



CENTRO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS
DEL NOROESTE, S.C.

Programa de Estudios de Posgrado

ESTRUCTURA POBLACIONAL Y DIVERSIDAD
GENÉTICA EN LA CENTOLLA (*Lithodes santolla*) DE
LA ZONA NORTE Y CENTRO-OESTE DE LA REGIÓN
DE MAGALLANES Y ANTÁRTICA, CHILE MEDIANTE
EL USO DE MICROSATÉLITES

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

Uso, Manejo y Preservación de los Recursos Naturales
(Orientación Biología Marina)

Presenta

Paulina Mejía Ruíz

La Paz, Baja California Sur, Septiembre del 2015

ACTA DE LIBERACION DE TESIS

En la Ciudad de La Paz, B. C. S., siendo las 16:00 horas del día 02 del Mes de Julio del 2015, se procedió por los abajo firmantes, miembros de la Comisión Revisora de Tesis avalada por la Dirección de Estudios de Posgrado del Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C., a liberar la Tesis de Grado titulada:

“Estructura poblacional y diversidad genética en la centolla (*Lithodes santolla*) de la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes y Antártica, Chile mediante el uso de microsatélites”

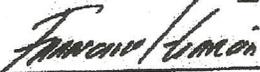
Presentada por el alumno:

Paulina Mejía Ruiz

Aspirante al Grado de MAESTRO EN CIENCIAS EN EL USO, MANEJO Y PRESERVACION DE LOS RECURSOS NATURALES CON ORIENTACION EN **Biología Marina**

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron su **APROBACION DE LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

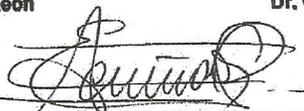
LA COMISION REVISORA



Dr. Francisco Javier García-De León
DIRECTOR DE TESIS



Dr. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
CO-TUTOR



Dra. Ellana Paola Acuña Gómez
CO-TUTOR



DRA. ELINA SERVIERE ZARAGOZA,
DIRECTORA DE ESTUDIOS DE POSGRADO Y FORMACIÓN DE RECURSOS HUMANOS

CONFORMACIÓN DEL COMITÉ TUTORIAL

Dr. Francisco Javier García-De León
Director de Tesis
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de México, S. C., La Paz,
B.C.S.

Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega

Co-Tutor
Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste de México, S. C., La Paz,
B.C.S.

Dra. Eliana Paola Acuña Gómez
Co-Tutor
Centro de Estudios del Cuaternario de Fuego-Patagonia y Antártica o Fundación
CEQUA, Chile

COMITÉ REVISOR DE TESIS

Dr. Francisco Javier García-De León
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dra. Eliana Paola Acuña Gómez

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Dr. Francisco Javier García-De León
Dra. Guadalupe Fabiola Arcos Ortega
Dra. Eliana Paola Acuña Gómez

SUPLENTE

Dr. Fausto Valenzuela Quiñonez

RESUMEN

Este trabajo representa el primer estudio sobre la estructura genética de la centolla de Magallanes (*Lithodes santolla*) en la zona Norte y Centro-Oeste de la XII Región de Chile utilizando 6 marcadores moleculares tipo microsatélite especie específicos generados por secuenciación masiva de última generación con Illumina. Dado que la *L. santolla* es un importante recurso en la pesquería artesanal de la región de Magallanes y de la Antártica Chilena, que representa más del 50% de los desembarques en esta región, existe interés por regular las capturas, por lo que el conocimiento de las diferentes unidades de stock representaría un valioso instrumento de manejo y regulación, sin embargo, no hay información confiable sobre las diferentes unidades de stock y no existen estudios genéticos publicados sobre el recurso.

Considerando las características de historia de vida del recurso, así como la gran extensión y la complejidad geográfica de la zona en donde se distribuye, en este trabajo se planteó la hipótesis de que *L. santolla* presenta una estructura genética a lo largo del área geográfica inspeccionada.

Los valores de diferenciación genética (F_{ST}) fueron bajos (0 a 0.002) y no mostraron diferencias significativas entre ninguna de las localidades inspeccionadas. Además usando métodos bayesianos (STRUCTURE) no se encontró señal de la existencia de dos o más poblaciones genéticamente homogéneas. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren panmixia para la *L. santolla* en la zona centro de la región de Magallanes, Chile, sin embargo, la prueba de poder estadístico (POWSIM) indica que es necesario utilizar un mayor número de loci o mayor número de muestra para precisar los niveles de diferenciación genético poblacional. La diversidad genética encontrada fue moderadamente alta, con una heterocigosidad observada de $H_o = 0.74$ y un número promedio de alelos por locus de 5 a 25 con un promedio de 12. Los resultados de este estudio son de suma importancia en función del manejo pesquero del recurso ya que forman la base de futuras investigaciones e indican la necesidad de continuar con un análisis genético a lo largo de toda la distribución de la especie.

Palabras clave: *Lithodes santolla*, panmixia, estructura genética.

ABSTRACT

This work represents the first study of the genetic structure of the Southern king crab (*Lithodes santolla*) in the North and Midwest of the XII Region of Chile using 6 microsatellite molecular markers type specific species generated by next generation sequencing with Illumina. Since *L. santolla* is an important resource in artisanal fisheries in the region of Magallanes and Chilean Antarctica, which represents more than 50% of landings in this región, there is interest to regulate the catch, so the knowledge of the different stock units represent a valuable tool for management and regulation, however, there are no reliable information on the different units of stock and there are no published genetic studies on this resource.

Given the life history of the resource and the vastness and complexity of the geographical area where it is distributed, this study hypothesized that *L. santolla* has a genetic structure along the area study.

The values of genetic differentiation (F_{ST}) were low (0 - 0.002), and show no significant differences between any of the sampling sites inspected. Furthermore using Bayesian methods (STRUCTURE), no signal of two or more genetically homogeneous populations were found. The results obtained in this study suggested panmixia for *L. santolla* in the center of the región of Magallanes, Chile, however, the test of statistical power (POWSIM) indicates the need to use a larger number of loci or more samples to asses the levels of population genetic differentiation. The genetic diversity found was moderately high, with observed heterozygosity of $H_o=0.74$ and an average number of alleles per locus of 5-25 with an average of 12. The results of this study are important in terms of fisheries resource management as they form the basis of future research indicate the need for future genetic analysis throughout the entire range of the species.

Key words: *Lithodes santolla*, panmixia, genetic structure.

DEDICATORIA

A mis padres Alejandrina Ruíz y Fernando Mejía

A Daniel VazArc y Tania V.C.

AGRADECIMIENTOS

Al CIBNOR y a toda las personas que lo hace funcionar, por todo el apoyo, atención y comprensión brindados durante la realización de esta tesis. Sobre todo gracias al personal de posgrado por toda su ayuda.

Al CONACyT por la beca otorgada para realizar mis estudios de maestría con número de registro CVU 492144.

Al Centro Regional Fundación CEQUA y al proyecto “Estudio combinado de variabilidad genética y morfológica de la centolla (*Lithodes santolla*) en la región de Magallanes y Antártica Chilena: Herramienta para el manejo, sustentabilidad y plusvalía del recurso” (Corfo – Innova Cod. 12BPC2-13541) por el financiamiento de esta tesis.

A mi director de tesis Dr. Francisco García-De León y a mi comité tutorial Dra. Paola Acuña y Dra. Fabiola Arcos por darme la oportunidad de integrarme en el proyecto, por su comprensión y asesorías cada vez que las necesitaba y por no desistir en este proyecto a pesar de todas las dificultades que pasamos para terminarlo, gracias por su confianza.

A Carlos Olave, Manuel Sánchez, Carla Mora, Marco Pinto, Johana Ruiz, por su apoyo en la realización de las colectas de tejidos.

Al personal administrativo de CEQUA por todo su apoyo y los trámites que permitieron la realización de este proyecto: Freddy Muñoz, María Teresa Cecilia.

A Carlos Olave por los mapas de muestreos realizados. A Francisca Quezada por la realización del mapa de distribución de la especie.

Al laboratorio de fisiología vegetal del CIBNOR por permitirme utilizar sus instalaciones para la cuantificación de ADN.

Al Dr. Eduardo Balart por su apoyo para obtener EL libro sobre mi especie de estudio.

Al mis compañeros y amigos del laboratorio de Genética para la Conservación del CIBNOR: Tania, Adrián, Ricardo, Fausto, Cari, Cris, David, Sara, Caro, Leo, Ilse, por haberme guiado en distintas partes de mi formación en la maestría.

En especial a Tania, Adrián, Ricardo y Fausto que me dedicaron muchas horas para discutir, enseñarme programas, técnicas, etc. aun cuando ya no estaban aquí, muchas gracias.

A los doctores Leonardo Álvarez Santamaría, Andrés Sepúlveda y Elías Pinilla por sus asesorías y tiempo brindado para aspectos oceanográficos.

A Leo Vázquez y Sarita Villada por su ayuda y asesoría para el manejo de ArcGis y por su amabilidad y disposición así como por todos sus consejos cada vez que eran requeridos.

A Vladimir por su ayuda para realizar análisis en R.

A Paty Rosas Hernández mi agradecimiento infinito por brindarme tu ayuda en todo momento con el uso de R, ArcGis, edición, apoyo moral, etc... muchas gracias no es suficiente para agradecer todo lo que hiciste por mí.

A los técnicos Jorge y Alfredo por atender mis llamadas de auxilio incluso en días festivos.

A mis compañeros y amigos de maestría y del CIBNOR Denisse, Paloma, Diana, Eli, Angie, Héctor, Peter, Raz, Caro, Kao, Tomás, Betsie, Kike, Luisito, Marcelo, Daniel, Eddi Chani, los Changuis, Pipina, Victor, Samuel, Cinthia, Christina, Sergio, Bryan, Laura, Anita... por muchas horas de diversión y todos sus ánimos, fue un placer conocerlos y compartir una etapa de nuestra formación.

A todas esas personas que hacen (desde hace tiempo o recientemente) muy especial mi vida en La Paz Dellis, Mario, Fer, Raul, Erik. A mi familia paceña Eli, Aby, Adri, Mariana, Dona, Magda, Paty, Susi, Fede, Kass, Diego, Dani, Gabo, Mirsha, Joel y Sir Marco, a todos gracias por su cariño, apoyo y porque siempre me hacen sentir como en casa.

A mi abuelita Idulia, a mis hermanos Fer, Alex y Edu, a la familia Vázquez-Valdéz, a Pablo, a mis primos y a la Sra. Gaby por sus atenciones, cariño y porque aunque estuvieron lejos siempre estaban al pendiente de mi.

A mi hermano Alex y a Paty por sus comentarios y revisiones.

A mi novio y compañero Daniel Vázquez, gracias por todo tu amor, consejos y apoyo, sin ti hubiera sido muy pesado y menos divertido el camino.

A mis padres Fernando y Alex, por todo su cariño y apoyo tanto moral como económico, porque sin ustedes no hubiera podido terminar esta tesis, los amo mucho. En especial a ti mami ya que este logro, como muchos otros en mi vida, se debe a ti y tu enorme esfuerzo.

Y a ustedes también.... porque siempre estarán en mi corazón.

ÍNDICE

LISTA DE TABLAS	xi
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	5
2.1 GENÉTICA DE POBLACIONES	5
2.1 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE	6
2.2 ESTADO PESQUERO DEL RECURSO	9
2.3 ESTUDIOS GENÉTICOS EN <i>LITHODES SANTOLLA</i>	11
2.4 ESTUDIOS GENÉTICOS EN EL CANGREJO REAL DE ALASKA: un análisis comparativo con la centolla de Chile.	12
2.4 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE CRUSTÁCEOS.	14
3. JUSTIFICACIÓN	16
4. OBJETIVOS.....	18
4.1 GENERAL.	18
4.2 ESPECÍFICOS.	18
5. HIPÓTESIS.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
6.1 ÁREA DE ESTUDIO.	19
6.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO.	20
6.2 RECOLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO.	20
6.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS.	22
6.3.1 Almacenamiento y procesamiento	22
6.3.2 Extracción de ácidos nucleicos.	22
6.4 SECUENCIACIÓN MASIVA.	23
6.5 OPTIMIZACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES.	23
6.5.1 Selección de iniciadores.	23
6.5.2 Condiciones de amplificación por PCR para su lectura en el secuenciador ABI 310 de un capilar (APPLIED BIOSYSTEMS®).	26
6.6 ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS.	28
6.6.1 Calidad y utilidad de los marcadores.	28

6.6.1.1 Alelos nulos.....	28
6.6.1.2 Desequilibrio de ligamiento.....	28
6.6.1.3 Locus bajo selección.....	28
6.6.2 Estimación de parámetros poblacionales.....	29
6.6.2.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg.....	29
6.7 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	29
6.7.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) y Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC).....	30
6.7.2 Estimación de diferenciación genética poblacional (F_{ST}).....	30
6.7.3 Forma teórica de la estructura genética.....	31
6.7.4 Análisis bayesianos.....	31
6.7.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	32
6.8 DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL.....	33
6.9 PRUEBA DE PODER.....	33
7. RESULTADOS.....	34
7.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.....	34
7.1.1 Extracción de ácidos nucleicos.....	34
7.2 OPTIMIZACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES.....	35
7.2.1 Condiciones de amplificación por PCR para su lectura en el secuenciador ABI 310 de un capilar (APPLIED BIOSYSTEMS®).....	35
7.3 ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS.....	38
7.3.1 Calidad y utilidad de los marcadores.....	38
7.3.1.1 Alelos nulos.....	38
7.3.1.2 Desequilibrio de ligamiento.....	40
7.3.1.3 Locus bajo selección.....	40
7.4 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL.....	41
7.4.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) y Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC).....	41
7.4.2 Estimación de diferenciación genética poblacional (F_{ST}).....	44
7.4.3 Forma teórica de la estructura genética.....	44
7.4.4 Análisis bayesianos.....	47
7.4.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).....	48

7.5 DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL.	48
7.6 PRUEBA DE PODER.	51
8. DISCUSIÓN	53
8.1 Estructura poblacional.	54
8.1.1 Tipos de larvas y dispersión por efecto de las corrientes.	57
8.1.2 Complejidad de la línea de costa.	59
8.1.3 Dispersión de los adultos.	63
8.2 Diversidad genética.	64
8.3 Implicaciones para el manejo pesquero.	66
9. CONCLUSIONES	69
10. LITERATURA CITADA	70
11. ANEXOS.	81
ANEXO 1. Extracción de ADN por método de sales tomado y modificado de Aljanabi y Martínez (1997).	81
ANEXO 2. Ensayos de amplificación, electroferogramas de los 6 loci microsatélites que amplificaron de manera correcta con 34 individuos (Canal Maule).	81
ANEXO 3. Gráficos obtenidos para el análisis de discriminantes de componentes principales (DAPC) con el programa R V 3.1.3. (Venables <i>et al.</i> 2015).....	84
ANEXO 4. Frecuencias alélicas para cada loci en la población usando 6 loci microsatélites.	85
ANEXO 5. Resultados de diversidad y estructura genética obtenidos analizando 5 loci microsatélites.	87
ANEXO 6. Resultados de diversidad genética obtenidos analizando 6 loci microsatélites y los sitios de muestreo con $n > 20$ (8 localidades).	89

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ejemplares de <i>L. santolla</i> , izquierda vista ventral, derecha vista dorsal. a) hembra adulta, b) izquierda, macho adulto.	7
Figura 2. Mapa de la distribución global de <i>Lithodes santolla</i> . La línea describe la distribución geográfica de la especie. Tomado de Vinuesa (1991).	9
Figura 3. Mapa de los sitios de muestreo de <i>L. santolla</i>	19
Figura 4. Gel de agarosa al 1% obtenido para la visualización de los ADN de <i>L. santolla</i>	34
Figura 5. Curvas de absorbancia de las diluciones de trabajo de ADN de <i>L. santolla</i> (concentración promedio de 40 ng/μL).....	35
Figura 6. Electroferograma obtenido del poolplex del Mix1: Lsa08 NED, Lsa10 FAM y Lsa14 PET.....	36
Figura 7. Electroferograma obtenido del poolplex del Mix2: Lsa01 FAM, Lsa11 PET y Lsa13 NED.....	36
Figura 8. Prueba de neutralidad para 6 loci microsatélites de <i>Lithodes santolla</i> . Análisis realizado con el programa LOSITAN (Antao <i>et al.</i> , 2008).	40
Figura 9. Gráfica obtenida a partir del AFC en donde se muestran la dispersión de los valores de las cargas de cada una de las muestras resultado de los 3 primeros factores o ejes calculados los cuales explican el 8.35% de la varianza genética.	42
Figura 10. Muestra los valores de las cargas de cada una de las muestras después del DAPC, cada localidad muestra una elipse que representa la varianza de las cargas de cada grupo.	43
Figura 11. Gráfica de probabilidad de membresía obtenida con el DAPC..	43
Figura 12. Variabilidad genética de 15 sitios de muestreo de <i>L. santolla</i> (<i>Population Graph</i>)..	45
Figura 13. Resultados de STRUCTURE. En a) se señala el número de grupos genéticamente homogéneos (K) más probables encontrados con el método de Evanno <i>et al.</i> (2005). En b) probabilidades de membresía de cada individuo para pertenecer a cada uno de los 3 grupos.	47
Figura 14. Coeficientes de membresía para $K=3$ como número de grupos genéticos homogéneos más probable.	48
Figura 15. Número de alelos por locus de <i>L. santolla</i> en la zona de estudio.	50
Figura 16. Valores promedio de heterocigosidad observada (H_o) y esperada (H_e) por locus de <i>L. santolla</i> en la zona de estudio.....	50
Figura 17. Valores del índice de fijación (F_{IS} , W&C) por locus en la población de <i>L. santolla</i> en la zona de estudio.....	51
Figura 18. Poder de resolución de los datos (número de loci y tamaño de muestra) POWSIM.....	52
Figura 19. Mapa de los sitios de colecta de <i>L. santolla</i> para el Estudio combinado de variabilidad genética y morfológica de la centolla en la región de Magallanes y la Antártica Chilena.....	62

Figura 20. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa01 FAM, [MgCl ₂]: 2; TM: 60 °C..	81
Figura 21. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa08 NED, [MgCl ₂]: 2.5; TM: 60 °C..	82
Figura 22. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa10 FAM, [MgCl ₂]: 2.5; TM: 66 °C..	82
Figura 23. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa11 PET, [MgCl ₂]: 2.5; TM: 66 °C..	82
Figura 24. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa13 NED, [MgCl ₂]: 1.5; TM: 66 °C..	83
Figura 25. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa14 NED, [MgCl ₂]: 2; TM: 66 °C..	83
Figura 26. Número de componentes principales retenidos para el análisis de DAPC, se utilizaron los 40 primeros PCs.....	84
Figura 27. Número de funciones discriminantes guardadas para el análisis de DAPC, se retuvieron 3 discriminantes.....	84
Figura 28. Frecuencias alélicas del locus Lsa01.....	85
Figura 29. Frecuencias alélicas del locus Lsa08.....	85
Figura 30. Frecuencias alélicas del locus Lsa10.....	85
Figura 31. Frecuencias alélicas del locus Lsa11.....	86
Figura 32. Frecuencias alélicas del locus Lsa13.....	86
Figura 33. Frecuencias alélicas del locus Lsa14.....	86
Figura 34. Coeficientes de membresía para los 16 sitios de muestreo de <i>L. santolla</i> utilizando 5 loci microsatélites.....	89

LISTA DE TABLAS

Tabla I. Localización geográfica de los sitios de muestreo en coordenadas decimales, nombres de las localidades, clave de la localidad y tamaño de muestras. Las localidades se muestran en orden latitudinal (norte-sur).	21
Tabla II. Iniciadores de loci microsatélites obtenidos para pruebas de amplificación y polimorfismo. Matriz DS-33 de ABI PRISM® (Colores: amarillo (NED®), azul (FAM®), verde (VIC®) y rojo (PET®)).....	24
Tabla III. Condiciones de optimización de los loci microsatélites utilizados para la genotipificación de 34 individuos de la localidad Canal Maule (Tabla I).	27
Tabla IV. Reacciones poolplex con los iniciadores de microsatélites marcados con distinto color.....	37
Tabla V. Porcentaje de error y éxito de amplificación de los 6 loci microsatélites utilizados para genotipificación los 370 individuos.	37
Tabla VI. Porcentaje de error y éxito de amplificación de los 6 loci microsatélites utilizados para genotipificación de 346 individuos, cuando se eliminaron de la base de datos global con un éxito de amplificación menor al 80% para los 6 loci.	38
Tabla VII. Frecuencia de alelos nulos por locus por localidad, para 6 loci microsatélites específicos para <i>Lithodes santolla</i> . Estimados realizados con el software FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). Se encuentra marcado con color azul el sitio de muestreo y locus que presentó alelos nulos.....	39
Tabla VIII. Frecuencia de alelos nulos para 6 loci microsatélites de <i>Lithodes santolla</i> . Estimados realizados con el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). Se agrupó los 16 sitios de muestreo como una sola población.	39
Tabla IX. Resultados de la prueba de neutralidad para los 6 loci microsatélites específicos para <i>Lithodes santolla</i> . (1,000,000 simulaciones; $p \leq 0.05$; submuestra=30). LOSITAN (Antao <i>et al.</i> , 2008).	41
Tabla X. Valores de F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) para comparaciones por pares de sitios de muestreo. Diagonal inferior los valores de F_{ST} y diagonal superior sus valores de p correspondiente ($p \leq 0.0004$ después de la corrección de Bonferroni, 136 pruebas). Los valores fueron obtenidos con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Para las abreviaciones ver Tabla I.	46
Tabla XI. Resultado del AMOVA multilocus realizado con los 16 sitios de muestreo de <i>L. santolla</i> . Las primeras 3 columnas son los porcentajes de la variación total de la varianza explicada. Las 3 columnas de la derecha muestran los valores de los índices de fijación F_{IS} (entre individuos dentro de las poblaciones, F_{ST} (individuos entre poblaciones) y F_{IT} (total) ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010).....	48
Tabla XII. Variabilidad genética poblacional estimada mediante 6 loci microsatélites de <i>Lithodes santolla</i> . (N) tamaño de muestra, (A) número promedio de alelos por locus, (H_o) heterocigosidad observada y (H_e) esperada con su probabilidad de equilibrio de HW (en azul $p \leq 0.001$, después de corrección de Bonferroni), (AM) alelos nulos, (F_{IS}) índice de endogamia de Weir y Cockerham con su probabilidad, en azul los que resultaron significativos ($p \leq 0.05$) y (F_{ST}) valores de diferenciación genética global por locus. Los	

programas que se utilizaron para las estimaciones fueron ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010), GENEPOP v 4.0 (Rousset, 2008), FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995), y FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). 49

Tabla XIII. Variabilidad genética poblacional estimada mediante 5 loci microsatélites de *Lithodes santolla* (Lsa01, 08, 10, 11 y 13). (*N*) tamaño de muestra, (*A*) número de alelos por locus, (*Ho*) heterocigosidad observada y (*He*) esperada, (*FIS*) índice de endogamia de Weir y Cockerham (*FIS*) y (*FST*) valores de diferenciación genética global por locus. Los programas que se utilizaron fueron ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010), GENEPOP V 4.0 (Rousset, 2008), FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995). 87

Tabla XIV. Valores de *FST* (Weir y Cockerham, 1984) para comparaciones por pares de sitios de muestreo mediante 5 loci microsatélites (Sin Lsa14). Diagonal inferior los valores de *FST* y diagonal superior sus valores de *p* correspondiente ($p \leq 0.0004$ después de la corrección de Bonferroni, 136 pruebas). Los valores fueron obtenidos con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010). Para las abreviaciones ver Tabla I. 88

Tabla XV. Variabilidad genética poblacional estimada mediante 6 loci microsatélites de *Lithodes santolla* utilizando las localidades con un tamaño de muestra mayor a 20. (*N*) tamaño de muestra, (*A*) número promedio de alelos por locus, (*Ho*) heterocigosidad observada y (*He*) esperada con su probabilidad de equilibrio de HW ($p < 0.001$, después de corrección de Bonferroni), (*FIS*) índice de endogamia de Weir y Cockerham con su probabilidad, en azul los que resultaron significativos ($p \leq 0.05$) y (*FST*) valores de diferenciación genética global por locus. Los programas que se utilizaron para las estimaciones fueron ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010), GENEPOP v 4.0 (Rousset, 2008) y FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995). 89

Tabla XVI. Valores de *FST* (Weir y Cockerham, 1984) para comparaciones por pares de sitios de muestreo utilizando 6 loci microsatélites y 8 localidades $n > 20$. Diagonal inferior los valores de *FST* y diagonal superior sus valores de *p* correspondiente ($p \leq 0.001$ después de la corrección de Bonferroni, 36 pruebas). Los valores fueron obtenidos con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010). Para las abreviaciones ver Tabla I. 90

1. INTRODUCCIÓN

Las pesquerías dentro de un país son de gran importancia, ya que además de generar enormes cantidades de alimento, son fuente importante de empleos para millones de personas y tienen gran contribución al producto interno bruto (PIB) (Beaumont y Hoare, 2003). No obstante, algunas especies son explotadas sin conocer los aspectos biológicos y poblacionales básicos tales como: el tamaño poblacional, la estructura de edades, el patrón reproductivo, la tasa de mortalidad natural, el éxito de reclutamiento y la tasa a la cual se está extrayendo el recurso por actividad de pesca. Estos parámetros generalmente son obtenidos directamente de las actividades de pesca, sin embargo, para llevar a cabo un manejo sustentable de los recursos pesqueros, es necesario tomar en cuenta otros aspectos de las poblaciones, los cuales a menudo se desconocen como: la existencia de una o más unidades genéticas distintas así como la magnitud de la dispersión de los organismos en sus diferentes estadios de vida (Beaumont y Hoare, 2003; Ungfors *et al.*, 2009).

Actualmente, existe interés por parte de los sectores públicos y privados para que los recursos sean auto-renovables y el objetivo de muchas pesquerías es lograr la certificación de sustentabilidad de sus recursos, de manera que se gestione adecuadamente para que permanezca en el tiempo a pesar de su explotación continua. Saetersdal (1984) define la gestión pesquera como la actividad que permite la mejor explotación posible del recurso en provecho de la comunidad, es decir se busca alcanzar el mayor beneficio posible (cantidad, empleo y dinero) para la comunidad pero cuidando que no se ponga en riesgo el potencial reproductivo del recurso.

Cuando las pesquerías son mal manejadas, tienen gran efecto sobre las poblaciones naturales, ya sea disminuyendo los tamaños poblacionales, fragmentando las poblaciones, sesgando selectivamente a la población durante las cosechas y en algunos casos provocando daños a la diversidad genética de dichas

especies (Ryman *et al.*, 1995). Por lo que es importante definir cómo se encuentra estructurado espacial y temporalmente el recurso pesquero sobre el cual se ejerce la explotación, esta definición debe precisar sin ambigüedad las unidades de stocks o poblaciones genéticamente distintas (Cadrin *et al.*, 2005).

Una población, desde el punto de vista genético-evolutivo es aquella en donde se hace énfasis en las interacciones reproductivas entre los individuos y la compone un grupo de individuos que se reproducen y se encuentran muy próximos unos de otros geográficamente (Templeton, 2006; Waples y Gaggiotti, 2006). En biología pesquera, con frecuencia se emplea el concepto de stock como un grupo de individuos de la misma especie aislado reproductivamente y por lo tanto genéticamente distinto a otros grupos (Carvalho y Hauser, 1994), ambas definiciones hacen hincapié en la integridad genética de los individuos como elementos cohesivos de la población.

Adicionalmente, es importante reconocer y definir la extensión geográfica que ocupa una población genética para definir unidades o stock pesqueros con la meta de realizar un manejo adecuado; si la extensión geográfica que delimita una población de otra es demasiado grande, puede que no se reconozcan las poblaciones independientes, de lo contrario, si se definen dos poblaciones distintas genéticamente como una misma podrían ponerse en riesgo las cuotas de pesca (Stevens, 2014). Si se ignora la pérdida de diversidad genética, tanto la productividad como el potencial adaptativo podrían disminuir (Altukhov y Salmenkova, 1987). Para esto, es necesario entender cómo está distribuida la variabilidad genética así como los procesos que causan esta diversidad (Allendorf y Luikart, 2007).

Los marcadores moleculares están siendo aplicados al manejo de recursos pesqueros de interés comercial debido a que son herramientas que permiten definir con precisión los stocks poblacionales, determinar si existe flujo genético entre individuos de áreas continuas o alejadas, identificar las especies al momento de las capturas, o determinar áreas en donde hay mezcla de poblaciones, entre otros. Medir la variación genética dentro y entre poblaciones es el principal atributo para

inferir la estructura poblacional y estos datos pueden proporcionar un indicador de aislamiento reproductivo entre los grupos (Carvalho y Pitcher, 1994).

Los marcadores del tipo microsatélites son secuencias cortas de ADN (motivos) repetidas en tandem de 2 a 6 unidades de repetición, incrementan o disminuyen su tamaño a consecuencia de que nuevas repeticiones son adicionadas o eliminadas ya sea por deslizamiento de la ADN polimerasa o por errores en la revisión o “proofreading” durante la replicación del ADN, y son estas diferencias en tamaños las que pueden ser analizadas por electroforesis. Debido a su alto nivel de polimorfismo, confiabilidad y reproducibilidad en PCR y genotipificación, estos marcadores nucleares han sido utilizados en varios estudios de genética de población de varios organismos pesqueros de importancia comercial para resolver problemáticas a nivel intraespecífico (Zhang, 2004; Stevens, 2014).

En el caso de la centolla de magallanes (*Lithodes santolla*, Molina, 1782), una especie que se explota desde hace más de 70 años con fines comerciales, poco se conoce sobre la diversidad genética que la constituye. Es una especie cuyos precios en el mercado oscilan entre los 2.8 y 4.5 dólares por kilo (precio en playa) y su demanda ha incrementado en la última década en Estados Unidos, Holanda, Bélgica, Alemania, Francia, España y Asia, por lo que se han observado importantes aumentos en los desembarques en la XII región de Chile para los años 2006, 2011 y 2013 con 3951, 4524 y 5726 toneladas respectivamente.

En un estudio realizado recientemente, *Lithodes santolla* fue evaluada como una población panmíctica en toda la región XII de Chile, es decir que las centollas que se distribuyen a lo largo de esa región se reproducen aleatoriamente y pueden ser consideradas como una unidad genética, esos estudios fueron realizados con marcadores bioquímicos (esterasas), con los fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAPD) y polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Soto *et al.*, 2007). Lamentablemente, este estudio aún no se ha publicado y la referencia que se cita aquí, es un resumen de un congreso (XXXIX Reunión Anual de Genética de Chile, 2006) donde no existen detalles sobre el número de muestra, el área geográfica analizada, etc., por lo que existe

incertidumbre sobre la conclusión de panmixia. Debido a esto, se justifica el uso de marcadores más polimórficos tales como los microsatélites y de un área geográfica extensa como la XII región de Chile.

Por tal motivo la finalidad del presente trabajo es identificar la estructura genética de la centolla de Magallanes (*L. santolla*) a lo largo de la región norte y centro-oeste de Magallanes, discernir si existe flujo genético entre ellas y la intensidad de éste utilizando 6 marcadores microsatélites. Con este conocimiento se puede aportar valiosa información para los tomadores de decisiones para delinear zonas de pesca y temporadas de veda más adecuadas a la biología de la especie, definir stocks en base a las unidades genéticas encontradas o regular los permisos y definir cuotas dependiendo de las características genéticas intrínsecas de cada stock, todo esto con el fin de contribuir con conocimiento para hacer del recurso centolla un recurso sustentable.

2. ANTECEDENTES

2.1 GENÉTICA DE POBLACIONES

La genética de poblaciones estudia el origen, la cantidad, la distribución de la variación genética presente en las poblaciones y los procesos por los cuales estas poblaciones evolucionan, es decir, cómo es el cambio en las frecuencias alélicas a través de las generaciones (Templeton, 2006). Las diferencias en las frecuencias alélicas entre poblaciones constituye la estructura genética. Cuando se hace referencia de una especie con alta estructura genética, quiere decir que se pueden detectar diferencias marcadas en las frecuencias alélicas entre las poblaciones y por lo tanto esta información permite identificar poblaciones locales distintas. Por su parte, una especie con baja estructura genética estará constituida por agregaciones de individuos con muy poca o nula diferencia en las frecuencias alélicas. Entender las causas de estas diferencias en las frecuencias alélicas (estructura genética) es el principal objetivo de la genética de poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2010).

La estructura genética que observemos en las poblaciones en condiciones naturales será el resultado de la acción de diferentes fuerzas evolutivas tales como: mutación, migración, deriva génica y selección natural. Un modelo nulo utilizado en genética de poblaciones para entender la evolución de las frecuencias alélicas es el de Equilibrio de Hardy-Weinberg (E-HW), en él, ninguna de estas fuerzas estará actuando sobre la población (Freeland, 2005). Una población que cumpla los requisitos anteriores y que tenga una reproducción aleatoria será una población panmíctica, en donde los organismos que ocupan una región geográfica dada tendrán una distribución no interrumpida y por lo tanto habrá una alta homogeneidad en las frecuencias alélicas a lo largo de un escenario geográfico, sin embargo, rara vez encontramos poblaciones que se comporten de esta manera (Allendorf *et al.*, 2013). Otros modelos poblacionales discretos pueden tener dos escenarios: uno en el que los individuos de cada población tiene acceso a cualquiera de las subpoblaciones (modelo de islas; Wright, 1943) y otro en el que las subpoblaciones sólo están conectadas con las más cercanas o adyacentes (modelo de saltos;

Kimura, 1953), también existe el modelo de aislamiento por distancia, donde los individuos más cercanos son más relacionados genéticamente que aquellos que se encuentra distantes (Allendorf *et al.*, 2013). Partiendo de estos modelos podemos observar qué pasa con las frecuencias alélicas cuando estos supuestos no se cumplen e inferir a cerca de la dinámica de la población.

En el presente estudio se espera encontrar diferencias en las frecuencias alélicas, por lo menos en aquellos sitios de muestreo aislados como los fiordos o canales de la XII región de Chile.

2.1 BIOLOGÍA DE LA ESPECIE

La centolla de magallanes (*Lithodes santolla*), es un crustáceo bentónico de aguas templado-frías perteneciente a la familia Lithodidae que se caracteriza por tener un caparazón grueso con numerosas espinas en la superficie, de las que destacan dos que terminan en la zona anterior. Presenta dimorfismo sexual y puede alcanzar una longitud de caparazón (LC) de hasta 19.8 cm y un peso superior a los 7 kg (Vinuesa, 1984; 2000) (Fig. 1). Es una especie longeva (se estima que puede llegar a vivir de 14 a 20 años), de crecimiento lento que alcanza la madurez sexual a los 5 ó 6 años de vida. El apareamiento se lleva a cabo una vez al año, durante la muda de las hembras. Al alcanzar la madurez sexual las hembras mudan cada año, con mayor intensidad en Diciembre, mientras que los machos lo hacen 2 ó 3 veces al año después del periodo de apareamiento (Vinuesa, 2000). Se reportan distintos meses de picos reproductivos así como de la edad promedio de madurez, dependiendo de la época del año y la distribución (Lovrich, 1997; Vinuesa y Labal, 1998). La fecundidad varía entre 2,000 y 60,000 huevos, dependiendo del tamaño de las hembras (Lovrich, 1997; Vinuesa y Labal, 1998; Wyngaard y Ioro, 2000).



Figura 1. Ejemplares de *L. santolla*, izquierda vista ventral, derecha vista dorsal. a) hembra adulta, b) izquierda, macho adulto.

El ciclo de vida de *L. santolla* consiste en un desarrollo indirecto, pasando por 3 estadios larvarios denominados zoea y un estadio post-larva llamado megalopa (Vinuesa *et al.*, 1985). La embriogénesis dura entre 9 y 10 meses y la eclosión de las larvas ocurre durante los meses de Agosto y Noviembre pero varía dependiendo de la latitud, se cree que *L. santolla* tiene periodos de eclosión mayores a 7 semanas en el medio natural. Se ha sugerido que los periodos largos de eclosión en lithodidos subantárticos son una estrategia para aumentar la tasa de supervivencia en los primeros estadios de vida, además de aumentar la dispersión y disminuir la depredación pelágica (Thatje *et al.*, 2003).

El desarrollo larvario puede durar de 18 a 200 días en condiciones de laboratorio dependiendo de la temperatura (Vinuesa *et al.*, 1985; Calcango *et al.*, 2004; 2005). Se ha demostrado que las larvas de *L. santolla* son completamente lecitotróficas debido a que son capaces de desarrollarse con éxito desde la eclosión hasta la metamorfosis en total ausencia de alimentos, se alimentan de las reservas de nutrientes suministradas al huevo por la madre, por lo que no es necesario que la eclosión coincida con los periodos de productividad primaria (Lovrich, 1999; Pechenik, 2000; Kattner *et al.*, 2003). Además, las larvas de *L. santolla* son capaces

de desarrollarse desde la eclosión hasta el estadio zoea a temperaturas menores de 1 a 3 °C (teniendo un crecimiento más rápido a mayores temperaturas) (Anger *et al.*, 2004).

El grado de independencia larval de la vida planctónica, en combinación con la alta tolerancia a las bajas temperaturas, se ha interpretado como una adaptación de las historias de vida tempranas a las condiciones que prevalecen típicamente en las latitudes altas (estrés al frío y cortos pulsos de productividad planctónica impredecibles en verano) (Anger *et al.*, 2004; Calcando *et al.*, 2004). Así mismo, la ausencia de larvas en muestras planctónicas y el comportamiento de éstas en estudios en laboratorio sugieren que las larvas son epibentónicas. Los estadios tempranos (individuos 0.15 a 1.35 cm de LC) se asocian mayormente a los discos del alga *Macrocystis pyrifera*, o a fondos complejos con conchas y rocas que les proveen protección contra posibles depredadores, aproximadamente a 40 m de profundidad (Tapella y Lovrich, 2006).

Lithodes santolla se distribuye, en el Océano Pacífico desde la X a la XII región de Chile [abarcando desde la Isla Grande de Chiloé (42°40'36" S 73°59'36" O) hasta Cabo de Hornos (55°58'48.5"S 67°17'21"O), incluyendo el estrecho de Magallanes y Canal del Beagle] hasta el Océano Atlántico a la altura de Uruguay (Vinuesa, 1991) (Fig. 2). Tiene una distribución batimétrica que va desde el submareal hasta profundidades cercanas a los 700 m; habita preferentemente fondos de arena y piedras, sin embargo, realiza migraciones en épocas reproductivas a aguas entre los 30 y 120 metros por lo que se facilita la captura de los adultos. Se cree que los individuos no realizan migraciones latitudinales o longitudinales de consideración y por esta razón se piensa que el recurso en la región austral se encuentre constituido por múltiples unidades poblacionales o con escaso o nulo grado de mezcla entre ellas (Boschi *et al.*, 1992; Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2009).

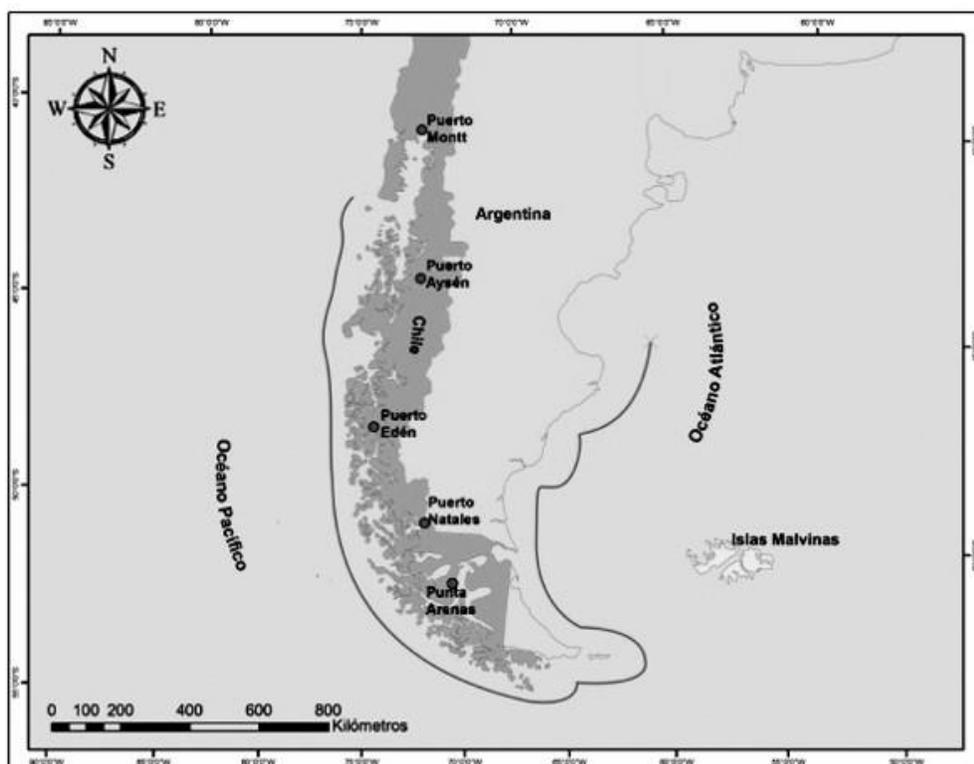


Figura 2. Mapa de la distribución global de *Lithodes santolla*. La línea describe la distribución geográfica de la especie. Tomado de Vinuesa (1991).

2.2 ESTADO PESQUERO DEL RECURSO

La pesca de *L. santolla* se lleva a cabo en el interior de los fiordos y canales de la región de Magallanes y es exclusiva para la pesca artesanal, su explotación en Chile comenzó en 1928, teniendo importantes capturas en 1983 (2755 ton) debido al colapso de la pesquería de cangrejo real (*Paralithodes camtschaticus*) en Alaska (Vinuesa, 2000). Es el principal recurso de la pesca artesanal en la Región de Magallanes y Antártica Chilena, representando una especie emblemática de alto impacto en el mercado internacional, además de ser una importante fuente de divisas y empleos (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014).

Actualmente, el recurso es explotado en la región de Los Lagos (X), Aysen (XI), Los Ríos (XIV) y La región de Magallanes (XII) bajo la categoría de plena explotación (Res. Ex. N° 3556/2014), siendo esta última la que presenta los mayores volúmenes de extracción a nivel nacional; reportándose 4,548.69 toneladas para el año 2013 (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2014). El principal objetivo de las reglamentaciones impuestas a las pesquerías ha sido guardar el potencial reproductivo por lo que en la actualidad se rigen las siguientes medidas: una veda biológica que va del 01 de Diciembre al 30 de Junio asegurando de esta manera que los individuos puedan reproducirse antes de la temporada extractiva. No se permiten registros de pesca artesanal de la X, XI, XII, XIV, regiones (Res. Ex. N° 3556/2014). Sólo se permite el uso de trampas para su pesca (Res. Ex. N° 442/1981) ya que ha demostrado ser el arte de pesca menos invasivo tanto para la especie objetivo como para la fauna de fondo. La talla mínima legal para la XII región (TML) es de 12 cm de LC (medidos desde el extremo distal del rostro a la base del caparazón) (D. Ex. N° 375/1987); ya que los individuos comienzan su madurez funcional (tamaño en que el macho puede sujetar a la hembra en la etapa precopulatoria) a partir de los 8-9.5 cm de LC, con esta medida se permite a una fracción de la población reproducirse antes ser pescados. Está prohibida la captura y el desembarque de hembras con la finalidad de asegurar el reclutamiento de nuevos individuos a las siguientes generaciones (D. Ex. N° 443/1990) (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2013; Vinuesa, 2000).

Aun cuando existen vedas y se realizan grandes esfuerzos por evitar la pesca ilegal, se ha observado cambios en algunos indicadores de la población como abundancia relativa, tallas de los ejemplares capturados e índices de condición reproductiva, como el tamaño de las masas ovígeras de las hembras o porcentaje de individuos con caparazón blando capturados (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2013; 2014). Estos parámetros dan una idea de la condición de la población, además de ser indicadores indirectos de la composición del stock en las

diferentes áreas de pesca, obligando a los administradores de la pesca en Chile a definir los stocks explotables (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2009; 2014).

En los años 2007-2013 se observó una tendencia de incremento en los valores de las tallas medias mensuales conforme avanza el año. En el mismo periodo, se observó una disminución en los tamaños de las masas ovígeras de las hembras así como una disminución en el rendimiento de pesca (menor número y peso de individuos por trampa) en el 95% de los monitoreos realizados por el Instituto de Fomento Pesquero de Chile (IFOP). Aunado a esto, se observó aumentos en el número de ejemplares con caparazón blando durante la temporada extractiva (Julio-Noviembre); por lo que es probable que estos individuos apenas se estaban reproduciendo (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2009; 2014).

2.3 ESTUDIOS GENÉTICOS EN *LITHODES SANTOLLA*

El único estudio genético realizado para *L. santolla* en la región XII de Chile es el de Soto *et al.* (2007), en el cual se reporta una baja estructuración genética ($F_{ST}= 0.0097$) proponiendo una población panmíctica para la región. Sin embargo, este estudio no se ha publicado y sólo se cuenta con el resumen de un congreso, en el cual no se aportan datos relevantes como número de muestra, área geográfica analizada o número de marcadores utilizados. Además, los marcadores usados (electroforesis de proteínas, RFLP y RAPD) muestran bajo polimorfismo y confiabilidad para detectar heterocigotos para algunos loci, por lo que no son los mejores indicadores de diferenciación genética a nivel intra-poblacional, como se ha observado en el cangrejo real de Alaska o centolla roja del norte, *Paralithodes camtschaticus*, en el mar de Bearing y aguas de Alaska (Seeb *et al.*, 1990; Grant *et al.*, 2011).

Por otro lado, la empresa BTA S.A., en un informe para el Instituto Nacional de Propiedad Industrial (INAPI) para el Gobierno de Chile (2014), reporta un trabajo

de evaluación de la especie a través de marcadores moleculares en donde concluyen que “el estudio genético mostró que existe un flujo genético abierto e importante entre las localidades en estudio, lo que sugiere la existencia de un solo grupo poblacional en la Región de Magallanes”. En este reporte se menciona que *L. santolla* no presenta diferencias poblacionales para las distintas zonas de pesca o macrozonas en la Región de Magallanes y que puede tomarse como una sola población a lo largo de la XII región. Este documento tampoco está publicado ni mencionan el tipo y número de marcadores moleculares utilizados, así como la extensión del área de muestreo o el número de individuos analizados, dejando incierto de que *L. santolla* sea o no una sola población a lo largo de su distribución en Chile.

2.4 ESTUDIOS GENÉTICOS EN EL CANGREJO REAL DE ALASKA: un análisis comparativo con la centolla de Chile.

Paralithodes camtschaticus (Tilesius, 1815) puede ser usado como referencia de estudios genéticos debido a que presenta algunas características de vida similares a las de *L. santolla* y sobre todo es una especie que ha sido ampliamente estudiada desde hace tiempo dada su importancia comercial para las pesquerías del Pacífico, existiendo muchos estudios, tanto biológicos como genéticos. *Paralithodes camtschaticus* o cangrejo real de Alaska, es la especie con mayor abundancia y distribución en el Pacífico Norte que se extiende desde el mar de Japón al norte de la Columbia Británica y dentro de los mares de Bearing y Chukchi (Grant y Cheng, 2012). Los adultos de *P. camtschaticus* al igual que *L. santolla*, realizan migraciones verticales temporales hacia aguas profundas para alimentarse y hacia aguas someras para la reproducción (Stone *et al.*, 1993). La reproducción es anual y las hembras llevan los huevos en su abdomen por 11 meses, presenta largos periodos de eclosión (2 a 3 semanas) y tiene 4 estadios larvarios y una post-larva denominado glaucothoe (antes de convertirse en el primer

cangrejo juvenil), a diferencia de *L. santolla* donde las larvas son planctotróficas (que se alimentan del plancton) y pasan más de 80 días en la columna de agua hasta comenzar su vida bentónica. Alcanzan la madurez sexual a los 5-7 años de edad y son reclutados en la pesquería a partir de los 7-9 años (Stevens *et al.*, 2008).

Los estudios realizados con marcadores moleculares en esta especie han revelado bajos niveles de estructuración genética cuando utilizan marcadores bioquímicos (Seeb *et al.*, 1990; Balakirev y Fedoseev, 2000; Grant *et al.*, 2011), mientras que en estudios realizados con otros marcadores más polimórficos, como son los microsatélites, se ha encontrado niveles de diferenciación genética entre las poblaciones a un nivel más fino (extensiones geográficas menores) (Zelenina *et al.*, 2008; Vulstek, 2011). También se han realizado estudios utilizando secuencias del ADN mitocondrial y SNPs (Polimorfismo de un nucleótido simple), sin embargo, estos marcadores tuvieron bajo poder estadístico (0.26) para detectar diferencias de frecuencias alélicas más pequeñas entre las poblaciones (Grant y Cheng, 2012).

Para el cangrejo real de Alaska se ha reportado que los niveles de diferenciación genética poblacional se ven afectados por las corrientes marinas y las características geográficas de las zonas. Por ejemplo, en un estudio realizado con marcadores microsatélites y secuencias del ADN mitocondrial encuentran un gradiente en la diversidad entre las poblaciones del Noroeste del Pacífico y las poblaciones del Sur del Golfo de Alaska (Vulstek, 2011). Se observó una mayor homogeneidad para las poblaciones del Noroeste (con menor diversidad genética entre ellas) debido a la acción de la corriente costera de Alaska, la cual aporta un gran flujo de las larvas planctónicas a las poblaciones situadas a lo largo de la costa del océano abierto (Oeste del Golfo de Alaska), resultando en un mayor intercambio genético y evitando que las poblaciones diverjan unas de otras. En cambio las poblaciones del Sureste de Alaska tuvieron una alta estructuración genética debido al aislamiento provocado por la complejidad geográfica (sistema de fiordos y canales) (Stevens, 2014).

Dado que no existen otros estudios genéticos realizados en *L. santolla* esperamos encontrar algo similar a los resultados obtenidos para las poblaciones

de *P. camtschaticus* en el sureste de Alaska en donde la geografía accidentada parece ser uno de los principales factores que impiden el flujo genético entre los cangrejos que habitan los fiordos, los cuales son ambientes similares a la Patagonia Chilena.

2.4 FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA ESTRUCTURA GENÉTICA DE LAS POBLACIONES DE CRUSTÁCEOS.

En general, se espera que las especies marinas muestren poca estructura poblacional a lo largo de grandes áreas geográficas debido a las pocas barreras para la dispersión de las larvas vía corrientes o al movimiento de los adultos, comparada con los organismos terrestres (Ward *et al.*, 1994). Sin embargo, análisis genéticos en decápodos comerciales han revelado complejos patrones de diferenciación genética a varias escalas geográficas, incluso a escala fina (distancias cortas de 40-255 km) (Weber y Levy, 2000; Weber *et al.*, 2000; Jørstad *et al.*, 2004; Weetman *et al.*, 2007), sugiriendo otros factores que determinan la estructura de poblaciones.

La dispersión de los cangrejos, ya sea como adultos o como larvas influye el grado de conectividad o flujo genético. Generalmente las poblaciones están limitadas por la calidad del hábitat y por la dinámica de la red alimenticia, por lo que las dispersiones se realizan en gran parte por las interacciones entre las corrientes oceánicas y las larvas (Stevens, 2014). En algunas especies como *Cancer pagurus* se ha observado que las migraciones de las hembras aumenta el intercambio genético, mientras que en el interior de la costa en los sistemas de fiordos el movimiento es menor y por lo tanto el flujo genético se ve limitado (Ungfors, 2007).

En cuanto a las larvas, se espera que las especies con larvas planctónicas tengan mayor capacidad de dispersión que las bentónicas, teniendo mayor posibilidad de intercambio genético entre poblaciones (Stevens, 2014). La compleja

topografía de la línea de costa también es una limitante para la dispersión de las larvas, especialmente entre poblaciones que habitan los fiordos semi-cerrados como el cangrejo real de Alaska (*P. camtschaticus*) (Jørstad *et al.*, 2007).

Los rasgos de historia de vida también influyen en la estructura genética de la población. La dispersión de las larvas en la mayoría de los cangrejos es limitada al principio debido a que los huevos se encuentran unidos a los pleópodos de la madre durante varios meses antes de que eclosionen. El auto-reclutamiento poblacional contribuye al aislamiento entre poblaciones y a la aparición de diferencias genéticas debido a la deriva génica. Por otra parte, el reclutamiento de cangrejos no locales dentro de la población promueve el flujo genético y tiende a hacer a las poblaciones genéticamente homogéneas (Bradbury *et al.*, 2008).

De acuerdo con lo anterior, la estructura genética de las poblaciones de crustáceos está determinada por la compleja interacción de varios factores, incluyendo el apareamiento y el comportamiento previo al desove, el tiempo de desarrollo larval y el comportamiento de las larvas, la oceanografía y su variación temporal y anual así como la complejidad de la línea de costa.

3. JUSTIFICACIÓN

Este trabajo de tesis se desarrolla en el contexto del proyecto “Estudio combinado de variabilidad genética y morfológica de la centolla (*Lithodes santolla*) en la región de Magallanes y Antártica Chilena: Herramienta para el manejo, sustentabilidad y plusvalía del recurso” (Corfo – Innova Cod. 12BPC2-13541) que desarrolla el Centro Regional Fundación CEQUA, Chile y tiene como objetivo conocer la variabilidad genética de *Lithodes santolla* mediante el uso de marcadores microsatélites.

El hecho de que *L. santolla* tenga una baja tasa de crecimiento, un largo tiempo generacional (6 años) y una fase larvaria poco conocida en las poblaciones naturales, hace que su estudio sea prioritario ya que el interés por este recurso pesquero no ha disminuido y se ha observado que la recuperación natural de los stocks es lenta.

La pesquería de la centolla en Chile se administra mediante la estrategia conocida como “SSS” en donde se regula la talla (size), se prohíbe la extracción de hembras (sex) y se maneja una veda estacional (season) para proteger el proceso reproductivo, también se regula el número de embarcaciones y el arte de pesca utilizado. Sin embargo, en los últimos años se ha observado deterioro en algunas variables indicadoras del estado de la población (tallas de los individuos, desembarque de individuos por debajo de la TML, disminución de masas ovígeras, etc.) y debido a las particularidades del recurso, la intensa pesquería y las condiciones geográficas en que se realiza la actividad; no se ha podido consolidar una estrategia para evaluar los stocks así como una referencia para calificar el estado de la pesquería.

Dada la problemática que se observa en esta pesquería, el presente trabajo pretende aportar información sobre la dinámica de la estructura poblacional así como si existe o no un flujo genético (conectividad) entre las zonas de pesca mediante el uso de marcadores microsatélites. Este conocimiento servirá para

reevaluar las reglamentaciones de manejo y uso del recurso, así como identificar stocks, determinar la intensidad del flujo genético entre stocks y estimar el efecto que tendrán las pesquerías sobre los distintos stocks de la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes, la cual es una zona fuertemente explotada.

4. OBJETIVOS

4.1 GENERAL.

Determinar la estructura genética poblacional de *Lithodes santolla* en la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes y Antártica, Chile mediante marcadores tipo microsatélites.

4.2 ESPECÍFICOS.

1. Estandarizar 25 loci microsatélites específicos para *L. santolla* y realizar la genotipificación de 370 individuos.
2. Evaluar si existen poblaciones genéticamente distintas en la zona de estudio.
3. Analizar la diversidad genética inter e intra-poblacional.

5. HIPÓTESIS

Debido a que *L. santolla* es un crustáceo que se distribuye en un área geográfica compleja (fiordos, canales, y bahías cerradas) y presenta características tales como; tamaños poblacionales grandes, sexos separados, larvas bentónicas y dado que los individuos no realizan migraciones longitudinales o latitudinales de consideración, esperamos que este crustáceo muestre dos o más poblaciones genéticamente distintas a lo largo del área de estudio.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 ÁREA DE ESTUDIO.

El área de estudio del presente trabajo, consiste desde Guarello por el extremo norte hasta el Archipiélago de Cabo de Hornos (-55°S -67°O) por el sur. Se incluyeron 16 sitios de muestreo entre la zona norte y centro, con mayor representación de muestras en el centro (13 sitios) que incluye la zona centro-oeste de la región (Fig. 3).

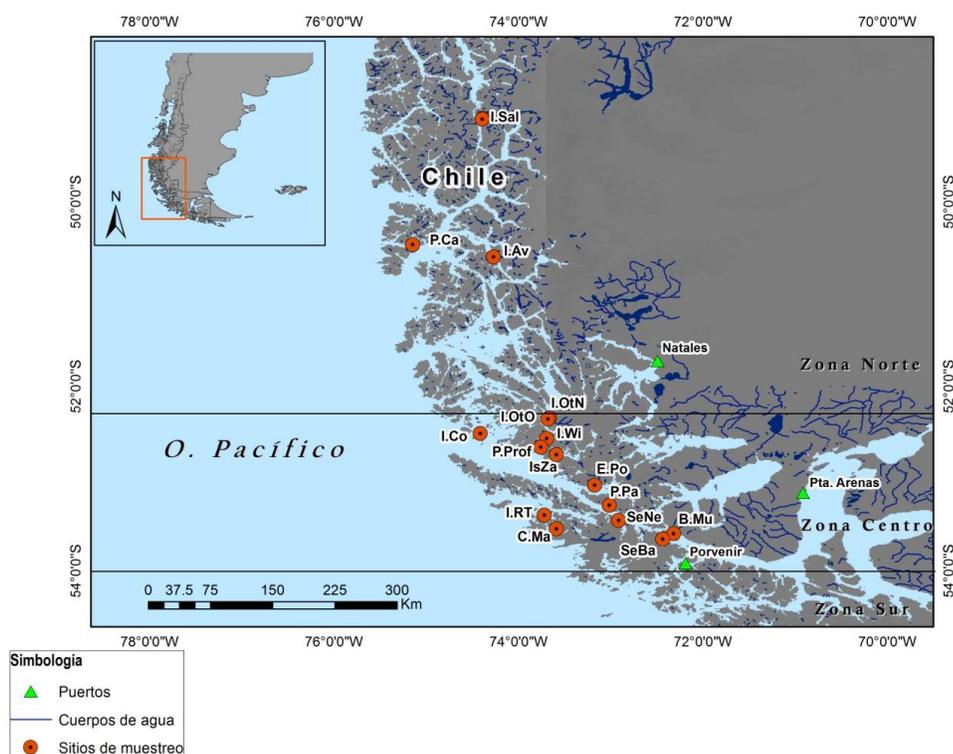


Figura 3. Mapa de los sitios de muestreo de *L. santolla*. Isla Salamandra, Paso del Indio (**I.Sal**); Puerto Caracciolo (**P.Ca**); Isla Avelino, Seno Marangunic (**I.Av**); Islas Otter, Norte Campbell (**I.OtN**); Islas Otter, Oeste (**I.OtO**); Isla Cóndor (**I.Co**); Isla Williams, Bahía Siverwright (**I.Wi**); Puerto Profundo (**P.Prof**); Paso Labbé, Isla Zanelli (**I.Za**); Estero Portaluppi, Punta Alfredo (**E.Po**); Playa Parda (**P.Pa**); Isla Rice Trevor, Canal Abra (**I.RT**); Seno Nevado, Bahía Havergal (**SeNe**); Canal Maule (**C.Ma**); Bahía Mussel (**B.Mu**) y Seno Ballena (**SeBa**). En verde se observan los principales puertos de desembarque de centolla cercanos al área de muestreo. Las líneas negras dividen las 3 zonas (norte, centro y sur) de la XII región de Magallanes y Antártica Chilena.

6.1.1 CARACTERÍSTICAS DEL ÁREA DE ESTUDIO.

La región de los canales y fiordos australes de Chile se extiende aproximadamente entre los 41° y 55° S. Este paisaje ha sido moldeado por el avance y retroceso de los hielos, dejando profundos surcos en forma de fiordos con aguas apozadas en las que el intercambio de aguas marinas es difícil. Desde el punto de vista oceanográfico es una zona compleja y heterogénea de tipo estuarino, debido a la variabilidad de sus parámetros hidrográficos (temperatura, salinidad, densidad y oxígeno disuelto) se generan fuertes gradientes de horizontales y verticales en estos parámetros (Guerrero, 2000; Sievers *et al.*, 2002). Esta región se caracteriza por una mezcla de aguas oceánicas de origen subantártico con aguas continentales más frías y menos salinas derivadas del Campo de Hielo Patagónico (Silva *et al.*, 1998; Guzmán y Silva, 2002).

Estudios oceanográficos como el programa CIMAR en 1995 y el de Sievers y Silva (2006), entre otros, han permitido identificar las masas de agua presentes en las 3 zonas (Norte, Centro y Sur) por sus propiedades físicas, químicas y de circulación presentes en cada una de ellas y proponer modelos esquemáticos de circulación general.

Del conjunto de masas de agua que caracterizaron, sólo dos de ellas penetran a la zona de aguas interiores (zona de canales y fiordos): el agua Subantártica (ASAA) por la capa superficial y el agua Ecuatorial Superficial (AESS) por la profunda. La primera, se va mezclando con agua dulce en distintas proporciones dependiendo del aporte de los ríos, escurrimientos costeros, pluviosidad y cercanía o lejanía de las fuentes de agua dulce (Silva *et al.*, 1998).

6.2 RECOLECTA DE MATERIAL BIOLÓGICO.

Se realizaron recolectas durante los días 3 al 28 de Noviembre del 2012 obteniendo 370 muestras de las cuales se cuenta con la información de

georeferenciación y sexo. En la Tabla I se detallan las coordenadas, nombre, clave de la localidad y tamaño de muestra en los 16 sitios de muestreo.

Tabla I. Localización geográfica de los sitios de muestreo en coordenadas decimales, nombres de las localidades, clave de la localidad y tamaño de muestras. Las localidades se muestran en orden latitudinal (norte-sur).

Localidad	Clave Localidad	Latitud Sur	Longitud Oeste	Tamaño de muestras
Isla Salamandra, Paso del Indio	I.Sal	-49.09685	-74.38388	32
Puerto Caracciolo	P.Ca	-50.46695	-75.14545	21
Isla Avelino, Seno Marangunic	I.Av	-50.60000	-74.26777	20
Islas Otter, Norte Campbell	I.OtN	-52.34349	-73.66275	45
Islas Otter, Oeste	I.OtO	-52.35594	-73.67853	15
Isla Cóndor	I.Co	-52.51250	-74.41148	3
Isla Williams, Bahía Siverwright	I.Wi	-52.56811	-73.69077	14
Puerto Profundo	P.Prof	-52.66248	-73.75541	6
Paso Labbé, Isla Zanelli	I.Za	-52.74139	-73.58689	49
Estero Portaluppi, Punta Alfredo	E.Po	-53.07287	-73.17131	18
Playa Parda	P.Pa	-53.29031	-73.01035	21
Isla Rice Trevor, Canal Abra	I.RT	-53.39650	-73.71649	19
Seno Nevado, Bahía Havergal	SeNe	-53.45599	-72.90979	14
Canal Maule	C.Ma	-53.54639	-73.58525	34
Bahía Mussel	B.Mu	-53.59918	-72.31442	43
Seno Ballena	SeBa	-53.65971	-72.43166	16
Total				370

Los individuos se obtuvieron directamente de los pescadores en actividad de pesca comercial en altamar. Todos los organismos fueron identificados con número de ejemplar y localidad. Se tomó un fragmento muscular del apéndice ambulatorio o pereiópo y se fijó en alcohol al 96%.

6.3 MUESTRAS BIOLÓGICAS.

6.3.1 Almacenamiento y procesamiento

Con el objeto de desarrollar este trabajo de tesis se transfirió un total de 109 muestras de tejidos y 329 muestras de ADN total de centolla desde el laboratorio de Ecología Molecular del Centro Científico Regional Fundación CEQUA Punta Arenas Chile al laboratorio de Genética para la Conservación del Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste de México (CIBNOR).

6.3.2 Extracción de ácidos nucleicos.

Debido a que algunas de las muestras de ADN se evaporaron o era necesaria mayor cantidad de ADN se realizaron 93 extracciones adicionales de ADN de centolla siguiendo el protocolo de extracción por sales (Aljanabi y Martinez, 1997) en el laboratorio de Genética para la Conservación (Anexo 1). De cada muestra de tejido conservada en etanol se cortaron de 10-20 mg de tejido muscular para su extracción.

La cuantificación de ADN se llevó a cabo en un nanodrop 8000 (Thermo SCIENTIFIC®). El ADN concentrado se almacenó en tubos eppendorf de 1.5 mL y se realizaron diluciones de trabajo con agua miliQ® para una concentración final de 40 ng/μL.

El material biológico (ADN y tejido muscular) se almacenó a -20° C en el laboratorio de Genética para la Conservación del CIBNOR.

6.4 SECUENCIACIÓN MASIVA.

La secuenciación y el diseño de los iniciadores o *primers* (del inglés) de PCR para microsatélites se realizó en la Universidad de Georgia, EUA, por el Dr. Travis C. Glenn de Enero a Mayo del 2013.

Cinco microgramos ADN de un individuo fue cortado utilizando un Covaris S2 y se ligaron adaptadores de Illumina mediante los métodos de Fisher *et al.* (2011) pero utilizando adaptadores equivalentes Illumina TruSeq con 10 índices nt (Faircloth y Glenn, 2012). Las librerías se agruparon y se corrieron en un secuenciador Illumina HiSeq, posteriormente de las lecturas obtenidas se identificaron y diseñaron los iniciadores para microsatélites mediante métodos informáticos (Castoe *et al.*, 2012). Se obtuvieron en promedio 10 millones de lecturas de 100 pb. Se detectaron 108,228 lecturas con microsatélites, de los cuales el 0.16% presentaron secuencias para el diseño de iniciadores. La selección de los iniciadores de microsatélites se hizo de la siguiente manera: 1) todos los loci con iniciadores que fueron encontrados más de una vez fueron eliminados, en particular aquellos dinucleótidos de longitudes muy cortas (<24 pb) o muy largas (>500pb); 2) se eliminaron los loci con muchas repeticiones. Con estos criterios se diseñaron 5,482 pares de iniciadores de tipo di, tri y tetra-nucleótidos con una longitud promedio de 150 pb, con un rango de secuencias blanco de amplificación de 75 a 300 pb (Glenn per. com.; Fisher *et al.*, 2011).

6.5 OPTIMIZACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES.

6.5.1 Selección de iniciadores.

De los iniciadores obtenidos con la secuenciación masiva, se eligieron 25 pares de loci microsatélites tetranucleótidos perfectos y se mandaron a sintetizar a LogitLab (Mexicali, B.C. México) (Tabla II). Los nombres fueron asignados utilizando

las iniciales del nombre científico de la centolla “Lsa” y números consecutivos del 01 al 25. Se seleccionaron iniciadores que tuvieran una C o G en la posición terminal 3’ debido al enlace de hidrógeno más fuerte de los residuos G/C, ayudando a mejorar la eficiencia de la reacción.

Los iniciadores *forward* fueron marcados con el conjunto de fluoróforos G5: azul (6-FAMTM), verde (VIC®), negro (NEDTM), y rojo (PET®). Estos fueron asignados de 4 en 4 para ser usados en procedimientos poolplex (agrupación de productos PCR de varios loci) y correrlos en el secuenciador para su posterior análisis por medio de poolplex.

Tabla II. Iniciadores de loci microsatélites obtenidos para pruebas de amplificación y polimorfismo. Matriz DS-33 de ABI PRISM® (Colores: amarillo (NED®), azul (FAM®), verde (VIC®) y rojo (PET®)).

Locus	Color	Secuencia del iniciador	Motivo repetido *
Lsa01	FAM	Forward: 5'-6FAM-AGGTACTGTGGGTATGTGCC-3'	ATAC(60)
		Reverse: 5'-ACCGGTACCCTTTCTAATATACGG-3'	
Lsa02	PET	Forward: 5'-PET-AGACTACCGTATCTGGTTAATCTGC-3'	AACT(52)
		Reverse: 5'-AGCTTGGATACCCACACCG-3'	
Lsa03	FAM	Forward: 5'-6FAM-TACGAGCGGGAGGTATACGG-3'	AGGT(48)
		Reverse: 5'-GGAGTGATGAAGATATACGCGG-3'	
Lsa05	VIC	Forward: 5'-VIC-AATAACAATTTACCCATCGTGCC-3'	ATCT(44)
		Reverse: 5'-CATGTCACCTGTTCCATCAGC-3'	
Lsa06	VIC	Forward: 5'-VIC-TGGGAAATATTGCAGATGCG-3'	TTCC(40)
		Reverse: 5'-GGGCGATCTCTGTAAGTGAAGG-3'	
Lsa07	PET	Forward: 5'-PET-CATCCATCCGCTCCTCCC-3'	ATGG(36)
		Reverse: 5'-GTTTCGTGGTCACCCGTCC-3'	
Lsa08	NED	Forward: 5'-NED-TTTCAGTTGGATGGCATTGG-3'	TCTG(32)
		Reverse: 5'-GACCTGACATTTAAAGAGAATGAAGC-3'	
Lsa09	VIC	Forward: 5'-VIC-CGAGAGCGAACAGAAAACG-3'	TTCC(32)
		Reverse: 5'-CTTCGACATATTTCTTTCTTCC-3'	

Lsa10	FAM	Forward: 5'-6FAM-TTGGTCTTGTTAGACACCCTGG-3' Reverse: 5'-GGCAGTGGTCACCCATCC-3'	AGGT(28)
Lsa11	PET	Forward: 5'-PET-GGGAAATCATCTATTGTAGAACCG-3' Reverse: 5'-AAATACTTATGCCTTTTGATCTATCTAGC-3'	TCTG(28)
Lsa13	NED	Forward: 5'-NED-TGACAAAACGATCATCAAGAGG-3' Reverse: 5'-GGTGGTCTACCTGTCATCTCG-3'	TCTG(28)
Lsa14	PET	Forward: 5'-PET-AAATGCATATACTTCTGTCTTTCGC-3' Reverse: 5'-CAATTGGCCAACCAATTAACC-3'	TTGG(28)
Lsa15	VIC	Forward: 5'-VIC-CAAGGATCTTAATACGCTTTTCC-3' Reverse: 5'-ACAGACACCATCACGGAGC-3'	AAAT(24)
Lsa16	PET	Forward: 5'-PET-GAATAAGACGTGTTTAGTTGTATGTCG-3' Reverse: 5'-ATGATTTGCTGGTCCAACCC-3'	ACTG(24)
Lsa17	FAM	Forward: 5'-6FAM-GCTAAGTCGTCAACAAGCCG-3' Reverse: 5'-GATTATTCAGCGGGCTTAGGG-3'	AGCC(24)
Lsa18	NED	Forward: 5'-NED-GCGAATATAATATGCACACGGG-3' Reverse: 5'-TTACGTGACGTGCCGTGC-3'	AGCT(24)
Lsa19	VIC	Forward: 5'-VIC-TTTGGTGTGTTTGGTCCTGC-3' Reverse: 5'-GGGAGTGGTGAGGTAGGGG-3'	AGGG(24)
Lsa20	PET	Forward: 5'-PET-GAGAGCGTGAGAGAGGTGGC-3' Reverse: 5'-GAACTTACCCCTTCATTTCTTCTCC-3'	AGTG(24)
Lsa21	FAM	Forward: 5'-6FAM-TGGCTCAAAGATAAAGTCAAAGTCC-3' Reverse: 5'-CTAACACTGTGGGGCCAGC-3'	AGTG(24)
Lsa22	NED	Forward: 5'-NED-TTGATCTATCCA ACTCTAACTAACTGGC-3' Reverse: 5'-ACTGGAGTATGTGGGACGGG-3'	AGTG(24)
Lsa23	VIC	Forward: 5'-VIC-TGATTGGTGGAGGGGTACAGG-3' Reverse: 5'-CATCCACCCACCCAAGCC-3'	ATGG(24)
Lsa24	PET	Forward: 5'-PET-ATCAGAAGCGACTCGACC-3' Reverse: 5'-GTGTGTTTCAGAGTGCCATCG-3'	TCTG(24)

Lsa25	FAM	Forward: 5'-6FAM-TCTACGTTCCAGTGAGGAGTATGG-3'	
		Reverse: 5'-CCTTTTACTCTACAACCAACCAACC-3'	TTGG(24)

* Los números entre paréntesis representan el número de veces que se repite el motivo

6.5.2 Condiciones de amplificación por PCR para su lectura en el secuenciador ABI 310 de un capilar (APPLIED BIOSYSTEMS®).

Se realizaron pruebas de amplificación por gradientes de 3 temperaturas de alineamiento y 3 concentraciones de cloruro de magnesio [MgCl₂] con 5 individuos para identificar las condiciones óptimas de PCR de los 25 pares de iniciadores obtenidos por medio de secuenciación masiva (Tabla II). Las pruebas iniciales para todos los microsatélites fueron temperaturas de 60°, 64° y 66°C y concentraciones de MgCl₂ de 1.5, 2 y 2.5 µL.

Las amplificaciones por PCR se llevaron a cabo en termocicladores con gradiente (BIORAD MyCycler) en tubos de 0.2 µl. Las reacciones fueron de 10 µl, conteniendo 40 ng/µl de ADN, 0.3 10µM de cada primer, 0.3 mM de DNTP's, 1 X de Buffer para PCR (MgCl), 1.5, 2 y 2.5 mM de MgCl₂ y 1 U de TAQ polimerasa. Los parámetros de los ciclos térmicos fueron: una desnaturalización inicial de 95°C por 5 min seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 min, la temperatura de alineamiento específica de cada iniciador por 30 seg, extensión a 72°C por 1 min, una extensión final de 72°C por 20 min y un ciclo infinito de 15°C.

Para visualizar los productos de PCR se utilizó el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) calibrado con la matriz DS33 de la misma marca. Los productos de PCR se diluyeron 1:2 con agua miliQ y se colocó en tubos de 0.2 µl para PCR: 1 µl del producto de PCR diluido, 0.5 µl de formamida Hi-Di™ (Applied Biosystems®) y 8.5 µl del estándar de talla LIZ600™ (Applied Biosystems®). La mezcla del producto de PCR con la formamida y la LIZ se desnaturalizó en el termociclador a 95°C por 5 minutos.

Los resultados fueron analizados con el programa GENEMAPPER® v4.0 (Applied Biosystems®) y dependiendo de la calidad de los picos obtenidos se decidieron las mejores condiciones de amplificación por PCR. La calidad de los microsatélites se determinó por medio de la morfología de los picos y de la intensidad lumínica medida en unidades de fluorescencia relativa (por sus siglas en inglés RFU).

Posteriormente, se seleccionaron los loci microsatélites que amplificaron de manera correcta con los 5 individuos con los que se realizaron las pruebas iniciales y se amplificó una localidad de 34 individuos (Tabla I, Canal Maule) para ver si la amplificación seguía siendo exitosa en más individuos.

Por último, se seleccionaron los loci microsatélites que mejor amplificaron en la localidad Canal Maule (Tabla III), después de estos pasos de estandarización se procedió a realizar la amplificación de todos los individuos. Para las corridas electroforéticas se crearon dos poolplex con los productos de PCR, cada uno con 3 iniciadores marcados de distinto color (FAM®, PET® y NED®). Esto permitió disminuir el número de corridas en el secuenciador, lo que economizó en el uso de formamida y del estándar de talla.

La genotipificación de los 370 individuos se llevó a cabo en el programa GENEMAPPER® v4.0 (Applied Biosystems®) y se creó una base de datos para su posterior análisis.

Tabla III. Condiciones de optimización de los loci microsatélites utilizados para la genotipificación de 34 individuos de la localidad Canal Maule (Tabla I).

Locus	Color	[MgCl ₂]	Temperatura de alineamiento (T _M °C)
Lsa01	FAM®	2	60
Lsa08	NED®	2.5	60
Lsa10	FAM®	2.5	66
Lsa11	PET®	2.5	66
Lsa13	NED®	1.5	66
Lsa14	PET®	2	66

6.6 ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS.

6.6.1 Calidad y utilidad de los marcadores.

6.6.1.1 Alelos nulos.

Aun cuando se utilice ADN de alta calidad, pueden ocurrir errores en la genotipificación. Por ejemplo, los alelos nulos resultan de la no amplificación de los alelos debido a una mutación en el sitio de unión de los iniciadores (Dakin y Avise, 2004). Con el fin de evaluar la frecuencia de alelos nulos se utilizó el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007) para calcular la frecuencia de su ocurrencia por locus y localidad, esta puede ir de $r < 0.05$, la cual se considera despreciable; de $0.05 < r < 0.20$ moderada y de $r > 0.20$ alta.

6.6.1.2 Desequilibrio de ligamiento.

Para comprobar que los alelos de distintos loci se están segregando de manera independiente se utilizó el programa GENEPOP V4.0 (Rousset, 2008), para lo cual se realizaron 10,000 dememorizaciones, 100 lotes y 10,000 iteraciones por lote. Este software estima la probabilidad de cada par de loci de estar ligados mediante el uso de cadenas de Markov, utilizando una prueba exacta de Fisher con la hipótesis nula de independencia entre los loci en cada localidad. La significancia de los valores de p fueron evaluados con un $\alpha = 0.05$, y se ajustó utilizando la prueba de Bonferroni para pruebas múltiples (Rice, 1989).

6.6.1.3 Locus bajo selección.

Para identificar si alguno de los loci se encontraban bajo selección se utilizó el programa Lositan (1,000,000 simulaciones, $\alpha = 0.05$, submuestras 16; Antao *et al.*, 2008), este programa evalúa la relación entre los F_{ST} y la heterocigosidad esperada

(H_e). Esta distribución es utilizada para identificar a los loci que tengan F_{ST} muy altos o bajos comparados con lo que se supondría si fueran neutrales, dichos loci son candidatos a estar sujetos a selección.

6.6.2 Estimación de parámetros poblacionales.

6.6.2.1 Equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para determinar si los individuos capturados en los distintos sitios de muestreo se encontraban en E-HW se utilizó la prueba exacta de Fisher a partir del coeficiente de endogamia (F_{IS}) con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010) con el algoritmo de cadenas de Markov por 1,000,000 cadenas y 100,000 dememorizaciones por locus por localidad. Se calculó la heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_e) y el valor de probabilidad (P) de que los valores de H_o fueran significativamente diferentes de lo que se esperaría bajo el modelo de equilibrio. La significancia de los valores de p fueron evaluados con un $\alpha=0.05$ y se ajustó utilizando la prueba de Bonferroni para pruebas múltiples (Rice, 1989).

Además se calculó la presencia de déficit de heterocigotos utilizando el programa GENEPOP v 4.0 (Rousset, 2008) (10,000 dememorizaciones, 100 lotes, 5,000 iteraciones por lote).

6.7 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL.

Para determinar la estructura genética poblacional y definir el número de grupos genéticamente diferentes entre los 16 sitios de muestreo, se siguieron varios procedimientos que se describen a continuación:

6.7.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) y Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC).

Empleando el programa GENETIX v 4.05 (Belkhir *et al.*, 2004) se realizó un análisis canónico multivariado AFC con el fin de visualizar cada uno de los individuos genotificados en un espacio definido por los valores de una tabla de contingencia construida en factores a partir de las frecuencias alélicas de cada grupo (sitio de muestreo). De esta manera, al combinar los factores que mejor explican la varianza entre los grupos, se puede representar a todas las muestras utilizadas en una nube de puntos dispuestos según el conjunto de sus frecuencias alélicas.

Asimismo el DAPC se realizó con el fin de determinar el número de grupos genéticos distintos usando el programa R V 3.1.3. (Venables *et al.*, 2015) Este método permite identificar y describir grupos genéticos descomponiendo la variación genética utilizando un modelo multivariado estándar de ANOVA en el que analiza la variación total como la suma de la variación entre los grupos más la variación dentro de los grupos. Este método busca variables sintéticas (funciones discriminantes) que muestran diferencias entre los grupos de la mejor manera posible mientras reduce al mínimo la variación dentro de los grupos.

6.7.2 Estimación de diferenciación genética poblacional (F_{ST}).

Otra manera de conocer la diferenciación genética entre los sitios de muestreo es utilizando los estadísticos F propuestos por Sewall Wright (1951). El parámetro F_{ST} mide la variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones mediante la comparación de las frecuencias alélicas de los individuos de una población con respecto a toda la población y la medición de la varianza de las frecuencias alélicas entre poblaciones. Los valores de F_{ST} pueden variar entre 0 y 1 en donde valores cercanos a 0 significa poca o no diferenciación genética mientras

que los que tienden a 1 significan que son más distintos genéticamente. Para esto se utilizó el programa ARLEQUIN V 3.5 (Excoffier y Lischer, 2010).

6.7.3 Forma teórica de la estructura genética.

También se utilizó la función *Population Graphs* (Dyer y Nason, 2004) con el programa R V 3.1.3 (Venables *et al.*, 2015) para obtener la forma gráfica de la estructura genética. Este método se centra en el análisis de los datos genéticos de la población basados en marcadores genéticos dentro de un marco teórico gráfico y tiene como interés principal caracterizar la compleja topología que resulta de las interacciones genéticas históricas y contemporáneas entre las poblaciones. La distribución de la variabilidad genética es representada a manera de red con nodos interconectados que representan a los individuos de las localidades muestreadas conectados por flujo genético (Dyer y Nason, 2004).

6.7.4 Análisis bayesianos.

El número más probable de grupos genéticos o poblaciones de *L. santolla* también fue evaluado mediante procedimientos bayesianos, para ellos se utilizó el programa STRUCTURE V 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), el cual implementa un modelo basado en un método de agrupación bayesiana para inferir estructura poblacional utilizando datos genotípicos de marcadores no ligados. Asume un modelo en el cual hay K poblaciones (en donde K probablemente se desconoce) y cada una está caracterizada por un set de frecuencias alélicas para cada locus. Los individuos son asignados (probabilísticamente) a las poblaciones, o una dos o más poblaciones si sus genotipos indican que están mezcladas mediante un índice de membresía. El modelo no asume algún modelo de mutación en particular y supone que los marcadores genéticos no están en desequilibrio de ligamiento y en E-HW.

En este estudio se utilizó el modelo de mezcla (admixture) puesto que permite que los individuos tengan múltiples orígenes poblacionales. El rango de posibles grupos (K) fue de entre 1 y 16 y para cada K se repitió 10 veces, (longitud de iteraciones de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) 100,000 y un proceso de calentamiento de 10,000). Con los resultados obtenidos se utilizó el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012) para evaluar la probabilidad acumulada y la probabilidad posterior para cada valor de K ; con esto se detectó el número de grupos para datos simulados, empleando el estadístico de ΔK de Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

Después de asignar las muestras a un grupo genético cuya pertenencia fue mayor (medida por el coeficiente de membresía al grupo K), se usó el programa CLUMMP V 1.1.2 para definir los grupos (Jakobsson y Rosenberg, 2007) y después se graficaron utilizando el programa DISTRUCT V 1.1 (Rosenberg, 2004).

6.7.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Finalmente con este análisis se determinó la cantidad de variabilidad genética contenida dentro de los subgrupos, dentro grupos y entre ellos realizando un análisis de varianza de las frecuencias alélicas jerarquizado con una matriz de distancias, para esto se utilizó el programa ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010).

6.8 DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL.

Para evaluar la diversidad genética se estimó para cada locus la heterocigosidad esperada (H_E), la heterocigosidad observada (H_O) y el número de alelos por locus (A) utilizando el programa Arlequin V 3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). También se estimó la riqueza alélica (RA) ponderada por número de muestras con el programa FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995).

6.9 PRUEBA DE PODER.

El nivel de poder de una prueba está asociado a la verificación de una hipótesis. Se utilizó el programa POWSIM V. 4.1. (Ryman, 2011) para estimar el poder estadístico cuando se prueba una hipótesis nula de homogeneidad genética o panmixia para diferentes combinaciones de tamaños de muestra, número de loci, número de alelos y frecuencias alélicas para un grado hipotético de diferenciación real, cuantificada como valores de diferenciación genética F_{ST} . La significancia de la prueba es evaluada con pruebas exactas de Fisher y Ji -cuadrada.

Además se realizó otro análisis de simulación de poder estadístico eliminando los sitios de muestreo que tuvieron menos de 20 individuos para evaluar el efecto del tamaño de muestra en el sesgo de los resultados.

7. RESULTADOS

7.1 MUESTRAS BIOLÓGICAS.

7.1.1 Extracción de ácidos nucleicos.

Se obtuvo un promedio de 897ng/μL de los 370 individuos en los cuales se realizó la extracción de ADN. La calidad y el peso molecular fueron altos, las diluciones con las que se trabajaron tuvieron una concentración promedio de 40ng/μL. En las figuras 4 y 5 se dan ejemplos de la calidad y concentración de ADN de diferentes individuos.

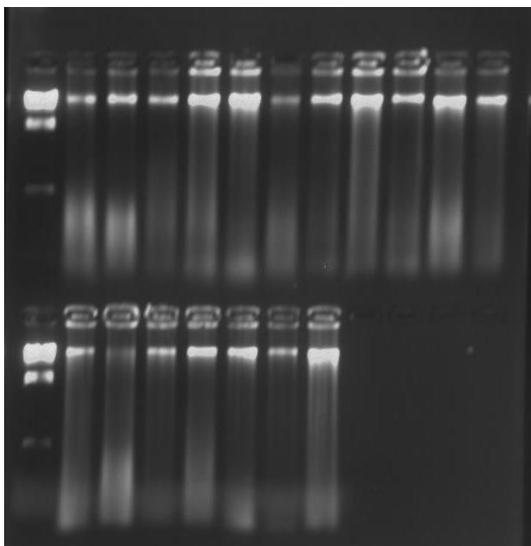


Figura 4. Gel de agarosa al 1% obtenido para la visualización de los ADN de *L. santolla*.

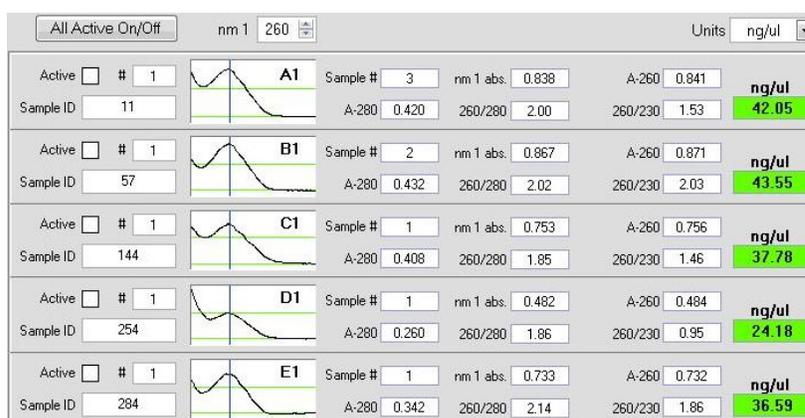


Figura 5. Curvas de absorbancia de las diluciones de trabajo de ADN de *L. santolla* (concentración promedio de 40 ng/ μ L). Las estimaciones se realizaron en un Nanodrop 8000 (Thermo SCIENTIFIC®).

7.2 OPTIMIZACIÓN DE AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES.

7.2.1 Condiciones de amplificación por PCR para su lectura en el secuenciador ABI 310 de un capilar (APPLIED BIOSYSTEMS®).

Después de las pruebas de optimización sólo se seleccionaron aquellos microsatélites que amplificaron de manera sencilla y sin ambigüedad, es decir con picos nítidos, limpios y con poco número de ensayos (Anexo 2). Finalmente, con los 6 loci seleccionados se crearon dos poolplex: el Mix1 que analiza los genotipos de los loci Lsa08, 10 y 14 (Fig. 6) y el Mix2 que analiza los genotipos de los loci Lsa 01, 11 y 13 (Fig. 7). En la Tabla IV se anotan los diferentes loci que constituyen los poolplex y sus fluoróforos correspondientes.

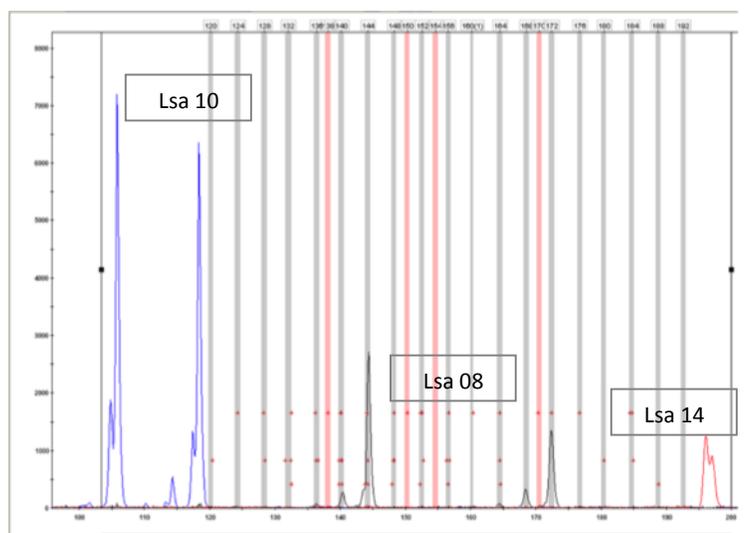


Figura 6. Electroferograma obtenido del poolplex del Mix1: Lsa08 NED, Lsa10 FAM y Lsa14 PET, con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

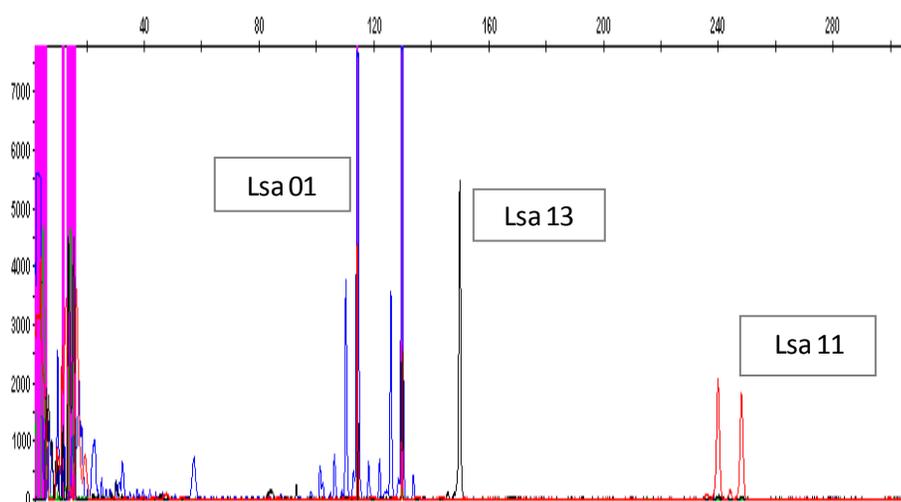


Figura 7. Electroferograma obtenido del poolplex del Mix2: Lsa01 FAM, Lsa11 PET y Lsa13 NED, con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

Tabla IV. Reacciones poolplex con los iniciadores de microsatélites marcados con distinto color.

MIX	Locus	Color	[MgCl ₂]	Temperatura de alineamiento (T _M °C)	Rango de tamaño del alelo (pb)
1	Lsa08	NED®	2.5	60	120-192
	Lsa10	FAM®	2.5	66	102-134
	Lsa14	PET®	2	66	181-221
2	Lsa01	FAM®	2	60	90-154
	Lsa11	PET®	2.5	66	232-260
	Lsa13	NED®	1.5	66	148-162

Se estimó una tasa de error de genotipificación para los 370 individuos con los 6 microsatélites, esta varió de 3% para el locus Lsa08 hasta un 8% para los loci Lsa01 y Lsa11 (Tabla V).

Tabla V. Porcentaje de error y éxito de amplificación de los 6 loci microsatélites utilizados para genotipificación los 370 individuos.

Locus	No. de individuos no amplificados (N=370)	% de Error	% de Éxito
Lsa01	31	8	92
Lsa08	10	3	97
Lsa10	22	6	94
Lsa11	31	8	92
Lsa13	19	5	95
Lsa14	24	6	94
Promedio	23	6	94

El análisis de datos se llevó a cabo con los individuos que tuvieron más del 80% de información genotipificada. Esto redujo a una muestra total de 346 individuos. La Tabla VI muestra los porcentajes de error y éxito de amplificación modificados después de la eliminación de esos individuos.

Tabla VI. Porcentaje de error y éxito de amplificación de los 6 loci microsatélites utilizados para genotipificación de 346 individuos, cuando se eliminaron de la base de datos global con un éxito de amplificación menor al 80% para los 6 loci.

Locus	No. de individuos no amplificados	% de Error	% de Éxito
Lsa01	15	4	96
Lsa08	1	0	100
Lsa10	13	4	96
Lsa11	11	3	97
Lsa13	4	1	99
Lsa14	11	3	97
Promedio	9	2.5	97.5

7.3 ANÁLISIS DE DATOS GENÉTICOS.

7.3.1 Calidad y utilidad de los marcadores.

7.3.1.1 *Alelos nulos.*

Cuando se analizó la presencia de alelos nulos por locus por localidad con el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007) se detectó alelos nulos sólo en un sitio de muestreo y en un locus (Isla Cónдор, Locus Lsa14), cabe mencionar que esta localidad es la de menor número de muestra (Tabla VII). Además, cuando se analizaron todos los sitios de muestreo como una sola población, no se encontró evidencia de alelos nulos para ningún locus (Tabla VIII).

Tabla VII. Frecuencia de alelos nulos por locus por localidad, para 6 loci microsatélites específicos para *Lithodes santolla*. Estimados realizados con el software FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). Se encuentra marcado con color azul el sitio de muestreo y locus que presentó alelos nulos.

Localidad	Lsa01	Lsa08	Lsa10	Lsa11	Lsa13	Lsa14
I.Sal	0.0645	0.0013	0.0000	0.0465	0.0000	0.0747
P.Ca	0.0000	0.0226	0.0240	0.0755	0.0252	0.1398
I.Av	0.0000	0.0000	0.0000	0.0297	0.0000	0.0000
I.OtN	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0327	0.0523
I.OtO	0.0000	0.0000	0.0928	0.0000	0.0000	0.0845
I.Co	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.3150
I.Wi	0.0003	0.0000	0.0403	0.0818	0.0000	0.1771
P.Prof	0.0004	0.0000	0.0007	0.0000	0.0000	0.1111
I.Za	0.0073	0.0267	0.0485	0.0000	0.0000	0.0572
E.Po	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0976
P.Pa	0.0269	0.0000	0.0005	0.0296	0.0256	0.1676
I.RT	0.0419	0.0003	0.0163	0.0000	0.0000	0.0000
SeNe	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	0.0536	0.1377
C.Ma	0.0000	0.0000	0.0225	0.0001	0.0055	0.0667
B.Mu	0.0000	0.0000	0.0258	0.0000	0.0000	0.1085
SeBa	0.0907	0.0000	0.0505	0.0000	0.0000	0.0667

Tabla VIII. Frecuencia de alelos nulos para 6 loci microsatélites de *Lithodes santolla*. Estimados realizados con el programa FREENA (Chapuis y Estoup, 2007). Se agrupó los 16 sitios de muestreo como una sola población.

Locus	Alelos Nulos	Dempster <i>et al.</i> 1997
Lsa01	No	0.0103
Lsa08	No	0.0000
Lsa10	No	0.0322
Lsa11	No	0.0072
Lsa13	No	0.0001
Lsa14	No	0.0897

7.3.1.2 Desequilibrio de ligamiento.

Ninguna de las pruebas de desequilibrio de ligamiento mostró valores significativos ($p \leq 0.003$) después de la corrección de Bonferroni (240 pruebas). Debido a esto podemos considerar que los loci microsatélites analizados se segregan de manera independiente.

7.3.1.3 Locus bajo selección.

Para realizar esta prueba se eliminó la localidad Isla Condor ya que modificaba los resultados al sólo tener 3 individuos. Después de esto, ningún loci fue candidato a estar bajo selección (Fig. 8). Los resultados obtenidos al utilizar el modelo de mutación de alelos infinitos y el modelo de mutación por pasos fueron similares (Tabla IX).

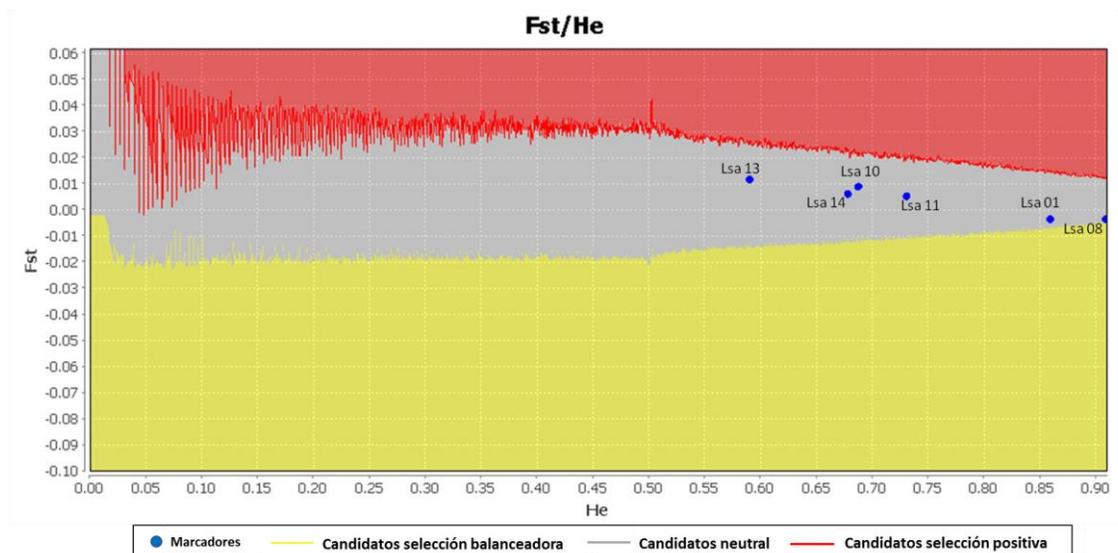


Figura 8. Prueba de neutralidad para 6 loci microsatélites de *Lithodes santolla*. Análisis realizado con el programa LOSITAN (Antao *et al.*, 2008). El área gris indica que los loci se encuentran bajo neutralidad, el área roja indica que los loci son candidatos a selección de tipo positiva y el área amarilla a selección balanceadora.

Tabla IX. Resultados de la prueba de neutralidad para los 6 loci microsatélites específicos para *Lithodes santolla*. (1,000,000 simulaciones; $p \leq 0.05$; submuestra=30). LOSITAN (Antao *et al.*, 2008).

Locus	Modelo de alelos infinitos			Modelo de mutación por pasos		
	Het	F_{ST}	P (Simul $F_{ST} <$ sample F_{ST})	Het	F_{ST}	P (Simul $F_{ST} <$ sample F_{ST})
Lsa01	0.8591	-0.0035	0.1061	0.8591	-0.0035	0.1079
Lsa08	0.9087	-0.0034	0.0543	0.9087	-0.0034	0.0668
Lsa10	0.6872	0.0089	0.7622	0.6872	0.0089	0.7628
Lsa11	0.7304	0.0053	0.6324	0.7304	0.0053	0.6220
Lsa13	0.5899	0.0116	0.7986	0.5899	0.0116	0.7819
Lsa14	0.6778	0.0062	0.6384	0.6778	0.0061	0.6303

7.4 ANÁLISIS DE ESTRUCTURA POBLACIONAL.

7.4.1 Análisis Factorial de Correspondencia (AFC) y Análisis Discriminante de Componentes Principales (DAPC).

El análisis de AFC para los 16 sitios de muestreo no mostró ningún patrón de agrupación de las frecuencias alélicas por sitio y los 3 ejes o factores principales sólo explicaron el 8.35% de la varianza genética (3%, 2.71% y 2.46% para los ejes 1, 2 y 3 respectivamente); por lo que no es posible detectar una separación que refleje grupos genéticamente distintos con este análisis (Fig. 9).

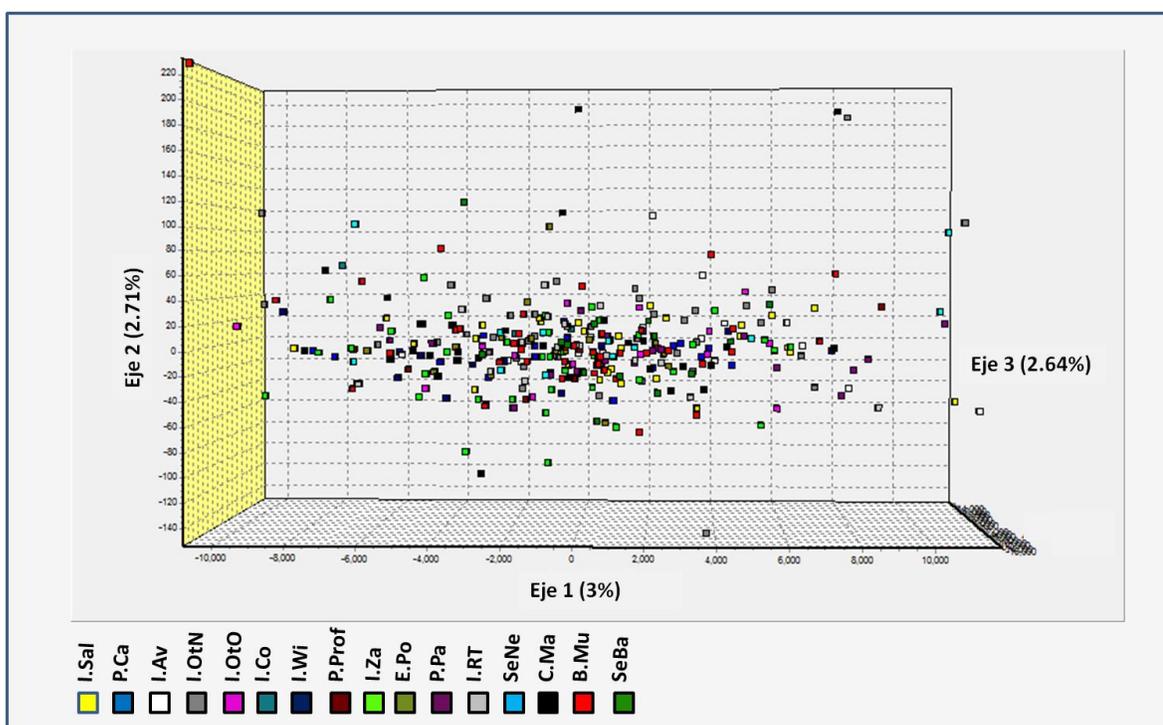


Figura 9. Gráfica obtenida a partir del AFC en donde se muestran la dispersión de los valores de las cargas de cada una de las muestras resultado de los 3 primeros factores o ejes calculados los cuales explican el 8.35% de la varianza genética. Los colores representan cada una de las localidades de origen. Para las abreviaciones ver Tabla I.

Para el DAPC se retuvieron los primeros 40 componentes y se guardaron las primeras 4 funciones discriminantes que explican sólo el 0.96% de la varianza total (Anexo 3). Con este análisis tampoco fue posible detectar ningún patrón de agrupamiento (Fig. 10). La figura 11 muestra la probabilidad de membresía de los individuos.

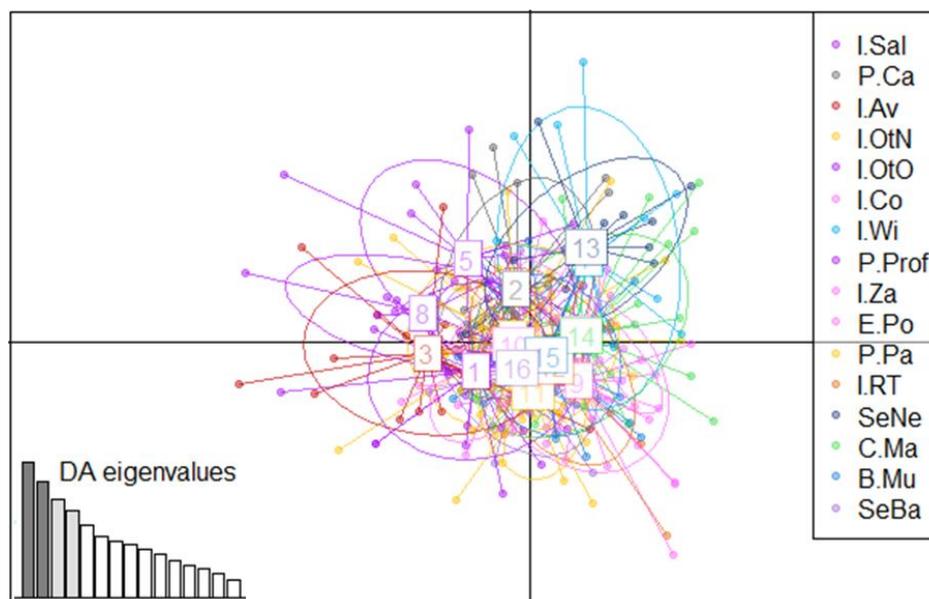


Figura 10. Muestra los valores de las cargas de cada una de las muestras después del DAPC, cada localidad muestra una elipse que representa la varianza de las cargas de cada grupo. Para las abreviaciones ver Tabla I.

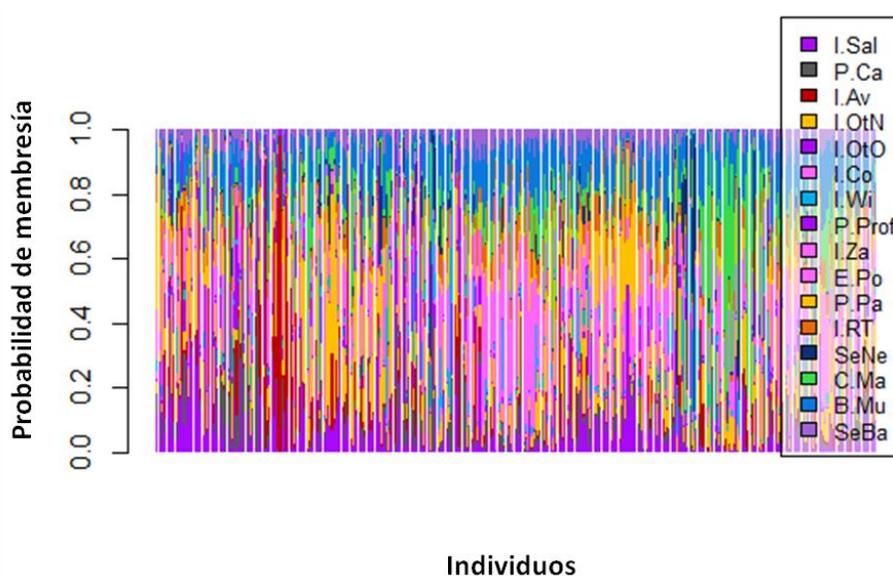


Figura 11. Gráfica de probabilidad de membresía obtenida con el DAPC. Para las abreviaciones ver Tabla I.

7.4.2 Estimación de diferenciación genética poblacional (F_{ST}).

Los valores del estadístico F_{ST} pareados para todos los sitios de muestreo variaron desde 0 hasta un máximo de 0.03 con un promedio de 0.002 (Tabla X). El 100% de las comparaciones tuvieron valores de diferenciación genética bajos (≤ 0.05) según los rangos propuestos por Freeland (2005). Ninguno de los valores fue estadísticamente significativo, indicando que no existen diferencias genéticas entre ninguna de las localidades muestreadas por lo que no fue posible hacer comparaciones inter-poblacionales.

7.4.3 Forma teórica de la estructura genética.

El gráfico poblacional que se muestra en la figura 12 muestra la variabilidad genética encontrada al utilizar la función de R *Graph Population*. Se muestran 15 nodos que representan los 15 sitios de muestreo de *L. santolla* (se eliminó el sitio Isla Cóndor debido a que el programa no trabaja con menos de 4 individuos). Ninguna localidad queda aislada o conectada sólo con otra localidad, al contrario, se observa que todas las localidades están conectadas a un mínimo de 2 localidades más.

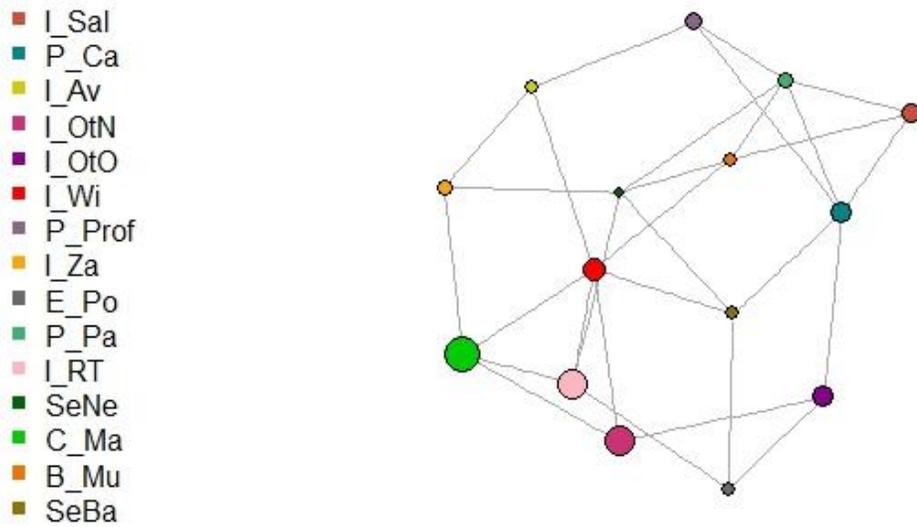


Figura 12. Variabilidad genética de 15 sitios de muestreo de *L. santolla* en forma de red en donde los nodos representan los sitios de muestreo con un tamaño proporcional a la varianza genética intrapoblacional y las interconexiones representan el flujo genético entre ellas, su longitud es proporcional a la varianza genética entre los nodos conectados (*Population Graph*, $\alpha=0.05$). Para las abreviaciones ver Tabla I.

Tabla X. Valores de F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) para comparaciones por pares de sitios de muestreo. Diagonal inferior los valores de F_{ST} y diagonal superior sus valores de p correspondiente ($p \leq 0.0004$ después de la corrección de Bonferroni, 136 pruebas). Los valores fueron obtenidos con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Para las abreviaciones ver Tabla I.

	I.Sal	P.Ca	I.Av	I.OtN	I.OtO	I.Co	I.Wi	P.Prof	I.Za	E.Po	P.Pa	I.RT	SeNe	C.Ma	B.Mu	SeBa
I.Sal		0.022	0.284	0.487	0.833	0.447	0.054	0.908	0.061	0.958	0.067	0.427	0.238	0.340	0.668	0.537
P.Ca	0.019		0.014	0.004	0.193	0.756	0.437	0.211	0.249	0.053	0.092	0.400	0.580	0.189	0.075	0.555
I.Av	0.004	0.029		0.786	0.460	0.288	0.058	0.321	0.106	0.136	0.430	0.084	0.124	0.260	0.201	0.153
I.OtN	0.000	0.024	0.000		0.516	0.323	0.116	0.728	0.345	0.361	0.071	0.313	0.160	0.505	0.906	0.241
I.OtO	0.000	0.010	0.000	0.000		0.598	0.369	0.978	0.363	0.968	0.300	0.810	0.609	0.608	0.632	0.891
I.Co	0.004	0.000	0.013	0.008	0.000		0.841	0.348	0.530	0.360	0.594	0.478	0.853	0.602	0.332	0.675
I.Wi	0.018	0.004	0.019	0.010	0.004	0.000		0.503	0.929	0.432	0.255	0.937	0.851	0.804	0.354	0.237
P.Prof	0.000	0.021	0.005	0.000	0.000	0.030	0.003		0.508	0.944	0.143	0.794	0.341	0.594	0.730	0.288
I.Za	0.009	0.004	0.008	0.001	0.002	0.000	0.000	0.000		0.380	0.258	0.967	0.240	0.998	0.891	0.233
E.Po	0.000	0.016	0.008	0.002	0.000	0.005	0.000	0.000	0.001		0.150	0.520	0.171	0.836	0.792	0.590
P.Pa	0.014	0.017	0.001	0.010	0.007	0.000	0.010	0.029	0.004	0.011		0.272	0.319	0.159	0.105	0.357
I.RT	0.001	0.003	0.011	0.003	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.006		0.492	0.889	0.884	0.491
SeNe	0.009	0.000	0.013	0.009	0.000	0.000	0.000	0.009	0.006	0.010	0.007	0.000		0.479	0.225	0.568
C.Ma	0.002	0.007	0.005	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000		0.999	0.452
B.Mu	0.000	0.010	0.004	0.000	0.000	0.008	0.002	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.006	0.000		0.650
SeBa	0.000	0.000	0.009	0.005	0.000	0.000	0.011	0.012	0.005	0.000	0.005	0.000	0.000	0.001	0.000	

7.4.4 Análisis bayesianos.

Con el análisis realizado en el programa STRUCTURE tampoco fue posible detectar grupos genéticamente distintos entre los sitios de muestreo. Al realizar el cálculo del número de grupos (K) más probables con el método de Evanno *et al.* (2005) (ΔK) se identificaron 3 grupos con el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012), sin embargo al ingresar los datos al programa CLUMMP V 1.1.2. (Jakobsson y Rosenberg, 2007) para ver la probabilidad de membresía de cada individuos a los 3 grupos, ninguno de ellos tiene más del 40% de probabilidades de pertenecer a algún grupo en particular, mostrando una amplia mezcla genética entre los tres grupos (Figuras 13 y 14).

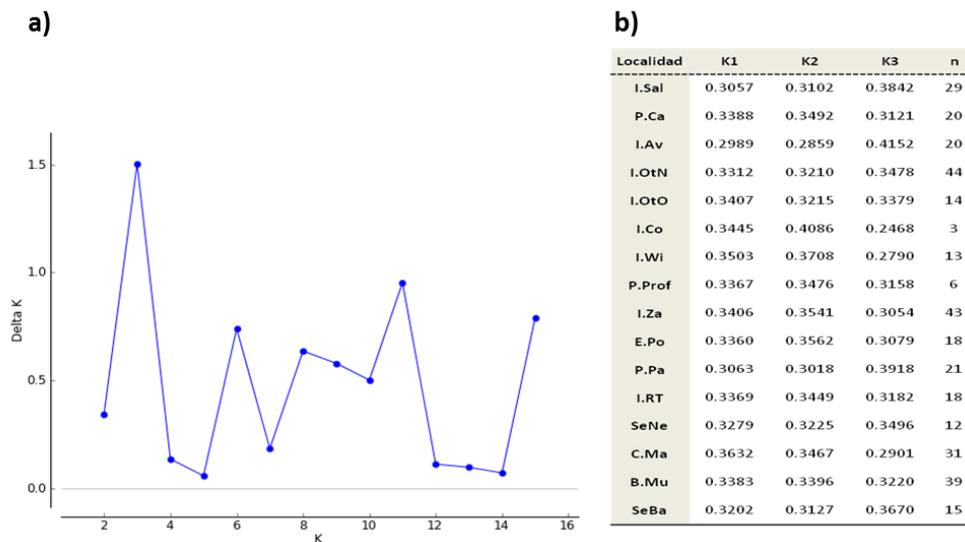


Figura 13. Resultados de STRUCTURE. En a) se señala el número de grupos genéticamente homogéneos (K) más probables encontrados con el método de Evanno *et al.* (2005) a partir del valor de ΔK con 6 loci microsatélites en 16 sitios de muestreo con el programa STRUCTURE HARVESTER (Earl y VonHoldt, 2012). En b) probabilidades de membresía de cada individuo para pertenecer a cada uno de los 3 grupos (CLUMMP V 1.1.2. Jakobsson y Rosenberg, 2007).

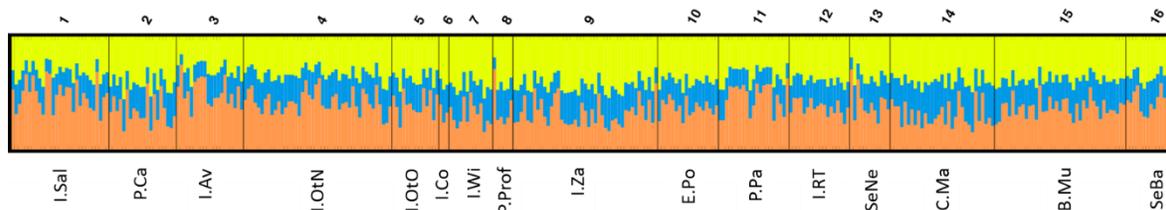


Figura 14. Coeficientes de membresía para $K=3$ como número de grupos genéticos homogéneos más probable. Cada una de las líneas verticales representa el genotipo multilocus determinado por las frecuencias alélicas para cada individuo y cada color corresponde a la proporción de probabilidad de pertenencia de cada grupo. El eje horizontal corresponde a los 16 sitios de muestreo. Para las abreviaciones ver Tabla I.

7.4.5 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

Al realizar el AMOVA suponiendo que cada sitio de muestreo forma un grupo genético distinto, se observó el mayor grado de variación genética dentro de los individuos (94%) y sólo un 0.255 % de la variación esta entre las poblaciones (Tabla XI).

Tabla XI. Resultado del AMOVA multilocus realizado con los 16 sitios de muestreo de *L. santolla*. Las primeras 3 columnas son los porcentajes de la variación total de la varianza explicada. Las 3 columnas de la derecha muestran los valores de los índices de fijación F_{IS} (entre individuos dentro de las poblaciones, F_{ST} (individuos entre poblaciones) y F_{IT} (total) ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010).

AMOVA	% de variación			Índice de fijación		
	Entre poblaciones	Entre individuos dentro de poblaciones	Dentro de los individuos	F_{IS}	F_{ST}	F_{IT}
Multilocus	0.255	5.109	94.636	0.051	0.003	0.054

7.5 DIVERSIDAD GENÉTICA POBLACIONAL.

Dado que no se encontraron evidencias que indicaran diferencias genéticas entre las centollas recolectadas en los diferentes sitios de muestreo en la Región de

Magallanes, se agrupó todos los individuos de cada sitio en una sola población para realizar los análisis de diversidad genética. Se observó un número promedio de alelos por locus de 5 (Lsa13) a 25 (Lsa08) con un promedio de 12 (Fig. 15). Todos los loci se encontraron en E-HW excepto por el Lsa14 (Fig. 16), el cual presentó un índice de endogamia elevado (0.214) (Fig. 17), este locus fue el que tuvo la mayor frecuencia de alelos nulos (0.089) y el menor valor de heterocigosidad observada (Tabla XII). Ver Anexo 4 para ver las frecuencias alélicas para cada loci. La heterocigosidad observada y esperada promedio fue moderadamente alta de 0.71 y 0.75 respectivamente.

Para probar que el locus Lsa14 no alteraba los resultados de estructuración genética por estar en desequilibrio de HW o por la posible presencia de alelos nulos, se realizaron de nuevo los análisis de heterocigosidad (H_o y H_e), índice de diferenciación (F_{ST}) y se realizó el análisis bayesiano (STRUCTURE) sin este locus y no se encontraron diferencias en los resultados promedio obtenidos, excepto para el valor promedio de F_{IS} el cual varió de 0.057 con los 6 loci a 0.024 con 5 loci (Anexo 5).

Tabla XII. Variabilidad genética poblacional estimada mediante 6 loci microsatélites de *Lithodes santolla*. (N) tamaño de muestra, (A) número promedio de alelos por locus, (H_o) heterocigosidad observada y (H_e) esperada con su probabilidad de equilibrio de HW (en azul $p \leq 0.001$, después de corrección de Bonferroni), (AN) alelos nulos, (F_{IS}) índice de endogamia de Weir y Cockerham con su probabilidad, en azul los que resultaron significativos ($p \leq 0.05$) y (F_{ST}) valores de diferenciación genética global por locus. Los programas que se utilizaron para las estimaciones fueron ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010), GENEPOP v 4.0 (Rousset, 2008), FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995), y FREENA (Chapuis y Estoup, 2007).

Locus	N	A	H_o	H_e	($p < 0.001$)	AN	F_{IS} (W&C)	($p \leq 0.05$)	F_{ST}
Lsa01	331	17	0.84	0.86	0.24	0.010	0.026	0.366	0.000
Lsa08	345	25	0.92	0.91	0.71	0	-0.012	0.177	0.000
Lsa10	334	9	0.64	0.69	0.18	0.032	0.067	0.149	0.007
Lsa11	335	8	0.71	0.73	0.95	0.007	0.032	0.949	0.004
Lsa13	342	5	0.59	0.60	0.23	0.000	0.016	0.272	0.002
Lsa14	335	9	0.55	0.69	0.00	0.089	0.214	0.00	0.005
Promedio	337	12	0.71	0.75		0.023	0.057		0.002

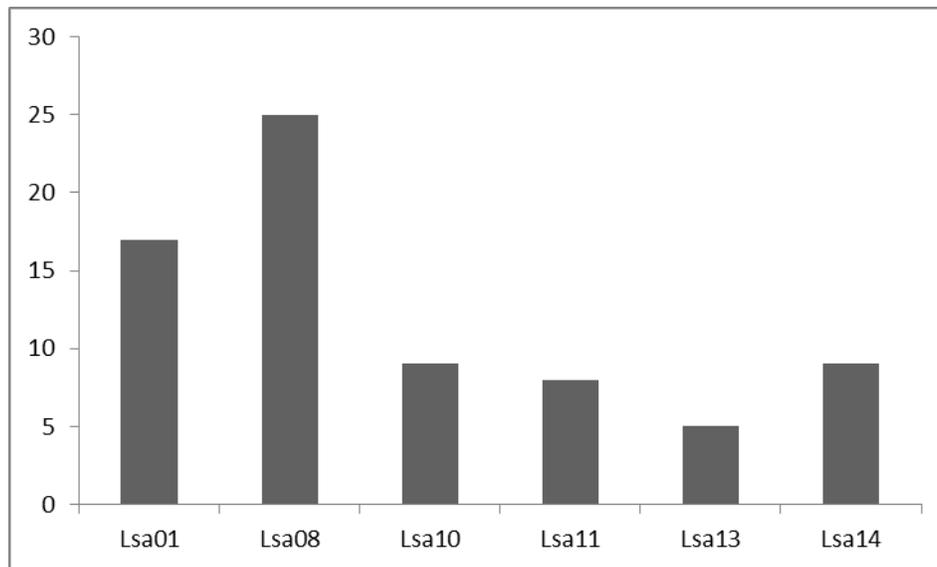


Figura 15. Número de alelos por locus de *L. santolla* en la zona de estudio.

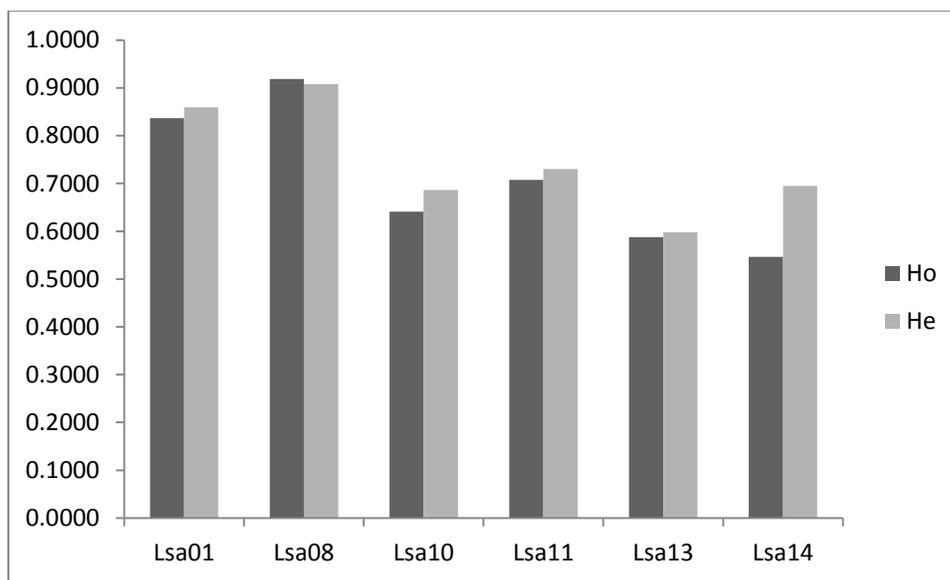


Figura 16. Valores promedio de heterocigosidad observada (*Ho*) y esperada (*He*) por locus de *L. santolla* en la zona de estudio.

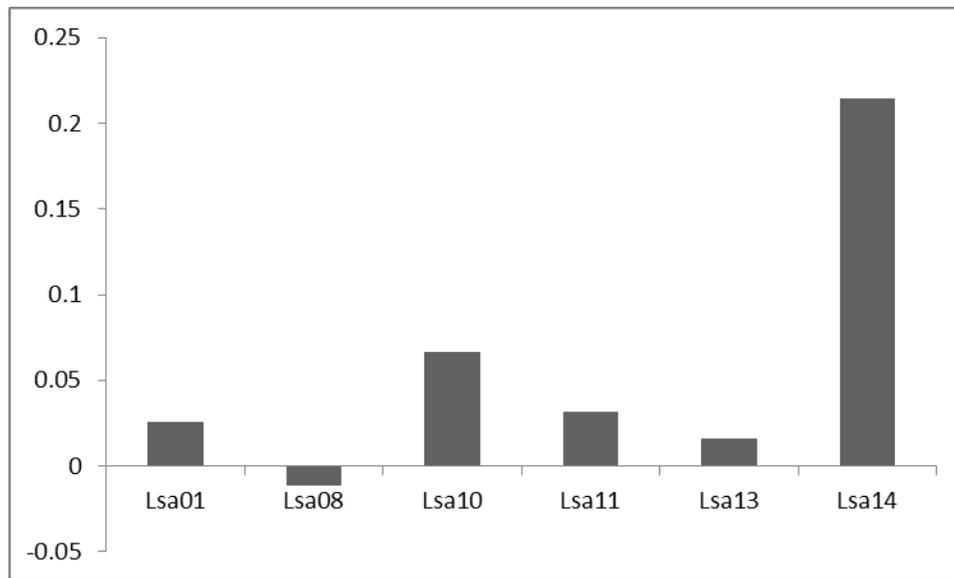


Figura 17. Valores del índice de fijación (F_{is} , W&C) por locus en la población de *L. santolla* en la zona de estudio.

7.6 PRUEBA DE PODER.

La estimación del error estadístico de tipo I (rechazar una hipótesis nula verdadera, H_0 = Homogeneidad) varió poco entre las dos pruebas analizadas. De 0.42 con la prueba exacta de Fisher y 0.46 con la prueba de *Ji*-cuadrada. Los análisis de simulación de poder de los loci microsatélites, revelaron que la combinación de los 6 loci y 346 individuos utilizados en este estudio confieren un poder estadístico de 0.5 para detectar un nivel de diferenciación genética de 0.002 (Fig. 18).

El análisis de simulación de poder eliminando los sitios de muestreo con un tamaño menor a 20 se realizó con 8 sitios de muestreo (Isla Salamandra, Puerto Caracciolo, Isla Avelino, Isla Otter Norte, Isla Zanelli, Playa Parda, Canal Maule y Bahía Mussel) y 247 individuos. Se obtuvo el mismo poder que con el análisis anterior (0.42 Fisher, 0.46 *Ji*-cuadrada).

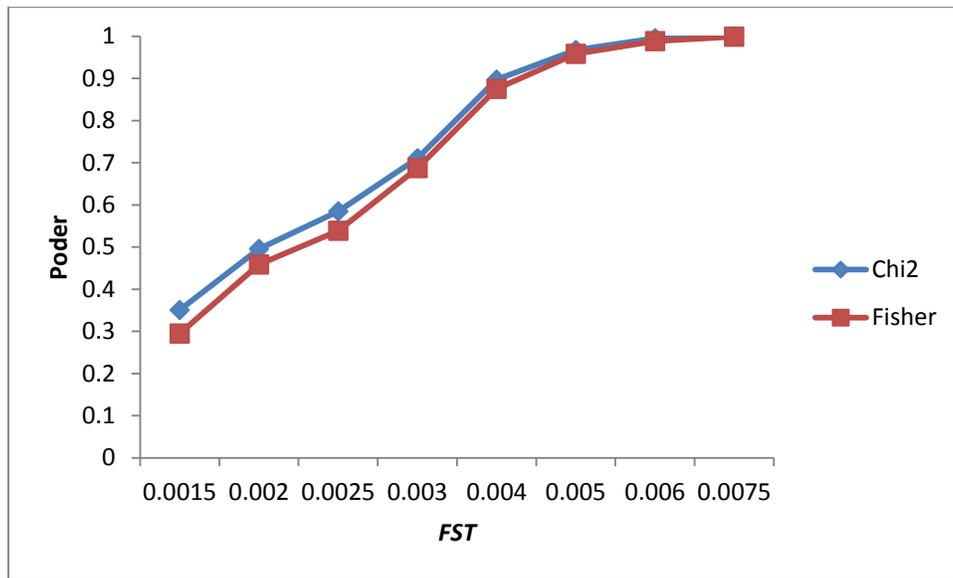


Figura 18. Poder de resolución de los datos (número de loci y tamaño de muestra) evaluado mediante simulación con diferentes niveles esperados de F_{ST} de acuerdo con el tamaño efectivo poblacional (N_e) y generaciones (t). La significancia evaluada utilizando la prueba exacta de Fisher y Ji-cuadrada refleja el poder para detectar cualquier nivel de diferenciación (F_{ST} promedio) con el diseño de muestreo utilizado en el estudio, ($N_e= 1,000$, $t=3-15$, iteraciones=1,000, 100, 1,000, 1,000 réplicas). Las estimaciones se realizaron con el programa POWSIM (Ryman, 2011).

8. DISCUSIÓN

Lithodes santolla es un recurso bentónico muy importante para las pesquerías artesanales de Chile ya que representa más del 50% de los desembarcos anuales de organismos bentónicos además de generar muchos empleos tanto directos como indirectos. A pesar de que este recurso ha sido explotado fuertemente desde hace más de 70 años, las regulaciones de pesca se han generado a partir de los datos de pesca y de estudios sobre su biología; principalmente generados en las décadas de los 80 y 90, sin embargo, actualmente no existe un plan de manejo para la especie basado en la biología reproductiva de las hembras, áreas de desove, comportamiento y dispersión de las larvas así como tampoco se tienen definidas unidades o stocks de manejo y por ende, no existe un marco de referencia cuantitativo para calificar el estado de la pesquería del recurso (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2013; 2014).

Considerando las características de historia de vida del recurso, así como la gran extensión y la complejidad geográfica de la zona en donde se distribuye (constituida por un gran número de fiordos y canales), en este trabajo se planteó la hipótesis de que *L. santolla* presenta una estructura genética a lo largo del área geográfica inspeccionada. Para responder a esta hipótesis se decidió utilizar marcadores tipo microsatélites, ya que han demostrado ser altamente sensibles para detectar diferencias genéticas a nivel intra-poblacional y muy efectivos para resolver problemas de identificación de stocks en especies de importancia comercial (Seeb *et al.*, 2002). Cabe destacar que los iniciadores para los loci microsatélites fueron diseñados específicamente para la especie a partir de secuenciación masiva de última generación de su genoma y posteriormente optimizados en este trabajo, por lo que el éxito de amplificación y de genotipificación debe ser mayor que si se utilizaran iniciadores diseñados para otra especie.

8.1 Estructura poblacional.

En el presente estudio se analizaron muestras de 346 individuos de *L. santolla* a lo largo de ≈ 890 km (desde los 49° - 53° S) dentro de la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes (Fig. 3). Dado que esta especie se reproduce a lo largo de una extensa área dentro de zonas semi-aisladas como son los fiordos y las bahías de la región austral de Chile se esperaba encontrar diferenciación genética entre los sitios de muestreo, sin embargo, los resultados en este estudio utilizando 6 loci microsatélites altamente polimórficos no mostraron diferenciación genética significativa, al menos en la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes.

Ningun análisis ensayado (diferenciación genética (F_{ST}), forma teórica de la estructura genética, AFC, DAPC, AMOVA y STRUCTURE) mostró evidencias de alguna estructura genética. Esto confirma en parte que las frecuencias alélicas entre los sitios muestreados de los loci probados no permiten determinar indicadores de aislamiento y por lo tanto de diferenciación genética, sugiriendo un amplio flujo genético entre los sitios muestreados. Lo cual en términos genéticos significa que las centollas del área muestreada forman una población panmíctica.

Para delinear entre un poder estadístico insuficiente y la existencia de panmixia en el presente estudio se realizaron análisis de simulación de poder utilizando el programa POWSIM los cuales revelaron que el conjunto de 6 loci microsatélites y 346 individuos utilizados en este trabajo tienen un poder cercano a 0.5 para detectar verdadera diferenciación genética con valores de $F_{ST}=0.002$ (Fig. 18).

En el estudio de Huey *et al.* (2004) para evaluar panmixia regional en una lisa de la familia Mugilidae (*Mugil cephalus*) obtuvieron un poder estadístico de 0.92 utilizando 6 loci microsatélites y 86 individuos con un valor de $F_{ST}=0.008$, los autores mencionan que el tamaño de muestra menor a 30 en estudios de genética puede afectar los resultados de diversidad genética obtenidos por lo que realizaron otras

corridas aumentando el número de muestras en cada sitio ($n=50$) obteniendo un poder estadístico de 0.97.

Considerando que los sitios de muestreo en el presente estudio tuvieron tamaños de muestra muy distintos (desde 3 hasta 44) se realizó el análisis de simulación con los mismos parámetros utilizando un tamaño de muestra de 30 para los sitios. Con este análisis el poder de los datos aumentó a 0.73. Sin embargo para no alterar los resultados utilizando un tamaño de muestra mayor, se eliminaron los sitios que tuvieron menos de 20 individuos y se corrió nuevamente el análisis; obteniendo un poder de 0.5 lo que hace pensar que el bajo poder se debe al número de loci utilizados y no al tamaño de muestra.

Pese a que la falta de poder obtenida en este estudio sugiere la necesidad de aumentar el número de loci microsatélites para realizar los análisis, los datos encontrados en este estudio se ven soportados ya que los resultados obtenidos variando algunos parámetros (# de loci y # de individuos) fueron los mismos, por lo que es probable que al utilizar un mayor número de loci se obtenga un valor bajo de diferenciación genética aunque con un mayor poder.

Para lo anterior se corrieron los análisis de H_o , H_e , F_{ST} y STRUCTURE quitando el locus Lsa14, debido a que fue el que tuvo un menor índice de heterocigosidad (0.55), además de que presentó desequilibrio de HW y un valor de $F_{IS}=0.21$ significativo por un exceso de homocigotos (Tabla XII). Nuevamente se obtuvo un valor de F_{ST} global de 0.002 no significativo, un valor de $H_o=0.73$ y $H_e=0.75$ y el número promedio de alelos por locus a lo largo de todos los sitios de muestreo se mantuvo con un promedio de 12 (Anexo 5). En cuanto a los resultados obtenidos con STRUCTURE tampoco se observó ningún patrón de agrupación por lo que no se continuó con los análisis posteriores (Anexo 5).

Los resultados de F_{ST} , heterocigosidad y número de alelos cuando se realizaron los análisis quitando sitios de muestreo con un número de individuos menor a 20 (6 loci, 8 localidades, $n=247$) tampoco variaron a los obtenidos con los análisis anteriores (Anexo 6).

Los análisis descritos previamente sugieren que las centollas de la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes conforman una unidad panmíctica. Sin embargo, Latch *et al.* (2006) reportan que STRUCTURE, el cual implementa métodos de inferencia Bayesiana, no es capaz de detectar niveles de división poblacional sutiles cuando los valores de diferenciación genética (F_{ST}) son menores a 0.02. En el presente trabajo los únicos valores encontrados por arriba este valor fueron 2 pruebas: Isla Otter Norte-Puerto Caracciolo ($F_{ST}=0.024$) e Isla Avelino-Puerto Caracciolo ($F_{ST}=0.029$), pero ninguno fue significativo después de la corrección de pruebas múltiples. El método de ΔK (Évanno *et al.*, 2005) detectó $K=3$ como el grupo más probable de grupos genéticamente distintos, sin embargo, los autores mencionan que éste método no puede encontrar el mejor K si $K=1$.

Por otro lado, las pruebas de simulación indican que el poder estadístico de nuestros datos podría no estar detectando estructuración genética cuando los niveles de F_{ST} son tan bajos o iguales a 0.002, por lo que es necesario ampliar la zona de muestreo e incrementar el número de loci para poder asegurar que los individuos que habitan el área muestreada conforman una unidad panmíctica.

De acuerdo con la teoría de genética de poblaciones, una población idealizada de tamaño infinito, en donde la reproducción es aleatoria (población panmíctica) se esperaría que las frecuencias alélicas no cambien de generación a generación en ausencia de las fuerzas evolutivas (mutación, deriva génica, migración y selección). Sin embargo, raramente se encuentra una población que cumpla estas características en la naturaleza (Allendorf *et al.*, 2013).

Santos *et al.* (2007) mencionan que los niveles altos de diversidad genética parecen ser comunes en especies migratorias con poblaciones panmícticas grandes, esto debido a que los tamaños efectivos poblacionales grandes y las altas tasas de migración minimizan el efecto de la deriva génica como una fuerza que reduce la diversidad genética (DeWoody y Avise, 2000). Avise *et al.* (1988), mencionan que en una población panmíctica se espera que el nivel de diversidad genética sea proporcional al tamaño efectivo poblacional y a la tasa de mutación,

asumiendo que son constantes en el tiempo. A pesar de que no se cuentan con datos de los tamaños efectivos poblacionales o las tasas de migración, se podría pensar que el N_e de la centolla es grande ya que ha soportado una fuerte explotación por varias décadas.

Existen varios factores que pueden influir en el grado de conectividad entre las poblaciones de *L. santolla*, los cuales han modelado la estructura genética de otras especies de crustáceos de importancia comercial que se distribuyen en ambientes complejos como los de la centolla de Magallanes en los que se han utilizado marcadores moleculares para definir unidades genéticas distintas:

1. El tipo de larva y la dispersión de éstas por acción de las corrientes,
2. La complejidad de la línea de costa y
3. La dispersión de los adultos.

A continuación se discutirán cada uno de estos factores.

8.1.1 Tipos de larvas y dispersión por efecto de las corrientes.

La dispersión de las larvas en la mayoría de especies de decápodos marinos, es limitada inicialmente debido a que los huevos se encuentran unidos a los pleópodos de las hembras durante un tiempo prolongado, en el caso de *L. santolla* se ha reportado que es de 9-10 meses (Vinuesa *et al.*, 1985); y en la centolla roja del norte o comúnmente llamado cangrejo real *P. camtschaticus*, de 11-12 meses (Marukawa, 1933) antes de que eclosionen. Sin embargo, después de que eclosionan se espera que las especies bentónicas con estadios larvales planctónicos experimenten grandes tasas de dispersión debido al efecto de las corrientes. Estos mecanismos de dispersión pueden repercutir en el flujo genético, el cual tiende a limitar la divergencia genética entre poblaciones produciendo

poblaciones geográficamente expansivas con grandes tamaños efectivos poblacionales (Waples, 1998; Bradbury *et al.*, 2008).

Por ejemplo, el cangrejo real de Alaska (*P. camtschaticus*) presenta larvas de tipo planctónicas con tiempos de eclosión prolongados (2-3 semanas), después de la eclosión las larvas permanecen en la columna de agua hasta 80 días antes de asentarse en el fondo por lo que tienen grandes probabilidades de ser desplazadas grandes distancias a lo largo de la costa por acción de las corrientes. Este patrón se ha comprobado en varios estudios con marcadores moleculares (ADNm, microsatélites y SNPs, Zelenina *et al.*, 2008; Vulstek, 2011; Grant y Cheng, 2012) en donde han encontrado baja diferenciación a lo largo de las poblaciones del Pacífico norte (abarcando desde el mar de Bearing hasta el Golfo de Alaska).

En un estudio con un el mismo numero (6) loci microsatélites realizado en las poblaciones de *P. camtscahticus* se encontró un fuerte grado de conectividad entre las poblaciones del Oeste del Golfo de Alaska y las del Pacífico Noroeste (Vulstek, 2011). Estos autores atribuyen estos resultados al efecto de las rápidas corrientes costeras y a la aparente falta de barreras físicas, lo que facilita la dispersión de las larvas planctónicas y proponen estos factores como los principales determinantes de la estructura genética en las poblaciones del cangrejo real de Alaska de esta región (Stevens, 2014).

En el caso de las larvas de *L. santolla* presentan también tiempos de eclosión y estadios larvales prolongados, los cuales se cree que pueden durar hasta 7 semanas en el medio natural y de 18 a 200 días para transformarse en el primer cangrejo dependiendo de la temperatura respectivamente (Anger *et al.*, 2004; Calcango *et al.*, 2005). Se ha sugerido que los periodos largos de eclosión en los litódidos subantárticos son una estrategia para aumentar la dispersión y disminuir la depredación pelágica (Tathje *et al.*, 2003). Sin embargo, se ha propuesto que tanto los estadios zoea como megalopa en *L. santolla* son bentónicas y de poca actividad, además de que es probable que los individuos recién eclosionados en el medio natural, elijan sustratos tridimensionales complejos durante las primeras 24 horas

(Tapella *et al.*, 2012), por lo que se espera que el potencial de dispersión de estas larvas sea menor en comparación con las de tipo planctónicas. El comportamiento de selección de hábitats con estructuras tridimensionales y complejos en las larvas lecitotróficas de *L. santolla* se ha sugerido como una estrategia para disminuir la depredación así como el canibalismo durante los primeros estadios de vida.

La falta de diferenciación genética para el área muestreada en este estudio, sugiere que las larvas en el medio natural tienen un comportamiento distinto al reportado en estudios de laboratorio y que en realidad si realizan movimientos de dispersión a lo largo de grandes distancias por otros medios, aún desconocidos. Por ejemplo, se ha reportado la asociación de individuos en sus primeras etapas como juveniles a los discos de fijación del alga *M. pyrifera*, la cual podrían utilizar como medio de dispersión cuando estas se desprenden (Tapella *et al.*, 2012). Esto refuerza la necesidad de llevar a cabo estudios sobre los primeros estadios de *L. santolla* en su medio natural ya que hasta la fecha los muestreos que se han realizado para evaluar larvas de crustáceos han sido por arrastres de plancton.

8.1.2 Complejidad de la línea de costa.

Como ya se mencionó, por lo general se espera que las especies marinas con larvas planctónicas muestren poca estructuración genética debido a las pocas barreras para la dispersión de las larvas vía corrientes marinas (Ward *et al.*, 1994). No obstante, a pesar de estas predicciones en el potencial de dispersión de las especies que poseen larvas planctónicas, análisis genéticos en decápodos comerciales han revelado complejos patrones de diferenciación genética a varias escalas geográficas, incluso en distancias cortas de 40-255 km (Weber *et al.*, 2000; Weber y Levy, 2000) sugiriendo que esos crustáceos, de hecho, no se dispersan.

También se ha observado diferenciación genética en especies con una gran distribución, en áreas en donde las líneas de costa son tan complejas (fiordos, bahías y canales) que actúan como barreras físicas y oceanográficas entre los individuos, y esto a pesar de que son especies con larvas planctónicas cuyo

potencial de dispersión es mucho mayor a la de las bentónicas. Por ejemplo, Zelenina *et al.* (2008) usando 5 loci microstélites y un gen mitocondrial (COI) para comparar muestras de 4 localidades del mar de Barents (al norte de Noruega y Rusia), una del Oeste de la península de Kamchatcka y otra de la Bahía “Peter the Great”; no encuentran diferenciación genética excepto para los individuos que habitan los fiordos de Varanger en el Noroeste del mar de Barents, argumentando que estas poblaciones se encuentran aisladas debido a las barreras geográficas que representa las complicadas líneas de costas que forman los fiordos.

Algo similar encontraron Jørstad *et al.* (2007) en un estudio con 11 loci microsátélites altamente polimórficos en donde sólo observan diferencias significativas entre las poblaciones que habitan los fiordos de Varanger en el mar de Barents y las poblaciones del mar de Bering.

En el estudio de Vulstek (2011), contrario a los resultados obtenidos a lo largo de las poblaciones cercanas a las costas abiertas (Oeste del Golfo de Alaska y las del Pacífico Noroeste), encuentra marcadas diferencias genéticas entre las localidades muestreadas dentro de los fiordos del Sureste de Alaska, indicando baja conectividad entre dichas poblaciones.

Tomando en cuenta los ejemplos anteriores, en donde se observa que las poblaciones a lo largo de las líneas de costa en el mar abierto tienen una mayor conexión que las que se encuentran a lo largo de líneas de costa complejas y aisladas como en los fiordos, bahías y canales, en este trabajo se esperaba encontrar diferencias genéticas al menos en los sitios más alejados del muestreo de *L. santolla* (ej. Isla Salamandra y Seno Ballena, Fig. 3). No obstante, las localidades más alejadas en este estudio tuvieron un valor de diferenciación genética bajo y no significativo ($F_{ST}=0$, $p=0.53$, Tabla X), sugiriendo que existe amplio flujo genético entre las centollas de esa region.

Por otro lado, debido a que la especie se distribuye en un rango mucho mayor al estudiado en esta investigación, es probable que el muestreo del presente estudio haya tomado localidades con características oceanográficas similares o que las

diferencias genéticas aumenten conforme aumente la distancia geográfica hacia la parte más austral de Chile y el Océano Atlántico ya que la línea de costa es mucho menos accidentada y la acción de las corrientes debe ser mayor que en los fiordos en el Océano Pacífico.

Actualmente se está realizando un muestreo extenso de *L. santolla* que abarca desde puerto Edén (49°S, 74°O) hasta puerto Williams (-54°S, 67°O) (Fig. 19) en el cual se colectarán 50 organismos por sitio de muestreo (Acuña-Gómez Com. pers.). Además, paralelo a este estudio se realiza un análisis de morfometría geométrica en el que los datos preliminares analizando 966 individuos (colectas 1 y 2, ver Fig. 19) detectan diferencias significativas entre individuos de la zona 4 y 3 con los individuos de las zonas más sureñas (Datos no publicados, Fundación CEQUA). Debido a que las muestras de este estudio abarcan una zona en donde la morfología de las centollas es igual, es probable que al analizar muestras de zonas más alejadas, en donde las diferencias morfológicas son significativas, se detecten diferencias genéticas. Por otro lado, también es probable que las centollas estén respondiendo a factores de selección aun desconocidos por lo que se requiere de un análisis mas profundo inspeccionando el genoma con miles de marcadores SNPs adaptativos y no adaptativos.

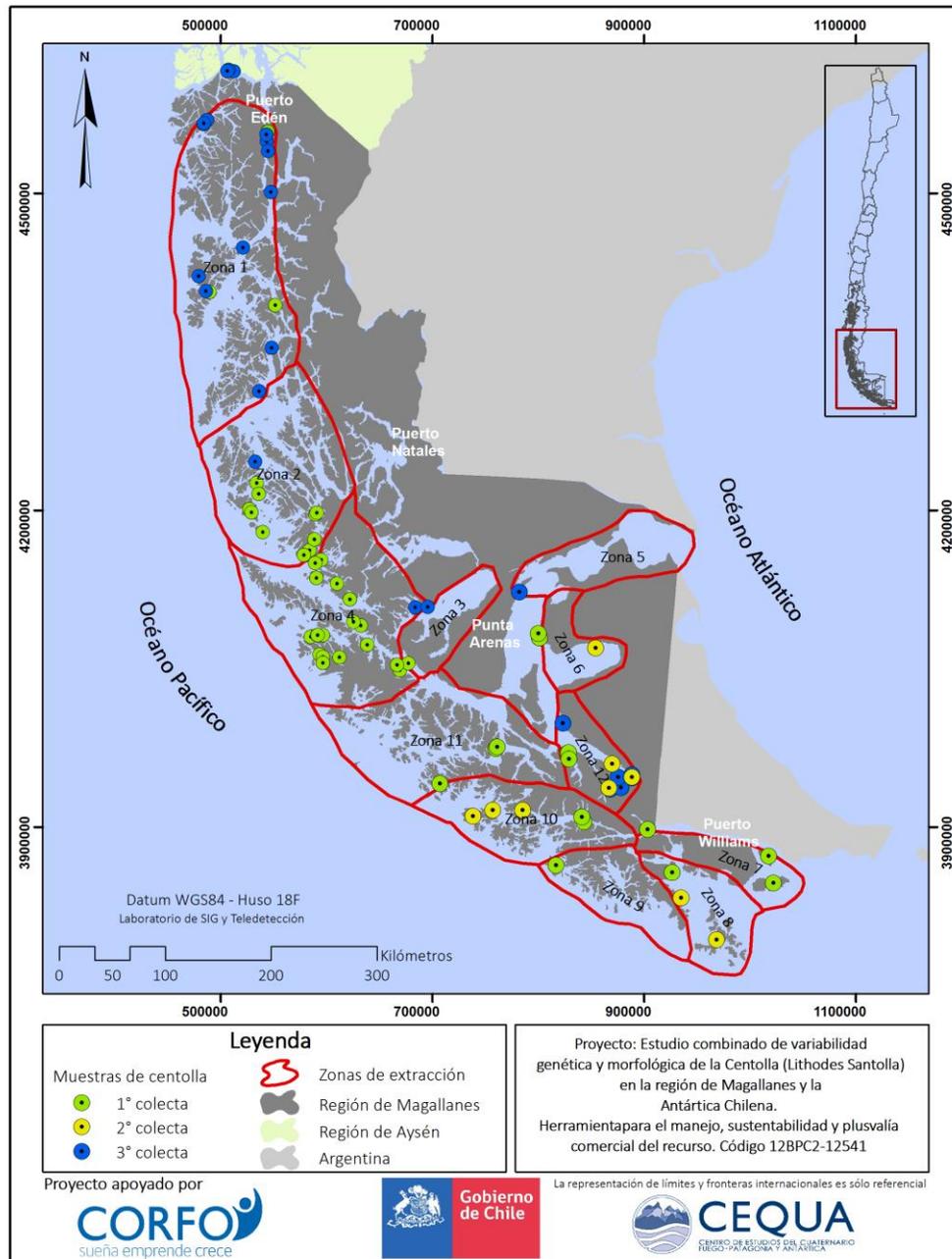


Figura 19. Mapa de los sitios de colecta de *L. santolla* para el Estudio combinado de variabilidad genética y morfológica de la centolla en la región de Magallanes y la Antártica Chilena. Las muestras utilizadas para el presente trabajo se encuentran marcadas en verde y abarcan la zona 4 del mapa. (Realizado por Carlos Olave, CEQUA).

8.1.3 Dispersión de los adultos.

Se ha discutido el efecto que tiene la dispersión de larvas de cangrejos en el grado de conectividad entre poblaciones y cómo este puede ser afectado por cuestiones geográficas. Sin embargo, la habilidad de dispersión de las especies como adultos también está estrechamente relacionada con la estructura genética de las poblaciones (Bohonak, 1999; Stevens, 2014).

Ungfors *et al.* (2009) realizaron un estudio con 8 loci microsatélites y 348 muestras de *Cancer pagurus*, un cangrejo de importancia comercial en las costas de Noruega y observaron una diferenciación genética espacio temporal baja ($F_{ST}=0.002$, significativa $p=0.03$) a lo largo de 1300 km de aguas costeras. Estos autores atribuyen la baja diferenciación genética a la habilidad de las hembras para dispersarse grandes distancias (100s km), lo cual aumenta el intercambio genético en las poblaciones que se encuentran en aguas abiertas. Sin embargo, en un estudio de marcado recaptura, Ungfors *et al.* (2007) encuentran que el movimiento de las hembras es significativamente menor en individuos que se distribuyen en el interior de la costa, en los sistemas de fiordos a los que se distribuyen en aguas abiertas, por lo tanto el flujo genético también se ve limitado.

Para el caso de *L. santolla*, Stevens (2014) propone que la colonización de las poblaciones de esta especie en los fiordos se lleva a cabo por organismos juveniles y adultos a través de las aguas profundas en mar abierto cuando realizan las migraciones. Sin embargo, Boschi *et al.* (1984), en un estudio de marcado-recaptura en el Canal de Beagle encuentra que los adultos realizan movimientos cortos y sin dirección aparente (≈ 14 km en 70 días) sugiriendo que es probable que estos movimientos no aporten mucho al flujo genético entre localidades alejadas y que exista escaso o nulo grado de mezcla entre ellas (Subsecretaría de Pesca y Acuicultura, 2009). Por lo que para comprobar las dos hipótesis son necesarios más estudios de marcado-recaptura en donde reporten el potencial de dispersión de los

individuos adultos y estudios genéticos en donde se evalúe el aporte de estos movimientos al flujo genético hacia otras localidades.

El hecho de que el presente estudio se hayan encontrado valores de diferenciación genética tan bajos y no significativos como los reportados para el *Cancer pagurus* (F_{ST} global de 0.002) a lo largo de 890 km dentro de los fiordos y canales del Sur de Chile, hace suponer que el área geográfica no es lo suficientemente grande y que se debe ampliar para detectar las diferencias genéticas causadas por las barreras que supondrían los fiordos, cambios de temperatura, salinidad y corrientes en estos sistemas tan complejos o que las diferencias en las frecuencias alélicas son tan bajas que no pudieron ser detectadas con los métodos empleados.

Se cree que la dispersión a grandes distancias de las larvas de *L. santolla* es poco probable ya que son bentónicas/demersales con un rango limitado de nado. Sin embargo, dado que a los primeros estadios de *L. santolla* se les ha observado asociados a los discos de *M. pyrifera* (Tapella *et al.*, 2012), la cual si tiene capacidad de dispersión, es probable que las larvas de centolla realicen procesos de dispersión asociados a objetos (algas) flotando; trasportándose a través de los fiordos por acción de las corrientes, distancias mayores a lo que se espera para este tipo de larvas como se observa para algunos crustáceos (Hinojosa *et al.*, 2010), al menos en las aguas con características fisicoquímicas similares en donde no sean una barrera para las algas y la sobrevivencia de las larvas.

8.2 Diversidad genética.

Todas las muestras en este estudio fueron analizadas utilizando 6 loci microsatélites, basados en iniciadores diseñados para *L. santolla*. Esto confiere mayores ventajas ya que muchas veces cuando se utilizan iniciadores diseñados para otra especie los loci utilizados se encuentran fijados o presentan bajo polimorfismo (Allendorf *et al.*, 2013).

En promedio, los loci utilizados en este estudio mostraron una alta diversidad genética en todos los análisis, multilocus y global (Tabla XII) por lo que se puede descartar un bajo poder de los loci debido a un bajo valor de diversidad genética (Texeira *et al.*, 2012). Tanto el número promedio de alelos por locus (5-25) como la heterocigosidad (0.55-0.92) se encuentran dentro de los valores reportados para otros decápodos marinos (Ej. Texeira *et al.*, 2012; Jørstad *et al.*, 2007), incluso en estudios en donde utilizan un mayor número de loci e individuos analizados.

El valor promedio del índice de fijación (F_{IS}) al utilizar los 6 loci se encontró en desequilibrio de las proporciones de HW (0.057, $p < 0.001$) sin embargo, al realizar los análisis sin el locus Lsa14, el cual fue el único que presentó desviaciones significativas del E-HW por un exceso de homocigotos ($F_{IS} = 0.021$), se obtuvo un valor de F_{IS} menor y no significativo (0.024, $p = 0.05$). Al respecto, Hedrick (2011) menciona que algunas de las causas para la desviación de la heterocigosis relativa a lo esperado en E-HW cuando se observa un déficit de heterocigotos son: selección, endogamia, apareamiento selectivo positivo, efecto Wahlund o alelos nulos.

El efecto Wahlund (subdivisión de la población en varios demes separados), puede ser descartado ya que el desequilibrio de HW debe observarse en todos los loci, no sólo en uno como fue nuestro caso. Además se puede detectar un efecto Wahlund si las pruebas de una sola localidad se encuentran en desequilibrio de HW (Allendorf *et al.*, 2013), en este caso no se encontró un sitio de muestreo específico fuera del E-HW.

La presencia de un valor alto de F_{IS} para un solo locus puede ser indicador de algo inusual en ese locus, por ejemplo alelos nulos, en el caso de Lsa14 tuvo un valor de alelos nulos de 0.089 considerándose muy baja o un valor marginal (Chapuis y Estoup, 2007) por lo que es probable que la presencia de alelos nulos en este locus esté contribuyendo de menor manera al bajo valor de heterocigosis presentada en este locus.

Otra causa podría ser que el locus Lsa14 se encuentre bajo selección indirecta, Lewontin y Krakauer (1973) proponen que cuando los alelos en un locus no concuerdan con los patrones geográficos compartidos por otros loci, la selección puede estar actuando en ese locus “outlier”.

8.3 Implicaciones para el manejo pesquero.

Los resultados obtenidos en este estudio tienen implicaciones importantes en el entendimiento del manejo de *L. santolla*, en general. Los valores altos de heterocigosidad y diversidad genética indican una población saludable sin embargo, dado que todas las pruebas muestran el mismo patrón (homogeneidad genética), sugieren que existe un flujo genético no restringido en el área de estudio. Esto implicaría que existen mecanismos de migración que no se han considerado para esta especie, ya sea en adultos o estadios tempranos, los cuales son suficientes para mantener homogéneas las frecuencias alélicas a lo largo de un área geográficamente compleja como lo es el área de estudio.

Dado que los datos genéticos muestran que *L. santolla* es una unidad genéticamente homogénea en el área geográfica analizada y debido a que esta especie tienen tiempos generacionales largos (6 años) y se ha observado que su recuperación es lenta (como la pesquería del canal de Beagle), se deben tener consideraciones con las cuotas de captura (inexistentes hasta ahora) y las zonas de pesca ya que es un área fuertemente explotada en la cual interactúan 3 de los principales puertos para la XII región (Puerto Natales, Punta Arenas y Porvenir).

Además, los esfuerzos de manejo y conservación deben ser coordinados a un nivel transnacional ya que es un recurso que se distribuye en un área muy extensa la cual incluye las costas de Argentina hasta Uruguay siendo un recurso pesquero compartido por Argentina a través del Canal de Beagle, aunque se desconoce las relaciones genéticas entre las centollas de aguas Argentinas y Chilenas.

No obstante, los resultados también sugieren que es necesario utilizar un mayor número de loci microsatélites así como ampliar el área de estudio para determinar si el patrón de homogeneidad genética se mantiene a lo largo de toda el área de distribución de la especie. No obstante, basados en resultados preliminares morfométricos esperamos que al aumentar el área de geográfica analizada se encuentren diferencias genéticas que puedan ser detectadas. Para concluir si existen diferencias genéticas que tenga una implicación en el manejo pesquero, se puede utilizar otro tipo de marcadores de tasa de mutación alta, como los SNPs y realizar muestreos más extensos, que incluyan las zonas de mar abierto, además de los fiordos y complejos canales existentes en la Región de Magallanes.

A pesar de las limitantes en el conocimiento del recurso, cabe destacar la importancia de este estudio dada la inexistencia de estudios publicados sobre genética de poblaciones en *Lithodes santolla*, además de que los loci diseñados y optimizados en esta investigación podrán ser utilizados posteriormente junto con otros y aplicados a un área más extensa para poder tener una visión más amplia sobre la estructura genética y la dinámica poblacional de la centolla a lo largo de su área de distribución en el Pacífico y Atlántico austral, así como también servirá como base y complemento para futuras investigaciones.

Los resultados de este estudio indican que las centollas del área analizada (zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes) están formando una unidad genética panmíctica; sin embargo, no significa que deba considerarse a las centollas de esta área como un solo stock pesquero ya que es necesario realizar más estudios utilizando un mayor número de loci, una mayor área de muestreo, además de realizar estudios sobre patrones de migración en adultos y estadios larvarios para poder inferir las áreas importantes para su protección como son las áreas de desove o crianza o las zonas con mayores congregaciones de hembras reproductivas.

Aunado a esto, y debido a que las centollas presentan presumiblemente patrones complejos de migración dentro de los canales y fiordos así como entre mar

abierto y el sistema de canales, además patrones temporales de migración para la reproducción. Se requiere estudiar estos patrones de migración complejos, con fines de la identificación de stock poblacionales críticos.

Adicionalmente, es necesario ampliar el área de muestreo ya que evidencias morfológicas indican que existen diferencias significativas entre los individuos de las zonas centro y sur de la región de Magallanes, las cuales podrían tener implicaciones importantes en la dinámica de poblaciones como diferentes tasas de reproducción, crecimiento, reclutamiento, etc.

9. CONCLUSIONES

1. En este trabajo se logró obtener mediante secuenciación masiva 25 pares de iniciadores microsatelitales para PCR.
2. Los resultados en este estudio utilizando 6 loci microsatélites moderadamente polimórficos no detectaron diferenciación genética significativa ente los sitios de muestreo, en la zona norte y centro-oeste de la región de Magallanes. Por lo que las centollas de esta región de Magallanes forman una población panmictica.
3. En promedio, los loci utilizados mostraron una alta diversidad genética en todos los análisis, multilocus y global. Tanto el número promedio de alelos por locus como la heterocigosidad, se encuentran dentro de los valores reportados para otros decápodos marinos.
4. Los resultados obtenidos en este estudio tienen implicaciones importantes en el entendimiento del manejo de *L. santolla*, en general. Los valores altos de heterocigosidad y diversidad genética indican una población saludable.
5. La homogeneidad genética observada sugiere la existencia de un flujo genético no restringido en el área de estudio. Esto implicaría que existen mecanismos de migración que no se han considerado para esta especie, ya sea en adultos o estadios tempranos, los cuales son responsables de mantener homogéneas las frecuencias alélicas a lo largo de un área geográficamente compleja como lo es el área de estudio.
6. Los test de poder estadístico sugieren que es necesario utilizar un mayor número de loci microsatélites así como ampliar el área de estudio para determinar si el patrón de homogeneidad genética se mantiene a lo largo de toda el área de distribución de la especie.

10. LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S.M., I. Martínez. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Allendorf, W.F., G. Luikart. 2007. Conserving global biodiversity? Conservation and the genetics of populations. *Conserv Genet.* 9(2): 437-438.
- Allendorf, F.W., G.H. Luikart, S.N. Aitken. 2013. Conservation and the Genetics of Populations. Wiley-Blackwell. Second Edition. USA. 624p.
- Altukhov, Y.P., E.A. Salmenkova. 1987. Stock transfer relative to natural organization, management and conservation of fish populations. N. Ryman and F.M. Utter (eds.), *Population Genetics and Fishery Management*. Washington: University of Washington. 333-344p.
- Anger, K., G.A. Lovrich, S. Thatje, J.A. Calcango. 2004. Larval and early juvenile development of *Lithodes santolla* (Molia, 1782) (Decapoda: Anomura: Lithodidae) reared at different temperatures in the laboratory. *J Exp Marine Biol.* 306(2): 217-230.
- Antao, T., A. Lopes, R.J. Lopes, A. Beja-Pereira, G. Luikart. 2008. LOSITAN: A workbench to detect molecular adaptation based on a Fast-outlier method. *BMC Bioinf.* 9: 323.
- Avise, J.C., R.M. Ball, J. Arnold. 1988. Current versus historical population sizes in vertebrate species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Mol Biol Evol.* 5: 311-344.
- Balakirev, E.S., Y.V. Fedoseev. 2000. Estimating allozyme genetic variability in red king crab *Paralithodes camtschaticus* Tilesius. *Russ J Genet.* 36: 860-866.
- Beaumont, A., K. Hoare. 2003. Biotechnology and Genetics in Fisheries and Aquaculture. Wiley-Blackwell. First edition. USA. 176p.

- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, F. Bonhomme. 2004. GENETIX. 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171. Université de Montpellier II. Montpellier Francia.
- Bohonak, A.J. 1999. Dispersal, Gene Flow, and Population Structure. *Q Rev Biol.* 74(1): 21-45.
- Boschi, E.E., D.A. Bertuche, J.G. Wyngaard. 1984. Estudio biológico pesquero de la centolla (*Lithodes santolla*) del Canal Beagle, Tierra del Fuego, Argentina. *Contrib Inst Nac Invest Des Pesq, (INIDEP).* 441: 7-72.
- Boschi, E.E., E.C. Fischbach, M.I. Iorio. 1992. Catálogo ilustrado de los crustáceos estomatópodos y decápodos marinos de Argentina. *Frente Marítimo*, 10, Sec. A: 7-94.
- Bradbury, I.R., B.J. Laurel, D. Robichaud, G.A. Rose, P.V.R. Snelgrove, R.S. Gregory, D. Cote, M.J.S. Windle. 2008. Discrete spatial dynamics in a marine broadcast spawner: re-evaluating scales of connectivity and hábitat associations in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) in coastal Newfoundland. *Fish Res.* 91: 299-309.
- Cadrin, S.X., K.D. Friedland, R.J. Waldman. 2005. *Stock Identification Methods: Applications in Fishery Science.* Elsevier Academic Press. Amsterdam. 719p.
- Calcango, J.A., K. Anger, G.A. Lovrich, S. Thatje. 2004. Larval development of the subantarctic king crabs *Lithodes santolla* and *Paralomis granulosa* reared in the laboratory. *Helgol Mar Res.* 58: 11-14.
- Calcango, J.A., G.A. Lovrich, S. Thatje, U. Nettelmann, K. Anger. 2005. First year growth in the lithodids *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* reared at different temperatures. *J Sea Res.* 54(3): 221-230.
- Carvalho, G.R., L. Hauser. 1994. Molecular genetics and the stock concept in fisheries. *Rev Fish Biol and Fisher.* 4: 326-350.

- Carvalho, G.R., T.J. Pitcher. 1994. Molecular genetics In fisheries. *Rev Fish Biol and Fisher.* 4(3): 269-271.
- Castoe, T.A., A.W. Poole, A.P.J. de Koning, K.L. Jones, D.F. Tomback, S.J. Oyler-McCance, J.A. Fike, S.L. Lance, J.W. Streicher, E.N. Smith, D.D. Pollack. 2012. Rapid Microsatellite Identification from Illumina Paired-End Genomic Sequencing in Two Birds and a Snake. *PLoS One*, 7(2): e30953. doi: 10.1371/journal.pone.0030953
- Chapius, M.P., A. Estoup. 2007. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Mol Biol Evol.* 24(3): 621-631.
- Dakin, E.E., J.C. Avise. 2004. Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity.* 93: 504-509.
- DeWoody J.A., J.C. Avise. 2001. Genetic perspectives on the natural history of fish mating systems. *J Hered.* 92:167-172.
- Dyer, R.J., J.D. Nason. 2004. Population Graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Mol Ecol.* 13(7): 1713-1727.
- Earl, D.A., M.B. VanHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resour.* 4: 359-361.
- Eguiarte, E.L., E. Aguirre-Planter, E. Scheinvar, A. González-González, V. Souza. 2010. Flujo genético, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. *Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, UNAM. México.* 30p.
- Evanno, G., S. Regnaut, J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol.* 14(8): 2611-2620.

- Excofier, L., H.E.L. Lischer 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10: 564-567.
- Faircloth, B.C., T.C. Glenn. 2012. Not All Sequence Tags Are Created Equal: Designing and Validating Sequence Identification Tags Robust to Indels. *PLoS One*, 7(8): e42543. doi: 10.1371/journal.pone.0042543
- Fisher, S., A. Barry, J. Abreu, B. Minie, J. Nolan, T.M. Delorey, G. Young, T.J. Fennell, A. Allen, L. Ambrogio, A.M. Berlin, B. Blumenstiel, K. Cibulskis, D. Friederich, R. Johnson, F. Juhn, B. Reilly, R. Shammass, J. Stalker, S.M. Skyes, J. Thompson, J. Walsh, A. Zimmer, Z. Zwirko, S. Gabriel, R. Nicol, C. Nusbaum. 2011. A scalable, fully automated process for construction of sequence-ready human exome targeted capture libraries. *Genome Biol.* 12:R1. 15p.
- Freeland. J. 2005. The evolution of population biology: past, present and future. *J Biogeogr.* 32(11): 2039-2040.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (Version 2.9): a computer program to calculate F-statistics. *J Hered.* 86: 485-486.
- Grant, W.S., W. Cheng. 2012. Incorporating deep and shallow components of genetic structure into the management of Alaskan red king crab. *Evol Appl.* 5: 820-837.
- Grant, S.W., E.S. Merkouris, H.G. Kruse, L.W. Seeb. 2011. Low allozyme heterozygosity in North Pacific and Bearing Sea populations of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*): adaptive specialization, population bottleneck, or metapopulation structure?. *ICES J Mar Sci.* 1-8. doi: 10.1093/icesjms/fsq184
- Guerrero, Y. 2000. Distribución de temperatura, salinidad y oxígeno disuelto en las aguas interiores de la zona de canales australes, entre el Golfo de Penas y

- Seno Almirantazgo. Tesis de Oceanografía. Escuela de Ciencias del Mar. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso. 99p.
- Guzmán, D., N. SILVA. 2002. Caracterización física y química y masas de agua en los canales australes de Chile entre boca del Guafo y golfo Elefantes (Crucero CIMAR 4 Fiordos). *Cienc Tecnol Mar.* 25 (2): 45-76.
- Hedrick, P.P. 2011. *Genetics of Populations*. Jones and Bartlett Publishers. Fourth edition. Arizona. 675p.
- Hinojosa, I.A., E.R. González, E. Macaya, M. Thiel. 2010. Macroalgas flotantes en el mar interior de Chiloé, Chile y su fauna asociada con énfasis en peracarida y estados tempranos de desarrollo de Decapoda (Crustacea). *Ciencia y Tecnología del Mar.* 33(2): 71-86
- Huey, J.A., T. Espinoza, J.M. Hughes. 2004. Regional panmixia in the mullet *Mugil cephalus* along the coast of Eastern Queensland; Revealed using highly polymorphic microsatellite loci. *Proceedings of the Royal Society of Queensland.* 1-15.
- Jakobsson, M., N.A. Rosenberg. 2007. CLUMP: a cluster matching and permutation program for dealing whit label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics.* 23: 1801-1806.
- Jørstad, K.E., P.A. Prodöhl, A.L. Agnalt, M. Hughes, A.P. Apostolidis, A. Triantafyllidis, E. Farestveit. 2004. Sub-arctic populations of European lobster, *Homarus gammarus*, in northern Norway. *Environ Biol Fish.* 69: 223-231.
- Jørstad, K.E., C. Smith, Z. Grauvogel, L.W. Seeb. 2007. The genetic variability of the red king crab, *Paralithodes camtschatica* (Tilesius, 1815) (Anomura, Lithodidae) introduced into the Barents Sea compared with samples from the Bering Sea and Kamchatka region using eleven microsatellite loci. *Hydrobiologia.* 590: 115–121.

- Kattner, G., M. Graeve, J.A. Calcango, G.A. Lovrich, S. Thatje, K. Anger. 2003. Lipid, fatty acid and protein utilization during lecithotrophic larval development of *Lithodes santolla* (Molina) and *Paralomis granulosa* (Jacquinot). *J Exp Marine Biol.* 229(1): 61-74.
- Kimura, M. 1953. "Stepping-stone" model of population. Annual report of the National Institute of Genetics Japan. 3: 62-63.
- Latch, E., G. Dharmarajan, J. Glaubitz, O.J. Rhodes. 2006. Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conserv Genet.* 7: 295-302.
- Lovrich, G.A. 1997. La pesquería mixta de las centollas *Lithodessantollay Paralomis granulosa* (Anomura: Lithodidae) en Tierra del Fuego, Argentina. *Invest. MarValparaíso.* 25: 41-57.
- Lovrich, G.A. 1999. Seasonality of larvae of Brachyura and Anomura (Crustacea Decapoda) in the Beagle Chanel, Argentina. *Sci Mar.* 63(1): 347-354.
- Marukawa, H. 1933. Biological and fishery research on Japanese King crab *Paralithodes camtschatica* (Tilesius). *J Imp Fish Exp Stn, Tokyo.* 4(37): 1-152p.
- Pechenik, A.J. 2000. *Biology of the Invertebrates.* Mc. Graw–Hill Higher Education, Fourth Edition. USA. 578p.
- Pitchard, J.K., M. Stephens, P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics.* 155(2): 945-959.
- Rice, W.R. 1989. Analysis tables of statistical tests. *Evolution.* 43: 223-225.
- Rosenberg, N.A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes.* 4: 137-138.

- Rousset, F. 2008. Genepop: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Mol Ecol Resour.* 8(1): 103-106.
- Ryman, N., F. Utter, L. Laikre. 1995. Protection of intraspecific biodiversity of exploited fishes. *Rev Fish Biol Fisher.* 5: 417-446.
- Santos, M.C.F., M.L. Ruffino, I.P. Farias. 2007. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. *J Fish Biol.* 71(Suplement A): 33-44.
- Seeb, J.E., G.H. Kruse, L.W. Seeb, R.G. Week. 1990. Genetic structure of red King crab populations in Alaska facilitates enforcement of fishing regulations. In *Proceedings of the international symposium on King and tanner crabs: November 28-30, 1989, Anchorage, Alaska.* AK-SG-90-04, pp. 491-502. Alaska Sea Grant: Fairbanks, AK. 633p.
- Seatersdal, 1984. Fisheries resources management. En: Cadima, E.L. 2003. *Fish Stock Assessment Manual.* FAO Fisheries Technical Paper 393. DANIDA (eds.). Rome.
- Sievers, H.A., C.M. Calvete, N.S. Silva. 2002. Distribución de características físicas, masas de agua y circulación general para algunos canales australes entre el Golfo de Penas y el Estrecho de Magallanes (Crucero CIMAR-Fiordo 2), Chile. *Cienc Tecnol Mar.* 25(2): 17-43.
- Sievers, H.A., N. Silva. 2006. Masas de agua y circulación en los canales y fiordos australes. *Comité Oceanográfico Nacional.* 53-58p.
- Silva, N., C. Calvete, H.A. Sievers. 1998. Masas de agua y circulación general para algunos canales australes chilenos entre Puerto Montt y laguna San Rafael (Crucero CIMAR-Fiordo 1). *Cienc Tecnol Mar.* 21: 17-48.
- Soto, M., S. Astete, S. Ferrada, R. Galleguillos. 2007. Análisis genético en *Lithodes santolla* (Molina 1782) (Crustacea: Decapoda), a través de marcadores de ADN e isoenzimáticos. *Biol Res.* 40(Suplemento A): R206.

- Stevens, B.G. 2014. King Crabs of the World: Biology and Fisheries Management. CRC Press Taylor & Francis Group. U.S. 636p.
- Stevens, B.G., S. Persselin, J. Matweyou. 2008. Survival of blue king crab larvae, *Paralithodes platypus*, in cultivation: Effects of diet, temperature, and density. Aq Res. 39: 390-397.
- Stone, R.P., C.E. O'Clair, T.C. Shirley. 1993. Aggregating behavior of ovigerous female red king crab, *Paralithodes camtschaticus*, in Auke Bay, Alaska. Can J Fish Aquat Sci. 50: 750-758.
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 2009. Informe Técnico (R. PEsq.) N° 123. Suspensión Temporal del Acceso a la Pesquería de Centolla de la XII Región, 2009-2014. 19p. http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articulos-12190_recurso_1.pdf
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 2013. Estado de situación de las principales pesquerías Chilenas, 2012. 55p. http://www.subpesca.cl/publicaciones/606/articulos-12190_recurso_1.pdf
- Subsecretaría de Pesca y Acuicultura. Gobierno de Chile. 2014. Informe Técnico (R. Pesq.) N° 208/2014 Modificación Veda Biológica Centolla (*Lithodes santolla*), XIV, X, XI y XII Región, año 2014. 41p. www.economia.cl/transparencia/documentos/DTOEX865.pdf
- Tapella, F., M.P. Sotelano, M.C. Romero, G.A. Lovrich. 2012. Experimental natural substrate preference of southern King crab *Lithodes santolla* larvae. J Exp Marine Biol. 411: 70-77.
- Tapella, F., G.A. Lovrich. 2006. Asentamiento de estadios tempranos de las centollas *Lithodes santolla* y *Paralomis granulosa* (Decapoda: Lithodidae) en colectores artificiales pasivos en el Canal Beagle, Argentina. Invest Mar. 34(2): 47-55

Templeton, R.A. 2006. Population genetics and microevolutionary theory. Wiley-Liss
A John Wiley & Sons., Inc. Publication. United States of America. 72p.

Texeira et al 2012

Thatje, S., S. Schnack-Schiel, W.E. Arntz. 2003. Developmental trade-offs in
Subantartic meroplankton communities and the enigma of low decapod
diversity in high southern latitudes. *Mar Ecol Progr Ser.* 260: 195-207.

Ungfors, A., H. Hallbäck, P.G. Nilsson. 2007. Movement of adult edible crab (*Cancer
pagurus* L.) at the Swedish West Coast by mark-recapture and acoustic
tracking. *Fish Res.* 84: 345-357.

Ungfors, A., N.J. McKeown, P.W. Shaw, C. André. 2009. Lack of spatial genetic
variation in the edible crab (*Cancer pagurus*) in the Kattegat – Skagerrak area.
ICES J Mar Sci. 66: 462-469.

Venables, N.W., D.M. Smith, R. Core Team. 2015. An introduction to R. Notes on R:
A programming environment for data analysis and graphics. Version: 3.1.3.
105p.

Vinuesa, J.H. 1984. Sistema reproductor, ciclo y madurez gonadal de la centolla
(*Lithodes arcticus*) del Canal de Beagle, Tierra del Fuego, Argentina. *Contrib
Inst Nac Des Pesq (INIDEP).* 441: 75-95.

Vinuesa, J.H. 2000. La centolla.....¿es un recurso sustentable?. Tercer Encuentro
Internacional Patagónico para el Desarrollo Sustentable. 2-4 de Noviembre
de 2000. 10p.

Vinuesa, J.H., M.L. Labal. 1998. La gametogénesis de la centolla, *Lithodes santolla*.
Naturalia Patag, Cs Biol. 6: 35-49.

Vinuesa, J.H., L. Ferrari, R.J. Lombardo. 1985. Effects of temperature and salinity
on larval development of southern King crab (*Lithodes antarcticus*). *Mar Biol.*
85(1): 83-88.

- Vulstek, S.C. 2011. Spatio-temporal population genetic structure and mating system of red king crab (*Paralithodes camtschaticus*) in Alaska. MS thesis, University of Alaska Fairbanks, AK. 90p.
- Ward, R.D., M. Woodwark, D.A. Skibinski. 1994. A comparison of genetic diversity levels in marine, freshwater, and anadromous fishes. *J Fish Biol.* 44: 213-232.
- Waples, R.S. 1998. Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *J Hered.* 89(5): 438-450.
- Waples, R.S., O. Gaggiotti. 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Mol Ecol.* 15: 1419-1439.
- Weetman, D., A. Ruggiero, S. Mariani, P.W. Shaw, A.R. Lawler, L. Hauser. 2007. Hierarchical population genetic structure in the commercially exploited shrimp *Crangon crangon* identified by AFLP analysis. *Mar Biol.* 151: 565-575.
- Weber, L.I., J.A. Levy. 2000. Genetic population structure of the swimming crab *Callinectes danae* (Crustacea: Decapoda) in southern Brazil. *Hydrobiologia.* 420: 203-210.
- Weber, L.I., R. Hartnoll, J. Thorpe. 2000. Genetic divergence and larval dispersal in two spider crabs (Crustacea: Decapoda). *Hydrobiologia.* 420: 211-219.
- Weir, B.S., C.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution.* 38: 1358-1370.
- Wright. S. 1943. Isolation by Distance. *Genetics.* 28(2): 114-138.
- Wyngaard, J., M.I. Iorio. 2000. Casos especiales En: pesquerías de Argentina 1997-1999. 267-274.
- Zelenina, D.A., N.S. Mogue, A.A. Volkov, V.I. Sokolov. 2008. Red King Crab: (*Paralithodes camtschaticus*) in the Barents Sea: A comparative Study of Introduced and Native Populations. *Russ J Genet.* 44(7): 859-866.

Zhang, D-X. 2004. Leptidoteran microsatellite DNA: redundant but promising. *Trends Ecol Evolut.* 19 (10): 507-509.

11. ANEXOS.

ANEXO 1. Extracción de ADN por método de sales tomado y modificado de Aljanabi y Martínez (1997).

1. Cortar tejido finamente (25-50 mg) y colocarlo en tubos de 1.6 ml a deshidratar
2. Añadir 400 µl de SDS (10%) y 15 µl de proteinasa k
3. Incubar a 60°C por 6 horas o hasta lograr la digestión total
4. Agregar 300 µl de NaCl (5M) y agitar en vortex, incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
5. Centrifugar a 14 krpm 30 minutos
6. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo y agregar un volumen de isopropanol puro frío
7. Incubar a -20°C por toda la noche
8. Centrifugar a 14 krpm por 20 minutos para decantar el sobrenadante y conservar la pastilla al fondo del tubo
9. Añadir 500 µl de etanol al 80% e incubar 20 minutos a -4°C
10. Centrifugar a 14 krpm por 20 minutos para decantar el sobrenadante y conservar la pastilla, dejar secar completamente
11. Resuspender ADN en 35-50 µl de H₂O mQ

ANEXO 2. Ensayos de amplificación, electroferogramas de los 6 loci microsatélites que amplificaron de manera correcta con 34 individuos (Canal Maule).

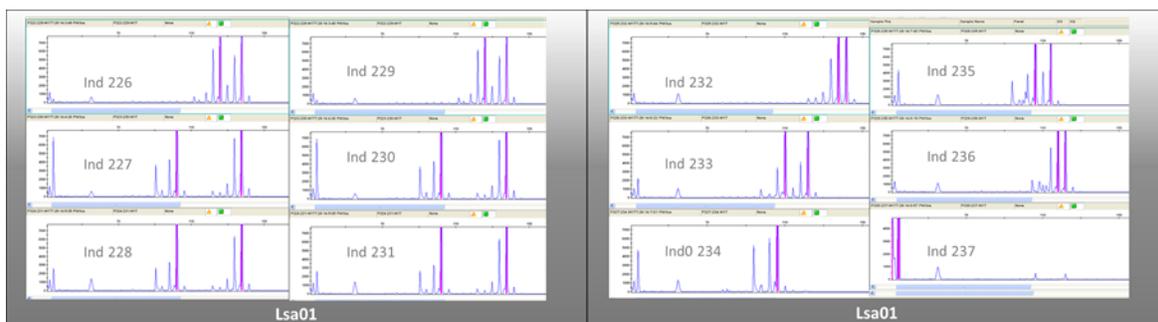


Figura 20. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa01 FAM, [MgCl₂]: 2; TM: 60 °C. Obtenidos con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

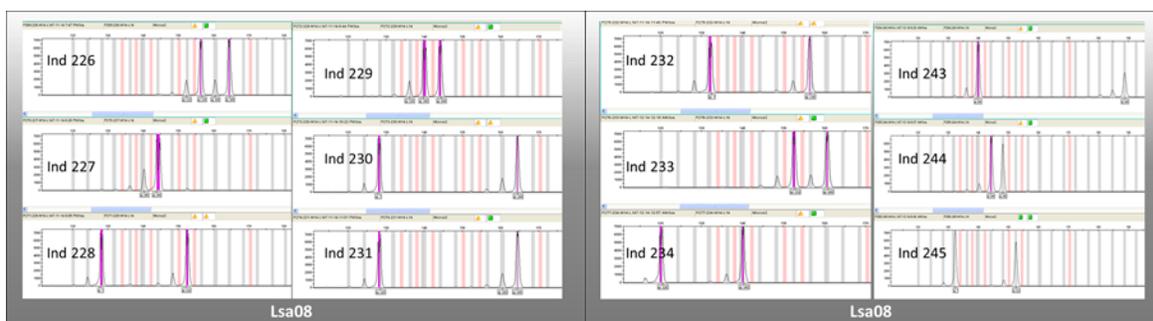


Figura 21. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa08 NED, [MgCl₂]: 2.5; TM: 60 °C. Obtenidos con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

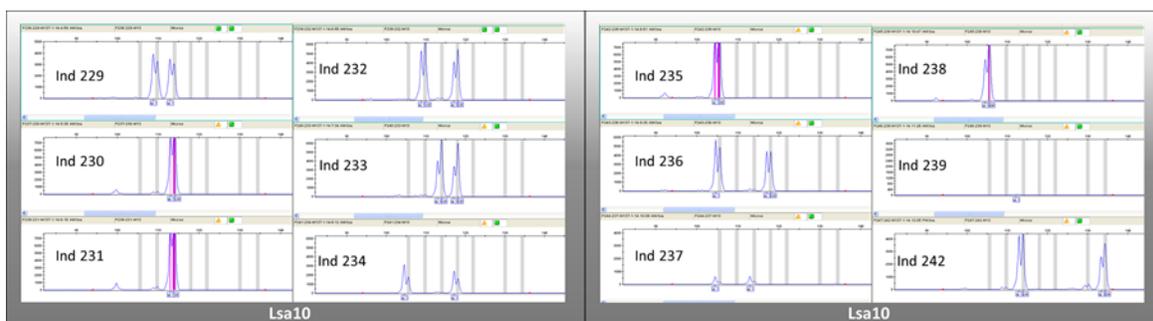


Figura 22. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa10 FAM, [MgCl₂]: 2.5; TM: 66 °C. Obtenidos con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

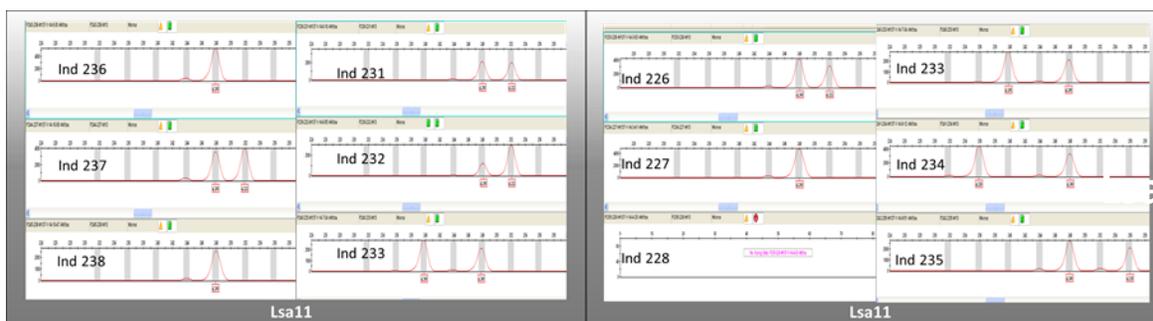


Figura 23. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa11 PET, [MgCl₂]: 2.5; TM: 66 °C. Obtenidos con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

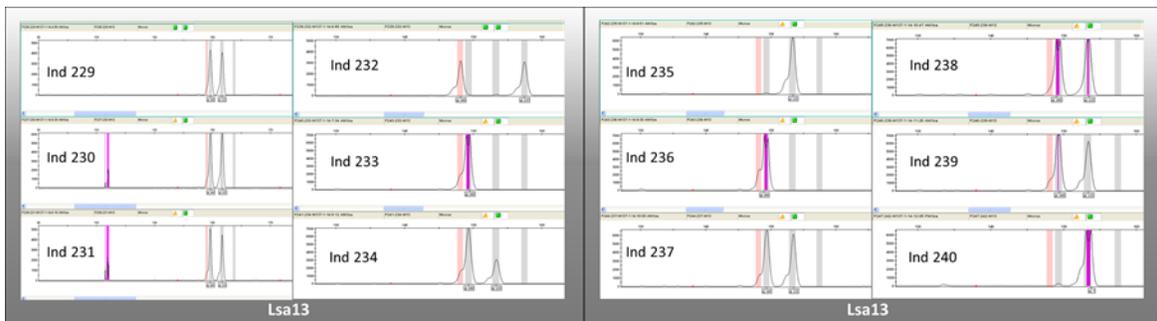


Figura 24. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa13 NED, [MgCl₂]: 1.5; TM: 66 °C. Obtenidos con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

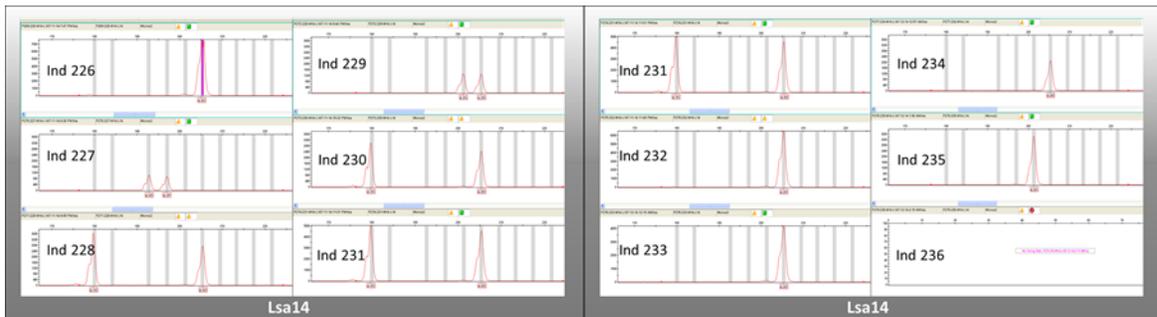


Figura 25. Electroferograma de 12 individuos del sitio de muestreo Canal Maule. Lsa14 NED, [MgCl₂]: 2; TM: 66 °C. Obtenidos con el secuenciador ABI 310 (Applied Biosystems®) de un capilar. Visualizados en GENEMAPPER V 4.1 (Applied Biosystems®).

ANEXO 3. Gráficos obtenidos para el análisis de discriminantes de componentes principales (DAPC) con el programa R V 3.1.3. (Venables *et al.* 2015).

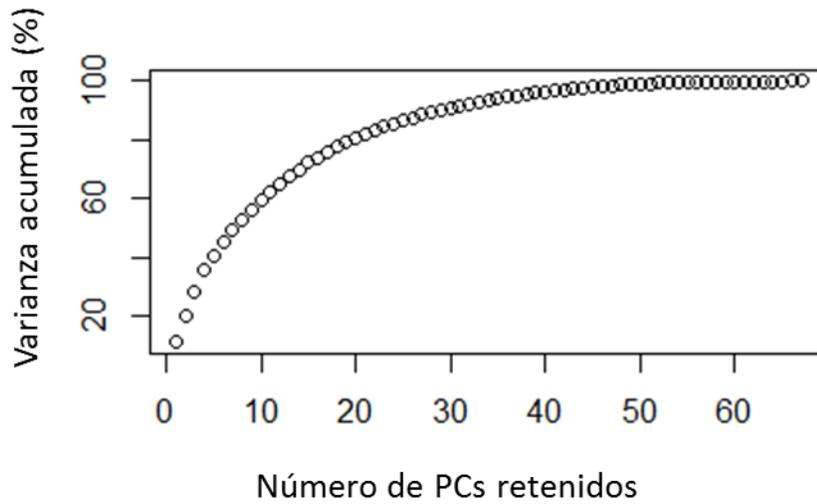


Figura 26. Número de componentes principales retenidos para el análisis de DAPC, se utilizaron los 40 primeros PCs.

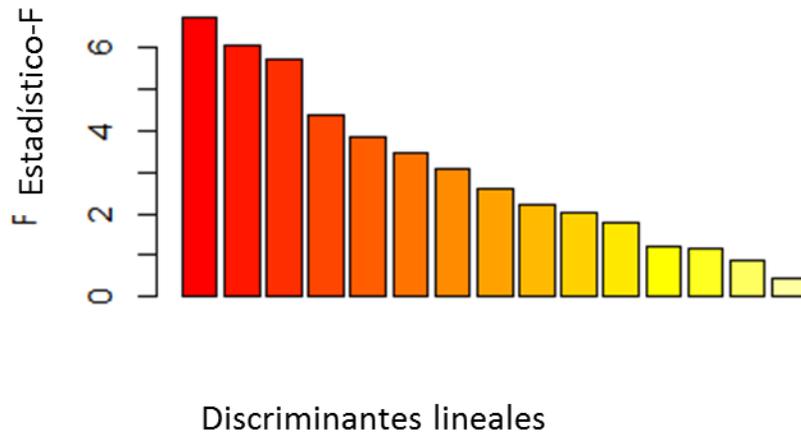


Figura 27. Número de funciones discriminantes guardadas para el análisis de DAPC, se retuvieron 3 discriminantes.

ANEXO 4. Frecuencias alélicas para cada loci en la población usando 6 loci microsatélites.

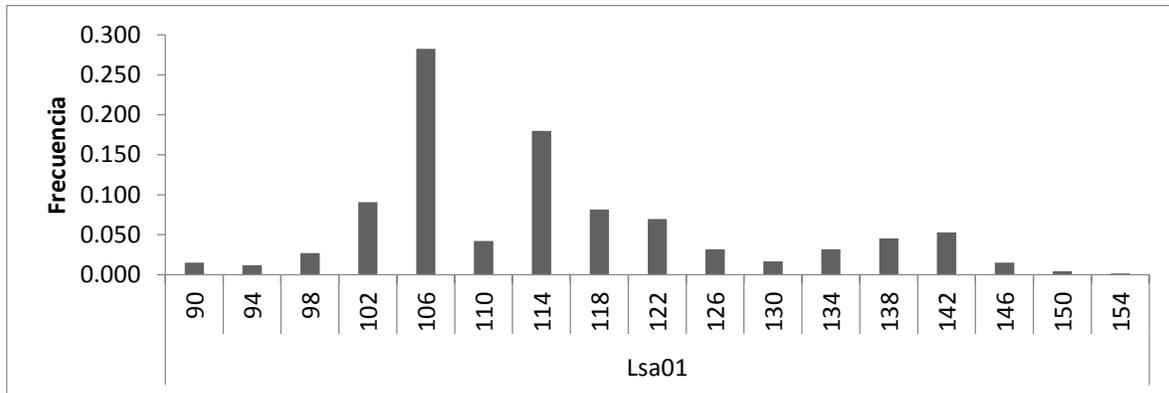


Figura 28. Frecuencias alélicas del locus Lsa01.

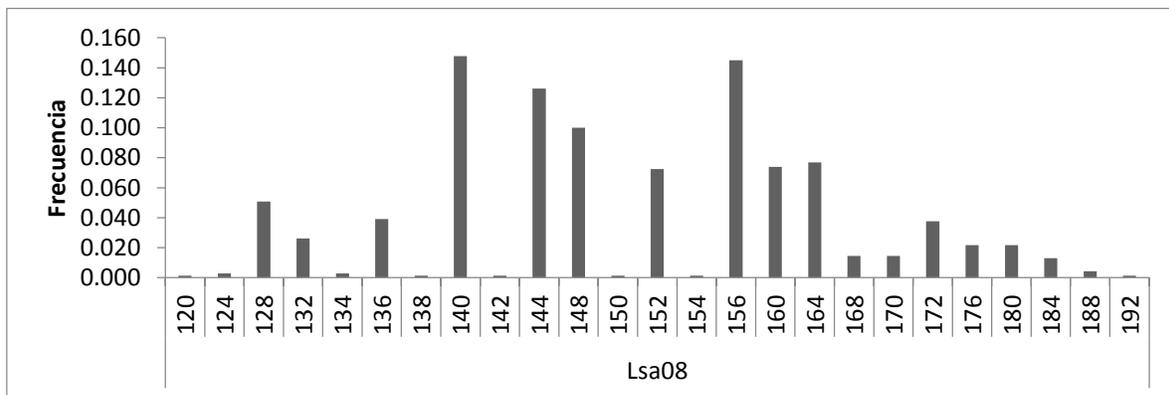


Figura 29. Frecuencias alélicas del locus Lsa08.

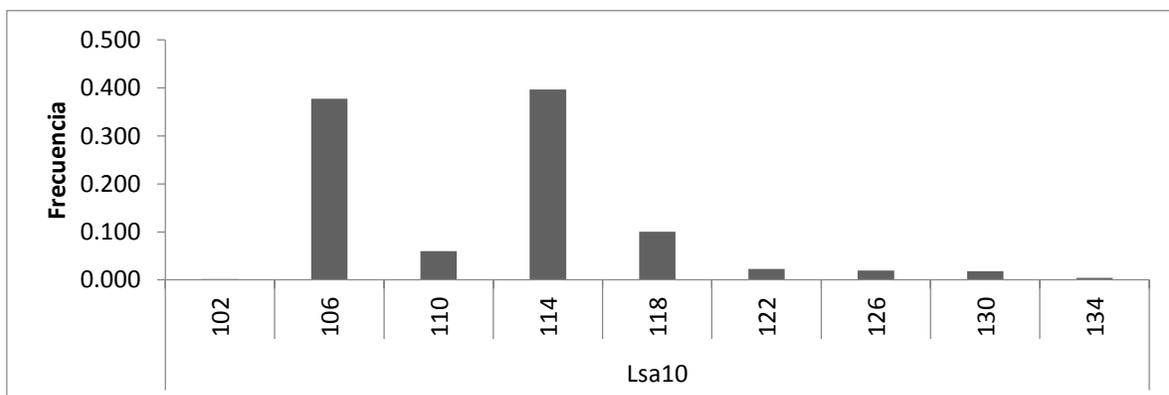


Figura 30. Frecuencias alélicas del locus Lsa10.

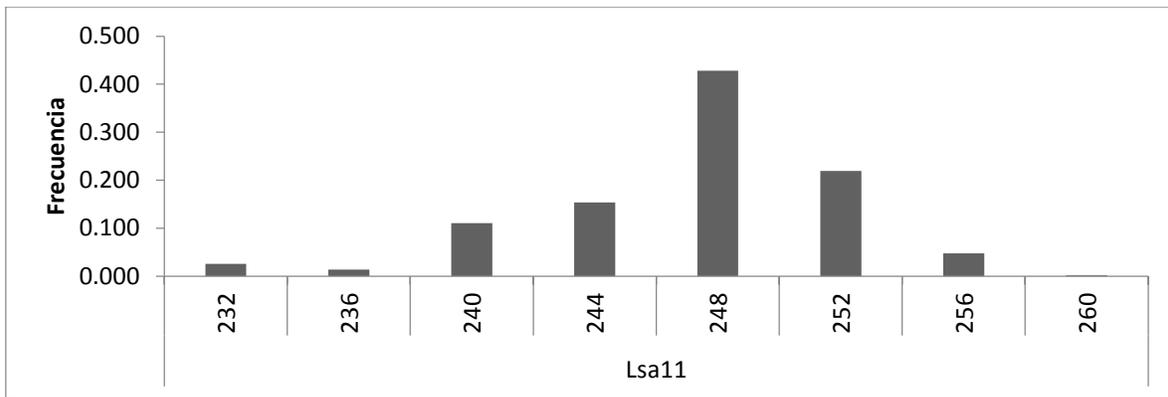


Figura 31. Frecuencias alélicas del locus Lsa11.

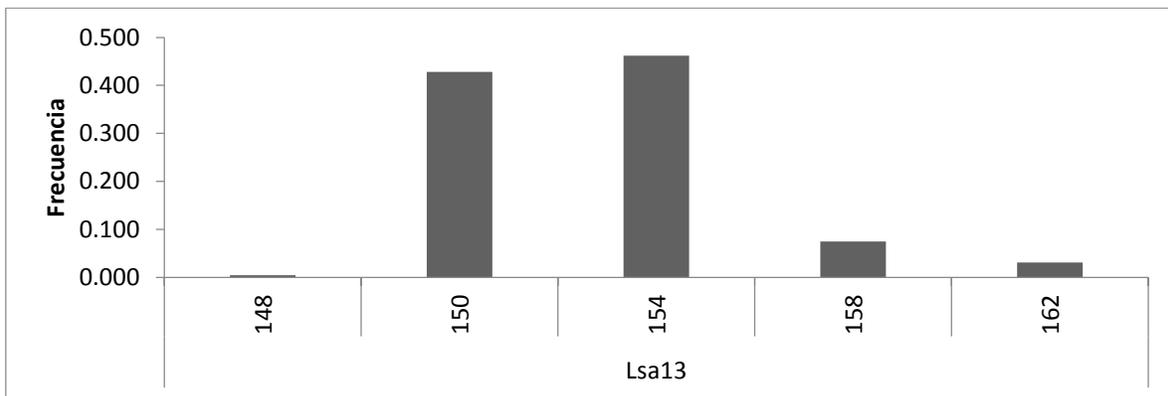


Figura 32. Frecuencias alélicas del locus Lsa13.

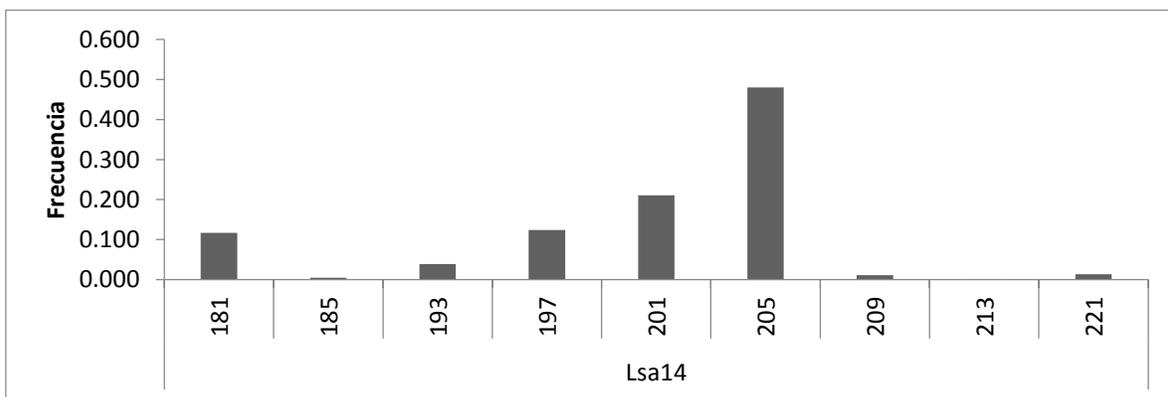


Figura 33. Frecuencias alélicas del locus Lsa14.

ANEXO 5. Resultados de diversidad y estructura genética obtenidos analizando 5 loci microsatélites.

Tabla XIII. Variabilidad genética poblacional estimada mediante 5 loci microsatélites de *Lithodes santolla* (Lsa01, 08, 10, 11 y 13). (*N*) tamaño de muestra, (*A*) número de alelos por locus, (*Ho*) heterocigosidad observada y (*He*) esperada, (*Fis*) índice de endogamia de Weir y Cockerham (*Fis*) y (*FST*) valores de diferenciación genética global por locus. Los programas que se utilizaron fueron ARLEQUIN V V3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010), GENEPOP V 4.0 (Rousset, 2008), FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995).

Locus	N	A	Ho	He	Fis	P (0.01)	FST
Lsa01	331	17.000	0.8369	0.8579	0.025	0.18	0.000
Lsa08	345	25.000	0.9188	0.9068	-0.013	0.80	0.000
Lsa10	334	9.000	0.6407	0.6854	0.065	0.03	0.007
Lsa11	335	8.000	0.7075	0.7294	0.030	0.17	0.004
Lsa13	342	5.000	0.5877	0.5966	0.015	0.39	0.002
Promedio	337.4	13	0.7383	0.7552	0.024	0.05	0.002

Tabla XIV. Valores de *FST* (Weir y Cockerham, 1984) para comparaciones por pares de sitios de muestreo mediante 5 loci microsatélites (Sin Lsa14). Diagonal inferior los valores de *FST* y diagonal superior sus valores de *p* correspondiente ($p \leq 0.0004$ después de la corrección de Bonferroni, 136 pruebas). Los valores fueron obtenidos con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Para las abreviaciones ver Tabla I.

	I.Sal	P.Ca	I.Av	I.OtN	I.OtO	I.Co	I.Wi	P.Prof	I.Za	E.Po	P.Pa	I.RT	SeNe	C.Ma	B.Mu	SeBa
I.Sal		0.025	0.388	0.645	0.793	0.355	0.033	0.802	0.017	0.967	0.050	0.215	0.240	0.099	0.554	0.438
P.Ca	0.021		0.04132	0.0083	0.099	0.694	0.223	0.149	0.6942	0.025	0.149	0.223	0.496	0.207	0.231	0.405
I.Av	0.000	0.021		0.7603	0.793	0.562	0.099	0.380	0.2645	0.628	0.364	0.149	0.264	0.570	0.273	0.331
I.OtN	0.000	0.016	0.000		0.884	0.636	0.256	0.736	0.2893	0.793	0.033	0.430	0.463	0.810	0.934	0.322
I.OtO	0.000	0.015	0.000	0.000		0.579	0.182	0.926	0.5620	0.959	0.281	0.793	0.248	0.661	0.826	0.769
I.Co	0.007	0.000	0.000	0.000	0.000		0.777	0.256	0.4050	0.223	0.810	0.430	0.893	0.612	0.289	0.545
I.Wi	0.025	0.008	0.014	0.006	0.009	0.000		0.273	0.9504	0.264	0.256	0.835	0.711	0.669	0.306	0.091
P.Prof	0.000	0.025	0.004	0.000	0.000	0.030	0.010		0.4628	0.893	0.050	0.512	0.223	0.479	0.612	0.174
I.Za	0.012	0.000	0.004	0.002	0.000	0.000	0.000	0.001		0.298	0.306	0.950	0.438	0.983	0.702	0.198
E.Po	0.000	0.018	0.000	0.000	0.000	0.009	0.004	0.000	0.000		0.248	0.372	0.165	0.562	0.893	0.306
P.Pa	0.014	0.010	0.003	0.014	0.006	0.000	0.008	0.038	0.001	0.005		0.273	0.331	0.190	0.149	0.347
I.RT	0.005	0.003	0.007	0.000	0.000	0.001	0.000	0.000	0.000	0.001	0.004		0.512	0.645	0.760	0.223
SeNe	0.009	0.001	0.005	0.001	0.002	0.000	0.000	0.016	0.000	0.010	0.004	0.000		0.554	0.397	0.397
C.Ma	0.007	0.006	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.007	0.000	0.000		0.992	0.289
B.Mu	0.000	0.005	0.003	0.000	0.000	0.005	0.001	0.000	0.000	0.000	0.008	0.000	0.000	0.000		0.636
SeBa	0.003	0.002	0.003	0.001	0.000	0.000	0.018	0.021	0.006	0.000	0.003	0.004	0.001	0.005	0.000	

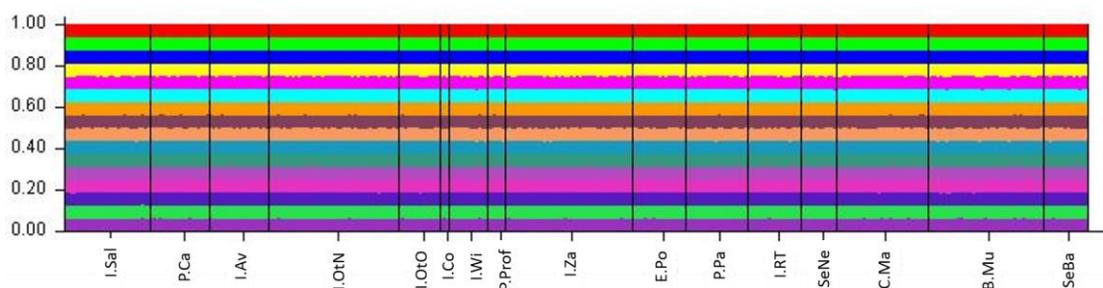


Figura 34. Coeficientes de membresía para los 16 sitios de muestreo de *L. santolla* utilizando 5 loci microsatélites. Cada una de las líneas verticales representa el genotipo multilocus determinado por las frecuencias alélicas para cada individuo y cada color corresponde a la proporción de probabilidad de pertenencia de cada grupo. El eje horizontal corresponde a los 16 sitios de muestreo. Para las abreviaciones ver Tabla I.

ANEXO 6. Resultados de diversidad genética obtenidos analizando 6 loci microsatélites y los sitios de muestreo con $n > 20$ (8 localidades).

Tabla XV. Variabilidad genética poblacional estimada mediante 6 loci microsatélites de *Lithodes santolla* utilizando las localidades con un tamaño de muestra mayor a 20. (*N*) tamaño de muestra, (*A*) número promedio de alelos por locus, (*H_o*) heterocigosidad observada y (*H_e*) esperada con su probabilidad de equilibrio de HW ($p < 0.001$, después de corrección de Bonferroni), (*F_{is}*) índice de endogamia de Weir y Cockerham con su probabilidad, en azul los que resultaron significativos ($p \leq 0.05$) y (*F_{ST}*) valores de diferenciación genética global por locus. Los programas que se utilizaron para las estimaciones fueron ARLEQUIN V 3.5.1.2 (Excoffer y Lischer, 2010), GENEPOP v 4.0 (Rousset, 2008) y FSTAT V2.9.3.2 (Goudet, 1995).

Locus	<i>N</i>	<i>A</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>P</i>	<i>F_{is}</i> (W&C)	<i>P</i>	<i>F_{ST}</i>
Lsa01	233	17	0.84	0.86	0.05901	0.026	0.2624	0.002
Lsa08	246	25	0.92	0.91	0.12703	-0.011	0.2185	0
Lsa10	241	9	0.65	0.69	0.58218	0.057	0.0468	0.008
Lsa11	237	8	0.68	0.73	0.62564	0.077	0.089	0.002
Lsa13	244	5	0.58	0.60	0.20891	0.043	0.3203	0.004
Lsa14	236	9	0.58	0.72	0	0.190	0	0.009
Promedio	239	12	0.71	0.75		0.064		0.002

Tabla XVI. Valores de F_{ST} (Weir y Cockerham, 1984) para comparaciones por pares de sitios de muestreo utilizando 6 loci microsatélites y 8 localidades $n > 20$. Diagonal inferior los valores de F_{ST} y diagonal superior sus valores de p correspondiente ($p \leq 0.001$ después de la corrección de Bonferroni, 36 pruebas). Los valores fueron obtenidos con el programa ARLEQUIN V3.5.1.2 (Excoffier y Lischer, 2010). Para las abreviaciones ver Tabla I.

	I.Sal	P.Ca	I.Av	I.OtN	I.Za	P.Pa	C.Ma	B.Mu
		0.040	0.80	0.81	0.02	0.03	0.21	0.59
I.Sal	0.026		0.04	0.01	0.37	0.16	0.26	0.11
I.Av	0.000	0.021		0.71	0.11	0.39	0.48	0.21
I.OtN	0.000	0.018	0.000		0.04	0.04	0.62	0.9
I.Za	0.014	0.001	0.009	0.009		0.28	0.67	0.67
P.Pa	0.019	0.014	0.000	0.016	0.005		0.2	0.09
C.Ma	0.005	0.005	0.000	0.000	0.000	0.007		0.98
B.Mu	0.000	0.010	0.003	0.000	0.000	0.011	0.000	