



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
DEPARTAMENTO DE OCEANOGRAFIA**

INFORME FINAL

**“CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES
RECURSOS BENTÓNICOS, Y ESTUDIO DE CONECTIVIDAD
ENTRE SUS POBLACIONES ENTRE LA I Y II REGIONES”.**

PROYECTO DEL FONDO DE INVESTIGACION PESQUERA

FIP N° 2008-39

CONCEPCION, AGOSTO 2010.

JEFE DE PROYECTO

Ricardo Galleguillos González

AUTORES

**Sandra Ferrada Fuentes
Cristian B. Canales-Aguirre
Andrea Barrera Valenzuela
Mariem Dib Moraga
Pedro Pizarro Fuentes
Cristian Gallardo Escárate
Myriam Valenzuela Bustamante
Cristian Hernández Ulloa
Gonzalo Gajardo Galvez
Patricia Beristain Ruiz**

CONCEPCION, AGOSTO 2010

RESUMEN EJECUTIVO

El presente Informe Final comunica los resultados generados del proyecto FIP N°2008–39 denominado “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”. El proyecto tiene como objetivo general determinar la estructura genética de los diferentes stocks de las pesquerías de Erizo *Loxechinus albus*, Locate *Thais chocolata*, Pulpo del Norte *Octopus mimus* y Loco *Concholepas concholepas* presentes en el norte grande (I y II regiones) de Chile, detectando las áreas fuentes y sumidero de estos recursos. Para dar cuenta del objetivo general se planteo como primera actividad establecer un diseño de muestreo que cubriese el área indicada en los términos de referencia, sin consideraciones en una escala temporal que debería cubrirse en una Fase II del presente estudio con la finalidad de corroborar los patrones de estructuración genética poblacional aquí evidenciados. El área de estudio comprende entre los 18 y 25° LS y cubre aproximadamente 800 kilómetros, correspondiendo a un estudio a nivel de microescala. Las zonas elegidas corresponden a las Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos (AMERBs) de Clavelito (I Región), Pisagua (I Región), Punta Arenas (II Región), Punta Campamento (II Región) y Punta Sur Taltal (II Región), contando con 1931 ejemplares entre las cuatro especies. Solicitar pescas de investigación fue necesario debido a la discordancia entre las temporadas de veda para cada una de las especies.

Los caracteres estudiados para la determinación de conectividad corresponden a marcadores moleculares tipo microsatélites. Para esta actividad se desarrollaron y estandarizaron loci microsatélites polimórficos como herramientas moleculares para determinar los parámetros genéticos poblacionales para cada una de las especies.

Para el desarrollo y estandarización de marcadores microsatélites se procedió a la búsqueda de microsatélites disponibles para cada especie. Marcadores especie específicos se encuentran disponibles para *C. concholepas*, estos fueron estandarizados y ensayados a nivel poblacional sobre 529 ejemplares y obteniendo 2500 genotipos para un total de 5 loci. En el caso de *O. mimus*, *L. albus* y *T. chocolata*, especies en las cuales no se disponía de marcadores microsatélites especie específicos se procedió a desarrollar una librería genómica enriquecida para motivos microsatélites con la finalidad de contar con los marcadores adecuados para el estudio poblacional y de conectividad. En el caso del erizo se obtuvieron 8 loci polimórficos que fueron ensayados sobre 519 ejemplares generando 2320 genotipos. En el caso del Locate 5 loci polimórficos fueron aplicados sobre 500 ejemplares, obteniendo un total de 1720 genotipos. Para el Pulpo del Norte 9 loci polimórficos fueron aplicados sobre 403 ejemplares, obteniendo un total de 3456 genotipos.

Posterior a la obtención de la base de datos correspondiente a los genotipos para cada ejemplar por loci microsatélites, se estimaron los parámetros de diversidad genética y estructuración poblacional clásicos para cada una de las agrupaciones genéticas detectadas mediante métodos de agrupamiento bayesiano, así como la magnitud y dirección del flujo génico entre las agrupaciones genéticas evidenciadas. De este modo se determinó la conectividad entre ellas y se desarrolló un modelo genético poblacional apoyado con información biológica y oceanográfica para cada una de las especies.

El análisis georeferenciado de agrupamiento bayesiano sin definición a priori del número de poblaciones presentes en el área de estudio, indica que en las cuatro especies el modelo de frecuencias alélicas correlacionado mostró fuerte evidencia a favor, en comparación al modelo no-correlacionado. Así y basado en el modelo seleccionado se muestra la existencia de dos poblaciones geográficamente estructuradas para el Erizo, la primera incluyendo tres localidades del norte (i.e. Clavelito, Pisagua, y Punta Arenas) y la segunda incluyendo las localidades del sur (i.e. Punta Campamento, y Punta Sur Taltal). En Locate también se observan dos poblaciones, sin embargo, estas presentan discontinuidad geográfica, la primera población incluye dos localidades del norte (i.e. Clavelito, y Punta Arenas) con discontinuidad en Pisagua, y la segunda población incluye las dos localidades del sur (i.e. Punta Campamento, y Punta Sur Taltal) más la localidad de Pisagua. Para la especie Loco, no se observan poblaciones genética o geográficamente estructuradas. En el Pulpo del Norte se observan tres poblaciones geográficamente estructuradas, la primera incluyendo sólo a la localidad más septentrional (i.e. Clavelito), la segunda incluyendo a dos localidades del norte del área de estudio (i.e. Pisagua, y Punta Arenas), y la tercera incluyendo las localidades del sur (i.e. Punta Campamento, y Punta Sur Taltal).

En el Erizo se observa una riqueza alélica entre 9 a 33, con exceso de homocigotos y desequilibrio de Hardy – Weinberg en todos los loci. Dos de los ocho loci analizados evidencian los patrones de estructuración genética observados. El análisis de varianza molecular somete a prueba y corrobora las dos agrupaciones determinadas por el método de agrupamiento bayesiano, con un índice F_{st} (0.008), y R_{st} (0.003) significativo sólo el índice F_{st} ($p < 0.000$).

Para el Locate se observa una riqueza alélica entre 21 a 41, con exceso de homocigotos y desequilibrio de Hardy – Weinberg en todos los loci. Tres de los cinco loci analizados evidencian los patrones de estructuración genética observados. El análisis de varianza molecular somete a prueba y corrobora las dos agrupaciones determinada por el método de agrupamiento bayesiano, con un índice F_{st} (0.004), y R_{st} (0.017) ambos significativos. Se destaca la discontinuidad observada en la agrupación norte, específicamente la zona de Pisagua, apelando movimiento de ejemplares o translocaciones entre AMERBs formalmente no informadas.

Los resultados en el recurso Loco a través de la distribución geográfica analizada y con los marcadores moleculares aquí utilizados no evidencian un patrón de estructuración genética poblacional, asumiendo una gran población con apareamientos azarosos. En esta población se observa una riqueza alélica entre 14 a 43, con exceso de homocigotos y desequilibrio de Hardy – Weinberg en todos los loci analizados. Estos resultados corroboran investigaciones nacionales anteriores en base a marcadores moleculares provenientes del ADN mitocondrial y nuclear.

En el caso el Pulpo del Norte se observa una riqueza alélica entre 7 a 15, con exceso de homocigotos y desequilibrio de Hardy – Weinberg en la mayoría de los loci. Seis de los nueve loci analizados evidencian los patrones de estructuración genética observados. El análisis de varianza molecular somete a prueba y corrobora las tres agrupaciones determinada por el método de agrupamiento bayesiano, con un índice F_{st} (0.07), y R_{st} (0.38) altamente significativos.

Para las cuatro especies en estudio y las respectivas agrupaciones poblacionales evidenciadas no se obtienen resultados significativos respecto a la ocurrencia de reducciones en el tamaño efectivo poblacional reciente.

En cuanto al análisis de migraciones y tamaño poblacional efectivo, los resultados del análisis bayesiano muestran mayores tamaños efectivos (N_e) en la población del norte tanto en Erizo como en Locate, además de mayores valores de tasa de migrantes por generación (N_m) desde Norte hacia el Sur para ambas especies. La mayor direccionalidad y magnitud del flujo génico en sentido norte-sur en ambas especies estarían relacionadas con mecanismos de transporte de sus larvas planctónicas de larga duración, con reportes de fases larvales de 10 a 33 días para la equinopluteus de Erizo, y hasta 120 días para la larva veliger de Locate. Estas larvas serían transportadas mayormente por las masas de aguas entre los 20 y 200 metros de profundidad que corren con dirección norte-sur, y que serían parte de la contracorriente subsuperficial Perú-Chile. En Pulpo del Norte se observan valores de N_e en aumento hacia la población del Sur, con los menores valores de N_e en la población más septentrional. El flujo de migrantes por generación indica mayores tasas de sur a norte, con la mayor conectividad entre la población más septentrional y la población de la zona centro-norte, por su parte la población del extremo sur muestra altos valores de N_m hacia el norte, pero bajos valores N_m hacia ella. La mayor direccionalidad y magnitud del flujo génico en sentido sur-norte en el Pulpo del Norte estaría relacionado con mecanismos de transporte de sus larvas planctónicas de larga duración, con reportes de sobrevivencia en el plancton de su paralarva de hasta 60 días. Estas larvas serían transportadas mayormente por masas de aguas entre los 0 y 20 metros de profundidad que corren con dirección sur-norte, y que corresponderían a las aguas de surgencias costeras, fenómeno oceanográfico característico de la zona Norte de Chile. Este mecanismo se fortalece frente al fototactismo positivo informado para las paralarvas del Pulpo del Norte, lo que las obliga a mantenerse en la zona fótica de la columna de agua.

En el contexto de los modelos ecológicos de hábitat fuente y sumidero, de forma general un hábitat sumidero es aquel que alberga una población donde la reproducción no es suficiente para balancear la mortalidad natural, y que depende de la inmigración desde el hábitat fuente para su persistencia en el tiempo. En este marco la agrupación genética geográfica norte del Erizo actuaría como hábitat fuente, y la agrupación sur como hábitat sumidero. Esta dinámica fuente-sumidero sería compartida para el recurso Locate. Patrón inverso se observan en el Pulpo del Norte, donde desde las agrupaciones genético poblacionales del sur y centro exportarían variantes genéticas (individuos) hacia el norte, de este modo las poblaciones del centro y sur actuarían como hábitats fuentes de la agrupación sumidero del norte. Mayor evidencia y análisis formales de modelamiento fuente-sumidero son necesarios para concluir respecto a este tema.

INDICE GENERAL

1.-	Objetivo General.....	1
1.1	Objetivos Específicos.....	1
2.-	ANTECEDENTES GENERAL.....	2
2.1	GENÉTICA Y POBLACIONES.....	2
2.2	MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DE STOCK Y ESTUDIOS DE CONECTIVIDAD.....	4
2.3	ANTECEDENTES BIOLÓGICOS - PESQUEROS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO.....	7
2.3.1	<i>Concholepas concholepas</i> “Loco”	7
2.3.2	<i>Thais chocolata</i> “Caracol Locote”	17
2.3.3	<i>Loxechinus albus</i> “Erizo”	21
2.3.4	<i>Octopus mimus</i> “Pulpo del Norte”	26
2.4	CARACTERISTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO.....	34
3.-	OBJETIVO GENERAL.....	37
4.-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
5.-	PROPUESTA METODOLÓGICA.....	38
5.1	CONSIDERACIONES SOBRE EL TAMAÑO, ÁREA Y PERÍODO DE MUESTREO.....	38
5.2	GUÍA E INSTRUCCIONES DE MUESTREO EN CAMPO.....	44
6.-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4.2.....	45
6.1	PROPUESTA METODOLÓGICA.....	45
6.2	OBTENCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES.....	45
a)	Obtención de marcadores microsatélites en <i>C. concholepas</i>	46

b)	Obtención de marcadores microsatélites en <i>O. mimus</i>	47
c y d)	Construcción de una librería genómica enriquecida con motivos microsatélites en <i>T. chocolata</i> y <i>L. albus</i>	48
6.3	AMPLIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES.....	49
7.-	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4.1 y 4.3.....	50
7.1	ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOCI MICROSATÉLITES.....	50
8.-	RESULTADOS.....	53
8.1	CONSIDERACIONES SOBRE EL TAMAÑO, ÁREA Y PERÍODO DE MUESTREO (Actividad 5.2).....	53
8.2	OBJETIVO ESPECIFICO 4.2.....	55
a)	Obtención de microsatélites en <i>Concholepas concholepas</i>	55
b)	Obtención de marcadores <i>Octopus mimus</i>	58
c)	Obtención de marcadores <i>Thais chocolata</i>	63
d)	Obtención de marcadores <i>Loxechinus albus</i>	66
8.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4.1 y 4.3.....	69
8.3.1	<i>Octopus mimus</i>	69
8.3.2	<i>Thais chocolata</i>	71
8.3.3	<i>Concholepas concholepas</i>	72
8.3.4	<i>Loxechinus albus</i>	72
9.-	ANÁLISIS Y DISCUSION DE RESULTADOS.....	82
10.-	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	90
11.-	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	92

INDICE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1: Características de Marcadores Moleculares.

Tabla 2: Naturaleza Marcadores Moleculares

Tabla 3: Parámetros de desarrollo de *C. concholepas*.

Tabla 4: Número de posturas y talla de madurez de *C. concholepas* para distintas localidades en Chile

Tabla 5: Cuotas de Loco *C. concholepas* asignadas para las caletas de la I Región

Tabla 6: Cuotas de Loco *C. concholepas* asignadas para las caletas de la II Región

Tabla 7: Principales caletas que presentan el recurso *L. albus* en el norte grande de Chile (Fuente: Sernapesca).

Tabla 8: Detalle de masas de agua en Chile descritas por Robles (1979). Modificada de Bernal et al., (1982). En negrita y cursiva las masas de aguas presentes en la zona de estudio.

Tabla 9: Situación de áreas de manejo presentes en la I y II Región (Fuente Subpesca y Sernapesca).

Tabla 10: Muestras comprometidas por localidad y recurso, Proyecto FIP2008-39.

Tabla 11: Características de loci microsátélites disponibles en *C. concholepas*. Extraído desde Cárdenas et al., 2007.

Tabla 12: Microsátélites desarrollados para *O. vulgaris* (Extraído desde Greatorex et al., 2000).

Tabla 13: Número de muestras por localidad y especie recolectadas durante la ejecución del proyecto FIP2008-39.

Tabla 14: Ubicación geográficas de las áreas de manejo de la I y II región de Chile, FIP2008-39. (Diciembre 2009: Fuente Subsecretaría de Pesca).

Tabla 15: Estado de situación de las áreas de manejo de la I y II región de Chile, FIP2008-39 (Diciembre 2009: Fuente Subsecretaría de Pesca).

Tabla 16: Distancia entre AMERBs en estudio entre la I y II región de Chile, FIP2008-39.

Tabla 17: Condiciones de PCR para amplificación de tres microsátélites de *C. concholepas*. **A.** Buffer PCR 1.2 X. **B.** Buffer PCR 1.5 X

Tabla 18: Nombre del locus, Motivo, temperatura de Melting, Concentración de magnesio y Tamaño del producto de los microsátélites descritos por Greatorex et al. (2000).

Tabla 19: Nombre del locus, Motivo, temperatura de Melting, Concentración de magnesio y Tamaño del producto de los microsatélites descritos por Doubleday et al. (2009).

Tabla 20: Característica de los loci microsatélites aislados para *O. mimus*.

Tabla 21: Características de microsatélites aislados en *T. chocolata*.

Tabla 22: Detalles de ocho loci microsatélites en *L. albus* incluyendo nombre del locus, motivo de repetición, secuencia de los partidores, rango de tamaño (bp), temperatura de annealing (T_a).

Tabla 23: Comparación de modelos usando el Factor de Bayes para la aproximación de *Geneland*.

Tabla 24: Parámetros de variabilidad genética en nueve loci microsatélites en los diferentes cluster para *O. mimus*.

Tabla 25: Test de ligamiento entre pares de loci microsatélites en *O. mimus*, FIP2008-39.

Tabla 26: índices F_{st} y R_{st} por pares de clústers en *O. mimus*, FIP2008-39

Tabla 27: Valores del test de Wilcoxon para testear un exceso de heterocigotos significativo, aludiendo disminución de tamaño poblacional efectivo reciente (cuello de botella), para cada especie en estudio, FIP2008-39.

Tabla 28: Parámetros de variabilidad genética en cinco loci microsatélites en los diferentes cluster en *T. chocolata*.

Tabla 29: Test de ligamiento entre pares de loci en microsatélites de en *T. chocolata*, FIP2008-39.

Tabla 30: índice F_{st} , R_{st} y test exacto de diferenciación poblacional en *T. chocolata*, FIP2008-39

Tabla 31: Parámetros de variabilidad genética en cinco loci microsatélites para el cluster identificado en *C. concholepas*.

Tabla 32: Test de ligamiento entre pares de loci en microsatélites de *C. concholepas*, FIP2008-39.

Tabla 33: Parámetros de variabilidad genética en ocho loci microsatélites para los diferentes cluster identificados en *L. albus*.

Tabla 34: Test de ligamiento entre pares de loci en microsatélites de *L. albus*, FIP2008-39.

Tabla 35: Índice F_{st} y R_{st} por par de clústers en *L. albus*, FIP2008-39.

Figura 1: Ejemplares de *Concholepas concholepas* (Bruguère, 1789).

Figura 2: Cápsulas ovíferas de *C. concholepas* (Gallardo, 1973; Garrido & Gallardo, 1993) y cada una de sus estructuras. Op: Opérculo; Cc: Cuerpo capsular; P: Pedúnculo; Cb Cemento basal.

Figura 3: Reconstrucción espacio - temporal del ciclo de vida de *C. concholepas* en un corte idealizado de la zona costera de Valdivia (Fuente Moreno et al., 1993)

Figura 4: Desembarque Nacional y de la XV, I y II Región de loco *C. concholepas* 1988-2009 (Fuente Sernapesca 2010).

Figura 5: Desembarque Nacional y de la XV, I y II Región de Loco *C. concholepas* 2001-2009 desde Áreas de Manejo (Fuente Sernapesca 2010).

Figura 6: Morfología general Externa del Caracol Locate. (Extraído y modificado desde Olguín & Jerez, 2003).

Figura 7: Esquema Ciclo de Vida de *Chorus giganteus* aplicable a *Thais chocolata* (Extraído desde Osorio, 2002).

Figura 8: Desembarque por región del recurso Locate para el año 2009. (Fuente: Sernapesca 2010.)

Figura 9: Serie cronológica de desembarque del recurso Locate entre 1999-2009. (Fuente: Sernapesca 2010)

Figura 10: Desembarque nacional del recurso *L. albus* entre 1996 – 2009 (Fuente Sernapesca 2010).

Figura 11: Desembarque nacional del erizo rojo por región para el año 2008 (Fuente Sernapesca 2009).

Figura 12: Desembarques del erizo rojo para la I y II. (Fuente: Sernapesca 1998-2009) (Fuente Sernapesca 2010)

Figura 13: Ejemplar de *Octopus mimus* (Extraído de Osorio, 2002).

Figura 14: Ciclo de vida *Octopus mimus* (Extraído desde Osorio, 2002)

Figura 15: Relaciones filogenéticas obtenidas mediante análisis del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa III en *Octopus* (Söller et al., 2000).

Figura 16: Desembarque nacional y de la I y II región del recurso pulpo *O. mimus* 2001-2009 (Fuente: Sernapesca 2010).

Figura 17: Desembarque nacional y de la I y II región del recurso pulpo *O. mimus* 1998 - 2009 proveniente de Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos (AMERBs) (Fuente: Sernapesca 2010).

Figura 18: Principales masas de agua frente a Chile (Corte Vertical). (Extraído y Modificado desde Osorio, 2002).

Figura 19: Área norte del Sistema de la Corriente de Humboldt, ilustrando la dinámica de gran escala de corrientes marinas.

Figura 20: Ubicación geográfica de las AMERBs, I región.

Figura 21: Ubicación geográfica de las AMERBs, II región.

Figura 22: Periodos de veda biológica actualmente vigente para las principales pesquerías bentónicas de la zona norte.

Figura 23: Ubicación geográfica de las AMERBs en estudio entre la I y II región de Chile, FIP2008-39.

Figura 24: Cromatograma correspondiente a lecturas de fragmentos de 4 microsatélites desarrollados para *L. albus*, FIP2008-39.

Figura 25: Mapa de distribución de las poblaciones basado en la probabilidad *a posteriori* de la asignación de la genética de individuos a los clústers geográficos para (a) Erizo, (b) Locate, (c) Loco, y Pulpo del Norte (d).

Figura 26: Resultados de los análisis realizados en MIGRATE-N en esquemas de diagrama de flujo.

12.- INDICE DE ANEXOS.....	116
Anexo 1 Personal participante por actividad, proyecto FIP 2008-39.....	110
Anexo 2 Autorización para pesca de investigación, proyecto FIP 2008-39.....	112
Anexo 3 Descriptivos de longitud y pesos de muestras, proyecto FIP 2008-39.....	115
Anexo 4 Programa de taller de discusión y difusión, proyecto FIP 2008-39.....	119
Anexo 5 Manuscrito en ingles para divulgación científica, proyecto FIP 2008-39.....	121
Anexo 6 Descripción de la base de datos, proyecto FIP 2008-39.....	125

1. OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura genética de los diferentes stocks de las principales pesquerías: erizo, locote, pulpo, loco, presentes en el norte grande (I y II regiones), detectando las áreas y fuentes de sumidero de estos recursos.

1.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El desarrollo de los objetivos específicos se presenta a continuación de acuerdo a su orden lógico en el tiempo.

4.2 Establecer los loci microsatélites polimórficos para cada una de las especies.

4.3 Determinar los parámetros genéticos poblacionales de cada uno de los loci microsatélites en las diferentes especies y poblaciones de la I-II regiones.

4.1 Determinar la diversidad genética y el flujo génico entre stocks efectivos para cada uno de los recursos en estudio.

2.- ANTECEDENTES

2.1 GENÉTICA Y POBLACIONES

El conocimiento de la conectividad de poblaciones marinas y el grado de estructuración que presentan sus poblaciones locales es vital para la conservación y manejo pesquero, particularmente para la estrategia de diseños de reservas. Una reciente proliferación de herramientas moleculares y estadísticas ha incrementado la integración de datos genéticos y geográficos (e.g Manel et al., 2003). Estos avances han significado sobrepasar en cierta medida el problema del seguimiento de organismo en el vasto océano. Teniendo en cuenta las inherentes limitaciones de las aproximaciones genéticas para inferir conectividad, particularmente en ambientes marinos.

La conectividad entre poblaciones ha sido el foco de un rápido incremento en el número de estudios desde hace unos 15 años (Crooks & Sanjayan, 2006), debido principalmente por un interés teórico de entender la dinámica poblacional y la necesidad de mantener poblaciones conectadas para la conservación de especies (Webster et al., 2002, Waples & Gaggiotti, 2006). La cuantificación de la conectividad es esencial para establecer estrategias de conservación, particularmente para proteger especies migratorias a través de su rango de distribución (Martin et al., 2007). Aquí, nos referimos a conectividad en el sentido ecológico, como un concepto utilizado para describir el movimiento o intercambio de organismos entre habitats geográficamente distintos, o poblaciones geográficamente distanciadas.

Los primeros estudios sobre la temática se focalizaron especialmente sobre sistemas terrestres, frecuentemente sobre problemáticas de fragmentación de hábitat, pero en los recientes años especies marinas y sus habitats han recibido mayor atención. Estudios de conectividad en sistemas marinos se han focalizado sobre especies con un amplio rango de distribución, desde invertebrados con larvas pelágicas a ballenas, en que los diferentes estados de sus ciclos de vida habitan en áreas separadas (DiBacco et al., 2006; Bjorndal & Bolten, 2008; Harrison & Bjorndal, 2006). Especial interés ha despertado la cuantificación de la conectividad en stocks de especies comercialmente importantes o que se encuentran en peligro, pues para un efectivo manejo de estos recursos es requisito el conocimiento de los patrones temporales y espaciales de sus movimientos y distribución.

En el contexto de la actividad extractiva desarrollada en torno a los recursos Loco, Erizo, Pulpo del Norte y Caracol Locote, uno de los requerimientos básicos para el adecuado manejo de poblaciones naturales de especies explotadas, ya sea por razones comerciales o de conservación, es el conocimiento de sus aspectos reproductivos, como por ejemplo, si una población o un “fishing ground” es reproductivamente autosustentable o depende de inmigrantes para el reemplazo de sus individuos adultos, pues el nivel de intercambio genético originado por la inmigración entre poblaciones, puede afectar su sustentabilidad en el largo plazo.

Tomando en cuenta que el monitoreo directo de la medida del potencial de dispersión (como una medida de conectividad), de un organismo sean estas larvas, juveniles o adultos es muy dificultoso, se deben desarrollar métodos indirectos para evaluar el grado en que las poblaciones divergen (autosustentables) o son comparables (intercambio de individuos). Un método es observar el rango y número de diferencias fenotípicas entre poblaciones. Si una población es suficientemente diferente

del punto de vista fenotípico de otras poblaciones, se podría deber a que se encuentran separadas reproductivamente. Sin embargo, aunque las diferencias fenotípicas pueden ser usadas para distinguir poblaciones, a menos que las condiciones ambientales y/o físicas sean idénticas para ambas, es igualmente posible que las diferencias fenotípicas observadas sean producto de la plasticidad (e.d, adaptaciones locales al ambiente). Una alternativa para evaluar las diferencias poblaciones es examinar la estructura genética de la población. El grado en el cual las diferentes poblaciones son genéticamente divergentes puede reflejar el balance entre los procesos potencialmente diversificantes de la deriva génica y la selección, versus, el efecto homogeneizador del flujo génico.

Así como se ha indicado uno de los principales objetivos de la evaluación y manejo de las poblaciones de recursos naturales es la identificación de él o los stocks sobre los cuales se está ejerciendo la acción pesquera o de extracción, además del nivel de migración o flujo génico que conecta las subpoblaciones o stocks; ya que el stock es la unidad básica sobre la cual deben sostenerse las evaluaciones y las medidas de ordenamiento (Grant & Waples, 2000; Tyler, 1988). La finalidad de identificar los stocks de un recurso en particular es entender la dinámica de su diferenciación espacial y temporal, y aplicar estos conceptos en la conservación y manejo de las especies (Winans, 1987). En este contexto existen varias acepciones del concepto de stock, dependiendo si se consideran aspectos ecológicos, pesqueros o genéticos. Bajo este último criterio se pueden diferenciar (1) un stock puro o discreto, es decir, una población que evolucionó independientemente de otras y por lo tanto acumuló diferencias genéticas con respecto a ellas o, (2) stock ecológico o dinámico, en que persisten patrones espaciales de distribución y abundancia en escala temporal ecológica sin que exista necesariamente una diferenciación genética entre unidades poblacionales (Spanakis et al., 1989).

En el presente estudio se considera el concepto de stock puro o discreto, dado que las técnicas de análisis de ADN requieren que exista algún grado de microevolución divergente entre las poblaciones en estudio. Este concepto de stock, esta basado en la idea de poblaciones de organismos que evolucionan independientemente y que, por lo tanto, pueden acumular diferencias genéticas y mantenerlas en el tiempo bajo ciertas condiciones, como por ejemplo, cuando el flujo génico es muy bajo o nulo, dado las grandes distribuciones geográficas, la fuerte dependencia de factores ambientales y la presencia de barreras que restringen el libre movimiento de los individuos, evitando la panmixia total entre los ejemplares de una misma especie, teniendo como resultado que una especie este formada por numerosas poblaciones panmíticas o demos (Spanakis et al., 1989).

Dentro de las metodologías disponibles para la discriminación de stock, los estudios genéticos en conjunto con el desarrollo de marcadores moleculares, se presentan como de suma importancia; pues son herramientas de gran utilidad y aplicación en la elaboración de mapas genéticos y físicos, búsqueda de asociaciones con QTLs (quantitative traits loci), variabilidad genética, estudios de ligamiento, identidad y discriminación de genotipos, parentesco, programas de selección asistida, estudios de filogenia, genética de poblaciones, etc. El termino “marcador molecular”, corresponde a cualquier fenotipo molecular que sea producto de la expresión de un gen o de segmentos específicos del ADN, que pueden ser regiones expresadas o no del genoma (Becerra & Paredes, 1999; Ferreira & Grattapaglia, 1989), siendo estos de origen nuclear (ADNn) o mitocondrial (ADNmt). Algunas de sus características se observa en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de Marcadores Moleculares.

NA: no aplica.

Tópico	MARCADOR MOLECULAR			
	Proteínas	ADNmt	Microsatélites	RAPD
Requerimientos de tejido	Alto	Bajo	<i>Bajo</i>	Bajo
Sacrificio de organismos	Frecuentemente	No	<i>No</i>	No
% cubierto del genoma	<5	<10 ⁻⁴	<i>5-20</i>	Desconocido
Numero de loci	10 ² -10 ³	1	<i>10⁴-10⁵</i>	Desconocido
Tasa de evolución	Moderado	Rápido	<i>Rápido</i>	Rápido
Tipo de estudio	Proteínas	ADNmt	Microsatélites	RAPD
Análisis de pedigrí	Dudoso	NA	<i>Excelente</i>	Bueno
Genética poblacional	Excelente	Bueno	<i>Excelente</i>	Dudoso
Zonas híbridas	Bueno	Bueno/Excelente	<i>Dudoso</i>	Dudoso
Filogenética	Bueno	Excelente	<i>Dudoso</i>	Dudoso

2.2 MARCADORES MOLECULARES PARA LA IDENTIFICACIÓN DE UNIDADES DE STOCK Y ESTUDIOS DE CONECTIVIDAD

Marcadores moleculares nucleares

En el ADN nuclear podemos encontrar secuencias moderadas y altamente repetitivas; entre las moderadamente repetitivas se encuentran los genes ribosomales, estructurado por unidades en “tandem” repetidas cientos de veces y entre las secuencias altamente repetitivas del ADN nuclear se encuentran los microsatélites (Litt & Luty, 1989), siendo estas últimas una de las más utilizadas en la evaluación de unidades poblacionales y determinación de variabilidad genética.

Los microsatélites (en sus siglas en inglés: SSRs, Simple Sequence Repeats; STRs, Short Tandem Repeats), corresponden a secuencias de ADN repetidas en “tandem”, con unidades o motivos de repetición que poseen entre uno 1 a 6 pares de bases de largo (dependiendo del criterio del autor), y organizadas en bloques de 20 a unos pocos cientos de bases (Beckmann & Weber, 1992). Presentan una amplia distribución a lo largo del genoma (O’Connell & Wright, 1997) y muestran altos niveles de polimorfismo alélico (Tautz, 1989), debido a sus altas tasas de mutación que presentan (10²-10⁶ mutaciones por locus por generación) (Ellegren, 2000), esto los convierte en la mayoría de los casos en marcadores moleculares hipervariables tanto a nivel específico como poblacional (Chistiakov et al., 2006), con un patrón de herencia codominante, fácilmente amplificado por PCR (De Woody & Avise, 2000; Chistiakov et al., 2006), y con una amplia cobertura del genoma, ubicados usualmente en regiones intergenicas no codificantes del ADN nuclear (Chistiakov et al., 2006). Aunque también se han encontrado en el genoma cloroplastidial de algunas plantas (Powell et al., 1995). Estos

marcadores son considerados selectivamente neutros, sin embargo diferentes estudios han provisto de relevancia funcional en un significativo numero de SSRs. Las diferencias en la frecuencia de microsatélites en regiones codificantes y no codificantes se relaciona con una selección específica frente a mutaciones en las secuencias flanqueantes en las regiones codificantes. En general los microsatélites con motivo de repetición tri- y hexanucléotidos se encuentran en exceso en regiones codificantes y no codificantes, mientras que los microsatélites con otros tipos de repeticiones no son tan abundantes. La selección que existe contra las mutaciones en las regiones flanqueantes limita la expansión de los microsatélites no tripletes en regiones codificantes (Metzgar et al., 2000).

En el campo de pesquería y acuicultura, la utilidad de estos marcadores se ha dado en áreas como caracterización de stocks genético, selección de reproductores, construcción de mapas genéticos, mapeo de QTLs de importancia comercial, entre otros (Chistiakov et al., 2006). Dentro de los estudios poblacionales los microsatélites se han utilizado en estudios de variabilidad genética, estructuración poblacional o evaluación de stock genético, para diferentes recursos marinos: peces (Ward et al., 2001; Oke et al., 1999), moluscos (McGoldrick et al., 2000; Pressa et al., 2002), equinodermos (Carlson & Lippé, 2007; Chenuil et al., 2003) y crustáceos (Cruz et al., 2002; Gouin et al., 2006).

La obtención de este tipo de marcador demanda un gran esfuerzo en tiempo y costo (Ver Zane et al., 2002), ya que se es necesario clonar, ligar, cultivar bacterias, encontrar el fragmento microsatélite, secuenciar y posteriormente diseñar partidores específicos de las regiones flanqueantes para el microsatélite aislado de la especie objetivo. Esta es una de las principales desventajas de los microsatélites, pero aun cuando en teoría son especie específicos, estos tienen una característica, pueden ser utilizados en especies emparentadas, trabajando con partidores heterologos para microsatélites, por ejemplo microsatélites de *O. vulgaris* (Greatorex et al., 2000) y *O. maorum* (Doubleday et al., 2009) aplicables a *O. mimus*.

Esta característica genera potencialmente gran utilidad de su uso en especies donde no hay conocimientos de dichos marcadores. La presencia de regiones altamente conservadas en la zona de flanqueantes de los loci microsatélites ha sido reportada en cetáceos (Schlötterer et al. 1991), tortugas (FitzSimmons et al., 1995) y peces (Rico et al., 1996; Angers & Bernatchez, 1996; D’amato et al., 1999, Oke et al., 1999; Williamson et al., 2002)

Se destaca que tanto para marcadores moleculares de origen nuclear y mitocondrial difieren en la naturaleza de información entregada para análisis genético poblacional y los costos relacionados con su análisis (Tabla 2):

Tabla 2. Naturaleza Marcadores Moleculares

	NATURALEZA DE LA INFORMACION				COSTOS	
	Grado de polimorfismo	Distribución de H&W	Flujo génico detectado	Codificante/no codificante	Inicio	Exploración de muestras
<i>Aloenzimas</i>	Bajo-Moderado	Si	Si	Codificante	Bajo	Bajo-moderado
<i>ADNmt</i>	Bajo-Moderado	No	Solo hembras	Altamente codificante (Excepto región control)	Moderado	Moderado
<i>Microsatélites</i>	<i>Alto</i>	<i>Si</i>	<i>Si</i>	<i>No codificante (con excepciones)</i>	<i>Alto</i>	<i>Moderado-alto</i>

H&W: Hardy & Weinberg

2.3 ANTECEDENTES BIOLÓGICOS - PESQUEROS DE LAS ESPECIES EN ESTUDIO

2.3.1 *Concholepas concholepas* “Loco”

El recurso Loco *C. concholepas* (Bruguière, 1789) en Chile (Pata de burro o Chanque tolina en Perú) es un Gastrópodo de la familia Muricidae que se caracteriza por poseer una concha muy gruesa, con una espira corta formada por dos vueltas, donde la última comprende toda la concha. El umbo está inclinado hacia el lado izquierdo. La superficie externa es áspera, rugosa, marcada por costillas muy gruesas y separadas por otras más pequeñas. Son notorias las estrías de crecimiento horizontales dispuestas irregularmente. El color varía entre el café chocolate a grisáceo. La superficie interna es de color blanco, de aspecto suave y brillante. Su pie es grueso con manchas de color amarillo y gris. El opérculo es córneo, oval y de color café (Zagal & Hermosilla, 2001; Osorio, 2002) (Fig. 1).



Figura 1. Ejemplares de *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789).

Distribución

La distribución geográfica de *C. concholepas*, está restringida al Pacífico Sur oriental. Desde Lobos de Afuera (Perú) hasta el Cabo de Hornos (Chile), incluyendo las Islas de Juan Fernández (Stuardo, 1979), batimétricamente los juveniles habitan el intermareal mientras que los adultos se encuentran hasta los 40 m de profundidad adheridos a la parte baja de las rocas.

Reproducción y Ciclo de Vida

El Loco es una especie dioica con fecundación interna (Castilla, 1974; Castilla & Cancino, 1976) que posee un ciclo de vida bento pelágico. En condiciones naturales 20 a 50 animales forman agrupaciones “maicillo” o “comidas” donde adultos migran a sectores poco profundos para el proceso de copulación (Castilla, 1974) por lo que múltiples inseminaciones podrían ocurrir. Las hembras adhieren sus capsulas ovíferas, que no poseen huevos nutricios, sobre sustratos duros como rocas o sobre las conchas de ejemplares de la misma especie. El cuerpo capsular está conformado por seis capas con diferentes roles funcionales, el opérculo posee en su extremo un tapón muco-fibroso el que una vez madura las larvas se abre y permite su liberación al medio, la región peduncular es un tallo considerado una prolongación del cuerpo capsular y la región del cemento basal está compuesta por una sustancia cementante y una matriz esponjosa (Fig. 2) (Garrido & Gallardo, 1993).

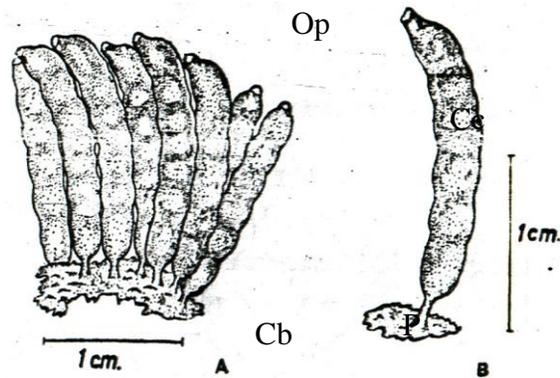


Figura 2: Cápsulas ovíferas de *C. concholepas* (Gallardo, 1973; Garrido & Gallardo, 1993) y cada una de sus estructuras. Op: Opérculo; Cc: Cuerpo capsular; P: Pedúnculo; Cb Cemento basal

En el interior de estas cápsulas se evidencia el desarrollo de un número variable de embriones, el cual depende del tamaño de las cápsulas (Ramorino, 1975; Gallardo, 1973, 1979; Castilla & Cancino, 1976) pudiendo contener hasta 13.000 huevos lecitotróficos. Una vez finalizado el ciclo de desarrollo intracapsular, aproximadamente 60 días dependiendo de la temperatura (Gallardo, 1979), las larvas véliger pelágicas nadan en la columna de agua libremente mediante el velum. Ellas crecen y se mantienen en el plancton marino alimentándose de fitoplancton. Cuando esta larva alcanza su estado competente (30-90 días), se fija a un sustrato apropiado, desencadenándose la metamorfosis que inicio el período bentónico (Gallardo, 1979). Desde este momento, los individuos cambian su hábito alimentario de herbívoro a carnívoro, depredando preferentemente sobre cirripedios, piures y moluscos bivalvos (Disalvo, 1988; Méndez & Cancino, 1990) (Tabla 3 y Figura 3)

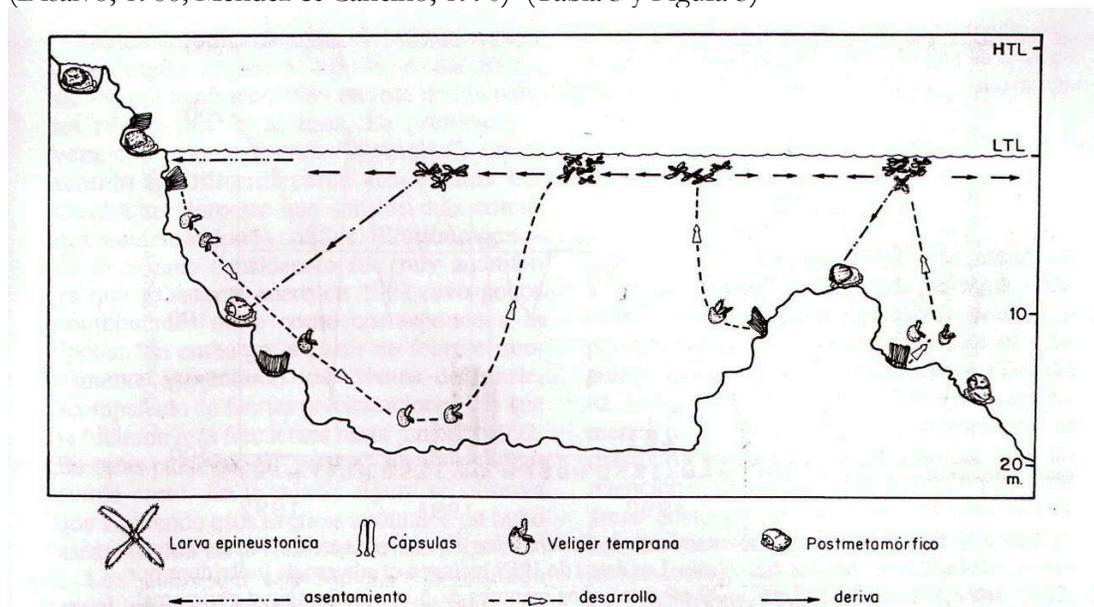


Figura 3: Reconstrucción espacio - temporal del ciclo de vida de *C. concholepas* en un corte idealizado de la zona costera de Valdivia (Fuente Moreno et al., 1993)

El proceso reproductivo del Loco presenta diferencias temporales de acuerdo al área geográfica estudiada. Tres zonas geográficas constituyen las áreas de pesquería del recurso:

- a) Zona Norte: desde Iquique hasta los 30°S
- b) Zona centro Sur: desde los 30°S hasta Chiloé
- c) Zona Extremo Sur: desde Chiloé hasta Magallanes

Lara et al., (2007) en un extenso informe del Fondo de Investigación Pesquera “Comportamiento y parámetros reproductivos de loco en la I y II Regiones” establece lo siguiente:

A) *Índice de Agregación*: los autores observaron diferencias en el índice de agregación entre ambas regiones. La tendencia temporal del agrupamiento en Chanavaya (I Región) consistió en presentar un mayor nivel de agrupamiento en la temporada de verano, disminuyendo hacia la temporada de invierno y primavera, mientras que en El Lagarto (II Región) observaron una tendencia de mayor agrupamiento hacia la estación de invierno y primavera. En ambas localidades la mayor parte del año (verano a invierno) mientras que en los meses de primavera no se registró presencia de agrupamiento reproductivo.

B) *Posturas de Cápsulas*: la presencia de cápsulas se concentró en las temporadas de otoño e invierno, alcanzando una presencia máxima de 16% en invierno en el sector de Chanavaya, concordando con los períodos de agregaciones reproductivas de loco a partir del verano tardío y todo el otoño. Batimétricamente éstas se registraron a mayores concentraciones entre los 7 y 10 metros en ambas regiones pudiendo estar éstas hasta profundidades de 15 m.

C) *Índice Gonadosomático*: los autores realizando muestreos durante 12 meses en la I (Pisagua) y II (Urcu) regiones, determinaron que en la I Región los valores más altos se presentan en el mes de febrero (machos: 18,07; hembras: 15,67), a partir del cual comienza a descender visualizándose el punto más bajo en julio (machos: 8,54; hembras: 8,99). En septiembre observaron un menor repunte para disminuir hacia diciembre. En la II región en tanto, la tendencia mensual es similar para machos y hembras. Los valores indicaron una caída hacia invierno, obteniendo, en ambos sexos, el punto más bajo en la colecta de junio (machos: 6,43; hembras: 6,66). De agosto a diciembre, después de experimentar un incremento, el indicador se mantiene relativamente estable, visualizándose una leve caída en noviembre.

D) *Tamaño Mínimo de Madurez Sexual*: para la I Región, el tamaño mínimo de madurez sexual para machos y hembras correspondió al rango 45-52 mm. Desde el rango de 52–59 mm, en ambos sexos, sobre el 75% de los individuos presentaron gónadas con la línea germinal completa. En la II Región el tamaño mínimo de madurez sexual para machos correspondió al rango 84-91 mm, con un 93% de ejemplares maduros. Desde el rango de 91–98 mm, el 100% de los individuos se encontró maduro sexualmente. Con respecto a las hembras, el tamaño mínimo de madurez sexual de la muestra poblacional correspondió al rango 93-100 mm, con un 75% de ejemplares maduros. Desde el rango de 100 –107 mm, sobre el 94% de los ovarios se encontró con línea germinal completa.

En la Tabla 4 se presentan antecedentes respecto de posturas y talla de primera madurez de *C. concholepas* para distintas localidades en Chile.

Tabla 3: Parámetros de desarrollo de *C. concholepas*.

Localidad	Diámetro del Huevo	Embriones por cápsula	Talla larval (μ)	Trocófora (días)	Véliger (días)	Días de desarrollo	Temperatura (°C)	Autor
Valdivia	159-169	2600-13187	260	12-13	19	36-37	16.6	Gallardo, 1973
Valparaíso	-	-	-	-	-	69-128	13.5-14.5	Castilla & Cancino, 1976
Laboratorio	147-170	-	250-260	-	-	60-84	12-14	Ramorino, 1979

Tabla 4: Número de posturas y talla de madurez de *C. concholepas* para distintas localidades en Chile

Localidad	Máximo número de Posturas	Talla Primera Madurez (cm)		Autor
		Macho	Hembra	
Valdivia	Noviembre-Diciembre	-	-	Lépez, 1987
Valparaíso	Febrero- Mayo	-	-	Ramorino, 1979
Mehuín	Noviembre-Febrero	-	-	Gallardo, 1979
Valdivia	Noviembre-Marzo			Gallardo, 1973
Iquique	-	4.9	5.3	Herrera & Alvial, 1983
Coquimbo	-	5.7	6.2	Lozada et al., 1976
Ultima Esperanza	-	4.6	5.3	Guzmán et al., 1987
Chanavaya	Mayo-Junio-Julio	4.9	5.4	Lara et al., 2007
El Lagarto	-	8.4	9.5	Lara et al., 2007

Reclutamiento y Crecimiento

En general y de acuerdo a lo informado por diversos autores la etapa de asentamiento de las larvas ocurriría en la zona intermareal por ejemplares de aproximadamente 10 mm (Gallardo, 1979; Guisado & Castilla, 1983; Jara & Moreno, 1983; Moreno & Reyes, 1988; Reyes & Moreno, 1990; Rivas & Castilla, 1987; Stotz et al., 1991) sobre sustratos rocosos normalmente con abundantes grietas. Para la Zona Sur, específicamente Mehuín Reyes & Moreno (1990) informan que el asentamiento (acumulación de más del 75% de individuos de una cohorte) podría ocurrir en los meses de mayo y junio, mientras que para la IV Región (Zona Norte). Stotz et al., (1991) reporta la presencia de juveniles menores a 10 mm entre los meses de noviembre a marzo. Durante la fase bentónica y posteriormente durante la migración de los juveniles al submareal ha sido escasamente estudiada, debido principalmente a su difícil seguimiento.

Sin embargo, Reyes & Moreno (1990) logran medir el crecimiento siguiendo una cohorte desde una talla media inicial de 3,5 mm para la zona de Valdivia y cuyas tasas fluctuaron entre 0,022 mm/día y 0,058 mm/día, medida en el mes de junio y noviembre, momento al cual la talla media era de 9,5 mm, respectivamente. Stotz (2000) realizando un estudio sobre parámetros de crecimiento con resultados obtenidos en experiencias de marcaje y recaptura planteó que existiría un gradiente latitudinal a lo largo de la costa chilena para los parámetros del modelo de crecimiento de von Bertalanffy.

Las estimaciones de parámetros de crecimiento utilizando los datos de individuos marcados y recapturados de la III y IV Región apuntan hacia un crecimiento rápido del loco en este sector costero. De acuerdo a las estimaciones realizadas por González et al., (2005) en este sector el loco demoraría alrededor de dos años para lograr la talla mínima legal de 100 milímetros.

Lara et al., (2007) utilizando el método marcaje recaptura y de lectura de anillos determinó el crecimiento estacional y anual por rangos de tamaño del loco en la I y II Regiones. Para la I Región los parámetros de crecimiento fueron $L_{\infty} = 136,0$; $K = 0,24$ y $t_0 = -0,81$ y para la II Región $L_{\infty} = 118,9$; $K = 0,26$ y $t_0 = -1,17$. De esta manera, la talla mínima legal de 10 cm se alcanzaría entre los 4 y 6 años de edad estimándose que los ejemplares de la I Región presentarían un mayor crecimiento en comparación a la II Región, el cual se expresa a partir del año 4 en adelante.

Pesquerías y Áreas de Manejo

El loco ha sido históricamente un recurso apreciado por la población del Pacífico Sur oriental por su gran pie comestible. Los conchales prehistóricos son el primer testimonio del valor nutritivo de este molusco (Suarez et al., 2004, Guzmán et al., 2008). Hasta fines de los 70` su pesquería se mantuvo en 2000 toneladas, sin embargo a partir de 1977 el Loco sufrió una creciente explotación intensiva producto del libre acceso a la pesquería con la debilidad del sistema de fiscalización y el auge de las exportaciones a los mercados orientales. Al mismo tiempo, la técnica del buceo semi-autónomo (hooka) aumentó el alcance operativo y la eficacia de los pescadores artesanales que realizan tradicionalmente la extracción de mariscos.

Así en el año 1980 la pesquería de este gastrópodo alcanzó su record con un peso bruto de desembarque de 24856 toneladas., en tanto que el record de ventas al exterior se registró en 1982 alcanzando un valor de US\$ 21 millones por 4.830 toneladas de locos congelados y US\$ 5 millones por 1120 toneladas de conservas. La sobre-pesca extensiva y declinación de los stocks de las áreas tradicionales de la zona norte y central provocaron en el cierre de la pesquería entre 1989 y 1992 inclusive (Fig 4).

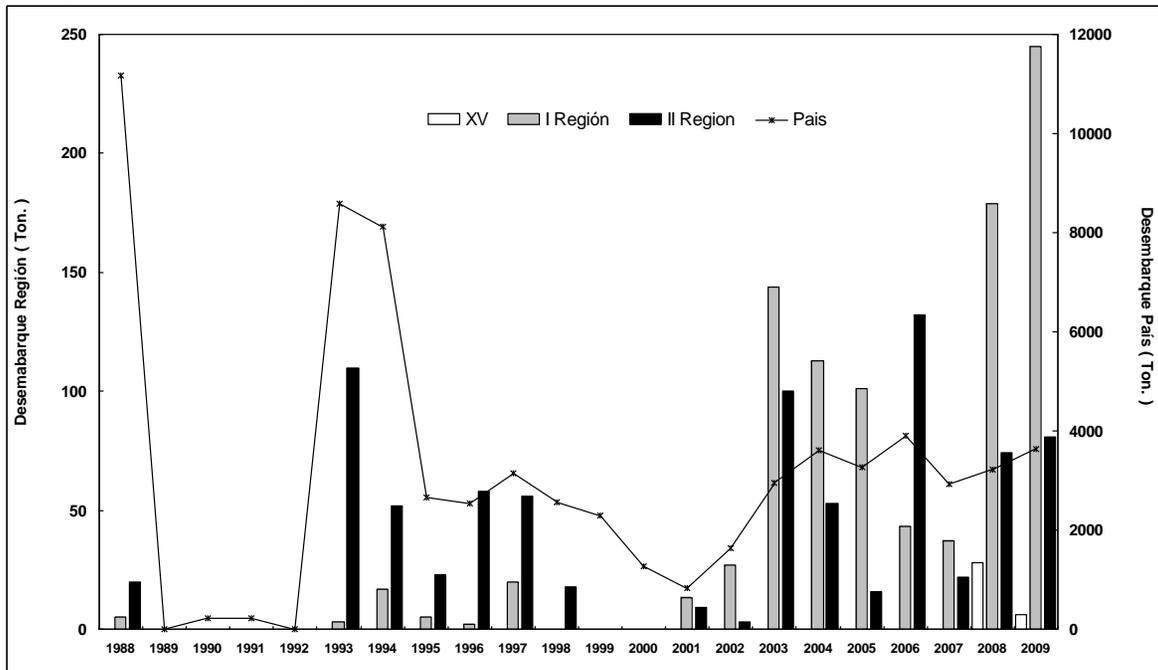


Figura 4: Desembarque Nacional y de la XV, I y II Región de loco *C. concholepas* 1988-2009 (Fuente Sernapesca 2010).

Desde 1999 las pesquerías del loco están sujetas al régimen de áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos, y desde el 2001 a la fecha la extracción se centra en ellas, permitiéndole a la I Región situarse por sobre los niveles de extracción alcanzados por la II Región excepto en el año 2006 (Fig 4). Un aspecto relevante que presenta el último periodo se refiere al drástico aumento en los desembarques y cosechas nacionales pasando desde menos de 2000 toneladas en el 2007 a valores entre las 8000 a 12000 toneladas entre el 2008 y 2009 (Fig 4 y 5).

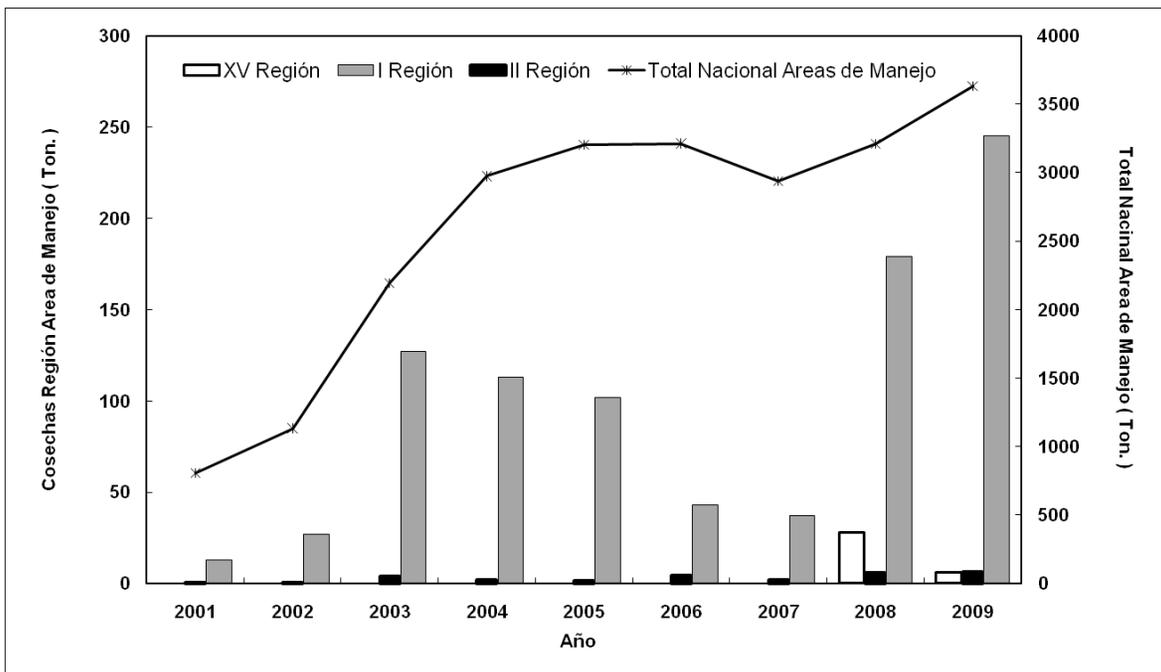


Figura 5: Desembarque Nacional y de la XV, I y II Región de Loco *C. concholepas* 2001-2009 desde Áreas de Manejo (Fuente Sernapesca 2010).

Las cuotas de Loco asignadas se presentan en la Tabla 5 y 6. La I Región tiene asignados 1.830.470 unidades del recurso equivalentes a 546,3 toneladas., mientras que en la II Región esta cifra alcanza a 1.505.101 unidades es decir 397, 5 toneladas. Las caletas con mayor números autorizados para la I y II región son Pabellón de Pica e Isla Santa María.

Actualmente, la veda extractiva se encuentra prorrogada entre la I y XI Regiones hasta el 31 de diciembre de 2008 (D.Ex. de MINECOM N° 1593 de 2005), mientras que para la XII región, la veda está estipulada entre el 1 de julio y 28 de febrero del año siguiente (D. Ex. De MINECOM N° 409 DE 2003). La veda reproductiva está calendarizada por zonas establecidas en el Decreto Exento del MINECOM N° 409 de 2003 y N° 185 de 2005. Por otro lado, la talla mínima de extracción de 10 cm de longitud peristomal rige para todo el territorio nacional (D.S. MINECON N° 264 de 1988).

Tabla 5: Cuotas de Loco *C. concholepas* asignadas para las caletas de la I Región de Chile.

Caleta	Unidades	Kilogramos
CARAMUCHO	30.813	9694
CHANAVAYITA	186.417	53788
CHIPANA	286.897	99341
LOS VERDES	55.111	17122
PABELLON DE PICA	556.352	148217
PISAGUA	101.319	26084
PUERTO IQUIQUE	8.237	2491
RIO SECO	299.518	101625
SAN MARCOS	305.806	87965
Total	1.830.470	546.327

Tabla 6: Cuotas de Loco *C. concholepas* asignadas para las caletas de la II Región de Chile.

Caleta	Unidades	Kilogramos
CIFUNCHO		
COBIJA		
COLOSO	23.587	8.473
HORNITO		
ISLA SANTA MARIA	542.739	141.246
JUAN LOPEZ	28.718	9.329
MEJILLONES	73.390	28.744
PUNTA ARENAS II Reg	358.835	69.031
PUNTA ATALA	116.622	25.851
TALTAL	306.519	96.682
TOCOPILLA	35.006	10.560
URCO	19.685	7.590
TOTAL	1.505.101	397.506

Antecedentes Genéticos y Diversidad Genética de *Concholepas concholepas*: implicaciones para el manejo de pesquerías

En este punto contrasta el alto nivel de explotación experimentado por el recurso Loco con la poca información genética disponible para su adecuado manejo, en particular en lo referente a niveles de variación y estructura genética de las poblaciones (alrededor de 5 referencias, como se demuestra en esta sección). La variabilidad genética es el sustrato para la continuidad del pool génico de las poblaciones en el tiempo, mientras que la estructura genética refleja la distribución heterogénea de las variantes genéticas en el ámbito geográfico de la especie. En otras palabras, la respuesta adaptativa de la población, o stock, a presiones selectivas locales (poblaciones locales). Diversos factores alteran la variabilidad genética y el tipo de estructuración intra-específica, tales como el tamaño efectivo de la población, la presión de extracción del recurso (que difiere significativamente entre áreas de manejo en las regiones I y II. Tabla 5 y 6), eventos demográficos, la conducta de apareamiento, el patrón de asentamiento, la intensidad de las presiones selectivas locales y muy especialmente el flujo génico que, de ser efectivo y de gran magnitud, tiende a homogenizar las características genéticas de las poblaciones (alto grado de conectividad = panmixis). Contrariamente, un flujo reducido (baja conectividad) tiende a mantener las diferencias genéticas inter-poblacionales, o entre stocks. El manejo del recurso dependerá de si la especie está estructurada genéticamente o no, puesto que una subdivisión poblacional requiere manejar de manera independiente cada población/stock, considerando sus rasgos adaptativos particulares que son necesarios para su continuidad temporal, pero también de interés productivo si existiera- que es lo que se esperaría- una correlación entre las diferencias genéticas y el fenotipo observado. En este sentido es relevante que el loco exhiba una larva de gran viabilidad y/o duración (alrededor de 3 meses) en la columna de agua, la que puede ser transportada grandes distancias por las corrientes oceánicas. Este antecedente permite anticipar que la conectividad entre poblaciones sería alta y por ello cabría esperar un pool genético homogéneo o cohesivo para la especie en partes importantes de su rango de distribución, como demostraron Gallardo & Carrasco (1996). Estos autores compararon por medio de aloenzimas 6 poblaciones de la zona sur demostrando una considerable homogeneidad genética entre los stocks. Previamente, Guíñez et al., (1992), utilizando la misma herramienta pero considerando diferencias sólo en tres loci, concluyen que a través de su distribución centro - sur de Chile y Perú, existirían a lo menos tres agregaciones o unidades genéticamente aisladas.

Hipótesis propuesta

Consideraremos dos hipótesis de trabajo:

- i) las áreas de estudio de la I y II región, representan una gran población panmíctica (conectadas por flujo génico), de acuerdo a lo señalado por Gallardo & Carrasco (1996), Vergara (2001), y Cardenas et al., (2007);
- ii) Alternativamente, áreas de estudio de la I y II región se comportaría como stocks independientes, de acuerdo a Guíñez et al., (1992), pues existiría la posibilidad de que a pesar de ocurrir flujo génico mediado por la dispersión larval, las presiones selectivas en ciertas localidades fueran de tal magnitud como para hacer inviables a los individuos que arriban, o inviables a los híbridos producidos, aunque es poco probable tal nivel de diferenciación ambiental en el mar.

Para someter a prueba las hipótesis anteriormente señaladas se requiere el uso de marcadores hipervariables del tipo microsatélites, los que han sido desarrollados recientemente para la especie (Cárdenas et al., 2007). Se dispone de 11 microsatélites altamente variables (12 a 51 alelos) los que a pesar de que no mostraron diferencias genéticas entre las poblaciones comparadas por Cárdenas et al., (2007), son marcadores altamente sensibles para evidenciar eventos contemporáneos (relación dispersión/flujo génico) a escala geográfica menor (a diferencia de las aloenzimas). Igualmente, permiten analizar las características genéticas de las larvas y eventualmente asignar su procedencia (análisis de asignamiento).

2.3.2 *Thais chocolata* “Caracol Locate”

El Caracol locate *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832) es un molusco gasterópodo perteneciente a la familia Muricidae, abundante en la zona norte de Chile (Fig. 6).

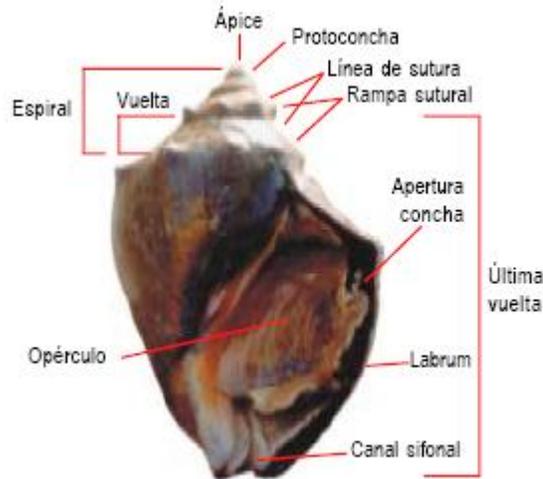


Figura 6: Morfología general Externa del Caracol Locate. (Extraído y modificado desde Olgún & Jerez, 2003).

Distribución

Su distribución se extiende desde Paita en Perú hasta Valparaíso en Chile (Osorio, 1979), encontrando la mayor biomasa entre la I y II regiones (Retamales & González, 1982). Su distribución batimétrica corresponde a la zona inframareal entre los 4 a 35 metros, aunque se concentra de preferencia entre los 10-25 m sobre el fondo rocoso, bancos de cholgas, fondos de conchuelas y arena gruesa (Andrade et al., 1994; Guzmán et al., 1998). Se caracteriza por ser un carnívoro depredador que se alimenta de carroña y pequeños organismos (Guzmán et al., 1998; Miranda, 1975).

Reproducción y Ciclo de Vida

T. chocolata, registra una longitud máxima controlada de 12 cm, en Mejillones, Miranda (1967) determina la estructura de la población y reconoce por lo menos 7 años. Se caracteriza por ser una especie gonocórica con fertilización interna, la cual presenta diferenciación externa de su dimorfismo sexual, con presencia de un hemipene en machos. En épocas de reproducción se acumula en grandes densidades sobre roqueríos o pilotes de muelles formando agrupaciones reproductivas llamadas “maicillos” entre los 8 y 18 m de profundidad. El tamaño de madurez sexual esta aproximadamente en lo 40 mm de longitud (estimada para la I región, Chile), con dos épocas reproductivas, mayo y octubre-enero, seguido por la evacuación de gametos en junio-septiembre y febrero-marzo, respectivamente (Retamales & González, 1982). Se ha descrito que la evacuación de las hembras ocurre todo el año, tal como ocurre en otros *Thais* (Barkati & Ahmed, 1983) y muricidos (Ramorino, 1975, Avilez & Lozada, 1975), en la I y II región Avendaño et al., (1998) indica que procesos reproductivos co-ocurren en simultáneamente en ambas regiones (18°-26°LS). En términos batimétricos, se indica que

organismos inmaduros se alimentarían a mayores profundidades y posteriormente, ya maduros migrarían a aguas someras para reproducirse (Andrade et al., 1994) (Fig. 7).

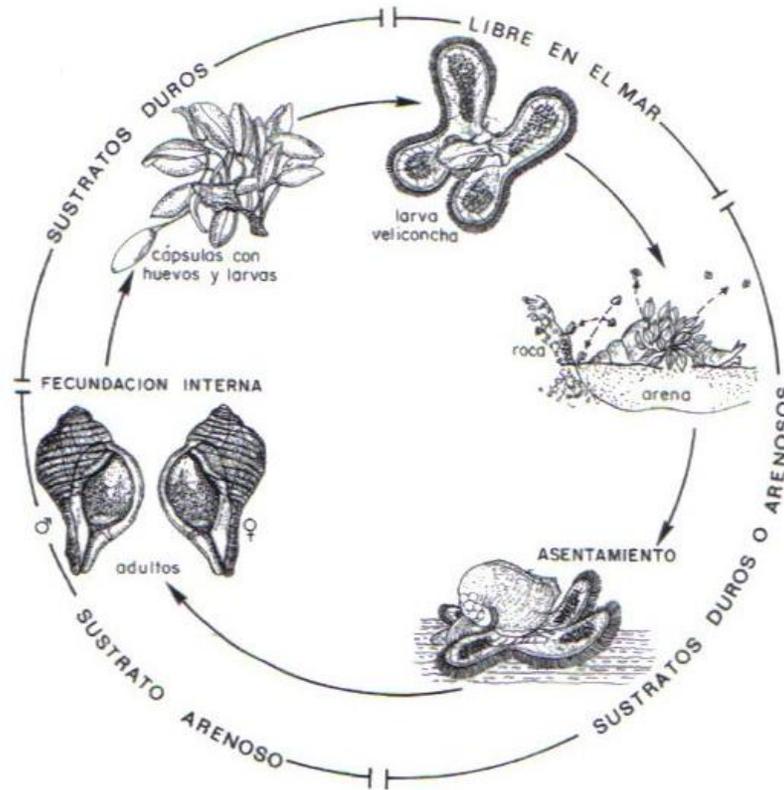


Figura 7: Esquema Ciclo de Vida de *Chorus giganteus* aplicable a *Thais chocolata* (Extraído desde Osorio, 2002).

Luego de la copulación, las hembras depositan grupos de huevos encapsulados, cada agrupación contiene capsulas de 100-150 pedúnculos, con forma de ampolleta, estas cápsulas miden aproximadamente entre 7 y 15 mm de largo (Romero et al., 2004) y contienen aproximadamente 2600 huevos pequeños (130 μm). El desarrollo intracapsular reportado por Romero et al., (2004), en condiciones de laboratorio plantea una duración de hasta 49 días post-fertilización desde un embrión hasta una larva veliger (220 \pm 10 μm) d largo. Después de la eclosión nadan hacia aguas superficiales formando pequeñas agrupaciones. El desarrollo larval continúa durante 4 meses (a 22°C). Una vez asentado comienza la metamorfosis (Romero et al., 2004)

Una larva veliger planctotrófica actae teleplanica (*sensu* Scheltema, 1971), ampliamente generalizada en moluscos (Gallardo, 1989), se origina desde cápsulas bentónicas (10 a 34 días antes de eclosionar (Cañete, 1992; Romero & Bellolio 1991, Romero 1995), con un estadio

pelágico de alta duración (aproximadamente 120 días), que presume una capacidad de dispersión larval capaz de mantener poblaciones separadas geográficamente, con un alto grado de homogeneidad desde un punto de vista genético, bajo un modelo panmictico.

La permanencia en el plancton estaría influenciada por patrones regionales y locales de circulación y mezcla de aguas que pueden favorecer o disminuir el suministro local de larvas.

En términos de estructura poblacional, Andrade et al., (1994), utilizando parámetros como estructura de tallas, densidades poblacionales, distribución espacial y reclutamiento, encontró diferencias en agrupaciones máximas de individuos, periodos reproductivos, diferencias en las tallas medias, diferencias temporales y espaciales en relación al proceso de reclutamiento. Una posible distribución diferencial entre reclutas (aguas profundas) y parentales (aguas someras) es planteada.

Pesquería y Áreas de Manejo

La pesquería del Caracol Locate se registra en las estadísticas desde 1986 con un desembarque de 8244 toneladas, disminuyendo a 975 toneladas en el año 1997. Su mayor desembarque aparece asociado con la XV, I y II (Fig. 8). Se consume en fresco – enfriado, congelado y en conservas.

Desde el año 2005 (Fig. 9) se observa una clara disminución de sus desembarques, con un máximo de 2036 toneladas el año 1999. Y cerca de 500 toneladas para el 2007 y 2009. Desde el año 1996 mediante el D.S. 348/96, publicado en el diario oficial del 29 de mayo de 1996, se decreto dos periodos de veda, un primer periodo entre la XV, I y IV región, entre 01-de marzo al 31 julio y el segundo periodo entre el 01 septiembre al 31 de diciembre. Con una talla mínima de extracción de 55 mm de longitud.

Antecedentes Genéticos y Diversidad Genética de *Thais chocolata*

Dentro de los antecedentes genéticos para el género encontramos que para *Stramonita* (= *Thais*) *haemastoma* utilizando marcadores aloenzimáticos determinaron dos grupos genéticamente diferentes, estas correspondían a caracoles tipo caniculata y floridana. La diferencia de estos dos grupos fue característica de especies congénicas, además de mantener sus diferencias genéticas en simpatria. La variación alelica de cada grupo fue baja a través de las largas distancias de muestreos (1500 km). Los autores sugieren que especies con larvas planctónicas deben tener tasas de flujo génico mayores (Liu et al., 1991). Mediante aloenzimas se diferenciaron genéticamente dos morfos de *T. clavigera*, el autor confirma que estos dos morfos están aislados genéticamente habiendo diferencias significativas en las frecuencias de al menos seis alelos analizados (Hayashi, 1999). Para *T. clavigera*, se determina que individuos muestreados a lo largo de la costa oeste de Taiwán pertenecen a la misma población (Yung-Chang, 2001).

Antecedentes genéticos acerca de la especie *T. chocolata* son casi nulos, salvo presentaciones en congreso (COLACMAR), uno relacionado con variabilidad genético-morfométrica (Muñoz et al., 1999) y diversidad genética en dos especies del género *Thais* (Muñoz et al., 2001)

La utilidad de marcadores microsatélites en especies cercanamente emparentada es una gran ventaja, dado el tiempo y recursos que requiere aislarlos. Kawai et al., (2001) determinó que 2 marcadores microsatélites heterólogos de 14 loci polimórficos, provenientes de la especie

Nucella lapillus amplificaron en especies del género *Thais*, específicamente *T. clavigera* (locus Nlw2) y *T. bronni* (loci Nlw2 y Nlw8). Este es el primer antecedente de potencial uso de microsatélites en el género para realizar estudios poblacionales. Los marcadores microsatélites heterólogos son una gran ventaja para especies que no tienen partidores especie específicos, aunque se ha establecido que la variabilidad genética disminuiría a medida que su estatus taxonómico aumenta (Barbará et al., 2007).

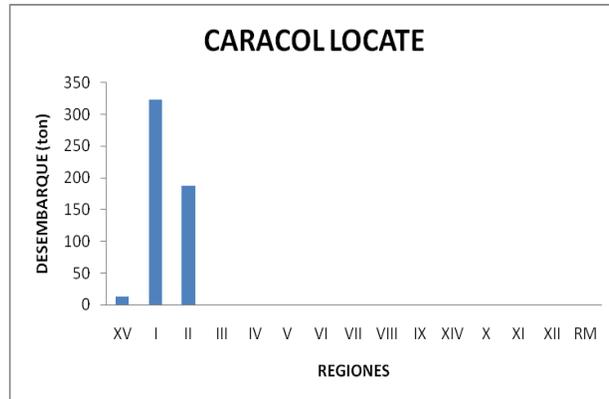


Figura 8: Desembarque por región del recurso Locate para el año 2009. (Fuente: Sernapesca 2010.)

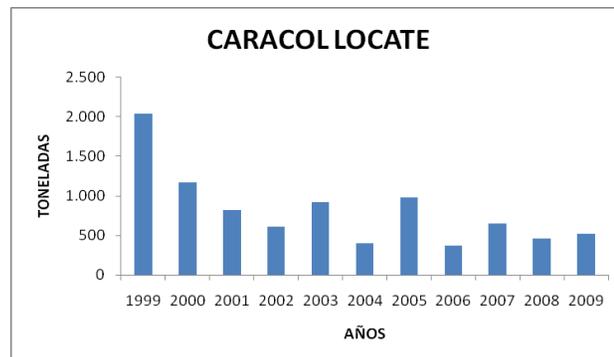


Figura 9: Serie cronológica de desembarque del recurso Locate entre 1999-2009. (Fuente: Sernapesca 2010)

Hipótesis propuesta

Para especies marinas sesiles y/o bentónicas se considera que el flujo génico está determinado en parte por su modo de reproducción (aplanico, teleplanico, etc) y la escala/ patrón en la cual sus larvas y/o juveniles pueden dispersarse. En el caso de *Thais* chocolata, hablamos de una especie teleplanica, con una larva planctotrofica de larva vida, que presume una capacidad de dispersión larval capaz de mantener poblaciones separadas geográficamente, con un alto grado de homogeneidad desde un punto de vista genético, bajo un modelo panmítico.

2.3.3 *Loxechinus albus* “Erizo”

El erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina, 1782) equinodermo de la familia Echinidae, se caracteriza por ser un organismo herbívoro, cuya dieta está constituida fundamentalmente por *Lessonia spp*, *Durvillea spp*, *Ulva spp* y *Macrocystis spp*.

Distribución

Su distribución geográfica en el pacífico suroriental es amplia y continua, abarcando desde el norte de Perú frente a la Isla Lobos de Afuera (6°53'50"S) hasta cabo de Hornos y Tierra del Fuego en Argentina (Guisado & Castilla 1987), siendo la única especie de erizo sometida a explotación en este rango. Habita en fondos duros desde la zona intermareal hasta los 340 metros de profundidad (Larraín, 1975), pero su extracción se concentra entre los 0 y 50 metros de profundidad.

Crecimiento

El crecimiento del erizo es relativamente lento y alcanza una longevidad de hasta los 20 años, con un diámetro máximo de testa de 130 mm (Stotz *et al.*, 1992; Gebauer, 1992; Gebauer & Moreno 1995). Recientemente Barahona *et al.*, (2003) encontraron diferencias entre dos localidades, una de la Región X (Quellón) y otra de la Región XI (Melinka).

Reproducción y Ciclo de Vida

L. albus es una especie dioica, sin dimorfismo sexual, con fecundación externa y alta fecundidad (Castilla & Defeo, 2001). Sus gónadas presentan un color desde tonalidades café, naranjas y amarillas. El inicio de la actividad gametogénica se ha detectado en tallas entre los 25 y 47 mm en machos y entre los 25 a 38 mm en hembras (Buckle *et al.*, 1978; Bay – Schmith *et al.*, 1981). La época de desove varía a lo largo de la costa de Chile, teniendo un solo desove en el año que puede extenderse de uno a tres meses dependiendo de la latitud (Bay-Schmith *et al.*, 1981).

L. albus es una especie con periodo larval (larva equipluteus) planctónico largo y variable (Castilla & Defeo (2001), permaneciendo la larva en el plancton por algunas semanas (Arrau, 1958; Guisado & Castilla, 1987; González *et al.*, 1987). Se conoce que el asentamiento ocurre principalmente en sistemas intermareales rocosos para después migrar al submareal y a aguas más profundas (Guisado & Castilla 1987; Vásquez 2001). Esta especie no presentaría patrones migratorios regulares (Castilla & Defeo, 2001).

Pesquería y Áreas de Manejo

Los desembarques de la especie han oscilado en los últimos diez años entre las 60 mil y 35 mil toneladas (Fig. 10), generándose principalmente en el sur de Chile, X, XI y XII, estas zonas son las que aportan el mayor número de desembarques (Fig. 11)

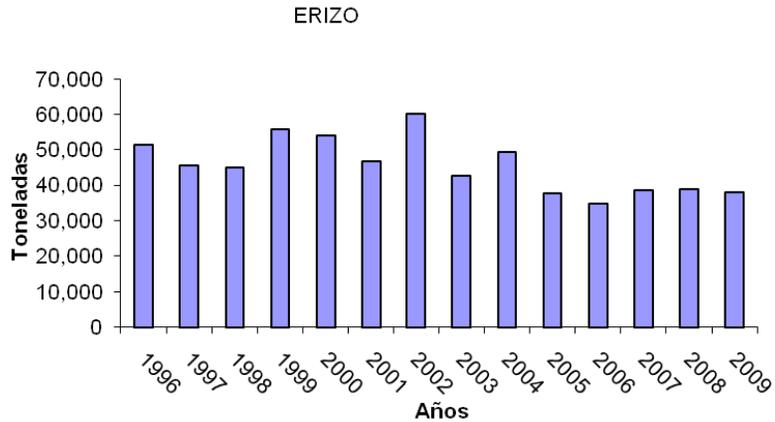


Figura 10: Desembarque nacional del recurso *L. albus* entre 1996 – 2009 (Fuente Sernapesca 2010).

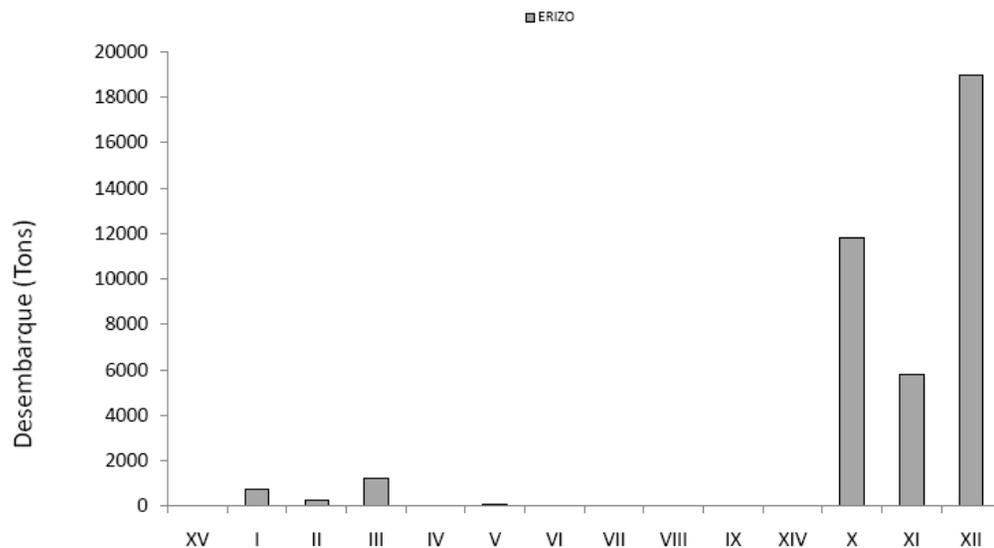


Figura 11: Desembarque nacional del erizo rojo por región para el año 2008 (Fuente Sernapesca 2009).

En el norte grande, particularmente XV, I y II región, a pesar que no presenta desembarques comparables con la zona sur, se ha mantenido en valores que oscilan entre las 1000 y 2000 toneladas, particularmente en la I región (Fig. 12).

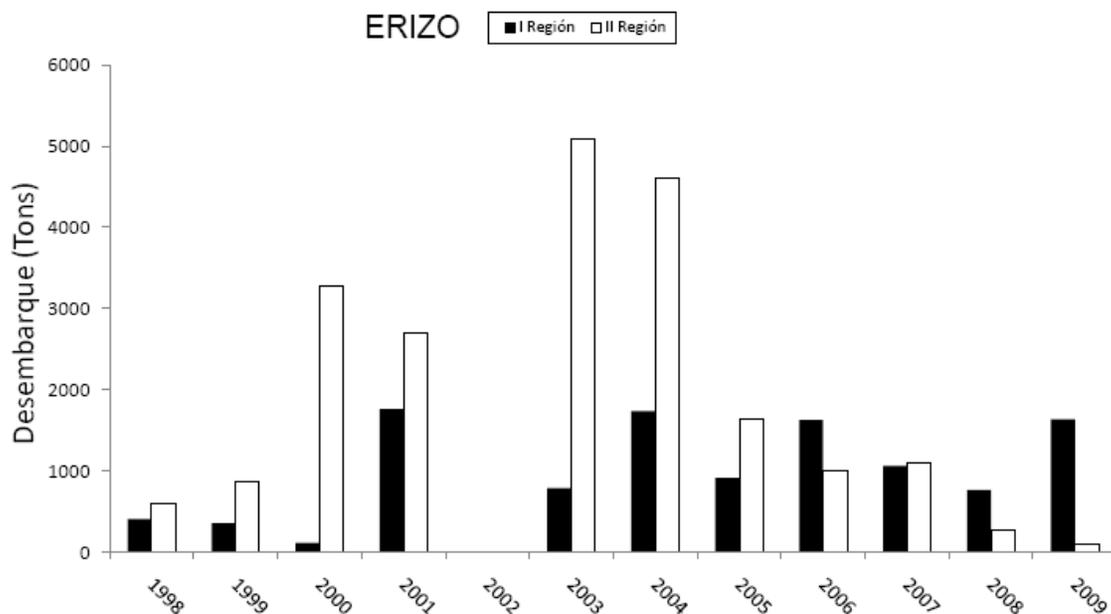


Figura 12: Desembarques del erizo rojo para la I y II. (Fuente: Sernapesca 1998-2009) (Fuente Sernapesca 2010)

Existen cuatro decretos supremos que determinan fechas y zonas de veda para el erizo, D.S. 291/87 periodo entre 15 octubre al 15 enero (I a XI), D.S. 275/99¹ periodo entre 15 agosto al 15 marzo XII, D.S 439/00² periodo entre 16 enero al 01 marzo (X a XI) y por último el D.S. 524/03 periodo 15 agosto al 15 marzo (47°10' LS y limite sur XI). En cuanto a las tallas mínimas de extracción para el recurso estas están normadas por D.S. 291/87, esta es una normativa nacional y establece un tamaño mínimo de extracción de 7 cm de diámetro, sin tomar en cuenta las púas. Las principales caletas donde funcionan áreas de manejo en el norte grande (I, I y II región) se presentan en la Tabla 7.

¹ Mediante decreto N° 972/06, se suspende la veda del Erizo en la XII Región, entre el 16 de agosto y 10 de septiembre de 2006.

² D.EX. N° 313/2008 prorroga veda hasta el día domingo 30 de marzo, en el área marítima comprendida entre el límite de la XI región y el paralelo 47°10' LS.

Tabla 7: Principales caletas que presentan el recurso *L. albus* en el norte grande de Chile (Fuente: Sernapesca).

Región	Caleta
I	ARICA CAMARONES
I	CARAMUCHO CHANAVAYITA CHIPANA LOS VERDES PABELLON DE PICA PISAGUA PUERTO IQUIQUE RIO SECO SAN MARCOS
II	CIFUNCHO COBIJA COLOSO ISLA SANTA MARIA JUAN LOPEZ MEJILLONES PUNTA ARENAS II Reg PUNTA ATALA TALTAL TOCOPILLA URCO

Antecedentes Genéticos y Diversidad Genética de *Loxechinus albus*

Lee et al., (2004), determinaron las relaciones filogenéticas y el tiempo de divergencia de erizos marinos antárticos y su relación con erizos sudamericanos, utilizando secuencias de ADNmt (COI y 12S), los autores determinan que el tiempo de divergencia entre *S. neumayeri* y *L. albus* coincide con la separación del continente antártico y Sudamérica sugiriendo que eventos tectónicos han provocado la cladogénesis de la especie a través de eventos vicariantes.

Espejo et al., (2004), trabajaron bajo una hipótesis nula de homogeneidad genética de *L. albus* a lo largo de la costa chilena (Punta Arenas, Tirúa, Antofagasta). Basado en el análisis genético de 13 sistemas enzimáticos con un total de 21 loci presuntivos, 9 de ellos polimórficos. 6 loci polimórficos fueron seleccionados para el análisis (PGI, PGM, AAT-1, AAT-2, MDH y IDH), no encontrando diferencias genéticas ($F_{st} = 0.002-0.069$), por lo cual no existirían barreras geográficas para impedir el flujo génico (conectividad) dentro de la zona estudiada.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Toro et al., (2005) analizó la estructura genético poblacional de *L. albus* mediante seis sistemas enzimáticos (PGM, GPI, PEP, ICD, GSR y EST) en 12 poblaciones (Iquique a Punta Arenas) no encontraron diferencias genéticas entre las diferentes zonas analizadas con un flujo génico (individuos por generación) de 5.93, flujo suficiente como para mantener la homogeneidad genética.

Hipótesis propuesta

De la información disponible en *L. albus* se puede inferir que las poblaciones presentes en las costas chilenas presentarían una gran conectividad a nivel larval, la cual no se vería afectada por procesos de deriva genética y/o presiones selectivas que puedan originar diferencias, generando que en su distribución a lo largo de la costa chilena (Arica a Punta Arenas; ca 5000 Km) se comporte como una gran unidad panmictica.

2.3.4 *Octopus mimus* “Pulpo del Norte”

El pulpo de los Changos, *Octopus mimus* (Gould 1882), cefalópodo de la familia Octopodidae, presenta un cuerpo ovalado, globoso y redondeado posteriormente. De ojos moderadamente prominentes, de piel rugosa y cubierta por mamelones carnosos con numerosas papilas cónicas, con reticulado epidérmico en mosaico y testelas anchas y alargadas (Fig. 13). Los brazos son largos y no sobrepasarían el 85% de la longitud total del animal. Hay ventosas más grandes en los 2° y 3° brazos, tanto en machos como en hembras. El 3° brazo esta hectocotilado en machos, con una lígula pequeña y el cálamo discretamente largo. El órgano del sifón tiene una forma de W. Las branquias tienen 7 a 8 laminillas por hemibranchia externa.

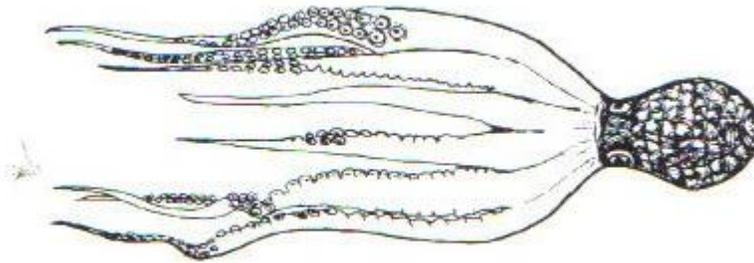


Figura 13: Ejemplar de *Octopus mimus* (Extraído de Osorio, 2002).

Distribución

Su distribución se presenta entre el norte de Perú a bahía San Vicente en Chile, este cefalópodo presenta un tamaño hasta 1200 mm y peso de 4104 g, en cautiverio es posible encontrar individuos con una tasa de crecimiento de 396g/mes. Presenta hábitos nocturnos y se alimenta de crustáceos, moluscos y pequeños peces (Cortez et al., 1999b).

Reproducción y Ciclo de Vida

O. mimus, es una especie dioica de fertilización interna, al igual que la todas las especies del género *Octopus*. Esta especie presenta la capacidad de reproducirse durante todo el año, en algunas poblaciones la maduración y postura se intensifica en los periodos de otoño- invierno e invierno-primavera. Se ha estimado que el peso de maduración de *O. mimus* es de 300 g para los machos y 750 g las hembras. Las hembras son capaces de desovar 213000 ovocitos, mientras que los machos presentan un máximo de 66 espermatoforos por bolsa Needham (Leite et al., 2008).

El proceso de copula ocurre de la misma forma que en *O. vulgaris*, el macho se aproxima a la hembra extendiendo el hectocotilo, y lo sitúa bajo el manto de la hembra, de esta forma se transfieren los espermatoforos, desde el macho, al oviducto distal para la posterior fecundación de la hembra, quien se encargará, hasta el momento de eclosión de cuidar a los huevos (Cardoso et al., 2004). (Fig. 14).

Esta especie, al igual que la mayoría del género *Octopus*, se caracteriza por ser una especie semélpara, las hembras mueren una vez alcanzada la madurez sexual. Este comportamiento es atribuido a la glándula óptica, quien también se encarga de aspectos fisiológicos como desove, degeneración postreproductiva, la nidación, la inanición y las expectativas de vida (Olivares-Paz et al., 2006). Los cambios más notorios en la maduración de la hembra, son a nivel de ovario y de la glándula oviductal, las que aumentan su masa entre 300 y 20 veces respectivamente. También es posible observar en esta etapa, que la madurez meiótica ocurre en animales jóvenes, durante el momento en que los ovarios generan una intensa proliferación de células germinales, sin generar aumento de la masa ovárica (Zamora & Olivares 2004; Olivares-Paz et al., 2006).

El proceso de proliferación de las células germinales se va estancado al acumularse vitelio, provocado por el crecimiento gonadal, de esta forma se inicia la vitelogenesis, la que marca la madurez sexual, esta etapa no se genera de manera sincronizada en las hembras de *O. mimus*, ya que los ovocitos al iniciarse la vitelogenesis se encuentran en estadios posteriores del desarrollo del ovario, esta asincrónica en el desarrollo folicular, permite a la hembra a presentar un periodo de postura de 20 días (Zamora & Olivares 2004). Los machos de esta especie por su parte presentan maduración temprana, permaneciendo en esta condición por un tiempo prolongado, lo que les permite transferir sus gametos en más de una ocasión, hasta el fin de su ciclo vital. Se han detectado tres tipos de machos: maduros jóvenes, de madurez máxima y en regresión; estos últimos disminuyen la producción espermatogénica, lo que indica el envejecimiento del *O. mimus* (Warnke, 1999; Olivares-Paz et al., 2006).

La madurez sexual de los machos, al igual que de las hembras, se ve regulada por las glándulas ópticas, las que secretan un factor mitogénico gonadotrófico, el que desencadena la proliferación de las células germinales. Además el sistema reproductor masculino presenta hormonas sexuales como esteroides y progesterona (Cortez et al., 1999b; Warnke, 1999). Durante la puesta de los huevos, la hembra deja de alimentarse, se encarga de cuidarlos aireándolos y limpiándolos, de manera de evitar contaminación de los huevos, hasta el momento de la eclosión. Los huevos se fijan en forma de racimo, aproximadamente 200 racimos por puesta de 6 a 10 cm de longitud, hasta alcanzar su desarrollo embrionario, el que se alcanza 25 días aproximadamente, luego de la eclosión, no se observan periodos larvales o metamorfosis (Cortez et al., 1999b; Warnke, 1999). Las primeras paralarvas se observan a los 37 días de eclosión. Éstas son planctónicas, presentan fototactismo positivo; la talla de eclosión de la paralarva son de aproximadamente 2,2 mm de longitud y 0,99 mm de longitud de manto (Baltazar et al., 2000). En referencias a estudios realizados a fin de completar el ciclo de vida en cautiverio, los autores Iglesias et al., (2004) han demostrado la factibilidad de producir en hatchery *O. vulgaris* mediante el control temperatura y salinidad así como de alimentación durante el período de paralarva (etapa de mayor mortalidad). Los resultados demuestran que una alimentación combinada de larvas zoeae y *Artemia* permite obtener un 31.5% de supervivencia de paralarvas a los 40 días de cultivo. En tal período las paralarvas alcanzan un peso aproximado de 9.5 mg, llegando a los 0.5-0.6 kg a los 6 meses de edad. Dos meses después los pulpos alcanzan un peso de 1.4-1.8 kg. Este rápido crecimiento no-asintótico característico de *Octopus*, es una de las grandes interrogantes del grupo debido principalmente a la alta variabilidad interindividual y a la falta de métodos precisos para estimar la edad en los ejemplares así como de sus unidades poblacionales (Semmens et al., 2004). Lo anterior, toma mayor complejidad debido a que la estructura de tallas de la población son altamente influenciadas por la prevalencia y escala de patrones de migración en pulpos. Dichos patrones

ocurren en todas las etapas del ciclo su ciclo de vida y han sido objeto de números estudios debido a la importancia en la implementación de regulaciones pesqueras sobre el recurso (Semmens et al., 2007).

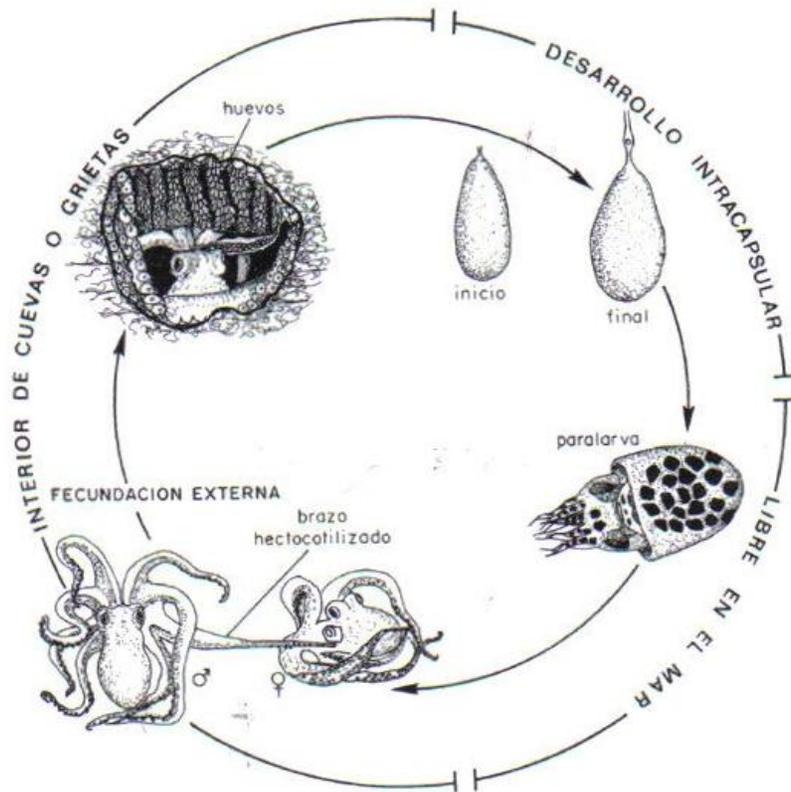


Figura 14: Ciclo de vida *Octopus mimus* (Extraído desde Osorio, 2002)

Reclutamiento y Crecimiento

En general las especies del género *Octopus* presentan una paralarva planctónica la que se transforma en un juvenil después de 2 meses aproximadamente de vida nadadora. En referencia al reclutamientos de *O. mimus*, se han realizado escasos estudios que describan el patrón y factores que controlan o afectan el proceso de reclutamiento. Sin embargo, Cortez et al., (1999b) logran medir el crecimiento en poblaciones naturales de *O. mimus* de la I región (Iquique), separaron a los individuos por sexo y tamaño logrando identificar 6 cohortes para machos y 5 para hembras, cuyas tasas de crecimiento medidas en longitud total fue para machos entre 0.15% a 0.84% d⁻¹ mientras que para hembras 0.12% a 0.90% d⁻¹ además miden la tasa de crecimiento en relación al peso corporal total obteniendo un promedio de 1.08% d⁻¹ para machos y un 1.19% d⁻¹ para hembras en verano, mientras que en invierno el crecimiento

corporal fue de 0.16% d⁻¹ en machos y 0.71% d⁻¹ en hembras. Cortez et al., (1999a) realizando un estudio sobre parámetros de crecimiento de individuos capturados del medio natural y mantenidos en sistemas controlados en mar abierto, obtienen un crecimiento exponencial durante los primeros 40 días con un promedio entre 5.33%-5.63% de peso corporal por día (326.6 g y 439 g, respectivamente) descrita por la siguiente ecuación de crecimiento $BW=40.80 e^{0.053t}$; pero durante los 40-70 días la tasa de crecimiento disminuyó a 2.25%-0.99% cambiando la ecuación de crecimiento $BW=-969.0 + 383.41nt$.

Cardoso et al., (2004) obtuvieron relaciones talla-peso para hembras $W=0.6521 LM^{2.8207}$ y para machos $W=0.6521 LM^{2.8207}$ a lo largo de la costa peruana concluyendo que *O. mimus* posee un crecimiento alométrico. Baltazar et al., (2000) obtuvieron en condiciones de cautiverio pesos de hasta 2.2 kg para *O. mimus* a partir de individuos de 348 g en un periodo de 5 meses mostrando una tasa de crecimiento de 369g/mes. Ellos determinaron un crecimiento exponencial de $W=434.74 e^{0.3577t}$.

Filogenia en Cephalopoda: Octopodidae

Cephalopoda es una de las nueve clases que integran al Phylum Mollusca. Los cefalópodos son divididos comúnmente en dos principales grupos: Nautiloidea y Coleoidea comprendiendo Octopoda (8 brazos) y decápoda (8 brazos + 2 tentáculos). La sistemática de los cefalópodos en general ha mostrado un constante cambio debido a la dificultad de establecer relaciones sólidas entre ellos en base a sus características morfológicas y paleontológicas. Aproximaciones moleculares entorno a la filogenia en Cephalopoda fueron inicialmente estudiadas por Bonnaud et al., (1997) mediante secuencias del gen citocromo oxidasa III. El autor describe 533 pb en 17 especies de cefalópodos (14 decápodos, 2 octópodos y 1 vampiromorfo). El análisis de COIII confirma el origen monofilético del grupo decápoda (incluyendo a especies de las familias Loliginidae y Sepioloidea) y deja en posición intermedia a *Vampyroteuthis infernalis* entre dicho grupo y especies del género *Octopus*. La posición intermedia filogenética del grupo vampiromorfo confirma la existencia de características morfológicas compartidas entre ambos grupos. No obstante los valores de distancia genética encontrados acercan más este grupo al género *Octopus* en comparación con los cefalópodos decápodos. En referencias a estudios filogenéticos en Octopidae, el taxon contiene alrededor de 90 especies las cuales se encuentran distribuidas circunglobalmente excepto en los mares árticos y antárticos (Nesis 1987). Análisis moleculares en la filogenia de *Octopus* han sido focalizados sobre estudios de aloenzimas y ADN mitocondrial (ADNmt) regiones: COI, COII, COIII, 16s ARNr, etc. (Bonnaud et al., 1997; Söller et al., 2000; Warnke et al., 2000; Warnke et al., 2004). Sin embargo, el estatus taxonómico de muchas especies es aún incierto, ejemplo de ello es *O. mimus* (Gould, 1982) el cual fue largamente considerado sinónimo con *O. vulgaris* (Osorio et al., 1979; FAO, 1996) pero observaciones realizadas sobre caracteres taxonómicos y embrionarios por Cortez (1999b) y Warnke (1999) re-describen a la especie como *O. mimus*. Antecedentes moleculares obtenidos entre *O. mimus* y *O. vulgaris* fueron expuestos paralelamente por los autores Warnke et al., (2000) y Söller et al., (2000). El primero de ellos mediante la utilización de marcadores RAPD identifica bandas específicas desde ejemplares (*O. mimus/O. vulgaris*) muestreados desde áreas costeras del océano Atlántico (Lanzarote, Senegal, Sudáfrica, Tristan da Cunha y Brasil) mar caribe (Venezuela) y océano Pacífico (Costa Rica y Norte de Chile). De un total de 14 bandas, sólo los ejemplares de *Octopus* provenientes del Atlántico presentan de manera específica los amplicones 1 y 13. Adicionalmente, los ejemplares del océano Pacífico presentan una banda característica de aproximadamente 250 pb (banda 14). Los resultados obtenidos mediante

amplicones RAPD demuestran una diferenciación entre los ejemplares reconocidos como *O. mimus* y *O. vulgaris*.

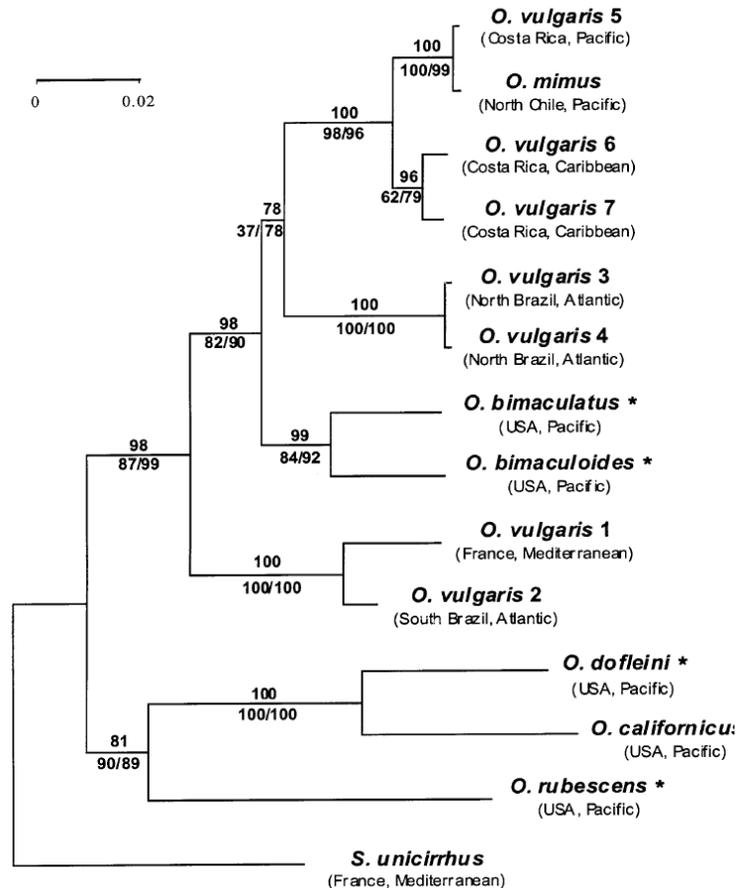


Figura 15: Relaciones filogenéticas obtenidas mediante análisis del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa III en *Octopus* (Söller et al., 2000).

El segundo autor Söller et al., (2000), mediante análisis de secuenciación del gen de ADNmt citocromo oxidasa III (COIII) sugiere al analizar 15 especímenes extraídos desde aguas mediterráneas (Francia), suroeste Atlántico (Brasil), el Caribe (Costa Rica), Pacífico sureste/tropical (Norte de Chile y Costa Rica) la existencia de dos principales clusters: (1) incluye a *O. rubescens*, *O. dofleini* y *O. californicus*, y (2) todos los ejemplares de *O. vulgaris*, *O. bimaculatus*, *O. bimaculoides* y *O. mimus*. Con una excepción, todos los haplotipos sudamericanos incluyendo *O. bimaculatus* y *O. bimaculoides* aparecen como grupo hermano de los haplotipos Mediterráneos de *O. vulgaris*, indicando que la mayoría de los ejemplares *O. vulgaris* investigados pueden no pertenecer a las especies descritas en el Mediterráneo y Atlántico Este. De hecho, la especie fue largamente considerada con una distribución global (Oosthuizen, 2003; Warnke et al., 2004), no obstante, diversos autores la consideran restringida al mediterráneo y Atlántico Oriental (Mangold & Hochberg 1991; Mangold, 1997). Recientemente, especies clasificadas previamente como *O. vulgaris*, han sido separadas entorno a un complejo denominado *O. vulgaris* y redescritas separadamente a través de aproximaciones genéticas (Warnke et al., 2000; Warnke et al., 2004). La posición de *O. mimus* como una especie distante de *O. vulgaris* del Mediterráneo es fuertemente sustentada debido a la alta divergencia nucleotídica de 12.7% entre dichas especies. Basados sobre la construcción de hipótesis filogenéticas del gen

COIIImt, los autores sugieren la existencia de especies crípticas entre pulpos similares morfológicamente a *O. vulgaris*.

Posteriormente, los autores Warnke et al., (2004) amplían la revisión del taxon mediante análisis tanto de COIII como de 16s ADNr. Los resultados muestran en general una concordancia con los antecedentes descritos por Söller et al., (2000) en referencia al origen monofilético del grupo y confirma la presencia de la especie en el océano atlántico, Pacífico Norte, Sudáfrica, mar caribe y Mediterráneo (Fig. 15).

Pesquerías y Áreas de Manejo

La pesquería del recurso *O. mimus*, se desarrolla principalmente en las regiones I a III, concentrándose en la región II, acumulando en el año 1996, el 55.6% del desembarque total. En términos generales la dinámica de este recurso muestra en el período 1984-1986 un incremento significativo de los niveles de desembarque, con un promedio de 540 ton/año, posteriormente los desembarques se mantienen en niveles que no superan las 50 ton/año (González et al., 1996).

Los registros obtenidos desde Sernapesca indican que en el año 1998 tanto para la I y II región del país ocurrieron los mayores desembarques a nivel pesquero artesanal (Fig. 16), pero posteriormente los desembarques fueron disminuyendo hasta estabilizarse en aproximadamente entre 500-1000 toneladas por año para la I región, con un drástico aumento en el año 2008 alcanzando las 250 toneladas.

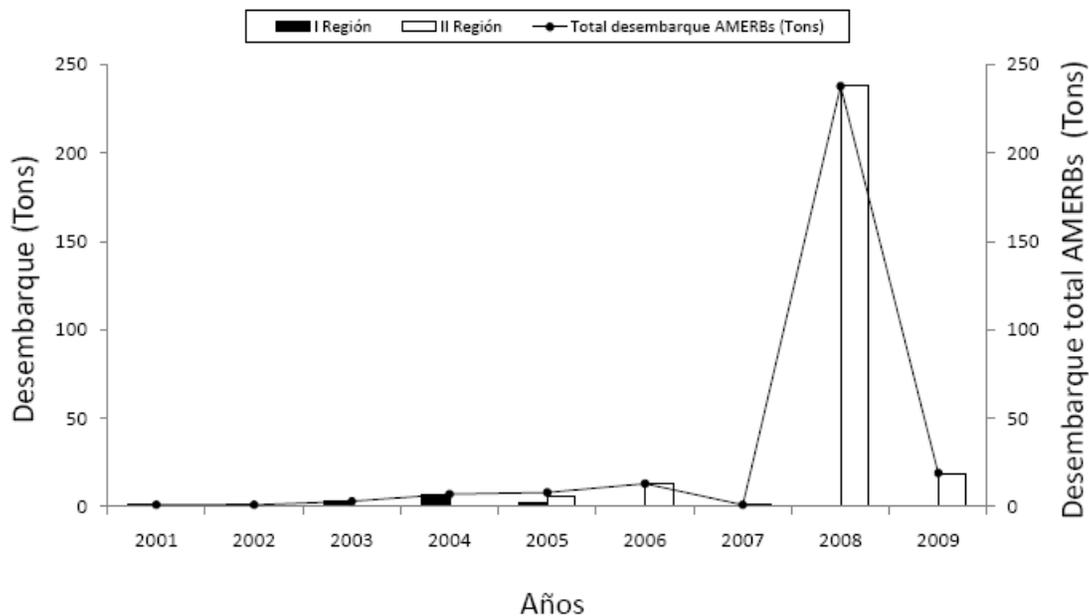


Figura 16: Desembarque nacional y de la I y II región del recurso pulpo *O. mimus* 2001-2009 (Fuente: Sernapesca 2010).

El historial de registros desde desembarques provenientes desde AMERBs, son principalmente aportados por la II región. Cabe mencionar que los volúmenes desembarcados son considerablemente menores a los registrados por el sector pesquero artesanal (Fig. 17).

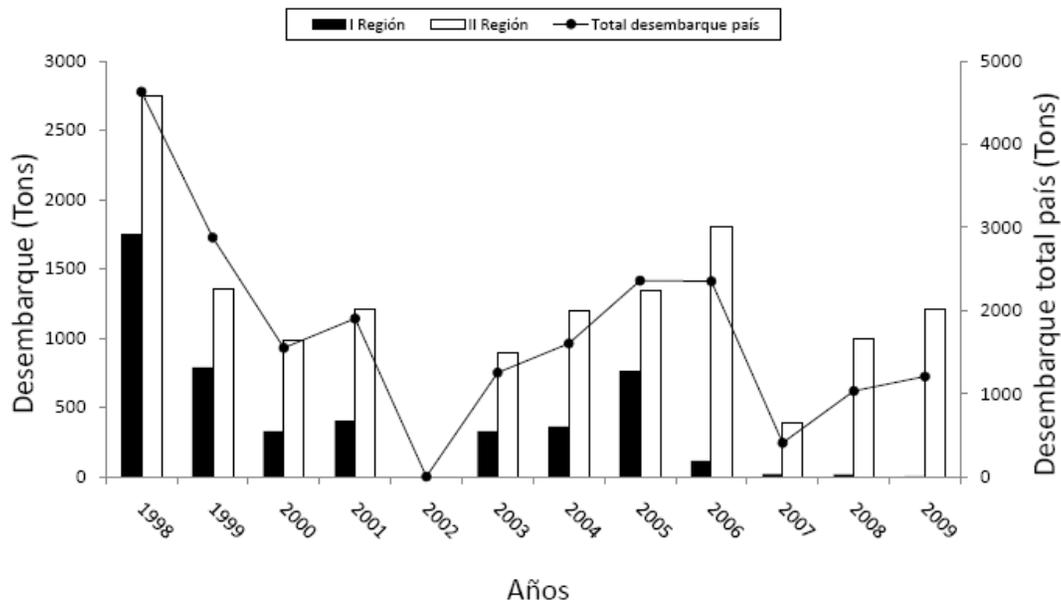


Figura 17: Desembarque nacional y de la I y II región del recurso pulpo *O. mimus* 1998 - 2009 proveniente de Áreas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos (AMERBs) (Fuente: Sernapesca 2010).

Las medidas de regulación enfocadas a la protección del recurso pulpo, determinan un peso mínimo de captura de 1 kg, una veda reproductiva entre el 15 de noviembre y el 15 de marzo de cada año (D.S. MINECOM N° 137 de 1985), y el cierre del registro artesanal de la I a III regiones en todas sus categorías (Res N° 316/95).

Antecedentes genéticos y Diversidad genética en *Octopus*: implicaciones en manejo de pesquerías

Recientemente, avances en el campo de la genética molecular han permitido dar un salto cualitativo en identificación genética de stock poblacionales (Gutierrez & Perez, 2005; An & Han 2006). Gracias al aumento progresivo de los marcadores de ADN, ha sido posible identificar stock principalmente de especies pelágicas como peces y crustáceos (Shakee et al., 1999; Smith et al., 2002). Sin embargo, estudios de genética poblacional en recursos bentónicos sólo han sido focalizados en moluscos bivalvos y gastrópodos (Sweijd et al., 2000; Zúñiga et al., 2000; Gallardo-Escárte et al., 2005; Gutierrez & Perez, 2005). En referencia a estudios genéticos en poblacionales demersales como los cefalópodos, éstos han sido escasamente

desarrollados excepto en el caso de calamares y jibias (Carvaloo et al., 1992; Brierly et al., 1993; Shaw et al., 1999). En pulpos los estudios han sido dirigidos al establecimiento de relaciones filogenéticas y con especial énfasis al género *Octopus* (De los Angeles et al., 1995; Bonnaud et al., 1997; Söller et al. 2000; Warnke et al., 2000). En este sentido, a pesar que *Octopus vulgaris* es una de las especies de cefalópodos más intensamente estudiadas, aun se encuentra en constantes revisiones taxonómicas.

En referencia a estudios poblaciones en *Octopus*, Faraj et al., (2007) mediante consideraciones espaciales de patrones de migración así como geoestadística, describe mediante el mapeo georeferenciado hembras maduras y juveniles en las fases de desove y reclutamiento de *O. vulgaris* sobre la costa Oeste de Marruecos. El autor reporta claras diferencias entre dichas fases. Los juveniles son mayormente costeros (profundidades <50m), menos dispersos espacialmente y más anisotrópicamente distribuidos. Mientras que ejemplares adultos (hembras maduras) migran hacia aguas profundas (>100 m) hasta antes del período de desove. De esta forma, el reclutamiento se realizaría principalmente en la región costera lo cual posee implicaciones de regulaciones pesqueras debido a que los ejemplares adultos serían más susceptibles a la flota industrial en comparación con la flota artesanal que sólo centraría su esfuerzo de captura sobre ejemplares adultos en períodos no reproductivos. Adicionalmente, lo anterior implicaría un mayor potencial de dispersión de paralarvas en fase pelágica (2 meses aprox.) (Balguerías et al., 2002). Factores temporales como presencia de surgencia y temperatura permitirían el reclutamiento local en áreas adyacentes a las zonas de desove reteniendo así parte de la biomasa (Balguerías et al., 2000). No obstante lo anterior, falta evidencia robusta que permita sustentar si el potencial de dispersión de *Octopus* permite una homogenización de las poblaciones adyacentes. Contrariamente, es probable que los patrones de migración observados en pulpos determinen algún grado de retención de la biomasa desovante dado que el reclutamiento se realiza principalmente en zonas costeras altamente influenciadas por un carácter temporal.

Hipótesis propuesta

Para especies marinas como *O. mimus* que vive en fase adulta asociado a grietas y roqueríos sin desplazarse grandes distancias, su flujo génico podría estar determinado principalmente por su modo de reproducción y la escala/ patrón en la cual sus larvas y/o juveniles pueden dispersarse. En el caso de *O. mimus*, hablamos de un especie con una larva planctotrofica de larva vida (ca 2 meses), que presume una capacidad de dispersión larval capaz de mantener poblaciones separadas geográficamente, con un alto grado de homogeneidad desde un punto de vista genético, bajo un modelo panmictico.

2.4 CARACTERISTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO

Dado que los organismos se ven fuertemente afectados por los cambios que se producen en su medio ambiente, especialmente aquellos que habitan en las zonas intermareales, como las especies objetivo de este estudio. A continuación se reúnen brevemente algunos antecedentes importantes de conocer y describir en cuanto a la geografía y oceanografía del área de estudio comprendida aproximadamente entre los 18 y 26°S, que correspondería al área norte del Sistema de la Corriente de Humboldt (SCH). Estos antecedentes y otros que serán recabados durante el transcurso del proyecto nos permitirán sustentar de mejor manera los resultados obtenidos.

En general el área norte del SCH presenta una costa predominantemente rectilínea, sin mayores indentaciones y alineada en sentido surnorte (Escribano & Hidalgo, 2001). La plataforma continental es estrecha y en algunos sectores virtualmente inexistente (< 10 km entre el límite norte y los 33,5°S) hacia el sur la plataforma continua ensanchándose levemente alcanzando aproximadamente los 70 km entre los 36°-42°S (Figueroa, 2002 *vide* Montecinos et al., 2004), más al sur la plataforma se angosta y se quiebra reapareciendo en forma extensa en el lado Argentino. Por lo cual la mayoría de la productividad biológica ocurre en una banda estrecha a lo largo de la costa, en particular en áreas de surgencia muy activa (Fonseca & Farías, 1987). Así la estrecha franja costera constituye una zona clave de producción biológica del SCH, reflejando el reconocido rol de los márgenes costeros en la productividad de los océanos (Walsh, 1991). En este margen continental la alta productividad biológica es promovida por la surgencia costera inducida por los vientos sur y suroeste (Alheit & Bernal, 1983). La surgencia fertiliza la zona eufótica promoviendo altos niveles de producción nueva (Barber & Smith, 1981). Es necesario hacer notar también que la zona costera es el lugar donde se concentra la explotación de recursos marinos, como es el caso de las especies objetivo de este estudio, junto a las actividades propias del uso industrial y urbano del litoral. De tal manera que es ineludible una comprensión cabal de los procesos físicos, químicos y biológicos para desarrollar apropiadas medidas de manejo y protección.

Las masas de aguas que se encuentran frente al norte y centro de Chile aproximadamente sobre los 500 m de profundidad, presentan importantes diferencias de temperatura y salinidad. Las principales masas de aguas frente a Chile se muestran en la figura 18.

El sistema de masas de aguas más predominante corresponde a la corriente de Humboldt que posee dos ramas que se dirigen hacia el norte transportando aguas de origen subantártico (frías y relativa baja salinidad), una costera y otra oceánica alcanzando una profundidad aproximada de sobre los 500 m (Pinet, 1998). En contraposición a este flujo hacia el norte existen dos corrientes, la primera la Contracorriente del Perú la que esta constituida por aguas de origen subtropical y que se sitúa entre las dos ramas de la corriente de Humboldt y el segundo flujo hacia el sur se denomina Contracorriente Costera de Chile, la que se presenta más claramente en la zona norte del país, como una corriente débil que afecta hasta los 150 m aproximadamente. Por debajo de la rama costera de la corriente de Humboldt, es posible detectar la influencia de la contracorriente Subsuperficial Perú-Chile, que se extiende desde la zona norte del Perú hasta alrededor de los 48°S, la que lleva aguas de origen Ecuatorial Subsuperficial caracterizadas por su bajo contenido de oxígeno disuelto.

Desde la zona norte ca. 18°S, que corresponde a nuestra zona de estudio, hasta aproximadamente los 30°S se pueden identificar cinco masas de agua: en la capa superficial se encuentra el agua Subtropical y agua Subantártica, en la capa subsuperficial se ubica el agua Ecuatorial Subsuperficial, bajo ella está el agua Intermedia Antártica y más abajo el agua Profunda del Pacífico. En la zona central del país se encuentran las mismas masas de agua que en la zona norte, con excepción del agua Subtropical que ocasionalmente alcanza estas latitudes. En la Tabla 8 se aprecian las distintas masas de agua descritas para Chile por Robles (1979) citado por Bernal et al., (1982).

Tabla 8: Detalle de masas de agua en Chile descritas por Robles (1979). Modificada de Bernal et al., (1982). En negrita y cursiva las masas de aguas presentes en la zona de estudio.

Area 1: 75°-90°W;18°-35°S				
Masas de agua	Profundidad (m)	Temperatura (°C)	Salinidad (‰)	Oxígeno (ml/l)
Subtropical superficial (AST)	<35	>18,5	>34,8	>5
Subantártica (ASA)	70-130	12,5-13,5	34,2-34,4	4,1-5,6
Ecuatorial subsuperficial (AEES)	320-370	8,5	34,4-34,5	0,9-2,2
Intermedia Antártica (AIA)	540-640	5,5-6,5	34,4	2,4-4,1
Area 2: Costa-75°W; 18°-28°S				
Subtropical superficial (AST)	<12	>18,5	>34,9	>5
Subantártica (ASA)	25-40	14,5	34,7-34,8	2,5-4,5
Arica-Mejillones	100-110	12,5	34,7-34,9	0,6-1
Ecuatorial subsuperficial (AEES)	330-370	9,5-10,5	34,6-34,8	0,3-0,6
Intermedia Antártica (AIA)	710-750	5,5	34,5	1,5-1,9
Area 3: Costa-75°W; 28°-39°S				
Fiordos	10-17	13,5-17,5	33,9-34,2	5,3-6
Subantártica (ASA)	20-50	11,5-13,5	34,1-34,2	4-5,7
Ecuatorial subsuperficial (AEES)	300-340	8,5	34,5-34,6	0,8-1,3
Intermedia Antártica (AIA)	560-600	5,5	34,3-34,4	3,8-4,1
Area 4: Costa-77°W; 39°-48°S				
Fiordos	0-40	11,5-13,5	32,7-33,4	5,5-6,6
O ² mínimo	152-210	8,5-9,5	34,1-34,4	2,0-3,0
Ecuatorial subsuperficial (AEES)	290-390	6,5-7,5	34,3-34,4	2,5-4,3
Intermedia Antártica (AIA)	500-530	5,5	34,3	5,0-5,2
Area 5: 76°-90°W; 35°-48°S				
Subantártica (ASA)	10-30	13,5-14,5	33,7-34	5,9-6,2
O ² mínimo	220-270	6,5-8,5	34,1-34,4	3,3-5
Intermedia Antártica (AIA)	450-470	5,5	34,3	5,5-5,8

Dado que las especies objetivos del presente proyecto y sus estadios de desarrollo habitan en aguas litorales más someras, es necesario caracterizar de buena manera el flujo de las corrientes superficiales del área norte y los fenómenos morfológicos y oceanográficos (e.g., corrientes costeras, surgencia, frentes termales, giros, incidencias de mareas, topografía,) que ahí suceden y que sin duda afectan la magnitud y dirección del flujo génico (conectividad) entre las áreas en estudio, y por ende el grado de estructuración que sus poblaciones presentan.

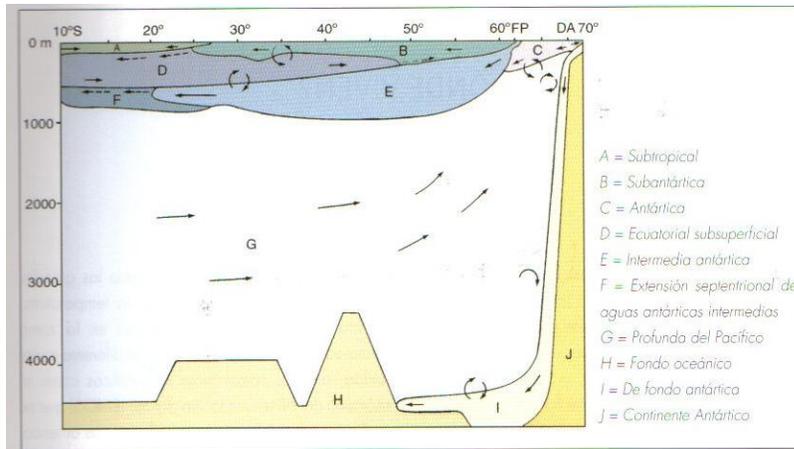


Figura 18: Principales masas de agua frente a Chile (Corte Vertical). (Extraído y Modificado desde Osorio, 2002).

En la figura 19 se ilustran la zona norte del SCH y la localización de las zonas de muestreo más particulares desde el punto de vista geográfico y otros, Bahía de Antofagasta y Bahía de Mejillos, así como las principales corrientes que interactúan en el norte de Chile en una gran escala espacial.

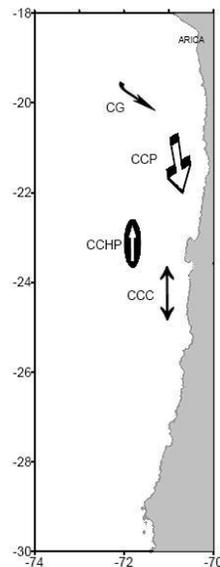


Figura 19: Área norte del Sistema de la Corriente de Humboldt, ilustrando la dinámica de gran escala de corrientes marinas. CG = Corriente subsuperficial de Gunther, CCP = Contracorriente Peruana, CCHP = Contra Corriente Chile – Perú, CCC = Corriente Chilena Costera (Extraído y modificado desde Escribano & Hidalgo, 2001).

3. OBJETIVO GENERAL

Determinar la estructura genética de los diferentes stocks de las principales pesquerías: erizo, locate, pulpo, loco, presentes en el norte grande (I y II regiones), detectando las áreas y fuentes de sumidero de estos recursos.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

El desarrollo de los objetivos específicos se presenta a continuación de acuerdo a su orden lógico en el tiempo.

4.2 Establecer los loci microsatélites polimórficos para cada una de las especies.

4.3 Determinar los parámetros genéticos poblacionales de cada uno de los loci microsatélites en las diferentes especies y poblaciones de la I-II regiones.

4.1 Determinar la diversidad genética y el flujo génico entre stocks efectivos para cada uno de los recursos en estudio.

5. METODOLOGIA DE TRABAJO

5.1 CONSIDERACIONES SOBRE EL TAMAÑO, ÁREA Y PERÍODO DE MUESTREO

Para efecto de coordinar acciones tendientes a desarrollar de la mejor manera las actividades para el cumplimiento del objetivo general y objetivos específicos, se contempló el desarrollo de reuniones de trabajo y de coordinación del equipo técnico comprometido en la presente propuesta, de tal manera de discutir la metodología y afinar su aplicación práctica, para posteriormente presentar el desarrollo de las actividades y justificar el desarrollo metodológico ante los equipos técnicos del Fondo de Investigación Pesquera y Subsecretaría de Pesca. En forma paralela, se realizaron las gestiones y trámites correspondientes para obtener permiso de investigación para estos recursos en los períodos en que se encuentran en veda, con la finalidad de no infringir las normativas vigentes y a la vez cautelar la toma de muestra de ejemplares y la información necesaria para dar cumplimiento al objetivo general del proyecto.

Elección de lugares de muestreos:

En la elección de los sitios de muestreos, se utilizó la información disponible de la actividad de las Areas de Manejo y Explotación de Recursos Bentónicos (AMERB) de las I y II Regiones, que dispone el Servicio Nacional de Pesca y Subsecretaría de Pesca, utilizando como criterios de decisión, que dentro de sus Planes de Manejo y Explotación del Área (PMEA) estuvieran las especies objetivos del estudio como recursos principales, el funcionamiento de las AMERBS y su persistencia en el tiempo. Aspectos logísticos que facilitasen la obtención de las muestras, su muestreo en terreno y traslado hacia las dependencias indicadas.

Tomando en consideración los resultados esperados, en la presente propuesta se tomaran como sitios de muestreos 5 localidades (Tabla 9); Clavelito (I Región, Arica); Pisagua (I Región, Iquique); Punta Arenas (II Región, Tocopilla); Punta Campamento (II Región, Mejillones) y Punta Sur Taltal (II Región, Cifuncho).

En cada unos de los lugares se contactó con los sindicatos por el objetivo de solicitar su colaboración y experiencia en estas pesquerías.

Tabla 9: Situación de áreas de manejo presentes entre la I y II Región de Chile (Fuente Subpesca y Sernapesca).

Región	Nombre	Hás	N° socios	Ha/Socio	Situación
I	Arica	2.817,5	185	15,23	Renunciado
	Clavelito	52,6	74	0,71	Esba
	Camarones	44,6	26	1,72	Plazo vencido
	Pisagua	155,4	51	3,05	5° Seguimiento
	Pta Colorada	491,0	46	10,67	1° Seguimiento
	Pta Piedra	237,5	50	4,75	1° Seguimiento
	Los Toyos	113,6	25	4,54	2° Seguimiento
	Caramucho A	48,9	41	1,19	6° Seguimiento
	Caramucho B	8,3	41	0,20	3° Seguimiento
	Chanavayita	256,3	46	5,57	7° Seguimiento
	Chanavaya	202,4	25	8,10	7° Seguimiento
	Río Seco A	23,9	24	0,99	Plazo vencido
	Río Seco B	124,4	24	5,18	4° Seguimiento
	San Marcos A	11,3	72	0,16	2° Seguimiento
	San Marcos B	61,8	72	0,86	5° Seguimiento
	Chipana A	396,9	32	12,40	3° Seguimiento
	Chipana B	53,5	32	1,67	1° Seguimiento
	Pabellón de Pica A	99,0	25	3,96	Esba
	Pabellón de Pica B	65,0	41	1,59	Esba
Pabellón de Pica C	50,0	24	2,08	Esba	
II	Punta Arenas B	276,0	20	13,80	7° Seguimiento
	Urco	148,4	32	4,64	2° Seguimiento
	Los Andariveles	98	49	2,00	Esba
	Mal Paso	360	36	10,00	En Desafección
	Punta Blanca	81,9	160	0,51	En Desafección
	Punta Atala	131,5	18	7,31	En Desafección
	Cobija A	44,7	27	1,66	2° Seguimiento
	Hornos A	33,2	36	0,92	En Desafección
	Mejillones A	114,8	96	1,20	Plazo vencido
	Punta Campamento	263,9	68	3,88	2° Seguimiento
	El Lagarto	360	54	6,67	5° Seguimiento
	Colo-Colo	88,9	36	2,47	1° Seguimiento
	Coloso A	9	102	0,09	2° Seguimiento
	Coloso B	3	102	0,03	2° Seguimiento
	Coloso C	6	102	0,06	2° Seguimiento
	Punta Sur Taltal	57,4	62	0,93	1° Seguimiento
	Las Guaneras	18,4	43	0,43	Renunciado
La Piedra del Sombrero	68,6	23	2,98	1° Seguimiento	
Caleta de Afuera	120	37	3,24	1° Seguimiento	

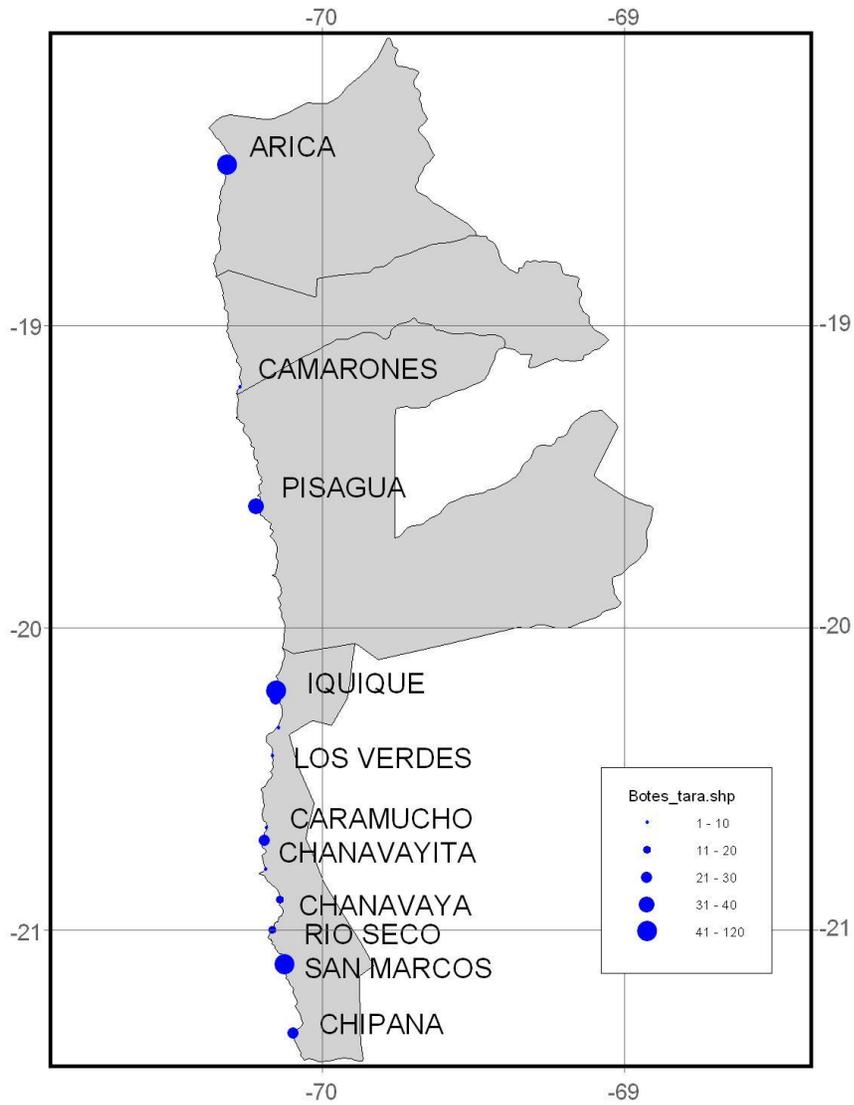


Figura 20: Ubicación geográfica de las AMERBs_s I y I región de Chile.

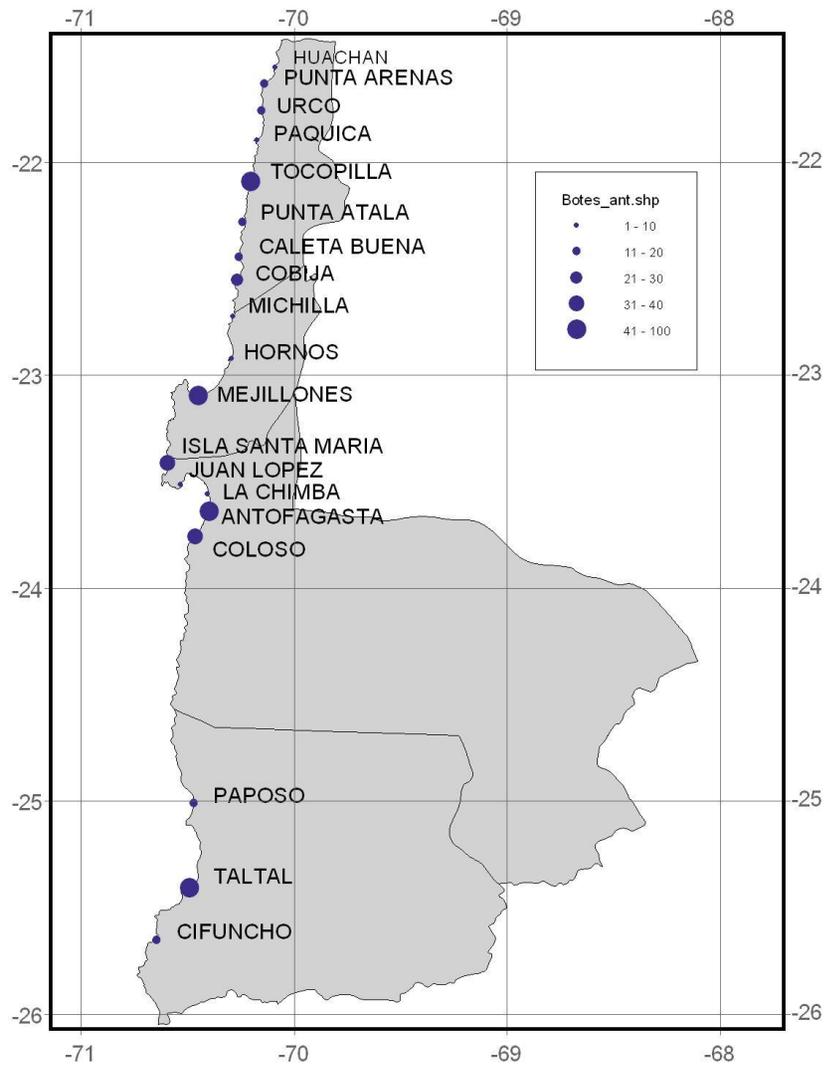


Figura 21: Ubicación geográfica de las AMERBs, II región de Chile.

Tamaño de la muestra

Un punto crítico a considerar en el diseño de muestreo es el número de loci e individuos que se deben muestrear para obtener importante información.

En el caso de marcadores moleculares tipo microsatélites, consideraciones teóricas (Pamilo & Nei, 1988; Weir, 1990), establecen que la resolución y calidad de los datos es mejorada si un gran número de loci son examinados; esto es particularmente cierto si los loci examinados exhiben moderados niveles de diversidad alélica. Así el número de individuos a ser muestreados dependen principalmente del número de alelos presentes en cada locus examinado. Cuando la diversidad alélica es baja, pocos individuos son necesarios en el análisis. Sin embargo, en el caso de loci hipervariables, un gran tamaño muestral es necesario para determinar frecuencias alélicas con confianza estadística. Por ejemplo, con un promedio de 25 alelos por población, simulaciones sugieren que aproximadamente 115 individuos deben ser analizados de cada población (Kornfield & Parker, 1997).

La relación empírica derivada de estas simulaciones establece que el tamaño muestral para análisis de microsatélites en poblaciones es:

$$\text{Tamaño Muestral} = 1.5 (\text{Número de alelos})^{1.35}$$

En base a estas estimaciones empíricas, y a la información disponible para una de las especies en estudio (ver Cardenas et al., 2007), se comprometió el análisis de 5 loci microsatélites sobre 100 individuos por recurso y localidad, con un total de 2000 ejemplares para el total del estudio (Tabla 10).

Tabla 10: Muestras comprometidas por localidad y recurso, Proyecto FIP2008-39.

RECURSO	Clavelito (Arica)	Pisagua (Iquique)	Punta Arenas	Punta Campamento	Pta Sur Taltal	Total
PULPO	100	100	100	100	100	500
LOCO	100	100	100	100	100	500
ERIZO	100	100	100	100	100	500
LOCATE	100	100	100	100	100	500
Total	400	400	400	400	400	2000

Época de muestreos

En la recolección de las muestras se consideró una cobertura espacial más que temporal pensando en este proyecto como una Fase I, igualmente se cauteló tomar las muestras en fechas en que no se encuentren en veda los recursos y en lo posible hacer coincidir los muestreos con las fechas de cosecha contemplado en cada uno de los planes de manejo aprobado para las AMERBs. Sin embargo igual se contempló solicitar permiso de investigación en caso que los muestreos coincidan con los períodos de vedas como lo muestra la figura 22.

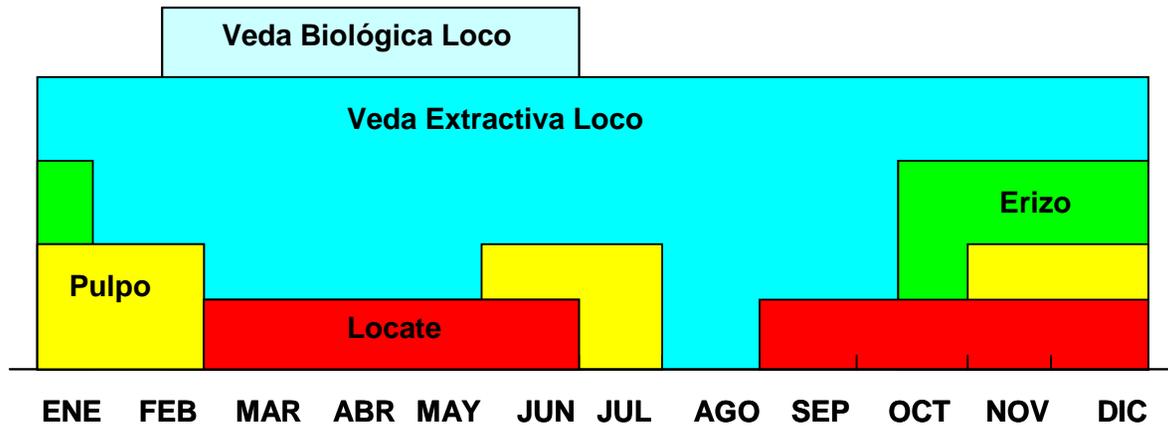


Figura 22: Periodos de veda biológica vigentes para las especies en estudio, Proyecto FIP2008-39.

Obtención de las muestras

Se realizaron muestreos al azar para obtener 100 ejemplares de cada especie en las localidades seleccionadas, mediante buceo semi-autónomo (hooka) con cobertura espacial procedentes de cada zona (Clavelito; Pisagua; Punta Arenas; Punta Campamento y Punta Sur Taltal). Se registraron mediciones biológicas y biométricas de acuerdo a los procedimientos estándar.

5.2 GUÍA E INSTRUCCIONES DE MUESTREO EN CAMPO

El proceso de obtención de muestras de cada una de las especies en estudio estuvo a cargo de organizaciones e instituciones que realizan muestreos rutinarios del recurso y que fueron contactados una vez iniciado el proyecto a través de reuniones informativas con las federaciones y sindicatos a cargo de las áreas de manejo indicadas en el punto “Tamaño, Área y Período de Muestreo” Tabla 10.

El muestreo en campo fue realizado por personal previamente entrenado para el efecto. El personal fue capacitado por profesionales participantes del proyecto bajo las siguientes guías generales.

El objetivo de registrar datos biológicos de cada ejemplar, es obtener información que nos permita mejorar nuestros resultados, y entregar información para los Estudios de Base de las áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos (ESBA).

Protocolo de muestreo de tejido para análisis de ADN

Se disectó de cada ejemplar un trozo de tejido de 1x1x1 cm. Tejido del manto para el Loco y Locate, gónada para el Erizo y tejido de los tentáculos en el Pulpo del Norte.

El tejido disectado fue depositado en un tubo de transporte de 5 ml con Alcohol Etílico Puro (96%) para análisis. Para asegurarse que todo el tejido se conserve por efecto del etanol, el tejido se secciona en pequeños trozos.

Para la disección del tejido se utilizó un bisturí nuevo y/o estéril para cada animal, esto evita la contaminación cruzada entre individuos que puede llevar a errores en los resultados.

6. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4.2; ESTABLECER LOCI MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES.

6.1 PROPUESTA METODOLÓGICA

Antes de comenzar con el desarrollo, y estandarización de loci microsatélites polimórficos, es necesario contar con ADN genómico en cantidad y calidad suficiente para realizar análisis posteriores.

Para este fin se probaron varios protocolos de extracción de ADN genómico; Fenol Cloroformo (Grijalva-Chon et al., 1994), Sales (<http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>) y kits (Blood & Cell Culture DNA Mini Kit, Qiagen).

6.2 OBTENCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES

Como se presentó en los antecedentes genéticos de cada una de las especies objetivo, sólo se dispone de marcadores microsatélites especie – específicos para *C. concholepas* (Cardenas et al., 2007), y de partidores heterólogos para *O. mimus* (Doubleday et al., 2009; Greatorex et al., 2000). En el caso de partidores heterólogos de *T. chocolata*, de los desarrollados para *Nucella lapillos* (Hawai et al., 2001), sólo un microsatélite genera buenos resultados en *T. clavigera* y *T. bronni*. *L. albus* no cuenta con microsatélites específicos, ni heterólogos aplicables a la especie.

Por lo expuesto anteriormente se propuso los siguientes pasos para obtener loci microsatélites polimórficos para cada una de las especies:

- a) Para *C. concholepas* se utilizarán los microsatélites desarrollados por Cárdenas et al., (2007).
- b) Para *O. mimus* se probarán los microsatélites desarrollados por Greatorex et al., (2000) y Doubleday et al., (2009). De no obtener resultados positivos se procederá a desarrollar una librería genómica especie – específica.
- c) Para *T. chocolata* se desarrollará una librería genómica para la obtención de marcadores microsatélites especie – específicos.
- d) Para *L. albus* se desarrollará una librería genómica para la obtención de marcadores microsatélites especie – específicos.

Las actividades de desarrollo de las librerías genómicas enriquecidas con motivos microsatélites en *T. chocolata*, *O. mimus* y *L. albus* se realizáron en el laboratorio Genetic Identification Services, California, USA (<http://www.genetic-id-services.com/library.htm>) en conjunto con el Laboratorio de Genética & Acuicultura (<http://www2.udec.cl/~acuigen>), y el Laboratorio de Genética y Biotecnología Acuícola (<http://www2.udec.cl/~lgba/index.html>), de la Universidad de Concepción. Las actividades de extracción de ADN, estandarización, ensayo y genotipificación de microsatélites en *C. concholepas* se realizaron en el Laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de Los Lagos.

a) Obtención de marcadores microsatélites en *C. CONCHOLEPAS*

Luego de la obtención del ADN genómico de buena calidad y libre de contaminantes se realizará la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de 5 loci microsatélites (Tabla 11) ya desarrollados, estandarizados y protocolizados en *C. concholepas*. La elección de los 5 loci microsatélites para la realización del estudio se basará en aquellos que presenten los mejores resultados en la genotipificación y el número de alelos por locus. No se recomienda descartar a priori ninguno de los microsatélites disponibles para la especie, pues regiones microsatélites pueden ser población específico y deben ser evaluados antes de su elección.

Tabla 11. Características de loci microsatélites disponibles en *C. concholepas*. Extraído desde Cárdenas et al., 2007.

Locus	Repeat array	Primer sequences (5'-3')	Allele size range (bp)	N _{Tail}
Cc1A2	(GT) ₅ (TG) ₈	F: GTGTTCTTGCTTGAGCTGGTGTGC R: CGCTTCTGAAAAACACATGCTCTCCTC	132-149	12
Cc2A11-1	(GT) ₁₃	F: CCACTTGGTTTCAGGATGGTCAC R: CATTGTTTTTGGTGTGTGGGAA	127-149	12
Cc2A5	(TGTGTC) ₂ (TG) ₆	F: GCACCAGCGAAAACAAGTCCC R: CTGTGCTGATGGGAGCCTTG	262-286	12
Cc1B6	(CA) ₁₃	F: AGGACATTGTAAGAGTAACGGTGGC R: ACCAAGTGGTGGTGAATTTCTGTTG	187-238	18
Cc2F5	(GAAT) ₂ N ₃ (TGAA) ₃ N ₁₀ (TGAA) ₃ N ₄ (AAGG) ₈ N ₁ (AAGG) ₂	F: TTGGCGAAGACACTAAAAATAATG R: TAGCCAGGACATGTTTGTGATG	215-333	18
Cc1E5	(TG) ₇ N ₃ (TG) ₈ N ₁ (TG) ₁₀	F: TCATCTGTTTGTTCATTTC R: GCTGTCCCCTTATTTCATTGTTC	299-347	21
Cc1D8	(CA) ₃ N ₁ (CA) ₂ N ₄ (CA) ₂₇ N(CA) ₅	F: GTAGATATGCAGTGAATGCAGTAG R: ACACCTTATGCCAATATCAGTAATG	209-266	27
Cc2A11-2	(TC) ₂₉ (TG) ₃ N ₁ (TC) ₂ N ₁ (TC) ₄	F: AACTCACCTCATTTCTACTAAAC R: AAGCGGTGGTCCCTATAACTGGC	228-315	34
Cc2B5	(CA) ₈ N ₁ (CA) ₂ (GA) ₁₀ N ₁ (GA) ₂ N ₁ (GA) ₂₅	F: GATGGTCCAGTCCACATGAATG R: GCCCCTCACTGTCTGTGTTC	194-348	48
Cc1H2	(CTA) ₂₉ N ₁ (ACC) ₂ (CTA) ₃ N ₁ (CTA) ₃ N ₂₀ (CTA) ₁₆	F: GCGAAGAAGAAATGACGACTAC R: ACTTCAAGATTAGAAACACCAATAC	268-361	48
Cc1H1	(TGTG) ₈ N ₁ (TGTG) ₃ N ₂ (TGTG) ₃	F: TCTGACAGAAACCAATGCTGAG R: CAACGCCGATAACAGCAGAATGG	280-395	51

Las reacciones PCRs para cada uno de los microsatélites elegidos constará básicamente de un volumen de amplificación de 10 µl; conteniendo 20ng de ADN templado, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 µM primer forward y 0.2µM primer reverse, marcando el primer forward con un fluoróforo adecuado (e.g. TET, 6-FAM, HEX, NED, VIC, PET) en su extremo 5', lo que permite su detección automática en el secuenciador, 200µM dNTPs. El programa de amplificación seguirá el protocolo desarrollado por Cardenas et al., (2007), en un termociclador Termociclador PxE Thermo Cycler. Modificaciones a las condiciones de reacción y amplificación pueden ser aplicadas en pro de obtener mejores resultados. En todos los ensayos se utilizarán controles negativos, con el fin de detectar contaminación.

Del producto amplificado por PCR (alelos de los microsatélites) 2ul serán mezclados con 10ul de formamida (variaciones en el volumen de carga serán experimentados hasta obtener los más óptimos resultados), y 0.2ul del estándar de peso o tamaño en pares de bases LIZ o ROX, dependiendo del filtro a utilizar en el secuenciador. Posteriormente la mezcla será denaturada incubando a 95°C por 2 minutos y cargada en el secuenciador ABI 3730 de Applied Biosystems. La carga de las muestras se llevara a cabo en capilares de 36 o 50 cm sobre el polímero POP4 o POP7, con 10 segundos como tiempo de inyección, voltaje de 12V y con un tiempo de corrida de 45 minutos. Variaciones en las condiciones de corrida pueden variar en pro de la optimización de los resultados.

Para el análisis de los fragmentos y determinación de los genotipos microsatélites obtenidos se utilizara el programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems), o un equivalente como GeneScan, Genotyper v3.7, PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems).

b) Obtención de marcadores microsatélites en *O. MIMUS*

Luego de la obtención del ADN genómico de buena calidad y libre de contaminantes se realizará la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de 5 loci microsatélites desarrollados, estandarizados y protocolizados para *O. vulgaris* en *O. mimus* (Tabla 12). La elección de los 5 loci microsatélites para la realización del estudio se basara en aquellos que presenten los mejores resultados en la genotipificación y el número de alelos por locus. No se recomienda descartar a priori ninguno de los microsatélites (heterólogos) disponibles para la especie, pues regiones microsatélites pueden ser población específico y deben ser evaluados antes de su elección.

Tabla 12: Microsatélites desarrollados para *O. vulgaris* (Extraído desde Greatorex et al., 2000).

Locus *	Repeat unit	Tm (°C)	Mg ²⁺ (Mm)	Product size	No. of alleles	Primer sequences (5'-3')
μOct3	(AT) ₁₆ (GT) ₁₅	55	2.5	147	12	F: CTCCTAGTTTTGAATCACG R: GCCACTAATACACTTTTCAAGG
μOct8	(TG) ₃₆	56	2.5	160	11	F: AGGGAGAGAAAATAGAAAAC R: TAAACTGAATAATACATACATACG
μOv04	(TTA) ²²	44	2.5	126	14	F: ATACCAGGCCTTGTGCCTTTAG R: CAGCACCGTAATACATCTTCAG
μOv06	(ATT) ²⁴	45	2.5	146	17	F: GGGCCTTATTCCTTAAGCAG R: CCATTTGCATTTGAATATTTTAAAG
μOv10	(GA) ¹⁴	52	2.5	122	12	F: GCAATAAAGGAGAAAACAAAAACA R: GCTATTGTCAATAAAGGCTCTCC
μOv12	(GATA) ²⁰	53	2.5	176	18	F: GCATAATGTCCGCTAAATGGAAC R: GCCTCGTCGGTATTTCTCTTCA

Las reacciones PCRs para cada uno de los microsatélites elegidos constará básicamente de un volumen de amplificación de 10 μl; conteniendo 20ng de ADN templado, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 μM primer forward y 0.2μM primer reverse, marcando el primer forward con un fluoróforo adecuado (e.g. TET, 6-FAM, HEX, NED, VIC, PET) en su extremo 5', lo que permite su detección automática en el secuenciador, 200μM dNTPs. El programa de amplificación seguirá el protocolo desarrollado por Greatorex et al., (2000), en un termociclador Termociclador PxE Thermo Cycler. Modificaciones a las condiciones de reacción y amplificación pueden ser aplicadas en pro de obtener mejores resultados. En todos los ensayos se utilizarán controles negativos, con el fin de detectar contaminación.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Del producto amplificado por PCR (alelos de los microsatélites) 2 μ l serán mezclados con 10 μ l de formamida (variaciones en el volumen de carga serán experimentados hasta obtener los más óptimos resultados), y 0.2 μ l del estándar de peso o tamaño en pares de bases LIZ o ROX, dependiendo del filtro a utilizar en el secuenciador. Posteriormente la mezcla será denaturada incubando a 95°C por 2 minutos y cargada en el secuenciador ABI 3730 de Applied Biosystems. La carga de las muestras se llevara a cabo en capilares de 36 o 50 cm sobre el polímero POP4 o POP7, con 10 segundos como tiempo de inyección, voltaje de 12V y con un tiempo de corrida de 45 minutos. Variaciones en las condiciones de corrida pueden variar en pro de la optimización de los resultados.

Para el análisis de los fragmentos y determinación de los genotipos microsatélites obtenidos se utilizara el programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems), o un equivalente como GeneScan, Genotyper v3.7, PeakScanner v1.0 (Applied Biosystems).

Si los resultados obtenidos para *O. mimus* con partidores de *O. vulgaris* no son adecuados, se procederá al desarrollo de una librería enriquecida para motivo microsatélites específica de *O. mimus* al igual que para *T. chocolata* y *L. albus*.

c y d) Construcción de una librería genómica enriquecida con motivos microsatélites en *THAIS CHOCOLATA* Y *LOXECHINUS ALBUS*

Debido a la importancia de contar con marcadores microsatélites especie - específicos para las especies del presente estudio que no cuentan con ellos (*Loxechibus albus*) o cuentan con partidores heterólogos de mala calidad (*Thais chocolata*), como parte de este proyecto se propone desarrollar librerías genómicas enriquecidas para motivos microsatélites y la posterior obtención de primers útiles en el análisis genético poblacional.

La metodología propuesta a continuación, es aplicable en ambas especies, existiendo diferencias sólo en los motivos microsatélites (sondas) que se puedan rastrear.

La librería genómica de ambas especies se construirá a partir del ADN genómico extraído con el protocolo elegido, desde ejemplares provenientes de varias zonas de estudio y de ambos sexos para generar un pool de ADN de aproximadamente 20 ejemplares, de esta forma se espera capturar la mayor variabilidad posible de cada especie.

La librería genómica será construida siguiendo el protocolo de FIASCO (Fast Isolation by AFLP of Sequences Containing Repeats) (Zane et al., 2002).

En el caso de la librería de *T. chocolata*, esta será enriquecida para motivos de repetición utilizados en otros moluscos muricidos como en el loco donde se utilizaron las sondas AC y TGTA (Cardenas et al., 2007), motivos que concuerdan con los amplificados positivamente para *T. clavigera* GT y *T. bronni* GT y CA (Hawai et al., 2001). Al momento de construir la librería se llevará a cabo un análisis más exhaustivo de con que motivos se enriquecerá en pro de los mejores resultados.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

En el caso de la librería para *L. albus*, la librería será enriquecida para motivos de repetición utilizados en otros equinodermos con resultados exitosos como GA, CA, AAT, AAAT, GACA, GATA, CATA (Chenuil et al., 2003), y CATC, TAGA (Carlon et al., 2007). Al momento de construir la librería se llevará a cabo un análisis más exhaustivo de con que motivos se enriquecerá en pro de los mejores resultados.

Para evitar el problema en la genotipificación de la presencia de bandas fantasmas (stutter) común en microsatélites con motivos di-nucleótidos, se trabajara de preferencia con motivos trí - nucleótidos y tetra – nucleótidos.

El pool de ADN generado será digerido con una batería de enzimas de restricción y luego enriquecido con sondas marcadas con biotina correspondientes a los motivos de repetición que se indican anteriormente. Los productos enriquecidos serán ligados dentro del sitio de restricción Hind III del vector pUC19 y electroporados en las células competentes de *Escherichia coli* DH5 α . Los clones positivos serán detectados siguiendo el protocolo descrito en Estoup & Turgeon (1996) (detalles del protocolo disponibles en <http://www.inapg.inra.fr/dsa/microsat/microsat.htm>). Los clones recombinantes serán traspasadas a placas de microtitulación para el rastreo de los insertos que contengan los motivos microsatélites de las sondas biotinizadas. Los clones positivos serán guardados en placas con glicerol -80°C. Posteriormente se realizará una PCR de cada clon positivo para seleccionar aquellos insertos de un tamaño adecuado para un bloque microsatélite (200 a 700 pb) y para las reacciones PCRs posteriores. Para verificar si los clones con insertos de tamaños adecuados afectivamente contienen las secuencias microsatélites de las sondas utilizadas se realizará una hibridación southern para rastrearlas.

Los clones con fragmentos de 300 a 700 pares de bases serán seleccionados para su secuenciación en un equipo automático ABI3730, utilizando los partidores universales M13/pUC.

6.3 AMPLIFICACIÓN Y VISUALIZACIÓN DE LOCI MICROSATÉLITES

Los primers para la amplificación por PCR de los marcadores microsatélites desarrollados, corresponden a las zonas flanqueantes de los bloques microsatélites rastreados con las sondas biotinizadas que presentan además una longitud adecuada (10 a 20 pb, además de cumplir con otros requisitos). Estos primers que serán diseñados con los programas Primer3 (Rozen & Skaletsky, 2000) ó Netprimer® (PREMIER Biosoft Internacional, CA). La especificidad de los microsatélites puede ser confirmada a través de ensayos PCRs (ausencia de productos de PCR) desde extractos de ADN de otras especies de *Loxechinus* y *Thais*.

Una vez obtenidos los primers de los potenciales marcadores microsatélites desarrollados para ambas especies, se procederá a estandarizar las condiciones de PCR y lectura de fragmentos (alelos) sobre un grupo de muestras, para así determinar la maleabilidad de los mismos se determinara la reproducibilidad, consistencia, rango de tamaño de los alelos, presencia/frecuencia de bandas “stutter” y polimorfismo de cada microsatélite.

Una vez determinados los loci microsatélites adecuados para los fines del estudio, se procederá a aplicarlos sobre la totalidad de las muestras comprometidas para ambas especies.

7. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4.1 y 4.3.

Determinar los parámetros genéticos poblacionales de cada uno de los loci microsatélites en las diferentes especies y poblaciones de la I-II regiones 4.3.

Determinar la diversidad genética y el flujo génico entre stocks efectivos para cada uno de los recursos en estudio 4.1.

Una vez identificados los genotipos de cada individuo y especie en estudio, se procederá a realizar el análisis estadístico de los datos. Con este fin los genotipos de los loci microsatélites analizados serán adecuadamente codificados. El análisis estadístico que a continuación se propone, es transversal para las cuatro especies en estudio.

7.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS LOCI MICROSATÉLITES

Unidades poblacionales o stocks en base a métodos bayesianos

Si bien en la propuesta original se había considerado usar métodos bayesianos basados en árboles filogenéticos para la evaluación de estructuración poblacional, estos métodos propuestos en la metodología original sólo consideraban la incertidumbre de la reconstrucción basado en la información genética, sin considerar implícitamente la información geográfica en la estimación de potenciales unidades poblacional. En base a esto último, y para sustentar de manera robusta los resultados de este informe, los métodos propuestos en la metodología original (*e.g.* BMCMC usando el programa BayesPhylogenies, árbol de consenso de red según en el programa SplitsTree-4) fueron reemplazados por una aproximación que permite estimar la probabilidad de estructuras poblacionales a nivel geográfico usando una aproximación bayesiana que considera tanto la información genética, como la posición geográfica de las muestras, la cual esta implementada en el programa *Geneland* 3.1.5 (Guillot *et al.*, 2005a, 2005b, 2008, 2009; Guillot, 2008; Guillot & Foll, 2009). Una de las características más relevantes en la elección de este método es su capacidad de distinguir el número de poblaciones, en conjunto con los límites geográficos de estas y la incertidumbre de la asignación de los individuos a estos clúster geográficos (Guillot *et al.*, 2005a).

El análisis en *Geneland* comprende tres pasos:

(1) ejecutar el programa para inferir el valor número de poblaciones (K) usando un modelo de frecuencias alélicas correlacionado y luego uno no-correlacionado, durante 1 millón de generaciones, muestreando cada 1000 parámetros, y permitiendo variar los valores de K entre 1 y 6;

(2) Comparar el ajuste de los dos modelos y seleccionar el modelo con mayor probabilidad *a posteriori* usando una prueba de Factor de Bayes (*i.e.* FB) (Gelman *et al.*, 1995; Drummond & Rambaut, 2007) usando el método descrito por Newton & Raftery (1994) con las modificaciones de Suchard *et al.* (2001) en el programa Tracer 1.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>). El FB usado está definido por los likelihoods marginales de los modelos ($\text{pr}(D/M)$) contrastados según la siguiente fórmula:

$$B_{10} = \text{pr}(D|M_1)/\text{pr}(D|M_0)$$

En donde B_{10} define el logaritmo base 10 de FB que nos permite evaluar que modelo (M) da cuenta de una mayor proporción de la probabilidad total de los datos. Para interpretar los valores de B_{10} se usó la clasificación de Raftery (1996: 165), según el cual valores entre 3 a 20 muestran evidencia positiva para el modelo 1, y mayores de 20 una fuerte evidencia.

(3) Volver a ejecutar el programa usando esta vez el modelo seleccionado y el número de K con el valor de convergencia de este modelo. Esta corrida final del programa se realizó por 10 millones de generaciones muestreando cada mil parámetros, para estimar *a posteriori* la probabilidad de asignación de individuos a grupos geográficos basados en su georeferenciación y el genotipo de los individuos.

Análisis de Diversidad Genética y Diferenciación Genética Poblacional

Todos los análisis para las especies y sus respectivos loci microsatélites fueron realizados sobre los cluster geográficos determinados en el programa *Geneland*.

Número mínimo de muestras y errores de genotipado

Dado que el número de alelos en una muestra es altamente dependiente del tamaño de la muestra, se estimó la riqueza alélica mediante un análisis de rarefacción, el cual estima el número de muestras representativas para cuantificar la riqueza alélica de las muestras. Este análisis se realizó en el software FSTAT (Goudet, 2001).

La presencia de errores en el genotipado de los loci microsatélites (large alleles dropout y stutter band) fueron estimados en el set de datos para cada cluster identificado en cada una de las especies. Además se estimó la presencia y frecuencia de estos alelos nulos en cada clúster y loci. La frecuencia de alelos nulos se estimó utilizando el algoritmo de Brookfield 1 (Brookfield, 1996), implementado en el programa Microchecker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004).

El número de alelos (N_a), heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e), índice de fijación (F), fueron calculados para todos los loci microsatélites en el programa GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006). Desviaciones al equilibrio de Hardy & Weinberg (H&W) se estimó utilizando el test exacto implementado en el programa ARLEQUIN v.3.10 (Excoffier *et al.* 2005). Desequilibrio por ligamiento entre pares de loci fueron calculados en GENEPOP 3.5 (Raymond & Rousset 1995) usando los parámetros por defecto. Los niveles de diferenciación genética entre poblaciones (cluster geográficos estimados en GENELAND) fueron estimados mediante F_{st} y R_{st} por pares (F_{st} basado en las frecuencias alélicas y R_{st} en diferencias en tamaños alélicos) y un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA), fueron realizados en ARLEQUIN v.3.10 (Excoffier *et al.* 2005). El AMOVA fue realizado con la finalidad de obtener la variación entre clúster (F_{st} y R_{st}) y dentro de clúster. Complementariamente se estimó el índice F_{st} y R_{st} por locus, para así determinar cual de los loci presentan estas

diferencias significativas. El valor de probabilidad en cada análisis para el F_{st} y R_{st} fue estimado mediante 10000 permutaciones.

Migraciones y tamaño poblacional efectivo en base a métodos bayesianos

Considerando que las estimaciones tradicionales de los parámetros poblacionales genéticos (i.e. tasa de migración, dirección de migración y tamaño poblacional efectivo) presentan un grado de incertidumbre en general no evaluado (e.g. Hey & Nielsen, 2007), calculamos estos parámetros a través de una estimación que toma en cuenta la incertidumbre de los genotipos así como de las genealogías (Kuhner & Felsenstein, 2000). Para esto utilizamos una reciente implementación de aproximaciones Bayesianas en el programa MIGRATE-N (v.2.4.2) (Beerli, 2006). El programa MIGRATE-N (v.2.4.2) utiliza teoría de coalescencia e implementa análisis basados en aproximación Bayesiana para estimar parámetros poblacionales genéticos, tales como la probabilidad a posteriori de las tasas de migración (M), dirección de la migración (\leftrightarrow) entre localidades, estimadores del tamaño efectivo poblacional ($\Theta = 2N \mu$) y la ubicación del ancestro común más reciente. Los parámetros estimados por estos métodos se usaron para proponer un escenario poblacional basado en la probabilidad o distribución de densidad a posteriori de los parámetros (e.g. Hey & Nielsen, 2007), como una evaluación de la incertidumbre de las hipótesis de conectividad y migración de genotipos (individuos) entre las localidades de estudio entre la I y II región de Chile. En este análisis tanto el valor de K como la asignación de individuos a las poblaciones para implementar el programa fueron los estimados en la aproximación de Geneland. El análisis en MIGRATE-N se realizó en base a un modelo bayesiano y muestreo de los parámetros por Slice sampling, corriendo 10 millones de Cadenas de Markov que fueron muestreadas cada 1000 parámetros, excluyendo todos los parámetros estimados previo a las 100.000 cadenas o antes de la zona de convergencia.

Detecciones de Cuellos de Botella recientes

Reducciones recientes de tamaño efectivo poblacional (N_e) para cada locus en cada uno de los cluster geográficos obtenidos en Geneland fueron estimadas usando el programa BOTTLENECK v1.2 (Cornuet & Luikart, 1996, Piry et al. 1999). Poblaciones que han experimentado una reducción reciente en su N_e muestran una disminución en el número de alelos y diversidad génica (heterocigocidad), debido a que la pérdida de alelos es más rápida que la pérdida de diversidad génica. La prueba de Wilcoxon fue utilizada para evaluar en los cluster si el exceso de heterocigocidad esperada es significativa respecto al equilibrio.

8. RESULTADOS

8.1 CONSIDERACIONES SOBRE EL TAMAÑO, ÁREA Y PERÍODO DE MUESTREO (actividad 5.2)

Para cumplir con el diseño de muestreo propuesto, en la Tabla 13 se indica el número de muestras recolectadas durante la ejecución del proyecto, siguiendo las instrucciones del punto 5.2 **Muestreo en Campo**.

En cada una de las localidades propuesta se contactó a los sindicatos con el fin de solicitar su colaboración y experiencia en estas pesquerías, tramitando y obteniendo permiso de pesca de investigación a través del R.EX N° 993 del 18 de marzo del 2009 y su modificación del 26 de junio R.EX N° 2288, el cual otorga permiso hasta fines de agosto del 2009 para completar el tamaño muestral comprometido en el punto 5.1 **Tamaño de la Muestra**.

Tabla 13: Número de muestras por localidad y especie recolectadas durante la ejecución del proyecto FIP2008-39.

Localidades	PULPO		LOCO		ERIZO		LOCATE	
	Propuesto	Muestreado	Propuesto	Muestreado	Propuesto	Muestreado	Propuesto	Muestreado
Clavelito(Arica)	100	92	100	101	100	100	100	100
Pisagua	100	80	100	110	100	120	100	100
Punta Arenas	100	47	100	102	100	99	100	100
Punta Campamento (Mejillones)	100	68	100	105	100	100	100	100
Punta Sur Taltal (Cifuncho)	100	96	100	111	100	100	100	100
<i>Total</i>		<i>383</i>		<i>529</i>		<i>519</i>		<i>500</i>

- Se analizaron en total 1931 ejemplares entre las cuatro especies en estudio.

En las Tablas 14 y 15, se detallan las posiciones geográficas de las áreas de manejo en las cuales se obtuvieron las muestras de las especies en estudio, como también lo referente al estado de situación de cada uno de ellas, las que demuestra un avance dispar, producto que se fueron desarrollando en forma desigual en el tiempo. Sobre la base de estos datos se calcularon las distancias aproximadas entre los lugares de muestreos, la mayor separación se da entre Punta Campamento en Mejillones y Punta Sur de Taltal y la menor entre Clavelito en Arica y Pisagua (Figura 23 y Tabla 16).

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Tabla 14: Ubicación geográficas de las áreas de manejo de la I y II región de Chile, FIP2008-39. (Diciembre 2009: Fuente Subsecretaría de Pesca).

		Latitud							
Área de manejo/Localidad	Vertice	A	B	C	D	E	F	G	H
Clavelito (Arica)		18°36'02,91''	18°36'02,91''	18°37'11,16''	18°37'11,16''				
Pisagua (Iquique)		19°33'29,44''	19°33'29,22''	19°33'48,45''	19°33'54,57''	19°34'26,27''	19°34'53,69''	19°34'56,87''	19°35'06,25''
Punta Arenas (Tocopilla)		21°36'48''	21°36'48''	21°37'24''	21°37'24''				
Punta Campamento (Mejillones)		23°01'17,40''	23°00'55,96''	23°02'21,40''	23°02'38,37''				
Punta Sur Taltal (Taltal)		25°23'30,81''	25°23'24,32''	25°23'23,67''	25°23'42,16''	25°24'04,62''	25°24'20,03''		
		Longitud							
Área de manejo/Localidad	Vertice	A	B	C	D	E	F	G	H
Clavelito (Arica)		70°20'11,90''	70°20'20,11''	70°20'22,16''	70°20'11,19''				
Pisagua (Iquique)		70°12'36,65''	70°12'51,35''	70°12'51,35''	70°12'31,93''	70°12'26,91''	70°12'33,98''	70°12'32,57''	70°12'15,42''
Punta Arenas (Tocopilla)		70°06'36''	70°07'12''	70°07'45''	70°07'20''				
Punta Campamento (Mejillones)		70°30'53,03''	70°30'52,96''	70°32'00,00''	70°32'00,00''				
Punta Sur Taltal (Taltal)		70°30'52,30''	70°30'51,22''	70°30'57,31''	70°31'12,54''	70°30'44,59''	70°31'05,55''		

Tabla 15: Estado de situación de las áreas de manejo de la I y II región de Chile, FIP2008-39 (Diciembre 2009: Fuente Subsecretaría de Pesca).

Área de manejo/Localidad	Hectareas	N° Socios	Ha/socios	Estado de situación	Decreto
Clavelito (Arica)	53	74	0.7	1° seguimiento aprobado	DS 352-05/06
Pisagua (Iquique)	155	51	3.0	7° seguimiento aprobado	DS 210-05/98
Punta Arenas (Tocopilla)	276	20	13.8	7° seguimiento aprobado	DS 830-11/96
Punta Campamento (Mejillones)	264	68	3.9	3° seguimiento aprobado	DS 560-08/03
Punta Sur Taltal (Taltal)	57	62	0.9	3° seguimiento aprobado	DS 184-01/05

Tabla 16: Distancia entre AMERBs en estudio entre la I y II región de Chile, FIP2008-39.

		Distancia	
Área de manejo/Localidad		Grados	kilometros
Clavelito (Arica)	Pisagua (Iquique)	0.984261	109
Pisagua (Iquique)	Punta Arenas (Tocopilla)	2.038264	226
Punta Arenas (Tocopilla)	Punta Campamento (Mejillones)	1.390658	155
Punta Campamento (Mejillones)	Punta Sur Taltal (Taltal)	2.391572	266

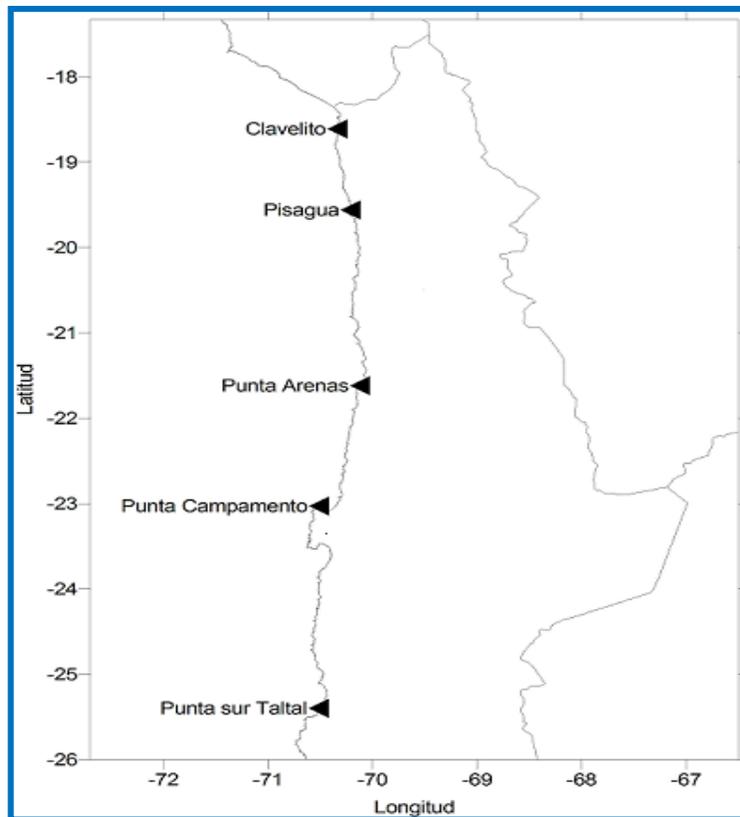


Figura 23: Ubicación geográfica de las AMERBs en estudio entre la I y II región de Chile, FIP2008-39.

8.2 ESTABLECER LOS LOCI MICROSATÉLITES POLIMÓRFICOS PARA CADA UNA DE LAS ESPECIES (objetivo específico 4.2)

A continuación se indican y detallan los resultados obtenidos durante el desarrollo del proyecto FIP2008-39 respecto al desarrollo de loci microsatélites polimórficos para el análisis poblacional en cada una de las especies en estudio.

a) Obtención de microsatélites en *C. CONCHOLEPAS*

Luego de la obtención del ADN genómico de buena calidad y libre de contaminantes se realizó la amplificación por PCR de 5 microsatélites ya desarrollados, estandarizados y protocolizados en *C. concholepas*. La elección de los 5 loci microsatélites se basó en aquellos que presentaron los mejores resultados en la genotipificación.

Para la extracción de ADN se utilizó el siguiente protocolo: Para la hidratación, cada porción de manto (20 mg) se hidrató en buffer TE9 (500mM Tris, 20 mM EDTA, 10 mM de NaCl, pH 9.0) y se mantuvo en un baño termo regulable (20°C) con agitación. Al día siguiente el buffer

se renovó cada 2 horas y nuevamente las muestras se incubaron toda la noche en buffer TE9 fresco. Para la lisis del tejido las muestras fueron incubadas en un baño termo regulable a 55°C entre 16-20 h, con agitación, hasta la completa digestión del tejido. Finalizada la lisis, las proteínas fueron precipitadas con 570 µl de Cloruro de Litio (3M) y 230 µl Acetato de Potasio (2.5M) e incubadas en un Freezer (a -20°C) por 4 horas, para luego centrifugar a 5.000 RPM por 5 minutos y a 14.000 RPM por 10 minutos. Se colectaron 600 µl de sobrenadante en un nuevo tubo agregando 570 µl de Cloruro de Litio (3M) y Acetato de Potasio (2.5M) y posterior centrifugación a 5.000 RPM (5min) y 14.000 RPM (10min). Al sobrenadante (900 µl) de cada tubo se agregó 500 µl de Etanol Absoluto (-20°C) y se centrifugó a 12.000 RPM por 10 minutos. El pellet (DNA) fue lavado por inversión con Etanol (70%, -20°C) y centrifugado a 12.000 RPM durante 5 minutos. El pellet sin etanol se secó en una estufa a 37°C por 5 minutos. El DNA fue resuspendido en 60 µl de buffer TE Low EDTA (10mM Tris HCl, 0.1mM EDTA) y refrigerado hasta su cuantificación.

La concentración de ADN genómico de cada muestra se cuantificó por espectrofotometría (Shimatzu). Las muestras de *C. concholepas* fueron diluidas a una concentración de 20ng/µl para la amplificación de los microsatélites.

Una vez realizada la cuantificación y diluidas las muestras, 7.5 µl (150 ng de DNA) en 2.5 µl de buffer de carga se sometieron a electroforesis (70V) en un gel de agarosa (1%) en buffer TBE 0.5X por al menos media hora para comprobar que el DNA aislado fuese de alto peso molecular y no estuviese degradado o contaminado.

De los 11 microsatélites desarrollados por Cárdenas et al. (2007), se seleccionaron 8 para la evaluación preliminar sobre éxito de amplificación, variabilidad observada y rango de tamaño de los alelos amplificados. Para la detección de los productos de amplificación de cada locus se utilizaron partidores marcados (Applied Biosystems) con fluoróforos en su extremo 5': Cc1A2 y Cc2A5 con 6-FAM, CcA111 y Cc2F5 con NED, CC1B6 y Cc1E5 con VIC, y Cc2A112 y CcH1 con PET.

Los microsatélites se probaron individualmente y en PCR múltiplex, se verificó la amplificación por PCR en geles de agarosa (2,5%) teñidos con SybrGreen comparándolos con marcador de peso molecular de 50 pb (Fermentas). Se realizaron ajustes al buffer PCR para optimizar la calidad del producto amplificado (Tabla 17 A y B). El régimen térmico utilizó un ciclo de denaturación inicial a 94°C por 4 minutos, seguido de un “touchdown” cuya temperatura de alineamiento se calibró inicialmente a 60°C y luego se redujo en 1°C por cada ciclo hasta llegar a los 50°C, seguida de una extensión de los partidores a 72°C por 45 segundos, se realizaron 20 ciclos adicionales a 50°C por 45 segundos, con una denaturación a 95 °C por 45 segundos y una extensión a 72°C por 45 segundos. Finalmente, se realizó la extensión a 72°C por 7 min.

Tabla 17: Condiciones de PCR para amplificación de tres microsatélites de *C. concholepas*.
A. Buffer PCR 1.2 X. **B.** Buffer PCR 1.5 X

A: Buffer PCR 1.2 X			
Solución	Concentración Inicial	Concentración Final	1 Reacción (µl)
PCR H ₂ O			4.91
Buffer PCR	10X	1.2 X	1.20
MgCl ₂	50Mm	1.5mM	0.30
dNTP's	10mM	0.25mM	0.25
BSA	100X	1X	0.10
Primer 1 F	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 1 R	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 2 F	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 2 R	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 3 F	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 3 F	10µM	0.2 µM	0.20
Taq	5UI/µl	0.2U	0.04
DNA	20ng/µl	40ng	2.00
Volumen Final			10.00
B: Buffer PCR 1.5 X			
Solución	Concentración Inicial	Concentración Final	1 Reacción (µl)
PCR H ₂ O			4.61
Buffer PCR	10X	1.5X	1.50
MgCl ₂	50mM	1.5mM	0.30
dNTP's	10mM	0.25mM	0.25
BSA	100X	1X	0.10
Primer 1 F	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 1 R	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 2 F	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 2 R	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 3 F	10µM	0.2 µM	0.20
Primer 3 R	10µM	0.2 µM	0.20
Taq	5UI/µl	0.2UI	0.04
DNA	20ng/µl	40ng	2.00
Volumen Final			10.00

Del producto amplificado por PCR (alelos de los microsatélites) 2ul fueron mezclados con 10ul de formamida (variaciones en el volumen de carga fueron experimentados hasta obtener los más óptimos resultados), y 0.2ul del estándar de peso LIZ500. Posteriormente la mezcla fue denaturada incubando a 95°C por 2 minutos y cargada en el secuenciador ABI 3730 de Applied Biosystems en el Advanced Analysis Centre Genomics Facility de la Universidad de Guelph. La carga de las muestras se llevara a cabo en capilares de 50 cm sobre el polímero POP7, con 10 segundos como tiempo de inyección, 12Volt y 45 minutos de corrida. Variaciones en las condiciones de corrida fueron aplicadas en pro de la optimización de los resultados.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Para el análisis de los fragmentos amplificados y determinación de los genotipos microsatélites obtenidos se utilizó el programa PeakScanner v1.0 de Applied Biosystems. Se obtuvieron en total 2500 genotipos para los análisis estadísticos posteriores.

b) Obtención de microsatélites en *O. MIMUS*

El aislamiento del ADN genómico se realizó mediante el método de sales (LiCl, KAc) estándar mediante digestión con proteinasa K.

A continuación se describe el método de extracción de ADN:

Para realizar las estandarizaciones de microsatélites para *O. mimus* se realizó la extracción de ADN genómico en 9 individuos. Se utilizaron 30 mg de tejido de manto el que fue triturado con nitrógeno líquido en un mortero, luego se agregaron 500µL de buffer de lisis a pH7.5 (100mM Tris-HCl, 100mM EDTA, 100mM NaCl y 0.5% de SDS p/v) y 5µL de proteinasa K (20mg/mL), se dejó incubar a 65°C por 2-3 hora hasta obtener un lisado claro. Posteriormente se agregaron 570µL de LiCl más 230µL de Acetato de Potasio y se dejó incubar en hielo por 20 minutos. Luego se realizó la centrifugación a 12000g por 15 minutos seguido de una precipitación de ADN con Isopropanol frío (-20°C) y una centrifugación por 15 minutos a 12000g. El lavado del ADN se realizó con etanol frío al 70% (-20°C). El pellet obtenido fue resuspendido en 50µL de agua DEPC. Finalmente el ADN extraído se incubó con RNAasa (10mg/mL) por 40 minutos a 37°C. Para evaluar la calidad del ADN extraído, este fue sometido a una electroforesis por 45 minutos a 70 volts con buffer TAE 1x en un gel de agarosa al 1% previamente teñido con bromuro de etidio, usando como referencia un marcador de peso molecular de 1kb (New England Biolabs). El gel fue visualizado en un sistema digital de fotodocumentación bajo luz ultravioleta. La pureza y cantidad del ADN fue determinada mediante lecturas en un espectrofotómetro NanoDrop ND1000 (Nanotechnologies). Para verificar el tamaño y calidad del ADN genómico extraído de cada ejemplar, los extractos de ADN fueron visualizados en geles de agarosa.

Para asegurar la amplificación de los loci microsatélites y debido a la calidad del ADN extraído se realizaron 2 controles positivos amplificando los genes 16S e ITS 2 con las condiciones estandarizadas. En el gen 16S se observó un fragmento de 550 pb aproximadamente y en el gen ITS2 un fragmento de 450pb.

Debido a la ausencia de marcadores microsatélites especie-específicos para *O. mimus*, fue necesario realizar una búsqueda exhaustiva de marcadores existentes en especies cercanas filogenéticamente (Fig 15). Luego de la obtención del ADN genómico se realizaron pruebas de amplificación por PCR de loci microsatélites desarrollados, estandarizados y protocolizados para *O. vulgaris* y *O. maorum* en *O. mimus* (Doubleday et al., 2009) (Tabla 12). La elección de los potenciales loci microsatélites para la realización del estudio se basó en aquellos que presentasen los mejores resultados en la genotipificación y polimorfismo. No se recomienda descartar a priori ninguno de los microsatélites (heterólogos) disponibles para la especie, pues regiones microsatélites pueden ser población específico y deben ser evaluados antes de su elección.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Se ensayaron 9 microsatélites con posible amplificación cruzada para *O. mimus* desarrollados por Greatorex *et al.* (2000) para *O. vulgaris* (Tabla 18) y Doubleday *et al.* (2009) para *O. maorum* (Tabla 19). La estandarización se realizó según las condiciones descritas por los autores con modificaciones.

Tabla18: Nombre del locus, Motivo, temperatura de Melting, Concentración de magnesio y Tamaño del producto de los microsatélites descritos por Greatorex *et al.* (2000).

Locus	Motivo	Tm (°C)	Mg ²⁺ (Mm)	Tamaño de producto (pb)
Oct 3	(AT) ₁₆ (GT) ₁₅	55	2.5	147
Oct 8	(TG) ₃₆	56	2.5	160
Ov04	(TTA) ₂₂	44	2.5	126
Ov06	(ATT) ₂₄	45	2.5	146
Ov10	(GA) ₁₄	52	2.5	122
Ov12	(GATA) ₂₀	53	2.5	176

Tabla 19: Nombre del locus, Motivo, temperatura de Melting, Concentración de magnesio y Tamaño del producto de los microsatélites descritos por Doubleday *et al.* (2009).

Locus	Motivo	Tm (°C)	Mg ²⁺ (Mm)	Tamaño de producto (pb)
Om5	(AGT) ₉ (GGT) _{3...3} (GGT) ₄	52	1.5	191-284
Om8	(GTAT) ₁₉ (GT) ₃₂	51	1.5	163-247
Om3	(GA) ₃₀ (GT) ₁₂	63	1.0	140-238
Om20	(TTG) ₈ (GGT) ₆	56	1.5	164-199

Para la estandarización se utilizaron Taq ADN polimerasa con distintas propiedades como Biolabs, Invitrogen y Fermentas con ciclo de PCR estándar para los microsatélites descritos por Greatorex *et al.* (2000) y Doubleday *et al.* (2009).

Se variaron las concentraciones de primers, magnesio, y temperatura de annealing para lograr una óptima amplificación. Finalmente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.8% teñido con bromuro de etidio y los tamaños de los productos obtenidos fueron comparados con un marcador de peso molecular de 50pb (New England Biolabs).

La electroforesis de los productos obtenidos por PCR del loci Oct3, Ov06, Om3, Om5, Om8 y Om20 no indica productos de amplificación. El locus Oct8 presenta productos de amplificación pero por su tamaño de aproximadamente 800pb no correspondería a un bloque microsatélite. El locus Ov04 presenta productos de amplificación pero con una gran cantidad de bandas inespecíficas lo que entorpecería su análisis y lectura.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Los resultados indican que de los 10 loci microsatélites descritos para *O. vulgaris* y *O. maorum* con posible amplificación cruzada para *O. mimus*, solo 2 amplificaron exitosamente, Ov010 y Ov012. Para el estudio de conectividad se comprometieron 5 loci microsatélites polimórficos para cada especie, por tales motivos se procedió a desarrollar una librería genómica enriquecida para microsatélites específica *O. mimus*.

Las actividades de extracción de ADN, estandarización, aplicación y genotipificación de microsatélites en *O. mimus* se realizaron en el Laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de Concepción.

ADN de alto peso molecular fue extraído desde tejido del brazo de 20 individuos de ambos sexos usando un protocolo de sales con modificaciones (*ver* <http://www.fruitfly.org/about/methods/inverse.pcr.html>). La librería genómica de microsatélites fue desarrollada por Genetics Identification Services (GIS, www.genetic-id-services.com/). Brevemente, el ADN genómico fue parcialmente digerido con un coctel de siete enzimas de restricción (*Hae*III, *Stu*I, *Eco*RV, *Sca*I, *Bsr*BI, *Pvu*II, *Hin*CII). Fragmentos entre 350 y 700 pb fueron seleccionados, extraídos desde el gel y ligados a un adaptador oligonucleótido de 20 pb conteniendo el sitio de restricción *Hind* III en el extremo 5'. El enriquecimiento de microsatélites fue realizado mediante el uso de perlas magnéticas recubiertas con estreptavidinas y sondas de oligonucleótidos biotinilados en su extremo 5' con CA₁₅, AAC₁₂, TACA₈ y TAGA₈. Las moléculas capturadas fueron amplificadas mediante PCR usando primers complementarios al adaptador, digeridos con *Hind*III para remover el adaptador y ligado dentro del sitio *Hind* III del vector pUC19. Los plásmidos fueron luego electroporados dentro de *Escherichia coli* DH5. Clones recombinantes, fueron identificados y seleccionados mediante tinción blanco-azul, estos clones fueron secuenciados arbitrariamente en un secuenciador ABI377 (Applied Biosystems). Primers específicos flanqueando la secuencia microsatélites identificada fueron diseñado usando el programa Designer PCR v1.03 (Research Genetics) (Tabla 20). Los microsatélites fueron amplificados en 10 µL de reacción conteniendo 1X de buffer PCR, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM primer forward (con marca fluorescente), 0.2 mM primer reversa, 0.2 mM dNTPs, 0.1 U/µl de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), y 20 ng de ADN genómico. La PCR fue realizada en un termociclador PTC-200 (MJ Research) con los siguientes parámetros: 94°C por 3 min, seguidos por 34 ciclos de 94°C por 40 s, 56°C por 40 s, 72°C por 30s, y una extensión final a 72°C por 4 min. Todos los loci fueron amplificados bajo las mismas condiciones. Los productos PCR fueron analizados en un secuenciador de ADN ABI 3330. Los alelos fueron registrados usando el programa Peak Scanner v1.0, con GS500 (Applied Biosystems) como tamaño estándar interno.

Caracterizamos el polimorfismo de cada locus en una muestra total de 187 individuos de los AMERBs Clavelito y Punta Sur de Taltal, Chile. Primero chequeamos la potencial presencia de alelos nulos y errores de genotipificación (stutter band o large dropout alleles) usando MicroCheker v2.2.3 (van Oosterhout et al. 2004). El número de alelos (N_a), la heterocigosidad esperada (H_e) y esperada (H_o) fueron obtenidos usando GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006). Desviaciones al equilibrio de Hardy–Weinberg y desequilibrio gamético entre pares de loci fueron testeados en el programa Arlequin v3.1 (Excoffier et al. 2005). Por otro lado obtuvimos el índice R_{st} específico para microsatélites como medida de diferenciación poblacional mediante el programa Arlequin v3.1 (Excoffier et al. 2005). Todos los valores de probabilidad fueron estimados usando 10000 permutaciones.

Todos los loci usados fueron polimórficos. Alelos nulos pueden estar presentes en cuatro loci, OmimA104, OmimA105, OmimB111 y OmimC106, sugerido por el exceso de homocigotos. Por otro lado, los resultados no mostraron presencia de errors de genotipado como drop-out y stutter bands. El número de alelos por oscilo entre 4 a 28 (Clavelito) y 9 a 30 (Punta sur Taltal). La H_o oscilo entre 0.127-1 (Clavelito) y 0.362-1 (Punta sur Taltal), y la H_e entre 0.651-0.946 (Clavelito) y 0.628-0.937 (Punta sur Taltal) (Tabla 20). Desviaciones significativas al equilibrio de Hardy–Weinberg (HW) fueron determinadas en tres de los nueve loci para Clavelito y cuatro para Punta sur Taltal (ver Tabla 20). Un considerable y altamente significativo nivel de diferenciación poblacional fue encontrado entre Clavelito y Punta sur Taltal, ($R_{st} = 0.160$; $p < 0.0001$).

Déficit de heterocigotos en los loci OmimA104, OmimA105, OmimB111 y OmimC106 podrían ser resultado de: a) Mezcla de individuos capturados sobre una gran distribución geográfica que puede incluir más de una unidad panmítica (Efecto Wahlund); b) Alelos nulos, un alelo de un heterocigoto que no pueden ser amplificado debido a mutaciones en la región flanqueante, dando como resultado un homocigoto. La presencia de alelos nulos subestima el número de heterocigotos. Los resultados obtenidos en Micro-Cheker (van Oosterhout et al. 2004) muestran evidencia de alelos nulos en los loci OmimA104, OmimA105, OmimB111 y OmimC106 (de acuerdo con Brookfield, 1996). Finalmente, c) Selección, en este caso asumimos que los loci utilizados son selectivamente neutros. En conclusión, este es el primer trabajo de descripción de loci microsatélices para *O. mimus*. Este trabajo provee de una significativa herramienta genética para futuros estudios de estructuración poblacional a escala fina tal como ecología y conservación de este cefalópodo.

Los nueve microsátélites aquí desarrollados y probados fueron aplicados en la totalidad de las muestras provenientes de las 5 AMERBs, generando un total de 3456 genotipos para los análisis estadísticos posteriores,

Oferta Técnica FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Tabla 20: Característica de los loci microsatélites aislados para *O. mimus*.

Rango tamaño alélico (pb), número de alelos (Na), heterocigosidad observada (Ho) y esperada (He), valor de probabilidad del test exacto para evaluar el equilibrio de Hardy-Weinberg (H&W) y el acceso a Genbank. Valores en *italica* muestran loci con exceso de homocigotos, pero los cuales pueden indicar la presencia de alelos nulos (ver Brookfield, 1996), valores en **negrita** muestran $p \leq 0.05$.

Locus (Genbank)	Secuencia de partidores (5'-3')	Rango de tamaño	Clavelito				Punta sur Taltal			
			Na	Ho	He	H&W	Na	Ho	He	H&W
OmimA2 (GU584076)	F: PET-TCAATGGATGTTGATGTCAGA G R: TTCCAGGCAAGGTAATATCTTG	268-306	8	0.893	0.816	0.001	9	0.659	0.762	0.005
OmimA103 (GU584077)	F: 6-FAM-CATTGCTGAACGAAGAACTC R: GCITATCCCGAACAGGTAAT	218-350	28	1	0.939	0.448	30	0.926	0.937	0.186
OmimA104 (GU584078)	F: 6-FAM-TGGTTGATAGAACTGTGTCTG R: GTTGTGGTGATGGTGACTG	186-276	13	0.936	0.88	0.219	9	0.362	0.628	0.000
OmimA105 (GU584079)	F: NED-GCCCTTTTGTGTAATAATACG R: TTCTCGCTAATGGCAGTTC	194-270	24	0.85	0.946	<i>0.122</i>	18	0.929	0.931	0.596
OmimB101 (GU584080)	F: NED-CACCAAGTCACAGACATCTTG R: GCCAGATAAACAACAATAGCTG	206-256	4	0.467	0.651	0.055	15	1	0.881	0.075
OmimB111 (GU584081)	F: VIC-TCCTGATTCAGTCATTTACAGG R: GGGTTCGTTCCTTTGACATG	186-300	8	0.273	0.826	0.000	19	0.947	0.83	0.000
OmimC1 (GU584082)	F: VIC-CGIGTGTCAACCAATTTTC R: GGTGTAGTTAAATGGCATACTC	133-213	14	0.938	0.805	0.000	15	0.972	0.821	0.217
OmimC106 (GU584083)	F: PET-TGCCATCAAAGTGACACTG R: AACCCACAGATACTCGAAGAATG	188-300	10	0.862	0.747	0.521	22	0.842	0.937	0.000
OmimC122 (GU584084)	F: 6-FAM-ATTGTTGAAATCGCAACTGT R: AATTCTCATAATCGCTGTTGTG	118-256	17	0.942	0.8	0.000	26	0.966	0.853	0.172

c) desarrollo de librería genómica enriquecida con motivos microsatélites en *T. CHOCOLATA*

Las actividades de extracción de ADN, estandarización, ensayo y genotipificación de microsatélites en *O.mimus* se realizaron en el Laboratorio de Genética & Biotecnología Acuícola de la Universidad de Concepción.

La librería genómica fue construida a partir de ADN aislado desde nueve ejemplares de *T.chocolata* desde el norte de Chile, utilizando protocolo de extracción Fenol-Cloroformo. El ADN fue digerido con una batería de enzimas de restricción y enriquecido para cuatro motivos frecuentes de repetición en murícidos (Cardenas et al., 2007; Hawai et al., 2001); ATG, CAG, CAGA y TAGA el laboratorio Genetic Identification Services (California, USA). Fragmentos de 350–700 bp fueron ligados en el sitio Hind III del plásmido pUC19. Los productos de ligamiento fueron introducidos en *Escherichia coli cepa* DH5 α (ElectroMAX, Invitrogen) por electroporación. Después de la transformación y recuperación en medio de cultivo SOC (Invitrogen), fue adherido glicerol 20%. 5 μ L de este producto producen entre 100 y 300 colonias recombinantes (ca. 10 000 células recombinantes/mL). Placas de agar Bluo-gal/IPTG/ampicillin–LB fueron utilizadas para aislar las colonias para su secuenciación. Para esto, las colonias blancas desde las placas fueron transferidas en nuevas placas con agar BIA–LB e incubadas toda la noche a 37°C en block de 96 pocillos en medio de cultivo 2X lb, los plasmidos fueron purificados utilizando placas Millipore Multiscreen MAFB NOB. Dos pasos de PCR en 10- μ L fueron realizadas para secuenciar los clones utilizando partidores M13. La primera PCR consta de 1 \times PCR buffer, 3mM MgCl $_2$, 0.3mM de dNTP mix, 1.5 μ M de cada primer, 0.0042 mg/mL de RNase y 4 μ L de la colonia seleccionada, que fue incubada a 100 °C por 10 min para lisar las bacterias y a continuación a 37°C. La segunda PCR consiste en adherir 5 μ L de una solución hot-start (1 \times PCR buffer y 0.075 U/ μ L of BIOLASE DNA polymerase) al mix preparado y amplificado en un termociclador por 21 ciclos (94 °C por 30 s, 57 °C por 30 s y 72 °C por 30 s) con un paso de extensión final a 72°C por 2 min. La secuenciación del AND fue realizada en un secuenciador de Applied Biosystems, Modelo 377, utilizando DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences). 76 partidores fueron diseñados utilizando el programa DesigerPCR, version 1.03 (Research Genetics, Inc.). Finalmente 8 parejas de partidores PCR fueron exitosamente amplificados (Tabla 21). La amplificación de estos microsatellites fue realizada en 12.5 μ L de reacción que contiene 1X PCR Buffer, 0.2 mM de dNTP Mix, 0.2mg/mL de BSA, 0.125 mM de partidor forward marcado en su extremo 5` con M13, 0.5mM de partidore reversa, 0.5 mM de partidor M13 marcado en su extremo 5`con fluoróforo HEX ó FAM, 0.04 U/mL de *Taq* DNA polymerase (Kappa Biosystem) y 13ng/mL de ADN templado. El ciclo de amplificación consiste en 3 min a 94°C, 35 ciclos de 40 s a 94°C, 40 s de temperature de annealing indicada en la Tabla 21, y 30 s a 72 °C, con una extensión final de 4 min a 72 °C. Los productos PCR fueron visualizados en un secuenciador de Applied Biosystem Modelo ABI3730XL, utilizando como marcador de peso a 400HD. Se caracterizó el polimorfismo de cada marcador en 20 individuos provenientes desde la localidad de Pisagua, Chile (Fig. 29, 30 y 31).

Los alelos fueron determinados utilizando el programa GeneMarker v1.35 (SoftGenetics, LLC). Se determinó la potencial presencia de alelos nulos mediante al algoritmo implementado en MicroCheker V2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). La riqueza alélica fue determinada (Ra) mediante FSTAT v2.9.3 (Goudet 1995). El número de alelos (Na), la heterocigosidad esperada

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

(H_e) y observada (H_o), así como el equilibrio de Hardy–Weinberg fueron obtenidos en Arlequin v3.11 (Schneider et al. 2000).

El número de alelos varía entre 9 a 19. Evidencia de alelos se observa en cinco loci, como sugiere el exceso de homocigotos observados (Tabla 21). Los valores de heterocigosidad observada varía entre 0.200 a 0.900, y la heterocigosidad esperada varía entre 0.794 a 0.953. Sólo los loci Tcho1, Tcho2 y Tcho4 muestran desviaciones significativas al equilibrio de Hardy–Weinberg ($P < 0.05$). Estos ocho loci microsatellites son los primeros descritos en *T. chocolata*.

De los ocho microsatélites aquí desarrollados y probados 5 loci (Tcho1, Tcho2, Tcho3, Tcho4 y Tcho5) fueron aplicados en los ejemplares provenientes de las 5 AMERBs, generando un total de 1720 genotipos para los análisis estadísticos posteriores.

Tabla 21. Características de microsatélites aislados en *Thais chocolata*, Proyecto FIP2008-39:

*Alelos nulos; †Desviaciones significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.05$); Ta, temperatura de annealing; Na, número de alelos; Ra, riqueza alélica; Ho, heterocigosidad observada; He, heterocigosidad esperada.

Locus	Primer sequence (5' - 3')	Genbank	Ta (°C)	Allele range (pb)	Na	Ra	Ho	He	H & W
Tcho 1	F: TCTCCAATGTTCTTCCATCGTA R: TCATCAGGTTCTGGTTGTCTG		58	234 - 315	18	18	0.950	0.953	0.896
Tcho 2	F: CGGAGTTCTAGCTGAGAAATAG TAAAAGGGTGTGTA CTGACATG	R:	55*	138 - 214	12	12	0.300	0.907	0.000†
Tcho 3	F: GGTATAGCATGGTTTTTAC TGCGTGTGATGTGATGAG	R:	56	151 - 181	13	13	0.800	0.891	0.140
Tcho 4	F: GAACAAGATGGGCCGTGT R: GGATGGAGGGTTTGATTAA		52	119 - 159	9	9	0.900	0.794	0.082
Tcho 5	F: CTGAATGCTGACATGAATTATG GGTTAATAAAGGGTGGGTATT C	R:	56*	145 - 269	17	17	0.450	0.935	0.000†
Tcho 6	F: GCCATCCCTCTCTCTCAC TAAGCTCTTGTACCAGG	R:	61*	190 - 242	19	19	0.600	0.938	0.014†
Tcho 7	F:GGAAGTAGTTGT CAGGTC TTC ATATTGCCAGCGCAGTGAC	R:	57*	113 - 225	14	14	0.350	0.920	0.000†
Tcho 8	F: CTCACTCTGCCAATGATACTG AGGCAAGCAATAACTCTATGAC	R:	57*	248 - 318	15	15	0.200	0.920	0.000†

d) Desarrollo de librería genómica enriquecida con motivos microsatélites en *L. albus*

Las actividades de extracción de ADN, estandarización, ensayo y genotipificación de microsatélites en *L. albus* se realizaron en el Laboratorio de Genética & Acuicultura de la Universidad de Concepción.

Una librería genómica fue construida desde ADN genómico aislado desde tejido gonadal desde ejemplares de *L. albus* provenientes desde el norte de Chile, Arica (18°37'; 70°20'16W) y Mejillones (23°01'; 70°31'W), utilizando un protocolo de extracción de CTAB (cetyltrimethylammonium bromide) (Ferraris & Palumbi, 1996).

Cuatro librerías fueron enriquecidas para 4 motivos microsatélites (AC_{15} , ATG_{12} , $CATC_8$ and $TAGA_8$) (Genetic Identification Services, California) bajo el protocolo descrito por Jones et al. (2002). El ADN fue digerido con seis enzimas de restricción (*HaeIII*, *StuI*, *EcoRV*, *ScaI*, *BstBI*, *Pvu II*, *HinCII*). Fragmentos de tamaños entre 300-700 bp fueron adaptados con partidores de 20 bp contenidos en el sitio *HindIII* del extremo 5', y capturados con bolitas magnéticas (CPG Inc.), utilizando oligonucleótidos biotinizados en 5'. Las moléculas capturadas fueron amplificadas y ligadas dentro del sitio *HindIII* del vector PUC19 y el plásmido electroporado dentro de *Escherichia coli* DH5alpha (Electromax, Gibco). Los clones recombinantes fueron seleccionados con el método blue-white, los cuales fueron arbitrariamente elegidos para secuenciación en un equipo ABI PRISM 377, utilizando ABI PRISM Taq dye terminator cycle como metodología de secuenciación. Los partidores fueron diseñados con el software DESIGNER PCR v1.03 (Research Genetics Inc.).

Noventa y un clones fueron secuenciados, incluyendo 23 desde las librerías correspondientes a los motivos CA, TAGA y CATC, y 22 clones desde la librería del motivo ATG. 63 clones contienen secuencias microsatélites. 24 pares de partidores fueron sintetizados y testeados utilizando ADN desde 7 individuos *L. albus*.

Las condiciones de PCR, genotipificación y análisis de fragmento utilizados se indican a continuación; 10- μ L de volumen de reacción, 20 ng de template de ADN templado combinado con 2 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTP's, 0.6 μ M de partidores reversa y forward (dye-labelled con fluoróforos 6-FAM, VIC, NED, PET), 1X buffer Q-solution (Qiagen) y 0.025 U/ μ L Taq DNA polymerase (Invitrogen®). El programa de amplificación realizado en un termociclador PCT-200 thermocycler (MJ-Research®) consta de una denaturación inicial de 94°C por 3 min, seguido por 35 ciclos de denaturación de 94°C por 40 s, una temperatura de annealing a 56-58.3°C por 40-30 s respectivamente (ver Tabla 22), extensión a 72°C por 30 s, y una extensión final a 72°C por 4 min. Los fragmentos fueron visualizados en un secuenciador por capilar ABI PRISM 3730xl (Applied Biosystems) utilizando LIZ 500 como marcador de peso molecular. El asignamiento del tamaño alélico fue realizado utilizando el software Peak Scanner v1.0 (Applied Biosystems) (Fig. 24).

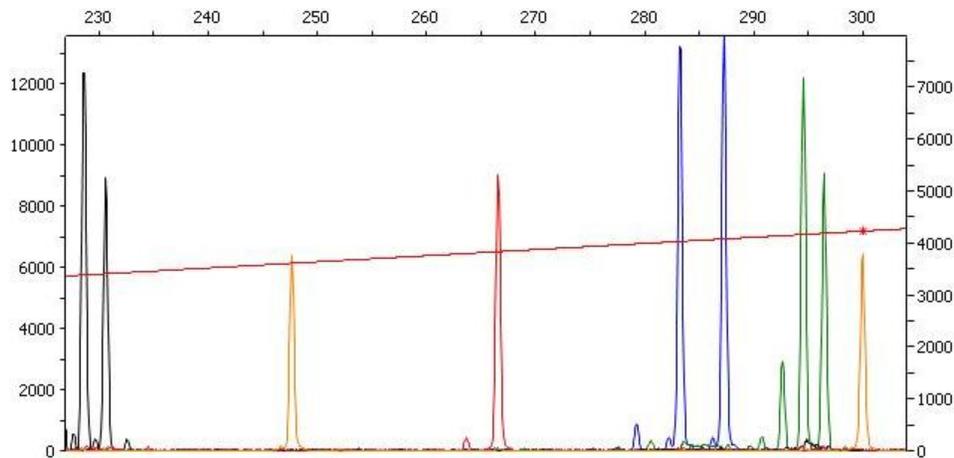


Figura 24: Cromatograma correspondiente a lecturas de fragmentos de 4 microsatélites desarrollados para *L. albus*, FIP2008-39.

Ocho de los loci (Tabla 22), generan buenas amplificaciones y polimorfismos, estos loci fueron ensayados sobre 30 ejemplares de *L. albus* provenientes desde Arica y Mejillones para explorar su diversidad genética y elegir aquellos a utilizar a nivel poblacional.

El número de alelos por loci, y la heterocigosidad observada, y la heterocigosidad esperada fueron estimadas en el programa GENALEX v6 (Peakall y Smouse, 2006). Diferencias significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg con el procedimiento de Guo y Thompson (1992), implementado en Arlequin v3.01 (Excoffier et al. 2005), se testeó el desequilibrio por ligamiento entre loci, fueron evaluados en GenePop v3.4 (Raymond y Rousset, 1995). Errores de genotipado (stuttering, large allele drop-out) y alelos nulos (95% confidence interval) fueron estimados utilizando el algoritmo de Brookfield (1996), implementado en Micro-Checker v2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004).

El número de alelos varía entre 9 a 32, y los valores de heterocigosidad observada y esperada varían entre 0.240 to 0.978 para Arica, y entre 0.344 y 0.953 para Mejillones. No se evidencia desequilibrio por ligamiento genotípico entre pares de loci en la muestra en estudio ($P < 0.05$). Desviaciones significativas al equilibrio de Hardy-Weinberg fueron encontradas en los siguientes loci: Sea A6, Sea D116, Sea A104, Sea A109, Sea B110 (Arica, Mejillones) y Sea C6 (Arica).

Los ocho microsatélites aquí desarrollados y probados fueron aplicados en los ejemplares provenientes de las cinco AMERBs, generando un total de 2320 genotipos para los análisis estadísticos posteriores.

Tabla 22: Detalle de ocho loci microsatélites en *L. albus* incluyendo nombre del locus, motivo de repetición, secuencia de los partidores, rango de tamaño (bp), temperatura de annealing (T_a), y número de acceso GenBank.

Locus	Secuencia Partidor (5'-3')	Rango de Tamaño	T_a (°C)	GenBank.
Sea A-6	F: NED-TCAGCAGAAGATACTCTCAATT R: CCTTCCCTTTTAACATAATCTC	123-193	56	GU584068
Sea C-6	F: PET-CTTCCATAATCTACCCCTATCC R: ATGATGCACAGGTAAGTGATG	121-222	56	GU584073
Sea B-6	F: VIC-TCATCGTTATCGTCACAACC R: CAGCAAATAGGCAATCATTAG	225-303	56	GU584071
Sea D-116	F: FAM-AATTAGCAGGCAAAGGACTAG R: AGGGTCCATGCTCTATTAAC	245-319	58.3	GU584075
Sea A-104	F: FAM-TCGGAAACTGTGTTCGTC R: GGATGATTGCTTTTGGTGT	115-204	56	GU584069
Sea A-109	F: NED-TCTTCCCTTTGACTGTGTCTTC R: TCCTTCACGTAGAACGTCACAT	212-267	58.3	GU584070
Sea B-110	F: PET-CGTCATCATCAATTATCATCC R: ATGAAGACGACGACACTGAT	249-294	58	GU584072
Sea D-1	F: FAM-TGTTGCATTCGTATTGACAATG R: TGGGCTATTACACAATGGACTG	260-310	56	GU584074

8.3 RESULTADOS DE OBJETIVOS ESPECÍFICOS 4.1 Y 4.3

Determinar los parámetros genéticos poblacionales de cada uno de los loci microsátélites en las diferentes especies y poblaciones de la I-II regiones 4.3.

Determinar la diversidad genética y el flujo génico entre stocks efectivos para cada uno de los recursos en estudio 4.1.

Unidades poblacionales o stocks para las especies en estudio

En las cuatro especies analizadas el modelo de frecuencias alélicas correlacionado mostró fuerte evidencia a favor, en comparación al modelo no-correlacionado (Tabla 23). El análisis basado en el modelo seleccionado muestra la existencia de dos poblaciones geográficamente estructuradas para Erizo (Fig. 25a), la primera incluyendo tres localidades del norte (i.e. Clavelito, Pisagua, y Punta Arenas) y la segunda incluyendo las localidades del sur (i.e. Punta Campamento, y Punta Sur Taltal). En Locate también se observan dos poblaciones, sin embargo, estas presenta discontinuidad geográfica (Fig. 25b), la primera población incluye dos localidades del norte (i.e. Clavelito, y Punta Arenas) con discontinuidad en Pisagua, y la segunda población incluye las dos localidades del sur (i.e. Punta Campamento, y Punta Sur Taltal) más la localidad de Pisagua. Para la especie Loco, no se observan poblaciones genética o geográficamente estructuradas (Fig. 25c). En el Pulpo del Norte se observan tres poblaciones geográficamente bien estructuradas (Fig. 25d), la primera incluyendo sólo a la localidad más septentrional (i.e. Clavelito), la segunda incluyendo a dos localidades del norte del área de estudio (i.e. Pisagua, y Punta Arenas), y la tercera incluyendo las localidades del sur (i.e. Punta Campamento, y Punta Sur Taltal).

Migraciones y tamaño poblacional efectivo para las especies en estudio

Los resultados del análisis bayesiano realizado en MIGRATE-N (Fig. 26) muestran mayores tamaños efectivos (N_e) en la población del norte tanto en Erizo como en Locate, además de mayores valores de tasa de migrantes por generación (N_m) desde Norte hacia el Sur para ambas especies. En Pulpo del Norte se observan valores de N_e en aumento hacia la población del Sur, con los menores valores de N_e en la población más septentrional. El flujo de migrantes por generación indica mayores tasas de sur a norte, con la mayor conectividad entre la población más septentrional y la población de la zona centro-norte, por su parte la población del extremo sur muestra altos valores de N_m hacia el norte, pero bajos valores N_m hacia ella.

8.3.1 *Octopus mimus*; Los análisis de riqueza alélica (R_s) mediante el método de rarefacción mostraron diferentes números mínimos de muestras necesarias para captar la R_s en todo el set de datos. El número de muestras mínimo osciló entre 7 y 15 individuos. No se encontró evidencia de alelos dropout en el set de datos. Por otro lado bandas stutter se encontró en OmimB101 y OmimA104 en el cluster 2 y cluster 3 respectivamente. Exceso de homocigotos se encontró en cada cluster: 1) cluster, OmimB111 y OmimA105; 2) cluster2, OmimB101, OmimB111, OmimA105 y OmimA2 y 3) cluster 3, OmimA104, OmimC106, OmimA105 y OmimA2. Loci con exceso de homocigotos podrían deberse a la presencia de alelos nulos.

La H_o osciló por cada cluster: a) cluster 1, 0.273-1.000 para OmimB111 y OmimA103, respectivamente; b) cluster 2, 0.414-0.983 para OmimB101 y OmimC122, respectivamente y c) cluster 3, 0.415-0.993 para OmimA104 y OmimB101, respectivamente. Basados en el signo del índice F , se encontró congruencia en que los valores que presentaron mayores índices de F son los loci con posible presencia de alelos nulos. El N_a osciló por cluster: a) cluster 1, 4-28 para OmimB101 y OmimA103, respectivamente; b) cluster 2, 8-39 para OmimB101 y OmimB111, respectivamente y c) cluster 3, 14-30 para OmimA104-OmimA2 y OmimA105-OmimA103, respectivamente. El test exacto de equilibrio H&W mostró valores significativos para la mayoría de los loci, a excepción del locus OmimB101, OmimA104, OmimC106 y OmimA103 en el cluster 1; OmimA104 y OmimA103 en el cluster 2; y OmimA103 en el cluster 3 (Tabla 24). Las desviaciones al equilibrio de H&W podrían ser causadas violaciones a sus supuestos (e.g. fuerzas selectivas, población finita, sobreposición de generaciones, etc) o presencia de alelos nulos, diferencias poblacionales. El resultado del test de desequilibrio por ligamiento genotípico por pares de loci (global) entregó valores no significativos ($p > 0.05$), excepto la combinación OmimA103-OmimC1 ($p = 0.04$). Aplicando la corrección para múltiples test de Bonferroni esta combinación no fue significativa (Tabla 25). Estos resultados sugieren que los nueve loci utilizados poseen patrones de herencia independientes.

Los valores de F_{st} por cada par de cluster mostró diferencias significativas entre cluster 2-cluster 3, en cambio para R_{st} mostró diferencias significativas entre los cluster 1-cluster 3 y cluster 2-cluster3 (Tabla 26). Los resultados del AMOVA global como una media ponderada sobre los nueve loci mostró un valor de F_{st} y R_{st} bajos y significativos ($F_{st} = 0.070$; $p < 0.0001$ y $R_{st}=0.380$; $p < 0.0000$). Este resultado muestra que el índice R_{st} presenta mayor sensibilidad que el F_{st} para detectar diferencias entre los diferentes clúster, esto debido a que los análisis de R_{st} se realizan bajo el modelo de mutación de microsatélites Stepwise Mutation Model (SMM, toma en cuenta la variabilidad del tamaño de los alelos). El mismo análisis pero realizado locus por locus mostro diferencias significativas en seis loci (OmimB101, OmimA104, OmimC106, OmimB111, OmimC122 y OmimC1). Tanto para el F_{st} como el R_{st} , estos seis loci evidenciarían significativas diferencias entre los clusters geográficos determinados.

No se encontró un exceso de heterocigosidad significativa para cada uno de los clusters con la prueba de Wilcoxon ($p > 0.05$) para ningún modelo de mutación de microsatélites evaluado (TPM y SMM). Los resultados dan cuenta que no se puede rechazar la hipótesis de equilibrio mutación-deriva en ninguno de los clusters analizados. Por lo tanto, estas clusters genéticos geográficos no habrían pasado por un cuello de botella reciente (Tabla 27).

8.3.2 *Thais chocolata*: Los análisis de riqueza alélica (R_s) mediante el método de rarefacción mostraron diferentes números mínimos de muestras necesarias para captar la R_s en todo el set de datos. El número de muestras mínimo osciló entre 21-41 individuos para el cluster 1 y 27-38 para el cluster 2. No se encontró evidencia de alelos dropout en el set de datos. Por otro lado bandas stutter se observan en TCHO2 en el cluster 1 y TCHO2-TCHO3 en el cluster 2. Exceso de homocigotos se encontró en cada cluster: a) cluster 1, todos excepto TCHO4; b) cluster 2, todos excepto TCHO4 y TCHO5. Los loci con exceso de homocigotos podrían deberse a la presencia de alelos nulos.

La H_o osciló por cada cluster: a) cluster 1, 0.440-0.920 para TCHO2 y TCHO4, respectivamente y b) cluster 2, 0.460-0.980 para TCHO2 y TCHO5, respectivamente. Basados en el signo del índice F , se encontró congruencia en que los valores que presentaron mayores índices de F son los loci con posible presencia de alelos nulos. El N_a osciló por cada cluster: a) cluster 1, 30-39 para TCHO2-TCHO4 y TCHO5, respectivamente; y b) cluster 2, 21-41 para TCHO2 y TCHO5, respectivamente. El test exacto de equilibrio de H&W arroja en todos los casos valores significativos $p < 0.05$ (Tabla 28). Las desviaciones al equilibrio de H&W podrían ser causadas violaciones a los supuestos de H&W (e.g. fuerzas selectivas, población finita, sobreposición de generaciones, etc) o presencia de alelos nulos, y diferencias poblacionales. El resultado del test de desequilibrio por ligamiento genotípico por pares de loci (global) entregó valores no significativos ($p > 0.05$) (Tabla 29). Estos resultados sugieren que los cinco loci utilizados son independientes en cuanto a sus patrones de herencia.

Los valores de F_{st} y R_{st} entre clústers no muestran diferencias significativas, en cambio el test exacto de diferenciación sí, $p < 0.05$ (Tabla 30). Los resultados del AMOVA global como una media ponderada sobre los cinco loci mostró un valor de F_{st} y R_{st} bajos y significativos ($F_{st} = 0.004$; $p < 0.0001$ y $R_{st} = 0.017$; $p < 0.012$). El resultado muestra que el índice R_{st} presenta mayor sensibilidad que el F_{st} para detectar diferencias entre los diferentes cluster, esto debido a que los análisis de R_{st} se realizan bajo el modelo de mutación de microsatélites Stepwise Mutation Model (SMM, toma en cuenta la variabilidad del tamaño alélico). El mismo análisis pero realizado locus por locus mostró diferencias significativas en dos loci (TCHO1 y TCHO5), para el R_{st} , y TCHO3 para el F_{st} . Estos tres loci presentan el poder para detectar diferencias entre los clústers evidenciados para *Thais chocolata*.

No se evidenció un exceso de heterocigosidad significativa para los clústers de *Thais chocolata* con la prueba de Wilcoxon ($p > 0.05$) para ningún modelo de mutación de microsatélites evaluado (IPM y SMM). Los resultados dan cuenta que no se puede rechazar la hipótesis de equilibrio mutación-deriva. Por lo tanto, estos clusters no habrían pasado por un cuello de botella reciente (Tabla 27).

8.3.3 *Concholepas concholepas*: Los análisis de riqueza alélica (R_s) mediante el método de rarefacción mostraron diferentes números mínimos de muestras necesarias para captar la R_s en todo el set de datos. El número de muestras mínimo osciló entre 14-43 individuos para el cluster 1 (Tabla 31).

Al analizarse como un sólo cluster los valores de R_s corresponden a los mismos que el Na. No se encontró evidencia de alelos dropout en el set de datos. Por otro lado todos los loci analizados presentaron bandas stutter. Exceso de homocigotos se encontró todos los loci. Los loci con exceso de homocigotos podrían deberse a la presencia de alelos nulos.

La H_o osciló entre 0.202-0.586 para Cc2F5 y Cc1B6, respectivamente. En todos los loci se encontró un déficit de heterocigotos. Basados en F , se encontró congruencia en que los valores que presentaron mayores índices de F son los loci con posible presencia de alelos nulos. El Na osciló entre 14-43 para Cc1A2-CcA111-Cc2A5 y Cc2F5, respectivamente. El test exacto de equilibrio de H&W mostró todos sus valores significativos $p < 0.05$ (Tabla 31). Las desviaciones al equilibrio de H&W podrían ser causadas violaciones a los supuestos de H&W (e.g. fuerzas selectivas, población finita, sobreposición de generaciones, etc) o presencia de alelos nulos, y diferencias poblacionales. El resultado del test de desequilibrio por ligamiento genotípico por pares de loci (global) entregó valores no significativos ($p > 0.05$) (Tabla 32), excepto para el locus Cc1B6, el cual presenta diferencias significativas con los loci Cc1A2 y CcA111. El ligamiento del locus Cc1B6 con los loci Cc1A2 y CcA111 debe ser interpretado con cuidado, debido a que la verificación de este ligamiento depende de futuros análisis de herencia de estos loci.

Debido a que los resultados obtenidos en el programa Geneland mostraron sólo un cluster geográfico. Los análisis de F_{st} y R_{st} , test exacto de diferenciación, AMOVA global y por locus no son conducentes.

No se encontró un exceso de heterocigosidad significativa en el cluster geográfico evidenciado, con la prueba de Wilcoxon ($p > 0.05$) para ningún modelo de mutación de microsatélites evaluado (IPM y SMM). Los resultados dan cuenta que no se puede rechazar la hipótesis de equilibrio mutación-deriva. Por lo tanto, este cluster no habría pasado por un cuello de botella reciente (Tabla 27).

8.3.4 *Loxechinus albus*: Los análisis de riqueza alélica (R_s) mediante el método de rarefacción mostraron diferentes números mínimos de muestras necesarias para captar la R_s en todo el set de datos. El número de muestras mínimo osciló entre 9-33 individuos para el cluster 1 y 9-35 para el cluster 2 (Tabla 33). No se encontró evidencia de alelos dropout ni bandas stutter en el set de datos en los clusters. Exceso de homocigotos se encontró en cada cluster: a) cluster 1, todos excepto SeaB-6 y SeaD-1; b) cluster 2, todos excepto SeaB-6 y SeaD-1. Los loci con exceso de homocigotos podrían deberse a la presencia de alelos nulos.

La H_o osciló por cada cluster: a) cluster 1, 0.317-0.756 para SeaB-110y SeaD-116, respectivamente y b) cluster 2, 0.321-0.744 para SeaA-109 y SeaB-6, respectivamente. En todos los loci y clústers se encontró déficit de heterocigotos. Basados en F , se encontró congruencia en que los valores que presentaron mayores índices de F son los loci con posible presencia de alelos nulos. El Na osciló por cada cluster: a) cluster 1, 9-37 para SeaB-110 y SeaA-104, respectivamente; y b) cluster 2, 9-35 para SeaB-110-SeaD-1 y SeaA-104, respectivamente. El

test exacto de equilibrio de H&W mostró todos sus valores significativos $p < 0.05$ (Tabla 33). Las desviaciones al equilibrio de H&W podrían ser causadas violaciones a los supuestos de H&W (e.g. fuerzas selectivas, población finita, sobreposición de generaciones, etc) o presencia de alelos nulos, y diferencias poblacionales. El resultado del test de desequilibrio por ligamiento genotípico por pares de loci (global) entregó valores no significativos ($p > 0.05$) (Tabla 34). Estos resultados sugieren que los ocho loci utilizados son independientes.

Los valores de F_{st} y R_{st} entre clústers no mostraron diferencias significativas (Tabla 35). Los resultados del AMOVA global como una media ponderada sobre los ocho loci mostró un valor de F_{st} bajo y altamente significativo ($F_{st} = 0.008$; $p < 0.0001$) y el índice R_{st} bajo y no significativo ($R_{st}=0.003$; $p = 0.315$). El resultado muestra que el índice F_{st} presenta mayor sensibilidad que el R_{st} para detectar diferencias entre los diferentes cluster. El mismo análisis pero realizado por locus mostró diferencias significativas en dos loci (SeaA-109 y SeaB-110), para el F_{st} y SeaA-109 para el R_{st} . Estos loci son los que evidencian las diferencias genéticas observadas entre los clústers en el área de estudio.

No se encontró un exceso de heterocigosidad significativa para los clusters con la prueba de Wilcoxon ($p > 0.05$) para ningún modelo de mutación de microsatélites evaluado (TPM y SMM). Los resultados dan cuenta que no se puede rechazar la hipótesis de equilibrio mutación-deriva en ninguno de los clusters analizados. Por lo tanto, estos clusters no habrían pasado por un cuello de botella reciente (Tabla 27).

Tabla 23: Comparación de modelos usando el Factor de Bayes para la aproximación de *Geneland*.

Especie	Likelihoods marginales ($\ln(D/M)$) \pm Error Estándar				$B_{10} M_1$
	No-correlacionado M_0		Correlacionado M_1		
Erizo	-8645	± 2.519	-8533	± 8.333	49
Loco	-8958	± 3.403	-8951	± 2.952	3
Pulpo	-12661	± 3.019	-12280	± 3.127	166
Locate	-8219	± 1.88	-8112	± 1.12	46

Tabla 24: Parámetros de variabilidad genética en nueve loci microsátelites en los diferentes cluster para *O. mimus*.

		OmimB101	OmimA104	OmimC106	OmimB111	OmimC122	OmimC1	OmimA105	OmimA2	OmimA103
Cluster1	N	15	47	29	11	69	81	20	28	82
	Na	4	13	10	8	17	14	24	8	28
	Rs	4	9	7	8	9	7	17	7	14
	Ho	0.467	0.936	0.862	0.273	0.942	0.938	0.850	0.893	1.000
	He	0.674	0.890	0.760	0.866	0.806	0.810	0.971	0.831	0.944
	H&W	0.057	0.182	0.534	0.000	0.000	0.000	0.010	0.001	0.500
	F	0.283	-0.063	-0.154	0.670	-0.177	-0.166	0.102	-0.095	-0.065
	Nulos	0.112	-0.030	-0.066	0.3032n	-0.079	-0.074	0.0495n	-0.043	-0.032
Cluster2	N	70	92	79	72	116	101	82	43	116
	Na	8	13	11	39	26	13	31	12	31
	Rs	5	9	7	16	10	7	15	8	14
	Ho	0.414	0.946	0.873	0.625	0.983	0.970	0.805	0.651	0.957
	He	0.702	0.881	0.808	0.962	0.837	0.812	0.955	0.805	0.941
	H&W	0.000	0.898	0.037	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.588
	F	0.406	-0.079	-0.087	0.346	-0.179	-0.201	0.152	0.182	-0.021
	Nulos	0.17 sn	-0.037	-0.039	0.169n	-0.081	-0.090	0.0741n	0.0804n	-0.010
Cluster3	N	141	118	94	98	148	135	63	100	144
	Na	18	14	27	19	28	15	30	14	30
	Rs	9	5	14	8	11	7	15	8	14
	Ho	0.993	0.415	0.777	0.867	0.973	0.963	0.810	0.710	0.944
	He	0.884	0.656	0.950	0.802	0.863	0.828	0.955	0.824	0.944
	H&W	0.006	0.000	0.000	0.000	0.025	0.016	0.000	0.000	0.889
	F	-0.128	0.364	0.178	-0.087	-0.131	-0.168	0.145	0.134	-0.004
	Nulos	-0.060	0.14 sn	0.0866n	-0.038	-0.061	-0.076	0.0708n	0.0604n	-0.002
	Rst	0.799	0.667	0.637	0.549	0.012	0.081	0.012	-0.005	-0.004
	Valor-P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.042	0.000	0.152	0.654	0.979
Fst	0.189	0.185	0.102	0.112	0.002	0.008	0.001	-0.001	-0.001	
Valor-P	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019	0.000	0.538	0.606	0.807	

N: número de muestras utilizadas en el análisis; Na: número de alelos; Rs: Riqueza alélica; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; F: Índice de fijación; H & W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg; Nulos: porcentaje de alelos nulos obtenido a partir del algoritmo de Brookfield (1996). Valores de probabilidad significativos en negrita ($P < 0.05$).

Tabla 25: Test de ligamiento entre pares de loci microsatélites en *O. mimus*, FIP2008-39.

	OmimB101	OmimA104	OmimC106	OmimB111	OmimC122	OmimC1	OmimA105	OmimA2	OmimA103
OmimB101	*								
OmimA104	0.981	*							
OmimC106	0.400	0.440	*						
OmimB111	0.759	0.992	0.999	*					
OmimC122	0.174	0.326	0.998	0.332	*				
OmimC1	0.837	0.809	1.000	0.991	0.124	*			
OmimA105	0.570	0.930	1.000	1.000	0.101	0.999	*		
OmimA2	0.826	0.968	1.000	0.263	0.969	0.952	1.000	*	
OmimA103	0.996	0.744	0.999	0.593	1.000	0.040	1.000	0.997	*

Tabla 26: índices Fst y Rst por pares de clústers en *O. mimus*, FIP2008-39

	FST			RST		
	1	2	3	1	2	
1. Cluster 1	*	0.999	0.999	*	0.999	0.000
2. Cluster 2	-0.101	*	0.000	-0.075	*	0.000
3. Cluster 3	-0.086	0.042	*	0.158	0.304	*

Tabla 27: Valores del test de Wilcoxon para testear un exceso de heterocigotos significativo, aludiendo disminución de tamaño poblacional efectivo reciente (cuello de botella), para cada especie en estudio, FIP2008-39.

	Prueba de Wilcoxon (H_{null} : Exceso de heterocigotos no significativos)							
	Pulpo		Erizo		Locate		Loco	
	TPM	SMM	TPM	SMM	TPM	SMM	TPM	SMM
Cluster 1	0.633	0.633	0.843	0.963	0.688	0.891	1.000	1.000
Cluster 2	0.986	0.997	0.990	0.996	0.688	0.688	-	-
Cluster 3	0.993	0.995	-	-	-	-	-	-

Tabla 28: Parámetros de variabilidad genética en cinco loci microsátelites en los diferentes cluster en *T. chocolata*.

		TCHO1	TCHO2	TCHO3	TCHO4	TCHO5
Cluster1	N	150	150	150	150	150
	Na	31	30	37	30	39
	Rs	26	21	27	23	41
	Ho	0.840	0.440	0.787	0.920	0.633
	He	0.954	0.945	0.943	0.871	0.971
	H&W	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	F	0.117	0.533	0.163	-0.060	0.345
	Nulos	0.0568	0.2583 s	0.0788	-0.0277	0.1699
Cluster2	N	100	100	100	100	100
	Na	26	21	27	23	41
	Rs	30	28	34	27	38
	Ho	0.880	0.460	0.730	0.930	0.980
	He	0.952	0.931	0.906	0.841	0.970
	H&W	0.008	0.000	0.000	0.000	0.000
	F	0.071	0.504	0.191	-0.111	-0.015
	Nulos	0.0345	0.2422 s	0.0904 s	-0.0508	-0.0075
	Rst	0.045	0.002	0.017	0.000	0.019
	Valor-P	0.000	0.317	0.055	0.425	0.037
	Fst	0.000	0.006	0.010	0.002	-0.0001
	Valor-P	0.529	0.070	0.001	0.084	0.757

N: número de muestras utilizadas en el análisis; Na: número de alelos; Rs: Riqueza alélica; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; F: Índice de fijación; H & W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg; Nulos: porcentaje de alelos nulos obtenido a partir del algoritmo de Brookfield (1996). Valores de probabilidad significativos en negrita ($P < 0.05$).

Tabla 29: Test de ligamiento entre pares de loci en microsátelites de en *T. chocolata*, FIP2008-39.

	TCHO1	TCHO2	TCHO3	TCHO4	TCHO5
TCHO1	*				
TCHO2	1.000	*			
TCHO3	0.810	1.000	*		
TCHO4	0.713	0.802	0.981	*	
TCHO5	0.867	1.000	1.000	0.761	*

Tabla 30: Índice Fst, Rst y test exacto de diferenciación poblacional en *T. chocolata*, FIP2008-39

	FST		RST		test exacto	
	1	2	1	2	1	2
1. Cluster 1	*	0.993	*	0.118	*	0.030
2. Cluster 2	-0.079	*	0.007	*		*

Tabla 31: Parámetros de variabilidad genética en cinco loci microsatélites para el cluster identificado en *C. concholepas*.

		Cc1A2	CcA111	Cc1B6	Cc2F5	Cc2A5
Cluster1	N	500	500	500	500	500
	Na	14	14	23	43	14
	Rs	14	14	23	43	14
	Ho	0.582	0.474	0.586	0.202	0.526
	He	0.761	0.798	0.872	0.873	0.609
	H&W	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	F	0.235	0.405	0.328	0.769	0.135
	Nulos	0.1015 s	0.1798 s	0.1526 s	0.3581 s	0.0509 s

N: número de muestras utilizadas en el análisis; Na: número de alelos; Rs: Riqueza alelica; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; F: índice de fijación; H & W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg; Nulos: porcentaje de alelos nulos obtenido a partir del algoritmo de Brookfield (1996). Valores de probabilidad significativos en negrita ($P < 0.05$).

Tabla 32: Test de ligamiento entre pares de loci en microsatélites de *C. concholepas*, FIP2008-39.

	Cc1A2	CcA111	Cc1B6	Cc2F5	Cc2A5
Cc1A2	*				
CcA111	0.110	*			
Cc1B6	0.000	0.005	*		
Cc2F5	0.500	0.250	0.539	*	
Cc2A5	0.406	0.346	0.061	0.421	*

Tabla 33: Parámetros de variabilidad genética en ocho loci microsatélites para los diferentes cluster identificados en *L. albus*.

		Sea A-6	Sea C-6	Sea B-6	Sea D-116	Sea A-104	Sea A-109	Sea B-110	Sea D-1
Cluster1	N	175	175	162	168	139	110	120	160
	Na	23	20	13	12	37	16	9	11
	Rs	21	18	11	12	33	15	9	10
	Ho	0.589	0.674	0.746	0.756	0.453	0.364	0.317	0.669
	He	0.935	0.793	0.797	0.88	0.961	0.9	0.749	0.713
	H&W	0	0	0.002	0.012	0	0	0	0.032
	F	0.368	0.145	0.059	0.138	0.525	0.593	0.573	0.058
	Nulos	0.177 s	0.063	0.026	0.064 s	0.256	0.279	0.244 s	0.024
Cluster2	N	99	88	78	92	61	81	73	76
	Na	23	17	12	12	35	15	9	9
	Rs	22	16	12	12	35	15	9	9
	Ho	0.646	0.602	0.744	0.696	0.525	0.321	0.37	0.658
	He	0.933	0.731	0.787	0.871	0.964	0.844	0.715	0.699
	H&W	0	0	0.047	0.008	0	0	0	0.006
	F	0.303	0.171	0.049	0.197	0.448	0.615	0.477	0.041
	Nulos	0.146	0.071	0.021	0.091	0.218	0.28s	0.197s	0.016
	Rst	-0.002	-0.002	-0.001	0.004	-0.001	0.058	-0.005	-0.003
	Valor-P	0.616	0.507	0.469	0.165	0.55	0.000	0.857	0.663
	Fst	0.003	0.002	-0.001	0.005	0.003	0.032	0.019	0.004
	Valor-P	0.191	0.223	0.546	0.085	0.349	0.000	0.021	0.132

N: número de muestras utilizadas en el análisis; Na: número de alelos; Rs: Riqueza alélica; Ho: Heterocigosidad observada; He: Heterocigosidad esperada; F: índice de fijación; H & W: valor de probabilidad para el test de equilibrio de Hardy & Weinberg; Nulos: porcentaje de alelos nulos obtenido a partir del algoritmo de Brookfield (1996). Valores de probabilidad significativos en negrita ($P < 0.05$).

Tabla 34: Test de ligamiento entre pares de loci en microsatélites de *L. albus*, FIP2008-39.

	Sea A-6	Sea C-6	Sea B-6	Sea D-116	Sea A-104	Sea A-109	Sea B-110	Sea D-1
Sea A-6	*							
Sea C-6	0.956	*						
Sea B-6	0.925	0.224	*					
Sea D-116	0.451	0.474	0.980	*				
Sea A-104	0.114	0.341	0.258	0.208	*			
Sea A-109	0.409	0.994	0.478	0.253	1.000	*		
Sea B-110	0.569	0.759	0.108	0.678	0.948	0.298	*	
Sea D-1	0.940	0.851	0.896	0.867	0.535	0.947	0.570	*

Tabla 35: Índice Fst y Rst por par de clústers en *L. albus*, FIP2008-39.

	FST		RST	
	1	2	1	2
1. Cluster 1	*	0.998	*	0.999
2. Cluster 2	-0.005	*	-0.020	*

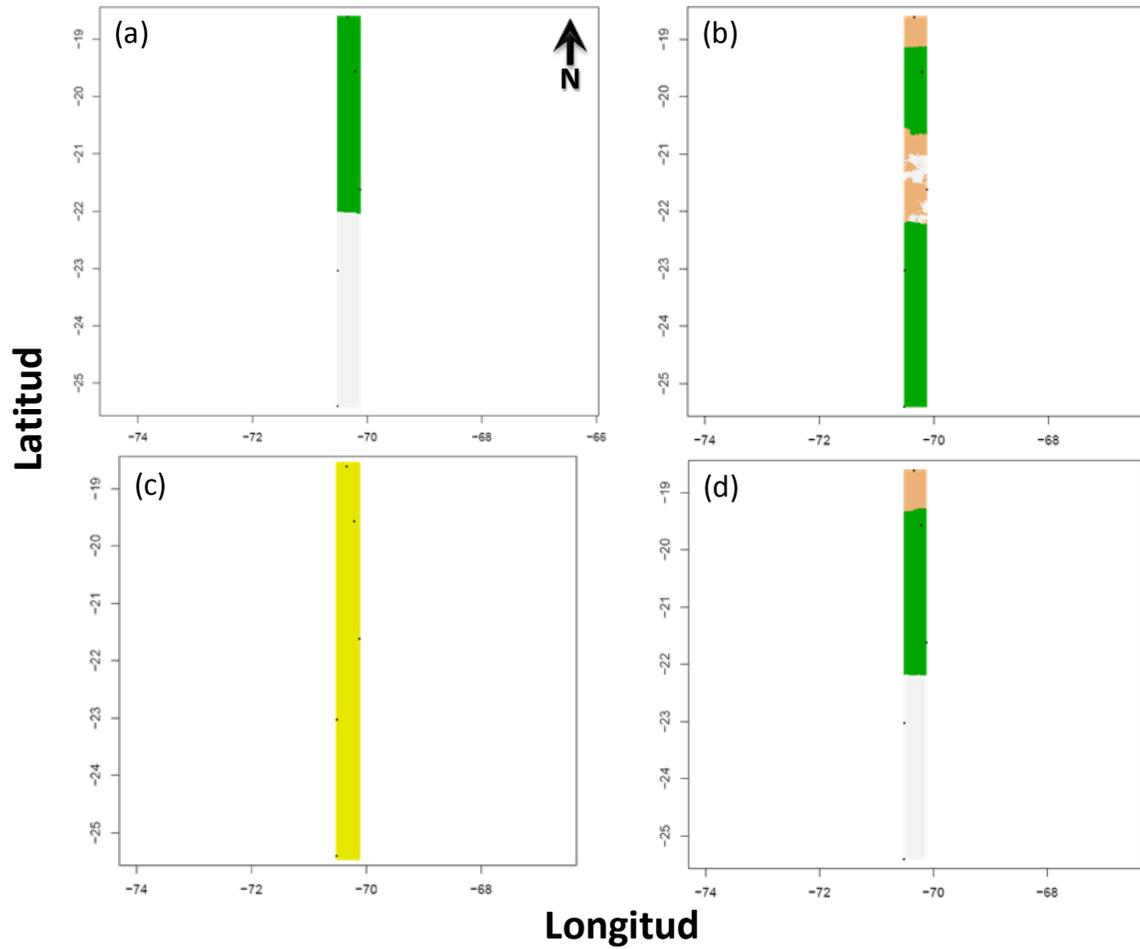


Figura 25: Mapa de distribución de las poblaciones basado en la probabilidad *a posteriori* de la asignación de la genética de individuos a los clústers geográficos para (a) Erizo, (b) Locate, (c) Loco, y Pulpo (d).

Los puntos negros indican las localidades muestreadas desde norte a sur (i.e. Clavelito, Pisagua, Punta Arenas, Punta Campamento, y Punta Sur Taltal).

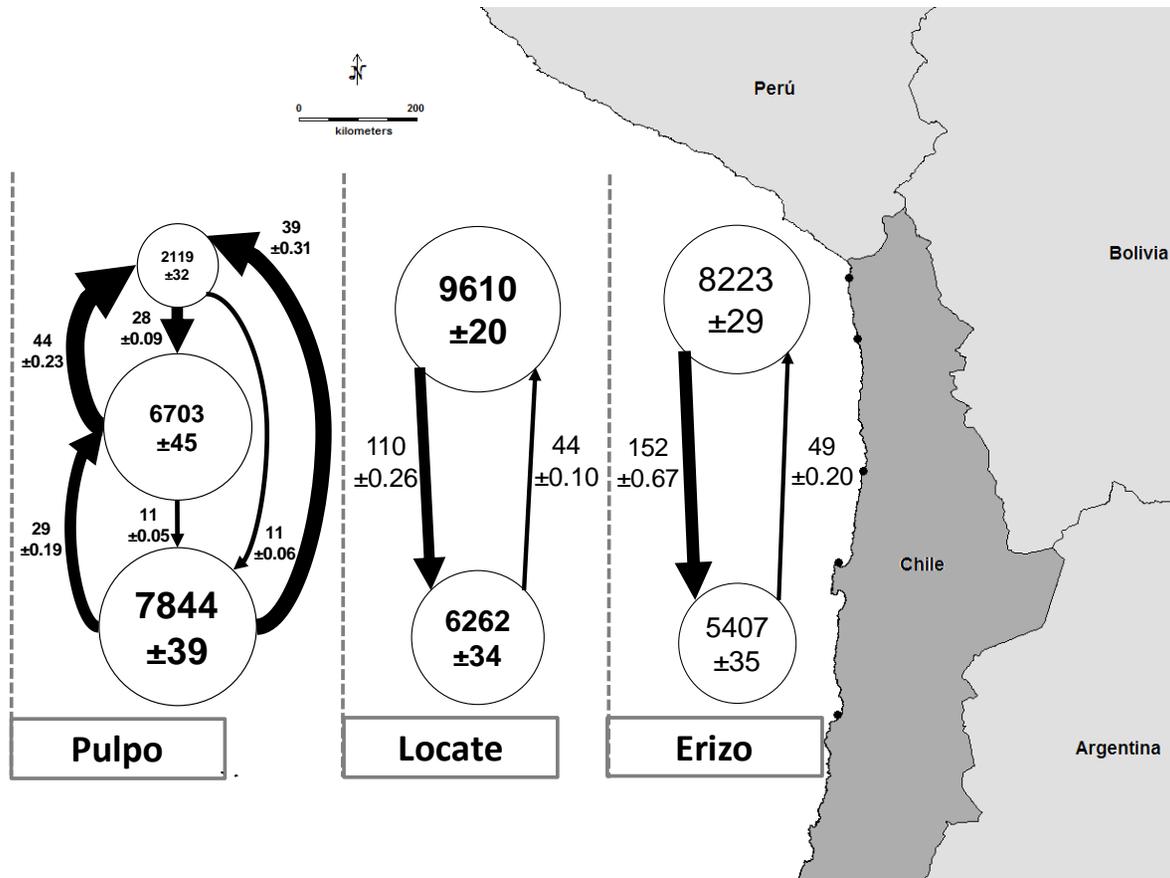


Figura 26: Resultados de los análisis realizados en MIGRATE-N en esquemas de diagrama de flujo.

Los círculos representan las poblaciones determinadas en el análisis de *Geneland*, los valores dentro de los círculos son los valores de tamaño efectivo poblacional (N_e), y los valores al lado de cada flecha la tasa de migrantes por generación (N_m). Todos los valores incluyen los respectivos errores estándar, y tanto el tamaño de los círculos como de las flechas están en proporción a los valores de los parámetros N_e y N_m .

9.- ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Octopus mimus

Los nueve loci microsátélites analizados para *O. mimus* en su distribución norte de Chile fueron altamente variables (promedio de $H_e = 0.850$). Los valores de H_e promedio de *O. vulgaris* obtenidos por Cabranes *et al.* (2008) fue 0.874, por Casu *et al.* (2002) de 0.714, y por Greatorex *et al.* (2000) de 0.765. En *O. maorum* Doubleday *et al.* (2008) obtiene una H_e de 0.850. Las diferencias entre los valores de H_e de Casu *et al.* (2002) y Greatorex *et al.* (2000) se debería principalmente a que Casu *et al.* (2002) analiza sólo un locus (*Or06*) para evaluar diferencias poblacionales y en Greatorex *et al.* (2000) está basado en un reducido número de individuos utilizados para hacer las pruebas de polimorfismo (entre 12-62). En general los valores de heterocigosidad fueron más altos en los clusters centro y sur que en el cluster norte. En términos comparativos con otros grupos de organismos marinos como por ejemplo peces con H_e promedio de 0.790, los valores aquí informados son relativamente mayores en microsátélites del género *Octopus*.

Se observaron desviaciones significativas del equilibrio de H&W en todos los clusters geográficos evidenciados para el Pulpo de Norte, observándose un exceso de homocigotos para estos loci en desequilibrio, sugiriendo patrones poblacionales de no apareamiento al azar. Otros factores como Efecto Wahlund, selección, endogamia o presencia de alelos nulos pueden provocar estas desviaciones. Un alelo nulo corresponde a la no amplificación de un alelo, debido a que la secuencia de la región flanqueante del microsátélite ha sufrido una mutación en su secuencia nucleotídica (Pemberton *et al.* 1995). La posible presencia de alelos nulos se encuentra frecuentemente en datos microsátélites de diferentes organismos marinos (ver Pemberton *et al.* 1995; e.g. Peces: Canales-Aguirre *et al.* 2010, Moluscos: Gardeström *et al.* 2008, Crustáceos: Ferrada *et al.* in press) y también reportado en cefalópodos como causa de desviaciones significativas de H&W (*L. argentinus*, Adcock *et al.* 1999; *L. opalescens*, Reichow & Smith 2001, *L. vulgaris* y *S. officinalis*, Garoia *et al.* 2004; *O. vulgaris*, Murphy *et al.* 2002, Casu *et al.* 2002, Cabranes *et al.* 2008; *O. maorum*, Doubleday *et al.* 2008;). Utilizando MICRO-CHECKER se corroboró que las desviaciones del Hardy & Weinberg correspondió a un exceso de homocigotos en algunos loci y se sugiere la presencia de alelos nulos. Aunque el algoritmo utilizado en el software sugiere la presencia de alelos nulos esto no puede ser corroborado sin conocer los genotipos de los parentales y de las generaciones (análisis de pedigrí), tanto en esta especie como en las demás involucradas en el presente proyecto.

Hay que destacar en este trabajo la estrategia de identificación de grupos genéticos poblacionales fue diferente al clásico utilizado. Los análisis tradicionales utiliza cada punto de muestreo y sobre ellos se realizan las mediciones de diversidad genética (N_a , H_o , H_e) e índices de diferenciación poblacional (F_{st} y/o R_{st} por pares). Estos parámetros poblacionales deberían ser estimados para los grupos poblacionales identificados por evidencia que vaya más allá del cada punto de muestreo. La utilización de programas computacionales que definen el número de clusters genéticos más probable de un set de datos, sin información a priori ha sido la solución a este problema. La utilidad de estas aproximaciones han tenido gran aumento en los últimos años para evaluar bajo un criterio objetivo las diferencias genéticas que presentan poblaciones (cluster genéticos), ejemplos donde utilizan esta aproximación en organismos marinos se encuentran en Galarza *et al.* 2009 y Fontaine *et al.* 2008.

Se utilizó información proveniente de nueve loci microsatélites, marcadores que tienen una alta tasa mutación y además dan cuenta de procesos microevolutivos a escala reciente. Nuestros resultados muestran una significativa diferenciación genética en el área estudiada, por tanto *O. mimus* en su distribución norte de Chile presentaría al menos tres agrupaciones genéticas poblacionales.

En general, los cefalópodos se han caracterizado por tener bajos niveles de diversidad genética (aloenzimas, Brierley et al. 1995, Triantafillos et al. 2004; ADN mitocondrial, Oosthuizen et al. 2004; RAPD, Hermosilla, 2004). En cambio, para loci microsatélites pocos son los trabajos que se enfocan en determinar cómo se distribuye la variabilidad genética en un contexto geográfico en *Octopus*, a pesar de que hay 21 especies que componen el género y la mayoría de importancia económica (Roper et al 1984). Las únicas especies estudiadas son *O. vulgaris* (Shaw et al. 1999, Casu et al. 2002; Cabranes et al. 2008) y *O. maorum* (Doubleday et al. 2008). Los resultados encontrados en este estudio no concuerdan con trabajos realizados en otras especies del grupo, *Loligo opalescens* (Reichow & Smith 2001), *Loligo vulgaris* (Garoia et al. 2004) *Sephia officinalis* (Garoia et al. 2004), *Illex argentinus* (Adcock et al. 1999) los cuales muestran homogeneidad genética poblacional en diversas escalas geográficas. No obstante en representantes del género *Octopus* habría congruencias en patrones de subdivisiones poblacionales, como es el caso de *O. vulgaris* (Shaw et al. 1999, Casu et al. 2002; Cabranes et al. 2008) y *O. maorum* (Doubleday et al. 2008). Los valores del índice de diferenciación poblacional F_{st} y R_{st} fueron significativos (AMOVA, $F_{st}=0.07$, $P<0.0001$ y $R_{st}=0.38$, $P<0.0001$), difirieron los valores del índice. Seis de los nueve loci (AMOVA locus por locus) corroboran estas diferencias significativas ($P<0.0001$).

O. mimus presenta características reproductivos particulares como ser una especie dioica con fecundación interna (para el género *Octopus* Leite et al., 2008), mayor proporción de machos que hembras, un periodo principal de desove en verano (Cardoso et al. 2004), semélpara (Zamora & Olivares, 2004), postura de huevos en racimos adheridos a grietas (Cortez et al., 1999b), cuidado parental de descendencia (Cardoso et al., 2004), merobentónico con paralarva planctónica (Doubleday et al. 2008) con fototactismo positivo (Baltazar et al., 2000). Estrategias como el cuidado parental podría generar bajos niveles de diversidad genética, como se ha demostrado en otros organismos marinos (Lassala & Renesto 2007), observándose diferencias poblacionales.

El área el cluster sur se ha caracterizado por presentar altas concentraciones de fitoplancton, riqueza de especies (Rodríguez et al. 1996) y agregaciones de zooplancton particularmente en periodos de primavera - verano cuando la surgencia se intensifica en la zona (Escribano & Hidalgo 2001, Escribano et al. 2000), concordante con el periodo de máximo desove de *O. mimus* (Cardoso et al. 2004). No hay que descartar que la eclosión de las paralarvas en periodos de intensificación de surgencia pudiera ser una estrategia para la alimentación y permanencia en esta zona rica en nutrientes. Por otro lado, se ha descrito que dado el comportamiento bentónico, asociado a rocas, aguas someras y protegidas representarían un hábitat ideal para todo tipo de pulpos bentónicos (Vega et al. 2000). En otras zonas de surgencia se han descrito procesos tales como, presencia de frentes termales que retienen masas de aguas hacia la costa (Graham & Largier 1997), circulación en doble capa que permiten flujos compensatorios en el plano vertical (Wroblewski 1982, Peterson 1998), y giros inducidos por la morfología costera (Wing et al. 1998, Hutchings et al. 1995), estos procesos estarían afectando los patrones de

diversidad observados. En otros organismos marinos como crustáceos también se ha evidenciado diferenciación genética, debido principalmente a un limitado flujo génico debido a giros oceanográficos (von der Hayden et al. 2007), reclutamiento larval relacionado a su ambiente natal (Matthee et al. 2007), circulación marina, remolinos (eddies) lentos y de larga duración (Brasher et al. 1992) o combinación de estrategias de comportamientos de distribución vertical, conjunto con corrientes superficiales y subsuperficiales diferenciales hacen que permanezcan o vuelvan al hábitat donde se encuentran los adultos (e.g., *Panulirus cygnus*, Phillips 1981).

Aunque los clusters geográficos evidenciados encuentran sustento estadístico (Cluster Norte, Centro y Sur), estos cluster no están totalmente aislados, existiendo conectividad entre ellos como lo demuestra las estimaciones de flujo génico. En términos de magnitud y dirección del flujo génico, los cluster centro y sur son los que aportan mayoritariamente al cluster norte, coincidiendo con la dirección de la corriente de Humboldt (SCH) (Escribano & Hidalgo 2001). Aunque el SCH tiene dirección sur-norte esta es de mayor profundidad (Pinet, 1998), y considerando que las paralarvas de *Octopus mimus* presentan fototactismo positivo (Baltazar et al., 2000), estas se encontrarían en la zona fótica de la columna de agua, así la SCH no influiría directamente a la conectividad sur-norte. En este sentido toma mayor importancia la corriente superficial proveniente de surgencias costeras en dirección sur-norte (Bernal et al., 1982), que podría estar facilitando la dispersión de paralarvas en distinta magnitud entre los clusters geográficos evidenciados. La conectividad encontrada (intercambio de individuos entre poblaciones) es de vital importancia para el estudio de dinámica poblacional, manejo de stock pesqueros y diseño de reservas marinas (Cowen et al. 2000). Aunque generalmente se asume que las larvas son partículas pasivas, al parecer son mucho más complejas de lo que se piensa (Cowen et al. 2000).

En el contexto de los modelos ecológicos de hábitat fuente y sumidero, un hábitat sumidero es aquel que alberga una población donde la reproducción no es suficiente para balancear la mortalidad natural (Pulliam, 1991), y que depende de la inmigración desde el hábitat fuente para su persistencia en el tiempo. Dentro de este marco el cluster sur actuaría como hábitat fuente, del cluster centro y sur que actuarían como hábitat sumidero. Mayor evidencia y análisis formales de modelamiento fuente-sumidero son necesarios para concluir respecto a este tema (e.g algoritmos implementados en Nestedness Calculator (Atmar & Patterson, 1993) y BINMATNEST 3 (Rodríguez-Gironés & Santamaría, 2006)).

La utilidad de marcadores moleculares para delinear estructuración poblacional es una herramienta que en cefalópodos debería ser más utilizada, ya que otro tipo de características, como medidas morfométricas podrían incorporar sesgo dada la plasticidad de caracteres relacionados con el crecimiento (Shaw, 1997).

Loxechinus albus

La heterocigosidad como una medida de la variabilidad genética poblacional mostró valores H_o entre (0.32-0.76) con un valor promedio de 0.54 para los ocho loci analizados en *L. albus*. Valores contenidos en este rango se han registrado para *Strongylocentrotus droebachiensis* desde estudios desde el Atlántico y Pacífico Norte, donde se observó una H_o observada promedio de 0.59 (Addison & Hart, 2004). De los ocho loci analizados en cada cluster geográfico identificado para *L. albus* todos presentaron desviaciones significativas al equilibrio de H-W, las cuales hacen referencia a un exceso de homocigotos.

Dentro de las posibles causas que explicarían la falta de heterocigosidad en los loci analizados, se encuentra la presencia de alelos nulos, esto fue evidenciado en seis de los ocho loci analizados. Cabe destacar que el locus Sea-109 que reflejo mayor porcentaje de alelos nulos en ambos grupos (cluster norte: 27,9% y cluster sur 28%), también presento las mayores diferencias entre la H_o y H_e .

Los apareamientos endogámicos también podrían estar aumentando la tasa a la cual se producen genotipos homocigos, ya que cuando $H_o < H_e$ se asume que en la población se produjeron más apareamientos endogámicos de lo que se espera por azar. Lo cual es reflejado por los valores de FIS registrados, donde queda de manifiesto un exceso significativo de homocigotos en todos los loci para los dos cluster geográficos, este exceso de homocigotos también se ha evidenciado con otros marcadores tipo RAPD (**R**andom **A**mplification of **P**olymorphic **D**NAs) y aloenzimas en *L. albus* por Vergara (2001) y en otros erizos del hemisferio norte como *Strongylocentrotus droebachiensis* (Addison & Hart 2004). Por otra parte, la deficiencia de heterocigosidad también podría ser atribuida al efecto Wahlund o la mezcla de individuos de muestreo en una amplia zona geográfica que puede incluir más de una unidad panmíctica.

Las poblaciones panmícticas son comunes para especies costeras con larvas planctotróficas, ya que esta estrategia de vida favorece el continuo flujo génico entre las poblaciones (Olivares, 2008). Sin embargo los resultados obtenidos mediante el análisis de la varianza molecular evidenciaron que los datos no soportan las hipótesis de panmixia planteada con respecto a la estructuración poblacional de *L. albus*.

Las mayores diferencias genéticas estarían produciéndose en la zona de Península de Mejillones (23°00'LS;70°24'W), lo que podría estar reflejando un hito geográfico que genera un quiebre genético significativo para *L. albus*. En relación a los valores del índice de diferenciación poblacional, el R_{st} que considera modelos de mutación para microsatélites tipo SMM (Stepwise Mutation Model; Kimura & Ohta 1978) no muestra diferencias significativas (0.003 - $p > 0.05$). A diferencia el índice F_{st} , el cual se basa en un modelo IAM (Infinite Allele Model; Kimura & Crow 1964), sí detecta diferencias genéticas leves (Balloux & Lugon-Moulin, 2002), pero significativas entre los cluster geográficos detectados por Geneland ($F_{st} = 0.008$ - $p < 0.05$). Las diferencias en resultados entre ambos estimadores se deberían a los distintos modelos de mutación que deberían evidenciar los loci desarrollados en el presente estudio. El análisis de F_{st} y R_{st} por locus mostró diferencias significativas en dos loci para el F_{st} (SeaA-109 y SeaB-110), donde el R_{st} ratifica esta diferencia para el locus SeaA-109, lo que estaría indicando que estos loci tendrían el poder suficiente como para evidenciar y reflejar las diferencias entre los clusters geográficos evidenciados.

El conocimiento genético poblacional es limitado para la especie *L. albus*, contando con información referente a isoenzimas (Espejo et al., 2004; Toro et al., 2005) y RAPDs (Vergara, 2001) a lo largo de la costa de Chile, donde no se ha observado estructuración genética poblacional. Esta ausencia de estructuración genética también ha sido informada en otras especies de erizos como *Strongylocentrotus droebachiensis* y *Strongylocentrotus franciscanus* del hemisferio norte (Debenham et al., 2000; Addison & Hart, 2004), en estos trabajos se sugiere que características como el desplazamiento y permanencia de larvas en el plancton, sumado a altas fecundidades favorecen la homogeneidad genética de una especie a través de su distribución (Burton, 1983).

Las diferencias entre los antecedentes de homogeneidad genética poblacional previa (Espejo et al., 2004; Toro et al., 2005; Vergara, 2001), y lo evidenciado en el presente estudio para *L. albus* podrían ser el resultado de la utilización de diferentes marcadores moleculares, isoenzimas con una cobertura del genoma menor al 5% y tasas de mutación que bordean las 3.3×10^{-6} mutaciones por alelo por generación, y microsatélites con coberturas del genoma del 5 al 20%, con tasas de mutación entre 10^{-2} y 10^{-6} mutaciones por locus por generación (Ellegren, 2000; Hauser & Ward, 1998). Estos últimos debido al elevado nivel de polimorfismo presentan un mayor poder para detectar estructuración genética poblacional débil pero significativa (Aranguren-Méndez et al., 2005).

Si bien *L. albus* es una especie que presenta características de historias de vida que favorecerían la homogeneidad genética poblacional, los resultados generados en el presente estudio contradicen la hipótesis de panmixia. Mecanismos causales relevantes que podrían jugar un importante rol en la estructuración poblacional evidenciada, se encuentran las características oceanográficas de la zona de estudio, tales como la corriente marina de Humboldt acompañado de los fenómenos de surgencias típicos del norte de Chile. Este fenómeno también se ha evidenciado en otras especies de erizo como *Strongylocentrotus purpuratus* del hemisferio norte y *Evechinus chloroticus* del hemisferio sur, donde la estructuración poblacional podría ser el resultado de una combinación de patrones oceanográficos locales específicos para zonas de surgencias (Lamare, 1998).

Avise (2000) menciona que los eventos locales de los océanos pueden alterar la dinámica de homogeneidad genética, lo que permite la aparición de parches genéticos, incluso en presencia de un elevado flujo de genes a través de la cobertura de una especie. La retención se ha demostrado en ambientes costeros semi-cerrados para *E. chloroticus*, donde los reclutas provienen de larvas que se han originado, mantenido y que han completado su desarrollo en el mismo lugar. Esto provocaría un reducido intercambio de larvas a través del rango de distribución geográfica de la especie, lo cual favorece la diferenciación genética poblacional (Lamare, 1998).

Los quiebres genéticos geográficos evidenciados no sólo en *L. Albus*, si no también en Locate y Pulpo del Norte en la zona de bahía Mejillones, indican que esta área sería un hito del paisaje importante en la generación de los patrones observados. Bahía Mejillones con características oceanográficas particulares, no se encuentra bajo los efectos directos de las corrientes costeras con dirección al Norte. Con una baja capacidad de exportación de material debido a su morfología “semicerrada” y a la baja velocidad de las corrientes, por lo que podría ser considerada como un núcleo de retención larval (Escribano, 1998; Ortlieb et al., 2000). Esta

bahía ha sido descrita como el accidente geográfico más importante de la costa chilena y pertenece al sistema de surgencias de Punta Angamos, descrito como el más productivo de la zona norte de Chile (Escribano, 1998; González et al., 1998; Marín & Olivares, 1999; Escribano & Hidalgo 2000; Thomas et al., 2001; Sobarzo & Figueroa, 2001). Aspectos ecológicos de la bahía de mejillones como la presencia de huirales mixtos de *Macrocystis integrifolia* y *Lessonia trabeculata* presentes en el submareal rocoso podrían favorecer la retención larval, actuando como ambientes de refugio y alimento para las comunidades de erizo (Viviani, 1978; Vásquez et al., 2001).

Según las estimaciones de dirección y magnitud del flujo génico entre clusters geográficos evidenciados para *L. Albus*, la mayor magnitud sería en dirección norte-sur favorecido por la contracorriente Chile-Perú, la cual se desplaza a través de la costa del norte de Chile en dirección sur (Fuenzalida et al., 2007). La exportación de variantes génicas en sentido norte-sur es ratificada con la mayor presencia de alelos privativos en el cluster norte, con 11 alelos cluster específico, a diferencia del cluster sur que sólo posee dos alelos cluster específico considerándose este como una submuestra del cluster norte. Este fenómeno es coherente con lo descrito por Slatkin (1985) donde alelos privados tienden a alcanzar una alta frecuencia solo cuando el número de migrantes es bajo ya que al existir menor recepción de emigrantes se favorece la mantención de alelos raros en frecuencia altas (Barton & Slatkin 1986). En el contexto de los modelos ecológicos de hábitat fuente y sumidero, un hábitat sumidero es aquel que alberga una población donde la reproducción no es suficiente para balancear la mortalidad natural (Pulliam, 1991), y que depende de la inmigración desde el hábitat fuente para su persistencia en el tiempo. Dentro de este marco el cluster norte actuaría como hábitat fuente, y el cluster sur como hábitat sumidero. Mayor evidencia y análisis formales de modelamiento fuente-sumidero son necesarios para concluir respecto a este tema (e.g algoritmos implementados en Nestedness Calculator (Atmar & Patterson, 1993) y BINMATNEST 3 (Rodríguez-Gironés & Santamaría, 2006)).

L. albus a través de su distribución en el norte de Chile, hasta los 30° LS, es ocasionalmente afectado por el fenómeno del NIÑO, aunque la magnitud del efecto no ha sido documentada. Durante el ENSO de 1982-83 una disminución de las poblaciones adheridas al sustrato se observó entre los 18° y 20°LS (Soto, 1985), así como una disminución de la densidad poblacional cerca de Antofagasta (23° y 24°LS) en relación con la mortalidad masiva de *Lessonia spp* y *Macrocystis integrifolia* (Tomicic, 1985). Durante el ENSO de 1997-98, el calentamiento de la superficie del mar fue minimizado por intensas y frecuentes surgencias costeras (González et al., 1998). Como consecuencia de ello, no se produjo mortalidades masivas de invertebrados del litoral cerca de Antofagasta. Sin embargo, las densidad de *L. albus* disminuyó durante la máxima expresión del fenómeno, tal vez debido a la migración o la mortalidad, con un aumento significativo en el reclutamiento después del evento (Vásquez, 2001). La disminución en el reclutamiento podría haber generado fuertes cambios a nivel demográfico, no obstante los resultados a partir de evidencia genética (tipo microsatélite) dan cuenta de que este tipo de fenómeno no habría provocado reducciones significativas del tamaño efectivo poblacional de *L. albus*, dado que el análisis de cuello de botella reciente para cada clusters evidenciado, no habría sido significativo para las hipótesis y modelos mutacionales de microsatélites evaluados.

Concholepas concholepas

El molusco Loco, *C. concholepas*, es uno de los recursos más ampliamente explotados por los pescadores artesanales por su extensa distribución latitudinal en el borde costero de Chile. Desde 1999 su pesquería se encuentra bajo el régimen de Áreas de Manejo de Recursos Bentónicos (AMERB), por el cual las organizaciones de pescadores artesanales se encuentran autorizados a extraer este recurso. Actualmente el 100% de las capturas de loco en Chile provienen de las AMERB acorde a un plan de manejo del área administrada por la organización y cuya cuota de extracción se establece de acuerdo a criterios biológicos. La implementación de las AMERB ha generado un ordenamiento importante en las pesquerías bentónicas así como también ha otorgado a las agrupaciones de pescadores los elementos básicos para incrementar la acción colectiva, generando nuevos negocios e ideas colaborativas. Esto ha significado además un incremento en los beneficios económicos de los pescadores artesanales. Por ejemplo, en el año 2006 la pesquería reportó divisas en US\$15,8 millones, alcanzando relevancia económica y social, y surgiendo además como un aporte al desarrollo sustentable del sector pesquero (Stotz 1997; Manriquez & Castilla 2001; Sobenes & Chávez 2007). Los pescadores artesanales en tanto han señalado como necesaria una mayor participación del gremio a fin de involucrarlos en la toma de decisiones respecto de su rol en los planes de las futuras políticas de las AMERBs (Gelcich et al. 2009)

Los resultados concuerdan con lo descrito previamente (Gallardo & Carrasco, 1996; Vergara, 2001; Cárdenas et al. 2007, 2009) en cuanto a que a través de su distribución en la costa de Chile la especie *C. concholepas* de presentaría como una gran agrupación genética, generando un solo clúster geográfico. Según Palumbi (1992) organismos como el Loco que poseen grandes tamaños poblacionales y amplios rangos de distribución geográfica tendrían en consecuencia tasas más lentas de especiación.

Es necesario, sin embargo, considerar que esta es una visión parcial del ecosistemas por la escala espacio-temporal restringida considerada y la limitada información disponible sobre los procesos ecosistémicos afectando los resultados (DeLeo & Levin 1997).

Los pescadores artesanales asociados a las AMERB, de acuerdo a investigaciones ecológicas y pesqueras, estarían suministrando una importante plataforma de capital humano y social para la conservación de la biodiversidad de los ambientes marinos de la costa de Chile. (Manriquez et al. 2001, Gelcich et al. 2008). En general los pescadores artesanales consideran sus AMERB como lugares de refugio/reclutamiento a su vez que reconocen la capacidad de carga de los ambientes. A modo de ejemplo y de acuerdo a sus experiencias y conocimiento ecológico local no consideran dentro de los planes de repoblamiento de sus AMERBs con ejemplares de *C. concholepas* debido a que estos consumirían todo el alimento disponible en el área sin alcanzar las tallas requeridas.

En el contexto de los modelos ecológicos de hábitat fuente y sumidero, y dada la homogeneidad genética evidenciada a través de la distribución geográfica analizada en el Loco, no ha sido posible realizar inferencias respecto a dinámica de fuente-sumidero (Pulliam, 1991. Mayor evidencia (e.g marcadores moleculares con valor selectivo) y análisis formales de modelamiento fuente-sumidero son necesarios para concluir respecto a este tema (e.g algoritmos implementados en Nestedness Calculator (Atmar & Patterson, 1993) y BINMATNEST 3 (Rodríguez-Gironés & Santamaría, 2006).

Thais chocolata

El nivel de flujo genético y conectividad en el ambiente marino es asociado en gran parte al ciclo de vida que presenten las especies, aquellas que presentan una fase larval dentro de su ciclo tendrían una mayor capacidad de dispersión que especies que presentan desarrollo directo y por ende un mayor flujo genético entre sus poblaciones. En invertebrados marinos la capacidad de dispersión junto con factores oceanográficos son las que explican en mayor parte el nivel de conectividad entre sus poblaciones.

En el ambiente marino, la capacidad de dispersión de las especies tiene un papel trascendental en definir la historia evolutiva de las poblaciones y por ende su patrón filogeográfico. Más aún, con la filogeografía se ha puesto a prueba el paradigma de conectividad, el cual establece una aparente ausencia de barreras a la dispersión en el ambiente marino y consecuentemente alta homogeneidad genética entre las poblaciones (Levin, 2006), siendo la presencia de una fase larval el principal factor que determina la conectividad entre poblaciones marinas. De aquí que se espera que invertebrados marinos con una etapa larval de dispersión en su ciclo de vida tengan poblaciones con baja estructuración genética, mientras que especies que carecen de esta, presentan una alta estructuración (Kyle & Boulding, 2000; Cassone & Boulding, 2006; Jonson & Black, 2006; Ayre et al., 2009; Lee & Boulding, 2009).

La capacidad de dispersión (su larva veliger permanecería 120 días en la columna de agua) otorgaría a *T. chocolata* la posibilidad de colonizar una amplia variedad de ambientes como lo que ocurre en el norte de Chile, donde destaca la presencia de la surgencia que permite la existencia de ecosistemas altamente productivos (Escribano et al., 2004), zona que también ha sido afectada por fenómenos climáticos como el Niño, proceso de gran escala que altera la diversidad y estructura comunitaria en el ambiente marino (Camus, 1990). Esta especie presenta características reproductivas tales como un desarrollo intracapsular relativamente corto (49 días), gran número de huevos por capsula (1700-3200), y una extensa fase larval de 120 días (Romero et al., 2004), lo cual causaría que muchos de los individuos de la población estén siendo responsables del reclutamiento en algún ciclo reproductivo. Esto conllevaría a que el tamaño poblacional fluctúe con el tiempo, donde solo algunos de los individuos aportan con nuevos juveniles a la generación siguiente.

La identificación de dos cluster geográficos (Clavelito y Punta Arenas; y Pisagua, Punta Campamento y Punta Sur Taltal) con los datos de genotipificación sin información *a priori*, agrupando localidades de forma intercalada se podría deber a traslocaciones realizadas por los pescadores a fin de acopiar recursos para su posterior extracción.

En el contexto de los modelos ecológicos de hábitat fuente y sumidero, un hábitat sumidero es aquel que alberga una población donde la reproducción no es suficiente para balancear la mortalidad natural (Pulliam, 1991), y que depende de la inmigración desde el hábitat fuente para su persistencia en el tiempo. Dentro de este marco el cluster norte del Erizo actuaría como hábitat fuente, y el cluster sur como hábitat sumidero. Mayor evidencia y análisis formales de modelamiento fuente-sumidero son necesarios para concluir respecto a este tema (e.g algoritmos implementados en Nestedness Calculator (Atmar & Patterson, 1993) y BINMATNEST 3 (Rodríguez-Gironés & Santamaría, 2006)).

10.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El proyecto FIP N° 2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”, es el primer esfuerzo que considera de manera conjunta los niveles de variabilidad y estructura genética en especies con distintas historias de vida, especialmente en lo referente a modos de dispersión y viabilidad del estado larval.

Basado en la evidencia molecular y los resultados obtenidos se concluye la existencia de dos agrupaciones genéticas geográficamente estructuradas para el Erizo en el área comprendida entre los 18 y 25°LS en el norte de Chile, con tamaños efectivos poblaciones mayores en la agrupación norte y flujos génicos de mayor magnitud en dirección norte-sur. Mismo patrón es observado para el Locate, sin embargo, en esta especie se destaca la presencia una discontinuidad geográfica en la zona de Pisagua, la que podría ser explicada por movimientos de ejemplares o translocaciones entre las AMERBs en estudio. En el recurso Pulpo del Norte se observan tres agrupaciones genéticas geográficamente estructuradas, y al contrario del Erizo y Locate los tamaños efectivos poblaciones van en aumento hacia el sur con un flujo génico en mayor magnitud en dirección sur-norte. En el muricido Loco, no se observan poblaciones genética o geográficamente estructuradas en el norte de Chile.

Respecto a la dinámica ecológica de hábitat fuente y sumidero, la agrupación genética geográfica norte del Erizo actuaría como hábitat fuente, y la agrupación sur como hábitat sumidero. Esta dinámica fuente-sumidero sería compartida para el recurso Locate. En el Pulpo del Norte, desde las agrupaciones genético poblacionales del sur y centro exportarían variantes genéticas (individuos) hacia el norte, de este modo las poblaciones del centro y sur actuarían como hábitats fuentes de la agrupación sumidero del norte. Mayor evidencia y análisis formales de modelamiento fuente-sumidero son necesarios para concluir respecto a este tema.

Recomendaciones emanadas desde el Taller de Discusión y Difusión

A la luz de los resultados generados se recomienda incorporar esta información en los planes de manejo y seguimientos de las AMERBs bajo estudio, teniendo en cuenta que la persistencia de las agrupaciones genéticas descritas para cada especie en estudio dependerá de diferentes factores. Un factor importante es la estabilidad en los tamaños efectivos poblacionales de aquellas agrupaciones que actúan como fuentes, y otro es el mantenimiento de los mecanismos de transporte larval que ayudarían a mantener aquellas agrupaciones donde las tasas de reproducción no serían suficientes para balancear los costos de la mortalidad natural, con efectivos poblacionales de menor magnitud.

Particular importancia debe ser atribuida a los movimientos de ejemplares entre áreas, por ejemplo con fines de repoblamiento (traslocaciones). Estos movimientos deben ser informados a las autoridades respectivas con la finalidad de mejorar las evaluaciones de los recursos en cuestión, además de monitorear y analizar los efectos a mediano y largo plazo de estos movimientos. Por otro lado, considerar la interacción con las agrupaciones de pescadores artesanales a cargo de estas AMERBs.

Se recomienda formular una segunda fase de este proyecto que permita verificar la estabilidad espacial y temporal de los patrones genéticos poblacionales evidenciados para estas especies así como otras de interés ecológico. Además incluir en los términos de referencia el análisis del patrón genético a través de toda distribución geográfica de las especies, utilizando los marcadores neutrales aquí desarrollados, y marcadores moleculares con valor selectivo que permita contrastar hipótesis relacionadas con adaptaciones locales. Por otro lado, con la finalidad de robustecer las futuras investigaciones se recomienda promover estudios de parentesco a partir de los microsatélites desarrollados en el presente estudio en el Locate, Pulpo del Norte y Erizo, para la validación de los marcadores y la determinación de los modelos de evolución de estos, que permita realizar estimaciones más robustas de flujos génicos y tamaños efectivos poblacionales.

Se recomienda incluir en los Estudios de Situación base del Área, en los Planes de Manejo, y la toma de decisiones el muestreo de ejemplares de las especies principales (u otras de interés ecológico) para establecer los parámetros de diversidad genética previo a las actividades de explotación de los recursos.

La información aquí generada es complementaria mientras no se clarifiquen/conozcan diversos aspectos de la ecología de las especies que permitan formular hipótesis con mayor información/certeza sobre los factores relevantes, además de la capacidad de dispersión de la larva, que no explican *per se* la diferenciación genética observada.

11.- REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adcock GJ, Shaw PW, Rodhouse PG, Carvalho GR. 1999. Microsatellite analysis of genetic diversity in the squid *Illex argentinus* during a period of intensive fishing. Marine Ecology Progress Series. 187: 171-178.

Addison JA, Hart MW. (2004). Analysis of population genetic structure of the green sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*) using microsatellites. Marine Biology, 144, 243-251.

An H, Han S. (2006). Isolation and characterization of microsatellite DNA markers in the Pacific abalone, *Haliotis discus hannai*. Molecular Ecology Notes 6,11-13.

Andrade C, Gonzalez J, Oliva J, Baros V, Olguin A, Leon C, Romero M, Cortes M, Cortes C (1994). Estudio del ciclo vital del recurso Locote (*Thais chocolata*), en las regiones I a IV. Informa final FIP 1994-34. Instituto de fomento pesquero. 241 pp.

Aranguren-Méndez JA, Román-Bravo R, Isea W, Villasmil Y, Jordana J (2005) Los microsatélites (STR's), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación, una revisión. Archivos Latinoamericanos de Producción Animal, 13(1), 1-6.

Arrau L (1958) Desarrollo del erizo comestible de Chile *Loxechinus albus*. Revista de Biología Marina de Valparaíso 7, 39-61.

Atmar, W & B. Patterson. 1993. The measure of order and disorder in the distribution of species in fragmented habitat. Oecologia. 96:373-382.

Avenidaño M, Cantillán M, Olivares A, Oliva M (1998) Indicadores de agregación reproductiva de *Thais chocolata* (Duclos, 1832) (Gastropoda, Thaididae) en Caleta Punta Arenas (21°38'S-70°09'W). Investigaciones Marinas, Valparaíso, 26, 15-20.

Avilez S, Lozada E (1975) Estudio histológico del ciclo reproductivo de *Concholepas concholepas* (Bruguire, 1789) en Punta Saliente, Coquimbo. Boletín de la sociedad de biología de concepción. Concepción. Chile 44, 207-218.

Avice JC (2000) Phylogeography, the History and Formation of Species. Harvard University Press, Cambridge, MA.

Ayre DJ, Minchinton TE, Perrin C (2009) Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier?. Molecular Ecology 18, 1887-1903.

Bailey K (1997) Structural dynamics and ecology of flatfish populations. Journal of Sea Research, 37,269–280.

Balguerías E, Hernández-González C, Perales-Raya C (2002). On the identity of *Octopus vulgaris* Cuvier, 1797 stocks in the Saharan Bank (Northwest Africa) and their spatio-temporal variations in abundance in relation to some environmental factors. Bulletin of Marine Science, 71,147–163.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Balguerías E, Quintero M, Hernandez-Gonzalez C (2000). The origin of the Saharan Bank cephalopod fishery. ICES Journal of Marine Science, 57,15-23.

Balloux F, Lugon-Moulin N (2002) The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology, 11(2), 155-165.

Baltazar P, Rodríguez P, Rivera W, Valdivieso V (2000). Cultivo experimental de *Octopus mimus* (Mollusca, Cephalopoda) en el Perú. Revista Peruana de Biología, 7,151-160.

Barbará T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C (2007). Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers, potential and limitations. Molecular Ecology, 16, 3759 – 3767.

Barkati S, Ahmed M (1983). Studies on reproductive biology of the nother Arabian sea II; Eggs capsules and larvae of four species of *Thais*. The Veliger, 26(1), 30-36.

Barton NH, Slatkin M (1986). A quasi-equilibrium theory of the distribution of rare alleles in a subdivided population. Heredity, 56,409–415.

Bay – Schmith E, Werlinger C, Silva J (1981) Ciclo anual de reproducción del recurso *Loxechinus albus* entre la X y XI región. Proyecto de Investigación. Subpesca. Informe final. Universidad de Concepción (Chile). 68 pp.

Berli P (2006) Comparison of Bayesian and maximum likelihood inference of population genetic parameters. Bioinformatics 22 (3), 341-345.

Begg G, Waldman J (1999) An holistic approach to fish stock identification. Fisheries Research, 43,35–44.

Bjorndal, K & A. Bolten. 2008. Annual variation in source contributions to a mixed stock, implications for quantifying connectivity. Molecular Ecology. 17, 2185 – 2193.

Bonnaud, L; R. Boucher-Rodoni & M. Monnerot. 1997. Phylogeny of Cephalopods Inferred from Mitochondrial DNA Sequences. Molecular Phylogenetics and Evolution 7,44-54.

Brasher DJ, Ovenden JR, Booth JD, White RWG. 1992. Genetic subdivision of Australian and New Zealand populations of *Jasus verreauxi* (Decapoda, Palinuridae) – preliminary evidence from the mitochondrial genome. New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research. 26: 53–58.

Brierley, A. N., P. G. Rodhouse, J. P. Thorpe and M. R. Clarke. 1995. Genetic variation in the neritic squid *Loligo forbesi* (Myopsida: Loliginidae) in the northeast Atlantic Ocean. Marine Biology. 122: 79–86.

Brierly, A; G. Rodhouse; J. Thorpe & R. Clarke. 1993. Genetic evidence of population heterogeneity and cryptic speciation in the ommastrephid squid *Martialia hyadesi* from the Patagonian shelf and Antarctic Polar Frontal Zone. Marine Biology 116,593-602.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Burton RS (1983). Protein polymorphisms and genetic differentiation of marine invertebrate populations. *Marine biology letters*, 4, 193–206.

Cabranes C, Fernandez-Rueda P, Martínez JL. 2008. Genetic structure of *Octopus vulgaris* around the Iberian Peninsula and Canary Islands as indicated by microsatellite DNA variation. – *ICES Journal of Marine Science*, 65: 12–16.

Camus PA (1990) Procesos regionales y fitogeografía en el pacífico suroriental: el efecto de “El Niño – Oscilación del sur”. *Revista Chilena de Historia Natural*, 63, 11-17.

Canales-Aguirre CB, Ferrada S, Galleguillos R. 2010. Isolation and characterization of microsatellite loci for the jack mackerel (*Trachurus murphyi* Nichols, 1920). *Conservation Genetics*. 11: 1235-1237.

Cañete J. 1992. Capsulas ovigeras de 5 especies de neogastropodos de la zona norte de Chile. *Bol. Soc. Biol. Concepcion. Chile* 63,43-49.

Cárdenas, L, Daguin, C, Castilla, JC, & Viard F 2007, ‘Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite markers for the marine gastropod *Concholepas concholepas* (Brugière, 1789)’, *Molecular Ecology Notes* vol. 7, pp 464 - 466.

Cardoso, F; P. Villegas, C. Estrella. 2004. Observaciones sobre la biología de *Octopus mimus* (Cephalopoda, Octopoda) en la costa peruana. *Revista Peruana de Biología* 11,45 - 50.

Carlson, D & C. Lippé. 2007. Eleven new microsatellite markers for the tropical sea urchin *Tripneustes gratilla* and cross-amplification in *Tripneustes ventricosa*. *Molecular Ecology Notes*. 7, 1002-1004.

Carvalho, G; & L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev Fish Biol Fish* 4,326–350.

Carvalho, G; A. Thompson & A. Stoner. 1992. Genetic diversity and population differentiation of the shortfin squid *Illex argentinus* in the south-west Atlantic. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol* 158,105-121.

Cassone, B. & Boulding E.G. 2006. Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology* 149, 213–226.

Castilla, J. & J. Cancino. 1976 Spawning behavior and egg capsule of *Concholepas concholepas* (Mollusca, Gastropoda, Muricidae. *Marine Biology* 37, 255-263.

Castilla, J. & O. Defeo. 2001. Latin American benthic shellfisheries, emphasis on co-management and experimental practices. *Reviews in Fish Biology and Fisheries* 11, 1 – 30.

Castilla, J. 1974. Notes on mating behavior of *Concholepas concholepas* (Mollusca, Gastropoda, Muricidae. *Veliger* 16, 291-292.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Casu M, Maltagliati F, Meloni M, Casu D, Cossu P, Binelli G, Curini-Galletti M, Castelli A. 2002. Genetic structure of *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda) from the Mediterranean Sea as revealed by a microsatellite locus. Italian Journal of Zoology, 69: 295–300.

Chenuil, A; L. Gac & M. Thierry. 2003. Fast isolation of microsatellite loci of very diverge repeat motifs by library enrichment in echinoderm species, *Amphipholis squamata* and *Echinocardium cordatum*. Molecular Ecology Notes. 3, 324-327.

Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar (COLACMAR). San Sebastián, Colombia.

Cortez, T., A. González, & A. Guerra. 1999b. Growth of *Octopus mimus* (Cephalopoda, Octopodidae) in wild populations. Fisheries Research 42,31 - 39.

Cortez, T; A. González, & A. Guerra. 1999a. Growth of cultured *Octopus mimus* (Cephalopoda, Octopodidae). Fisheries Research 40,81 - 89.

Cowen RK, Lwiza KMM, Sponaugle S, Paris CB, Olson DB. 2000. Connectivity of Marine Populations: Open or Closed?. Science. 287: 857-859

Cross, K & M. Sanjayan. 2006. Connectivity conservation, maintaining connections for nature. En, Connectivity Conservation. Editores, Cross, K & M. Sanjayan. 1-19. Cambridge University Press, Cambridge.

De los Angeles Barriga Sosa, I., K. Beckenbach, E. Hartwick & M. Smith. 1995. The molecular phylogeny of five eastern North Pacific *Octopus* species. Molecular Phylogenetics and Evolution 4,163-174.

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

Disalvo, L 1988, ‘Observation on the larval and postmetamorphic life of *Concholepas concholepas* (Bruguere, 1789) in laboratory culture’, The veliger 30: 358 - 368.

Doubleday, Z; J.Semmens; A. Smolenski & P. Shaw. 2009. Microsatellite DNA markers and morphometrics reveal a complex population structure in a merobenthic *Octopus* species (*Octopus maorum*) in south-east Australia and New Zealand. Marine Biology., 156:6, 1183-1192

Dupanloup, I, Schneider, S & Excoffier L 2002, ‘A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations’, Molecular Ecology vol. 11, no 12, 2571-2581.

Ellegren H. 2000. Heterogeneous mutation processes in human microsatellite DNA sequences. Nature Genetics. 24:400–402.

Escribano R, Hidalgo P. 2000. Spatial distribution of copepod in the north of the Humbolt Current region off Chile during coastal upwelling. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 80: 283-290

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Escribano R, Rosales SA, Blanco JL. 2004. Understanding upwelling circulation off Antofagasta (northern Chile): A three-dimensional numerical modeling approach. *Continental Shelf Research* 24, 37–53

Escribano R.. 1998. Population dynamics of *Calanus chilensis* in the Chilean Eastern Boundary Humboldt Current. *Fisheries Oceanography*, 7, 245-251.

Escribano, R & P. Hidalgo. 2001. Circulación inducida por el viento en Bahía de Antofagasta, norte de Chile 23° S. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*. 36.1: 43-60.

Espejo, A. Galleguillos R. & Ferrada S. 2003. Isozyme analysis in the sea urchin *Loxechinus albus*. In *Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture*, J. M Lawrence & O.

Excoffier, L, Laval, G, & Schneider S 2005, ‘Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis’, *Evolutionary Bioinformatics Online* vol. 1, pp 47 – 50.

FAO. 1996. Report of the Expert Consultation on Small-Scale Rural Aquaculturepp. Fishery Report N°548 FIRI/R548, Rome, Italy, 28 - 31 May.

Faraj, A; & N. Bez. 2007. Spatial considerations for the Dakhla stock of *Octopus vulgaris*, indicators, patterns, and fisheries interactions. *ICES J. Mar. Sci.* 64,1820-1828.

Ferrada S, Canales-Aguirre CB, Galleguillos R, Barrera A, Gallardo JA. In press. Development of microsatellite markers in the *Caligus rogercresseyi* (Boxshall & Bravo, 2000) (Copepoda, Caligidae). *Crustaceana*.

FIP N° 2003-22. 2003. Informe Final. Caracterización ecológica y Pesquera del área de reserva artesanal entre la I y II regiones. Ejecutor IFOP. 495 pp.

Forster, P; A. Torroni; C. Renfrew & A. Röhl. 2001. Phylogenetic star contraction applied to Asian and Papuan mtDNA evolution. *Mol Biol Evol.* 18,1864-1881

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

Fuenzalida R, Schneider W, Blanco JL, Garcés-Vargas J, Bravo L (2007) Sistema de Corrientes Chile-Perú y masas de agua entre Caldera e Isla de Pascua. *Ciencia y Tecnología del Mar*, 30(2), 5-16.

Galarza JA, Carreras-Carbonell J, Macpherson E, Pascual M, Roques S, Turner GF, Ricod C. 2009. The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 106: 1473-1478.

Gallardo, C 1973, ‘Desarrollo intracapsular de *Concholepas concholepas* (Bruguiere) (Gastropoda Muricidae)’, *Museo Nacional de Historia Natural* vol. 16 pp 1 - 16.

Gallardo, C 1979, ‘El ciclo vital del Muricido *Concholepas concholepas* y consideraciones sobre sus primeras fases de vida en el bentos’, *Biología Pesquera* vol. 12 pp 79 - 103.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Gallardo, C. 1989. Patrones de reproducción y ciclo vital en moluscos marinos benticos; una aproximación ecologico evolutiva. *Medio ambiente* 10(2), 25-35.

Gallardo, M & Carrasco J 1996, ‘Genetic cohesiveness among natural populations of *Concholepas concholepas* (Gastropoda, Muricidae) in Southern Chile’, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* vol. 197, pp 237 - 249.

Gallardo-Escárate, C; J. Álvarez-Borrego; E. Brand-Skopnik & M. Río-Portilla. 2005. Genome size estimation in two populations of the northern Chilean scallop, *Argopecten purpuratus*, using fluorescence image analysis. *Journal of Shellfish Research* 24,55 - 60.

Gardeström J, Pereyra RT, Andre C. 2008. Characterization of six microsatellite loci in the Baltic blue mussel *Mytilus trossulus* and cross-species amplification in North Sea *Mytilus edulis*. *Conservation Genetics*. 9:1003-1005.

Garoia F, Guarniero I, Ramžak A, Ungaro N, Landi M, Piccinetti C, Mannini P, Tinti F. 2004. Microsatellite DNA variation reveals high gene flow and panmictic populations in the Adriatic shared stocks of the European squid and cuttlefish (Cephalopoda). *Heredity*. 93: 166-174.

Garrido, O & Gallardo C 1993, ‘Ultraestructura de la cápsula ovífera de *Concholepas concholepas* (Brugiere, 1789) (Gastropoda:Muricidae). *Revista de Biología Marina* vol. 28, no. 2, pp 191-201.

Gebauer, P & C. Moreno. 1995. Experimental validation of the growth rings of *Loxechinus albus* (Molina, 1782) in southern Chile (Echinodermata, Echinoidea). *Fisheries Research*. 21, 423 – 435

Gebauer, P. 1992. Validación experimental de los anillos de crecimiento de *Loxechinus albus* (Molina, 1782) (Echinodermata, Echinoidea) en la reserve marina de Mehuin. Chile. Tesis, Esc. Biología Marina, Univ. Austral de Chile. 66 pp.

Gelcich, S, Godoy, N & Castilla JC 2009, “Artisanal fishers’ perceptions regarding coastal co-management policies in Chile and their potentials to scale-up marine biodiversity conservation *Ocean & Coastal Management* 52, pp 424–432.

Gelcich, S, Godoy, N, Prado, L, & Castilla JC 2008, “Add-on conservation benefits of territorial marine user right fishery in Central Chile’ *Ecological Applications* 18(1) pp 273-281.

Gelman, A., J. Carlin; H, Stern & D. Rubin. 1995. *Bayesian Data Analysis*. Chapman and Hall, London.

Glaubitz, J 2004, ‘CONVERT: A user-friendly program to reformat diploid genotypic data for commonly used population genetic software packages’, *Molecular Ecology Notes* vol. 4, pp 309 - 310.

González HE, Daneri G, Figueroa D, Iriarte JL, Lefevre N, Pizarro G, Quiñónez R, Sobarzo M, Troncoso A (1998) Producción primaria y su destino en la trama trófica pelágica y océano profundo e intercambio océano-atmósfera de CO2 en la zona norte de la corriente de

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Humboldt (23° S), posibles efectos del evento El Niño, 1997-98 en Chile. Revista Chilena de Historia Natural, 71, 429-458.

González J, Tapia C, Alfaro W, Stotz W, Orensanz JM, Parma A, Valero J, Catrileo M, Garrido J (2005) Bases Biológicas para la evaluación y manejo de metapoblaciones de loco en la III y IV Regiones. Proyecto FIP 2002-16, 338pp.

González, H; J. Castilla & C. Guisado. 1987. Effect of larval diet and rearing temperature on metamorphosis and juvenile survival of the sea urchin *Loxechinus albus* (Molina, 1872) (Echinodermata, Echinoidea). Journal of Shellfish Research. 6, 109 – 115.

Gonzalez, J; A. Olguin, E. Figueroa, H. Miranda, G. Jerez & C. Cortes. 1996. Análisis de la pesquería de los recursos lapa, jaiba y pulpo de la III y IV regiones. Informe Final FIP 96/48, 230 pp.

Goudet, J. 1995. Fstat , Version 1.2 a program for IBM PC compatibles to calculate Weir and Cockerham`s estimators of *F*-statistics. Journal of Heredity 86, 485-486.

Gouin, N; F. Grandjean & C. Souty-Grosset. 2006. Population genetic structure of the endangered crayfish *Austropotamobius pallipes* in France based on microsatellite variation, biogeographical inferences and conservation implications. Freshwater Biology. 51, 1369-1387.

Gould, A. 1882. Mollusca and shells. Pp. 473-474 in Gould, and Lincoln, eds. United States Exploring Expedition 1823-1842, Under the Command of Charles Wilkes, Washington, DC.

Graham W, Largier JL. 1997. Upwelling shadows as nearshore retention sites: the example of northern Monterey Bay. Continental Shelf Research. 17:509-532.

Greatorax, E; C. Jones; J. Murphy; L. Key; A. Emery & P. Boyle. 2000. Microsatellite markers for investigating population structure in *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda). Molecular Ecology 9,641-642.

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

Guillot G. & M. Foll. 2009. Accounting for the ascertainment bias in Markov chain Monte Carlo inferences of population structure. Bioinformatics, 25(4): 552-554.

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

Guillot G., F. Mortier, & A. Estoup. 2005b. Geneland: A computer package for landscape genetics. Molecular Ecology Notes, 5(3): 708-711.

Guillot G., F. Santos, & A. Estoup. 2008. Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. Bioinformatics, 24(11): 1406-1407.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

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

Guiñez, R, Gómez, M, & Castilla JC 1992, ‘Diferenciación genética poblacional en *Concholepas concholepas* (Brugiere, 1789) (Gastropoda, Muricidae) en su área de distribución centro-norte’, *Biología Pesquera* vol. 21, pp 31 - 41.

Guisado, Ch & Castilla JC 1983, ‘Aspects of the ecology and growth of an intertidal juvenile population of *Concholepas concholepas* (Brugiere, 1789) (Mollusca, Gastropoda, Muricidae) at Las Cruces’, *Marine Biology* vol. 78, pp 99 - 103.

Guisado, Ch. & JC. Castilla. 1987. Historia de vida, reproducción y avances en el cultivo de erizo comestible chileno *Loxechinus albus* (Molina, 1780) (Echinoidea, Echinidae). pp. 59-68. En, P. Arana (ed) Jornadas en Pesquerías Chilenas, 7ª/Universidad Católica de Valparaíso. Manejo y Desarrollo Pesquero. Valparaíso, Universidad Católica de Valparaíso, 1987. 249pp.

Gutierrez-Gonzalez, J; & R. Perez-Enriquez. 2005. A genetic evaluation of stock enhancement of blue abalone *Haliotis fulgens* in Baja California, Mexico. *Aquaculture* 247,233-242.

Guzman (Eds). Proceedings of the International Conference on Sea-Urchin Fisheries and Aquaculture, Puerto Varas, Chile, March 25-27, 2003. DEStech Publications Inc., Lancaster, Pennsylvania, 3-17.

Guzmán N; S. Saa & L. Ortleb. 1998. Catalogo descriptivo de los moluscos litorales (Gastropoda y Pelecypoda) de la zona de Antofagasta 23°C., Chile. *Estudios Oceanologicos* 17,17-86.

Guzmán, L, Rios, C, Ibarra, M, & Oyarzún S 1987, ‘Investigación bancos de ostiones y locos. 1. Recurso “loco” *Concholepas concholepas* (Brugiere, 1789)’, Informe Instituto de la Patagonia.

Guzman, N, Dauphin, Y, Cuif, JP, Denis, A, & Ortleb L 2008, ‘Diagenetic changes in *Concholepas concholepas* shells (Gastropoda, Muricidae) in the hyper-arid conditions of Northern Chile - implications for palaeoenvironmental reconstructions’, *Biogeosciences Discuss* vol. 5, pp 501 - 530.

Hall T (2004) BioEdit 7.0, a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95, 98, NT or 2000. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41,95-98.

Hartl DL (1980) *Principles of Population Genetics*, Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Massachusetts, United State.

Hartl DL, Clark AG (2007) *Principles of Population Genetics*, Sinauer Associates. Inc. Sunderland, Massachusetts, United State.

Hauser L, Ward RD (1998) Population identification in pelagic fish, the limits of molecular markers. In, Carvalho, G.R. (Ed.), *Advances in Molecular Ecology*. IOS Press, pp. 191-224.

Havenhand, JN 1995, ‘Evolutionary ecology of larval types’, in L McEdward (ed) *Ecology of marine invertebrate larvae*, Boca Raton FL. CRC Press pp 79–122.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Hayashi, T. 1999. Genetic Differentiation between the Two Forms of *Thais clavigera* (Kuster, 1858) (Mollusca, Gastropoda) in Tanabe Bay, Central Japan. *Zoological Science*. 19, 81-86.

Hermosilla C. 2004. Morphological and genetic variation between populations of red octopus *Enteroctopus megalocyathus* (cephalopoda, octopoda) in southern Chile and Argentina Degree. School of Marine Biology, Santiago

Herrera, G & Alvial A 1983, ‘Talla mínima de madurez gonádica en poblaciones de *Concholepas concholepas* (Bruguire, 1789. Mollusca: Gastropoda: Muricidae) en Iquique, Chile’, *Memorias de la Asociación Latinoamericana de Acuicultura*, vol. 5, n° 2, pp 289 - 293.

Hey, J & R. Nielsen. 2007. Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *PNAS* 104, 785–2790.

Higgins, D; J. Thompson T. & Gibson. 1996. Using CLUSTAL for multiple sequence alignment. *Methods in Enzymology* 266, 383-402.

Holland, B; K. Huber; T, Moulton & P. Lockhart. 2004 .Using consensus networks to visualize contradictory evidence for species phylogeny. *Mol. Biol. Evol.* 21, 1459-1461.

Huelsenbeck, J; F. Ronquist; R. Nielsen & J. Bollback. 2001. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. *Science* 294, 2310-2314.

Huson, D. & D. Bryant. 2006. Application of Phylogenetic Networks in Evolutionary Studies. *Mol. Biol. Evol.*, 23(2), 254-267.

Hutchings L, Pitcher GC, Probyn TA, Bailey GW. 1995. The chemical and biological consequences of coastal upwelling. In C.P. Summerhayes, K.-C. Emeis, M.V. In. Angel, R.L. Smith & B. Zeitzschel (eds), *Upwelling in the Ocean: Modern Processes and Ancient Records*. John Wiley & Sons, New York. pp. 65-82.

Iglesias, J; J. Otero, C. Moxica, L. Fuentes & J. Sánchez. 2004. The completed life cycle of the octopus (*Octopus vulgaris*, Cuvier) under culture conditions, paralarval rearing using *Artemia* and zoeae, and first data on juvenile growth up to 8 months of age. *Aquaculture International* 12, 481–487.

Jara, F & Moreno C 1983, ‘Calendario de reclutamiento de organismos epibentónicos móviles de la zona mesomareal de Mehuin, Chile’, *Medio Ambiente* vol. 6, no. 2, 72 - 79.

Johnson MS, Black R (2006) Effects of mode of reproduction on genetic divergence over large spatial and temporal scales in intertidal snails of the genus *Bembicium Philippi* (Gastropoda: Littorinidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 89, 689-704

Kassahn, K; S. Donnellan; A. Fowler; K. Hall; M. Adams & P. Shaw. 2003. Molecular and morphological analyses of the cuttlefish *Sepia apama* indicate a complex population structure. *Marine Biology* 143,947–962.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Kawai K; R. Hughes & O. Takenaka. 2001. Isolation and characterization of microsatellite loci in the marine gastropod *Nucella lapillus*. *Molecular Ecology Notes* 1, 270-272.

Kimura, M. & Crow, J. (1964). The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49, 725-738.

Kimura, M & Ohta T 1978, ‘Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in finite populations’, *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, vol. 75, pp 2868-2872.

Kuhner, M. 2006. LAMARC 2.0, maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatic*, 22, 768–770.

Kuhner, M.K. and Felsenstein, J. 2000. Sampling among haplotype resolutions in a coalescent-based genealogy sampler. *Genet. Epidemiol.*, 19, Suppl. 1, S15–S21.

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

Laird, P; A. Zijderveld; K. Linders; M. Rudnicki; R. Jaenisch & A. Berns. 1991. Simplified mammalian DNA procedure. *Nucleic Acid Research* 19, 4293.

Lamare M. D. 1998. Origin and transport of larvae of the sea urchin *Evechinus chloroticus* (Echinodermata, Echinoidea) in a New Zealand fiord. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 174, 107–121.

Lambert, WJ, Todd, CD, & Thorpe JP 2003, ‘Genetic population structure of two intertidal nudibranch molluscs with contrasting larval types: temporal variation and transplant experiments’, *Marine Biology* vol. 42, pp 461 – 471.

Lara, E, Díaz, E, González J, Jerez, J, Baros, G, Becerra, V, Toledo, C, Gaspar, C & Padilla. 2007, ‘Comportamiento y parámetros reproductivos de Loco en la I y II Regiones’ Proyecto FIP 2005-32, pp 35.

Larraín, A. 1975. Los equinoideos regulares fósiles y recientes de Chile. *Gayana Zoo.*, Chile, 35, 1- 189.

Lassala MDP, Renesto E. 2007. Reproductive strategies and genetic variability in tropical freshwater fish. *Genetics and Molecular Biology.* 30: 690-697.

Lee HJ, Boulding EG (2009) Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology* 18, 2165–2184.

Lee, Y; M. Song; S. Lee; R. Leon; S. Godoy & I. Cañete. 2004. Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the south American sea urchins. *Antarctic Science* 1, 29 – 36.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Leite, T; M. Haimovic; W. Molina & K. Warnke. 2008. Morphological and genetic description of *Octopus insularis*, a new cryptic species in the *Octopus vulgaris* complex (Cephalopoda, Octopodidae) from tropical southwestern Atlantic. . Journal of Molluscan Studies 74.

Lépez, I 1987 ‘Ecología intermareal de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789) bajo dos regímenes de intervención antrópica. Tesis de Magíster, Universidad Austral de Chile.

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

Liu, L; D. Foltz & W. Stickle. 1991. Genetic population structure of the southern oyster drill *Stramonita* (= *Thais*) *haemastoma*. Marine Biology 111, 71-79.

Longmire, J; A. Lewis; N. Brown; J. Buckingham; L. Clark; M. Jones; M. Meincke; L. Meyne; J, Ratliff; R. Ray; F. Wagner & R. Moyzis. 1988. Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. Genomics 2,14-24.

Lozada, E, López, M, & Desqueyroux R 1976, ‘Aspectos Ecológicos de Poblaciones chilenas de loco *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789)(Mollusca, Gasteropoda, Muricidae)’, Biología Pesquera, vol. 8, pp 5 - 29.

Manel, S; M. Schwartz; G. Luikart, & P. Taberlet. 2003. Landscape genetics, Combining landscape ecology and population genetics. Trends in Ecology and Evolution 18,189-196

Mangold, K & F. Hochberg. 1991. Defining the genus *Octopus*, redescription of *Octopus vulgaris*. Bull. Mar. Sci. 49,665.

Mangold, K. 1997. *Octopus vulgaris*, review of the biology. Pp. 85-90. in M. A. Lang, and F. G. Hochberg, eds. Proceeding of the Workshop on The Fishery and Market Potential of Octopus in California. Smithsonian Institution, Washington D.C.

Manríquez, P & Castilla JC 2001, ‘Significance of marine protected areas in central Chile as seeding grounds for the gastropod *Concholepas concholepas*’, Marine Ecology Progress Series vol. 215, pp 201–211.

Marín V & G Olivares. 1999. Estacionalidad de la productividad primaria en bahía Mejillones del Sur (Chile), una aproximación proceso-funcional. Revista Chilena de Historia Natural 72, 629-641.

Matthee CA, Cockcroft AC, Gopal K, von der Heyden S. 2007. Mitochondrial DNA variation of the west-coast rock lobster, *Jasus lalandii*: marked genetic diversity differences among sampling sites. Marine and Freshwater Research. 58: 1130–1135

Méndez, M & Cancino J 1992, ‘Crecimiento de ejemplares postmetamorficos de juveniles de *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789) en condiciones de laboratorio. Efecto de la densidad, dieta y temperatura’, Biología Pesquera vol. 21, pp 21 - 30.

Michaël C Fontaine MC, Baird SJE, Piry S, Ray N, Tolley KA, Duke S, Birkun Jr A, Ferreira M, Jauniaux T, Llavona Á, Öztürk B, Öztürk AA, Ridoux V, Rogan E, Sequeira M, Siebert U,

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Vikingsson GA, Bouquegneau J-M, Michaux JR. 2007. Rise of oceanographic barriers in continuous populations of a cetacean: the genetic structure of harbour porpoises in Old World waters. BMC Biology, 2007.doi:10.1186/1741-7007-5-30

Miranda, B. 1967. Edad y grupos modales en *Thais chocolata*, una descripción de los métodos usados. Apuntes Oceanología 3, 1-25.

Miranda, B. 1975. Crecimiento y estructura poblacional de *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1823) en Bahía Mejillones del Sur, Chile. Revista de Biología Marina Montemar. 15(3), 263-286.

Moreno C, Asencio, G, & Ibañez S 1993, ‘Patrones de asentamiento de *Concholepas concholepas* (Brugière)(Mollusca: Muricidae) en la zona intermareal rocosa de Valdivia, Chile’ Revista Chilena de Historia Natural vol. 63, pp 93 – 101.

Moreno, C & Reyes A 1988, ‘Densidad de *Concholepas concholepas* (Mollusca) en la Reserva Marina de Mehuín: Evidencias de fallas en el reclutamiento’, Biología Pesquera vol. 17, pp 31 - 38.

Morgan, ST 1995, ‘Life and death in the plankton: larval mortality and adaptation’, in McEdward L (ed) Ecology of marine invertebrate larvae, CRC Press, Boca Raton, Florida, USA), pp 279 - 322.

Muñoz, C; C. Brieba; E. Cristian & C. Castro. 1999. Variabilidad genético-morfométrica en el gastrópodo *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832) en la primera región, Chile. VIII Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar (COLACMAR). Trujillo, Perú.

Muñoz, C; C. Castro; C. Elizalde & C. Brieba. 2001. Diversidad genética en dos especies del género *Thais*, *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832) y *Thais (Stramonita) haemastoma* (Linnaeus, 1767), presentes en la zona norte de Chile. IX

Murphy JM, Balguerías E, Key LN, Boyle PR. 2002. Microsatellite DNA markers discriminate between two *Octopus vulgaris* (Cephalopoda: Octopoda) fisheries along the Northwest African Coast. Bulletin of Marine Science. 71: 545–553.

Murray, V. 1989. Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucleic Acid Research 17, 88-89.

Nesis, K. 1987. Cephalopods of the world. Squids, cuttlefishes, octopuses and allies. TFH Publications, Neptune City, New Jersey.

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

Olguín, A & G. Jerez. 2003. Chile. Especies Bentónicas de Importancia Comercial.

Olivares Banuelos Nadia C., Enríquez Paredes Luis M., Ladah Lydia B., et al. 2008. Population structure of purple sea urchin *Strongylocentrotus purpuratus* along the Baja California peninsula. Fisheries Science. Vol. 74, 4 p. doi,10.1111/j.1444 2906.2008.01592.x (PA, 72924)

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Olivares-Paz, A; J. Quinteiro & M. Rey-Méndez. 2006. Autenticación de lapas del género *Fissurella* (Mollusca, Vetigastropoda) en la costa chilena, mediante PCR-RFLP. Investigaciones Marinas 34,113 - 118.

Oosthuizen A, Jiwaji M, Shaw P. 2004. Genetic analysis of the *Octopus vulgaris* population on the coast of South Africa. South African Journal of Science 100: 603-607.

Oosthuizen, A. 2003. A development and management framework for a new *Octopus vulgaris* fishery in South Africa. 203 pp. Rhodes University, Rhodes.

Ortlieb L, R Escribano, R Follegati, O Zúñiga, I Kong, L Rodríguez, J Valdés, N Guzmán & P Iratchet. 2000. Oceanclimatic changes during the last 2000 years in a hypoxic marine environment of Northern Chile (23°S). Revista Chilena de Historia Natural 73: 221-242.

Osorio, C. 1979. Moluscos marinos de importancia económica en Chile. Biología Pesquera, Chile. 11, 3-47.

Osorio, C. 2002. Moluscos marinos en Chile, especies de importancia económica. Guía para su identificación. Facultad de Ciencias, Universidad de Chile Press, Chile.

Pagel, M & A. Meade. 2004. A Phylogenetic Mixture Model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character-state data. Systematic Biology, 53 (4), 571–581.

Palumbi, SR 1992, ‘Marine speciation on a small planet?’, Trends in Ecology and Evolution vol. 7, pp 114-118.

Pemberton JM, Slate J, Bancroft DR, Barret JA. 1995. Nonamplifying alleles at microsatellite loci: a caution for parentage and population studies. Molecular Ecology. 4: 249-252.

Peterson W. 1998. Life cycle strategies of copepods in coastal upwelling zones. Journal of Marine Systems 15: 313-326.

Piry, S; A. Alapetite; J. Cornuet; D. Paetkau; L. Baudouin & A. Estoup. 2004. GeneClass2, A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. Journal of Heredity 95,536-539.

Polzin, T & S. Daneschmand. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. Operations Research Letters 31,12-20

Posada, D & K. Crandall. 2001. Intraspecific gene genealogies, trees grafting into networks. Trends Ecol. Evol. 16, 37-45.

Posada, D; K. Crandall & A. Templeton. 2000. GeoDis, a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. Mol. Ecol. 9, 487-488.

Poulin, E, Palma, A, Leiva, G, Hernández, E, Martínez, P, Navarrete, S, & Castilla JC 2002, ‘Temporal and spatial variation in the distribution of epineustonic competent larvae of *Concholepas concholepas* along the central coast of Chile’, Marine Ecology Progress Series vol. 229, pp 95 - 104.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Pulliam, H. R., and B. J. Danielson. 1991. Sources, Sinks, and Habitat Selection - a Landscape Perspective on Population-Dynamics. *American Naturalist* 137:S50-S66.

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

Ramorino, L 1975, ‘Ciclo reproductivo de *Concholepas concholepas* en la zona de Valparaíso. *Revista de Biología Marina* vol. 15, no 2, pp 149 - 177.

Ramos-Onsins, S & J. Rozas. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 2092–2100.

Raymond, M & Rousset F 1995, ‘An exact test for population differentiation’, *Evolution* vol. 49, pp 1280 - 1283.

Reichow D, Smith MJ. 2001. Microsatellites reveal high levels of gene flow among populations of the California squid *Loligo opalescens*. *Molecular Ecology*. 10: 1101–1109

Retamales, R & R. González. 1982. Prospección, evaluación y reproducción del erizo (*Loxechinus albus*), Ostión para (*Chlamys (Argopecten) purpurata*) y locote (*Thais (Stramonita) chocolata*). Instituto de Fomento Pesquero (IFOP). SERPLAC I Region. 75pp.

Reyes, AE & Moreno CA 1990, ‘Asentamiento y crecimiento de los primeros estadios bentónicos de *Concholepas concholepas* (Mollusca: Muricidae) en el intermareal rocoso de Mehuín, Chile’, *Revista Chilena de Historia Natural* vol. 63, 157 - 163.

Rivas, D & Castilla JC 1987, ‘Dinámica de poblaciones intermareales de *Concholepas concholepas* (Bruguere, 1789) (Mollusca: Gastropoda) en Chile central’, *Investigación Pesquera* vol. 34, pp 3 - 19.

Rodríguez L, Escribano R, Grone G, Iribarren C, Castro H. 1996. Ecología del fitoplancton en la bahía de Antofagasta (23°S). *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, Valparaíso. 31: 65-80.

Rodríguez-Gironés M. & L. Santamaría. 2006. A new algorithm to calculate the nestedness temperature of presence-absence matrices. *Journal of Biogeography*. 33: 924-935.

Rodríguez, F; Oliver, J; Marín, A. & J. Medina. 1990. The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.* 142, 485-501.

Rogers, A & Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552–569.A242+A217

Rogers, A. 1995. Genetic evidence for a Pleistocene population explosion. *Evolution*, 49, 608–615.

Romero, M & G. Bellolio. 1991. Desarrollo intracapsular de *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832). Resúmenes de la II jornadas del COALCMAR.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Romero, M. 1995. Desarrollo intracapsular, extracapsular, asentamiento y metamorfosis de de *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832) (Gastropoda, Muricidae, Thaididae) en condiciones de laboratorio. Tesis presentada para obtener el título de biólogo marino. 134 pp.

Romero, M; C. Gallardo & Belloio G. 2004. Egg laying and embryonic-larval development in the snail *Thais (Stramonita) chocolata* (Duclos, 1832) with observations on its evolutionary relationships within the Muricidae. *Marine Biology* 145,681-692

Roper C, Sweeney M, Nauen C. 1984. Cephalopods of the world. An annotated and illustrated catalogue of species of interest to fisheries. *FAO Fisheries Synopsis* 125 (3): 277 pp.

Rozas, J & R. Rozas. 1999. DnaSP, version 3.0, an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analyses. *Bioinformatics*, 15, 174–175.

Scheltema, R. 1971. Larval dispersiones a mean of genetic exchange between geographically separated populations of shallow-water benthic marine gastropods. *Biol. Bull*, 140, 184-322.

Schneider, S; D. Roessli & L. Excoffier. 2000. Arlequin ver. 2000, a software for population genetics data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland*.

Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18, 233-234.

Semmens, J; G. Pecl, B. Gillanders, C. Waluda, E. Shea, D. Jouffre, T. Ichii, K. Zumholz, O. Katugin, S. Leporati & W. Shaw. 2007. Approaches to resolving cephalopod movement and migration patterns. *Rev Fish Biol Fisheries* 17,401–423.

Serie - Chile, Recursos Pesqueros N° 1, 2003, IFOP, 30 pp.

Servicio Nacional de Pesca. 2009. Informe Gestión Territorial: Áreas de Manejo. www.sernapesca.cl

Shakee, J; B. Beacham; L. Seeb & B. White. 1999. Managing fisheries using genetic data, case studies from four species of Pacific salmon. *Fisheries Research* 43,45-78.

Shanks, A 2009, ‘Pelagic Larval Duration and Dispersal Distance Revisited’, *Biological Bulletin* vol. 216, pp 373–385.

Shanks, A, Grantham, BA, & Carr MH 2003, ‘Propagule dispersal distance and the size and spacing of marine reserves’, *Ecology Applications* vol. 13, pp 159 – 169.

Shaw P, Pierce J, Boyle PR. 1999. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*. 8: 407–417.

Slatkin M 1985. Gene flow in natural populations. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16,393-430.

Slatkin, M 1993, ‘Isolation by distance in equilibrium and non-equilibrium populations’, *Evolution* vol. 47, pp 264 - 279.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Smith, P; S. Robertson; P. Horn; B. Bull; O. Anderson; B. Stanton & C. Oke. 2002. Multiple techniques for determining stock relationships between Orange Roughy, *Hoplostethus atlanticus*, fisheries in the eastern Tasman Sea. Fisheries Research 58,119-140.

Sobarzo M & D Figueroa. 2001. The physical structure of a cold filament in a Chilean upwelling zone (Península de Mejillones, Chile, 23°S). Deep Sea Research Part I, Oceanographic Research Papers 48, 2699-2726.

Sobenes, C & Chávez C 2007, ‘Economic performance of benthic resource management areas in the Bío-Bío region’, Investigaciones Marinas vol. 35, no 2, pp 83 – 97.

Söller, R; K. Warnke; U. Saint-Paul & D. Blohm. 2000. Sequence divergence of mitochondrial DNA indicates cryptic biodiversity in *Octopus vulgaris* and supports the taxonomic distinctiveness of *Octopus mimus* (Cephalopoda, Octopodidae). Marine Biology 136,29-35.

Soto. R. 1985. Efectos del fenómeno El Niño 1982-83 en ecosistemas de la I región. Investigaciones pesqueras (Chile), 32, 199-206.

StatSoft Inc. 1995. STATISTICA for Windows. Tulsa, OK, StatSoft, Inc.

Stotz, W 1997, ‘The Management Areas in the Fishery Law: First experiences and evaluation of utility as a management tool for *Concholepas concholepas*’, Estudios Oceanológicos vol. 16, pp 67 – 86

Stotz, W 2000, ‘Formulación de una metodología para el estudio de edad y crecimiento en el recurso loco’, Proyecto FIP 1997-36, pp 151.

Stotz, W, Lancelloti, D, Martínez, D, Amesti, P, & Pérez E 1991, ‘Variación temporal y espacial del registro de juveniles recién asentados de *Concholepas concholepas* (Bruguiere, 1789), en el intermareal rocoso de IV Región, Chile’, Revista de Biología Marina vol. 26, 351 - 361.

Stotz, W; S. González & C. López. 1992. Siembra experimental del erizo rojo *Loxechinus albus* (Molina) en la costa expuesta del centro – norte, efectos del erizo negro *Tetrapygus niger* (Molina) sobre la permanencia y crecimiento de juveniles. Investigación Pesquera (Chile) 37, 107 – 117

Stuardo, J 1979, ‘Sobre la clasificación, distribución y variación de *Concholepas concholepas* (Briguière, 1789): Un estudio de taxonomía Beta’, Biología Pesquera, Chile vol.12 pp 5-38.

Suárez, M, Lamilla, J, & Marquardt C 2004, ‘Peces Chimaeriformes (Chondrichthyes, Holocephali) del Neógeno de la Formación Bahía Inglesa (Región de Atacama, Chile)’, Revista Geológica de Chile, vol.31, no.1, pp.105 - 117.

Suchard, M.A., Weiss, R.E. & Sinsheimer, J.S. 2001. Bayesian selection of continuous-time markov chain evolutionary models. Molecular Biology and Evolution, 18, 1001-1013.

Sweijid, N; K. Bowie; B. Evans & L. Lopata. 2000. Molecular genetics and the management and conservation of marine organisms. Hydrobiologia 420,153 - 164.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585–595.

Thomas A, J Blanco, M Carr, P Strub & J Osses. 2001. Satellite measured chlorophyll and temperature variability off northern Chile during the 1996–1998 La Niña and El Niño. *Journal of Geophysical Research* 106(C1), 899-915.

Tomicic JJ (1985) Efectos del fenómeno de El Niño 1982-83 en las comunidades litorales de la Península de Mejillones. *Investigaciones pesqueras (Chile)* 32: 209-213.

Toro, J; A. Vergara & J. Ojeda. 2005. Caracterización genética poblacional del recurso de importancia económica *Loxechinus albus* (erizo rojo), en el litoral chileno. XI Congreso Latinoamericano sobre Ciencias del Mar (COLACMAR). Viña del mar, Chile.

Triantafillos L, Adams M. 2001. Allozyme analysis reveals a complex population structure in the southern calamary *Sepioteuthis australis* from Australia and New Zealand. *Marine Ecology Progress Series*. 212: 193-209.

Van Oosterhout C, Hutchinson W.F, Wills DPM, Shipley P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4, 535–538.

Van Oosterhout C, Weetman D, Hutchinson WF (2006) Estimation and adjustment of microsatellite null alleles in nonequilibrium populations. *Molecular Ecology Notes*, 6,255–256.

Vásquez, J. 2001. Ecology of *Loxechinus albus*. In J.M. Lawrence, ed., “Edible Sea Urchins, Biology and Ecology”. Elsevier Science Publ., pages 161 – 175.

Vásquez, J. A., D. Véliz & L. M. Pardo. 2001. Vida bajo las grandes algas pardas. En, K. Alveal & T. Antezana, (Eds.), *Sustentabilidad de la Biodiversidad. Un problema actual, bases científicas, técnicas, teorizaciones y perspectivas*. Ediciones Universidad de Concepción, Concepción (Chile). 293-3008.

Vega MA, Rocha FJ, Osorio C. 2000. Variaciones espaciales y temporales de paralarvas de cefalópodos en el canal Moraleda (43° S), sur de Chile. *Ciencia y Tecnología del Mar*. 23: 69-82.

Vergara, A. 2001. Proyecto FIA BID-PI-C-20011M068. Caracterización genética poblacional para el manejo y la conservación de recursos marinos de importancia para la acuicultura y la pesquería. Instituto de Fomento Pesquero. División de Fomento de la Acuicultura.

Viviani C. 1978. Predación interespecífica, canibalismo y autotomía como mecanismos de escape en las especies de Asteroidea (Echinodermata) en el litoral del Desierto del norte grande de Chile. Report. Laboratorio de Ecología Marina. Universidad del Norte, Iquique.

von der Heyden S, Groeneveld JC, Matthee CA. 2007. Long current to nowhere? – Genetic connectivity of *Jasus tristani* populations in the southern Atlantic Ocean. *African Journal of Marine Science*. 29: 491–497.

PreInforme Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

Wares, J. & C. Cunningham. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 55(12), 2455–2469.

Warnke, K. 1999. Observations on the embryonic development of *Ocotpus mimus* (Mollusca, Cephalopoda) from northern Chile. *Veliger* 42,211–217.

Warnke, K; R. Söller, D. Blohm, & U. Saint-Paul. 2004. A new look at geographic and phylogenetic relationships within the species group surrounding *Octopus vulgaris* (Mollusca, Cephalopoda), indications of very wide distribution from mitochondrial DNA sequences. *J. Zool. Sys. Evol. Research* 42,306-312.

Warnke, K; R. Söller; D. Blohm & U. Saint-Paul. 2000. Rapid differentiation between *Octopus vulgaris* Cuvier (1797) and *Octopus mimus* Gould (1852) using randomly amplified polymorphic DNA. *J. Zool. Sys. Evol. Research* 38,119-122.

Weir, BS & Cockerham CC 1984, ‘Estimating F-Statistics for the analysis of population structure’, *Evolution* vol. 38, pp 1358 - 1370.

Wing S, Botsford L, Ralston S, Largier J. 1998. Meroplanktonic distribution and circulation in a coastal retention zone of the northern California upwelling system. *Limnology & Oceanography* 43: 1710-1721.

Wright, S 1978, Variability Within And Among Natural Populations’ in University Of Chicago Press (ed) *Evolution And The Genetics Of Populations*, Vol. 4.

Wroblewski JS. 1982. Interaction of currents and vertical migration in maintaining *Calanus marshallae* in the Oregon upwelling zone – a simulation. *Deep Sea Research* 29: 665-686.

Yung-Chang H. 2001. Genetic structure of oyster drill (*Thais clavigera*) along the west coast of Taiwan. Master's Thesis. Nacional Sun Yat-sen University.

Zagal, C & Hermosilla C 2001, Guía de invertebrados marinos del litoral valdiviano. Quebecor Wild Chile S.A. Press, Chile. 217.

Zamora, M & A. Olivares. 2004. Variaciones bioquímicas e histológicas asociadas al evento reproductivo de la hembra de *Octopus mimus* (Mollusca, Cephalopoda). *International Journal of Morphology* 22,207-216.

Zar. J. 1996. *Biostatistical Analysis*. New Jersey, Prentice-Hall, Englewood Cliffs. 211p.

Zúñiga, G; S. Guzmán; R. Cisneros & G. Rodríguez. 2000. Population genetic analysis of the abalone *Haliotis fulgens* (Mollusca, Gastropoda) in Baja California, México. *Journal of Shellfish Research* 19,853-859.

12.- ANEXOS

ANEXO 1: PERSONAL PARTICIPANTE POR ACTIVIDAD, PROYECTO FIP N° 2008-39.

NOMBRE	TITULO	FUNCIONES O ACTIVIDADES	HORAS EMPLEADAS
Ricardo Galleguillos G.	Profesor Biología PhD Biology	Jefe Proyecto	140
Sandra Ferrada F.	Biólogo Marino Magíster en Pesquerías	Coordinación Análisis de Laboratorio Análisis de Datos Elaboración de Informes	650
Cristian Canales A.	Biólogo Marino	Análisis de Laboratorio Análisis de Datos Elaboración de Informes	450
Andrea Barrera V.	Biólogo Marino	Análisis de Laboratorio Análisis de Datos Elaboración de Informes	360
Mariem Dib M.	Bióloga	Análisis de Laboratorio Análisis de Datos	330
Cristian Hernández U.	Biólogo Marino Dr. Ecología	Análisis Genético Elaboración de Informes	100
Cristian Gallardo E.	Dr. Ciencias	Coordinación Análisis de Datos Elaboración de Informes	150
Myriam Valenzuela B.	Biólogo Marino	Análisis Genético Análisis de Datos Elaboración de Informes	360
Pedro Pizarro F.	Biólogo Marino	Coordinación Muestreo Elaboración de Informes	150
Gonzalo Gajardo G.	Dr. Biología	Coordinación Elaboración de Informes	150
Patricia Beristain R.	Ingeniero en Acuicultura Magíster en Acuicultura	Análisis de Laboratorio Análisis de Datos Elaboración de Informes	360

ANEXO 2: AUTORIZACIÓN PARA PESCA DE INVESTIGACIÓN, PROYECTO FIP 2008-39.



AUTORIZA A UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
PARA REALIZAR PESCA DE INVESTIGACIÓN
QUE INDICA.

VALPARAISO, 18 MAR 2009

R. EX. N° 993

VISTO: Lo solicitado por Universidad de Concepción, mediante C.I. SUBPESCA N° 960 de 2009; lo informado por la División de Administración Pesquera de esta Subsecretaría en Informe Técnico (P.INV.) N° 081/2009, contenido en el Memorandum Técnico (P.INV.) N° 81 de fecha 2 de marzo de 2009; los Términos Técnicos de Referencia del Proyecto denominado "**Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones**", elaborados por la solicitante y aprobados por esta Subsecretaría; lo dispuesto en el D.F.L. N° 5 de 1983; la Ley General de Pesca y Acuicultura N° 18.892 y sus modificaciones cuyo texto refundido fue fijado por el D.S. N° 430 de 1991, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción; la Ley N° 19.880; los D.S. N° 830 de 1996 y N° 210 de 1998, y los Decretos Exentos N° 560 de 2003, N° 184 y N° 521, ambos de 2005, todos del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción.

RESUELVO:

1.- Autorízase a la Universidad de Concepción, R.U.T. N° 81.494.400-K, domiciliada en Víctor Lamas N° 1290, Concepción, para efectuar una pesca de investigación de conformidad con los Términos Técnicos de Referencia del Proyecto denominado "**Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones**", elaborados por la solicitante y aprobados por esta Subsecretaría y en conformidad al Informe Técnico citado en Visto, el que se considerará parte integrante de esta Resolución, por el lapso de doce meses a contar de la fecha de la misma.

2.- El objetivo principal de la pesca de investigación que por la presente Resolución se autoriza consiste en obtener ejemplares de los recursos bentónicos erizo rojo, locate, pulpo del norte y loco, en áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos, con el objeto de determinar la estructura genética de los diferentes stocks de las principales pesquerías presentes en el norte grande, detectando áreas y fuentes de sumidero de estos recursos.

3.- La pesca de investigación se efectuará por el período comprendido entre la fecha de la presente Resolución y el 31 de mayo de 2009, en las siguientes áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos: **Arica**, ubicada en la XV Región; **Pisagua**, ubicada en la I Región; **Punta Arenas Sector B**, **Punta Campamento** y **Punta Sur Taltal**, ubicadas en la II Región,

4.- En cumplimiento del objetivo de la pesca de investigación autorizada, se podrá extraer mediante buceo semi autónomo (Hooka) de las áreas de manejo antes señaladas un total de 500 ejemplares de cada una de las siguientes especies: Erizo rojo **Loxechinus albus**, Locate **Thais chocolate**, Pulpo del norte **Octopus mimus** y Loco **Concholepas concholepas**.

5.- Para efectos de la pesca de investigación que se autoriza por la presente resolución, se exceptúa el cumplimiento de las medidas de administración establecidas para las especies objeto del presente estudio, relativas a pesos mínimos de extracción, veda biológica y veda extractiva.

6.- Podrán participar en la presente pesca de investigación, embarcaciones artesanales y buzos mariscadores, inscritos en el Registro Pesquero Artesanal en cada uno de los recursos hidrobiológicos señalados en el numeral 4.- de la presente Resolución, de las regiones XV, I y II. Las embarcaciones autorizadas para la pesca de investigación, son:

Caleta	Nombre embarcación	Nº matrícula
Arica	Princesa	273
	Alejandra	218
Pisagua	León	353
	Rocky	723
Punta Arenas	Juan Carlos	627
	Popeye	221
Punta Campamento	Astro	70
	Galan	278
Cifuncho	El Siquita	457
	Jamaicano	-

7.- La peticionaria deberá entregar dentro del plazo de un mes, una vez finalizada la presente pesca de investigación un informe final de resultados, que deberá dar cuenta de cada uno de los objetivos específicos contenidos en la solicitud C.I. SUBPESCA N° 960 de 2009, e incluir las observaciones realizadas en el presente informe.

8.- El peticionario designa como persona responsable de esta pesca de investigación, de conformidad con lo dispuesto en el artículo 102 del D.S. N° 430 de 1991, del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, a don Sergio Lavanchy Merino, R.U.T. N° 4.329.379-6, del mismo domicilio de la solicitante.

9.- La presente resolución deberá publicarse en extracto en el Diario Oficial, por cuenta de la interesada, dentro del plazo de 30 días hábiles contados desde su fecha quedando sin efecto de no publicarse en el plazo señalado.

10.- Esta autorización es intransferible y no podrá ser objeto de negociación alguna.

11.- La solicitante deberá dar cumplimiento a las obligaciones establecidas en los D.S. N° 430 de 1991 y N° 461 de 1995, ambos del Ministerio de Economía, Fomento y Reconstrucción, sin perjuicio del cumplimiento de las obligaciones que se establecen en la presente Resolución. El incumplimiento hará incurrir al titular en el término inmediato de la pesca de investigación sin que sea necesario formalizarlo.

12.- La presente autorización es sin perjuicio de las que corresponda conferir a otras autoridades, de acuerdo a las disposiciones legales y reglamentarias vigentes o que se establezcan.

13.- La infracción a las disposiciones legales y reglamentarias sobre pesca de investigación, será sancionada con las penas y conforme al procedimiento establecido en la Ley General de Pesca y Acuicultura.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

14.- El Servicio Nacional de Pesca deberá adoptar las medidas y efectuar los controles que sea necesarios para lograr un efectivo cumplimiento de las disposiciones de la presente resolución.

15.- La presente Resolución podrá ser impugnada por la interposición del recurso de reposición contemplado en el artículo 59 de la ley 19.880, ante esta misma Subsecretaría y dentro del plazo de 5 días hábiles contados desde la respectiva notificación, sin perjuicio de la aclaración del acto dispuesta en el artículo 62 del citado cuerpo legal y de las demás acciones y recursos que correspondan de acuerdo a la normativa vigente.

16.- Transcribese copia de esta Resolución, del Informe Técnico Citado en Visto, y de la solicitud C.I. SUBPESCA N° 960 de 2009, a la Dirección General del Territorio Marítimo y Marina Mercante, al Servicio Nacional de Pesca y la peticionaria.

ANOTESE, NOTIFIQUESE POR CARTA CERTIFICADA Y PUBLIQUESE EN EXTRACTO EN EL DIARIO OFICIAL POR CUENTA DE LA INTERESADA.

(Firmado) JORGE CHOCAIR SANTIBAÑEZ, SUBSECRETARIO DE PESCA
Lo que transcribo a Ud., para su conocimiento.

Saluda atentamente a Ud.,



JOSE SALOMON SILVA
Jefe Departamento Administrativo

AUTORIZACIÓN DE LA SOLICITUD DE MODIFICACIÓN DEL PERMISO DE PESCA DE INVESTIGACIÓN, PROYECTO FIP 2008-39

VALPARAÍSO

MODIFICA RESOLUCIÓN QUE INDICA

(EXTRACTO)

2288 26 JUN 2009

Por Resolución Exenta N° de esta Subsecretaría, modifícase el numeral 3.- de la Resolución Exenta N° 993 de 2009, de esta Subsecretaría que autorizó a la Universidad de Concepción, para efectuar una pesca de investigación, en el sentido de:

- a) prorrogar el plazo indicado por 60 días contados desde la fecha de la presente Resolución.
- b) respecto de las áreas de manejo y explotación de recursos bentónicos donde se desarrolla la pesca de investigación, incluir *Clavelito* de la XV Región y *Caleta Afuera* de la II Región, y excluir *Arica* de la XV Región y *Punta Sur Taital* de la II Región.



JORGE CHOCAIR SANTIBÁÑEZ
Subsecretario de Pesca

VALPARAÍSO, 26 JUN 2009

ANOTESE, NOTIFIQUESE POR CARTA CERTIFICADA Y PUBLIQUESE EN EXTRACTO POR CUENTA DEL INTERESADO.

(Firmado) JORGE CHOCAIR SANTIBÁÑEZ, SUBSECRETARIO DE PESCA
Lo que transcribo a Ud., para su conocimiento.

Saluda atentamente a Ud.,

GINO BOCCA CHOY
Jefe Departamento Administrativo (S)

ANEXO 3: DESCRIPTIVOS DE LONGITUD Y PESO DE MUESTRAS ANÁLIZADAS, PROYECTO FIP N°2008-39.

Distribución de frecuencia de tallas

En el recurso loco los ejemplares muestreados presentaron una distribución normal con una moda centrada entre los 81 y 90 mm de longitud peristomal, lo que correspondió al 24.4% del total, al analizar el porcentaje de ejemplares sobre la talla mínima legal de extracción (90 mm), se detectó un valor igual a 46.5% (Fig. 1).

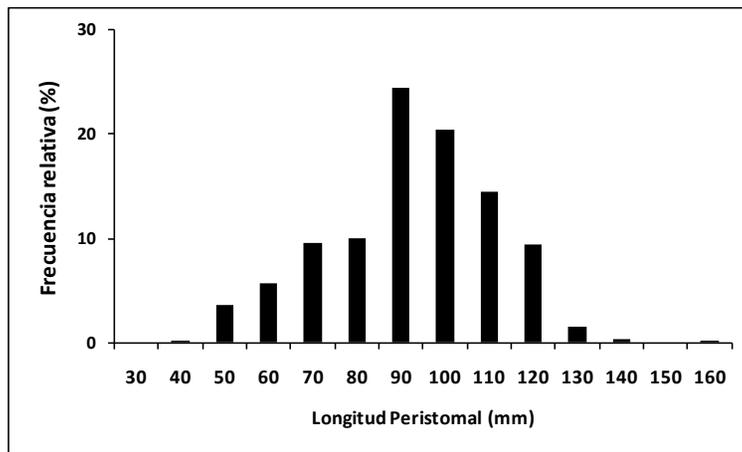


Figura 1: Distribución de frecuencia de longitud peristomal en el recurso loco (*Concholepas concholepas*), proyecto FIP2008-39.

Para el locate el 85% de los especímenes colectados para los análisis se encontraban sobre la talla mínima legal de extracción (55 mm), la distribución de frecuencia de longitudes se observó normal y cuya moda se ubico en el rango de 61 y 65 mm de longitud total (Fig. 2).

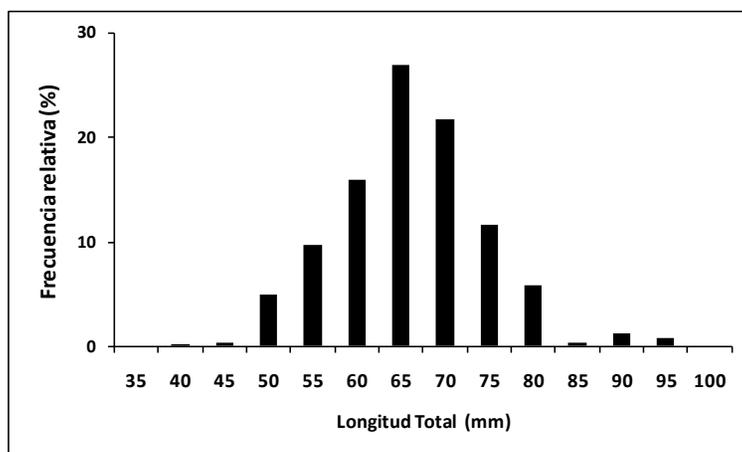


Figura 2: Distribución de frecuencia de longitud total en el recurso locate (*Thais chocolata*), proyecto FIP2008-39.

En el recurso erizo los individuos muestreados mostraron una distribución normal, cuya moda estuvo entre los 71 y 80 mm de diámetro, lo que concernió al 28.0% del total, al examinar el porcentaje de ejemplares bajo el diámetro mínimo legal de extracción (70 mm), se detectó un valor de 19.5% (Fig. 3).

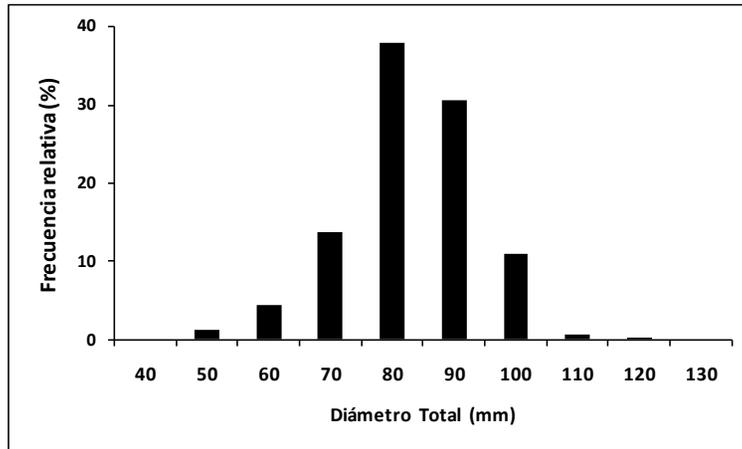


Figura 3: Distribución de frecuencia de diámetro en el recurso erizo (*Loxechinus albus*), proyecto FIP2008-39.

En el caso del recurso pulpo, la norma señala que la medida de tamaño mínimo dice relación con el peso, siendo esta igual 1000 gramos de peso total y se pudo detectar que el 63% de los ejemplares colectados para el estudio se hallaban sobre el peso mínimo legal de extracción, la distribución de frecuencia de peso se observó con una leve asimetría hacia pesos mayores y cuya moda se ubicó en el rango de 751 y 1000 gr de peso total (Fig. 4).

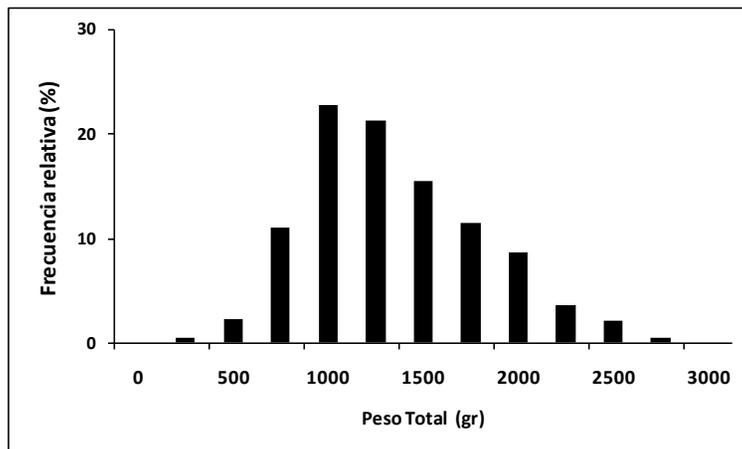


Figura 4: Distribución de frecuencia de peso en el recurso pulpo (*Octopus mimus*), proyecto FIP2008-39.

Relaciones longitud vs peso total

Las relaciones longitud (total, peristomal, diámetro o longitud dorsal del manto) según sea el recurso, vs peso total se ajustaron mejor al modelo curvilíneo del tipo potencial, excepto para

el recurso pulpo, en donde la longitud dorsal del manto vs peso total, lo describe mejor el modelo lineal (Fig. 5, 6, 7 y 8).

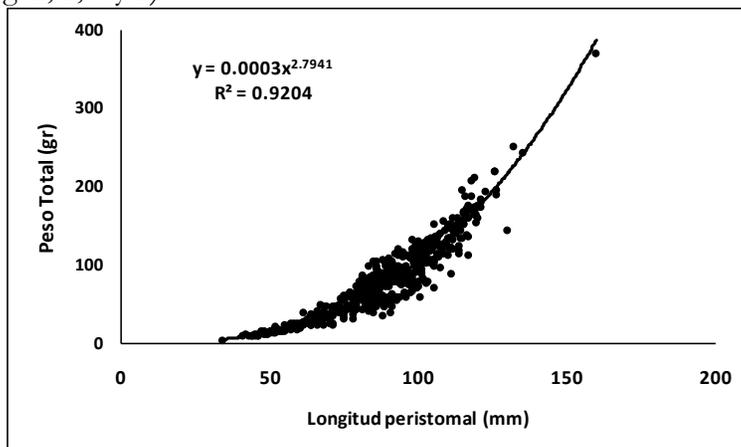


Figura 5: Relación longitud peristomal vs peso total para el recurso loco (*Concholepas concholepas*) para las áreas de manejo de la zona norte de Chile, proyecto FIP2008-39.

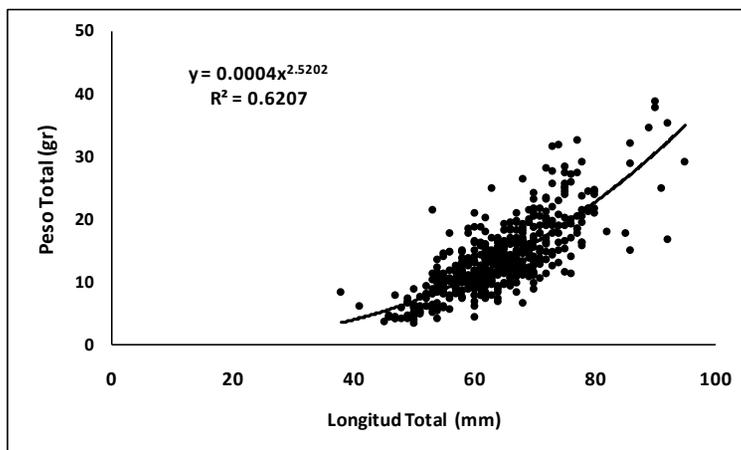


Figura 6: Relación longitud total vs peso total para el recurso locote (*Thais chocolata*) para las áreas de manejo de la zona norte de Chile, proyecto FIP2008-39.

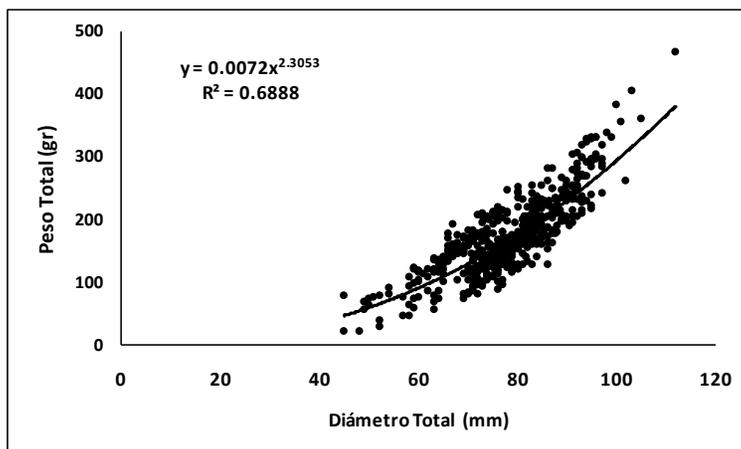


Figura 7: Relación diámetro total vs peso total para el recurso erizo (*Loxechinus albus*) para las áreas de manejo de la zona norte de Chile, proyecto FIP2008-39.

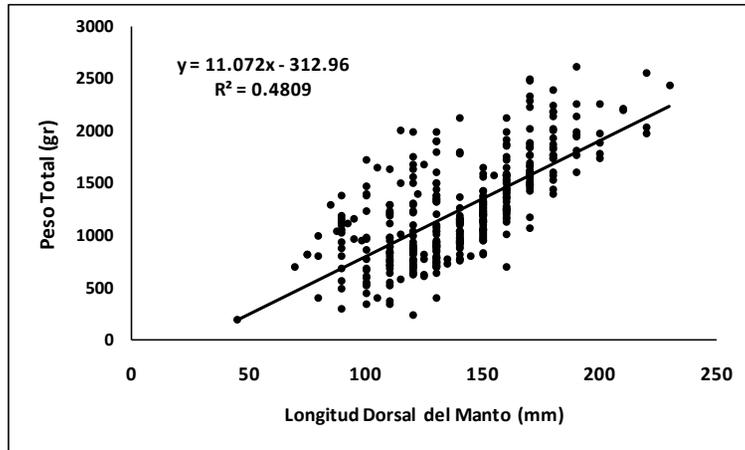
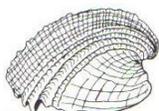


Figura 8: Relación longitud dorsal del manto vs peso total para el recurso pulpo (*Octopus mimus*) para las áreas de manejo de la zona norte de Chile, proyecto FIP2008-39.

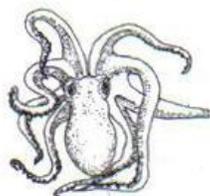
ANEXO 4: PROGRAMA DE TALLER DE DISCUSIÓN Y DIFUSIÓN



Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones Proyecto FIP 2008-39

Programa Taller de Discusión y Difusión
Concepción, 18 de mayo de 2010

- 09:30 – 09:45 Presentación del Proyecto.
Ricardo Galleguillos, *Universidad de Concepción.*
- 09:45 – 10:00 Diseño de Muestreo y Marcadores Moleculares: Consideraciones sobre el Tamaño, Área y Período de Muestreo.
Pedro Pizarro, *Universidad Arturo Prat.*
- 10:00 – 11:15 Metodológica: Desarrollo y Obtención de loci microsatélites para cada una de las especies, como herramienta para la evaluación de conectividad.
Patricia Beristain, *Universidad de Los Lagos.*
Myriam Valenzuela, *Universidad de Concepción.*
Cristian Canales, *Universidad de Concepción.*
Andrea Barrera, *Universidad de Concepción.*
- 11:15 – 11:30 Café
- 11:30 – 11:45 Resultados: Aproximaciones estadísticas para el análisis de loci microsatélites y conectividad.
Sandra Ferrada, *Universidad de Concepción.*
- 11:45 – 12:30 Discusión y Recomendaciones.



Universidad de Concepción

Universidad de Los Lagos

Asistentes



ASISTENCIA TALLER DE DISCUSIÓN Y DIFUSIÓN

Asistentes Taller de Difusión y Discusión FIP 2008-39

"CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LOS PRINCIPALES RECURSOS BENTÓNICOS, Y ESTUDIO DE CONECTIVIDAD ENTRE SUS POBLACIONES ENTRE LA I Y II REGIONES (FASE I)"

Nombre	Institución	Email
PATRICIA BERISTAIN RUIZ	Universidad de Los Lagos, Osorno	pberista@ulagos.cl
Andrea Barrera V	Universidad de Concepción	andrabarrera@ucsc@gmail.com
JORGE TORRES HERRERA	SERVA PESCA TALCAHUANO	j.torres@servapesc.cl
Cristian Hernández V.	Universidad de Concepción	cristianhernandez@udec.cl
Cristian Gallardo	Universidad de Concepción	crgallardo@udec.cl
Fabiola Lafarga de la Cruz	Universidad de Concepción	lafarga13@msn.com
Miriam Valenzuela Bustamante	Universidad de Concepción	mvalenzuela@udec.cl
Mariana Sepúlveda Reyes	Universidad de Concepción	marisepul@udec.cl
Natasha Torres Ojeda	Universidad de Concepción	natashatorres@udec.cl
Gonzalo Gajardo	U. Lagos	ggajardo@ulagos.cl
Sandra Ferrada	Universidad de Concepción	sferrada@udec.cl
Cristian Canales Aguirre	UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN	CRISTIANCANALES@UDEC.CL
Cecilia Ovalle Torres	Universidad de Chile	CECILIAOVALLE@gmail.com
Ricardo Gallardo E.	U de Concepción	rgallardo@udec.cl

ANEXO 5: MANUSCRITO EN INGLÉS PARA DIVULGACIÓN CIENTÍFICA.

El presente escrito al momento de este Preinforme Final del Proyecto FIP2008-39 está bajo revisión por la editorial de la revista.

Otros manuscritos están siendo elaborados por el grupo de investigación para ser presentados en revistas en pro de la divulgación de los resultados a la comunidad interesada, y la divulgación del Fondo de Investigación Pesquera.

Permanent Genetic Resources Notes

Isolation and characterization of eight new microsatellite loci for Chilean rock shell *Thais chocolata* (Gastropoda: Muricidae)

Myriam Valenzuela-Bustamante¹, Felipe Aguilera-Muñoz¹, Sandra Ferrada², Ricardo Galleguillos² & Cristian Gallardo-Escárate ^{1*}

¹ Laboratorio de Genética y Biotecnología Acuícola, Departamento de Oceanografía, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Centro de Biotecnología, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

² Laboratorio de Genética y Acuicultura, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción, Casilla 160-C, Concepción, Chile.

Keywords: Chilean rock shell, *Thais chocolata*, microsatellite loci, genetic populations.

Corresponding author:

Dr. Cristian Gallardo-Escárate

Centro de Biotecnología, Departamento de Oceanografía, Universidad de Concepción. Casilla 160-C, Concepción, Chile.

Phone: + 56-41-2203422; Fax: + 56-41-2207310

E-mail: crisgallardo@udec.cl

Running title: Microsatellite markers in *Thais chocolata*

Abstract

Eight highly polymorphic microsatellite markers were isolated and characterized for *Thais chocolata* a gastropod mollusk distributed in the Northern Chile. Markers were tested in 20 individual samples from a single wild population and the number of alleles ranged between 9 and 29. Observed and expected heterozygosities ranged from 0.200 to 0.950 and 0.794 to 0.953, respectively. Significant deviations from Hardy-Weinberg equilibrium were found in five microsatellite loci. These markers will be useful for further ecological and populations genetic studies in Chilean rock shell.

Thais chocolata (Duclos, 1832) is a gastropod mollusk distributed along the Pacific coast specifically from Paita in Peru to Valparaiso in Chile. This benthonic resource is economically important in the Northern Chile with an historical fisheries production volume of 8,244 t in 1986 as well as ecologically interesting due to its extended free larval phase of four months and high potential for larval dispersion which implies its effect on recruitment and population

dynamics (Romero et al. 2004). Population dynamics have been evaluated only through morphological parameters (Miranda 1975) however to date not exist reports about population dynamics at genetic level. In this study, we described 8 new specie-specific microsatellite loci developed for *T. chocolata* for to be used in future studies of populations genetic.

A genomic library was constructed of DNA isolated from a nine individual of *T. chocolata* from north Chile using a standard phenolchloroform extraction method. Restricted DNA fragments were enriched for four common microsatellite motifs ATG, CAG, CAGA and TAGA by Genetic Identification Services. Fragments of 350–700 bp were ligated in to the Hind III site of the pUC19 plasmid. Ligation products were introduced into *Escherichia coli* strain DH5 α (ElectroMAX, Invitrogen) by electroporation. After the transformation and recovery incubation in SOC broth (Invitrogen), 20% of glycerol was added to the final volume. Plating of 5 μ L of this product produced between 100 and 300 recombinant colonies (more than 10 000 recombinant cells/mL). Bluo-gal/IPTG/ampicillin–LB agar plates were used to isolate colonies for sequencing. For this, white colonies from spread stock plates were transferred in to a new BIA–LB agar plate and then incubated overnight at 37 °C in 96-well block using 2X lb broth Plasmid DNA was purified using Millipore Multiscreen MAFB NOB plates. A two-step 10- μ L polymerase chain reaction (PCR) was performed to sequence the clones using M13 primers. The first step was to prepare a PCR mix with 1 \times PCR buffer, 3mM MgCl₂, 0.3mM of dNTP mix, 1.5 μ M of each primer, 0.0042 mg/mL of RNase and 4 μ L of a picked colony, which was set to 100 °C for 10 min to lyse the bacteria and then at 37 °C to soak. The second step was to add 5 μ L of a hot-start solution (1 \times PCR buffer and 0.075 U/ μ L of BIOLASE DNA polymerase) to the prepared mix and place it in the thermocycler for 21 cycles (94 °C for 30 s, 57 °C for 30 s and 72 °C for 30 s) with a final extension step at 72 °C for 2 min. DNA sequencing was performed in an Applied Biosystems Model 377 DNA sequencer using DYEnamic ET terminator cycle sequencing kit (Amersham Biosciences). Sixty-six primers were designes using DesignerPCR, version 1.03(Research Genetics, Inc.). Finally, only eight PCR primers were successfully amplified. (Table 1). Amplification of microsatellite loci were performed in a 12.5 μ L reaction containing 1X PCR Buffer, 0.2 mM of dNTP Mix, 0.2mg/mL of BSA, 0.125 mM of forward primers labelled in 5` end with M13, 0.5mM of reverse primers, 0.5 mM of primers M13 labelled in 5`end with HEX or FAM, 0.04 U/mL of Taq DNA polymerase (Kappa Biosystem) and 13ng/mL of template DNA. The cycling conditions were 3 min at 94 °C, 35 cycles of 40 s at 94 °C, 40 s at the annealing temperature listed in Table 1 and 30 s at 72 °C, final extension of 4 min at 72 °C. PCR products with primers fluorescent labeled were run in a Applied Biosystem Model ABI3730XL with a standard size marker 400HD. We characterized the polymorphism of each marker in a sample of 20 individuals from the locality of Pisagua, Chile.

Alleles were scored using GeneMarker v1.35 (SoftGenetics, LLC). We first checked for the potential presence of null alleles using MicroCheker V2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). The allelic richness (Ra) was obtained using FSTAT v2.9.3 (Goudet 1995). The number of alleles (Na), the expected (He) and observed (Ho) levels of heterozygosity and Hardy–Weinberg equilibrium were obtained using Arlequin v3.11 (Schneider et al. 2000).

Locus	Repeat Motif	Primer sequence (5' - 3')	Genbank	Ta (°C)	Allele range (pb)	Na	Ra	Ho	He	H & W
Tcho 1	(ATG) ₁₉	F: TCTCCAATGTTCTTCCATCGTA R: TCATCAGGTTCTGGTTGTCTG		58	234 - 315	18	18	0.950	0.953	0.896
Tcho 2	(CATC) ₉	F: CGGAGTTCTAGCTGAGAAATAG R: TAAAAGGGTGTGTACTGACATG		55*	138 - 214	12	12	0.300	0.907	0.000†
Tcho 3	(GT) ₆ (CT) ₂ (GT) ₂ CT(GT) ₁₄	F: GGTATAGCATGGTTTTCAC R: TGCCTGTGATGTGATGAG		56	151 - 181	13	13	0.800	0.891	0.140
Tcho 4	(TGAA) ₁₉	F: GAACAAGATGGGCCGTGT R: GGATGGAGGGTTTGATTAA		52	119 - 159	9	9	0.900	0.794	0.082
Tcho 5	(TAGA) ₃ N ₄ (TAGA) ₁₁	F: CTGAATGCTGACATGAATTATG R: GGTTAATAAAGGGTGGGTATTC		56*	145 - 269	17	17	0.450	0.935	0.000†
Tcho 6	(CA) ₃₂	F: GCCATCCCTCTCTCTCAC R: TAAGCTCTTGTCCACCAGG		61*	190 - 242	19	19	0.600	0.938	0.014†
Tcho 7	(GATA) ₈	F:GGAAGTACTAGTTGTCAGGTCTTC R: ATATTGCCAGCGCAGTGAC		57*	113 - 225	14	14	0.350	0.920	0.000†
Tcho 8	(CA) ₂₅ AA(CA) ₄	F: CTCACTCTGCCAATGATACTG R: AGGCAAGCAATAACTCTATGAC		57*	248 - 318	15	15	0.200	0.920	0.000†

Table 1 Characteristics of the microsatellite loci isolated for the Chilean rock shell (*Thais chocolata*).

*Possible presence of null alleles; †Statistically significant deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (P < 0.05); Ta, primer annealing temperature; Na, number of alleles; Ra, alleles richness; Ho, observed heterozygosity and He, expected heterozygosity.

Informe Final FIP N°2008-39 “Caracterización molecular de los principales recursos bentónicos, y estudio de conectividad entre sus poblaciones entre la I y II regiones”.

The number of alleles per locus ranged from 9 to 19. Null alleles may be present at five loci, as suggested by the general excess of homozygotes (Table 1). Values of observed ranged from 0.200 to 0.900 and expected heterozygosity range from 0.794 to 0.953. Only, loci Tcho1, Tcho2 and Tcho4 showed significant deviation from Hardy–Weinberg equilibrium ($P < 0.05$). These eight microsatellite loci are the first developed for *T. chocolata*.

Acknowledgments This work forms part of the FIP 2008-39 project.

REFERENCES

Goudet J (1995) FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. The Journal of Heredity 86(6), 485 – 486.

Miranda O (1975) Crecimiento y estructura poblacional de *Thais (Stromanita) chocolata* (Duclos, 1832) en la Bahía de Mejillones del Sur, Chile (Mollusca: Gastropoda, Thaididae). Revista de Biología Marina y Oceanografía 15, 263 - 286.

Romero MS, Gallardo CS, Bellolio G (2004) Egg laying and embryonic-larval development in the snail *Thais (Stromanita) chocolata* (Duclos, 1832) with observations on its evolutionary relationships within the Muricidae. Marine Biology 145, 681 - 692.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) ARLEQUIN, Version 2.000: software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory University of Geneva, Geneva

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Mol Ecol Notes 4, 535 – 538.

ANEXO 6: DESCRIPCIÓN DE LA BASE DE DATOS.

Columna A: “ESPECIE”, se refiere a la especie identificada con su nombre común.

Columna B: “LOCUS”, se refiere a cada microsatélite utilizado para los análisis. Cada microsatélite comienza con un acrónimo (i.e. Cc1A: corresponde a *Concholepas concholepas*); para el recurso erizo el acrónimo es Sea (i.e. *Sea urchin*), para el recurso Locote el acrónimo es Tcho (i.e. *Thais chocolata*) y para el recurso Pulpo (i.e. *Octopus mimus*).

Columna C: ALELO, Se refiere a las diferentes variantes genéticas encontradas en cada loci microsatelite. Estas variantes genéticas corresponden al tamaño del alelo expresado en pares de bases nucleotídicas.

Columna D: CLUSTER 1, Se refiere a las frecuencias alélicas de cada alelo para el Cluster 1.

Columna E: CLUSTER 2, Se refiere a las frecuencias alélicas de cada alelo para el Cluster 2.

Columna F: CLUSTER 3, Se refiere a las frecuencias alélicas de cada alelo para el Cluster 3.