidad morfológica latitudinal de <i>P. chilensis</i>.....	75
4.3.1 Análisis morfológico multivariados.....	75
4.3.2 Variables biométricas del caparazón y alometría de quelíceros.....	76
4.4 Caracterización molecular de <i>Pinnaxodes chilensis</i>.....	78
4.4.1 Descripción de la diversidad genética en el PSO.....	78
4.4.2 Estructura genética y filogeográfica: Enfoques de Historia de vida.....	79
4.4.3 Demografía histórica.....	82
5. CONCLUSIONES.....	88
6. ANEXOS.....	89
Anexo 1.....	90
Anexo.....	91
7. REFERENCIAS.....	92

RESUMEN

Hasta ahora, la variada comprensión de historias de vida y distribución geográfica de linajes genéticos se han basado principalmente en organismos de vida libre. De aquí que especies parásitas y/o comensales, habitantes de micro ambientes muy específicos, constituyen un excelente modelo biológico para avanzar en este conocimiento.

En el ambiente marino el modo de desarrollo (especialmente el tiempo que dura la larva en el plancton), sin duda, juega un papel crítico en el gobierno de la estructura genética y filogeográfica. Pero además, dichos patrones se ven fuertemente influenciados por las interacciones entre el pasado y presente, las historias de vida y las limitaciones ambientales. Para la costa Oriental del Pacífico Sur (PSO) poco se sabe respecto de los mecanismos que han dado forma a la distribución geográfica de la variación genético-morfológica y al patrón espacial de evolución de muchas especies. Aquí proporcionamos el primer estudio filogeográfico-morfológico de un organismo comensal ampliamente distribuido en este rango costero; el brachyuro *Pinnaxodes chilensis*. Características excepcionales definen a *P. chilensis* como un buen modelo para dilucidar patrones de conectividad y variabilidad en la forma a lo largo de regiones biogeográficas: (1) su amplio rango distribucional atraviesa las dos zonas transicionales descritas para el PSO; (2) cuenta con fase larval dispersiva; (3) se evidencia variación latitudinal en rasgos reproductivos con aparente plasticidad morfológica; y (4) es comensal del erizo comestible *Loxechinus albus*, situado entre las especies de mayor importancia socioeconómica para Chile.

Usando la subunidad I del marcador molecular Citocromo Oxidasa c (COI) en conjunto con herramientas de morfometría clásica, se evaluó los patrones en cuestión considerando 15 localidades distribuidas desde los 23°S hasta los 54°S. Los resultados poblacionales demostraron un patrón latitudinal de prevalencia que disminuye hasta cero de norte a sur. Correlación significativa con la temperatura superficial estaría determinando altas prevalencias a bajas latitudes producto del estímulo térmico que ejerce la temperatura sobre el crecimiento y desarrollo de *P. chilensis*. La frecuencia de 11,4% respecto del total de individuos encontrados, evidencia la presencia de machos comensales a lo largo de regiones, cuya proporción sexual de 1 macho: 7,6 hembras, apuntan a una falta de sincronía en el ciclo reproductivo. Por otro lado, las variables biométricas revelaron que el 95% de la variabilidad

morfológica total está representada por el tercer segmento abdominal, con ausencia regional de estructura. Fluctuaciones ambientales locales estarían provocando una variabilidad morfológica “entre” las localidades del rango estudiado. Por ende, el espacio físico disponible para la acumulación de huevos, como la pequeña cantidad de carbonato calcio depositado en el exoesqueleto, permitirían a este segmento tener mayor plasticidad frente a los diferenciales ritmos de incubación y variación ambiental.

La caracterización genética de *P. chilensis* reveló un alto número de haplotipos de baja frecuencia, que describen su alta heterocigocidad y baja diversidad nucleotídica. Estos índices de diversidad genética, por un lado, responderían a la alta tasa mutacional de *P. chilensis* y, por otro, al gran tamaño efectivo de la hembra. Los resultados de AMOVA jerárquico indicaron bajo nivel de divergencia genética entre localidades y entre regiones biogeográficas. La evidente homogeneidad genética observada y la alta frecuencia de un haplotipo, sugiere que *P. chilensis* no presente sub-poblaciones en todo el rango geográfico (posible panmixia). La distribución espacial de haplotipos en forma “estrellada”, los valores negativos y significativos de neutralidad y distribución mismatch unimodal, son consistentes con un patrón evolutivo de expansión poblacional para *P. chilensis* a partir de un limitado número de fundadores. Posiblemente el último máximo glacial (UMG) permitió que poblaciones del extremo norte hayan persistido y recolonizado lugares extintos de la zona sur-austral, provocando una migración asimétrica de haplotipos que en conjunto al “transporte unidireccional Norte-Sur” de corrientes a macro-escala, habrían generado un aumento de la diversidad genética del extremo sur. Por lo tanto, mutaciones producidas al sur del rango no serían transportadas en dirección opuesta, estableciendo entonces la existencia de haplotipos únicos en esta región.

Rasgos e inferencias de historia de vida de *P. chilensis* como: (1) dimorfismo sexual; (2) razón sexual distinta de 1:1; (3) alometría de quelíceros; y (4) un eventual macho visitador; serían factores contribuyentes a la alta diversidad genética observada. La fase larval dispersiva de *P. chilensis* tendría una exposición prolongada en la columna de agua, suficiente para permitir un flujo de genes ininterrumpido a lo largo de los 3.030 km de costa. Esto nos indica que los procesos oceanográficos que actúan como filtros regionales en el intercambio genético para muchas especies, no afectan a *P. chilensis* o son lo suficientemente permeables como para formar estructuración.

SUMMARY

To date, the varied understanding of life stories and geographic distribution of genetic lineages have been based primarily on free-living organisms. Hence, parasite species and / or commensals, inhabitants of very specific microenvironments, are an excellent biological model to make further progresses with this knowledge.

In the marine environment the development way (especially the duration of the larvae in the plankton) undoubtedly, plays a critical role in the government of the genetic and phylogeographic structure. In addition, these patterns are strongly influenced by interactions between past and present, life stories and environmental constraints. To the Eastern coast of the South Pacific (PSO) there is not enough information about the mechanisms that have shaped the geographical distribution of genetic-morphological variation and the spatial pattern of evolution of numerous species. Here it is provided the first phylogeographic-morphological study of a commensal organism widely distributed in this coastal range, the brachyuro *Pinnaxodes chilensis*. Exceptional characteristics define *P. chilensis* as a good model to elucidate connectivity patterns and variability in its way along biogeographic regions: (1) the commensal of edible sea urchin *Loxechinus albus*, is located among the species of major socioeconomic importance for Chile, (2) its wide distributional range goes through the two transitional zones described for the PSO, (3) it has a dispersive larval phase, (4) it is shown a latitudinal variation in reproductive traits with apparent morphological plasticity.

Using the subunit I of the molecular marker of cytochrome c oxidase (COI), together with classical morphometry tools, patterns in question were assessed taking under consideration 15 locations distributed from 23 ° S-54 ° S. Demographic results exposed a latitudinal pattern of prevalence, which decreases to zero from north to south. Significant correlation with the surface temperature would determine high prevalence at low latitudes, resulting from thermal stimulus exerted by the temperature on the growth and development of *P. chilensis*. The frequency of 11, 4% of all individuals encountered, showed the presence of males commensal along regions, whose sex ratio of 1 male: 7, 6 females, suggests a lack of synchronization in the reproductive cycle. Moreover, biometric variables revealed that 95% of the overall morphologic variability is represented by the third abdominal segment, with no

regional structure. Local environmental fluctuations would be causing morphological variability “among” localities of the studied range. Therefore, the physical space available in the eggs accumulation as the small amount of calcium carbonate deposited on the exoskeleton, would allow this segment to have greater plasticity against to differential rates of incubation and local variations.

Genetic characterization of *P. chilensis* revealed a large number of low-frequency haplotypes, which describe their high heterozygosity and low nucleotide diversity. These rates of genetic diversity, firstly, would respond to the high mutational rate of *P. chilensis*, and secondly, to the great effective size of the female. The results from the hierarchical AMOVA show a low genetic divergence among localities, and also among biogeographic regions. The evident genetic homogeneity observed and the high frequency of a haplotype, suggests that *P. chilensis* does not present sub-populations throughout the geographic range (possible panmixis). The spatial distribution of "star-shaped" haplotypes, the negative and significant values of neutrality and unimodal mismatch distribution are consistent with an evolutionary pattern of population expansion for *P. chilensis* from a limited number of founders. Possibly the last glacial maximum (LGM) allowed the north end populations to have persisted and recolonized extinct places in the sur-austral area, causing asymmetric migration of haplotypes which together with the "North-South unidirectional transport" of macroscale, would have resulted in an increase of the genetic diversity at the southern end. Therefore, mutations produced in the south of the range would not be transported in opposite direction, allowing the existence of unique haplotypes in this region.

Inferences in life history traits of *P. chilensis* as: (1) sexual dimorphism, (2) sex ratio other than 1:1, (3) allometry of chelicerae, and (4) a visiting male eventual, would be contributing factors to the high genetic diversity observed. The dispersive larval stage of *P. chilensis* would have prolonged exposure in the water column, sufficient to allow an uninterrupted flow of genes along 3.030 km the coastline. This indicates that oceanographic processes that act as filters regional in the genetic exchange in many species do not affect to *P. chilensis* or that they are permeable enough to form structure.

1. INTRODUCCIÓN

La estructura geográfica en poblaciones de especies costeras se encuentra fuertemente modelada por una combinación de procesos evolutivos (histórico-contemporáneos) y condiciones oceanográficas. Estas fuerzas pueden cambiar la abundancia de especies (Connolly *et al.*, 2001; Byers & Pingle, 2006) o causar distribuciones insospechadas de la diversidad genética intra-específica (Hoskin, 2000; Waters & Roy, 2004; Pringle & Wares, 2007). Para muchas especies de peces e invertebrados intermareales, las larvas pueden ser capaces de atravesar cientos de kilómetros durante su desarrollo. Muchas de ellas, generalmente, exhiben una estructura en gran parte panmítica (habitualmente homogéneo) en toda su área geográfica (Palumbi, 1994; Thorrold *et al.*, 2002; Kinlan & Gaines, 2003). Sin embargo, la interacción de las fuerzas oceanográficas (e.g. fuentes de surgencias, remolinos, corrientes de marea) y sus efectos sobre el transporte y comportamiento larval (Lessios, 2008), la selección y efectos del paleoclima (Gil & Hilbish, 2003), como la morfología de la costa (Sköld *et al.*, 2003), pueden mantener o modificar la distribución geográfica de la variación genética y el patrón espacial de la evolución, que se apartan de esta expectativa (Hellberg, 1998; Dawson & Hamner, 2005; Faucci *et al.*, 2007 ; Hickerson & Meyer, 2008; Lessios, 2008; Rocha & Bowen, 2008).

Estas influencias pueden ser sutiles en escalas de tiempo reducidas y, sin embargo, tener efectos profundos sobre poblaciones en una escala de tiempo prolongada (Wares *et al.*, 2001; Wares, 2002; Marko, 2004). Los acontecimientos históricos demográficos (e.g. efecto fundador, eventos vicariantes, expansiones de rango) ya no pueden ser observados directamente en las poblaciones naturales. No obstante, a menudo dejan una firma distintiva de diferenciación genética que puede ser detectada en la estructura de la población actual mediante herramientas filogeográficas.

John Avise en su libro *Pylogeography, the history and formation of species*, define la filogeografía como: “*el campo de estudio relacionado con los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genéticos, sobre todo aquellos entre y dentro de especies cercanamente relacionadas*” (Avise, 2000). Esta disciplina refuerza y permite la interacción a nivel macro y microevolutivo, donde la genética molecular juega un papel primordial como herramienta indispensable (Eguiarte *et al.*, 2007). En su línea de contraponer

y englobar aspectos tanto temporales (relaciones evolutivas) como espaciales (distribución geográfica), permite entender la influencia de los factores preponderantes que podrían explicar la distribución de la variación genética. A una escala ecológica, además, enfatiza el papel de las presiones o factores ecológicos contemporáneos en la formación de la distribución espacial de caracteres genéticos. Por lo tanto, la filogeografía podría considerarse como una subdisciplina de la biogeografía histórica, donde, para analizar e interpretar las distribuciones de linajes, se hace necesaria una visión holística, que incluya contribución teórica, metodológica y/o conceptual de campos de conocimientos muy diversos, tales como: genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática y filogenia, paleontología, geología y geografía histórica (Avice *et al.*, 2000). En un contexto global, el conocimiento y aplicación de marcadores moleculares, han permitido a esta disciplina responder diversas incógnitas y problemáticas (Eguiarte *et al.*, 2007). El acelerado desarrollo de técnicas moleculares en paralelo al conocimiento de la molécula de ADN mitocondrial (DNAm) a mediados de la década de los 70, contribuyeron de forma significativa a consolidar los análisis filogenéticos. Esto, debido a lo circular de la molécula y no tener histonas asociadas, siendo esta última una de las características que favorecen su alta tasa mutacional y justifican su empleo a escala microevolutiva, a diferencia de genes nucleares (Brown, 1985; Waincoat, 1987; Lunt *et al.*, 1998). Entre las propiedades que hacen del DNAm un marcador útil en filogeografía a nivel microevolutivo en especies animales, se encuentran: (1) exhibir un extenso polimorfismo y una tasa mutacional alta, por lo que evoluciona más rápidamente que el DNA nuclear de copia simple; (2) la mayoría de las variantes del DNAm involucran sustituciones nucleotídicas y son pocos los casos en que se observa cambios en longitud de la molécula; (3) la herencia del DNAm es “casi siempre” materna y normalmente no presenta recombinación genética intermolecular; y (4) la mayoría de los individuos son homoplásmicos para un DNAm prevalente.

La Filogeografía se ha usado para diversas aplicaciones, por ejemplo: (1) determinar el lugar de origen y vías de dispersión en especies consideradas plagas agrícolas o que han colonizado archipiélagos volcánicos (Roderick & Gillespie, 1998; Confalonieri *et al.*, 2000; Juan *et al.*, 2000); (2) determinar causas de variación poblacional observada en caracteres cromosómicos o genético y su correlación con gradientes geográficos y/o ecológicos

(Confalonieri *et al.*, 1998); (3) definir el tipo de especiación que explica la co-ocurrencia de distintos morfotipos de una especie (Bernatchez & Dodson, 1990); (4) reconocer poblaciones en riesgo de extinción (Avise, 2000); (5) determinar la influencia de la dispersión y vicarianza en la evolución de especies co-distribuidas en un contexto filogenético comparado (Bermingham *et al.*, 1997); (6) probar diferentes modelos de diversificación (Eguiarte *et al.*, 2007); (7) dilucidar aspectos de sistemática y taxonomía (Eguiarte *et al.*, 2007); y (8) reconstruir las relaciones filogenéticas de la especie humana "*Homo sapiens*", a corroborar la principal hipótesis sobre su origen y poner a prueba distintos modelos de evolución durante el pleistoceno (Ayala, 1995 a, b; Ayala *et al.*, 1994; Brown *et al.*, 1982; Cavalli-Sforza *et al.*, 1994; Li & Sadler, 1992; Nei, 1995). Esta última, merece mención especial por sus investigaciones basadas en DNAm, cuyos estudios han sido precursores en aplicar esta metodología de análisis, permitiendo posteriormente extenderla al resto de los grupos animales.

El enfoque filogeográfico de mayor consideración en investigaciones de orden mundial, ha consistido en definir el grado de estructuración poblacional de las especies a través de su rango geográfico (Eguiarte *et al.*, 2007; Avise, 2000). Entre estos, los circunscritos a sistemas marinos en general, indican que la capacidad de dispersión de las larvas de invertebrados bentónicos a menudo se corresponde con el modo de desarrollo (Scheltema, 1975; Hedgecock, 1986), donde la mayor permanencia en el plancton está relacionada con menor diferenciación entre poblaciones (Scheltema, 1971; Avise, 1994; Helberg *et al.*, 2001; Lessios & Robertson, 2006). La evidencia de esta relación ha sido encontrada en los estudios comparativos de las especies que varían en su potencial dispersivo (Kyle & Boulding, 2000). No obstante, el alto potencial de dispersión no siempre se traduce en altos niveles de flujo génico (Knowlton & Keller, 1986). La mayoría de las estimaciones de la dispersión de larvas marinas son indirectos (Levin *et al.*, 1993). Por lo tanto, hay poca información disponible sobre la verdadera magnitud del desplazamiento larval de estas especies en el plancton. A pesar de que el escenario de "homogeneidad a gran escala" (Levin, 2006) sugiere aceptarse considerando ausencia aparente de barreras a la dispersión, en muchos casos la capacidad de dispersión no coincide con los niveles de flujo genético o dispersión realizada (Ruzzante *et al.*, 2006; Kyle & Boulding 2000; Pogson *et al.*, 2001; Kenchington *et*

al., 2003; Jolly *et al.*, 2005; Florin & Höglund, 2007). Invertebrados marinos podrían no evidenciar su real capacidad dispersiva y tampoco niveles concomitantes del flujo genético debido a mecanismos locales de retención, tales como gradientes de temperatura (Newman, 1979; Wares *et al.*, 2001), patrones de circulación oceanográfica (Ketchum, 1954; Hedgecock, 1986; McConaugha, 1992) y el comportamiento larval (Burton & Feldman, 1982; Raimondi & Keough, 1990).

Por ello, cabe considerar que los patrones filogeográficos y biogeográficos regionales, surgen no sólo de las interacciones entre el pasado y presente y las historias de vida de especies con larvas planctónicas, sino también, de las limitaciones ambientales (Lester *et al.*, 2007 & Pelc *et al.*, 2009).

1.1 Características oceanográficas en la costa Oriental del Pacífico Sur

A gran escala la forma y configuración de este borde contrasta dos escenarios geográficos. Por una parte, la línea de costa desde Perú hasta la Isla de Chiloé (~41°S) es continua, suave y carece de quiebres o rasgos geográficos mayores. Destaca el “codo” de Arica (~18°S) situado en el límite político entre Perú y Chile, donde la línea costera cambia en forma abrupta desde una orientación S-O a una N-O, a partir del cual la costa es virtualmente recta hasta el Canal de Chacao. Por otra parte, todo el borde continental desde Chiloé hasta el Cabo de Hornos (~56°S) es un gran sistema insular (archipiélago Chileno) con profusión de golfos, fiordos y canales, un paisaje complejo resultante del efecto combinado de procesos tectónicos y de glaciación (Camus, 2001). En numerosos estudios, los puntos de quiebre filogeográficos se han relacionado con cambios térmicos ocurridos durante los períodos glaciales e interglaciares, en particular durante el último máximo glacial (UMG; hace 18000 a 20000 años), donde una capa de hielo (~1.800 km) cubrió la tierra desde la cordillera de los Andes hasta el mar, entre los 35°S -56°S (Clapperton, 1993; McCulloch *et al.*, 2000; Hulton *et al.*, 2002).

Biogeográficamente, las características oceanográficas actuales hacen resaltar tres aspectos. Primero, la influencia superficial de la Corriente de Deriva de los Vientos del Oeste (CDO) que se origina en el borde occidental del océano Pacífico (40°-45°S) llegando a la zona

frente a Chile con una dirección general hacia el Sureste (Reid, 1965; Wyrki, 1975; Silva & Neshyba, 1977). Esta corriente transporta aguas comparativamente más salinas desde el occidente, las que van disminuyendo su salinidad y se enfrían a medida que se acercan al continente sudamericano (Silva & Neshyba, 1979). Su brazo sur, une un flujo costero hacia el polo con la colaboración de la escorrentía fluvial, dando lugar a la Corriente del Cabo de Hornos (CCH). Las aguas sub-superficiales transportadas por esta última, generan una masa de agua sub-antártica modificada (menor salinidad), principalmente por el aporte proveniente de los canales australes del archipiélago Chileno, que terminan por unirse al este con la Corriente de Falkland en el atlántico (Montecino *et al.*, 2005). Su brazo norte forma el flujo principal (oceánico) del Sistema de Corriente de Humboldt (SCH) que avanza mar adentro hacia el Ecuador con aguas de baja salinidad y temperatura a una profundidad de ~300 a 400 metros entre 550 a 750 Km de la costa oeste de Sudamérica, hasta los 4°27'S (Sievers & Silva, 1975) (Fig.1). Entre los 40 a 48°S la CCH genera una rama de flujo norte que es mantenida por los vientos del sur y se denomina rama costera de Humboldt (RCH) (Silva & Sievers, 1981). Entre la rama costera (RCH) y oceánica de Humboldt (ROH) fluye una corriente sub-superficial hacia el sur denominada Contracorriente Perú-Chile (CPC), a una profundidad de 200 a 400 metros, distanciada entre 500 a 300 km de la costa (Ahumada, 2000). Los principales flujos hacia el polo están compuestos básicamente por CPC y la Corriente Sub-superficial Perú-Chile (CG) (o Corriente de Gunther), que tiene su origen en aguas ecuatoriales y fluye hacia el sur sobre la llamada Masa de Agua Intermedia (Lukas, 1986) (Fig.1). A pesar de existir controversias respecto a la localización de CPC en el margen oriental de Chile, ésta se ha definido como un flujo que se desplaza desde los 8°S a los 30° - 40°S, manteniendo su posición entre ~100 – 300 km fuera de la costa (Strub *et al.*, 1995). En cambio, la Corriente Sub-superficial Chile-Perú puede ser trazada a partir de su origen desde Perú (10°S) hasta el sur de Chile (48°S), entre la costa y 100 km hacia el oeste (Silva & Neshyba, 1979). En la zona norte, más hacia la costa, se encuentra la Contracorriente Costera Chilena (CCC) a una profundidad de ~150 metros. Esta corriente superficial débil, transporta agua salada, cálida, rica en oxígeno que en años de invierno crudo prácticamente desaparece. Las corrientes marinas ya descritas transportan masas de agua con distintas características físico-químicas, de manera tal que en ciertos puntos de confluencia de dichas masas se producen tres convergencias oceánicas: (1) Convergencia Subtropical (CST) que define al

norte la zona sub-tropical caracterizada por surgencias activas, salinidad variable y marcadas variaciones de temperatura superficial (TSM). Mientras que al sur, define la zona transicional central caracterizada por bruscos cambios de temperatura por aporte de ríos y lluvias de la porción sur que modifican su salinidad; (2) Convergencia de la Deriva del Oeste (CDO), que corresponde a la zona en la que se produce la bifurcación del SCH al norte y la CCH al sur y define el límite de la zona central transicional con la zona sur-antártica, caracterizada por aporte de agua dulce y un flujo permanente hacia el sur; y (3) Convergencia Antártica (CA), donde confluyen las aguas sub-antárticas y antárticas separadas por el frente polar. (Castilla *et al.*, 1993; Ahumada *et al.*, 2000; Montecino *et al.*, 2005) (Fig.1). El segundo aspecto de importancia lo constituye el patrón de surgencia costera, asociado principalmente a la masa de agua sub-superficial. La CCC y gracias a los vientos del sur y sureste, producen surgencias costeras que son más fuertes desde finales del invierno a inicios del verano y más débiles durante las estaciones cálidas. Las surgencias incluso ocurren al sur de la CCC hasta los 40°S - 41°S cuando la capa superior de la CPC alcanza la superficie a la altura dentro de la rama costera de Humboldt (Bernal *et al.*, 1983; Bernal, 1990). Así, las localidades comprendidas desde los ~40°S al norte, se encuentran dentro de uno de los sistemas de surgencia más importantes del mundo, que junto a la advección horizontal de gran escala serían responsables de mantener un sistema altamente productivo (e.g. ver Thiel *et al.*, 2007; Camus & Andrade, 1999), que a pesar de no estar claramente determinado su efecto sobre las comunidades litorales, sí parece ser un factor adicional que contribuye al enfriamiento de las aguas costeras adyacentes a la costa (Espinoza *et al.*, 1983). El tercer aspecto relevante lo conforma las “anomalías” oceanográficas y atmosféricas, particularmente “El Niño” Oscilación del Sur (ver Philander, 1983). Entre sus efectos en las costas de Chile y Perú se encuentran: (a) un aumento tanto de las temperaturas atmósfera-océano, como del nivel del mar; (b) modificación de los vientos y corrientes marinas; y (c) generalmente un crecimiento considerable de precipitaciones en zonas bajas y medias. Esta variación se reporta ha generado aumento en densidades poblacionales, altas mortalidades, emigraciones e inmigraciones, cambios en la actividad reproductora y cambios en los rangos de distribución: latitudinal, longitudinal y en profundidad (Castilla & Camus, 1992; Espino, 1999; Mendo & Wolff, 2003; Jahncke *et al.*, 2004). Estos visos de catástrofe se incrementan para el norte de Chile, sin embargo, hacia el sur, aunque menos intensos, sus efectos han sido detectados incluso en la Antártica (Croxall,

1992; Guinet *et al.*, 1994; Hucke-Gaete, 1992). Desde una visión evolutiva, es posible pensar que la fauna marina Chilena, dada la continua presencia del ENOS, debiera presentar mecanismos fisiológicos y ecológicos, como acoplamientos con eventos físicos que le permitan persistir o cambiar en un ambiente de tanta inestabilidad temporal.

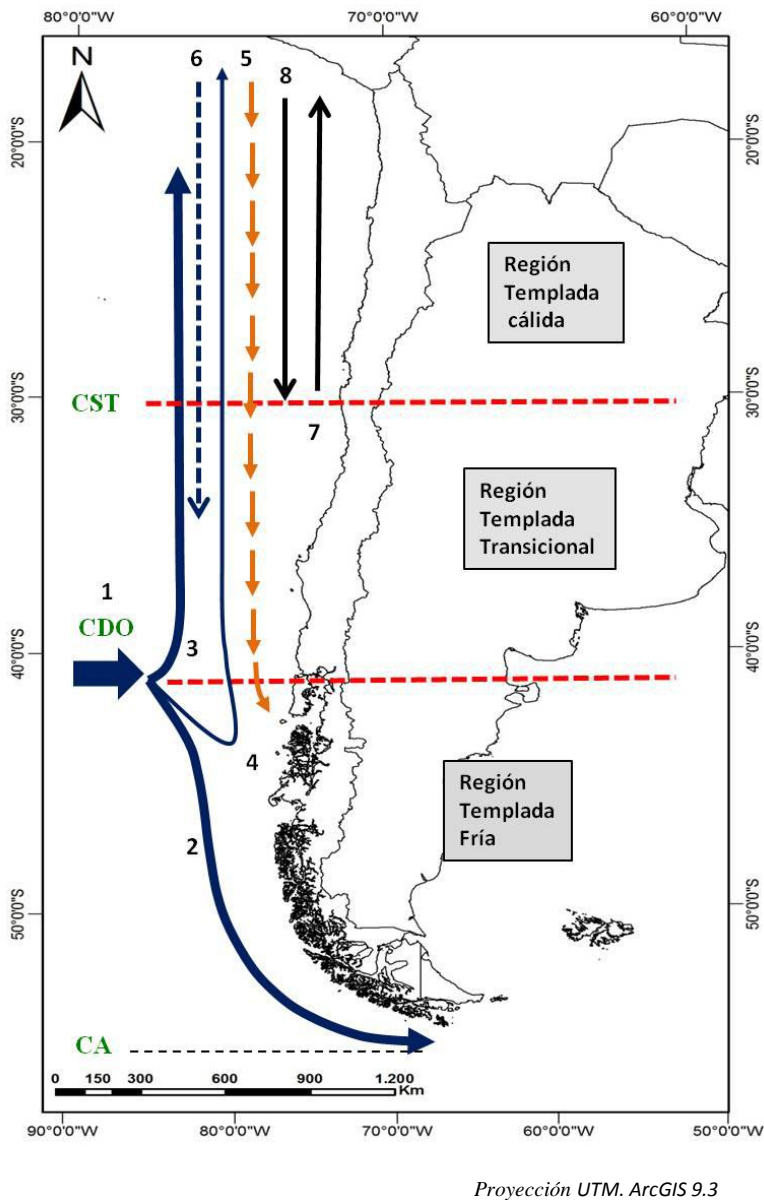


Figura 1. Patrón de circulación de corrientes en el PSO. (1) CDO= Corriente Deriva de los Vientos del Oeste. (2) Corriente Cabo de Hornos (CCH). (3) Rama Oceánica de Humboldt (ROH). (4) Rama Costera de Humboldt (RCH). (5) Corriente de Gunter (CG). (6) Contra corriente Perú-Chile (CPC). (7) Corriente costera Chilena (CCP) (8) Contra corriente costera Chilena (CCC). CST= Convergencia Subtropical; CA= Convergencia Antártica.

1.2 Estudios con enfoque filogeográfico en la costa Chilena

Las zonas de transición biogeográficas se han descrito en todos los océanos, donde la concordancia con quiebres filogeográficos se ha demostrado para una gran variedad de organismos (e.g. costa noreste de América, Avise, 2000; costa noroccidental de América, Dawson, 2001; costa sureste de Australia, Dawson, 2005; Atlántico norte, Maggs *et al.*, 2008). En Chile, gran parte de las investigaciones filogeográficas se encuentran circunscritas a la clasificación biogeográfica descrita por Camus (2001), quien discute sobre 27 clasificaciones publicadas, los factores y procesos dinámicos formadores de unidades, sobre los cuales se ha informado límites de rango para un gran número de especies (Santelices, 1980; Camus, 2001). Entre sus conclusiones, propone una hipótesis de clasificación biogeográfica a nivel de biotas en tres grandes áreas: (1) Provincia Peruana (PP) desde Perú hasta los 30°S, compuesta por biota de ambiente templado-cálido; (2) Provincia Magallánica (PM) desde los 42°S hasta los 56°S, con biota austral de ambiente templado-frío; (3) el Área Intermedia (AI) habitada por biota con características de mezcla de las provincias contiguas. Estas tres áreas espaciales definen dos quiebres biogeográficos de distinta naturaleza. El primero, entre los 30°-33°S, reportado como una zona transicional con diferencias importantes en la abundancia, diversidad y reclutamiento de varias especies de invertebrados marinos intermareales (Broitman *et al.*, 2001; Rivadeneira *et al.*, 2002). La segunda transición se ubica alrededor entre los 40-42°S y se ha reconocido como un importante quiebre biogeográfico por contribuir al aislamiento relativo de la flora y fauna de fiordos Patagónicos (Castilla *et al.*, 1993; Valdovinos *et al.*, 2003). En general, no sólo en Chile, la biogeografía marina se ha construido principalmente sobre una base descriptiva de los conjuntos de especies y con un enfoque más bien estático, sin esfuerzos significativos que expliquen la formación- dinámica o mecanismos generadores de unidades biogeográficas actuales (revisado de Camus, 2001). Por ello, los tres aspectos claves señalados por Castilla (1979) (estructura, historia y dinámica) siguen siendo relevantes y los menos conocidos a nivel de biotas.

Se han realizado diversos estudios con enfoque filogeográfico abarcando la costa Chilena a distinta escala geográfica, entre ellos, especies de invertebrados, un alga y un vertebrado han mostrado concordancia entre la divergencia genética y la zona de transición

biogeográfica de los 30-33°S. Tellier., *et al* (2009) para un alga parda de amplia distribución y dispersión limitada, encontraron dos linajes divergentes dentro de *lessonia nigrescens*, una a cada lado de esta transición. Diferencias importantes entre marcadores (cloroplasto, mitocondria y núcleo) se hicieron evidentes en relación con la intensidad de la divergencia genética, acoplado a eventos históricos y contemporáneos de la región. Entre los invertebrados marinos con diferenciación genética en esta zona biogeográfica, se encuentra el reporte de Zakas *et al.*, (2009) en dos especies co-distribuidas de cirripedios; *Jehlius cirratus* y *Notochthamalus scabrosus*. Este estudio a pequeña escala geográfica (28°S-34°S) evidenció marcada ruptura en las frecuencias de haplotipos del marcador mitocondrial (COI) en *N. scabrosus*, pero débilmente en *J. cirratus*. Sus autores responden a este patrón por la diferente habilidad dispersiva (comportamiento larval) y la eventual disparidad que ejercen las presiones selectivas entre ambas especies. A una escala geográfica amplia (28°S – 58°S), Sánchez *et al.*, (2011) para el gastrópodo marino *Acanthina monodon*, también encontraron esta pausa filogeográfica, sugiriendo los eventos históricos regionales y la historia de vida que presenta la especie (ciclo directo de desarrollo), como los factores principales modeladores de la estructura. Este patrón de estructura genética robusta asociado a especies con ciclo de desarrollo directo, también fue encontrado por Brante *et al.*, (2012) en las especie *Crepidatella dilatata* en 543 km de costa y en *Crepidula coquimbensis* en localidades contiguas a la zona transicional (Vilches *et al.*, (2012). Para el primer caso se conjetura que el limitado flujo de genes podría potenciar el proceso de especiación y para el segundo, se menciona como ente clave en la dispersión, al cangrejo ermitaño con el cual co-habita. Este último informe constituye un aporte relevante en lo que a especies con relación asociativa se refiere, aparte del hermafroditismo. A otra escala geográfica, un crustáceo cuyo taxón representa un complejo de especies divergentes en Panamá, fue estudiado en costas Chilenas, presentando el mismo patrón críptico de especies dentro de *Excirolana brazilensis* (Varela & Hayes, 2012). Este estudio a través del rango estudiado en Chile (18°S a 38°S), mostró clados divergentes que se condicen con la transición de menor latitud.

En cuanto a estudios comparados de estructura genética, destaca el reporte de Hayes *et al.*, (2014) mediante un estudio a distinta escala geográfica en ocho especies de invertebrados bentónicos con distinto potencial dispersivo, encontrando firma genética actual para el quiebre en cuestión en cuatro especies catalogadas como “dispersores bajos” (*Orchestoidea*

tuberculata, *Scurria scurra*, *Stichaster striatus* y *Tegula atra*). Usando el mismo marcador molecular (COI), este estudio muestra una relación consistente entre la estructura genética y el potencial dispersivo, sugiriendo que este último es un determinante robusto de la diversidad genética, la diferenciación y discontinuidad genética respecto a esta transición biogeográfica en especies bentónicas costeras del mar Chileno. Finalmente, también se evidencia pausa genética con esta transición biogeográfica en un vertebrado ampliamente distribuido en América del Sur, el mamífero *Lontra felina* (Vianna *et al.*, 2010). Diferencias filogeográficas claras entre los linajes norte y sur de Chile (13°S a 43°S) fueron reportados como consecuencia aparente de una colonización post-glacial reciente en la zona sur debido a la gran divergencia presente en el norte.

Discontinuidades genéticas congruentes con ambas zonas transicionales 30-33°S y 40-42°S han sido reportadas en dos especies de algas de amplia distribución e invertebrados bentónicos. Macaya & Zuccarello (2010) encontraron baja diversidad genética del gen mitocondrial para el alga parda *Macrocystis pyrifera* en el norte de Chile, asociado a eventos contemporáneos (e.g. El Niño Oscilación del Sur, ENOS), mientras que la distribución de haplotipos en la zona sur reflejaría el efecto de acontecimientos históricos (Ultimo Máximo glacial, UMG). En el reporte de Montecinos *et al.*, (2012) proponen la presencia de tres linajes monofiléticos genéticamente muy distintos y separados a nivel geográfico (Norte, Centro y Sur) en el alga parda *Mazzaella laminiaroides*. Marcadores mitocondriales siguieron la existencia de un complejo de tres especies crípticas separadas por las dos zonas transicionales descritas por Camus (2001).

Los estudios anteriores aportan información apreciable en cuanto a estructuración genética congruente a quiebres biogeográficos en especies con distinta historia de vida. No obstante, los trabajos para especies ampliamente distribuidas con clara homogeneidad genética (sin estructura), son escasos. Los invertebrados bentónicos *Emerita analoga*, *Heliaster helianthus*, *Petrolisthes violaceus* y *Tetrapyrgus niger* estudiados en la zona norte y centro de Chile, no mostraron discontinuidad genética para la transición biogeográfica de los 30-33°S. Estas especies se catalogaron como “dispersores altos”, donde hubo congruencia entre el potencial dispersivo y el flujo de genes (Hayes *et al.*, 2014). El gasterópodo bentónico *Concholepas*

concholepas constituye el único reporte en un organismo marino de amplia distribución sin pausa genética a lo largo de los dos quiebres biogeográficos descritos (30-33°S y 40-42°S). Sus autores, Cárdenas *et al.*, (2009) proponen expansión demográfica de un solo haplotipo, el que habría borrado la firma de cualquier estructura genética preexistente en todo rango estudiado (11°S - 49°S). El escenario de “homogeneidad a gran escala” explicaría la distribución actual de la diversidad genética, postulando que su extensa fase larval (~3 meses) le otorgaría una alta capacidad dispersiva y consecuente homogeneidad genética.

Pese a la trascendente contribución de los estudios filogeográficos para el PSO en los últimos seis años, los procesos evolutivos (históricos y contemporáneos) determinantes de la actual distribución para una gran cantidad de taxas, al igual que la extensa comprensión de la biología e historias de vida, siguen basándose principalmente en organismos de vida libre. Por ende, el diferencial conocimiento en desmedro de especies parásitas y/o comensales, ponen límites a la comprensión en la evolución de muchos taxas que habitan o han adaptado su estilo de vida a ambientes muy específicos, entre estos, un constreñido conocimiento respecto a la influencia de los quiebres transicionales sobre su distribución. Teniendo en cuenta los sesgos ambientales y como mencionan Via *et al.*, (1995), al existir alta variabilidad ambiental en los hábitat que ocupa una especie, es poco probable que un solo fenotipo maximice la sobrevivencia en todas las situaciones. De aquí que, organismos que habitan microambientes muy específicos, donde el principal factor de influencia lo constituye el medio biótico de su hospedero (Rhode, 1984), son un excelente modelo para responder a la incógnita, si emergentes generalidades filogeográficas también podrían aplicar a organismos parásitos y/o comensales.

1.3 *Pinnaxodes chilensis* como modelo biológico

El crustáceo brachyuro *Pinnaxodes chilensis*, tiene la particularidad de habitar al interior del recto del erizo comestible *Loxechinus albus*. Relación de comensalismo que descrita para hembras adultas de esta especie (Gutiérrez & Martínez, 1971), mientras que otros autores mencionan al macho con conducta de vida libre y escasamente visible (Rathbun, 1918; & Garth, 1957). El dimorfismo sexual por tamaño corporal también se describe para *P. chilensis*, siendo las hembras poseedoras de un caparazón liso, oval y frágil, que supera hasta tres veces la longitud de los machos. Sus márgenes son redondeados, ojos parcialmente visibles en vista dorsal con superficie ventral del cuerpo y pereiópodos cubiertos de pelos suaves, donde el segundo y tercero son más largos que el primero y el cuarto. Los machos, contrariamente, se califican como enanos (longitud máxima de 2 cm), caparazón calcificado con el cuarto pereiópodo más pequeño (Rathbun, 1918; Garth, 1957 & Zúñiga, 2002).

La aparente simbiosis que genera esta especie, le permite en términos generales beneficiarse de su hospedero en dos aspectos: (1) poseer un hábitat estable dentro de la porción distal de su intestino, recibiendo gran homogeneidad del medio ambiente (Báez & Martínez, 1976) y (2) el alimento suficiente compuesto de los residuos fecales (Miyake, 1939 & Fenucci, 1967). Esta asociación es muy frecuente (Schwabe, 1936; Báez & Martínez, 1976; Gutierrez & Martinez, 1971; Jangoux, 1987) por ello comúnmente se denomina “jaiba del erizo”. De hecho, Claudio Gay (1854) define a *P. chilensis* de esta manera: “Especie sumamente notable por su habitación: siempre la hayamos dentro de los erizos y cada individuo tenía el suyo, lo cual es tan constante que muchas personas creen que es el animal mismo del erizo donde se halla, pero es una grande equivocación”.

Destacamos que ambas especies son típicas de aguas sub-antárticas. Por un lado, *P. chilensis* se distribuye desde Ecuador, frente a Islas Galápagos a Puerto Barroso en Chile (Retamal, 1981) y, por otro, *Loxechinus albus* se distribuye ininterrumpida desde el norte de Perú, frente a Isla Lobos de Afuera hasta el extremo austral de Chile (Cabo de Hornos, 55°52`S) y Tierra del Fuego en el sector Argentino (Guisado & Castilla, 1987).

Así mismo, ambas especies poseen importancia económica, el comensal se consume entero y es considerado una exquisitez (Vásquez & Bay-Schmith, 2011), mientras que las “lenguas” o gónadas de su hospedero *L. albus*, constituye uno de los recursos bentónicos

costeros más importantes para Chile. Cabe señalar que la explotación comercial del recurso erizo ha llevado prácticamente a la extinción de las poblaciones naturales a lo largo de la costa chilena, donde esta pesquería opera actualmente con una temporada de veda y restricción de talla (González *et al.*, 2008). Hasta la actualidad se han llevado a cabo diversas metodologías para asegurar la protección de la especie, sin embargo, los antecedentes respecto a esta relación o del comensal mismo con el cual cohabita, son exiguos. Frente a los escasos reportes y en un intento de dar luces sobre la desconocida historia de vida de *P. chilensis*, resulta indispensable considerar aspectos a nivel de familia.

Los cangrejos Pinnotheridae constituyen unos de los grupos más diversos y abundantes entre los decápodos que han adoptado un hábito de vida simbiótico (Ross, 1983). Presentes en aguas tropicales y templadas alrededor de todo el mundo, han sido descritos como comensales o parásitos de organismos de vida sésil, hemisésil o vágil. Entre sus hospedadores se encuentran ascídeas, holoturoideos, equinoideos, moluscos bivalvos y gastrópodos (Christensen & MacDermontt, 1958; Wells & Well, 1961; Telford, 1978; Ross, 1983).

La asignación de larvas por familia o género es una tarea complicada, en especial cuando se desconoce la diversidad biológica existente. Esto se ve acrecentado cuando se altera el desarrollo ontogénico o tanto las mudas como la morfogénesis pasan a constituir procesos heterocrónicos que dan lugar a más de una morfología por estadio (Finchman, 1979; Finchman & Figueras, 1986; Criales & Anger, 1986; Freeman, 1990 y 1991; Albornoz, 1996). De ahí que, la taxonomía de los diferentes estadios larvales de decápodos es escasamente documentada comparándola con estudios similares sobre adultos (Ingle, 1992). No obstante, una buena aproximación es entregada por varios autores que bajo condiciones de laboratorio han identificado la duración y estadios larvales de algunos géneros de la familia Pinnotheridae, conviniendo en cinco zoeas y una megalopa con duración de un mes como mínimo estimado (Marques & Pole, 1996; Ocampo *et al.*, 2010).

El modo de desarrollo, especialmente el tiempo que las larvas pasan en el plancton, sin duda, juega un papel crítico en el gobierno de la estructura genética y filogeográfica en el mar (e.g. Scheltema, 1988; Doherty *et al.*, 1995; Bohonak, 1999; Dawson, 2001; Lester *et al.*, 2007). Por ello, el cuadro que surge es que, la historia de vida influye fuertemente en el flujo de genes, la estructura de la población y la distribución de las especies (Bohonak, 1999).

Aunque existen varios estudios biológicos en el mundo para esta familia y sus especies hospedantes, poco se sabe acerca de sus ciclos y estrategias de vida y menos aún sobre las influencias del medio ambiente biótico. Esto, considerando que deben adaptarse a las limitaciones de orden físico, fisiológico y movimiento de sus huéspedes, lo cual podría modificar no solo su morfología, fisiología, reproducción y comportamiento, sino también la de quienes los cobijan (Patton, 1967).

Un único estudio respecto a la influencia latitudinal de variables ambientales sobre rasgos reproductivos en *P. chilensis*, es reportado por Lardies & Castilla (2001). Sus autores comparan diversos parámetros de la biología reproductiva en tres sitios equidistantes de la zona centro-norte de Chile, concluyendo tres hitos importantes; (1) el número de huevos disminuye de baja a altas latitudes, (2) el tamaño del huevo aumenta inversamente a su número y (3) el rendimiento reproductivo es mayor hacia el polo. Variaciones en estos rasgos, explican, estarían modeladas por variables ambientales como temperatura y salinidad, las que no sólo influirían sobre rasgos reproductivos sino también morfológicos. Es decir, el macroambiente, que se define como el entorno de acogida (Rohde, 1984), afecta directamente aspectos biológicos del pinotérico. Así, la relación positiva entre la latitud y parámetros reproductivos en cuestión, sería el primer informe de *P. chilensis* como comensal, dado que se observa un equilibrio entre condiciones ambientales externas (T° y $S\%$), las larvas de vida libre y la estrategia reproductiva de la especie (Lardies & Castilla, 2001).

Considerando la diversidad del orden decápodo debido a gradientes latitudinales, las evidencias también apuntan a que las variaciones morfológicas se corresponden a condiciones ecológicas y ambientales particulares. En estomatópodos, por ejemplo, se ha comprobado una relación positiva entre el tamaño del cuerpo y la distribución geográfica (Reaka, 1980), mientras que en otros grupos se sugiere un incremento en el tamaño del cuerpo en relación con bajas temperaturas y aumento de la profundidad. Abele (1982), por otro lado, encontró una relación positiva entre el tamaño de las quelas y el gradiente geográfico en algunas especies de decápodos. Esta aparente plasticidad morfológica de los crustáceos podría contribuir en los estudios de reconocimiento de poblaciones locales, o dilucidar patrones de comportamiento y reproducción por medio de complejas adaptaciones de apéndices claves. Por eso, especies de la familia Pinnotheridae constituyen un excelente modelo para la realización de estudios morfométricos múltiples, donde estas adaptaciones son un sistema intrigante y, en

consecuencia, casi todas las características morfológicas de estos cangrejos están adaptados para su relación inter-específica (Palacios-Thiel *et al.*, 2009).

En cuanto a los efectos de la latitud sobre la distribución de la diversidad genética de *P. chilensis*, podrían “predecirse”. Siguiendo el escenario de “homogeneidad a gran escala” se esperaría un nivel de conectividad importante entre poblaciones espacialmente aisladas, lo cual resultaría en un bajo coeficiente de consanguinidad, alta diversidad genética y poblaciones poco estructuradas.

Los antecedentes antes descritos, definen a *P. chilensis* como una especie con características excepcionales, que lo transforman en un modelo biológico interesante para probar patrones de conectividad y variaciones de forma, a lo largo de regiones biogeográficas. (1) Posee un amplio rango distribucional que atraviesa las dos zonas transicionales descritas para el PSO. (2) Cuenta con fase larval planctónica dispersiva. (3) Se evidencia variación latitudinal en rasgos reproductivos y aparente plasticidad morfológica (4) Es una especie con escasos antecedentes, por ende los patrones a desarrollar constituyen la primera contribución en su naturaleza. (5) Establece relación inter-específica con una de las especies más explotadas e importantes para Chile en términos socioeconómicos.

Usando marcadores moleculares y herramientas de morfometría clásica, esta investigación tiene como propósito caracterizar aspectos genético-poblacionales, y variación de la forma en casi todo el rango distribucional de *P. chilensis*. Con un enfoque filogeográfico se aportará información relevante de los patrones evolutivos (históricos y contemporáneos) de organismos comensales y en qué medida influyen los quiebres transicionales sobre su distribución.

HIPÓTESIS

Las zonas transicionales (30°S y 42°S) no actúan como filtros regionales o son suficientemente permeables a la dispersión realizada por *Pinnaxodes chilensis*, por lo que el alto flujo de genes entre sus poblaciones no evidencian estructura genética ni morfológica a lo largo de la costa Oriental del Pacífico Sur.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar y determinar, respectivamente, el patrón genético-poblacional y la variabilidad morfológica de *Pinnaxodes chilensis*, en relación con las zonas transicionales descritas para la costa Oriental del Pacífico Sur.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Caracterizar las variables oceanográficas (temperatura y salinidad) de cada punto muestreado.
2. Determinar descriptores poblacionales de *Pinnaxodes chilensis*, tales como: prevalencia, intensidad media, abundancia media y frecuencia de ocurrencia de sexos.
3. Describir la distribución de tallas comensal – hospedero y determinar la variabilidad morfológica de *Pinnaxodes chilensis* entre y dentro de regiones biogeográficas.
4. Caracterizar la variabilidad genética de *Pinnaxodes chilensis* por medio del marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) a lo largo de su rango distribucional.
5. Evaluar el patrón actual de distribución espacial de la diversidad genética y morfológica, y su relación con posibles eventos histórico-contemporáneos de la región.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Muestreo

2.1.1 Área de estudio

Comprendió los paralelos 23°38'S y 54°56'S, cubriendo un total de ~ 3.500 kilómetros de litoral (Fig.2) que consideran casi la totalidad del rango distribucional de *Pinnaxodes chilensis* en costas chilenas (Fenucci, 1967). Esta franja costera (> 30 grados) se caracteriza por poseer heterogeneidad geográfica-ambiental, donde se distinguen escenarios contrastantes. Considerando la clasificación biogeográfica para el Pacífico Suroriental (PSO) de Camus (2001), nuestro modelo de estudio se encuentra distribuido en tres grandes zonas biogeográficas; Provincia Peruana, Área Intermedia y Provincia Magallánica, las que se encuentran separadas por dos quiebres, uno a los 30°S y otro a los ~ 42°S respectivamente. Para contrastar la variabilidad genética y morfológica de *P. chilensis* con la biogeografía descrita, se recolectaron 15 poblaciones de su hospedero, *Loxechinus albus* (Fig. 1). El criterio anterior se basa en la relativa y decreciente prevalencia que presenta *P. chilensis* de baja a altas latitudes (Lardies & Castilla, 2001) en tres localidades centro-norte de nuestro país. Con esta derivación se aseguró obtener al menos tres localidades por región biogeográfica que permitan hacer inferencias estadísticas del polimorfismo intra-poblacional (Waples, 1998).

2.1.2 Obtención de material biológico

Los ejemplares de *P. chilensis*, fueron colectados durante el periodo estival 2012. *Loxechinus albus*, es un recurso de importancia económica para Chile que cuenta con periodos de veda biológica temporal establecidos en el D.S. N°291 del 30 de septiembre de 1987, orientado a evitar su captura durante la fase de máximo desove (www.subpesca.cl). En este contexto, los muestreos correspondientes a las localidades de la Provincia Magallánica, en su mayoría se realizaron mediante autorización de la Subsecretaría de Pesca en conformidad a los términos técnicos de referencia “*Pesca de investigación exploratoria en el recurso Loxechinus albus*”, con resolución exenta N°175.

La colecta de muestras se realizó mediante buceo autónomo por medio de pescadores artesanales a una profundidad media de 25 metros e inmediatamente trasladadas a laboratorio o lugar habilitado para su análisis. Los ejemplares (comensal y hospedero) encontrados se procesaron con máximo de un día a posteriori para evitar degradación del material genético. El tamaño muestral de *L. albus* colectado y procesado fue de 890 individuos (Tabla 1).

2.2 Procesamiento de muestras

2.2.1 Medición y Disección de *Loxechinus albus*

A cada ejemplar se le determinó el peso húmedo con una balanza digital (sensibilidad de 0,05 g) y el diámetro máximo de testa (LT) con un calibrador pie de rey digital (precisión de $\pm 0,02$ mm), previo a examinar presencia o ausencia de *P. chilensis*. La disección de erizos se realizó con tijera recta de punta fina (10,5 cm) mediante un recorte circular vertical comenzando desde el periprocto, pasando por la membrana peristomial hasta retornar nuevamente al centro del hemisferio aboral. De esta forma, se logró la bipartición del animal manteniendo siempre la integridad del intestino por constituir nuestro órgano objetivo.

2.2.2 Revisión del intestino de *Loxechinus albus*

Como lo describen varios autores, *P. chilensis* habita en el extremo distal del intestino de su hospedero (hemisferio aboral) (e.g. Miyake, 1939; Fenucci, 1967; Báez & Martínez, 1971), por tal razón se revisó cuidadosamente la región (Fig. 7). Los erizos con presencia de *P. chilensis* fueron manipulados con pinzas rectas de punta roma jalando el decápodo desde el quelícero más cercano al ano por el frágil caparazón de hembras (Zúñiga, 2002), hasta desvincularlo completamente de la mucosa epitelial y depositarlo en un tubo falcon PP de 50 ml con etanol al 95%. El material utilizado en disección y manipulación de muestra biológica se desinfectó con alcohol, cloro y agua destilada para evitar contaminación cruzada. Finalmente, las muestras se rotularon por color según área biogeográfica y se almacenaron en bolsas plásticas por localidad a temperatura ambiente (Fig.2), con un recambio de etanol posterior a su fijación de uno o dos días.

2.3 Morfología de *Pinnaxodes chilensis*

2.3.1 Características del crecimiento

Los reportes del crecimiento en estos decápodos se vinculan directamente al proceso de ecdisis, ya que durante el ciclo de vida hay una sucesión de mudas separadas por inter-mudas, que son más frecuentes en las primeras etapas de vida del animal (Petriella & Boschi, 1997). Normalmente, esta característica implica la eliminación del antiguo exoesqueleto y la formación de un tegumento nuevo de mayor tamaño (generalmente), gobernado por un complejo sistema endocrino que no puede considerarse como evento aislado, sino como parte de un ciclo continuo de actividad metabólica, según lo mencionan diversos estudios (Olmsted & Baumberger, 1923; Darch & Tchernigovtzeff, 1967, Skinner *et al.* 1985; Lachaise *et al.* 1993). El crecimiento en crustáceos entonces, se advierte como un incremento de talla, peso o forma casi instantáneos, que ocurre de forma discontinua.

En particular, el incremento en la forma a través de las sucesivas mudas en el ciclo de vida de *P. chilensis*, entrega importantes antecedentes de su variabilidad morfológica a lo largo de su rango distribucional. Por ello, en esta investigación se usaron mediciones consideradas para crustáceos decápodos en general, que explican ritmos diferenciales tanto para crecimiento absoluto como también relativo.

2.3.2 Medición de los comensales

Se analizó un total de 217 ejemplares de *P. chilensis*, obteniendo en todos ellos nueve dimensiones del exoesqueleto. Con el objeto de reflejar de mejor manera los cambios morfológicos (crecimiento relativo) se consideró gran parte de las estructuras presentes en la especie, las que incluyeron: (1) longitud del caparazón (LC), (2) ancho del caparazón (AC), (3) altura (H), (4) largo del tercer segmento abdominal (L3S), (5) ancho del tercer segmento abdominal (A3S), (6) largo del quelícero izquierdo (LQI), (7) ancho del quelícero izquierdo (AQI), (8) largo del quelícero derecho (LQD) y (9) ancho del quelícero derecho (AQD) (Fig.3). La longitud del caparazón se midió desde el extremo frontal hasta el final del caparazón, mientras que el ancho lo fue a nivel del margen de la región branquial de ambos costados. La altura de *P. chilensis* se calculó como la distancia en milímetros entre el ápice del caparazón hasta el centro del cuarto segmento abdominal aproximadamente (ventral) (Fig.3A).

Al tercer segmento abdominal se le midió el ancho, considerando ambas líneas que lo separan de los segmentos contiguos en su parte más ancha, mientras que el largo lo fue desde ambos extremos laterales (Fig.3C). Para el caso de los quelíceros, se midió el largo desde el punto de articulación con el carpo hasta el extremo distal del propodio y su anchura fue perpendicular a la longitud desde el punto superior de inserción del dácilo. Estas mediciones fueron realizadas de igual forma para el quelícero izquierdo y derecha (Fig.3B).

Los ejemplares se montaron en placa petri y en su mayoría fueron medidos bajo lupa estereoscópica (Zeiss, Stemi DV4) con diferentes aumentos, por el diferencial tamaño de los individuos.

2.4 Caracterización de variables ambientales

2.4.1 Salinidad (S ‰)

Se caracterizó la salinidad (S ‰ en ups) costera para las 15 localidades del gradiente latitudinal. Se obtuvieron datos (ppm) de los últimos 60 años, estableciendo un perfil de salinidad promedio a lo largo de toda la costa chilena. Este set de datos fue extraído desde World Ocean Atlas (WOA09) <http://www.nodc.noaa.gov/OC5/WOA09/pubwoa09.html> para posteriormente confeccionar el perfil de climas en el programa Ocean Data View (ODV) (Schlitzer, 2002).

2.4.2 Temperatura Media Superficial del mar (TSM)

En cuanto a la TSM, se obtuvieron datos promedio entre los meses de septiembre 2011 a abril 2012 procedentes de la combinación de sensores Advanced Very High Resolution Radiometer (AVHRR) y Advanced Microwave Scanning Radiometer (AMSR) e información in-situ procedentes de barcos y boyas, con las cuales se corrige sus sesgos. Esta información se extrajo de <http://www.ncdc.noaa.gov/oa/climate/research/sst/oi-daily.php> con una resolución espacial de 25 km x 25 km. Información adicional puede ser consultada en Reynolds *et al.* (2007).

2.5 Descriptores poblacionales de *P. chilensis*

En esta investigación se considera la relación entre *Loxechinus albus* y *P. chilensis* como inter-específica de beneficio, definiendo a *Pinnaxodes chilensis* como una especie comensal. Pese a su categoría, se realizaron estimaciones descritas en parásitos según Bush *et al* (1997), que las define como;

2.5.1 Prevalencia de infección

Número de huéspedes infectados con uno o más individuos de una determinada especie de parásito dividido por el número de huéspedes examinados, expresado en porcentaje. Análisis de regresión lineal simple fue usado para establecer la prevalencia de *P. chilensis* respecto a la latitud y mediante un ANDEVA se determinó la significancia estadística de tal relación ($P < 0,05$).

2.5.2 Intensidad media de infección

Número promedio de individuos de una especie de parásito encontrados en un huésped. Sólo se considera a individuos infectados con una especie particular de parásito. Se representa tal parámetro a nivel latitudinal mediante gráfico de dispersión.

2.5.3 Abundancia media de infección

Número promedio de individuos de una especie de parásito encontrados en un huésped. Sólo se considera el número total de hospedadores examinados (infectados y no infectados).

2.5.4 Identificación y frecuencia de sexos

Se describe a *Loxechinus albus* con la característica particular de hospedar a hembras adultas del crustáceo braquiuro *P. chilensis* (Gutiérrez & Martínez, 1971). No obstante, se hizo una revisión bibliográfica y se analizó bajo lupa aquellas estructuras diagnósticas del dimorfismo sexual. Rasgo evidente en la identificación de sexos para la familia Pinnotheridae es el tamaño corporal, señalando al macho como enano (ver Fig.5). Además, se usó identificación general para miembros del infraorden brachyura, que describe el abdomen de la hembra más amplio que el macho y por lo general con cuatro pares de pleópodos que se

conservan para incubar los huevos (Fig.4B). Distintamente, en el macho se reporta la existencia de sólo dos pares anteriores de pleópodos que en muchas especies está modificado como órgano copulador (Rupert & Barnes, 1996) (Fig.5B). Estos criterios fueron categóricos para determinar la presencia no sólo de hembras, sino también de machos comensales a lo largo de su rango distribucional. Para el caso de las hembras se chequeó, además, la presencia o ausencia de huevos, para así tener en cuenta la dinámica de producción de los mismos a nivel latitudinal (Fig.4B). Finalmente, la posición del gonoporo también fue utilizada como estructura para identificar el sexo, lo que posteriormente permitió estimar frecuencia de ocurrencia de machos y hembras en todo el gradiente latitudinal. Estos antecedentes fueron registrados mediante fotografías digitales con una cámara canon Power Shot A620, adaptada a lupa estereoscópica por medio de un tubo para canon A610/620 52mm wide.

2.6 Distribución de tallas comensal – hospedero

2.6.1 *Loxechinus albus* a nivel latitudinal

Considerando la clina ecológica y ambiental particular del rango geográfico de distribución de *L. albus*, se determinó el grado de asociación lineal entre la longitud de testa (LT) y latitud respectiva mediante correlación de Pearson (1896). Este coeficiente (r) se obtuvo a partir de la tipificación del promedio de las puntuaciones diferenciales de cada caso (desviaciones de la media).

2.6.2 Relación de tamaño comensal-hospedero

Para especies supeditadas a microambientes específicos se ha aceptado ampliamente una relación de tamaño positiva con su hospedero, como el caso de muchos parásitos. Sometiendo a prueba este supuesto, aludiendo el estilo de vida asociado y en favor de estimar un efecto adaptativo de *P. chilensis* a los factores externos que condicionan el crecimiento de su hospedero, se evaluó un análisis de varianza sobre un modelo de regresión lineal simple. Se usó la longitud del caparazón (LC) de *P. chilensis* como variable respuesta en función de la longitud de testa (LT) de *L. albus*, estableciendo significancia estadística del modelo por medio de $p < 0,05$.

2.6.3 Presencia/ausencia de *P. chilensis* en su hospedero *L. albus*

La desconocida historia de vida de *P. chilensis* no permite establecer el momento (estadio) de ingreso del comensal al huésped respectivo. Sin embargo, estimar a qué talla (LT) de *L. albus* es posible observar presencia de *P. chilensis*, otorga un avance de contribución importante a la comprensión y discusión del inicio del comensalismo. Para este fin se usó un análisis de regresión logística con posterior validación estadística del modelo a través de prueba Chi-cuadrado.

2.7 Variabilidad morfológica latitudinal de *P. chilensis*

2.7.1 Análisis de varianza basado en permutaciones (PERMANOVA)

Se comparó la variabilidad morfológica de 192 hembras de *Pinnaxodes chilensis* a lo largo del gradiente latitudinal sobre las siguientes variables biométricas: LC, AC, H, L3S, A3S, LQD, LQI, AQD y ADI. Estas variables fueron transformadas a matrices de distancias euclidianas, las que luego fueron comparadas a través de análisis de varianza usando permutaciones con el objetivo de determinar diferencias morfológicas entre áreas biogeográficas y entre localidades. Un diseño de PERMANOVA anidado, fue realizado usando “área” como factor fijo y “localidad” como factor aleatorio anidado en “área”. Todos los valores de probabilidad (P_{perm}) fueron derivados de una distribución de pseudo-F calculada a través de 10.000 permutaciones del mismo grupo de datos; cuando las permutaciones simuladas fueron <1000, el valor de probabilidad fue obtenido a través de simulaciones de Monte-Carlo (P_{MC}).

Análisis de Componentes Principales (PCA, e.g. matriz varianza-covarianza) fue realizado para extraer la variación espacial de las dos primeras variables de forma para cada individuo analizado. En forma paralela, Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) fue realizado para identificar centroides poblacionales, los cuales estiman tamaños de efecto, interacciones entre factores, e identifican la heterogeneidad de la dispersión en diseños anidados, representando la variación morfológica promedio de las localidades dentro de áreas biogeográficas (Quinn & Keough 2002; Anderson *et al.*, 2008). Se excluyó en estos análisis a

los individuos machos por constituir un bajo porcentaje del universo muestral y presentar dimorfismo sexual de tamaño corporal.

2.7.2 Análisis de dimorfismo sexual en quelíceros

El dimorfismo sexual en el tamaño de las quelas y la presencia o ausencia de un crecimiento relativo positivo respecto a las mismas estructuras entre machos y hembras, sugiere el grado de selección sexual y sistema de apareamiento (Baeza, 1999). En este contexto y considerando la conducta comensal de la hembra, reproducción interna por cópula y vida libre del macho, se determinó diferencias significativas de propodios tanto para el mismo individuo como entre sexo mediante pruebas estadísticas t de Student sobre las variables largo y ancho. Para el caso de la hembra y tras basar su alimento en restos del intestino de su hospedero, se evaluó en 182 individuos un posible desarrollo heteroquelar atribuible a un uso diferencial de estas estructuras mediante una prueba t dependiente. Para determinar diferencias de crecimiento relativo respecto al tamaño corporal entre sexos, se comparó los largos del propodio en 23 machos y 182 hembras de *P. chilensis* mediante una prueba t independiente. Análisis que nos ayudarán en posteriores inferencias del sistema de apareamiento a nivel específico.

2.8 Extracción de material genético, PCR y Secuenciación

2.8.1 Extracción de ADN

Las muestras previamente fijadas fueron manipuladas a partir de las localidades situadas en los extremos de distribución N-S. Se extrajo ADN de individuos provenientes desde 11 localidades de un total de 15, excluyendo cuatro por prevalencia cero. A partir de la disección de la porción lateral del caparazón de cada individuo, se extrajeron 20-30 miligramos de tejido branquial. El ADN se obtuvo mediante Kit comercial “E.Z.N.A.® Tissue DNA kit”, empresa OMEGA bio-tek (www.omegabiotek.com). Los detalles de la técnica puede ser consultada en el protocolo descrito por el fabricante.

La concentración total de ADN de cada individuo fue calculada a través de un espectrofotómetro (NanoDrop[®] ND-1000), del cual se evaluó la absorbancia 260/280 para estimar el grado de pureza de la muestra con 1 nm de exactitud. Proporciones 260/280 de ~1,8 se consideraron puras, criterio fundamental para posterior amplificación. La integridad de DNA se corroboró a través de geles de agarosa al 0,8%, corridas a 100 voltios por 45 minutos, usando una solución amortiguadora TAE (10X) con tinción de Bromuro de etidio. Las diluciones consideradas en este trabajo se estandarizaron a una razón de concentración 1:2 (ng/μl) (DNA: H₂O ultra-pura).

2.8.2 Amplificación de Citocromo Oxidasa c, subunidad I (COI)

Este marcador del genoma mitocondrial se ha utilizado ampliamente en estudios de genética de poblaciones de una amplia variedad de invertebrados marinos (Edmands *et al.*, 1996; Uthicke & Benzie, 2003). Los cebadores universales desarrollados por Folmer *et al.*, (1994) y usados en este estudio, también han sido probados con éxito para la amplificación del gen COI en otros decápodos (Tam *et al.*, 1996; Fratini & Vannini, 2002). Las cantidades de cada reactivo usadas en las reacciones de PCR para un volumen total de 25μl consistieron de: 0,125μl de TaqDNA polimerasa Invitrogen (5U/μl), 2,5μl de Buffer (10x), 0,5μl de dNTPs (10Mm), 3μl de MgCl₂ (25mM), 1μl de cada partidor (ambos a concentración de 10 pmol/ μl), 1,5μl de BSA (10mg/ml), 2,5μl de DNA diluido (1:2) y 12,875μl de H₂O ultra-pura para completar el volumen final. Los parámetros del ciclo utilizado en el termociclador (Perkin Elmer) incluyen una desnaturalización inicial a 95°C (5 min), seguida por 40 ciclos de desnaturalización a 95°C (45 s), alineamiento a 50°C (45 s), para terminar con una fase de extensión final de 72°C (10 min) (Fig.6).

2.8.3 Secuenciación

Para eliminar impurezas (cebadores, nucleótidos, enzimas, sales y otras sustancias) contenidas en el producto final de PCR se usó un Kit comercial de purificación “E.Z.N.A.[®] Cycle Pure Kit”, empresa Omega bio-tek. La concentración de cada producto purificado se verificó a través de geles de agarosa al 2% (100 V por 45min usando buffer TAE 10x) agregando red gel al buffer de carga (6x). Los productos PCR fueron enviados a secuenciar a la Empresa MacroGen Inc. Seoul Korea del Sur (www.macrogen.com) mediante el servicio de

secuenciación automática, utilizando secuenciado modelo ABI PRISM 310. Para menor ambigüedad se secuenció la hebra forward (rio arriba) y reverse (rio abajo). Ambas secuencias de cada individuo fueron editadas en el programa ProSeq v3.0 (Filatov, 2002). A partir de este análisis se construyó una hebra consenso para cada individuo secuenciado, que se editó y alineó en el mismo programa para ser usada en posteriores análisis que consideró nueve localidades de las 11 con prevalencia distinta de cero. Dos de las nueve localidades fueron eliminadas por mala calidad de los resultados de secuenciación. Finalmente, se trabajó con un total de 89 secuencias de *P. chilensis*, con fragmento del gen COI correspondiente a una longitud de 700 pares de bases (pb).

Debido a la utilización de partidores universales, antes de someter los consensos a análisis genéticos, se verificó la secuencia a través de una búsqueda por similitud de nucleótidos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov) usando el programa Blast (Camacho *et al.*, 2008). De esta forma se aseguró trabajar con secuencias del gen COI correspondientes a braquiuros.

2.9 Análisis de datos moleculares en *Pinnaxodes chilensis*

2.9.1 Diversidad genética

Con el objeto de caracterizar la diversidad genética a lo largo del rango distribucional de *P. chilensis* se calcularon índices de diversidad genética para el gen COI. Se usaron indicadores clásicos como: el número de haplotipos (N_{hap}), número de sitios polimórficos (S), diversidad genética (H_e), número promedio de diferencias entre pares de secuencias (π_1) y diversidad nucleotídica (π_2) tanto a nivel específico, como también para cada región biogeográfica mediante el programa DnaSP 5.10 (Rozas *et al.*, 2010).

2.9.2 Diferenciación genética

Con el objeto de evaluar un patrón de estructuración genética en *P. chilensis*, se realizó un análisis de AMOVA jerárquico (análisis de varianza molecular) sobre la disposición de tres

regiones biogeográficas (niveles) con sus respectivas poblaciones (grupos). Este análisis usó información de covarianzas asociado a diferencias entre haplotipos por niveles de estructuración, introducidos como matrices de distancia euclidiana al cuadrado. En función de la estadística de prueba y el diseño jerárquico dado, se realizaron 10000 permutaciones no paramétricas para asegurar precisión en la probabilidad final, fundado en el índice de fijación F_{st} que es idéntico a la media ponderada del F-estadístico definido por Weir & Cockerham (1984) e implementado en el programa ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier *et al.*, 2010). Así, la varianza genética entre localidades y regiones biogeográficas, fue subdividida en tres componentes: (1) diferenciación genética entre todas las poblaciones del rango latitudinal (F_{st}); (2) diferenciación genética entre poblaciones dentro de cada región biogeográfica (F_{sc}); y (3) diferenciación genética entre regiones biogeográficas (F_{ct}). El grado de significación de estos tres estadígrafos se definió por valores de $P < 0,05$.

2.9.3 Frecuencia de haplotipos a través de Regiones Biogeográficas

Para establecer de forma visual la distribución de la frecuencia de haplotipos obtenidos entre las nueve localidades estudiadas (Tabla 1), se confeccionó un gráfico de torta para cada una de ellas. Este gráfico tiene por objeto representar la proporción de haplotipos existentes en determinada localidad respecto al tamaño muestral y cómo se encuentran distribuidos en un plano latitudinal. De esta forma se pudo identificar haplotipos únicos y compartidos entre regiones biogeográficas en base a información proporcionada en el programa ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier *et al.*, 2010).

2.9.4 Redes de Haplotipos

Para analizar los patrones filogeográficos en *P. chilensis*, se construyeron redes de haplotipos (a nivel latitudinal y regional) para el marcador COI, los cuales permiten describir las relaciones evolutivas en forma de árboles multi-bifurcantes fundado en un límite de parsimonia estadística (con una confianza del 95%). Con el propósito de considerar posibles homoplasias y múltiples reticulaciones que son esperadas a nivel intra-específico, se usó el algoritmo de Median Joining (Bandelt *et al.*, 1999) implementado en el programa Network 4.6.1.1 (Röhl, 1999). El resultado final de este análisis es una red que muestra las relaciones

entre todos los haplotipos con base en el número mínimo de mutaciones (los pasos en la ejecución del programa pueden consultarse en Clement *et al.*, 2000).

2.9.5 Aislamiento por distancia

Para establecer patrones de diferenciación filogeográfica y determinar si *P. chilensis* sigue un modelo de aislamiento por distancia, se realizó una prueba Mantel (Mantel, 1967) implementada y elaborada en el programa ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier *et al.*, 2010). Este test proporciona un análisis de correlación de matrices de distancias genéticas y geográficas entre los distintos pares de poblaciones (Wright, 1943) otorgando un coeficiente de correlación con un valor de significancia estadística $\alpha=0,05$. Las distancias genéticas corresponden a valores representados como diferencias entre pares de poblaciones (F_{st}), mientras que la distancia geográfica fue insertada a la matriz para su posterior correlación. Esta última, se elaboró a partir de las coordenadas geográficas entre pares de poblaciones transformadas a kilómetros en el siguiente sitio web, <http://www.chemical-ecology.net/java/lat-long.htm>.

2.9.6 Demografía histórica

Para estudiar la posibilidad de eventos demográficos en el pasado reciente de las localidades analizadas, se realizaron pruebas que detectan huellas de estos posibles eventos en la diversidad genética observada, según la teoría coalescente (Slatkin & Hudson, 1991). Los datos fueron estimados en el programa ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier *et al.*, 2010).

2.9.7 Pruebas de Neutralidad (Wright-Fisher)

De manera histórica la selección positiva es estudiada indirectamente cuando un grupo de genes parece desviarse del modelo neutral, es decir, al no encajar en las predicciones neutrales se supone de forma indirecta que estas desviaciones son producto de la selección que las está modificando (Eguiarte *et al.*, 2007). Derivaciones particularmente importantes del modelo neutro de Wright-Fisher, es que la tasa de cambio a la cual un nucleótido es reemplazado (sustituido) por otro dentro de una población, es igual a la tasa de mutación o cambio de ese sitio sin importar el tamaño poblacional (Eguiarte *et al.*, 2007). Donde el

número de mutaciones se encuentra en balance con la baja probabilidad de que cada mutación se fije en una población grande (equilibrio mutación-deriva génica). Entonces, para poder detectar si nuestros resultados de diversidad genética se desvían del modelo neutral y si están siendo afectados por alguna perturbación o selección natural en alguna región del gen COI analizado, se consideró la diversidad genética descrita por sus dos estimadores: π (π) y θ (teta). El primero (π), se refiere a la diversidad nucleotídica, que es el número de nucleótidos diferentes por sitio entre dos secuencias tomadas al azar (Nei & Li, 1979). El segundo (θ), es calculado a partir de la expresión $\theta=4N_e \mu$ (Kimura, 1968). Se deduce entonces que π se ve afectada mayormente por los alelos que poseen mayor frecuencia y es independiente del tamaño muestral, mientras que θ sí se ve afectada por el tamaño de la muestra y la deriva génica, es decir, por los alelos poco frecuentes (Tajima, 1983, 1989). La relación que existe entre ambos estimadores nos permitió determinar si las secuencias del gen COI en *P. chilensis* se encuentran bajo el modelo neutral o se desvían del mismo. Si existe diferencia entre ambos, quiere decir que la selección está afectando alguno de ellos, promoviendo su incremento o decremento: si existe selección positiva, incrementará las frecuencias alélicas (π). Si existe un mayor número de alelos deletéreos en la muestra, θ se verá incrementado (Watterson, 1975; Tajima 1983, 1989), mientras que si ambos estimadores dan el mismo resultado en cuanto a variación genética, quiere decir que el polimorfismo observado es neutro y se encuentra distribuido aleatoriamente. La diferencia señalada se determinó estadísticamente lo cual nos permitirá detectar indirectamente la participación de la selección positiva o negativa en el mantenimiento del polimorfismo de *P. chilensis*. Para cada región biogeográfica como a nivel global, se calculó la prueba D de Tajima (Tajima, 1989) y el Fs del Método Fu-Li (Fu, 1997), considerando sus respectivos grados de significancia mediante 1000 bootstraps. Para estos dos estadígrafos los valores negativos indican que θ posee un valor mayor que π , lo cual indica la presencia de mutaciones deletéreas. Es decir, un exceso de haplotipos de baja frecuencia que podrían ser debido a una expansión poblacional o fenómenos de selección positiva. En cambio, valores positivos indican que π tiene un mayor valor que θ , surgiendo una disminución en el tamaño poblacional (cuello de botella) o selección balanceadora. Si los valores son cercanos a cero quiere decir que no existe diferencia alguna entre ambos estimadores y nos encontramos bajo equilibrio neutral en poblaciones con tamaño constante (Tajima, 1989; Fu, 1997).

2.9.8 Distribuciones Mismatch

Basados en las distancias genéticas entre los individuos y suponiendo cierta tasa evolutiva, se pueden obtener estimados provisionales de tiempo absoluto de coancestría materna (gen COI). Estos estimados de tiempo acumulados para muchos individuos dan como resultado una distribución del número de diferencias mutacionales entre pares de secuencias de una población (Rogers, 2002) conocidas como distribuciones mismatch. Los histogramas construidos a partir de estas distribuciones se comparan con el modelo de una población en expansión repentina. Posteriormente la prueba Chi-cuadrado estadísticamente significativa acepta que la diferencia entre ambas no es debido al azar, observándose en la estructura de la gráfica si las poblaciones experimentaron recientemente un crecimiento exponencial (Zink & Blackwell-Rago, 2000). Para nuestro caso, usando 1000 bootstrap, se comprobó el ajuste de la distribución observada con lo esperado bajo un modelo de expansión repentina (Rogers & Harpending, 1992). Se espera una distribución multimodal en muestras tomadas desde una población en equilibrio demográfico con tamaño estable o que está declinando y unimodal para poblaciones que han experimentado una reciente expansión demográfica con el pico de frecuencias en el lado de pocas diferencias (Schneider *et al.*, 2000). Estos análisis se ejecutaron a nivel global, como también para distribuciones a nivel de regiones biogeográficas. Los diagramas de frecuencia respectivos fueron elaborados con el programa DnaSP 5.10 (Rozas *et al.*, 2010).

2.9.9 Diversidad genética y variables ambientales

Para establecer el grado de asociación entre la morfología y variables ambientales con la diversidad genética determinada en *P. chilensis*, se realizó correlaciones lineales de Pearson. Para relacionar la variabilidad morfológica con la variación genética de la especie, se utilizó los promedios de PC1 obtenidos en análisis de morfología con los índices de diversidad genética respectivos para cada localidad. Estos últimos, también fueron correlacionados con las variables ambientales temperatura (1°C) y salinidad (UPS) para cada localidad.

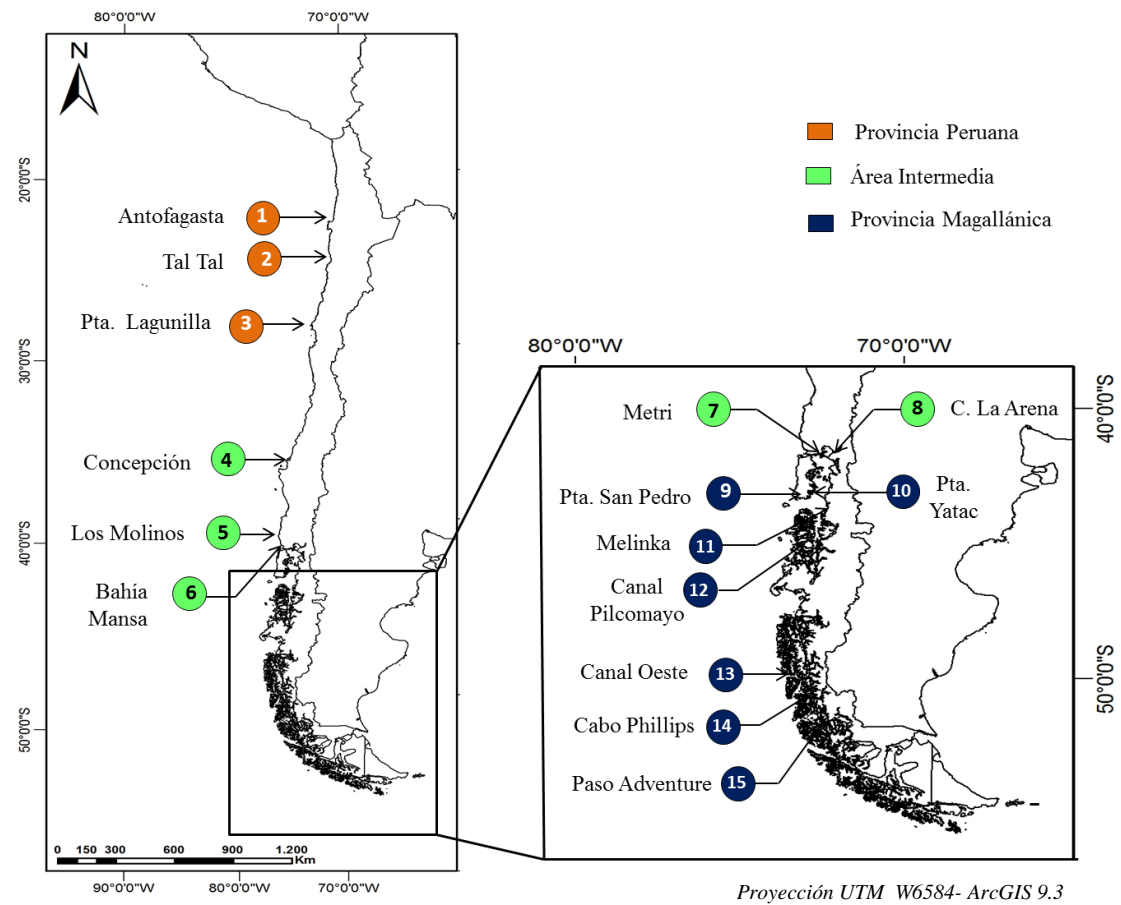


Figura 2. Mapa con los sitios de muestreo a lo largo de la costa Chilena.

Tabla1. Universo muestral comensal-hospedero y análisis realizados en *Pinnaxodes chilensis* para las 15 localidades a lo largo del PSO según región biogeográfica. Las viñetas del extremo derecho indican los análisis efectuados a la localidad que respecta.

Región	Localidad	Código	Lat. °S – Long. °W	Z	N <i>L. albus</i>	N <i>P. chilensis</i>	MFM	D. P	COI
PP	1. Antofagasta	CAN	23°38'22,74" 70°23'58,78"	SE	24	23	✓	✓	✓
	2. Tal-Tal	CTT	25°23'57,27" 70°28'56,80"	SE	69	64	✓	✓	✓
	3. Pta. Lagunilla	CPL	30°6'17,07" - 71°23'17,89"	SE	14	14	✓	✓	✓
Total					107	101			
AI	4. B. Concepción	CBC	36°42'25,07" 73°1'57,53"	P	73	12	✓	✓	✓
	5. Los Molinos	CLM	39°50'04,61" 73°24'40,45"	SE	30	12		✓	✓
	6. Bahía Mansa	CBM	40°35'4,42" 73°44'27,86"	P	54	0		✓	
	7. Metri	CM	41°35'19,47" 72°43'53,59"	P	74	5	✓	✓	
	8. Caleta La Arena	CCL	41°41'54,78" 72°39'26,62"	P	20	4	✓	✓	
Total					251	33			
PM	9. Punta Yatac	CPY	43°21'36,8" 73°39'40"	SE	97	42	✓	✓	✓
	10. Pta. San Pedro	CPS	43°23'32" 73°41'13"	E	114	0		✓	
	11. Melinka	CMK	44°2'10,35" 73°36'59,13"	P	62	6	✓	✓	✓
	12. C. Pilcomayo	CP	45°30'05" 73°42'78"	P	79	28	✓	✓	✓
	13. Canal Oeste	CCO	50°28'57" 75°06'28"	SE	60	7	✓	✓	✓
	14. Cabo Phillips	CCP	52°43'50,9" 73°50'50,6"	E	60	0		✓	
	15. Paso Adventure	CPA	54°56'59,5" 73°50'50,6"	E	60	0		✓	
Total					532	83			
N Total					890	217			

PP=Provincia Peruana; **AI**= Área Intermedia; **PM**= Provincia Magallánica. **Z**= Zona; **E**= expuesta al oleaje; **SE**= Semi-expuesta y **P**= Protegida. **N** *L. albus* = Número de *Loxechinus albus* muestreado; **N** *P. chilensis*= Número de *P. chilensis* encontrado. **MFM**= análisis morfométrico; **D.P**= Descriptores poblacionales; **COI**= Análisis genético "Citocromo Oxidasa c, subunidad I.

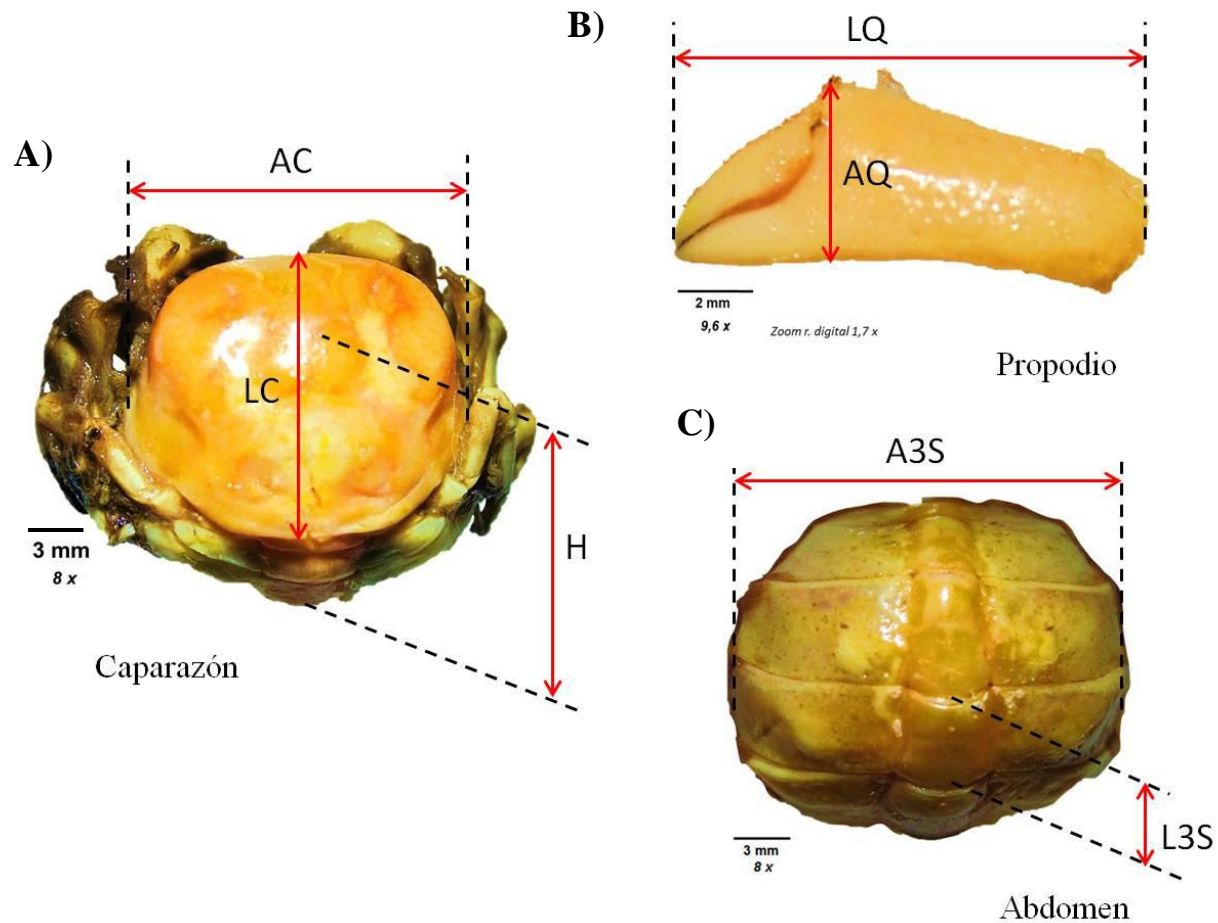


Figura 3. Nueve dimensiones consideradas en morfometría de *P. chilensis*. **A)** Vista dorsal. **AC**= ancho caparazón; **LC**= largo caparazón; **H**= altura. **B)** **AQI**= ancho quelícero izquierdo; **LQI**= largo quelícero izquierdo. Estas mismas mediciones fueron realizadas para el quelícero derecho. **C)** Vista ventral. **A3S**=ancho tercer segmento abdominal; **L3S**= largo tercer segmento abdominal.

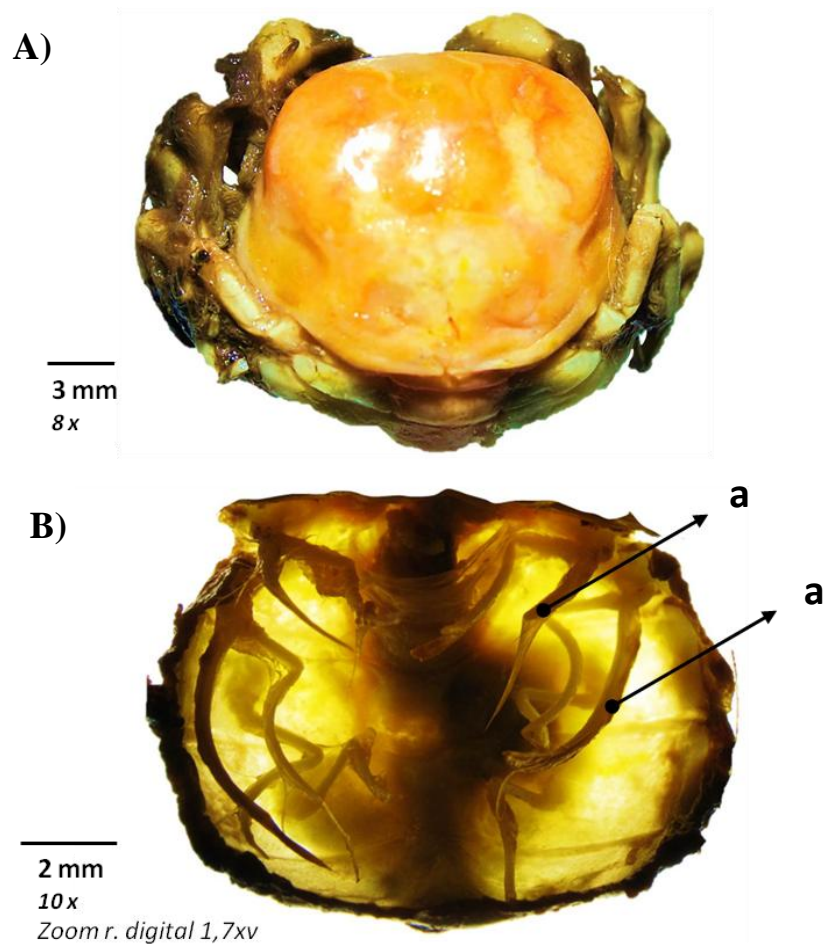


Figura 4. *P. chilensis* hembra **A)** Vista dorsal del caparazón con tonalidades características. **B)** Vista interna del abdomen con los respectivos pares de pleópodos en la especie (cuatro), estructuras que almacenan y sostienen la masa ovígera en periodo reproductivo (indicadas por el puntero letra a).

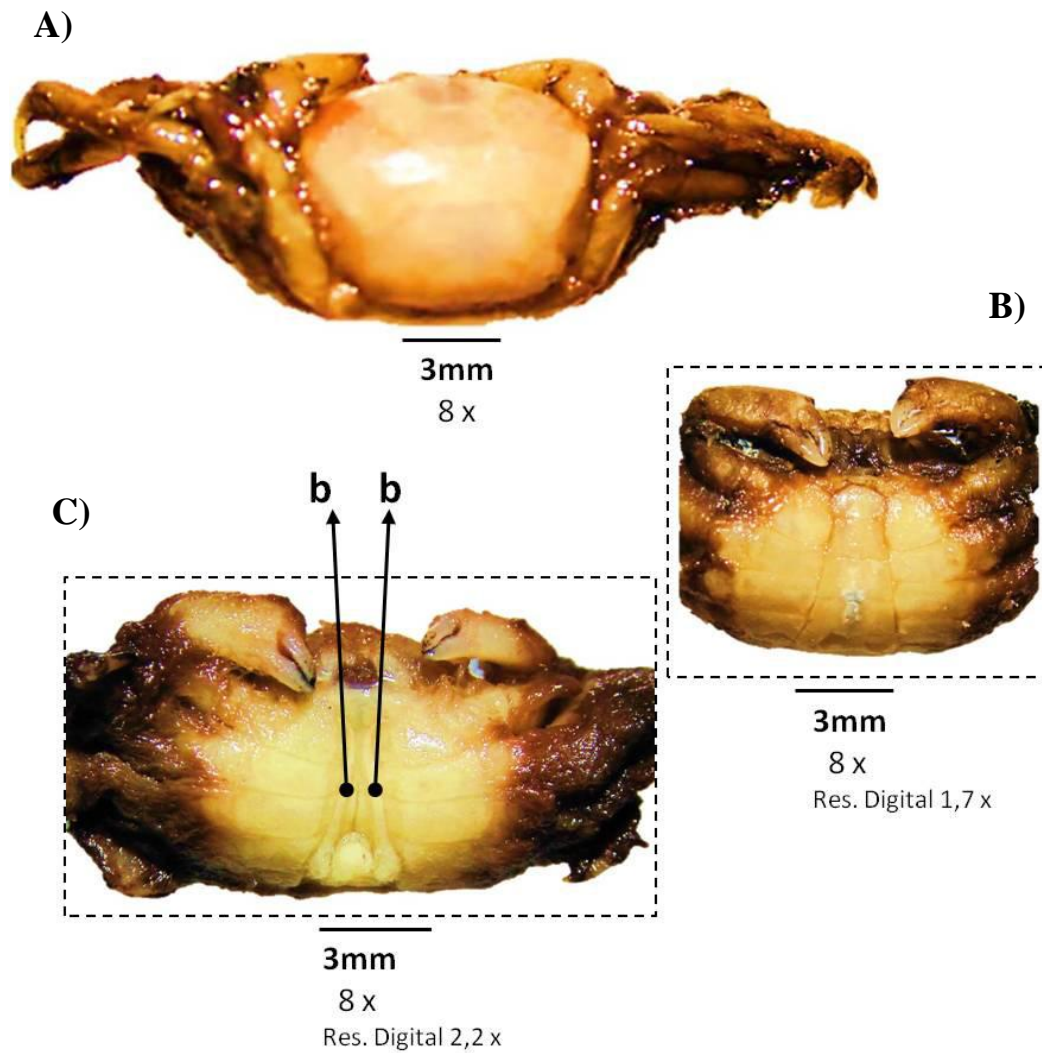
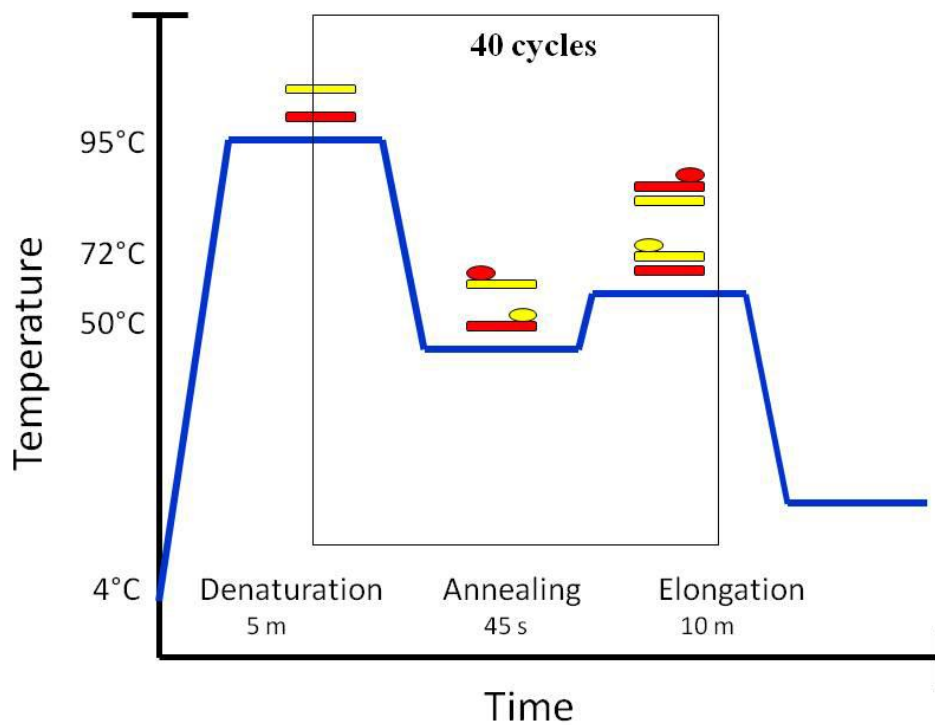


Figura 5. *P. chilensis* macho **A)** Vista dorsal del individuo. **B)** Vista ventral, esbozando el abdomen de forma triangular. **C)** Imagen sin el abdomen, señalando el par de pleópodos (posiblemente adaptado para la cópula), con el puntero, letra b.



LCO-F 5' GGT CAA CAA ATC AAG ATA TTG G '3
HCO-R 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA '3

Figura 6. Diagrama tiempo-temperatura de los ciclos PCR en la amplificación del gen COI de *Pinnaxodes chilensis*. En la parte inferior se detalla la secuencia de los partidores universales para Citocromo Oxidasa c, subunidad I desarrollados por Folmer *et al.*, (1994).

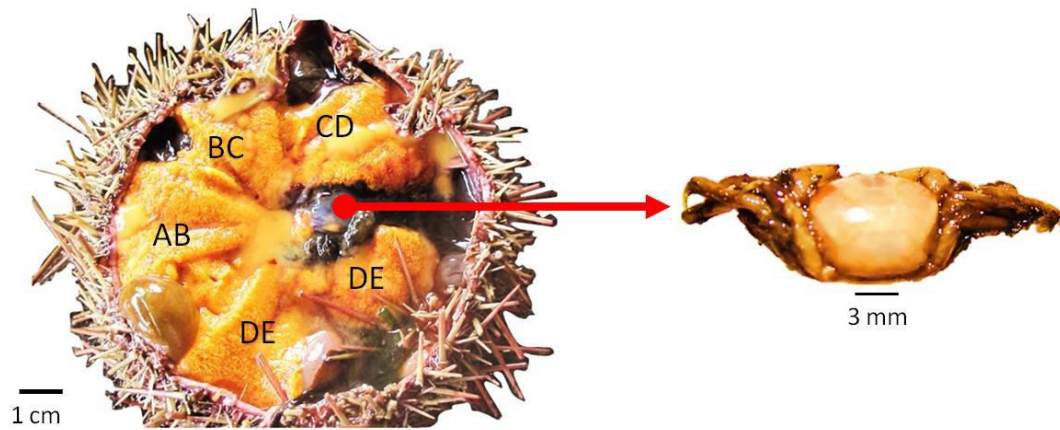


Figura 7. Corte diametral de *Loxechinus albus*. Vista interna del hemisferio aboral con presencia de *Pinnaxodes chilensis* (indicado con la flecha) en la zona terminal del intestino. Se observa un leve desplazamiento de las gónadas contiguas (*CD* y *DE*) por la presión ejercida, además del ensanchamiento de la porción rectal. *CD*, *DE*, *EA*, *AB*, *BC*, corresponden a los inter-radios sobre los que se sitúan las gónadas.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de la Temperatura Superficial Media y Salinidad

Se recogieron valores de Temperatura y salinidad superficial sobre el rango latitudinal desde los 23°S a los 54°S para las 15 localidades consideradas en este estudio durante el período estival 2012 (tabla 2). Para ambos casos se obtuvieron correlaciones estadísticamente significativas; temperatura-latitud (Pearson $r = -0.933$, $P < 0.001$) y salinidad-latitud (Pearson $r = -0.932$, $P < 0.0001$) (Fig.11A y 11B).

La Temperatura superficial media (TSM, en °C) promedio de los meses muestreados mostró un gradiente latitudinal descendente, con valores más altos en el norte (~22°C) y los más bajos en el extremo austral (~8°C). El estrato espacial de temperaturas promedio entre regiones biogeográficas mostró valores aproximados de 19 °C para PP, 16 °C para AI y 9.5 °C para PM. El mayor gradiente diferencial de temperaturas se observó sobre los 42 °S para PM, con diferencias de 7 °C, mientras que las diferencias para PP y AI fueron de 3 °C respectivamente. Para obtener mayor detalle de la variación temporal de temperaturas para cada localidad muestreada, se obtuvieron perfiles mensuales representados en la figura 9 y 10. Las mayores fluctuaciones y no necesariamente con temperaturas decrecientes a nivel latitudinal, se observaron en los muestreos realizados en Enero (verano). Entre los ejemplos destaca el caso de Tal Tal que presentó la mayor temperatura, correspondiente a la segunda localidad muestreada para PP. Igualmente Metri, que corresponde a la cuarta localidad muestreada dentro de AI, presentando una temperatura mayor a las encontradas en localidades de menor latitud. Distintamente para PM, los muestreos realizados en Enero y Abril para las siete localidades de esta región, mostraron un gradiente decreciente a mayor latitud.

Respecto a la caracterización de la salinidad a lo largo de la costa chilena, se consideró una variabilidad anual con datos promedios de los últimos 60 años, los cuales mostraron un patrón general de distribución superficial decreciente desde baja hacia altas latitudes (Fig.8) Salinidades de alrededor de 35 (ups) se reportaron para el extremo norte,

mientras que valores menores (33 ups) se observó sobre los 42 °S, con oscilaciones bajas en ecosistemas estuarinos compuestos por fiordos y canales (Chiloé al sur).

3.2 Análisis de descriptores poblacionales en *Pinnaxodes chilensis*

Los cálculos de prevalencia, intensidad media y abundancia media fueron obtenidos a partir de 217 ejemplares de *P. chilensis*, a los que también se les determinó el sexo.

3.2.1 Prevalencia latitudinal

Este descriptor para las 15 localidades a lo largo del PSO mostró un patrón latitudinal significativo a nivel específico (ANDEVA regresión $F(1; 8) = 30.553$, $r^2 = 0,7$; $P < 0.0001$,) (Fig.12). Prevalencias de 100% se encontró en bajas latitudes y cercanas a cero en el extremo opuesto del rango distribucional. Los resultados a nivel de regiones biogeográficas mostraron una prevalencia de 87,8% en PP, sin embargo, en PM este descriptor fue mayor que en AI, con valores de 15,6% y 13.1% respectivamente. Dentro de cada región biogeográfica la prevalencia presentó algunas variaciones, no obstante en las tres localidades de PP los valores fueron cercanos al 100%. Respecto a las cinco localidades de AI, la prevalencia osciló entre cero y 40% siendo estos extremos representados por Bahía Mansa (40,5°S) y Los Molinos (39,8°S). Para las siete localidades de PM, el patrón prevalente descendió a mayor latitud, con su valor máximo en Puna Yatac (43,2%) y prevalencias igual a cero en Punta San Pedro (43,3°S), Cabo Phillips (52,4°S) y Paso Adventure (54,5°S). Destaca en PM la alta prevalencia obtenida en Canal Pilcomayo (45°S), cuarta localidad en orden latitudinal dentro de la región, con prevalencia de 35,4% y situada en una particular zona de fiordos (Tabla 3).

3.2.2 Intensidad media

La intensidad media de *P. chilensis* en el recurso *Loxechinus albus* presentó valores cero y/o uno (Fig.13). En ningún hospedero de los 890 ejemplares revisados se evidenció presencia mayor a uno. Valores de intensidad media cero se reportaron mayoritariamente en las localidades del extremo sur del rango distribucional. En PP no se encontró valores iguales a cero, mientras que para AI se reportó intensidad cero en la localidad de Bahía

Mansa. Igualmente en PM, las localidades con valores cero se corresponden con aquellas cuya prevalencia también fue cero. Detalles de este índice para cada localidad se presentan en la Tabla N°3.

3.2.3 Abundancia media

La abundancia media en las poblaciones estudiadas presentó un patrón latitudinal similar a la prevalencia. Valores más altos fueron encontrados a bajas latitudes, cercanos a uno, mientras que en el extremo sur tendió a cero. Este patrón obedece a que cada hospedero presentó como máximo un comensal. Detalles por localidad se encuentran en la Tabla N°3.

3.2.4 Identificación y frecuencia de sexo

De un universo de 890 *L. albus* diseccionados, se constató presencia de *P. chilensis* en 217 de ellos (Tabla1). De estos, no todos correspondieron a hembras ya que 25 individuos fueron identificados como machos. Consecuentemente, los 192 individuos identificados como hembra presentaron rasgos generales descritos para su género, es decir, morfología redonda y un abdomen ovalado. Entre las características propias encontradas en esta investigación, destaca la presencia de cuatro pares de pleópodos bajo el abdomen (Fig.4B) y la posición del gonoporo. Para el caso de los machos, además de ser significativamente más pequeño que la hembra, se encontró la forma de un abdomen triangular que los diferencia de hembras juveniles por la menor presencia de pleópodos (Fig.5B). Aparentemente estas estructuras corresponden a un sólo par extendido desde la base del abdomen hasta el sexto segmento, conformado quizás por la fusión del primer y segundo par.

La frecuencia de ocurrencia de sexos mostró un patrón general representado mayoritariamente por hembras (88.4%) en todo el gradiente latitudinal, mientras que los machos constituyeron un bajo porcentaje de la misma (11.5%) (Fig.14). En localidades como Los Molinos, Caleta La Arena, Melinka y Canal Oeste, se registró una frecuencia de 100% hembras. En ninguna localidad del gradiente analizado se encontró frecuencia 100% de individuos machos. No obstante, destaca el caso de Bahía Concepción, donde la prevalencia obtenida correspondió a 50% hembras y 50% machos. A nivel de regiones

biogeográficas, AI presentó la mayor frecuencia de machos dentro de las respectivas prevalencia de sus cinco localidades, distinto a PM que presentó la menor frecuencia.

3.3 Distribución de tallas comensal – hospedero

3.3.1 *Loxechinus albus* y latitud geográfica

La distribución de tallas en los 890 ejemplares de *L. albus* no presentó una correlación significativa con la latitud (Pearson $r = -0,14$) (Fig.15). En las tres regiones biogeográficas se encontró una variedad similar de tallas (erizos pequeños y grandes en latitudes bajas y altas). Considerando la media para cada localidad, Tal Tal presentó los ejemplares más grandes, alcanzando 89,2 cm de longitud de testa, mientras que Punta Yatac fue la localidad con los individuos más pequeños, correspondiente a 55,2 cm. El individuo más grande se encontró en Tal Tal y el más pequeño en Punta Lagunilla con longitud de testa de 145,2 y 10 cm respectivamente.

3.3.2 Relación de tamaño comensal – hospedero

La longitud del caparazón (LC) de *Pinnaxodes chilensis* con la longitud de testa (LT) de su hospedero presentó una relación lineal validada por un significativo modelo de regresión (ANDEVA regresión F (1; 8)= 10.522, $r^2 = 0,568$; $P < 0.01$). Esta relación se presentó a nivel individual, como también entre las longitudes medias del comensal y hospedero de cada localidad, donde a mayor tamaño de *L. albus*, mayor tamaño de *P. chilensis* (Fig.16).

3.3.3 *Loxechinus albus* versus presencia/ausencia de *Pinnaxodes chilensis*

El modelo multivariante de regresión logística usado para explicar la longitud de testa de *L. albus* respecto a la presencia o ausencia de *P. chilensis*, no presentó un ajuste sigmoidal perfecto esperado para casos ideales. Se observó un rango ajustado donde en todos los tamaños se examinó presencia/ausencia del comensal. Pese a la sobre-posición de datos, el modelo aplicado mostró pocos residuales haciéndolo estadísticamente significativo ($\text{Chi}^2_{(1)} = 6.36$, $P < 0,01$). Esto nos permite inferir un punto de inflexión aproximado, donde a partir de los 40 mm de longitud de testa del erizo, sería posible encontrar eventual presencia de *P. chilensis* (Fig.17).

3.4 Variabilidad morfológica latitudinal de *Pinnaxodes chilensis*

3.4.1 Análisis morfológico multivariante

El resultado de las nueve variables analizadas para las 182 hembras de las 11 localidades consideradas en estos análisis, no mostró un patrón de variabilidad morfológica asociada a regiones o quiebres biogeográficos. Los dos primeros *eigenvalues* obtenidos en el análisis de coordenadas principales (PCoA) representaron el 95.8% de la variación morfológica total a nivel latitudinal, con valores de 85.3% y 10.5% respectivamente (Fig.18). Considerando los análisis bajo distancias euclidianas, los resultados de componentes principales (PCA) sustentan lo anterior y muestra que las dos primeras variables de forma que explican esta variación espacial en la morfometría de *P. chilensis*, están representadas por el largo del tercer segmento abdominal (L3S) y la altura del caparazón (H).

La dispersión morfológica espacial promedio para los 11 centroides poblacionales respecto a los dos primeros *eigenvalues*, mostró una heterogeneidad morfológica espacial no diferenciada en regiones (Fig.19). Sin embargo, Bahía Concepción resultó ser la única localidad alejada de la nube de centroides poblacionales. El diseño PERMANOVA anidado finalmente, demostró que las variables explicativas de la variación morfológica entre regiones biogeográficas no es estadísticamente significativa ($P_{perm}= 0,458$), pero sí lo es dentro de cada región biogeográfica ($P_{perm}<0,000$). Los análisis anteriores posicionan a L3S como la variable que representa la mayor variación morfológica latitudinal para esta especie, con mayor oscilación y plasticidad en su longitud dentro de AI.

3.4.2 Análisis de Dimorfismo sexual en quelíceros

No se observó dimensiones atribuibles a un crecimiento diferencial de los quelíceros en *P. chilensis* respecto a su tamaño corporal (figura 13). La prueba T para muestras dependientes, no mostró diferencias estadísticamente significativas en las medias del largo y ancho para los quelíceros derecho e izquierdo en las 182 hembras consideradas ($P_{largo}=0,432$, $P_{ancho}=0,223$) (Fig.20). No obstante, la prueba estadística T independiente sí mostró diferencias significativas en las medias del largo entre quelíceros de machos y hembras. De las 182 hembras y 23 machos considerados, se evidenció un crecimiento diferencial en longitud de sus quelíceros, siendo los machos quienes presentan un

crecimiento alométrico de estas estructuras respecto al tamaño corporal ($P_{\text{largo}} < 0,00$) (Fig.21).

3.5 Análisis de datos moleculares

3.5.1 Diversidad Genética

Para el gen mitocondrial Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) se consideró un total de 89 secuencias (3 de machos) para nueve localidades, abarcando desde los 23° S a los 50,4°S. Este rango incluye tres localidades de PP, dos de AI y cuatro de PM. En esta base de datos se registraron 127 mutaciones (todas por sustitución) y 45 sitios polimórficos que conducen a definir 45 haplotipos. La diversidad genética (H_e) a nivel específico fue de 0,91 presentándose los máximos de H_e dentro de PM, para las localidades de Punta Yatac, Melinka y Canal Oeste ($H_e=1$), mientras que el mínimo se encontró en PP, para Punta Lagunilla ($H_e=0,67$). A nivel de regiones biogeográficas AI almacena la menor diversidad genética ($H_e=0,86$) y PM la mayor ($H_e=0,97$) (Tabla.4). Latitudinalmente, este índice presentó un patrón de aumento significativo hacia los extremos del rango distribucional (Pearson $r= 0,67$; $P=0.004$) (Fig.27).

La diversidad nucleotídica (π_2) observada fue baja a lo largo del gradiente estudiado, oscilando entre 0,003 y 0,006. Valores promedios de este índice sitúan a PM como la región con mayor diversidad nucleotídica entre sus pares con un valor de 0,006, seguida por PP con 0,004 y AI con 0,003. Entre las nueve localidades, destaca Melinka a nivel latitudinal como la localidad poseedora del valor más alto en este índice (0,006).

Por otro lado, se encontró un alto número de Haplotipos (Nhap) respecto al número de individuos analizados en todo el gradiente. Para los 48 individuos de PP, 15 de AI y 28 de PM, se encontró 28, 9 y 25 haplotipos respectivamente. Para el caso de PM, hubo tres localidades (Punta Yatac, Melinka y Canal Oeste) en que la cantidad de haplotipos encontrados fue igual al número de individuos muestreados. De igual forma, la gran cantidad de sitios polimórficos encontrados a nivel específico respecto al universo muestral, se representó por valores de 40 para PP, 13 para AI y 41 para PM. Detalles de los índices de diversidad genética pueden ser revisados en la Tabla N° 4.

3.5.2 Diferenciación genética geográfica

AMOVA jerárquico no reveló ninguna concordancia genética del gen COI con las regiones biogeográficas que se describen a lo largo de los 3010 Km de costa analizada. Nivel no significativo de estructuración genética se presentó entre regiones biogeográficas ($F_{ct}=0,016$; $P=0,06$), del mismo modo la diferenciación genética entre poblaciones dentro de cada región no fue significativa ($F_{sc}=0,012$, $P=0,64$) como tampoco lo fue entre localidades ($F_{st}= 0,0039$; $P=0,45$) (Tabla.5). Valores de F_{st} pareado no significativos fueron encontrados para todos los pares de localidades comparadas (Tabla7).

3.5.3 Distribución espacial de haplotipos

Un haplotipo (H3) se presentó en las tres regiones biogeográficas y con mayor frecuencia y recurrencia en el conjunto total de datos. Este haplotipo fue compartido por 26 individuos de siete localidades, representando el 26,8% del número total de individuos analizados, ausente sólo en dos localidades, Punta Lagunilla y Melinka.

De los restantes haplotipos compartidos intra-regionalmente se encuentra el caso de AI con PM, por medio de un haplotipo (H27), dado por dos localidades, Bahía Concepción y Canal Oeste. Por otro lado, entre PM y PP se comparten cinco haplotipos exclusivos (H1, H3, H4, H20 y H5), excepto uno de ellos (H3) que también se comparte con AI (Fig.22).

De los 45 haplotipos, 33 fueron privados y no compartidos entre localidades, correspondiente a 37 individuos de siete localidades. De estos, 30 forman parte de haplotipos únicos que a su vez constituyen el 66,6% del total de individuos analizados.

A nivel regional se produjo una disparidad en el número total de haplotipos de norte a sur, con 28 haplotipos para PP, 9 para AI y 26 para PM. Lo que debió resultar principalmente al diferente tamaño muestral en cada región biogeográfica y, este último, supeditado al patrón de prevalencia (Tabla 4).

3.5.4 Red de Haplotipos

La unión de haplotipos mediante algoritmo median Joining, reveló un patrón de estrella (ver Posada & Crandall, 2001). El haplotipo central (H3) constituye la forma más repetida y más ampliamente distribuida en el plano geográfico. Gran parte de los haplotipos emergentes se vinculan a H3 con una longitud de divergencia máxima de un paso mutacional. El haplotipo más alejado se encuentra a tres pasos mutacionales del haplotipo central, correspondiente a un individuo de PP. Entre las ramificaciones de esta red, interesante es el caso del haplotipo 15 representado por individuos de Tal Tal y Bahía Concepción (PP), del que surgen tres haplotipos correspondientes a individuos de Punta Yatac, Canal Pilcomayo y Canal Oeste (todos de PM). Estos tres haplotipos se separan por uno y dos pasos mutacionales del haplotipo 15, constituyendo los individuos más alejados del haplotipo central (h3). A nivel regional (PP, IA y MP), se observa el mismo patrón, lo cual sugiere que *P. chilensis* presenta una reciente expansión rápida geográfica y demográfica a lo largo de su rango distribucional (Fig.23).

3.5.5 Demografía histórica

Como se espera en una red con forma de estrella, las pruebas D de Tajima y F_s de Fu fueron negativas y significativas para cada región como para todo el conjunto de datos ($D=-2,2$; $P=0,04$ y $F_s=-2.57$; $P=0,05$) (Fig.24izq.), indicando bajo un modelo neutral que esta especie experimentó un evento de expansión demográfica. Para caracterizar el patrón de expansión, el ajuste de un modelo de crecimiento repentino indicó una pauta unimodal, donde lo esperado con lo observado se sobreponen en una curva de poisson. Esto sugiere un exceso de haplotipos de baja frecuencia y un consecuente crecimiento demográfico reciente. Independientemente los análisis “*mismatch*” dentro de cada región biogeográfica, muestran el mismo patrón y ajuste al modelo de expansión, corroborado por los respectivos valores de neutralidad (Fig.24der.)

3.5.6 Aislamiento por distancia

Un patrón de aislamiento por distancia, típico de poblaciones que se conectan bajo un modelo poblacional “stepping Stone”, fue puesto a prueba mediante la realización de una Prueba de Mantel (Tabla 6). En este análisis se reporta una relación lineal entre la distancia genética (F_{st}) y geográfica (km) encontrándose un coeficiente de correlación bajo, pero estadísticamente significativo ($r=0,306$; $P=0,042$). Las mayores diferencias genéticas estarían dadas entre localidades de los extremos del rango de distribución (Antofagasta, Canal Pilcomayo y Canal Oeste) (ver Fig.25).

Tabla 2. Fechas de muestreo y caracterización de temperatura (°C) – salinidad (ups)
Para cada localidad, según región biogeográfica.

Región	Localidad	Latitud °S	Fecha muestreo	T (°C)	S‰ (ups)
PP	1. Antofagasta	23,63	21 Nov. 2011	17.6	34,76
	2. Tal Tal	25,39	19 Ene. 2012	21	34,75
	3. Punta Lagunilla	30,10	05 Jun. 2012	16	34,4
AI	4. Bahía Concepción	36,70	27 Jun. 2012	14.5	34
	5. Los Molinos	39,83	Octubre 2011	12.3	33,8
	6. Bahía Mansa	40,58	17 Nov. 2011	13.7	33,4
	7. Metri	41,58	25 Ene. 2012	14	33,3
	8. Caleta La Arena	41,69	20 Sep. 2011	10.8	33,3
PM	9. Punta Yatac	43,36	16 Ene. 2012	13.5	33,1
	10. Punta San Pedro	43,39	16 Ene. 2012	13.8	33,1
	11. Melinka	44,04	03 Abr. 2012	12	32,9
	12. Canal Pilcomayo	45,50	04 Abr. 2012	11.6	32,8
	13. Canal Oeste	50,48	17. Abr. 2012	10.8	33,3
	14. Cabo Phillips	52,73	17. Abr. 2012	9	33,2
	15. Paso Adventure	54,94	17. Abr. 2012	8.5	33

PP= Provincia Peruana; **AI**= Área Intermedia; **PM**= Provincia Magallánica.

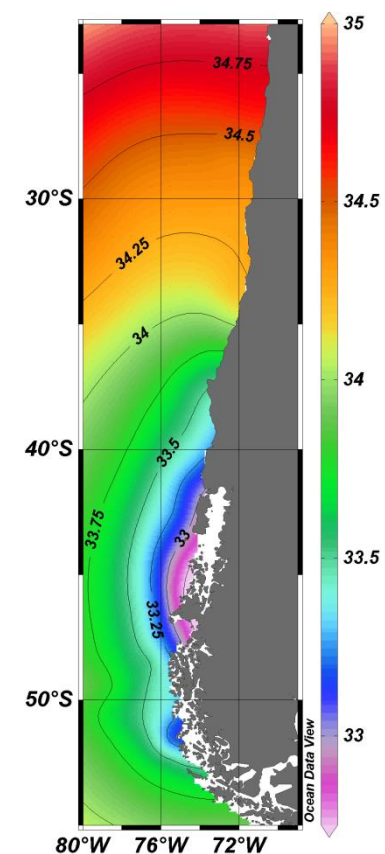


Figura 8. Perfil de salinidad (ups)
Para la costa chilena. Valores
Promedio de los últimos 60 años.

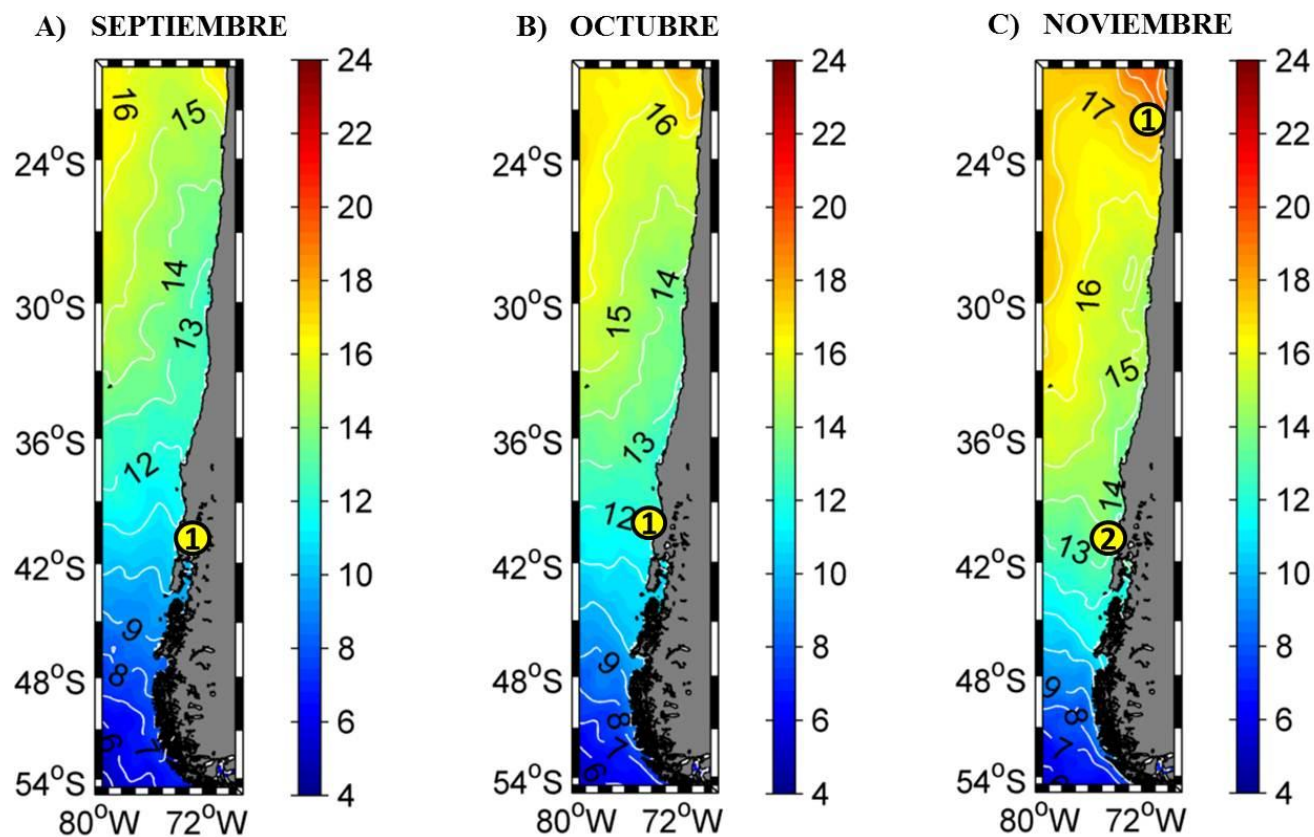


Figura 9. Perfiles de temperatura temporal para los meses de muestreo del año 2011. Se ilustran las TSM del mar promedio a lo largo de la costa chilena para cuatro localidades durante tres meses de muestreo. **A)** (1) Caleta La Arena. **B)** (1) Los Molinos. **C)** (1) Antofagasta y (2) Bahía Mansa.

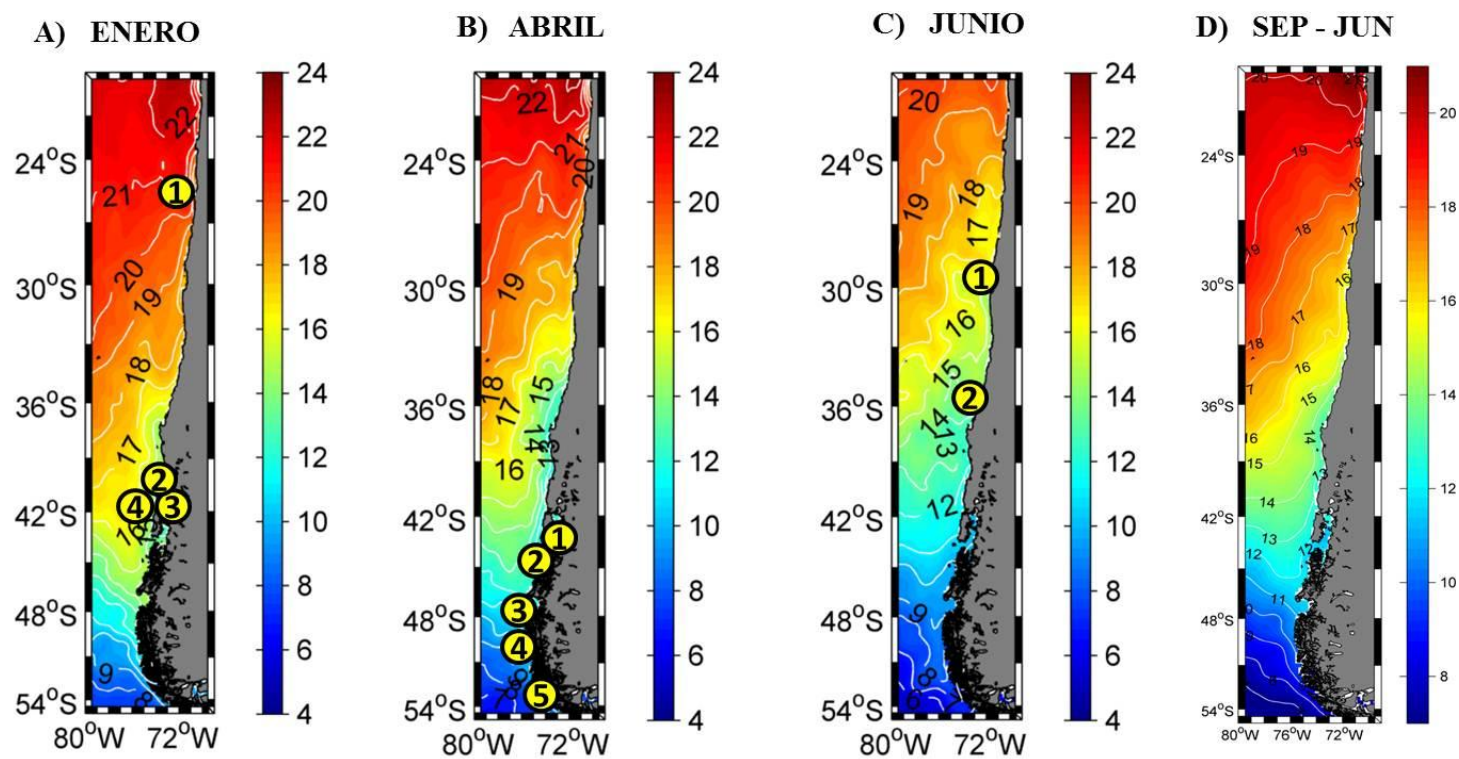


Figura 10. Perfiles de temperatura temporal para los meses de muestreo del año 2012. Se ilustran las TSM promedio para tres meses con las respectivas localidades muestreadas. **A)** (1) Tal Tal, (2) Metri, (3) Punta Yatac, (4) Punta San Pedro. **B)** (1) Melinka, (2) Canal Pilcomayo, (3) Canal Oeste, (4) Cabo Phillips, (5) Paso Adventure. **C)** (1) Punta Lagunilla, (2) Bahía Concepción. **D)** TSM promedio de todo el periodo muestral.

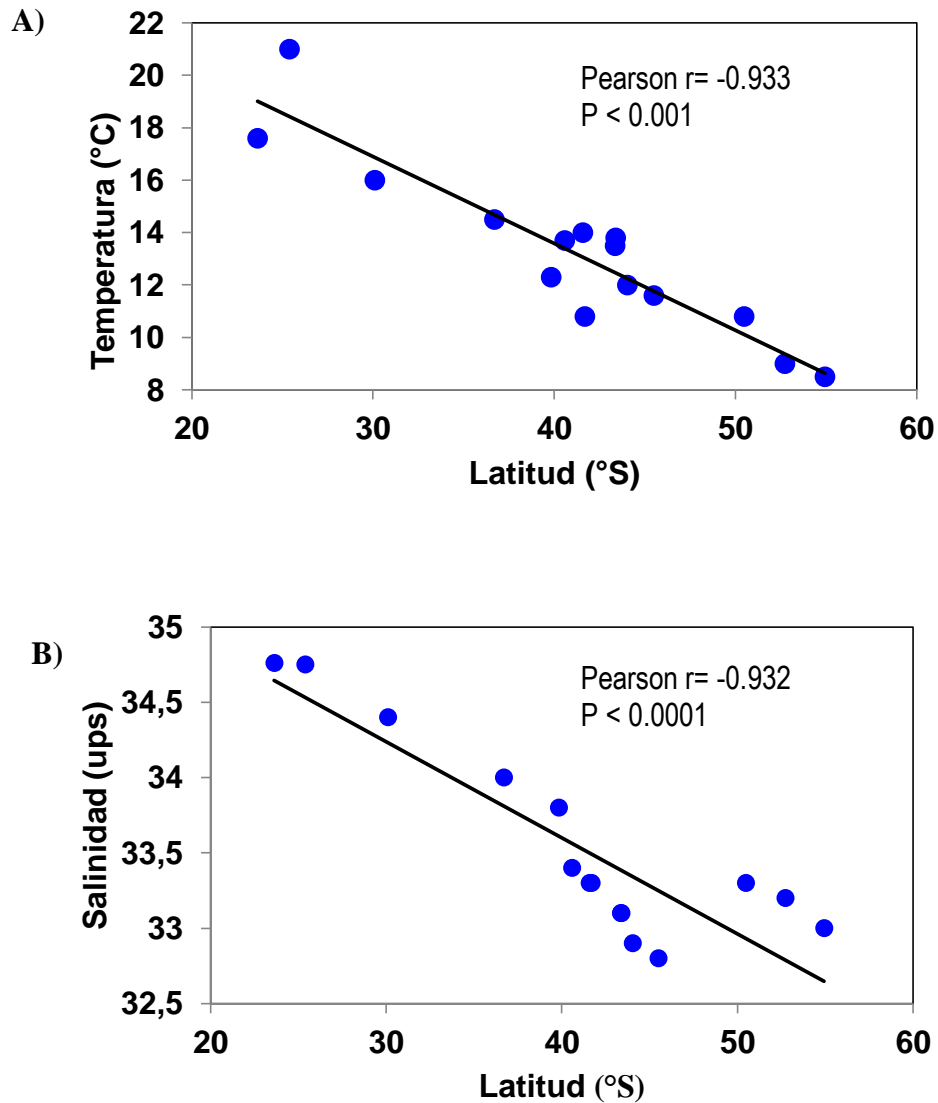


Figura 11.A) Temperatura superficial (grados Celsius) y **B)** Salinidad superficial del mar (unidades prácticas de salinidad) versus latitud geográfica (grados sur) para las 15 localidades estudiadas. En ambos casos se presenta la correlación respectiva con su grado significativo.

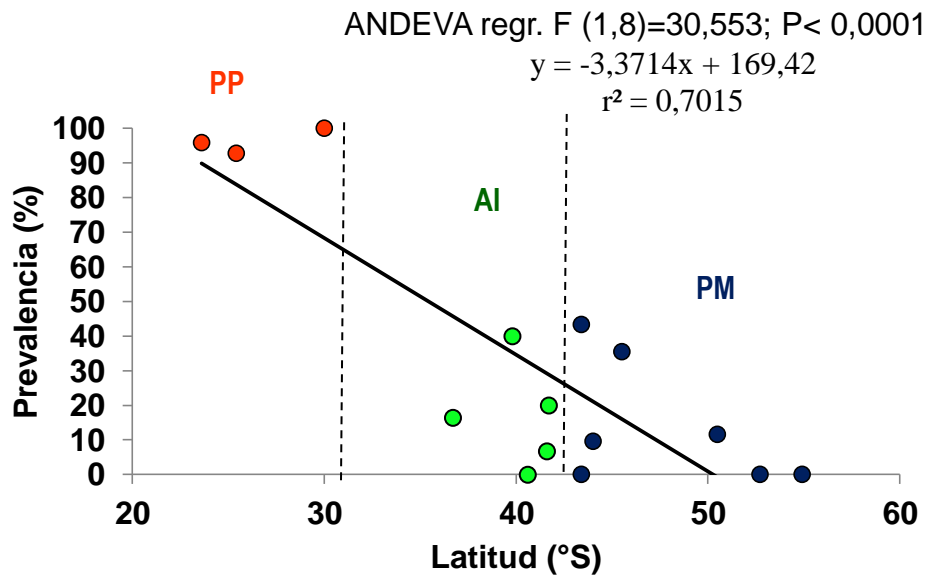


Figura 12. Patrón latitudinal de prevalencia (%) de *Pinnaxodes chilensis* a lo largo del PSO

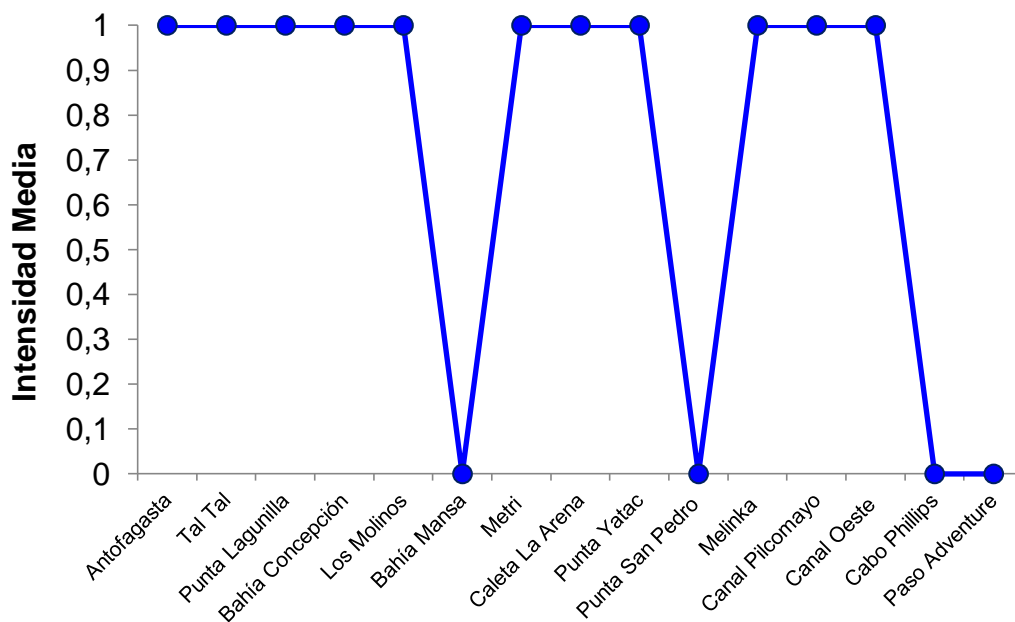


Figura 13. Valores de intensidad media de infección para las 15 localidades muestreadas.

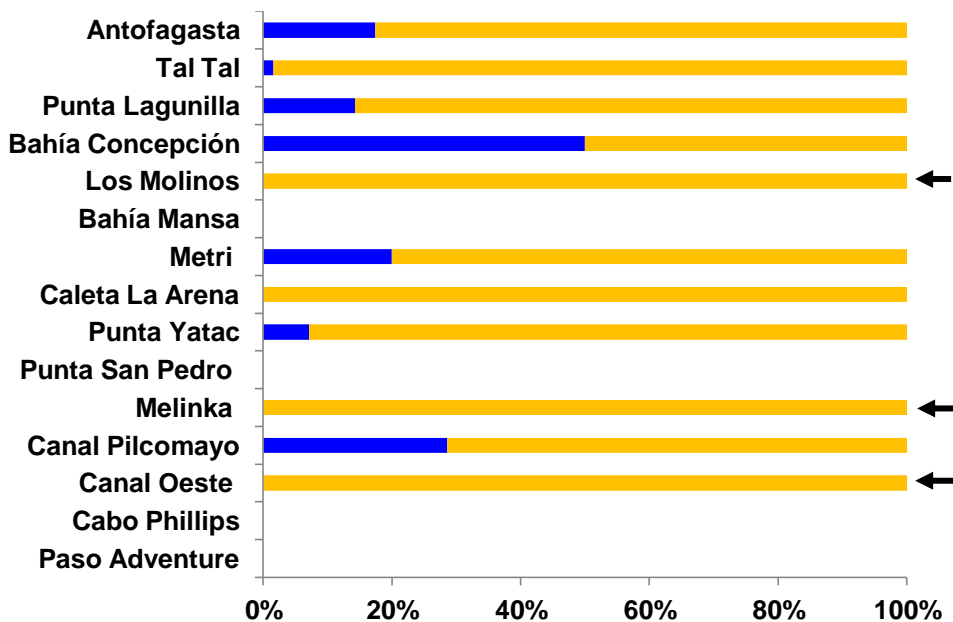


Figura 14. Frecuencia de ocurrencia de sexos en *Pinnaxodes chilensis* a lo largo del PSO. La flecha en la barra lateral, indica localidades con frecuencia sólo hembras. En color azul se representa el porcentaje de machos y en naranja el de hembras respecto a la frecuencia total prevalente.

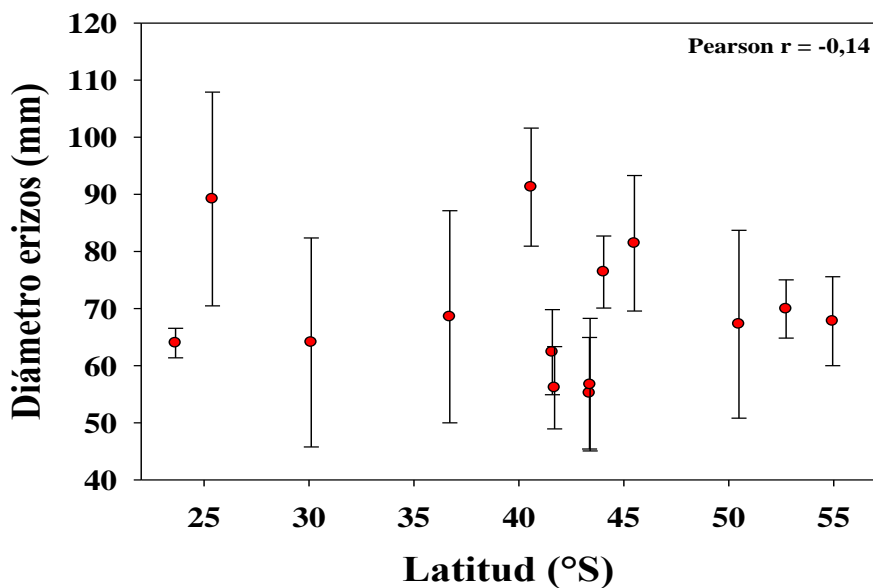


Figura 15. Longitud de testa (LT) de *Loxechinus albus* respecto a la latitud geográfica. Al costado superior, la significancia estadística de la correlación Pearson.

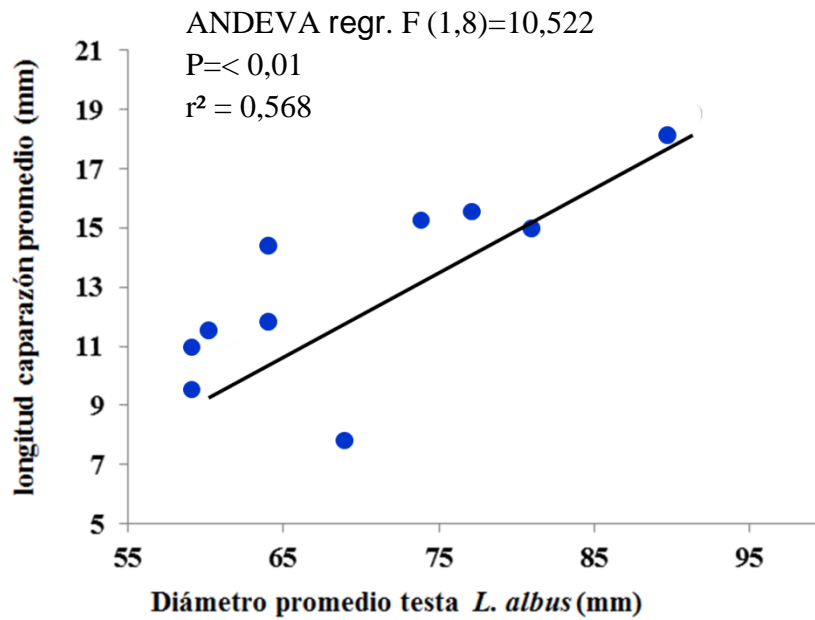


Figura 16. Relación de tallas entre la longitud del caparazón de *P. chilensis* con la longitud de testa de *L. albus*. Se consideran valores promedio de las 10 localidades comprendidas en estos análisis, con su respectiva significancia estadística.

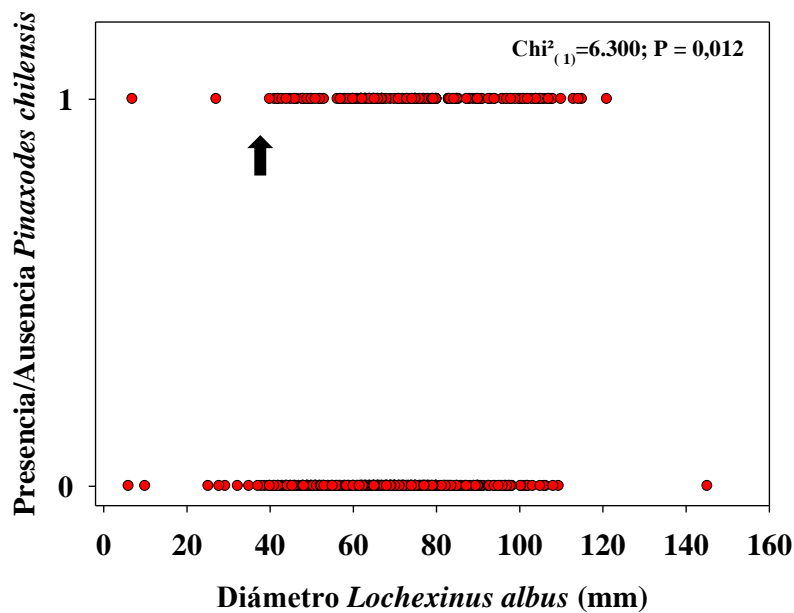


Figura 17. Modelo logístico de la presencia/ausencia de *P. chilensis* respecto a la longitud de testa de su hospedero, *L. albus*. La flecha negra indica la longitud de testa aproximada (40mm) a la que es mayormente factible observar la presencia del comensal.

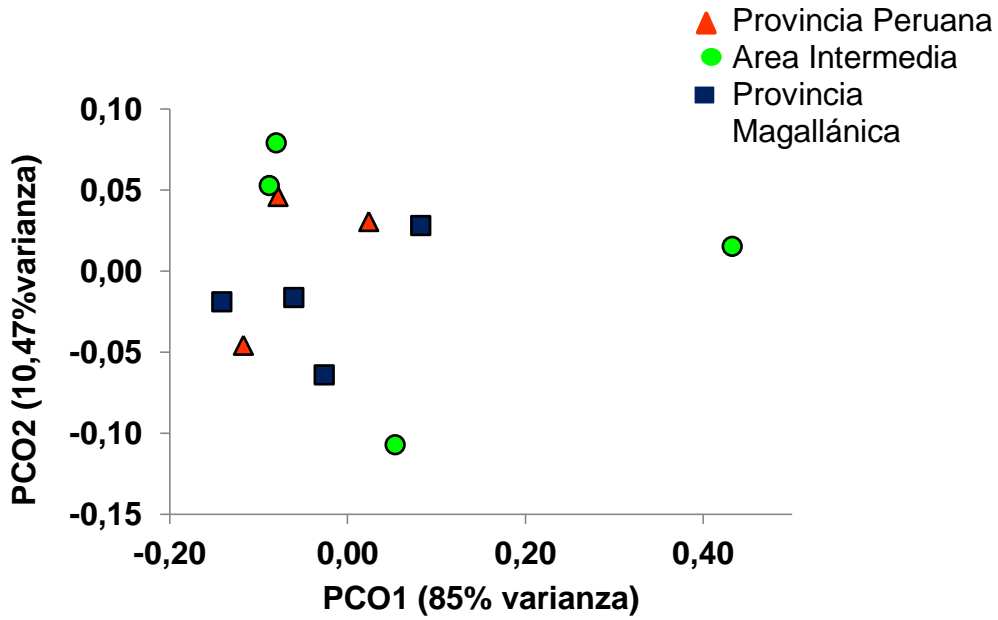


Figura 18. Representación espacial de centroides poblacionales para las dos variables de forma, que explican la mayor variación morfológica de *P. chilensis* a nivel latitudinal.

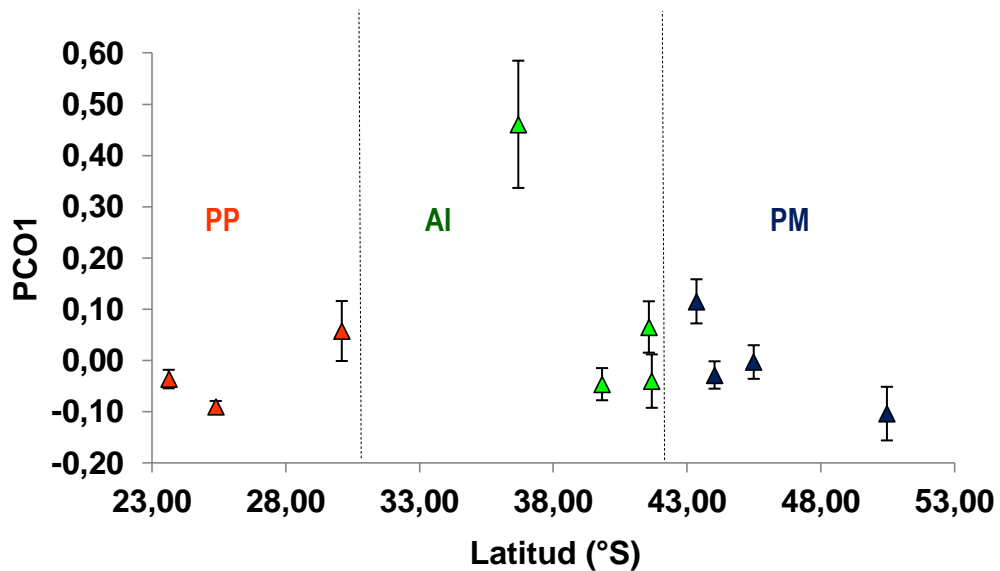


Figura 19. Distribución latitudinal de la variación correspondiente al primer eigenvalue (L3S) obtenido en componentes principales (incluye error estándar).

Localidad	N_{Machos}	N_{Hembras}	Prevalencia (%)	Intensidad Media	Abundancia Media
1. Antofagasta	4	19	95,8	1	0,95
2. Tal Tal	1	63	92,8	1	0,92
3. Punta Lagunilla	2	12	100	1	1
4. Bahía Concepción	6	6	16,4	1	0,16
5. Los Molinos	0	12	40	1	0,4
6. Bahía Mansa	0	0	0	0	0
7. Metri	1	4	6,8	1	0,06
8. Caleta La Arena	0	4	20	1	0,2
9. Punta Yatac	3	39	43,3	1	0,43
10. Punta San Pedro	0	0	0	0	0
11. Melinka	0	6	9,7	1	0,097
12. Canal Pilcomayo	8	20	35,4	1	0,35
13. Canal Oeste	0	7	11,7	1	0,11
14. Cabo Phillips	0	0	0	0	0
15. Paso Adventure	0	0	0	0	0
Total latitudinal	25	192	24,4	1	0,24

Tabla3. Descriptores poblacionales y número de hembras y machos de *Pinnaxodes chilensis* encontrado a nivel regional y latitudinal.

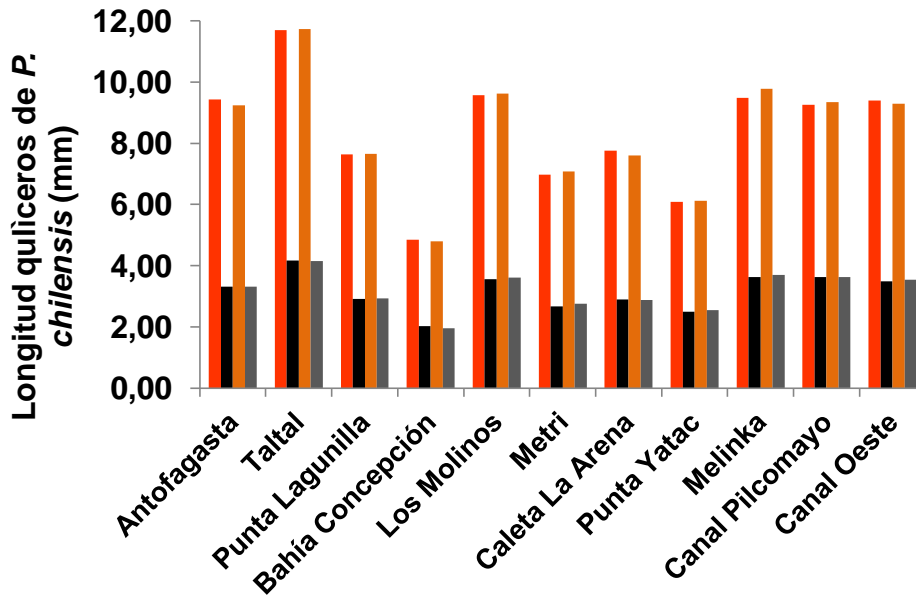


Figura 20. Variables biométricas promedio de *P. chilensis*, correspondientes a los quelíceros de hembras para cada localidad. Barras color naranja (oscuro-claro) corresponden a la longitud (mm) del quelílcero derecho e izquierdo respectivamente, mientras que las barras color negro y gris, indican su ancho respectivo.



Figura 21. Representación del tamaño estandarizado (respecto al tamaño corporal) de los quelíceros derecho e izquierdo para machos y hembras de *P. chilensis*. Se comparan las longitudes medias entre ambos sexos.

Tabla 4. Diversidad genética del gen COI para las localidades consideradas en estos análisis según región biogeográfica. En esta base de datos se considera sólo individuos secuenciados de *P. chilensis* (N_{sec}) cuya longitud alcanzó las 700 pb.

Región Biog.	Localidad	LatS - LongW	N_{sec}	N_{hap}	S	He	π_1	π_2
1. PP	1. Antofagasta	23°38'S - 70°23'W	6	4	6	0,87	2,20	0,003
	2. TalTal	25°23'S - 70°28'W	39	22	29	0,90	2,51	0,004
	3. Pta.Lagunilla	30°6'S - 71°23'W	3	2	5	0,67	3,33	0,005
Σ			48	28	40	0,91	2,53	0,004
Promedio			16	9,3	13,3	0,81	2,68	0,004
2. AI	4. B. Concepción	36°42'S - 73°1'W	6	5	7	0,93	2,73	0,004
	5. Los Molinos	39°50'S - 73°24'W	7	4	6	0,71	1,71	0,002
	Σ			13	9	13	0,86	2,21
Promedio			6,5	4,5	6,5	0,82	2,22	0,003
3. PM	6. Pta. Yatac	43°21'S - 73°39'W	10	10	14	1	2,8	0,004
	7. Melinka	44°2'S - 73°36'W	3	3	6	1	4	0,006
	8. C.Pilcomayo	45°30'S - 73°42'W	10	8	13	0,96	3,38	0,005
	9. Canal Oeste	50°28'S - 75°06'W	5	5	8	1	3,6	0,005
Σ			28	26	41	0,97	3,18	0,005
Promedio			7	6,5	10,25	0,99	3,44	0,005

PP, Provincia Peruana; **AI**, Área Intermedia; **PM**, Provincia Magallánica; N_{hap} , n° de haplotipos; **S**, n° sitios polimórficos; **He**, Diversidad haplotípica; π_1 , n° medio de diferencias pares; π_2 , diversidad nucleotídica.

Tabla 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA jerárquico) para las tres regiones biogeográficas del PSO (PP, AI y PM).

AMOVA Groups of locs			Structured tested			F statistic	P-values
1	3	(Antof, TalT, P. Lag)	(Concep, Los Mol, C. are)	(P. Yat, Mel, C. Pil, C. oest)		Fsc= -0.01248	0,64693
		PP	AI	PM		Fst= 0.00397	0,45554
						Fct= 0.01625	0,06624

Tabla 6. Matriz de distancia geográfica (Km) entre pares de localidades ordenadas de norte a sur.

Localidades	1. Antof	2. TalTal	3. Pta.Lag	4. B.Conc	5. Los Mol	7. Pta.Yatac	8. Melin	9. C. Pilc	10. C. Oes
1. Antofagasta									
2. TalTal	196								
3. Pta.Lagunilla	725	530							
4. B.Concepción	1474	1280	749						
5. Los Molinos	1822	1627	1097	349					
6. Pta.Yatac	2212	2017	1487	741	392				
7. Melinka	2285	2090	1560	816	467	75			
8. C. Pilcomayo	2448	2252	1722	979	630	238	163		
9. Canal Oeste	3010	2815	2285	1540	1191	799	725	563	

Tabla 7. Matriz de distancia genética, medida como diferencia entre pares de poblaciones. Valores de Fst parte inferior izquierda y valores de significancia respectivo en parte superior derecha. Localidades se encuentran ordenadas de norte a sur.

Localidades	1. Antofagasta	2. TalTal	3. Pta.Lagunilla	4. B.Concepción	5. Los Molinos	7. Pta.Yatac	8. Melinka	9. C. Pilcomayo	10. C. Oeste
1. Antofagasta		0,24	0,71	0,09	0,12	0,82	0,38	0,54	0,16
2. TalTal	0,065		0,14	0,15	0,07	0,08	0,80	0,32	0,19
3. Pta.Lagunilla	-0,024	0,092		0,12	0,84	0,68	0,29	0,42	0,10
4. B.Concepción	0,075	0,124	0,044		0,38	0,47	0,53	0,34	0,60
5. Los Molinos	0,036	0,193	-0,033	0,023		1,00	0,20	0,72	0,31
6. Pta.Yatac	-0,035	0,104	-0,011	-0,001	-0,036		0,48	0,59	0,60
7. Melinka	0,045	-0,031	0,037	-0,026	0,023	-0,016		0,81	0,89
8. C. Pilcomayo	-0,011	0,011	0,001	0,017	-0,026	-0,009	-0,086		0,60
9. Canal Oeste	0,074	0,097	0,056	-0,039	0,012	-0,012	-0,180	-0,023	

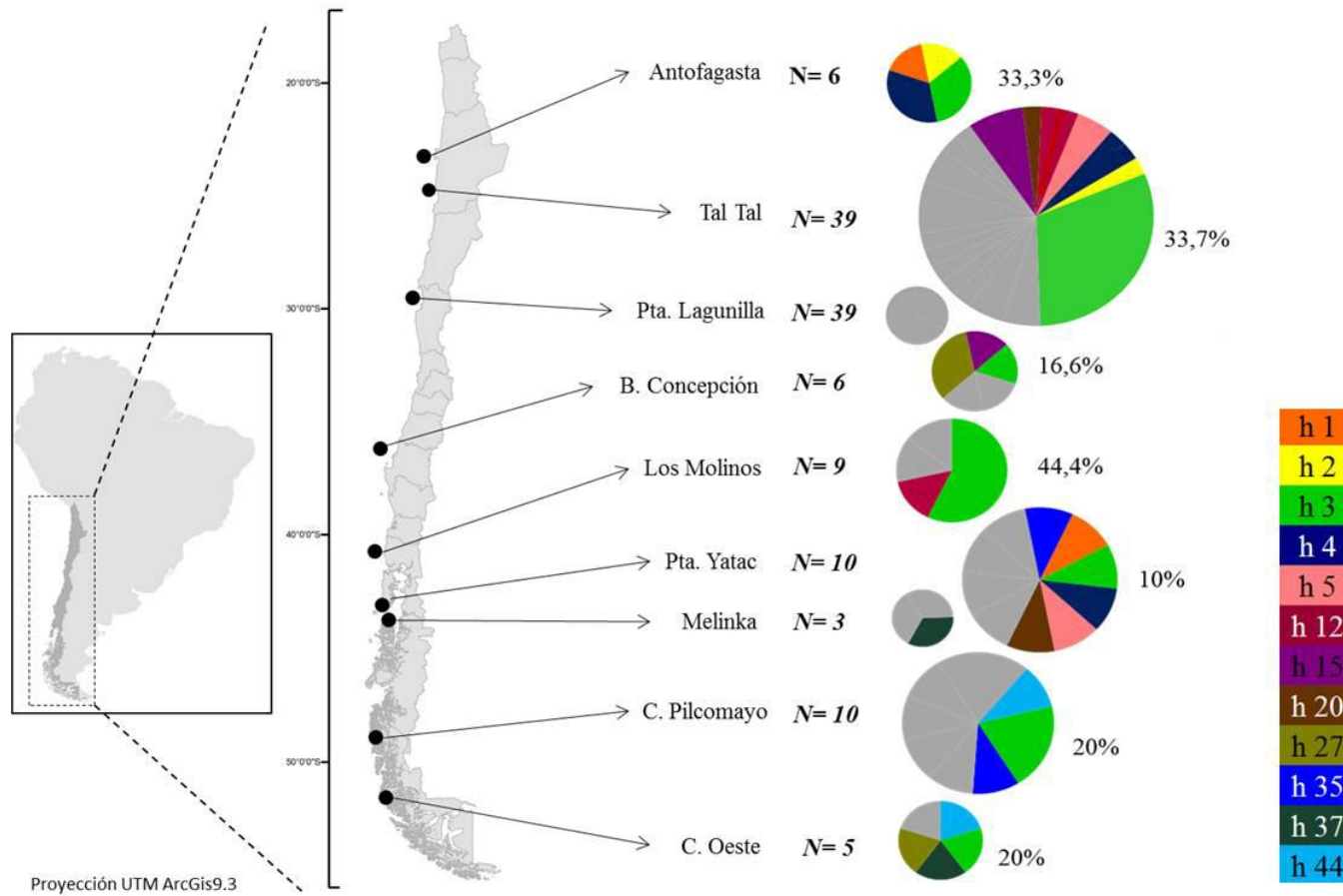


Figura 22. Distribución espacial de los 45 haplotipos encontrados. Los colores indican haplotipos compartidos, mientras que en gris se señala haplotipos privados y/o únicos. El tamaño del área es proporcional al número de individuos secuenciados (N), con el porcentaje de ocurrencia del haplotipos más recurrente (H3). Al lado derecho se indica el color de cada haplotipo compartido.

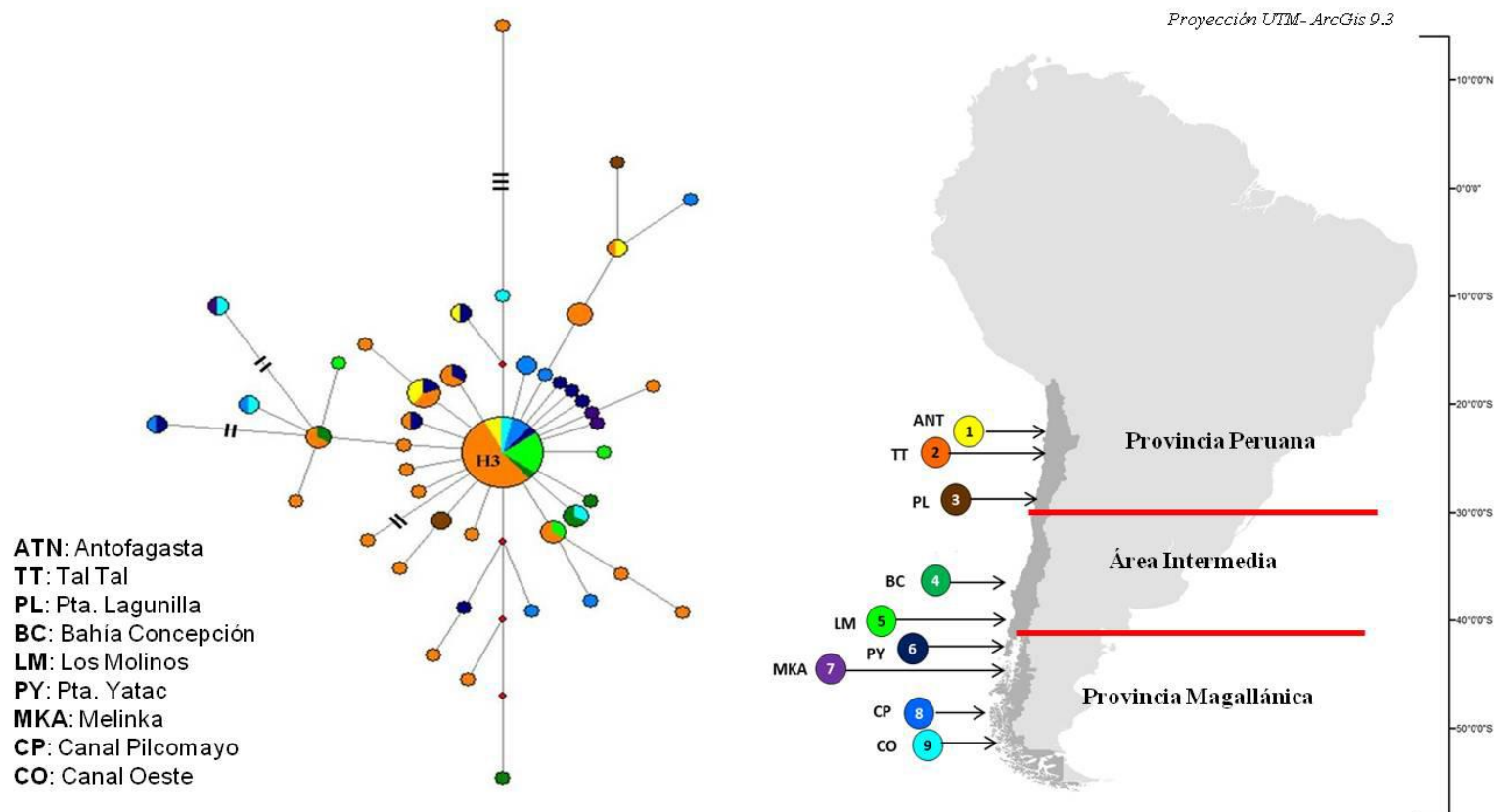
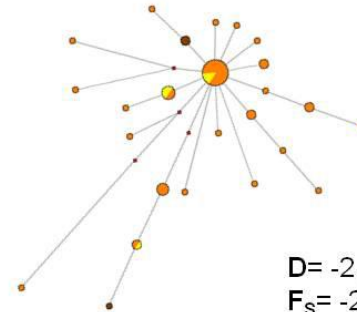
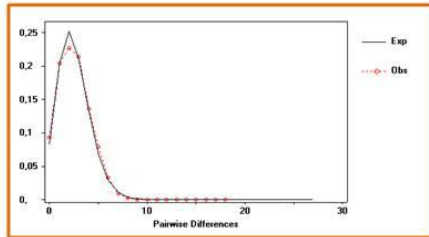


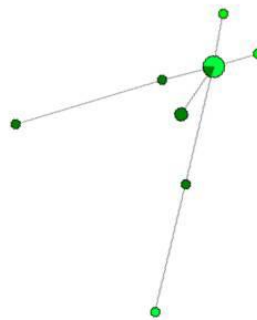
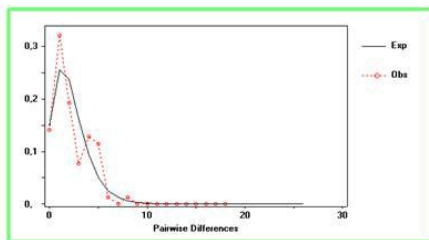
Figura 23. Red de haplotipos para nueve localidades de *P. chilensis*. Las localidades se encuentran señaladas por color, cada círculo corresponde a un haplotipo y su tamaño es proporcional al número de individuos representados por ese haplotipo. Las rallas negras entre haplotipos corresponde a la distancia en pasos mutacionales (1 raya= 1 paso mutacional y H3= Haplotipo ancestral) (Arlequin v.3.5, Exocoffier & Lisher, 2010).

Provincia Peruana



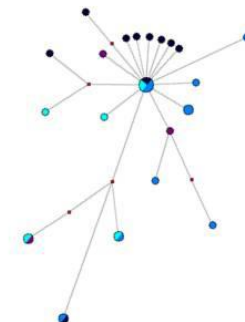
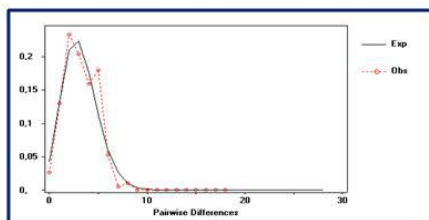
$D = -2,09$; $P = 0,001$
 $F_S = -21,57$; $P < 0,0001$

Área Intermedia



$D = -1,52$; $P = 0,05$
 $F_S = -3,27$; $P < 0,01$

Provincia Magallánica



$D = -1,52$; $P = 0,05$
 $F_S = -3,27$; $P < 0,01$

Figura 24. Inferencias de la historia demográfica para las tres regiones biogeográficas estudiadas. De izquierda a derecha se presenta la distribución mismatch, Arlequin v.3.5 (Excoffier&Lisher, 2010), red de haplotipos, Network v 4.6.0 (Bandelt et al. 1999) y los respectivos índices de neutralidad D de Tajima y F_S de Fu-Li calculados, Arlequin v.3.5.

4. DISCUSIÓN

Pinnaxodes chilensis es un crustáceo braquiuro que desarrolla una interacción interespecífica con una de las especies más explotadas e importantes para Chile en términos socioeconómicos, el erizo comestible *Loxechinus albus*. Los resultados obtenidos a través de esta investigación aportan nueva información acerca de los patrones de distribución genética y morfológica en casi todo su rango geográfico, cubriendo 15 localidades distribuidas desde los 23° a 56°S. El análisis multivariado evidencia que gran parte de la diversidad morfológica total está representada por el tercer segmento abdominal. Mientras que la subunidad I del marcador molecular Citocromo Oxidasa (COI), ha demostrado que *P. chilensis* presenta alta diversidad genética a nivel específico con un alto número de haplotipos de baja frecuencia. Sin embargo, no presenta estructuración genética ni morfológica entre sus localidades ni entre las regiones biogeográficas descritas a lo largo de su rango distribucional. El patrón encontrado será discutido en función de los parámetros poblacionales de *P. chilensis* dentro de un contexto biogeográfico. Esto incluye posibles efectos de variables ambientales caracterizadas en este trabajo.

4.1 Descriptores poblacionales de *Pinnaxodes chilensis*

4.1.1 Prevalencia, Intensidad Media y variables ambientales

El patrón latitudinal de prevalencia obtenido en *P. chilensis* estaría modelado por distintas características ambientales presentes en el gradiente de los 23° a los 54°S. La caracterización de Temperatura Superficial Media del mar (TSM) para las 15 localidades analizadas, coincide con la clina latitudinal ($r = -0.93$; $P < 0,00$) (Fig.11). Experimentalmente se ha demostrado que la temperatura es un factor clave para estimular el crecimiento y el desarrollo temprano del ovario en crustáceos (Kinne, 1970; Annala *et al.*, 1980; Nelson *et al.*, 1988). Dado que las aguas del extremo norte del rango estudiado poseen temperaturas más altas y menor oscilación en promedio (PP= $\sim 19^\circ\text{C}$), en comparación con las temperaturas más bajas y mayores fluctuaciones en la zona centro (AI= 16°C) y sur (PM= $9,5^\circ\text{C}$), sugerimos que la variable TSM podría ser una causa importante en favorecer mayores prevalencias a bajas

latitudes. Resultados similares en parásitos marinos mencionan que diferencias encontradas entre años en descriptores comunitarios, estarían influenciados por variaciones de la TSM, afectando los estados larvales y/o reproducción de copépodos infectantes de *Sciaena deliciosa* en el mar Peruano (Iannacone *et al.*, 2010). No obstante, la prevalencia diferencial encontrada entre localidades expuestas y protegidas al oleaje para AI y PM en nuestro estudio, podrían deberse a la mayor oscilación de corrientes que estos sectores presentan de Chiloé al sur (Silva *et al.*, 1998). Al respecto, se ha señalado que la migración vertical y la migración ontogénica de las larvas de decápodos, participan directamente en el proceso de retención y dispersión larval, permitiendo que la descendencia de la decapofauna bentónica o pelágica encuentre un ambiente propicio para completar su desarrollo (Chen *et al.*, 1997; Escribano *et al.*, 2002; Martinho *et al.*, 2006). La variabilidad del flujo de las aguas de los canales al sur de Chile y su compleja dinámica, es producto de la interacción del efecto del viento, la topografía submarina y las corrientes de marea (Cáceres *et al.*, 2007). Por ende mayores fluctuaciones de corrientes, TSM y S‰ actuarían como presión selectiva en la sobrevivencia larval o su éxito en la búsqueda de un lugar especializado para el asentamiento (erizo) entre localidades expuestas y protegidas al oleaje directo, como el ingreso de agua dulce proveniente de ríos y la alta pluviosidad de estas zonas, lo que genera marcadas haloclinas someras (20 m) y circulación tipo estuarina (Silva *et al.*, 1998). Otro factor a discutir en este patrón de prevalencia es la condición nutricional de las hembras, ya que en los crustáceos la nutrición influye directamente con la madurez (Harrison, 1990). Sin embargo, el alimento no parece ser un factor limitante para *P. chilensis* por dos razones; (1) El principal ítem dietario de su hospedero *L. albus*, comprende algas del género Phaeophyceae y Rhodophyceae de amplia distribución en la costa de Chile (González *et al.*, 2008) y (2) El cangrejo comensal basa su alimentación en los restos acumulados en el interior del recto del erizo de mar (Gutierrez & Martínez, 1971). Esta observación podría contrastarse por ejemplo, en la idea que organismos parásitos normalmente poseen una superabundancia de recursos (Rohde, 1991).

Respecto a la intensidad media de infección reportada en este estudio destacan las condiciones de ausente o de sólo un comensal dentro de cada huésped, lo que podríamos conjeturar como un mecanismo de señal química en el erizo captada por *P. chilensis* en estado larval. Si la señal química no se produce u ocurre un fracaso en este proceso, se impediría entonces que la larva encontrara su huésped. A pesar de lo desconocido de este proceso o si

existe un evento químico mediador en algún momento especial de la vida del huésped, Sastry & Menzel (1962) describieron para el comensal *Pinnotheres maculatus* de la costa de Florida, un fenómeno de quimotaxis. Sus autores describen dos opciones de huéspedes para el pinotérico determinadas por este fenómeno.

4.1.2 Dimorfismo sexual y frecuencia de ocurrencia de sexos

Para la familia Pinnotheridae lo reducido de su tamaño corporal constituye un mecanismo estratégico en su ciclo reproductivo, dada su condición de simbioses (Stevens, 1990). Sin embargo, el dimorfismo sexual para los cangrejos de esta familia no se describe, probablemente a la poca ocurrencia de individuos machos. Ejemplo de ello no sólo lo constituye *P. chilensis*, para el que se sugiere un comensalismo selectivo por sexo (Rathbun 1918, Garth 1957), sino también para varias de las especies estudiadas dentro de esta familia (Sastry & Menzel, 1962; Stevens, 1990). El dimorfismo sexual en particular y consecuente conducta comensal asumida para *P. chilensis*, concuerda con lo observado en *Tunicotheres moseri*, pinnotherido de la cavidad atrial del tunicado *Phallusia nigra* (Hernández *et al.*, 2008).

La frecuencia de machos encontrada en siete localidades de las 11 con prevalencias mayores a cero (Fig.14), nos hace rechazar la lógica general esperada para frecuencias de ocurrencia 100% hembras según las selectivas características de comensalismo antes señalada (Rathbun, 1918; Garth, 1957). Sin embargo, esta frecuencia de machos a nivel latitudinal es ínfima (11.4%) si se compara con hembras, las cuales porcentualmente representan gran parte de la prevalencia en todo el gradiente estudiado. Por otro lado, observaciones propias de esta investigación respecto a hembras ovígeras en distintas etapas de desarrollo, demuestra la adaptabilidad de *P. chilensis* al estilo de vida asociado (Hipeau-Jacquotte, 1973). Este patrón, acompañado de los diferentes estados de mudas en que se encontraban las hembras, deriva a proponer dos hipótesis (1) El ciclo reproductivo no es sincronizado a nivel específico a lo largo de todo su gradiente distribucional y ocurre en periodos continuos, tal como lo informó Dowds (1978) para varias especies de *Pinnixa* en un estuario de Carolina del Norte, USA. (2) La razón de sexo para esta especie no es 1:1, con la existencia de un macho visitador (vida libre) capaz de fecundar a más de una hembra. Cabe destacar que de los 217 ejemplares de *P.*

chilensis encontrados dentro de erizos, el 11,5% fueron machos y el 88,4% hembras, para una proporción sexual de 1 macho: 7,6 hembras. Similares valores fueron observados en *Juxtafabia muliniarum* con 29.5% machos y 70.5% hembras, para una proporción sexual de 1 macho: 2,4 hembras (Cabrera *et al.*, 2001). Gran parte de los trabajos realizados para otras especies de pinotéridos asociados a moluscos bivalvos (Pearce, 1964, 1966), a galerías de camarones excavadores (Dos Santos & Pezzuto, 1997) y equinodermos (Bell & Stancyck, 1983) indican relaciones sexuales de 1:1. Coincide con lo informado para pinotérido hospederos de tubos de poliquetos (McDermott, 1981), donde dominan las hembras. Distintamente, esta relación difiere a lo registrado por Ambariyanto & Seed (1991) para *P. pisum* (1.4:1) y por Kruczynsky (1973) para *P. maculatus* (1.6:1), ambos hospederos en *Mytilus edulis*, donde los machos fueron dominantes.

El comensalismo selectivo por sexo a lo largo de todo el gradiente de esta investigación, respondería además a una estrategia reproductiva en beneficio de proteger al embrión de factores macro-ambientales, ya que recibir un hábitat permanente, además de alimento suficiente, permitiría aumentar la tasa de supervivencia considerablemente (Rohde, 1982). Esto se sustenta por el alto rendimiento reproductivo reportado desde la zona centro-norte de Chile para hembras ovígeras de *P. chilensis* (Lardies & Castilla, 2001), lo que constituiría una adaptación al nicho simbiote en esta familia compensando así la alta mortalidad larval (Hines, 1992).

4.2 Caracterización comensal - hospedero

La correlación no significativa ($r = -0,14$) observada en la distribución de tallas de *L. albus* (LT) respecto a la latitud geográfica (Fig. 15), no es condicente a lo acordado por varios autores respecto de que invertebrados marinos muestran un aumento en su tamaño hacia latitudes altas (Garth *et al.*, 1967; Boschi *et al.*, 1969; Steele, 1983; Arntz & Gorny, 1991). Tamaños variables de erizos dentro y entre localidades podrían responder a factores físicos locales. Sin embargo, la significativa relación de tallas ($r^2 = 0,44$; $P = 0,03$) entre *P. chilensis* (LC) y su hospedero (Fig. 16), es congruente a lo esperado para parásitos marinos en general (Poulin, 1995) donde erizos con mayores longitudes albergan individuos de *P. chilensis* más grandes. Por otro lado, variación de tamaño sin un patrón latitudinal en *P. chilensis* no

armoniza con lo propuesto por Abele (1982), quien postula una disminución del tamaño en crustáceos en general a medida que decrece la latitud.

De acuerdo a los resultados del análisis de presencia o ausencia de *P. chilensis* versus el tamaño de su huésped, discutimos que a pesar de inferir presencia a partir de los 40 mm de longitud de testa de *L. albus* ($\text{Chi}^2 = 6,3$; $P < 0.01$), es probable que el comensal habite la zona rectal desde un estado muy temprano del desarrollo, el que evidentemente no se ha podido demostrar (ver fig. 1 estado 4). El ensanchamiento del recto proporcional al tamaño de *P. chilensis* abarca el interrradio DE y buena parte del interrradio CB, lo que significa un aparente desplazamiento del extremo de la gónada alejándose del ano y un aplastamiento de la zona gonadal directamente presionada por el recto. Esto indica que probablemente el ingreso desde larva y crecimiento gradual del crustáceo permite al erizo adaptar sus estructuras bajo tensión sin consecuencias reproductivas. Vásquez & Bay-Schmith (2011), demostraron que las deformaciones producidas por el comensal no afectan la integridad de los anillos aborales ni su conexión a cada una de las gónadas, permitiendo que la sincronía del ciclo gametogénico no se vea interrumpida ni aun en las gónadas más directamente afectadas. Por otro lado, observaciones personales de esta investigación contribuyen a sustentar este argumento, donde erizos de varias localidades con presencia de *P. chilensis* mostraron poseer una protuberancia cercana a la región aboral entre los interrradios ya mencionados.

Tomando en cuenta la relación inter-específica generada por *P. chilensis* y *L. albus*, destacamos la nula existencia de reportes orientados a sugerir o clasificar esta interacción como un parasitismo propiamente tal. Aparentemente, para aquellos erizos con presencia de comensal, poseer una pared intestinal más delgada, especialmente el epitelio luminal que pierde sus plegamientos y reduce las vellosidades intestinales, no le significa repercusiones reproductivas (Rojas & Bay-Schmith, 2011). Si esta condición implica consecuencias nutricionales o metabólicas significativas para el erizo, sólo podría dilucidarse con estudios futuros de esta naturaleza.

Distintamente, para la costa oeste de India se ha registrado una relación de parasitismo facultativo en un cangrejo de la misma familia. El braquiuro *Pinnotheres sp* causaría daños en los tejidos blandos de su huésped, la almeja *Meretrix casta* según lo reporta Silas & Alagarswami (1965). Estos autores sugieren que el parasitismo o comensalismo estaría

relacionado con las fluctuaciones en el tamaño poblacional de *Pinnotheres sp*, donde la abundancia de cangrejos en los meses de muestreo desencadenaría el parasitismo.

4.3 Variabilidad morfológica latitudinal de *Pinnaxodes chilensis*

4.3.1 Análisis morfológico multivariado

Los métodos para la recopilación de datos morfológicos, a pesar de experimentar grandes avances en el desarrollo de técnicas de procesamiento de imágenes digitales, continúan basándose en métodos multivariantes para investigar patrones de varianza en datos múltiples (Cadrin, 2000). Análisis multivariado de hembras de *P. chilensis* demuestran que la variabilidad morfológica en un 95% del total, se encuentra representada por el largo del tercer segmento abdominal (L3S) y la altura (H) con 85,3% y 10,5% respectivamente. Los valores complementarios de PCoA y PCA nos permiten discutir que la primera variable de forma L3S constituiría el apéndice más plástico a nivel específico dado la heterogeneidad de su distribución espacial por las siguientes razones con Hines (1992) los ovarios en este orden se extienden fuera del cefalotórax: (1) El abdomen constituye el reservorio de la masa ovígera, por lo tanto el cefalotórax constituiría una limitación en el espacio disponible para los lotes de huevos en braquiuros. De acuerdo con Hines (1992) los ovarios en este orden se extienden fuera del cefalotórax en el abdomen, proporcionando más espacio para la acumulación de huevos, que al parecer no existe fuera de la familia Pinnotheridae (ovarios suelen limitarse al cefalotórax). (2) La pequeña cantidad de carbonato calcio depositado en el exoesqueleto de las hembras, permitiría que los segmentos abdominales tengan mayor plasticidad y modificación a los diferenciales ritmos de incubación (Bell & Stancyk, 1983; Hines, 1992). Esto sintoniza con el alto rendimiento reproductivo reportado para *P. chilensis* (Lardies & Castilla, 2001), además de observaciones propias de esta investigación anteriormente discutidas respecto al eventual ciclo reproductivo. Esta plasticidad en el abdomen determinada por la variable L3S, estaría siendo aportada principalmente por hembras sexualmente maduras, ya que la expansión y discontinuidad en el crecimiento relativo del abdomen en esta familia se relaciona directamente con la madurez sexual de las hembras (Pohle y Telford, 1982; Bell, 1988; Alves & Pezzuto, 1999; Alves *et al.*, 2005).

El 10% restante de la variabilidad morfológica total representado por la altura (H), estaría condicionado en su totalidad por el estado de desarrollo de la masa ovígera albergada en el cefalotórax, donde la mayor masa incubante sería la principal causa de incremento en altura de hembras de *P. chilensis*.

Probablemente los eventos físicos oceanográficos de macro-escala no estarían determinando la variabilidad morfológica total, ya que no hubo estructuración acorde a regiones biogeográficas ($P_{perm} = 0,45$). Sin embargo, fluctuaciones ambientales locales (temperatura, salinidad, corrientes, surgencias, entre otras), estarían provocando una variabilidad morfológica entre las localidades del rango estudiado, con sustento significativo del modelo Nested-PERMANOVA ($P_{perm} < 0,00$).

4.3.2 Variables biométricas del caparazón y alometría de quelíceros

Entre las nueve variables biométricas medidas en este estudio (Fig.3), las hembras presentaron en promedio una longitud de caparazón (LC) que superó el doble la longitud respectiva de los machos, lo cual coincide con lo informado por McDermott (1981) y Bell & Stancyk (1983) para la mayoría de los pinotéridos simbioses de moluscos, equinodermos y otros invertebrados marinos. Por otro lado, el ancho del caparazón (AC) promedio para *P. chilensis* (15,62 mm) se encontró cercano a los valores reportados por Pohle & Marques (1988) para *P. novaezelandie* y *P. pilumnoides* con tallas de 15,2 y 14,0 mm respectivamente.

Los resultados de esta investigación nos hace sospechar que los machos de *P. chilensis* ingresarían a su huésped con un AC promedio menor (7.12 mm) a lo reportado para algunas especies de la familia, tales como: *P. novaezelandie* (9.8 mm), *P. pilumnoides* (14.0 mm) y *Favia concharum* (12,1 mm). Pero mayor a *P. angelicus* (5.9 mm), *P. modiolicola* (6,3 mm), *P. pisum* (6,3 mm) y *P. taylori* (2,1 mm) (Pohle & Marques 1988). Esto considerando el AC medido en cangrejos encontrados dentro de los erizos, ya que determinar la talla exacta de entrada significa necesariamente una observación in situ o simulación en laboratorio.

El dimorfismo sexual en decápodos se reporta por diferencias en el crecimiento relativo entre machos y hembras, que no son claras en etapas iniciales. Existiendo estructuras que presentan patrones consistentes de variación en la alometría asociadas a la madurez, por ejemplo; el quelíceros (Hartnoll, 1978; Templeman, 1935; Alunno-Bruscia & Sainte-Marie,

1998; Díaz *et al.*, 2000; Hartnoll, 2001; Castilho *et al.*, 2004; Hirose & Negreiros-Fransozo, 2004).

Las diferencias no significativas en las variables biométricas del propodio izquierdo y derecho ($P_{\text{largo}}=0,432$; $P_{\text{ancho}}=0,223$) en hembras de *P. chilensis*, no nos permite discutir respecto a un crecimiento diferencial entre ambas estructuras. Sin embargo, y suponiendo que ambos quelíceros no difieren en tamaño y forma, es probable que tampoco lo hagan a nivel funcional, tal vez por el reducido espacio que ocupa en el intestino de su hospedero, que no permite una especialización heteroquelar dentro de su función alimenticia. Lo mismo se observó en *Austinixia aideae* (Peiró *et al.*, 2001) y *A. patagonensis* en dos localidades diferentes (Alves & Pezzuto, 1999; Alves *et al.*, 2005). Esta similitud difiere del patrón encontrado con frecuencia en braquiuros donde es común encontrar especies con heteroquelas (Hartnoll, 1982).

Distintamente, cambios de alometría observados en dimensiones del propodio entre machos y hembras (respecto a su tamaño corporal) evidencian un crecimiento diferencial a nivel específico ($P_{\text{largo}} < 0.000$). La forma y tamaño de quelíceros son parámetros importantes en el estilo de vida de braquiuros, ya que estas estructuras se utilizan en las interacciones reproductivas y antagonistas, así como en la alimentación (Negreiros-Fransozo & Fransozo, 2003). Para machos de *P. chilensis* tener quelíceros más grandes podría deberse a dos razones; (1) Significar un beneficio reproductivo, ya que llegar donde se encuentra la hembra y tomarla con firmeza considerando que esta duplica su tamaño corporal, constituye un evento importante en la transferencia de espermátóforos a la abertura genital para asegurar efectividad en la cópula, la que se realizaría mediante pleópodos unirrámios (Bauer & Martín, 1991; Harrison, 1992). Este razonamiento es consistente con observaciones remotas de Hartnoll (1974), quien cataloga el dimorfismo sexual en quelíceros de machos como una consecuencia de su utilización durante las fases precopulativa y copulativa. Resultados de Abello y Sardá (1982) para el braquiuro *Goneplax rhomboides*, señalan que el conjunto del quelícero (mero + carpo + propodio) puede alcanzar una longitud de 2-3 veces la longitud del cefalotórax. (2) Mayores dimensiones de estas estructuras sería una hipótesis de su utilización para la defensa territorial, combate o interacciones agresivas con otros machos o para la obtención de recursos con los cuales atraer a la hembra. Varios autores señalan que el grado específico de dimorfismo sexual de esta estructura depende del sistema de apareamiento de la especie

(Hartnoll, 1974; Salmon, 1983; Orenzans & Gallucci, 1988). Inversamente, en las hembras de *P. chilensis* el gasto energético estaría destinado a crecimiento somático en desmedro de sus quelíceros, para las cuales las peleas por territorio o comportamiento de cortejo estarían ausentes, como consecuencia de la conducta comensal asociada.

4.4 Caracterización molecular de *Pinnaxodes chilensis*

4.4.1 Descripción de la diversidad genética en el PSO

Análisis de la subunidad I del gen mitocondrial COI evidencia una alta diversidad genética ($H_e = 0,91 \pm 0,12$) y una baja diversidad nucleotídica ($0,003 \pm 0,001$) a nivel específico, igual a lo obtenido individualmente para cada una de las nueve localidades correspondientes a ~ 3030 Km del PSO. Los valores de estos índices son congruentes con lo observado en varias especies marinas de amplia distribución que contemplan alto potencial dispersivo y abundancia (Tabla 1), tanto para en las costas de Chile como en otros océanos (e.g. el Equinodermo *Holothuria nobilis*, Uthike & Benzie, 2003; el Decápodo *Pachygrapsus crassipes*, Cassone & Boulding, 2005; el Cordado *Pleuragramma antarcticum*, Zane *et al.*, 2006; el Littorinimorfo *Littorina keenae*, Lee & Boulding, 2007; el Neogastrópodo *Concholepas concholepas*, Cárdenas *et al.*, 2009 y el Decápodo *Emerita analoga*, Dawson *et al.*, 2011). El alto número de haplotipos (45) para las 92 secuencias analizadas puede obedecer, primero, al aumento de la tasa mutacional; y segundo, al gran tamaño poblacional efectivo de la hembra de *P. chilensis*. El alto número de haplotipos raros encontrado en este estudio sugiere de forma más laudable este segundo punto (Lewontin, 1974; Hiatt 1948; Morris *et al.*, 1980; Cassone & Boulding, 2005). Por otro lado, esta aparición de variantes raras y similitudes genéticas estrechas, se ha considerado como una huella evolutiva de expansión poblacional (Rogers 1995; Graves 1998; Uthicke y Benzie, 2003; Lee & Boulding, 2007), lo que convendría en una consecuente desviación al equilibrio mutación-deriva. Respecto a los bajos índices de diversidad nucleotídica ($0,003 \pm 0,001$) observado en *P. chilensis* para todas las localidades del PSO, podría atribuirse a la existencia relativamente corta de haplotipos, por lo que los haplotipos nuevos a crearse se extinguen después de haber obtenido unas pocas diferencias de pares de bases adicionales. Además, podríamos proponer que represente a

secuencias indiferenciadas de un reciente linaje ancestral común, según similares inferencias reportadas para un braquiuro de la costa Oeste de América del Norte (Cassone & Boulding, 2005).

Estimadores de diversidad genética alta también han sido reportados para otros organismos que igualmente habitan micro-ambiente muy específico; como es el caso de parásitos marinos. No obstante, estos índices se reportan supeditados a la capacidad dispersiva o vagilidad propia de su (s) hospedero (s) móvil (ver Prugnolle *et al.*, 2005), el que estaría determinando la composición genética y distribución del parásito (e.g. Blouin *et al.*, 1995; Criscione & Blouin, 2004; Prugnolle *et al.*, 2005; Jellyman & Graynoth, 2005; Louhi *et al.*, 2010; Blasco-Costa *et al.*, 2012). Descartamos para este estudio atribuir influencia significativa en los resultados de diversidad genética en *P. chilensis* por parte de su hospedero. Esto, debido a la baja probabilidad que un erizo logre desplazarse grandes distancias y atravesar regiones biogeográficas, por ser un organismo bentónico que no presenta patrones migratorios regulares (Castilla & Defeo, 2001).

4.4.2 Estructura genética y filogeográfica: Enfoques de historia de vida de *Pinnaxodes chilensis*.

De acuerdo a ostensibles reportes de numerosos autores, el flujo génico y la estructura de la población en el ambiente marino, estarían determinadas principalmente por dos líneas argumentativas: (1) Aspectos de la historia de vida (e.g. Scheltema, 1988; Doherty *et al.*, 1995; Bohonak, 1999; Dawson, 2001; Lester *et al.*, 2007) y (2) La interacción de factores ambientales y procesos oceanográficos (e.g. Cowen *et al.*, 2000; Byers & Pringle, 2006; Galindo *et al.*, 2006), que en muchas especies actúan como barrera biogeográfica delimitando quiebres genéticos (Avice, 2000; Maggs *et al.*, 2008). Por otro lado, la interacción conjunta de ambos razonamientos también ha sido propuesto (Lester *et al.*, 2007; Pelc *et al.*, 2009) (Tabla 8). Consideramos importante indicar que el punto segundo ha sido bastante descrito para la costa del PSO (chile y Perú), donde los patrones de circulación y condiciones oceanográficas (Narváez *et al.*, 2006, Aiken *et al.*, 2007, Thiel *et al.*, 2007, Wieters *et al.*, 2009) como la biogeografía de taxones marinos costeros, se conoce y está relativamente bien estudiado (Brattström & Johanssen 1983, Camus, 2001). Contrariamente, el punto primero

dado por la desconocida historia de vida de *P. chilensis*, pasa a constituir nuestra principal línea argumentativa en pro de analizar y explicar los patrones filogeográficos encontrados.

En decápodos que han adoptado un hábito de vida simbiótico, los estudios son escasos (Baeza, 1999). En estas situaciones, se podría considerar en futuros análisis el sistema de apareamiento de *P. chilensis* considerando dos caracteres; (1) dimorfismo sexual y (2) el patrón de asociación entre los sexos, los cuales según varios autores son modelados por interacciones sociales y el propio sistema de apareamiento de la especie (ver Hazlett *et al.*, 1974, Hazlett, 1979, Bell 1984, 1988). En *P. ostreum*, se ha postulado que el macho se mantiene pequeño, posee un caparazón duro y aparentemente se traslada de hospedador en hospedador en busca de hembras con las cuales copular hasta morir (Stauber, 1945; Christenensen & McDermott, 1958) (ver Fig.26). Cada individuo de *P. ostreum* copula varias veces con diferentes miembros del sexo puesto (Wilson, 1975; Barash, 1982; Salmon 1983). Sistema de apareamiento similar se ha discutido en las especies *Pinnotheres pisum*, entocomensal del mejillón *Mytilus edulis* en el Atlántico (Haines *et al.*, 1994), en *Pinnotheres novaezelandiae* asociado a varias especies de bivalvos en Nueva Zelandia (Jones, 1977; Palmer, 1995) y en *Pinnaxodes floridensis* asociado a *Theelothuria príncipes* en Florida (Well & Well 1961). Inferir un sistema de apareamiento en *P. chilensis* podría ser prematuro, donde hace necesario considerar estudios futuros por ejemplo, de la biología reproductiva del braquiuro.

Si se considera una función visitadora por parte del macho de *P. chilensis*, por un lado, ayudaría a contribuir en la variabilidad genética o flujo propio de sus desplazamientos. Por otro lado, y en mayor importancia dado el marcador mitocondrial utilizado en este estudio, el potencial dispersivo de la fase larval en la especie constituye discusión relevante en los patrones filogeográficos. A pesar de desconocer estos antecedentes en *P. chilensis*, una buena aproximación se obtiene gracias a los reportes de experimentos en condiciones de laboratorio respecto a la identificación y duración de los estadios larvales en varias especies de la familia Pinnotheridae. Un ejemplo es el caso de *Auxtinixa bragantina*, para la cual se establecen cinco estadios zoeas y una megalopa con duración de un mes aproximadamente en la columna de agua. Similar a lo reportado para otros géneros, como *Asthenognathus* (Stimpson, 1858), *Pinnaxodes* (Heller, 1865), *Pinnixia* (Blanco, 1846), *Pinnotheres* (Latreille, 1802) y

Tumidotheres (Campos, 1989), según lo informado por Marques & Phole (1996a,b). El modo de desarrollo, especialmente el tiempo que las larvas pasan en el plancton, sin duda, juega un papel crítico en la conformación de la estructura genética y filogeográfica de especies marinas (e.g. Scheltema, 1988; Doherty *et al.*, 1995; Bohonak, 1999; Dawson, 2001; Lester *et al.*, 2007). Muchos invertebrados marinos con larva de alta exposición y potencial dispersivo, poseen patrones similares de baja estructuración genética entre las poblaciones en escalas espaciales extensas y continuas (revisado de Avise, 1994) (ver Tabla 8). Esto es consistente a nuestros resultados, donde AMOVA jerárquico del gen COI en *P. chilensis* reveló bajo nivel de divergencia genética entre localidades y regiones biogeográficas, a pesar de las características a gran escala espacio temporal que describen la heterogeneidad geográfica ambiental del PSO. Además, la alta frecuencia de ocurrencia de un haplotipo (H3) en siete de las nueve localidades y alta diversidad haplotípica a nivel local y regional, nos hace asumir que los individuos de las nueve localidades analizadas no presentan sub-poblaciones, contrastado además con lo propuesto en el paradigma de conectividad por fase larval dispersiva (Helberg *et al.*, 2002).

Resultados similares se reportan para el decápodo *Emerita analoga*, la que contempla una dispersión larval potencial de tres a cuatro meses (Johnson, 1939). Su alta abundancia, larga duración de las larvas pelágicas y amplia gama de gradientes ambientales que habita, a través de los cuales muchos otros taxones exhiben discontinuidades genéticas o límites del rango, Dugan & colaboradores (2000) sugieren que la especie es un generalista ecológico que consiste en una única gran población para América del Norte. De igual forma en el PSO un estudio filogeográfico de Cárdenas *et al.*, (2009), describen una extensa fase larval planctónica de tres meses en el murícido *Concholepas concholepas*, la cual no mostró ninguna discontinuidad genética de sus poblaciones a lo largo de regiones biogeográficas.

La homogeneidad genética observada en el rango geográfico de *P. chilensis* se ha reportado en otras especies de cangrejos marinos de la costa Oeste de América del Norte (Beckwitt, 1985; Merkouris *et al.*, 1998). Por su parte, ejemplos similares se ha documentado para otros taxones de invertebrados marinos con extensa fase larval en diversos océanos, por ejemplo: Mar de Tasmania, *Jasus edwardsii* (Booth & Ovenden, 2000); Costa Nororiental del Pacífico, *Littorina scutulata*, (Kyle & Boulding, 2000); Costas de Australia y Nueva Zelanda, *Nerita atramentosa*, Waters *et al.*, 2005). Además, nuestro estudio es consistente con muchos

estudios que correlacionan positivamente la capacidad de dispersión con el flujo de genes (Palumbi, 1995; Kinlan & Gaines, 2003; Siegel *et al.*, 2003) y con el área de distribución geográfica (Scheltema, 1968; Victor & Wellington, 2000). A pesar de no coincidir con el escenario ampliamente asumido de concordancia entre barreras biogeográficas con quiebres filogeográficos (Avise, 2000; Maggs *et al.*, 2008), varios estudios comparativos de enfoque filogeográfico en el PSO han puesto de manifiesto la relación entre el modo de desarrollo y capacidad dispersiva en la estructuración genética poblacional (Zakas *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2011; Vilches *et al.*, 2012). Finalmente, los estudios de filogeografía comparada entre organismos comensales que compartan rasgos de desarrollo y distribución con distinta duración de las larvas pelágicas, por un lado ayudarán a dilucidar los patrones de comportamiento y flujo génico entre poblaciones distantes y, por otro lado, ayudarán a determinar si los procesos oceanográficos y ecológicos que tienen lugar en el PSO generan interacciones previsibles entre la dispersión larval y su potencial de adaptación local.

4.4.3 Demografía Histórica

Los patrones filogeográficos regionales surgen de las interacciones entre el pasado y presente, influenciadas por las historias de vida y limitaciones ambientales (Lester *et al.*, 2007; Pelc *et al.*, 2009). Resultados de relaciones genealógicas entre los haplotipos de *P. chilensis* reveló una red en forma de estrella, con un haplotipo central más frecuente, posiblemente ancestral (Avise, 2000; Hewitt, 2000), conectado por pocos pasos mutacionales a los demás haplotipos de baja frecuencia. Enmarcado en la teoría coalescente (Kingman, 2000) este patrón sugiere una expansión poblacional a partir de un número limitado de fundadores (Fig.32 y 24). A pesar de no existir antecedentes de registro fósil para *P. chilensis*, el accidente histórico más influyente en la actual distribución de las especies en el ambiente marino, es el Último máximo glacial (UMG) (Avise, 2000; Maggs *et al.*, 2008), el que habría forzado a muchos taxos de climas templados a retroceder en su rango de distribución durante el avance de las capas de hielo (Hewitt, 2000, 2004). Considerando este suceso, es probable que las poblaciones de *P. chilensis* del sur del rango estudiado hayan desaparecido y la persistencia de las poblaciones del norte hayan recolonizado lugares extintos. Este proceso de recolonización es consistente con los gráficos de distribución mismatch unimodal, el que se

ajusta a un modelo de expansión poblacional reciente con índices de neutralidad D de Tajima y F_s de F_u negativos y significativos.

La existencia de haplotipos únicos poco frecuentes del extremo sur del rango (H35, H37 y H44) y no compartidos a nivel de regiones biogeográficas (Fig.22), induce a una hipótesis de posible efectos fundadores por un lado y en mayor grado al patrón de corriente unidireccional a macro-escala. Un flujo importante de agua que fluye desde el norte de Perú hasta Chiloé, lo constituye la subcorriente Peruana Chilena con profundidad entre 100 y 400 metros que viaja opuesta a la rama costera del brazo norte de la corriente de Humboldt transportando agua subsuperficial. De forma más débil se encuentra la contracorriente Costera de Chile que transporta agua subtropical desde el noreste hacia el sur entre la corriente Costera del Perú y la costa Chilena. Finalmente, la Corriente de Cabo de Hornos que fluye paralela a la costa hasta el extremo sur del archipiélago Chileno, constituye en conjunto a las anteriores (Camus, 2001) un mecanismo dispersor en gran parte unidireccional. Estos procesos oceanográficos provocarían el aumento de la diversidad genética al sur según correlación significativa de este estudio (Fig.27), con aporte de nuevas variantes a partir de una población fundadora al sur. Los movimientos de haplotipos de sur a norte serían más frecuentes que en dirección opuesta, implicando una migración asimétrica de los mismos. Por otro lado, las mutaciones que surgen al sur sería poco probable se transporten al norte que a la inversa, lo que explicaría además la existencia de los haplotipos únicos al sur del rango no compartidos entre regiones. El transporte unidireccional por corrientes a macro-escala con aumento de diversidad genética ya ha sido propuesto en otros estudios (Edmands *et al.*, 1996; Gaylord & Gaines, 2000; Cassone & Boulding, 2005).

En un contexto contemporáneo, la alta frecuencia del haplotipo 3 (H3) presente en las tres regiones biogeográficas y siete de las nueve localidades estudiadas, nos hace proponer que en el PSO, el flujo de genes de *P. chilensis* sería en gran parte ininterrumpido a lo largo de los 3010 km de costa. Esto nos indica que los procesos oceanográficos que actúan como filtros regionales para el intercambio genético de muchas especies marinas de nuestra costa (e.g. Tellier *et al.*, 2009; Montecinos *et al.*, 2012; Sánchez *et al.*, 2011) no afectan a *P. chilensis* o son lo suficientemente permeables como para haber formado estructuración genética. En ausencia de fuertes barreras intrínsecas a la dispersión, la duración de la fase larval estimada en *P. chilensis* debe resultar en un alto flujo génico a grandes distancias, lo que nos hace

conjeturar que actualmente corresponda a una sola población o en gran parte panmíctica en toda su área geográfica (e.g. Palumbi, 1994; Thorrold *et al.*, 2002, Kinlan & Gaines, 2003). Es probable que el desarrollo post-embionario de *P. chilensis* podría desarrollarse sin captar alimento visible del medio externo durante su desarrollo larval, lo que podría explicar el sustento de la duración de esta fase en la especie aun por periodos más prolongados que lo reportado para especies de la misma familia (ver Fig.26). Este fenómeno de lecitotrofia ha sido propuesta para otras especies tales como; *Tunicotheres moseri*, de la cavidad atrial del tunicado *Phallusia nigra* (Hernández *et al.*, 2008) y *Orthotheres barbatus*, otro miembro de la misma familia (Galindo *et al.*, 2003).

Tabla 8. Rasgos comparativos de diferenciación genética entre crustáceos y organismos marinos con diversa historia de vida y magnitud de escalas geográficas. Se contrasta información entre especies que poseen desarrollo directo con aquellas de fase larval dispersiva.

Información de la Historia de vida					Información Genética							
Especie	Organismo	Rango	Desarrollo	Hábitat	Marcador	Estructuración	Escala	N _{sec}	N _{hap}	H _e	π	Fuente
		Distibución	(Dispersión)			Genética	Geográfica					
<i>Pinnaxodes chilensis</i>	Crustáceo	PSE	Larva	Comensal	COI (mit.)	NO	~ 3.010 Km	92	45	0.91	0.003	Runil <i>et al.</i> <i>In prep</i>
	Decápodo		(~1-2 meses)	intermareal inframareal								
<i>Emerita analoga</i>	Crustáceo	PSO	Larva	Intermareal	COI (mit.)	NO	~ 2.000 Km	297	SD	* 0.92	* 0.004	Dawson <i>et al.</i> , (2011)
	Decápodo		(3-4 meses)	(Arenoso)								
<i>Pachygrapsus crassipes</i>	Crustáceo	PNE	Larva	Intermareal	COI (mit.)	NO	~ 2.500 Km	346	154	0.92	0.009	Cassone & Boulding, (2006)
	Decápodo			superior (rocoso)								
<i>Concholepas concholepas</i>	Molusco	PSE	Larva	Intermareal	COI (mit.)	NO	~ 4.141 Km	337	179	0.89	0.004	Cárdenas <i>et al.</i> , (2009)
	Murícido		(3-6 meses)	submareal (rocoso)								
<i>Acanthina monodon</i>	Molusco	PSE	Directo	Intermareal	COI (mit.)	SI	~ 2.732 Km	227	43	0.53	0.004	Sánchez <i>et al.</i> , (2011)
	Murícido			Submareal (rocoso)								
<i>Littorina subrotundata</i>	Molusco	PNE	Directo	Intermareal	Cyt b (mit.)	SI	~ 64 Km	229	11	0.30	0.001	Lee & Boulding (2009)
	Gasterópodo			medio y sup. (rocoso)								
<i>Exirolana braziliensis</i>	Crustáceo	PSE	Directo	Supralitoral	COI (mit.)	SI	~ 2.241 Km	132	45	SD	SD	Varela & haye (2012)
<i>Crepidula coquimbensis</i>	Molusco	PSE	Directo	Intermareal	COI (mit.)	SI	~ 26 Km	83	19	0.73	0,002	Vilches <i>et al.</i> , (2012)
	Gasterópodo			(Arenoso)								

PSE= Pacífico Sureste; **PSO**= Pacífico Suroeste; **PNE**; Pacífico Noreste; **N_{sec}**= Número de individuos secuenciados; **N_{hap}**= Número de haplotipos; **H_e**= diversidad genética; **π** = diversidad nucleotídica; **SD**= sin datos.

* Corresponde a un dato promedio.

Mecanismos de transporte; corrientes, surgencias-relajación, etc.

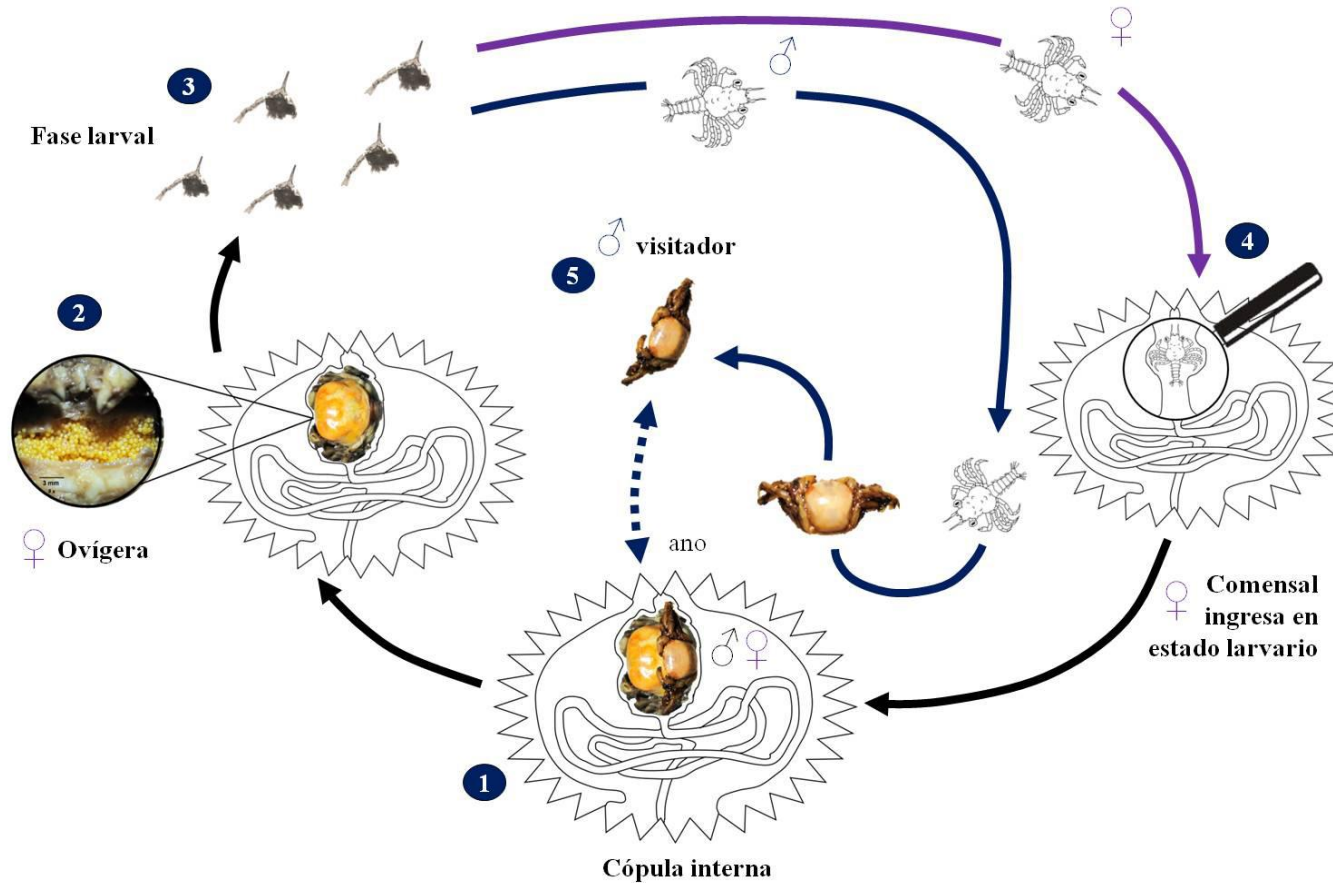


Figura 26. Ciclo de vida sugerido para *P. chilensis*. (1) Reproducción por cópula interna a través de pleópodos de un macho visitante. (2) Hembra ovígera incuba los huevos bajo el cefalotórax hasta liberar los estadios larvales pelágicos. (3) Fase larval en la columna de agua (zoeas y megalopa). (4) probablemente el ingreso al huésped sea en un estado larval, con estructuras desarrolladas para adherirse al intestino.

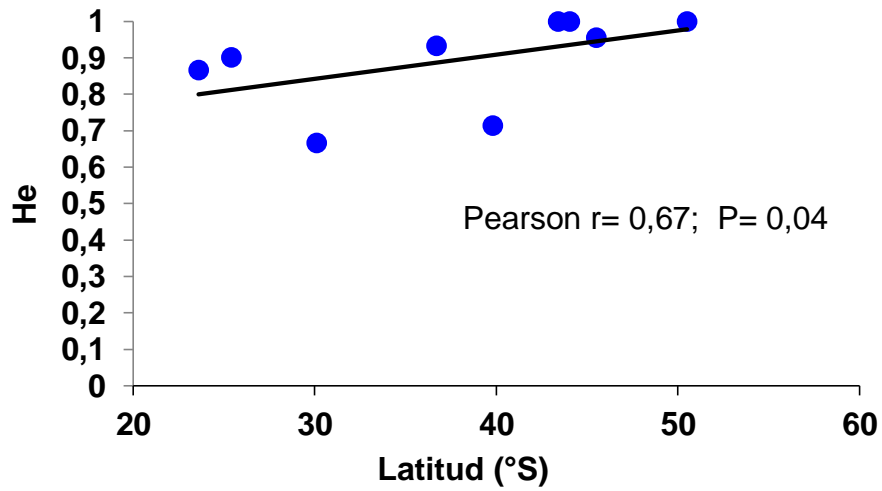


Figura 27. Diversidad genética (He) versus la latitud geográfica en el PSO, con respectiva significancia de la correlación Pearson.

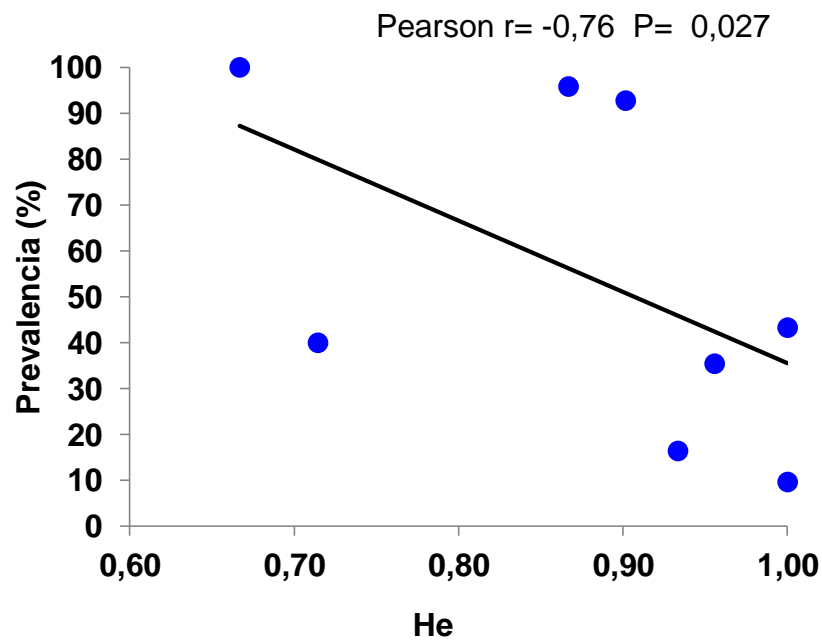


Figura 28. Prevalencia de infección de *P. chilensis* versus la diversidad genética (He) encontrada a lo largo del PSO. Se muestra valor significativo de la correlación.

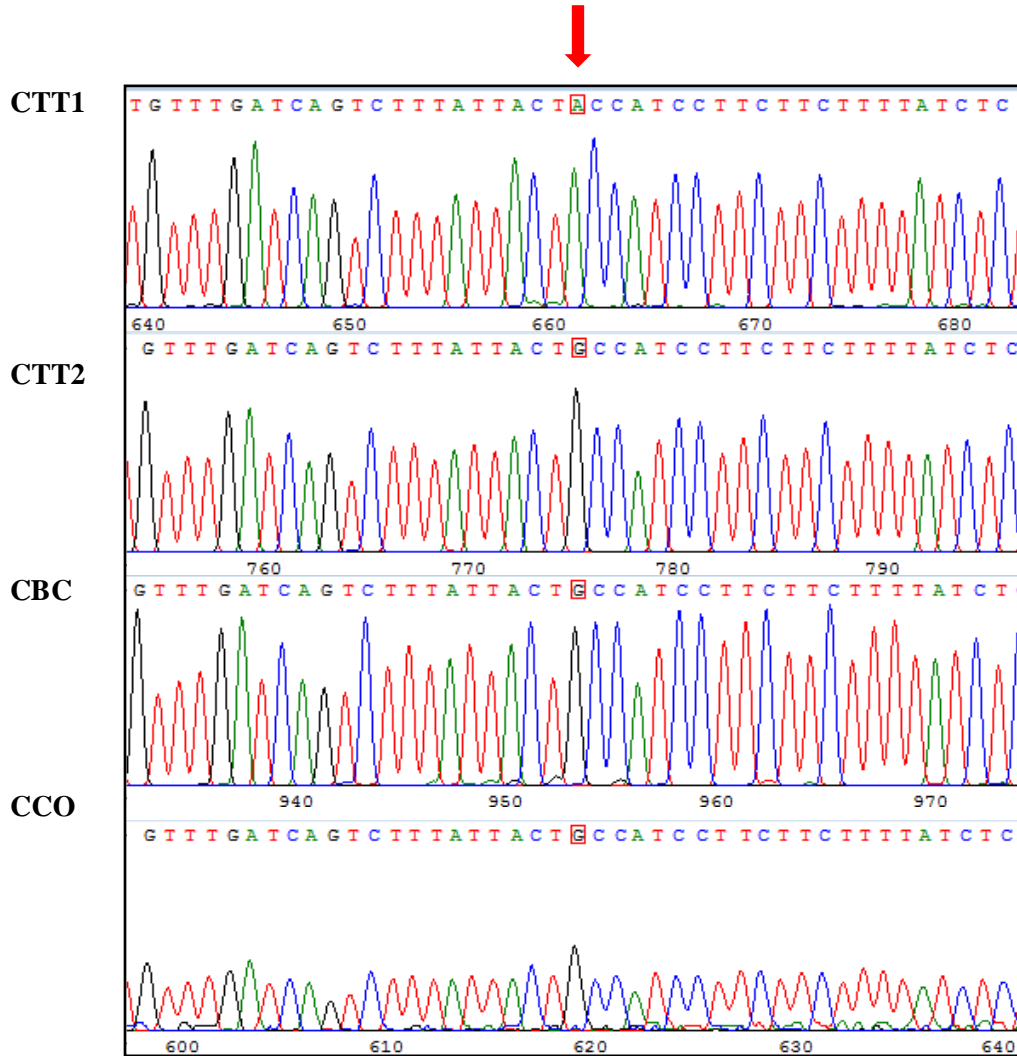
5. CONCLUSIONES

Resultados obtenidos a lo largo de esta investigación, constituye el primer ejemplo de un estudio integral que contempla aspectos genéticos, morfológicos y aproximaciones en la historia de vida por medio de parámetros poblacionales en un pinotérico, como también el primer estudio filogeográfico de un organismo comensal a lo largo de la costa Oriental del Pacífico Sur. No se observó correlación entre los índices de diversidad genética con la variabilidad morfológica en *P. chilensis* y tampoco se evidenció para ningún caso estructuración asociada a regiones biogeográficas. La falta de estructura genética y alta plasticidad fenotípica a nivel específico, sugiere que esta especie constituya una sola gran población para el PSO. Entre los aportes de estos resultados mencionamos: (1) Aumentar el exiguo conocimiento a nivel de familia en aspectos de genética poblacional, dimorfismo sexual (crecimiento absoluto y relativo) y aspectos poblacionales para diversas aplicaciones. (2) Dilucidar aspectos históricos y contemporáneos que han conducido a la presente distribución y evolución de especies marinas, sobre todo aquellas que habitan microambientes muy específicos como parásitos y comensales de la costa Chilena. (3) Considerando el interés e importancia socio económica de *Loxechinus albus* para Chile, como la inaplazable necesidad de conservación del recurso, esta investigación es pionera en otorgar información cabal, primero, del comensal que lleva asociado; y, segundo, de la relación inter-específica generada, para lo cual es medular considerar en políticas de manejo, conservación y cultivo artificial, cuyos puntos han sido angulares en la última década, dado el agotamiento de bancos naturales. Tener en cuenta los efectos latitudinales sobre descriptores poblacionales de *P. chilensis*, resulta útil al momento de experimentar trasplantes recíprocos de *L. albus* en ambientes contrastantes. Experimentos futuros de esta naturaleza, en otros marcadores moleculares (biparentales o nucleares), ayudará a sustentar el patrón genético propuesto y determinar si el potencial dispersivo de “un macho visitador” tendría contribución significativa en la distribución espacial de la diversidad genética de *P. chilensis*. Por otro lado, experimentos de laboratorio ayudarían a estimar con más certeza aspectos reproductivos de *P. chilensis* y el tiempo de duración de las larvas plantónicas, que además potenciará un correcto manejo del recurso erizo. Finalmente, hace necesario continuar con estudios de otra naturaleza (e.g. fisiológica) para establecer con mayor fundamento el real comensalismo descrito hasta ahora.

6. ANEXOS

Anexo I

Mutación por sustitución A x G de la posición 553 pb (pares de bases) del gen Citocromo Oxidasa Subunidad I (COI) de *Pinnaxodes chilensis*, correspondientes a cuatro individuos de distintas localidades. La posición mutacional de cada nucleótido se identifica con recuadro rojo, señalado por la flecha.

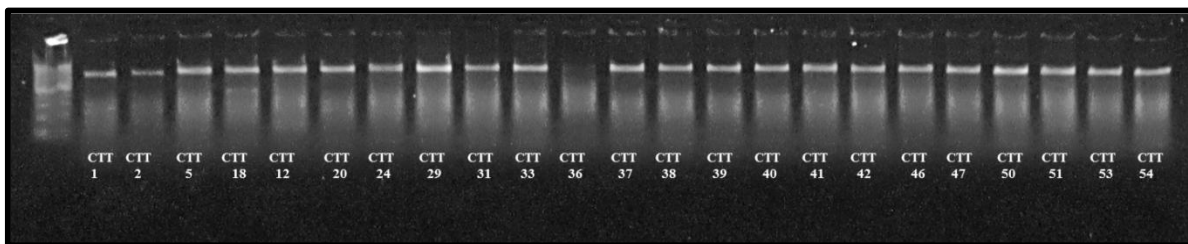


CTT1= Tal Tal, indiv.1; **CTT2**= Tal Tal, indiv.2; **CBC**= Bahía Concepción; **CCO**= Canal Oeste (Pta. Arenas).

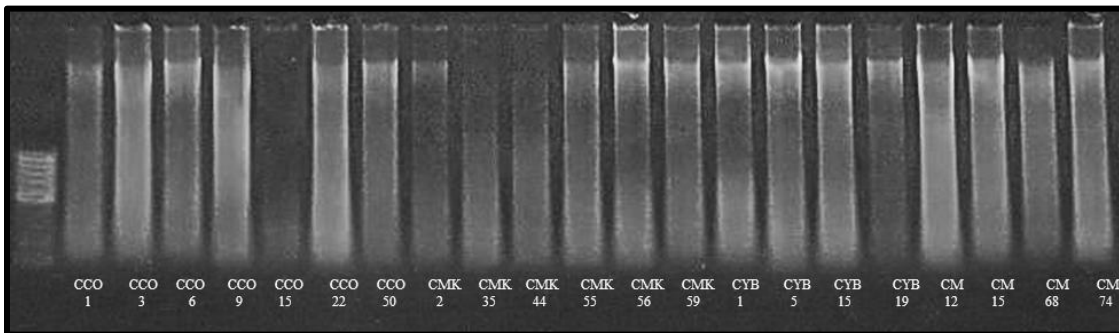
Anexo II

Electroforesis en geles de agarosa para individuos de *Pinnaxodes chilensis*. A) Amplificación de producto PCR para el gen COI (~700 pares de bases). B) Visualización de la integridad de ADN.

A)



B)



7. REFERENCIAS

Abele, L.G. (1982) Biogeography. pp. 242-304. *En:* L.G. Abele (ed.). Systematics, the fossil record, and biogeography. Academic Press.

Abelló, P. & Sardá, F. (1982) Nota sobre morfometría del dimorfismo sexual en las pinzas de *Goneplax rhomboides* (Linnaeus, 1758) (Decapoda: Brachyura). *Inv. Pesq.* 46(2) pp. 163-170.

Ahumada, R.B., Pinto, L. & Camus, P.A. (2000) The Chilean coast. *En:* Sheppard CRC (ed) Seas at the millenium: an environmental analysis: 699-717. Pergamon Press, Oxford, United Kingdom.

Aiken, C.M., Navarrete, S.A., Castillo, M.I. Castilla, J.C. (2007) Alongshore larval dispersal kernels in a numerical ocean model of the central Chilean coast. *Mar Ecol Prog Ser* 339:13–24.

Albornoz, L. (1996) Desarrollo morfológico en larvas de *Nauticaris magellanica* (A.M. Edwards, 1891) (Decapoda: Caridea: Hippolytidae), una comparación laboratorio-plancton. Tesis, Esc. de Biología Marina, Fac. de Ciencias, Univ. Austral de Chile, Valdivia, 104 pp.

Alunno-Bruscia, M., & B. Sainte-Marie. (1998) Abdomen allometry, ovary development, and growth of female snow crab, *Chionoecetes opilio* (Brachyura, Majidae), in the northwestern Gulf of St. Lawrence. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences/J. Can. Sci. Halieut. Aquat.* 55 (2): 459-477.

Alves, E.S., & P.R. Pezzuto. (1999) Crescimento relativo de *Austinixa patagoniensis* (Rathbun, 1918) (Decapoda: Pinnotheridae), simbiote de *Sergio mirim* (Rodrigues, 1971) (Decapoda: Callianassidae) na praia do Cassino, RS. *Nauplius*, 7(1): 83-92.

Alves, E.S., S.A. Rodrigues & P.R. Pezzuto. (2005) Estudo do crescimento relativo de *Austinixa patagoniensis*(Rathbun) (Decapoda, Pinnotheridae) simbiote de *Callichirus major* (Say) (Decapoda, Callianassidae) no mesolitoral da praia de Balneário Camboriú, Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.*, 22(3): 784-792.

Ambariyanto, H. & R. Seed. (1991) The infestation of *Mytilus edulis* Linnaeus by *Polydora ciliata* (Johnston) in the Conwy Estuary, North Wales. *J. Moll. Stud.* 57: 413-424.

Anderson, M.J., Gorley, R.N. & Clarke, K.R. (2008) PERMANOVA+ for PRIMER: Guide to Software and Statistical Methods. PRIMER-E, Plymouth, UK.

Annala, J. H., Mckoy, J. L., Booth, J. D. and Pike, R. B. (1980) Size at the onset of sexual maturity in female *Jasus edwardsii* (Decapoda: Palinuridae) in New Zealand, *New Zealand Journal in Marine and Freshwater Research*, 14, 217–228.

Arntz, W.E., & M. Gorny. (1991) Shrimp (Decapoda, Natantia) occurrence and distribution in the eastern Weddell Sea, Antarctica. *Polar BioZ.*, Vol. 11, pp. 169-177.

Avise, J.C. (1994) Molecular markers, natural history and evolution. Chapman & Hall, New York.

Avise, J. C. (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Londres.

Ayala, F. J. (1995a) The myth of Eve: Molecular biology and human origins. *Science*, 270: 1930-1936.

Ayala, F. J. (1995b) Adam, Eve, and other ancestors: A story of human origins told by genes. *Hist. Phil. Life Sci.*, 17: 303-313.

Ayala, F. J., A. Escalante, C. O’Huigin y J. Klein. (1994) Molecular genetics of speciation and human origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91: 6787-6794.

Baéz, P. & C. Martínez. (1976) Desove y fecundidad de *Pinnaxodes chilensis* (H. Milne Edwards, 1837) (Crustacea, Decapoda, Brachyura, Pinnotheridae). *An. Mus. Hist. Nat. Valparaíso*, 9: 45-60.

Baeza, J.A. (1999) Indicadores de monogamia en el cangrejo commensal *Pinnixa travesalis* (Milne Edwards & Lucas) (Decápoda: Brachyura: Pinnotheridae): distribución poblacional, asociación macho-hembra y dimorfismo sexual. *Revista de Biología Marina y Oceanografía* 34(2): 303-313.

Bandelt, HJ., Forster P. & Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37–48.

Barash D. (1982) *Sociobiology and Behavior*, 426 p. Elsevier. USA.

Bauer, R.T., & J.W. Martin. (1991) *Crustacean sexual biology*. Columbia University Press, New York, 351pp.

Beckwitt, R. (1985) Population genetics of the sand crab, *Emerita analoga* Stimpson, in southern California. *J Exp Mar Biol Ecol* 91:45–52.

Bell, J.L., Stancyk, S.E. (1983) Population dynamics and reproduction of *Dissodactylus mellitae* (Brachyura: Pinnotheridae) on its sand dollar host *Mellita quinquiesperforata* (Echinodermata). *PSZN I: Mar Ecol* 13:141–149.

Bell, J.L. (1984) Changing residence: dynamics of the symbiotic relationship between *Dissodactylus mellitae* Rathbun (Pinnotheridae) and *Mellita quinquiesperforata* (Leske) (Echinodermata). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 82: 101-115.

Bell, J.L. (1988) Distribution and abundance of *Dissodactylus mellitae* Rathbun (Pinnotheridae) on *Mellita quinquiesperforata* (Leske) (Echinodermata). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 117(2): 93-114.

Bermingham, E. y C. Moritz. (1998) Comparative phylogeography: Concepts and applications. *Mol. Ecol.*, 7: 367-369.

Bernal, P. (1990) La oceanografía del sistema de corrientes de Chile-Perú en relación a las pesquerías pelágicas: Una revisión. *In: «Perspectivas de la Actividad Pesquera en Chile»*, M.A. Barbieri (Ed.), Escuela de Ciencias del Mar, UCV, Valparaíso: 35-48.

Bernal, P., F. Robles y O. Rojas. (1983) Variabilidad física y biológica en la región meridional del sistema de corrientes Chile-Perú. *FAO Fish. Rep.*, (291) Vol.3:683-711.

Bernatchez, L., y J. J. Dodson. (1990) Allopatric origin of sympatric populations of lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) as revealed by mitochondrial-DNA restriction analysis. *Evolution*, 44: 1263-1271.

Blasco-Costa, I., Waters, J. M. and Poulin, R. (2012) Swimming against the current: genetic structure, host mobility and the drift paradox in trematode parasites. *Molecular Ecology* 21, 207–217. doi: 10.1111/j.1365- 294X.2011.05374.x

Blouin, M.S., Yowell, C.A., Courtney, C.H., & Dame, J.B. (1995) Host movement and the genetic structure of populations of parasitic nematodes. *Genetics* 141:1007–1014.

Bohonak, A.J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology*, 74, 21–45.

Bohonak, A.J. (1999) Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology*, 74, 21–45.

Booth, J.D. & Oviden, J.R. (2000) Distribution of *Jasus* spp. (Decapoda: Palinuridae) phyllosomas in southern waters: implications for larval recruitment. Marine Ecology Progress Series, 200, 241–255.

Boschi, EE., Scelzo, MA., Goldstein, B. (1969) Desarrollo larval del cangrejo, *Halicarcinus planatus* (Fabricius) (Crustacea, Decapoda, Heymenosomidae), en el laboratorio, con observaciones sobre la distribución de la especie. Bull Mar Sci 19:225-242.

Brattström, H., Johansen, A. (1983) Ecological and regional zoogeography of the marine benthic fauna of Chile. Sarsia 68:289–339.

Brante, A., Fernández, M & Viard, F. (2012) Phylogeography and biogeography concordance in the Marine Gastrop *Crepidatella dilatata* (Calyptraeidae) along the Southeastern pacific Coast. Journal of Heredity doi:10.1093.

Broitman, B.R., Navarrete, S.A., Smith, F. & Gaines, S.D. (2001) Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. Marine Ecology Progress Series, 224, 21–34.

Brown, W. M., E. M. Prager, A. Wang y A. C. Wilson. (1982). Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. J. Mol. Evol., 18: 225-239.

Brown, W.M. (1985) The mitochondrial genome of animals. En: R.J. MacIntyre (ed.). Molecular evolutionary genetics. Plenum, Nueva York, EUA. pp. 95-130.

Burton, RS., Feldman, M. (1982) Population genetics of coastal and estuarine invertebrates: does larval behavior influence population structure? In: Kennedy VS (ed) Estuarine comparisons. Academic, New York, pp 537–551.

Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. (1997) Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al., revisited. J. Parasit. 83, 575-583.

Byers, JE., Pringle, JM. (2006) Going against the flow: retention, range limits and invasions in advective environments. Mar Ecol Prog Ser 313:27–41.

Byers, J.E. & Pringle, J.M. (2006) Going against the flow: retention, range limits and invasions in advective environments. Marine Ecology Progress Series, 313, 27–41.

Cabrera, J., Protti, M., Hernández, M., Vargas, O. & Hidalgo, R. (2001) Tallas y fecundidad de *Juxtafabia muliniarum* (Brachyura: Pinnotheridae) asociado con *Saccostrea Palmula* (Bivalvia: Ostreidae), Costa Rica. RRRev. Biol.Trop.49(3-4): 889-894.

Cáceres, M., A. Valle-Levinson, J. Fierro, M. Bello & M. Castillo. (2007) Características del flujo residual en canales Pulluche y Chacabuco. *Cienc. Tecnol. Mar*, 30(2): 17-32.

Cadrin, S.X. (2000) Advances in morphometric identification of fishery stocks. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*. 10: 91-112.

Camacho, C., Coulouris, G., Avagyan, V., Ma N., Papadopoulos J., Bealer K., & Madden, T.L. (2008) "BLAST+: architecture and applications." *BMC Bioinformatics* 10:421. PubMed.

Camus, P.A & Y.N Andrade. (1999) Diversidad de comunidades intermareales rocosas del norte de Chile y el efecto potencial de la surgencia costera. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 389-410.

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

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

Cárdenas, L., Castilla, J.C., Viard, F. (2009) A phylogeographic analysis across three biogeographic provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *J. Biogeogr.* 36, 969-981.

Cassone, B., J. Boulding, E.G. (2005) Genetic structure phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology* 146: 213-226.

Castilho, A.L., M.L. Negreiros-Fransozo, A.P. Pinheiro & F.A.M. Freire. (2004) Seleção sexual dos pleópodos de camarões *Penaeoidea* (Crustacea, Decapoda). XXV Congresso Brasileiro de Zoologia: Resumos. Brasília, 8 a 13 de fevereiro. Sociedade Brasileira de Zoologia 70.

Castilla, J.C & P.A Camus. (1992) The Humboldt-El Niño scenario: coastal benthic resources and anthropogenic influences, with particular reference to the 1982/83 ENSO. *South African Journal of Marine Science* 12: 703-712.

Castilla, J.C. (1979) Características bióticas del Pacífico Sur-Oriental, con especial referencia al sector chileno. *Revista de la Comisión Permanente del Pacífico Sur* 10: 167-182.

Castilla, J.C. & Defeo, O. (2001) Latin American benthic shellfisheries: emphasis on co-management and experimental practices. *Rev. Fish. Biol. Fish.* 11, 1–30.

Castilla, J.C., S.A. Navarrete & J. Lubchenco. (1993) “Southeastern Pacific coastal environments: main features, large-scale perturbations, and global climate change”. In *Earth System Responses to Global Change: contrasts between north and South America*.

Cavalli-Sforza, L. L., P. Menozzi y A. Piazza. (1994) The history and geography of human genes. Princeton University Press, Princeton.

Chen, Y.H., P.T. Shaw & T.G. Wolcott. (1997) Enhancing estuarine retention of planktonic larvae by tidal currents. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*, 45: 525-533.

Christensen AM & JJ McDermott. (1958) Life history and biology of the oyster crab, *Pinnotheres ostreum*, Say. *The Biological Bulletin* 114: 146-179.

Clapperton, C.C. (1993) Quaternary geology and geomorphology of South America. Elsevier, Amsterdam.

Clement, M, Posada D, Crandall KA. (2000) A computer program to estimate gene genealogies. *Mol Ecol* ;9:1657-1659.

Confalonieri, V. A., M. A. Scataglini y A. A. Lanteri. (2000) Origin and dispersal of the cotton boll weevil (Coleoptera: Curculionidae) in South America: A mtDNA phylogeographic study. XXI International Congress of Entomology (ICE), Foz do Iguassu, Paraná, Brazil, Abstracts, Book 1, p. 566.

Confalonieri, V. A., A. S. Sequeira, L. Todaro & J. C. Vilardi. (1998) Mitochondrial DNA and phylogeography of the grasshopper *Trimeotropis pallidipennis* in relation to clinal distribution of chromosome polymorphisms. *Heredity*, 81: 444-452.

Connolly, S.R, Menge, BA, Roughgarden, J. (2001) A latitudinal gradient in recruitment of intertidal invertebrates in the northeast Pacific Ocean. *Ecology* 82:1799–1813.

Cowen, R.K., Lwiza, K.M.M., Sponaugle, S., Paris, C.B. & Olson, D.B. (2000) Connectivity of marine populations: open or closed? *Science*, 287, 857–859.

Criales, M.M. y K. Anger. (1986) Experimental studies on the larval development of the shrimps *Crangon crangon* and *C. allmanni*. *Helgoländer Meeresunters.*, 40: 241-265.

Criscione, C.D. and M.S. Blouin. (2004) Life cycles shape parasite evolution: comparative population genetics of salmon trematodes. *Evolution* 58:198-202.

Prugnolle, F., Manica, A, Charpentier, M., Guegan, J.F, Guernier, V. Balloux, F.

(2005) Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr. Biol.*15, 1022–1027.

Croxall, J. P. (1992) Southern Ocean environmental changes: effects on sea bird, seal and whale population. *Philosophical Transaction of the Royal Society, London. Serie B*, 338:319-328.

Dawson, M.N., & Hamner, W.M. (2005) Rapid evolutionary radiation of marine zooplankton in peripheral environments. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 102, 9235–9240.

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

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

Díaz, G.A., S.G. Smith, J.E. Serafy & J.S. Ault. (2000) Allometry of the growth of pink shrimp *Farfantepenaeus duorarum* in a Subtropical Bay. *Transactions of the American Fisheries Society*. 130 (2): 328-335.

Doherty, P.J., Planes, S. & Mather, P. (1995) Gene flow and larval duration in seven species of fish from the Great Barrier Reef. *Ecology*, 76, 2373–2391.

Dos Santos, A.E. & P.R. Pezzuto. (1997) Population dynamics of *Pinnixa patagoniensis* Rathbun, 1918 (Brachyura: Pinnotheridae) a symbiotic crab of *Sergio mirim* (Thalassinidea: Callianassidae) in Cassino Beach, Southern Brazil. *Mar. Ecol.* 19: 37-51.

Drach, P. y C. Tchernigovtzeff. (1967) Sur le méthode de la détermination des stades d'intermue et son application générale aux Crustacés. *Vie et Milieu, Ser. A*, 18: 595-610.

Bell, J.L & S.E, Stancyck. (1983) Population dynamic and reproduction of *Dissodactylus mellitae* (Brachyura: Pinnotheridae) on its sand dollar host *Mellita quinquiesperforata* (Echinodermata). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 13: 141-149.

Dowds, R.E. (1978) Distribution and reproduction of four species of *Pinnixa* (Crustacea: Brachyura) in a NorthCarolina Estuary. *Amer. Zool.* 18: 599.

Dugan, J.E., Hubbard, D.M. & Lastra, M. (2000) Burrowing abilities and swash behavior of three crabs, *Emerita analoga* Stimpson, *Blepharipoda occidentalis* Randall and

Lepidopa californica Efford (Anomura, Hippoidea), of exposed sandy beaches. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 255, 229–245.

Edmands, S., Moberg, PE., Burton, RS. (1996) Allozyme and mitochondrial DNA evidence of population subdivision in the purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus*. *Mar Biol* 126:443–450.

eels (*Anguilla* spp.). *Fisheries Management and Ecology*. 12: 237–247.

Louhi, KR., Karvonen, A., Rellstab, C., Jokela, J. (2010) Is the population genetic structure of complex life cycle parasites determined by the geographic range of the most motile host? *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 1271–1277.

Eguiarte, L., Souza, V. & Aguirre, X. (2007) *Ecología molecular*. Instituto Nacional de Ecología, SEMARNAT & Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, CONABIO. México, DF.

Escribano, R., V. Marín, P. Hidalgo & G. Olivares. (2002) Physical-biological interactions in the pelagic ecosystem of the nearshore zone of the northern Humboldt Current System. In: J.C. Castilla & J. Largier (eds.). *Proceedings of the International Symposium on Linkages and Dynamics of Coastal Systems*. Ediciones Universidad Católica de Chile, Santiago, pp. 145-175.

Espino, M. (1999) “El Niño 1997-98”: su efecto sobre el ambiente y los recursos pesqueros en el Perú. *Rev. Per. Biol. Vol. Extraordinaire*: 97-109.

Espinoza, F.R., S Neshyba & Z Maoxiang. (1983) Surface water motion off Chile revealed in satellite images of surface chlorophyll and temperatures. En: Arana P (ed) *Recursos marinos del Pacífico*: 41-58. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Excoffier, Laurent, Lischer, H.E.L., (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol. Ecol. Res.* 10, 564–567.

Fauci, A., Toonen, R.J. & Hadfield, M.G. (2007) Host shift and speciation in a coral-feeding nudibranch. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 274, 111–119.

Fenucci, J. (1967) Contribución al conocimiento del crustáceo decápodo braquiuro *Pinnaxodes chilensis* (H. Milne Edwards), comensal de *Loxechinus albus* (Molina) (Equinodermata, Equinoidea). *Physis* (B. Aires), 27: 125-133.

Filatov, D.A. (2002) PROSEQ: software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence datasets. *Molecular Ecology Notes*, 2, 621–624.

Fincham, A.A. (1979) Larval development of British prawns and shrimps (Crustacea: Decapoda: Natantia). *2.Palaemonetes. (Palaemonetes) varians* (Leach, 1814) and morphological variation. *Bull. Brit. Mus. Nat. Hist. (Zool.)*, 35(2): 164-182.

Fincham, A.A., y A.J. Figueras. (1986) Larval keys and diagnoses for the subfamily Palaemoninae (Crustacea: Decapoda: Palaemonidae) in the north-east Atlantic and aspects of functional morphology. *J. Nat. Hist.*, 20: 203-224.

Florin, A. B., & J. Hoglund (2007) Absence of population structure of turbot (*Psetta maxima*) in the Baltic Sea. *Mol. Ecol.* 16:115-128.

Folmer, O.M., Black, R., Hoeh, R., Lutz, R., Vrijenhoek, R. (1994) DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol Mar Biol Biotechnol* 3:294–299.

Fratini, S., Vannini, M. (2002) Genetic differentiation in the mud crab *Scylla serrata* (Decapoda: Portunidae) within the Indian Ocean. *J Exp Mar Biol Ecol* 272:103–116.

Freeman, J.A. (1990) Molt increment, molt cycle duration, and tissue growth in *Palaemonetes pugio* Holthuis larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.*, 143: 47-61.

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

Galindo, H.M., Olson, D.B. & Palumbi, S.R. (2006) Seascape genetics: a coupled oceanographic-genetic model predicts population structure of Caribbean corals. *Current Biology*, 16, 1622–1626.

Galindo, L. A., J. A. Bolaños, J. E. Hernández y Y. W. Rivero. (2003) Lecithotrophic development of the pea crab *Orthotheres barbatus* (Desbonne, 1867) (Decapoda: Pinnotheridae). *Nauplius* 11(2): 123–128.

Garth, JS., Haig, J., Yaldwyn, J.C., (1967) The decapod Crustacea of the royal Society expedition to Southern Chile, 1958-1959. *Trans R Soc NZ* 8:169-186.

Garth, J.S. (1957) The Crustácea Decapoda Brachyura of Chile. Reports of the Lund University Chile Expedition. 1948-49. *Lunds. Univ. Ársskr., N.F. (2)53(7)*: 1-130.

Gay, C. (1854) Historia física y política de Chile. Zoología. Tomo VIII, 500 pp.

Gaylord, B., Gaines, SD. (2000) Temperature or transport? Range limits in marine species mediated solely by flow. *Am Nat* 155:769–789.

Gilg, M.R. & Hilbish, T.J. (2003) Patterns of larval dispersal and their effect on the maintenance of a blue mussel hybrid zone in southwestern England. *Evolution*, 57, 1061–1077.

Gonzalez S., C. Caceres, & P. Ojeda. (2008) Feeding and nutritional ecology of the edible sea urchin *Loxechinus albus* in the northern Chilean coast. *Rev. chil. Hist. Nat.* 81: 575-584.

Gonzalez, C., Marciniak, J., Villaverde, S., Garcia-Encina, P.A., Munoz, R., (2008) Microalgae-based processes for the biodegradation of pretreated piggyery wastewaters. *Applied Microbiology and Biotechnology* 80, 891-898.

Graves, JE. (1998) Molecular insights into the population structures of cosmopolitan marine fishes. *J Hered* 89:427–437.

Guinet, C., P. Juvention & J-Y. Ggeorges (1994) Long term population changes of fur seals *Arctocephalus tropicalis* on subantartic (Crozet) and subtropical (St. Paul and Amsterdam) island and their possible relationship to El Niño Southern Oscillation. *Antarctic Aciencia* 6(4): 473-478.

Guisado, C. y J.C. Castilla. (1987) Historia de vida, reproducción y avances en el cultivo del erizo comestible chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinoidea: Echinidae). In: "Manejo y Desarrollo Pesquero", P. Arana (Ed.), Esc. Ciencias del Mar, UCV, Valparaíso, 59-68.

Gutiérrez-Martínez, J. (1971) Notas biológicas sobre *Pinnaxodes chilensis* (M. Edwards) y descripción de su primera Zoea (Crustacea, Decapoda, Brachyura). *Mus. Nac. Hist. Nat. Not. Mens.*, Santiago, 15: 3-10.

Haines, CM., M Edmunds & AR Pewsey. (1994) The pea crab, *Pinnolheres pisum* (Linnaeus, 1767), and its association with the common mussel, *Mytilus edulis* (Linnaeus, 1758), in the Solent (UK). *Journal of Shellfish Research* 13: 5-10.

Harrison, K.E. (1990) The role of nutrition in maturation, reproduction and embryonic of decapod crustacean: a review. *J Schellifish Res* 9:1-28.

Harrison, F. (1992) Microscopic anatomy of invertebrates. Wiley-Liss, New York, 459 pp.

Hartnoll, R.G. (1978) The determination of relative growth in crustácea. *Crustaceana* 34: 281-292.

Hartnoll, R.G. (1982). Growth. En: Abele, LG (ed), *The Biology of Crustácea* 2: 111-196. Academic Press, Nueva York.

Hartnoll, R.G. (1974). Variations in growth pattern between some secondary sexual characters in crabs (Decapoda: Brachyura) *Crustaceana*, 27(2): 131-136.

Hartnoll, R.G. (2001). Growth in Crustacea - twenty years on. *Hydrobiologia*. 449: 111-122.

Hazlett, BA., Bach C. & Mitchell C. (1974) Distributional patterns of the xanthid crab *Cataleptodius floridianus* (Decapoda, Brachyura, Xanthidae). *Crustaceana* 33: 316-319.

Haye PA, Segovia NI, Muñoz-Herrera NC, Gálvez FE, Martínez A, et al. (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.

Hazlett, BA. (1979) Biotic aspects of the distribution of the crabs *Panopeus herbstii* and *Mithrax sculptus*. *Bulletin of Marine Science* 29: 576-580.

Hedgecock, D. (1986) Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bull Mar Sci* 39:550–565.

Helberg, M.E., Burton, R.S., Neigel, J.E. & Palumbi, S. (2002) Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70 (1).

Hellberg, ME., Balch, DP., Roy, K. (2001) Climate-driven range expansion and morphological evolution in a marine gastropod. *Science* 292:1707–1709.

Hellberg, M.E. (1998) Sympatric sea shells along the sea's shore: the geography of speciation in the marine gastropod *Tegula*. *Evolution*, 52, 1311–1324.

Hernández, J., Bolaños, J., Galindo, L., Lira, C. & Hernández, G. (2008) Lecitotrofia en el desarrollo larval de *Tunicotheres moseri* (Crustacea: Brachyura: Pinnotheridae). *Boletín del centro de investigaciones biológicas*. Vol. 42, N°1pp. 135-142.

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

Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 359, 183–195.

Hiatt, R.W. (1948) The biology of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes* Randall. Pac Sci 2:135–213.

Hickerson, M.J. & Meyer, C.P. (2008) Testing comparative phylogeographic models of marine vicariance and dispersal using a hierarchical Bayesian approach. BMC Evolutionary Biology, 8, 322.

Hines, AH (1992) Constraint on reproductive output in brachyura crabs: pinnotherids test the rule. Am Zool 32:503-511.

Hipeau-Jacquotte, R. (1973) Manifestation d'un comportement territorial chez crevettes Pontoninae (Palaemonidae) associées aux mollusques Pinnidae à Tuléar (Madagascar). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 13: 63-71.

Hirose, G.L. & M.L. Negreiros-Fransozo. (2004) Crescimento relativo e maturidade.

Hoskin, M.G. (2000) Effects of the East Australian Current on the genetic structure of a direct developing muricid snail (*Bedevelia hanleyi*, Angas): variability within and among local populations. Biol J Linn Soc 69:245–262

<http://dx.doi.org/10.5479/si.03629236.97.i>

Hucke-Gaete, R. (1999) Dinámica poblacional del lobo fino antártico *Arctocephalus gazella* (Peters, 1875) en el Sitio de especial Interés Científico N°32, Isla Livingston, Shetland del Sur, Antártica: 1957-1999. Tesis, Biólogo Marino. Universidad Austral de Chile, 66p.

Hulton, NRJ., Purves, RS., McCulloch, RD., Sugden, DE., Bentley, MJ. (2002) The last glacial maximum and deglaciation in southern South America. Quat Sci Rev 21:233–241.

Iannacone, J, Morón L, Guizado. S. (2010) Variación entre años de la fauna de parásitos metazoos de *Sciaena deliciosa* (Tschudi, 1846) (Perciformes: Sciaenidae) en Lima Perú. Lat. Am. J. Aquat. Res., 38(2): 218-226.

Ingle, R. (1992) Larval stages of northeastern Atlantic crabs. Chapman and Hall, London, 363 pp

Jahncke, J., Checkley, D.M. & Hunt, G.L. Jr. (2004) Trends in carbon flux to seabirds in the Peruvian upwelling system: effects of wind and fisheries on population regulation. Fish. Oceanogr. 13: 3, 208-223.

Jangoux, M. (1987) Diseases of Echinodermata. III. Agents metazoans (Annelida to Pisces). Dis. Aquat. Org., 3:59-83.

Jellyman, D.J.; Graynoth, E. (2005) The use of fyke nets as a quantitative capture technique for freshwater

Johnson, M.W. (1939) The correlation of water movements and dispersal of pelagic larval stages of certain littoral animals, especially the sand crab, *Emerita*. *Journal of Marine Research*, 11, 236–245.

Jolly, M.T., Jollivet, D., Gentil, F., Thie´baut, E. & Viard, F. (2005) Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the north coast of France. *Heredity*, 94, 23–32.

Jones, J.B. (1977) Natural history of the pea crab in Wellington harbour, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 11: 667-676.

Juan, C., B. C. Emerson, P. Oromí y G. M. Hewitt. (2000) Colonization and diversification: Towards a phylogeographic synthesis for the Canary Islands. *Trends. Ecol. Evol.*, 15(3): 104-109.

Kenchington, E., M. Heino and E. E. Nielsen. (2003) Managing marine genetic diversity: time for action? *ICES J. Mar. Sci.* 60: 1172-1176.

Ketchum, B.H. (1954) Relation between circulation and planktonic populations in estuaries. *Ecology* 35:191–200.

Kimura, M. (1968) Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217(129):624-626. 1980.

Kingman, J.F.C., (2000) Origins of the coalescent: 1974–1982. *Genetics* 156, 1461–1463.

Kinlan. B.P, Gaines, S.D. (2003) Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: a community perspective. *Ecology* 84:2007–2020.

Kinne, O., (1970) Temperature: animals invertebrates, in O. Kinne (ed.) *Marine Ecology*, 1, Environmental Factors (London: Wiley-Interscience), pp. 407–414.

Knowlton, K, Keller, B.D. (1986) Larvae which fall short of their potential: highly localized recruitment in an alpheid shrimp with extended larval development. *Bull Mar Sci* 39:213–223

Kruczynski, W.L. (1973) Distribution and abundance of *Pinnotheres maculatus* Say in Bogue Sound, North Carolina. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole* 145: 482-491.

Kyle, C.J., Boulding, E.G. (2000). Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina* spp.) with and without pelagic larval dispersal. *Mar Biol* 137:835–845.

Lachaise, F., A. Le Roux, M. Hubert y R. Lafont, R. (1993) The molting gland of crustaceans: localization, activity, and endocrine control (a review). *J. Crust. Biol.*, 13(2): 198-234.

Lardies, M. A, Castilla J.C. (2001) Latitudinal variation in the reproductive biology of the commensal crab *Pinnaxodes chilensis* (Decapoda: Pinnotheridae) along the Chilean Coast. *Marine Biology* 139: 1125-1133.

Lee, H.J.E. & Boulding, E.G. (2007) Mitochondrial DNA variation in space and time in the northeastern Pacific gastropod, *Littorina keenae*. *Molecular Ecology*, 16, 3084–3103.

Lessios, H.A. & Robertson, D.R. (2006) Crossing the impassable: genetic connections in 20 reef fishes across the eastern Pacific barrier. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273, 2201–2208.

Lessios, H.A. (2008) The great American schism: divergence of marine organisms after the rise of the central American isthmus. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39, 63–91.

Lester, S.E., Ruttenberg, B.I., Gaines, S.D. & Kinlan, B.P. (2007) The relationship between dispersal ability and geographic range size. *Ecology Letters*, 10, 745–758.

Levin, L.A., Huggett, D., Myers, P., Bridges, T., Weaver, J. (1993) Rareearth tagging methods for the study of larval dispersal by marine invertebrates. *Limnol Oceanogr* 38:246–360.

Levin, L.A. (2006) Recent progress in Understanding Larval Dispersal: New Directions and Digressions. *Integrative and Comparative Biology* 46:282-297.

Lewontin, R.C. (1974) The genetic basis of evolutionary change. Columbia University Press, New York.

Li, W.-H. y L. A. Sadler. (1992) DNA variation in humans and its implications for human evolution. *Oxford Surv. Evol. Biol.*, 8: 111-134.

Lunt, D.H., L.E. Whipple y B.C. Hyman. (1998) Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology* 7:1441-1455.

Macaya, E.C., Zuccarello, G.C. (2010) Genetic structure of the giant kelp *Macrocystis Pyrifera* along the southeastern Pacific. *Mar Ecol Prog Ser.* 420:103–112.

Maggs, C.A., Castilho, R., Foltz, D., Hensler, C., Jolly, M.T., Kelly, J., Olsen, J., Perez, K.E., Stam, W., Vainola, R., Viard, F. & Wares, J. (2008) Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic marine organisms? *Ecology*, 89, 5108–5122.

Mantel, N. A. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209–220.

Marko, P.B. (2004) ‘What’s larvae got to do with it?’ Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. *Mol Ecol* 13:597–611.

Marques, F & G. Pohle. (1996) Complete larval development of *clypeasterophilus stebbing* (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) and a comparison with other within the *Dissodactylus* complex. *Bulletin of Marine Science* 58 (1):165-185.

Marques, F. & G. Pohle. (1996a). Laboratory-reared larval stages of *dissodactylus mellitae* (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) and development patterns within the *Dissodactylus* complex. *Canadian Journal of Zoology* 74: 47-62.

Marques, F. & G. Pohle. (1996b) Complete larval development of *Clypeasterophilus stebbing* (Decapoda: Brachyura: Pinnotheridae) and a comparison with other species within the *Dissodactylus* complex. *Bulletin of Marine Science* 58(1): 165-185.

Martinho, M.A., J. Dubert, A. Peliz & H. Queiroga. (2006) Influence of vertical migration pattern on retention of crab larvae in a seasonal upwelling system. *Mar. Ecol. Progr. Ser.*, 307: 1-19.

McConaughy, J.R. (1992) Decapod larvae: dispersal, mortality, and ecology. A working hypothesis? *Am Zool* 32:512–573.

McCulloch, R.D., Bentley, M.J., Purves, R.S., Hulton, N.R.J., Sugden, D.E. & Clapperton, C.M. (2000) Climatic inferences from glacial and paleoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary Science*, 15, 409–417.

McDermott, J.J. (1981) Biology of the symbiotic crab *Pinnixa cylindrica* (Say) (Decapoda: Pinnotheridae). *Proc. Pennsylvania Acad. Sci.* 55: 23-27.

Mendo, J. & Wolff, M. (2003) El impacto de El Niño sobre la producción de conchas de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Ecol. apl.* 2(1): 51-57.

Merkouris, SE., Seeb, LW., Murphy, MC. (1998) Low levels of genetic diversity in highly exploited populations of Alaskan tanner crabs, *Chionoecetes bairdi*, and Alaskan and Atlantic snow crabs, *C. opilio*. *Fish Bull* 96:525–537.

Miyake, S. (1939) Notes on Crustacea Brachyura collected by professor Teiso Esaki's Micronesia expedition 1937-1938 together with a checklist of Micronesian Brachyura. *Rec. Oceanogr. Works Japan* 10: 168-245.

Montecino, V., Strub, P.T., Chavez, F.P., Thomas, A.C., Tarazona, J. & Baumgartner, T. (2005) Chapter 10 Bio-physical interactions off western South America (6,E). In *The Sea*, A.R. Robinson & K.H. Brink (eds). Cambridge: Harvard University Press, 329–390.

Montecinos, A., BR, broitman, S. Faugeron., PA. Haye., F. Tellier & ML Guillemin (2012) Species replacement along a linear coastal habitat: Phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the south east pacific. *BMC Evolutionary Biology* 12: 97.

Morris, RH., Abbott, DP., Haderlie, EC. (1980) Intertidal invertebrates of California. Stanford University Press, Stanford.

Narváez, D., Navarrete, S., Largier, J., Vargas, C. (2006) Onshore advection of warm water, larval invertebrate settlement, and relaxation of upwelling off central Chile. *Mar ecol Prog Ser* 309:159–173.

Negreiros-Fransozo, M.L. & V. Fransozo. (2003) A morphometric study of the mud crab, *Panopeus austrobesus* Williams, 1983 (Decapoda, Brachyura) from a subtropical mangrove in South America. *Crustaceana*, 76(3): 281-294.

Nei, M. (1995) Genetic support for the out of Africa theory of human evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92: 6720-6722.

Nei, M. y W.-H. Li. (1979) Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 76:5269-5273.

Nelson, K., Hedgecock, D. and Borgeson, W. (1988) Effects of reproduction upon molting and growth in female American lobsters (*Homarus americanus*), Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 45, 805–821.

Newman, W.A. (1979) California transition zone: significance of short-range endemics. In: Gray J, Boucot AJ (eds) Historical biogeography, plate tectonics, and the changing environment. Oregon State University Press, Corvallis, pp 399–416.

Ocampo, E. H., J. D. Nuñez, M. S. Lizarralde and M. Cledón. (2010) Larval development of *Calyptraeotheres garthi* (Fenucci, 1975) (Brachyura, Pinnotheridae) described from laboratory-reared material, with notes of larval character use on Pinnotheridae systematic. Helgol. Mar. Res. 5: 347–359.

Olmstead, J.M. & J.P. Baumberger (1923) Form and growth of grapsoid crabs. A comparison of the form of three species of grapsoid crabs and their growth at moulting. J. Morphol., 38: 279-294.

Orensanz JM & VF Gallucci. (1988). A comparative study of post-larval life-history schedules in four sympatric *Cáncer* species (Decapoda: Brachyura: Cancridae). Journal of Crustacean Biology 8: 187-220.

Palacios-Theil, E., J.A. Cuesta, E. Campos & D.L. Felder. (2009) Molecular genetic re-examination of subfamilies and polyphyly in the family Pinnotheridae (Crustacea: Decapoda). In: J.W. Martin, K.A. Crandall & D.L. Felder (eds.). Crustacean Issues, 18: Decapod Crustacean phylogenetics. Taylor & Francis/CRC Press, Boca Raton, pp. 423-442.

Palmer, P. (1995) Occurrence of a New Zealand pea crab, *Pinnotheres novaezealandiae*, in five species of surf clam. Marine and Freshwater Research 46: 1071-1075.

Palumbi, S.R. (1994) Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. Annual Review of Ecology and Systematics, 25, 547–572.

Palumbi, S.R. (1995) Using genetics as an indirect estimator of larval dispersal. Ecology of marine invertebrate larvae (ed. By L.R. McEdward), pp. 369–387. CRC Press, Boca Raton, FL.

Patton, W.K. (1967) Commensal Crustacea. Proc. Symp. Crustacea 3:12281244.

Pearce, J.B. (1964) On reproduction in *Pinnotheres maculatus* (Decapoda: Pinnotheridae). Biol. Bull. Mar. Biol. Lab. Woods Hole 127: 384.

Pearce, J.B. (1966) On *Pinnixa faba* and *Pinnixa littoralis* (Decapoda: Pinnotheridae) symbiotic with the clam *Tresus capax* (Pelecypoda: Mactridae), p. 565-589. In H. Barnes (ed.). Some contemporary studies in marine science. Allen Unwin, Londres.

Pearson, K. and Filon, L. N. G. (1898) Mathematical contributions to the theory of evolution IV. On the probable errors of frequency constants and on the influence of random selection on variation and correlation. *Philos. Trans.*

Peiró D, Pezzuto P & Mantelatto F. (2011) Relative growth and sexual dimorphism of *Austinixa aideae* (Brachyura: Pinnotheridae): a symbiont of the ghost shrimp *Callichirus major* from the southern Atlantic. *Lat. Am. J. Aquat. Res.*, 39(2): 261-270.

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

Petriella, A & Boschi, E. (1997) Crecimiento en crustáceos decápodos: resultados de investigaciones realizadas en Argentina. *Invest. Mar. Valparaiso*, 25:135-157.

Philander, S.G.H. (1983). El Niño Southern Oscillation phenomena. *Nature* 302: 295-301.

Pogson, G.H, Taggart CT, Mesa, K.A, Boutlier, R.G. (2001) Isolation by distance in the Atlantic cod, *Gadus morhua*, at large and small geographic scales. *Evolution* 55:131–146.

Pohle, G & F. Marques. (1998) Phylogeny of the Pinnotheridae: Larval and adult evidence, with emphasis on the evolution of gills. *Invert. Reprod. Develop.* 33: 229-239.

Pohle, G. & M. Telford. (1982) Post-larval growth of *Dissodactylus primitivus* Bouvier, 1917 (Brachyura: Pinnotheridae) under laboratory conditions. *Bull. Mar. Sci.*, 33(2): 257-273.

Poulin R (1995) “Adaptive” changes in the behaviour of parasitized animal: A critical review. *Inst. J. Parasitol.* 25, 1375-1383.

Pringle JM, Wares JP (2007) The maintenance of alongshore variation in allele frequency in a coastal ocean. *Mar Ecol Prog Ser* 335:69–84.

Quinn, G.P. & M.J. Keough. (2002) Experimental design and data analysis for biologists. Cambridge University Press. Cambridge. Pg. 509.

Raimondi, P.T., Keough, M.J. (1990) Behavioural variability in marine larvae. *Aust J Ecol* 4:427–437.

Rathbun, M.J. (1918) The grapsoid crabs of America. Bulletin of the United States National Museum, 97, 1–461.

Reaka, M.L. (1980) Geographic range, life history patterns, and body size in a guild of coral-dwelling mantis shrimps. *Evolution*. 34: 1019-1030.

Reid, J.L. (1965) Intermediate waters of the Pacific Ocean. The Johns Hopkins Oceanographic Studies, 2: 85 pp.

Retamal, M. A. (1981) Catálogo ilustrado de los crustáceos decápodos de Chile. *Gayana Zool.*, 44: 1-110.

Reynolds, R. W., Smith, T.M., Liu, C., Chelton, D.B., Casey, K.S. & M.G. Schlax (2007) Daily high-resolution-blended analyses for sea surface temperature. *Climate* 20:5473-5496.

Rivadeneira, M., Fernández, M. & Navarrete, S.A. (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.

Rocha, L.A. & Bowen, B.W. (2008) Speciation in coral-reef fishes. *Journal of Fish Biology*, 72, 1101–1121.

Roderick, G. K. y R. G. Gillespie. (1998) Speciation and phylogeography of Hawaiian terrestrial arthropods. *Mol. Ecol.*, 7: 519-531.

Rogers AR (1995) Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution* 49:608–615.

Rogers, A.R. (2002) The theoretical mismatch distribution. *Lecture Notes on Gene Genealogies*: 7: 30-46.

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

Rohde, K. (1982) Ecology of marine parasites. University of Queensland Press, St. Lucia.

Rohde, K. (1984). Ecology of marine parasites. *Helgol Meeresunters* 37:5-33.

Röhl, A. (1999). Network. A program package for phylogenetic networks. Mathematisches Seminar, Universität Hamburg (available on request).

Ross, DM. (1983) Symbiotic relations. En: Abele, LG (ed), *The Biology of Crustácea* 7: 163-212. Academic Press, Nueva York. Roy. Soc. London (A) 191 229–311. Karl

Pearson's Early Statistical Papers (1956) 179–261 Cambridge Univ. Press. Abstract in Proc. Roy. Soc. London (1897) 62 173–176.

Rozas J, Librado P, Sánchez-Del Barrio JC, Messeguer X, Rozas R. (2010) DnaSP Version 5 Help Contents [Help File].

Ruppert, Edward E. y Robert D. Barnes. (1996) Zoología de los Invertebrados. McGraw - Hill Interamericana. México. 1114 pp.

Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Cussac, V.E., Dalebout, M.L., Seibert, J., Ortubay, S. & Habit, E. (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology*, 15, 2949–2968.

Saavedra, N. & AJ. Foppiano. (1992) Contribución a la cinemática del anticiclón del Pacífico sur. *Geoacta*, 19: 95-110

Salmon M. (1983) Courtship, mating systems, and sexual selection in decapods. En: Rebach, S & D Dunham (eds), *Studies in adaptation: The behavior of higher Crustácea*: 143-169. WilleyA Sons, USA.

Sánchez R, Sepu lveda RD, Brante A, Cárdenas L. (2011) Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: mollusca). *Mar Ecol Prog Ser.* 434:121–131.

Santelices, B. (1980) Phytogeographic characterization of the temperate coast of Pacific South America. *Phycologia* 19: 1-12.

Sastry, A.N. and R.W. Menzel. (1962) Influence of hosts on the behavior of the commensal crab *Pinnotheres maculatus* Say. *Biological Bulletin (Woods Hole)* 123:388–395.

Scheltema, R.S. (1971) Larval dispersal as a means of genetic exchange between geographically separated populations of shallow- water benthic invertebrates. *Biol Bull Mar Biol Lab (Woods Hole)* 140:284–322.

Scheltema, R.S. (1968) Dispersal of larvae by equatorial ocean currents and its importance to the zoogeography of shoalwater tropical species. *Nature*, 217, 1159–1162.

Scheltema, R.S. (1988) Initial evidence for the transport of teleplanic larvae of benthic invertebrates across the East Pacific Barrier. *Biological Bulletin*, 174, 145–152.

Schneider S., Roessli D., y Excoffier L., (2000) Arlequin ver. 2.000. A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Schwabe, G. H. (1936) Investigaciones sobre *Loxechinus albus* Mol. y *Pinnotheres chilensis* Edw. Bol. Soc. Biol. Concepción, 19(2): 125-136.

Siegel, D., Kinlan, B., Gaylord, B. & Gaines, S. (2003) Lagrangian descriptions of marine larval dispersion. Marine Ecology Progress Series, 260, 83–96.

Sievers, H. & N. Silva. (1979) Variación temporal de las condiciones oceanográficas frente a punta Curaumilla, Valparaíso, Chile. (Mayo de 1974- Abril de 1975). Inv. Mar., Valparaíso, 7(1): 3-20.

Silas, E.G. and K . Alagarswami. (1965) An instance of parasitism by the peacrab (*Pinnotheres* sp.) on the backwater clam, *Meretrix casta* (chemnitz) from India with a review of the work on the systematics, ecology, biology, and ethology of the pea-crabs of the genus *Pinnotheres* Latreille. *Symposium on Crustacea*. (Mar. Biol. Ass. India). *Abstracts*,62-63.

Silva, N. & H, Sievers. (1981) Masas de agua y circulación en la rama costera de la Corriente de Humboldt Latitudes 18° S- 33° S (Operación Oceanográfica Marchile X-Erfen I). Ciencia y Tecnología del Mar, CONA 5: 5-50.

Skinner, D.M., D.E. Graham, C.A. Holland, D.L. Mykles, C. Soumoff y L.H. Yamaoka. (1985) Control of molting in Crustacea. *In: A.M. Wenner* (ed.). Factors in adult growth. A.A. Balkema, Rotterdam, pp. 3-14.

Lukas, R (1986) The termination of the Equatorial Undercurrent in the Eastern Pacific. Progress in Oceanography N°16. P63-90.

Silva, N. & S. Neshyba. (1977).Corrientes superficiales frente a la costa austral de Chile. Cienc. Tecnol. Mar, 3:

Silva, N. & S. Neshyba. (1979) Masas de agua y circulación geostrofica frente a la costa de Chile austral. Inst. Antár. Chi., Ser. Cient., 25/26: 5-32.

Silva, N., C. Caleté & H. A. Sievers. (1998) Masas de agua y circulación general para algunos canales australes chilenos entre Puerto Montt y laguna San Rafael (Crucero CIMAR-Fiordo1). Cienc.Tecnol.Mar, 21:17:48.

Sköld, M., SR, Wing & PV Mladenof. (2003) Genetic subdivision of a sea star with high dispersal capability in relation to physical barriers in a fjordic seascape. Marine Ecology Progress Series 250: 163-174.

Stauber, LA. (1945) *Pinnotheres ostreum*, parasitic on the american oyster, *Ostrea (gryphaea) virginica*. The Biological Bulletin 88: 269-291.

Steele, D.H., (1983) Size compositions of lysianassid amphipods in cold and warm water habitats. Australian Museum Sydney Memoir: 18: 113-119.

Stevens, P.M., (1990) Specificity of host recognition of individuals from different hostraces of symbiotic pea crabs (Decapoda: Pinnotheridae). J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 143, 193-207.

Strub, P.T., Mesías, J.M. & James, C. (1995) Satellite observations of the Perú-Chile counter-current. *Geophysical Research Letters* 22, 211–214.

Tajima, F. (1983) Evolutionary relationship of ADN sequences in finite populations. *Genetics* 105:437-460.

Tam YK, Kornfield I, Ojeda FP (1996) Divergence and zoogeography of mole crabs, *Emerita* spp. (Decapoda: Hippidae), in the Americas. *Mar Biol* 125:489–497.

Telford, M. (1978) Distribution of two species of *Dissodactylus* (Brachyura: Pinnotheridae) among their echinoid host population in Barbados. *Bulletin of Marine Science* 28: 651-658.

Tellier, F, Meynard, A.P, Correa, J.A, Faugeron S, Valero, M. (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? *Mol Phyl Evol.* 53:679–693.

Templeman, W. (1935) Local differences in the body proportions of the lobster, *Homarus americanus*. *Journal of the Biological Board of Canada.* 1: 213-226.

Thiel M, Macaya EC, Acuña E, Arntz WE, Bastias H, Brokordt K, Camus P, Castilla JC, Castro LR, Cortés M, Dumont CP, Escribano R, Fernández M, Gajardo JA, Gaymer CF, Gómez I, González AE, González HE, Haye PA, Illanes JE, Iriarte JL, Lancellotti DA, Luna-Jorquera G, Luxoro C, Manríquez PH, Marín V, Muñoz P, Navarrete SA, Pérez E, Poulin E, Sellanes J, Sepúlveda HH, Stotz W, Tala F, Thomas A, Vargas CA, Vásquez JA, Vega A (2007). The Humboldt Current System of northern and central Chile: oceanographic processes, ecological interactions and socioeconomic feedback. *Oceanogr Mar Biol* 45:195–345.

Thorrold SR, Jones GP, Hellberg ME, Burton RS & others. (2002) Quantifying larval del norte de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 71: 479-499.

Vásquez P & Bay-Schmit E (2011) Efecto de la expansión rectal por el comensal *Pinnaxodes chilensis* (Crustácea: Decápoda) en el erizo de mar *Loxechinus albus* (Echinodermata: Echinoidea). Bol.Soc.Biol.Concepción, Chile. Tomo 80, pp. 83-88.

Via, S., Gomulkiewicz, R., De Jong G., Scheiner, SM., Schlichting, CD., Van Tienderen PH (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. Trends Ecol Evol 10:212-217.

Victor, B.C. & Wellington, G.M. (2000). Endemism and the pelagic larval duration of reef fishes in the eastern Pacific Ocean. Marine Ecology Progress Series, 205, 241–248.

Vilches, C., Pradenas J, Quiñones A, Brante A (2012) Association of *Crepidula coquimbensis* with *Pagurus edwardsi*: effect on dispersal potential and population genetic structure. Biología Marina y Oceanografía. Vol. 47, N°2: 327-331.

Wainscoat, J. (1987) Out of the garden of Eden. Science 234:194-196.

Waples, R.S (1998) Separating the wheat from the chaff. Pattern of genetic differentiation in high gene flow species. Journal of heredity 89:438-450.

Wares, J.P. (2001) Patterns of speciation inferred from mitochondrial DNA in North American *Chthamalus* (Cirripedia: Balanomorpha: Chthamaloidea). Mol Phylogenet Evol 18:104–116.

Wares, J.P. (2002) Community Genetics in the Northwestern Atlantic intertidal. Mol Ecol 11:1131–1144.

Wares, J.P, Gaines, S.D, Cunningham, C.W. (2001) A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. Evolution 55:295–306.

Waters, JM., Roy, MS. (2004) Phylogeography of a high-dispersal New Zealand seastar: Does upwelling block gene flow? Mol Ecol 13:2797–2806.

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

Watterson, G.A. (1975) On the number of segregating sites in genetical models without recombination. Theoretical Population Biology 7:256-276.

Weir, B., Cockerham, C., (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. Evolution 38 (6), 1358–1370.

Wells, HW. & MJ, Wells. (1961) Observations on *Pinnaxodes floridensis*, a new species of pinnotherid crustacean commensal in holothurians. *Bulletin of Marine Science* 11: 267-279.

Wieters, E.A, Broitman, B.R, Branch, G.M. (2009) Benthic community structure and spatiotemporal thermal regimes in two upwelling ecosystems: comparisons between South Africa and Chile. *Limnol Oceanogr.* doi:10.4319/lo.2009.54.4.1060.

Wilson, E.O. (1975) *Sociobiology: The new synthesis*, 336 p. Belknap/Harvard University Press, Cambridge, Mass.

Wright, S. (1943) The genetical structure of populations. *Ann. Eugenics* 15: 323-354.
- 1959 *Physiological genetics, ecology of populations, and natural selection. Perspectives Biol. Med.* 3 : 107-151.

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

Wyrtsky, K. (1975) Fluctuation of the dynamic topography in the Pacific Ocean. *J. Phys. Oceanogr.*, 5: 450-459.

Zakas, C, Binford J, Navarrete, S.A, Wares, J.P. (2009) Restricted gene flow in Chilean barnacles reflects an oceanographic and biogeographic transition zone. *Mar Ecol Prog Ser.* 394:165–177.

Zane, L., Marcato, S., Bargelloni, L., Bortolotto, E., Papetti, C., Simonato, M., Varotto, V. & Patarnello, T. (2006) Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. *Molecular Ecology*, 15, 4499–4511.

Zink, R.M. y R.C. Blackwell-Rago (2000) Species limits and recent population history in the Curve-billed Trasher. *The Condor* 102:881-886.

Zúñiga, O. (2002) Guía de biodiversidad N°2. Centro regional de estudios y educación ambiental II Rregión de Antofagasta-Chile. Departamento de Acuicultura, Universidad de Antofagasta. Vol.1.

