



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

ESCUELA DE BIOLOGÍA MARINA

PROFESOR PATROCINANTE:

DRA. MARIE-LAURE GUILLEMIN

**INSTITUTO DE ECOLOGÍA Y
EVOLUCIÓN**

PROFESOR CO-PATROCINANTE:

DR. SYLVAIN FAUGERON

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE CHILE**

**“FILOGEOGRAFIA DEL ALGA ROJA *MAZZAELLA*
LAMINARIOIDES (BORY) FREDERICQ EN CHILE”.**

Tesis de Grado presentada como
parte de los requisitos para optar al
título de Biólogo Marino

ALEJANDRO ENRIQUE MONTECINOS VILLARROEL

VALDIVIA-CHILE

2011

AGRADECIMIENTOS:

Primero que todo, quiero agradecer infinitamente a mi familia, en especial a mis amados padres (Juan y Sonia), por todo su apoyo para completar mis estudios. En segundo lugar, quiero agradecer a mi tutora la Dra. Marie-Laure Guillemin, sinceramente muchas gracias profe, por su tiempo y en especial por ayudarme a crecer en mi madurez tanto personal como profesional. Tercero, muchas gracias a mi novia Kathy, por el apoyo incondicional y las palabras de ánimo cuando las cosas no salen como se esperan. Y por último, muchas gracias a mis compañeros y a todas las personas que hicieron posible la realización de esta Tesis.

Esta tesis va dedicada a todas las personas que yo amo y estimo...

ÍNDICE

RESUMEN	2
ABSTRACT	3
INTRODUCCIÓN	4
Filogeografía en Chile	8
Modelo de estudio	12
HIPÓTESIS DE TRABAJO	16
OBJETIVOS GENERAL	17
MATERIAL Y MÉTODOS	18
Muestreo	18
Extracción ADN, PCR, Secuenciación	19
Análisis de datos moleculares	21
RESULTADOS	25
<i>Mazzaella laminarioides</i> , un complejo de especies crípticas	25
Distribución geográfica de los polimorfismos	29
Demografía Histórica	33
Datación de los eventos de divergencia entre linajes y de expansión poblacional	35
DISCUSIÓN	36
<i>M. laminarioides</i> , un potencial complejo de tres especies crípticas	36
Zonas de transición	39
Demografía Histórica	42
BIBLIOGRAFÍA	44

RESUMEN

La Filogeografía ha sido usada para detectar patrones genéticos producidos por la contracción y expansión de las poblaciones durante el UMG, y para probar la congruencia entre quiebres genéticos y barreras biogeográficas. En América del Sur se han realizado pocos estudios y el efecto del UMG o barreras biogeográficas sobre las especies son todavía poco conocidos. La costa de Chile presenta un escenario interesante, en donde la costa Sur del continente fue afectada por glaciaciones durante el UMG y dos barreras biogeográficas claras ya han sido descritas: la primera entre los 30°S-33°S y la segunda entre los 40°S-42°S. En este estudio, se pretende analizar la presencia de quiebres genéticos en *M. laminarioides*, un alga roja que habita en parches en el nivel supra-litoral de la costa rocosa. El rango de distribución de esta especie, abarca una gran parte del territorio chileno, desde Punta Arenas (54°S) en el Sur, hasta la Isla de Chañaral (29°S) en el Norte. Para esto tomamos muestras de 13 poblaciones, las que representan todo el rango de distribución de esta especie. En las reconstrucciones filogenéticas se utilizaron dos marcadores (COI; mitocondrial y *rbcl*; cloroplasto), mientras que los marcadores COI e ITS1 fueron utilizados para caracterizar la diversidad genética a nivel poblacional. La presencia de tres linajes monofiléticos, genéticamente muy diferentes y separados a nivel geográfico (Norte, Centro y Sur), sugieren la existencia de un complejo de tres especies cripticas dentro de *M. laminarioides*. Se estimó mediante relojes moleculares un tiempo de divergencia de alrededor de 3 millones de años, entre los linajes más recientes (Centro y Sur). El marcador COI muestra la presencia de dos claros quiebres genéticos: entre los 32°S-34°S y 37°S-39°S. Un patrón de disminución de la diversidad genética en el extremo Sur de la distribución de esta especie, se evidenció en ITS1 y COI, posiblemente vinculado con el proceso de recolonización de la parte Sur de la costa después del UMG.

ABSTRACT

Phylogeography have been used to detect genetic patterns produced by the contraction and expansion of the populations during the LGM and to test the congruence between genetic breaks and biogeographic barriers. In South America few studies have been conducted, and the effect of the LGM or biogeographic barriers are still poorly understood. The Chilean coast present an interesting scenario with only the Southern coastal part of the continent affected by ice during the LGM and two clear biogeographic barriers already described: the first between 30°S-33°S and the second between 40°S-42°S. In this study we aim to test for the presence of genetic breaks in *M. laminarioides* a rodophyte living in patchy populations at the supra-littoral level of the rocky shore. The distribution range of this species covers a large part of Chilean territory, from Punta Arenas (54°S) in the south to Chañaral Island (29°S) in the North. We sampled 13 populations of *M. laminarioides*, representing the entire range of this species. In phylogenetic reconstructions two markers were used (COI, mitochondrial; *rbcl*, chloroplast) while only the COI and ITS1 were used to characterize the genetic diversity at the population level. The presence of three monophyletic lineages, genetically very different and separated at the geographical level (North, Central and South) was detected suggesting the existence of a complex of three cryptic species within *M. laminarioides*. A divergence time of about 3MY was estimated using molecular clocks between the two more recent lineages (Center and South). The COI marker shows the presence of two clear-cut genetic breaks: at 32°S-34°S and 37°S-39°S. A pattern of decreasing genetic diversity at the southern end of the range of this species was demonstrated in ITS1 and COI, possibly linked to the recolonization process of the Southern part of the coast after the LGM.

INTRODUCCIÓN.

Eventos históricos del pasado como períodos glaciares, así como también fenómenos actuales, son capaces de influenciar la distribución geográfica de muchas especies. Estas expansiones y contracciones del rango de distribución de las especies a lo largo de sus historias evolutivas, dejan una huella en la diversidad genética de las poblaciones, la que permanece por muchas generaciones. Esta firma genética puede ser evidenciada mediante el uso de la Filogeografía. Esta disciplina es definida como la rama de la biogeografía que trata de los principios y procesos que rigen las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos o filogenéticos, especialmente dentro y entre especies cercanamente relacionadas (Avise et al. 1987, Avise 1998). La Filogeografía basa sus interpretaciones sobre las predicciones de la teoría de la coalescencia, permitiendo inferir procesos pasados a partir del análisis del patrón actual de diversidad genética (Avise 1998). La Filogeografía también es usada para probar la congruencia entre patrones de límites geográficos, tales como zonas de transición biogeográficas y discontinuidades genéticas, para las especies cuya distribución atraviesa dichas zonas de transición (Avise 2000). Avise planteó las bases de esta disciplina integrativa en 1998 y la definió como la intersección entre la macro y la microevolución. La Filogeografía surgió con el desarrollo de la biología molecular, basándose en estudios de variación genética realizados con marcadores moleculares como isoenzimas, RAPD, RFLPs y secuencias de ADN.

En los estudios filogeográficos, los marcadores mitocondriales (ej.: COI, D-Loop, ARNr 16S, Cox2-3, etc.) han sido los más usados, principalmente debido a las particularidades del genoma mitocondrial: ausencia de recombinación y alta tasa de mutación (Wilson et al. 1985, Avise 2009). Sin embargo, debido a que su herencia es generalmente materna posee desventajas, ya que las reconstrucciones de la historia poblacional de algunas especies pueden estar incompletas, principalmente para aquellas en que machos y hembras presentan patrones de dispersión diferentes (Freeland 2005). Para el caso particular de las plantas, también son usados los marcadores del cloroplasto (ADNcp), debido a

que generalmente son de herencia uni-parental y poseen una relativa alta tasa de mutación (3 a 4 veces mayor que el ADNmt de plantas, pero menor que el ADNmt de animales) (Avice 2009). Por otra parte, los marcadores nucleares han sido usados en mucha menor medida en plantas y animales, principalmente debido a lo difícil de aislar haplotipos nucleares a partir de genomas diploides y al fenómeno de recombinación intra-génica (Avice 2009). Los estudios filogeográficos hoy en día, están dirigidos a integrar análisis de más de un tipo de marcador molecular para una misma especie, para llegar a la mejor aproximación de los procesos que originaron la actual distribución genética de las especies.

La Filogeografía en sólo 20 años, implementó una nueva aproximación al análisis de la historia post-glacial de un amplio rango de taxas; como por ejemplo: algas (Hoarau et al. 2007, Provan et al. 2005), moluscos (Dahlgreen et al. 2000, Wares & Cunningham 2001), plantas (Dumolinn-Lapeguè et al. 1997, Konnert & Bergman 1995, Soltis et al. 1997), y mamíferos (Dalén et al. 2007, Taberlet & Bouvet 1994), entre otros. Esto se debe a que la combinación del uso de marcadores moleculares con la reconstrucción de las condiciones paleoclimáticas, ha sido capaz de proporcionar nueva información sobre la evolución de las especies a través de las oscilaciones climáticas (Hewitt 2004). Además, la integración de análisis filogeográficos para varias especies mediante la Filogeografía comparada, ha sido usada para revelar refugios glaciares y rutas de colonización postglacial en Europa y Norte América (Bermingham & Moritz 1998, Taberlet et al. 1998, Wares & Cunningham 2001, Maggs et al. 2008, Marko et al. 2010). Estudios filogeográficos junto con datos biogeográficos y paleontológicos, han revelado que los eventos históricos que influenciaron mayormente la actual distribución de muchas especies son los cambios climáticos ocurridos durante los períodos glaciares Cuaternarios, principalmente durante el período más reciente denominado Último Máximo Glacial (UMG 23000 - 18000 años) (Hewitt 2003, 2004). El UMG se caracterizó por un descenso mundial de las temperaturas que originó grandes placas de hielo en zonas cercanas a los polos. En el período de expansión del hielo, las especies de zonas templadas estuvieron sometidas a una

contracción en sus áreas de distribución, caracterizadas por cuellos de botella y extinciones locales (Hewitt 2000). Incluso para una especie con un alto potencial de migración como el zorro ártico *Alopex lagopus*, se demostró que los cambios climáticos provocaron extinciones en varias regiones de Europa del Norte (Dalén et al. 2007). El UMG obligó a muchas especies templadas a limitar su distribución en zonas refugios de bajas latitudes (Bennett et al. 1991, Taberlet et al. 1998, Williams et al. 1998), los que se caracterizaban por ser zonas con temperaturas menos extremas. Luego en los períodos de deshielo, las especies comenzaron procesos de recolonización hacia nuevas zonas (Taberlet et al. 1998). Este modelo de contracción-expansión, es un paradigma simple para la demografía de las especies a través de los ciclos glaciares. Los cambios demográficos implicados tienen efectos sin dudas en la variación genética de las especies, pero la magnitud de estos efectos dependerá a su vez de los rasgos de historia de vida propios de cada especie (Hewitt 2000). Así este modelo da lugar a dos predicciones fundamentales sobre niveles y patrones de diversidad genética, en zonas de potenciales refugios y sobre zonas que han sido posteriormente recolonizadas desde estos refugios:

- I) Para las poblaciones de organismos que persistieron durante el UMG en zonas denominadas refugios glaciares, es esperado que posean generalmente una historia demográfica más estable, con un tamaño poblacional suficiente para no presentar los clásicos efectos de cuello de botella. Por esta razón, se planteó que los refugios deberían tener altos niveles de diversidad genética (Taberlet et al. 1998, Comes & Kadereit 1998). Al contrario, las poblaciones ubicadas en zonas recientemente recolonizadas estarían por lo general compuestas de subconjuntos de la diversidad genética presente en las poblaciones de origen (en los refugios). Este proceso de recolonización puede llevar a la pérdida de alelos (Hewitt 1993), siendo las nuevas poblaciones el resultado de sucesivos efectos fundadores y cuellos de botella (Provan & Bennett 2008).

- II) Segundo, el aislamiento geográfico de poblaciones refugios separadas por cientos de kilómetros durante los períodos glaciares, puede originar una alta diferenciación genética entre refugios y se espera un alto nivel de estructuración genética entre los refugios.

Estas dos predicciones han sido comprobadas para varias especies en Europa (Taberlet et al. 1998, Hewitt 1999). De hecho el patrón de diversidad genética de especies templadas en Europa, se describe en la literatura como una “riqueza del Sur” y una “pureza del Norte” (Hewitt 1999). Aunque las firmas genéticas de refugios glaciares y rutas de recolonización son a menudo fáciles de deducir desde algunos escenarios filogeográficos, otros factores pueden complejizar este escenario (Provan & Bennett 2008). Por ejemplo, el contacto entre linajes genéticos provenientes de refugios separados puede originar zonas de vicarianza de alta diversidad genética, que pueden llevar a la confusión con áreas refugios (Petit et al. 2003). Para evitar interpretaciones erróneas y determinar potenciales refugios glaciares y rutas de recolonización, es necesario combinar datos filogeográficos junto a información paleontológica (Bernatchez & Wilson 1998, Taberlet et al. 1998). Para los organismos marinos que dejan un escaso o simplemente no dejan registro fósil (Provan & Bennett 2008), la Filogeografía ha sido la única manera de estudiar sus historias evolutivas post-glaciales (algas: Hoarau et al. 2007, Maggs et al. 2008, Provan et al. 2005; invertebrados marinos: Dahlgreen et al. 2000, Wares & Cunningham 2001).

La Filogeografía, además ha surgido como una herramienta de gran utilidad al ampliar el entendimiento del efecto que tienen las barreras biogeográficas sobre las especies. Las barreras biogeográficas son definidas como áreas en donde muchas especies encuentran sus límites de distribución y por lo tanto se observan cambios importantes en la flora y la fauna en una zona restringida (Briggs 1995, Cox & Moore 2000). La posición geográfica de las zonas de transición depende tanto de eventos históricos como geológicos (periodos glaciares/interglaciares, eventos tectónicos). En el ambiente marino existen zonas

de transición biogeográficas que afectan a las especies en la actualidad, como las barreras asociadas a condiciones oceanográficas (ej.: Point Conception en California, Burton 1998). Las barreras biogeográficas pueden actuar como filtros para muchas especies dependiendo de su habilidad de dispersión (Bohonak 1999, Palumbi 1994, Jolly et al. 2005). De hecho, concordancias entre quiebres filogeográficos y zonas de transición biogeográficas, han sido evidenciados para diferentes taxas (ej.: *Crassostrea Virginica*, Reeb & Avise 1990; *Lessonia nigrescens*, Tellier et al. 2009; *Pectinaria korenni*, Jolly et al. 2005). Por esto, la identificación y el entendimiento de estas barreras a la dispersión es un paso crítico para entender los patrones de estructuración geográficos de las especies (Avise 2000, Wiens 2004).

Filogeografía en Chile.

Para la costa Chilena, los procesos históricos que influyen la distribución geográfica de las especies son poco comprendidos. Esto se debe principalmente a que los estudios se han enfocado en describir la distribución de las especies, pero no en los mecanismos que han originado este patrón (revisado por Camus 2001). La costa Chilena continental (18°S-56°S), comprende una gran extensión geográfica (4200 km. aprox.) y está ubicada en el Pacífico Sur Este (PSE). La costa Chilena posee características particulares (Figura 1), por lo que ha sido posible clasificarla en tres provincias biogeográficas (Figura 2A) (Camus 2001). Éstas son: (1) la provincia Peruana (PP) desde Perú hasta los 30°S, la cual incluye biota de ambientes cálidos; (2) Provincia Magallánica (PM) desde los 40°S-42°S hasta los 56°S, la que posee una biota relacionada a ambientes australes (3) el Área Intermedia (AI) desde los 30°S hasta los 40°S-42°S, que incluye biotas con características de una mezcla de ambas regiones mencionadas anteriormente. Esta clasificación se basa en características de la flora y la fauna, así como también de las condiciones ambientales (T°, morfología de la costa, Corrientes, etc.). Estas tres zonas están separadas por dos zonas de transición biogeográficas:

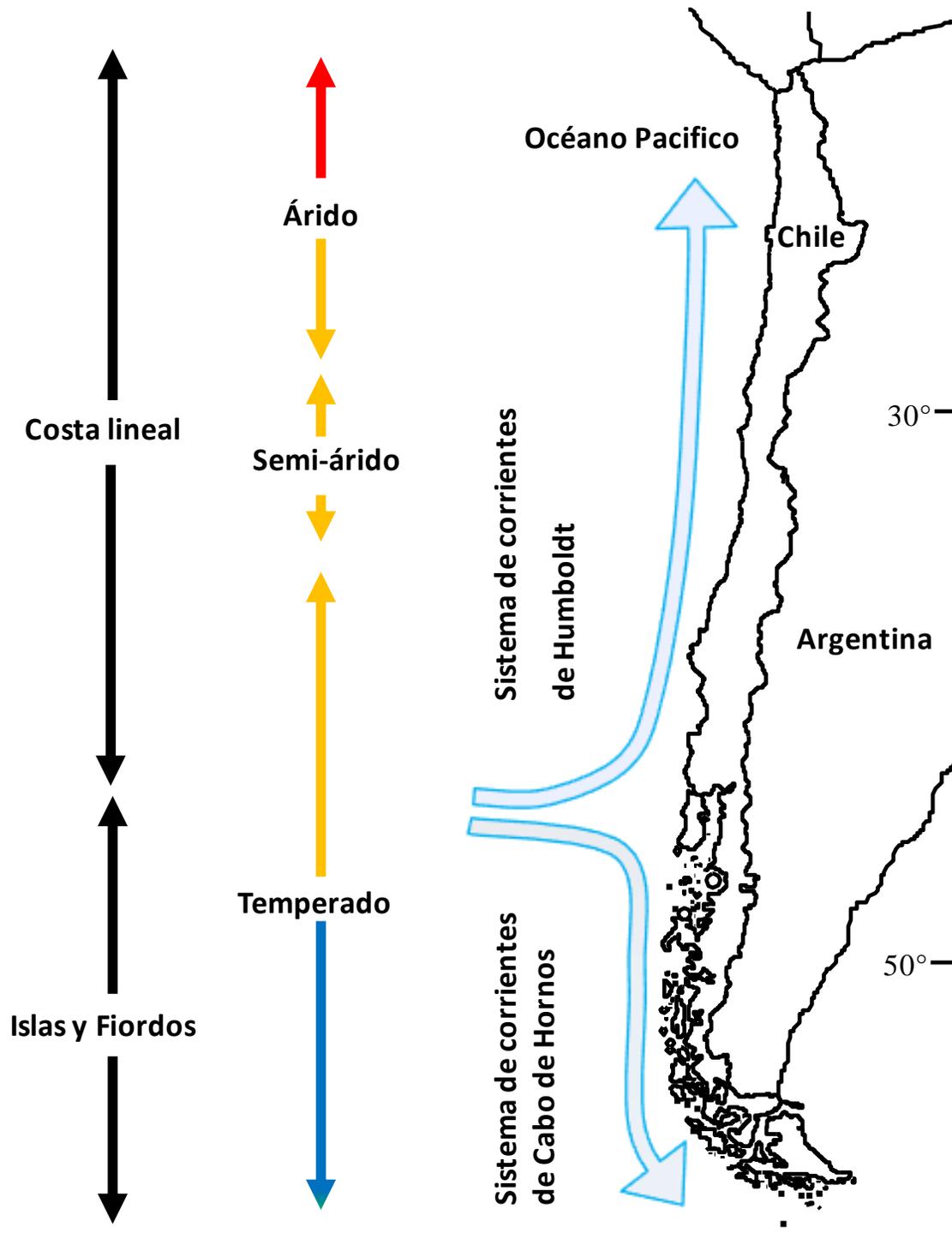


Figura 1. Características Morfológicas, Climáticas e Hidrográficas de la costa Chilena.

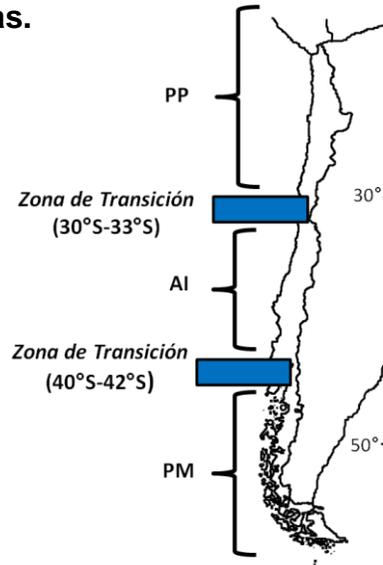
- I) La primera zona de transición, ha sido descrita alrededor de los 30°S-32°S y se correlaciona con un gradiente en la temperatura (Broitman et al. 2001), una peculiar circulación del agua (Hormazabal et al. 2004) y un abrupto estrechamiento de la plataforma continental (Strub et al. 1998). Para esta zona de transición se ha encontrado un notorio quiebre filogeográfico para la macroalga *Lessonia nigrescens* (Tellier et al. 2009), también se registró un marcado quiebre en frecuencias de haplotipos para el cirripedio *Notochthamalus scabrosus* (Zakas et al. 2009).

- II) La segunda zona de transición, ha sido descrita alrededor de los 42°S y ha sido reconocida como un gran quiebre geográfico. En esta zona, ocurre la separación de la corriente de deriva del Oeste en la Corriente de Humboldt y la Corriente de Cabo de Hornos. Esta separación origina el límite norte de la Provincia Magallánica, contribuyendo al aislamiento relativo de la flora y la fauna de los fiordos de la Patagonia (Castilla et al. 1993).

Además, el extremo sur de la costa Chilena fue afectado por eventos geológicos y climáticos durante el Cuaternario, siendo el más importante el UMG (Figura 2B). Durante el UMG (+/- 19.000/23.000 años atrás), una capa de hielo cubrió una extensión aproximadamente desde los 38°S hasta los 56°S (Hulton et al. 2002). Durante este período, muchas de las especies que habitaban en la zona Centro-Sur y Sur debieron restringir su distribución a refugios glaciares: uno al norte de la Isla grande de Chiloé (43°S) y otro en el extremo Sur-Oeste de Tierra del Fuego y del archipiélago de Cabo de Hornos (cerca de los 56°, Hulton et al. 2002). Una vez finalizado el UMG hace unos 15.500-17.150 años atrás, comenzó el periodo de deshielo (McCulloch et al. 2000), ocurriendo con esto una expansión de las especies hacia zonas de las costas Chilenas anteriormente cubiertas por hielo. Aunque estudios recientes, han demostrado que varias especies de agua dulce sobrevivieron en refugios acuáticos en esta región a pesar de los hielos,

haciendo más complejo el patrón general de expansión-colonización (Ruzzante et al. 2009, Xu et al. 2009, Vianna et al. 2011).

A) Barreras Biogeográficas.



B) Glaciaciones durante el UMG.

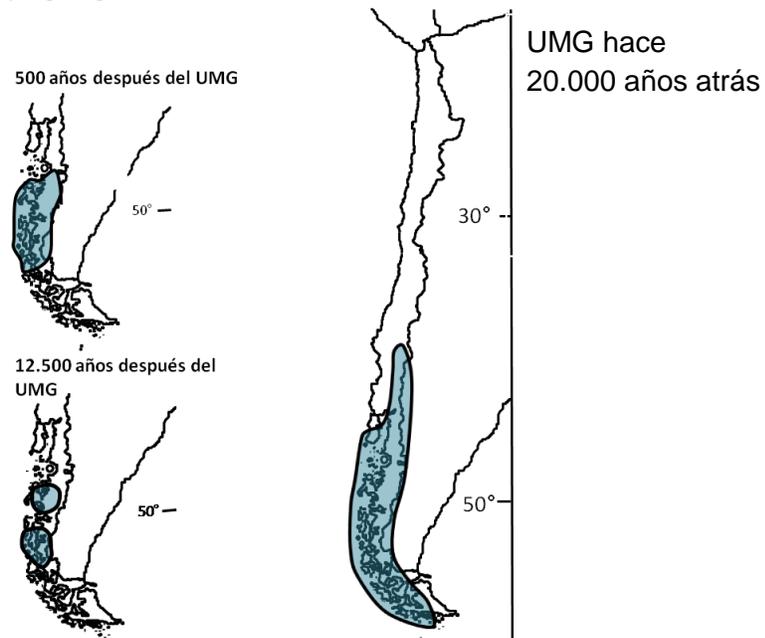


Figura 2. A) Localización de las tres regiones biogeográficas y de las dos zonas de transición, delimitadas según Camus (2001); PP: Provincia Peruana; AI: Área Intermedia; PM: Provincia Magallánica. **B)** Evolución de la capa de hielo después el Último Máximo Glacial en la costa Chilena según Hulton et al. (2002).

Modelo de estudio.

Mazzaella laminarioides (Bory) Fredericq (antiguamente *Iridea laminarioides* Bory, Hommersand et al. 1993), es una especie de macroalga roja de la familia de la Gigartinaceae (orden Gigartinales, clase de las Florideophyceae). Esta alga es de importancia tanto ecológica como económica, para las zonas centro-sur y sur de Chile. *M. laminarioides* ha sufrido continuos replanteamientos taxonómicos principalmente cambios de género (por ejemplo ver Hughey et. al 2001). Esta especie se restringe a playas rocosas y se ubica extensamente en el intermareal medio y bajo (Santelices 1991). *M. laminarioides* se encuentra esencialmente en dos tipos de sustratos rocosos: rocoso granítico en el norte y rocoso metamórfico en la zona centro y sur (Santelices 1991). Su hábitat está expuesto al oleaje en marea alta y a la desecación en períodos de marea baja. Las poblaciones forman largas extensiones y están separados por largas playas de arena y estuarios a lo largo de la costa de Chile. Su distribución geográfica se extiende a lo largo de la costa Chilena aproximadamente desde los 30°S hasta los 56°S (Figura 3). También ha sido reportada al sur de Argentina en las islas Falkland (Hommersand et al 1993, Hoffmann & Santelices 1997) y en unas pocas islas subantárticas, como Isla Crozet y Kerguelen (Santelices 1989).

M. laminarioides es una de las especies cosechadas más importantes del grupo de las Rodophyta en Chile y se obtiene principalmente para la extracción de carragenanos (Buschmann et al. 2001). *M. laminarioides* es consumida por herbívoros, en particular las fisurellas quienes en gran parte son responsables de su límite de distribución bajo en la zona intermareal (Moreno & Jaramillo 1983). También Jara & Moreno 1984, concluyen que la lapa *S. lessoni* consume *Mazzaella* y tiene efectos negativos sobre su abundancia.



Figura 3. Distribución geográfica de *M. laminarioides* a lo largo de la costa Chilena.

M. laminarioides posee un ciclo de vida característico de las algas rojas de la clase de las Florideophyceae (Figura 4). Los individuos haploides (gametofitos) son dioicos. Los gametos son producidos por mitosis en el talo de los gametofitos machos y hembras. La fecundación ocurre en el talo femenino y el proceso de cariogamia es seguido de procesos citológicos complejos, los que conducen a la formación de un cuerpo microscópico: el cistocarpo. El cistocarpo produce por mitosis sucesivas, millares de esporas diploides (carposporas). Las carposporas liberadas se fijan y se desarrollan en un individuo diploide (tétraesporofito), morfológicamente idéntico a los individuos haploides. La meiosis se produce en el

talo diploide desde estructuras llamadas tetraesporangios. Las esporas haploides (tetrasporas) son liberadas para su posterior fijación y formación de un gametofito masculino o femenino. Los tres tipos de individuos coexisten en las poblaciones (hembra, macho y tetrasporofito).

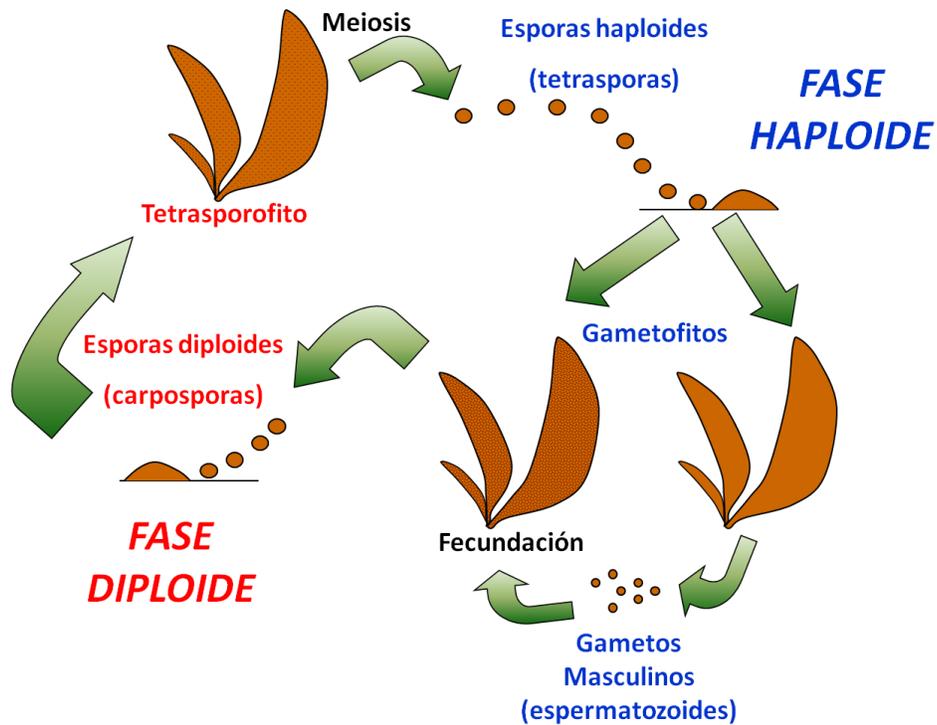


Figura 4. Ciclo reproductivo haploide-diploide isomórfico de *M. laminarioides*.

Para *M. laminarioides* como muchas algas con ciclos de vida complejos, existen tres elementos de dispersión: las esporas haploides (tetrasporas), los gametos masculinos (espermatozoides) y las esporas diploides (carposporas). Cabe destacar que ninguno de estos propágulos posee flagelo, ni ninguna otra estructura especializada para el movimiento. La velocidad de sedimentación de las esporas de *M. laminarioides* es muy rápida y aproximadamente el 50% de las esporas que están en suspensión en la columna de agua sedimentan después de un periodo de 15 minutos (Hoffman & Camus 1989). La dispersión de esporas también puede ser modulada por ciertos herbívoros. Los micro-herbívoros, en

particular anfípodos, ayudan a la liberación de esporas al abrir los cistocarpos maduros con el fin de consumir las esporas (Buschmann & Santelices 1987, Vergara et al. 1990). Erizos de mar (Santelices et al. 1983) y gastrópodos (*Fisurella* y *Siphonaria*) podrían desplazar a cortas distancias las esporas, ya que resisten el paso a través del tracto digestivo (Santelices & Ugarte 1987). Estas características hacen pensar que la capacidad de dispersión de esporas es reducida en *M. laminarioides*. Además, un estudio hecho por Faugeron et al. (2001) usando RAPD's, soporta la limitada capacidad de dispersión en esta especie, ya que un análisis de la varianza molecular entre poblaciones separadas por distancias menores de 30 metros mostró una estructuración genética (aunque baja y solo marginalmente significativa). Por otra parte, poblaciones separadas por distancias entre 5-60kms, mostraron una fuerte estructuración genética entre poblaciones (Faugeron et al. 2001).

M. laminarioides es un excelente modelo para realizar un estudio filogeográfico. Su distribución cubre áreas con historias climáticas distintas (posibles refugios glaciares durante el UMG como zonas recientemente recolonizadas) y atraviesa la barrera biogeográfica de los 42°S. Además, un estudio previo ha demostrado limitado flujo génico entre poblaciones separadas por unos kilómetros de distancia en la zona central (Faugeron et al. 2001). El restringido flujo génico de *M. laminarioides*, hace potencialmente fácil seguir las señales genéticas de los procesos de recolonización originadas por el UMG desde los posibles refugios glaciares y también rastrear los procesos pasados de aislamiento entre poblaciones, los que han dado origen a las actuales transiciones biogeográficas observadas en Chile, ya que estos procesos y sus efectos genéticos tienen menos probabilidad de ser borrados por el actual flujo génico.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

HIPÓTESIS GENERAL:

Mazzaella laminarioides presenta una fuerte estructuración genética a lo largo de la costa de Chile, debido al impacto de eventos pasados y fenómenos actuales sobre la dinámica de sus poblaciones.

HIPÓTESIS SECUNDARIAS:

- 1- La transición biogeográfica ubicada a los 40°S-42°S aísla las poblaciones de *M. laminarioides* de la zona intermedia y de la provincia magallánica.
- 2- En cada zona (la zona intermedia y provincia magallánica) existe un aislamiento por distancia entre poblaciones de *M. laminarioides* debido a la limitada capacidad de dispersión de esta especie.
- 3- Al sur de los 43°S, las poblaciones de *M. laminarioides* han sido afectadas por las glaciaciones y recientemente re-colonizadas desde el(los) refugio(s) glaciario(s).
- 4- Existieron al menos dos refugios glaciares durante el UMG: (1) al norte de los 43° en el norte de la Isla grande de Chiloé y (2) alrededor de los 56°, en Punta Arenas.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar la variabilidad genética poblacional actual del alga roja *Mazzaella laminarioides* a lo largo de su distribución en la costa chilena y relacionarla con eventos históricos y actuales que afectan su dinámica poblacional.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- 1- Encontrar al menos, un marcador molecular adecuado que evidencie la variabilidad genética existente dentro y entre poblaciones.
- 2- Inferir la historia evolutiva de *Mazzaella laminarioides*, después del periodo del UMG, usando la actual variabilidad genética.
- 3- Verificar la existencia de un refugio sur, cercano al Cabo de Hornos durante el UMG.
- 4- Caracterizar los efectos de las barreras biogeográficas sobre la estructuración genética de esta especie.

MATERIAL Y MÉTODOS

A- Muestreo.

Para caracterizar la diversidad genética de *M. laminarioides* se muestrearon 13 localidades, las que representan prácticamente todo el rango de distribución de esta especie (Tabla 1, Figura 5). En cada localidad se colectó un mínimo de 20 individuos (Tabla 1), exceptuando la localidad de ICL (n=15). Se recolectó un talo por cada individuo y cada talo provenía de discos de fijación distintos. La distancia entre individuos colectados fue de al menos unos centímetros, para así evitar el muestreo de clones. Las muestras fueron secadas con toallas de papel, luego almacenadas en bolsas herméticas con silica gel para deshidratarlas y posteriormente extraer su ADN. El ADN de las poblaciones de MAI, FRJ, TOP, CON, PUC, CHI, PAR fue extraído por S. Faugeron en 2001 - departamento de Ecología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Pontificia Universidad Católica. Las poblaciones de CDA, BHL, ICO, CNC, ICL fueron colectadas en 2009 (Tabla 1).

Tabla 1.- Localidades muestreada, sus códigos, punto GPS, y recolector. Las regiones biogeográficas están delimitadas según Camus (2001). (n) = número total de individuos muestreados por localidad.

Región biogeográfica	Localidad	Código	Colector	Ubicación	n
<i>Provincia Peruana</i>	Ch. de Aceituno	CDA	C. Destombe y V. Oppliger	29°04'04"S 71°29'35"O	20
<i>Área Intermedia</i>	Frai Jorge	FRJ	S. Faugeron	30°40'10"S 71°42'22,7"O	60
	Maitencillo	MAI	S. Faugeron	32°37'24"S 71°38'07,3"O	60
	Topocalma	TOP	S. Faugeron	34°05'41"S 71°58'46,0"O	60
	Constitución	CON	S. Faugeron	35°19'44"S 72°26'06,5"O	60
	Concepción	CNC	C. Destombe y V. Oppliger	36°31'30"S 72°57'40,5"O	20
	Pilolcura	PIL	M-L. Guillemín	39°40'15"S 73°21'13,9"O	40
	Pucatrihue	PUC	S. Faugeron	40°32'46"S 73°43'12,9"O	60
<i>Provincia Magallánica</i>	Chiloé	CHI	S. Faugeron	41°52'04"S 71°01'04,2"O	60
	Bahía Low	BHL	A. Montecinos	43°47'8.00"S 73°52'5,9"O	20
	Isla Concoto	ICO	A. Montecinos	44°11'14"S 73°48'25,7"O	20
	Punta Arenas	PAR	S. Faugeron	53°43'15"S 70°57'57,1"O	60
	Isla Clarence	ICL	S. Faugeron	54° 3'54"S 71°58'10,1"O	15

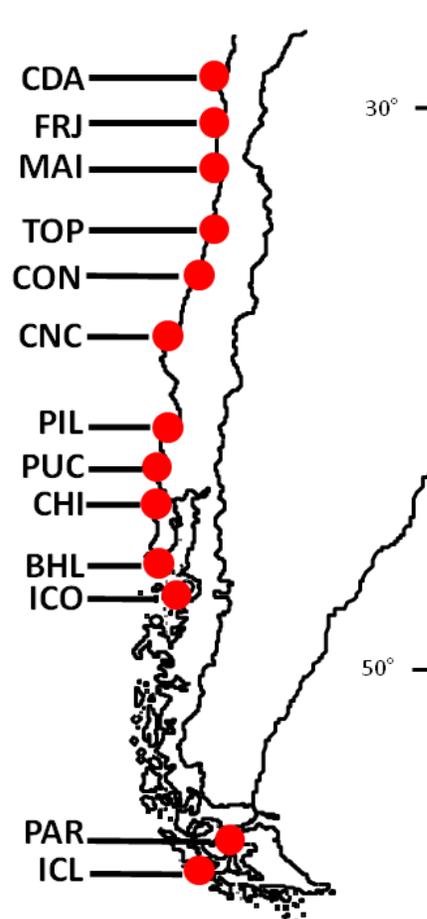


Figura 5. Localidades muestreadas de *M. laminarioides* a lo largo de la costa chilena.

B- Extracción de ADN, PCR y Secuenciación:

1) Extracción de ADN:

Para extraer el ADN de cada individuo muestreado, se molió un promedio de 20 miligramos de tejido seco en nitrógeno líquido. El ADN fue extraído usando el método de Saunders (1993), ligeramente modificado por Faugeron et al. (2001).

2) Amplificación de los marcadores moleculares elegidos:

Los marcadores utilizados fueron: COI (mitocondrial), ITS1 (nuclear) y *rbcL* (cloroplástico). El marcador molecular Citocromo Oxidasa I (COI), es un marcador que ha sido usado ampliamente en estudios filogeográficos (ej.: Wares

& Cunningham 2001; Trontelj et al. 2005, Frasier et al. 2010), así como también para estudios de códigos de barra para determinar límites entre especies (ej.: Hebert et al. 2003, Saunders 2005, Robba et al. 2006). La amplificación de este marcador se realizó utilizando los partidores publicados por Saunders (2005). Debido a problemas de amplificación en las poblaciones de MAI y FRJ, se diseñaron partidores específicos para estas poblaciones (MazN-degeF: GTTTTRGGTGGATGCATGTC; MazN-degeR: TGRTAYAARATTGGRTCTCAAC). Estos partidores fueron diseñados usando el alineamiento de las secuencias del resto de las poblaciones y con dos secuencias de Maitencillo (MAI) (2 productos de PCR secuenciados sobre más de 160 intentos de PCR) que se pudieron obtener usando los partidores ya descritos por Saunders (2005).

El Internal Transcribed Spacer (ITS1), es un marcador intergénico del ADN nuclear utilizado en estudios filogenéticos y filogeográficos de plantas y algas (Coyer et al. 2001, Lane et al. 2006, 2007). La amplificación de este marcador se realizó mediante los partidores publicados por Hughey et al. (2001).

El gen cloroplástico *rbcL*, es un gen que codifica para la sub-unidad mayor de la enzima Rubisco. Este marcador ha sido ampliamente utilizado para realizar análisis filogenéticos, tanto en plantas terrestres como en algas (Gielly & Taberlet 1994, Freshwater 1994, Lin et al. 2001, Zuccarello & Lokhorst 2005, Hommersand et al. 1999). Para amplificar este marcador se usaron los partidores publicados por Hommersand y colaboradores (1994).

Las cantidades de cada reactivo para las reacciones de PCR para los tres marcadores fueron estandarizadas y consistieron para todas en un total de 30 µl: 2 µl de DNA (20-25 ng/µl), 0.1 µl (5 U) de Paq5000TM Polimerasa (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 0.8 µl de una mezcla de los 4 DNTP's (2.5 µM), 3 µl (10x) de Paq5000TM Polimerasa Reaction Buffer (Stratagene, La Jolla, CA, USA), 0.6 µl (100x) de BSA (New England Biolabs, Beverly, MA, USA) y 2 µl de cada partidore (10 µM). Para amplificar el marcador COI (con los partidores de Saunders 2005 y los diseñados en este estudio) y el ITS1, se usó un programa de PCR con los siguientes parámetros: denaturación inicial a 94°C por 5:00 minutos, seguido de 5

ciclos de denaturación a 94°C por 0:30 segundos, alineamiento a 40°C por 0:30 segundos y extensión a 72°C por 0:30 segundos, seguidos de 25 ciclos de denaturación a 94°C por 0:30 segundos, alineamiento de 50°C por 0:30 segundos y extensión a 72°C por 0:30 segundos. Para el marcador *rbcL*, se usó el programa de PCR caracterizado por Fredericq & Lopez-Bautista (2002). Todas las reacción de PCR fueron realizadas usando el termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, USA).

3) Secuenciación:

Los productos de PCR de cada individuo amplificado fueron purificados, utilizando el kit comercial UltraClean™ 15 DNA Purification (MO BIO Laboratories, Carlsbad, CA, USA). La concentración de cada uno de los productos purificados fue verificada en geles de agarosa (concentración al 1%), mediante electroforesis con Bromuro de Etidio y enviados a secuenciar al servicio de secuenciación Macrogen Inc. Seoul, Korea (<http://www.macrogen.com>). Las secuencias obtenidas fueron editadas usando los programas: Chromas v.2.33 (McCarthy 1997), para visualizarlas y Mega v5 (Tamura et al. 2011) para alinearlas. Además, cada sitio variable fue verificado en Chromas v.2.33 de forma visual para minimizar los errores.

C- Análisis de datos moleculares.

1) Diversidad genética:

Para la caracterización de la diversidad genética de las poblaciones de *M. laminarioides* para los marcadores COI e ITS1, se calcularon índices de diversidad genética clásicos, como el número de Haplotipos (h), número de sitios polimórficos (S), diversidad genética (H_e), y la diversidad nucleotídica (π) y el número de haplotipos privados (h_{priv}), usando el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Con el programa Contrib v1.02b (Petit et al. 2008), se calculó usando un

método de rarefacción, el número de haplotipos corregidos de acuerdo al tamaño mínimo de muestra (h_{corr}).

2) Análisis Filogenéticos:

Para los marcadores *rbcl* y COI, se construyeron árboles de máxima verosimilitud con el programa TreeFinder (Jobb et al. 2004). Para cada gen se usó un modelo mixto que toma en cuenta las posiciones de los codones. Los modelos de sustitución para cada codón fueron seleccionados mediante ModelTest, implementado en el programa TreeFinder. El mejor modelo se eligió usando el criterio AIC (Akaike Information Criterion). Para el marcador *rbcl* se usaron los modelos TN para los codones 1 y 2, mientras que para el codón 3 se utilizó el modelo J3+I. Para el marcador COI se utilizaron los modelos J1 para el codón 1, TN para el 2 y HKY para el 3. Los valores de soporte de cada rama fueron calculados usando 1000 bootstrap. Se usó como grupo externo tres especies del género *Mazzaella*. Para el marcador COI, se utilizaron las secuencias publicadas en Saunders (2005): AY970575 *Mazzaella flaccida*, AY970623 *Mazzaella splendens* y AY970577 *Mazzaella affinis*. Para el marcador *rbcl* se utilizaron las secuencias publicadas en Hommersand y colaboradores (1999): U03378 *Mazzaella flaccida*, U03385 *Mazzaella splendens*, AF146214 *Mazzaella membranacea*. Debido al alto número de gaps presente en el set de datos del ITS1, no se reconstruyeron arboles para este marcador.

3) Distancias genéticas:

Para los marcadores COI y *rbcl*, se calcularon las distancias genéticas entre linajes e intra linajes, con el programa Mega5 (Tamura et al. 2011) usando la distancia de Kimura dos parámetros (Kimura 1980).

4) Redes de Haplotipos:

Para analizar los patrones filogeográficos en *M. laminarioides*, se construyeron redes de haplotipos para los marcadores COI e ITS1. Para la construcción de estas redes de haplotipos y con el fin de tomar en cuenta

homoplasias y múltiples reticulaciones que son esperadas al nivel intra-específico, se usó el algoritmo de Median Joining (Bandelt et al., 1999) el cual está implementado en el programa Network v 4.510 (Bandelt et al., 1999).

5) Demografía Histórica:

Para inferir la historia demográfica de las poblaciones de *M. laminarioides*, se realizaron una serie de análisis implementadas en el programa Arlequin v3.5 (Excoffier 2010). Para estimar desviaciones al modelo neutral de Wright-Fisher, se calcularon para cada linaje los índices D de Tajima (Tajima 1989) y F_S de Fu (Fu 1997) y sus grados de significancia mediante 1000 bootstraps. Para estos dos índices, se encuentran valores cercanos a cero en poblaciones que presentan un tamaño constante. Valores negativos indican excesos de haplotipos de baja frecuencia que podrían ser debido a una expansión poblacional o fenómenos de selección positiva y valores positivos se relacionan con una disminución en el tamaño poblacional (cuello de botella) o de selección balanceadora (Tajima 1989, Fu 1997). Para cada linaje también fue realizado un análisis de distribución Mismatch, que corresponde a la distribución de las frecuencias observadas, del número de diferencias mutacionales entre pares de secuencias (Rogers & Harpending 1992). Se espera una distribución multimodal en poblaciones en equilibrio demográfico y una distribución unimodal en poblaciones que han experimentado una expansión poblacional reciente. Usando 1000 bootstrap, se comprobó el ajuste de la distribución observada con lo esperado bajo un modelo de expansión repentina (Rogers y Harpending 1992) y de expansión geográfica (Excoffier 2004). Usando la distribución Mismatch se calculó el parámetro τ , este parámetro es una estimación del tiempo después de la expansión en unidades mutacionales $\tau = 2\mu t$, en donde t = tiempo generacional y μ = tasa de mutación por sitio para el gen en estudio (COI) multiplicado por el largo de la secuencia (573 pb) (Rogers y Harpending 1992). El cálculo fue hecho con un intervalo de confianza de 95% para los linajes en expansión. A pesar de que en algas la falta de fósiles hace que la calibración del reloj molecular sea muy difícil, hemos intentado calcular los tiempos de expansión y los tiempos de divergencia entre linajes, usando tasas de

mutaciones propuestas en la literatura. Para el marcador *rbcL* se usó una tasa de divergencia de 0.109-0.127% por millones de años, propuesta para las algas rojas por Kamiya y colaboradores (2004). Para el marcador COI, debido a la falta de calibración de tasas de mutación en algas, hemos usado una tasa de divergencia promedio propuesta para plantas superiores de 0,5% por millones de años (Cho et al. 2004). Esta tasa es muy cercana a la propuesta para algas rojas para el espaciador del Cox2-Cox3 por Zuccarello (2002) (0,55% por millones de años).

RESULTADOS

Para los tres marcadores, COI (mitocondrial, 573 pb), ITS1 (nuclear ~163 pb) y *rbcl* (cloroplástico, 922 pb), el número total de individuos secuenciados fue de 234, 84 y 17 respectivamente. El número total de sitios polimórficos para los marcadores fue de 59 para COI y 18 tanto para ITS1 como para *rbcl*.

A- *Mazzaella laminarioides*, un complejo de especies crípticas.

Se reconstruyeron árboles filogenéticos de Máxima-Verosimilitud para los marcadores *rbcl* y COI (FIGURAS 6, 7), usando el programa TreeFinder (Jobb 2004). Para el marcador ITS1, el gran número de gaps y la dificultad de alinear las secuencias entre especies del género *Mazzaella*, impidió el uso de las reconstrucciones filogenéticas de MV.

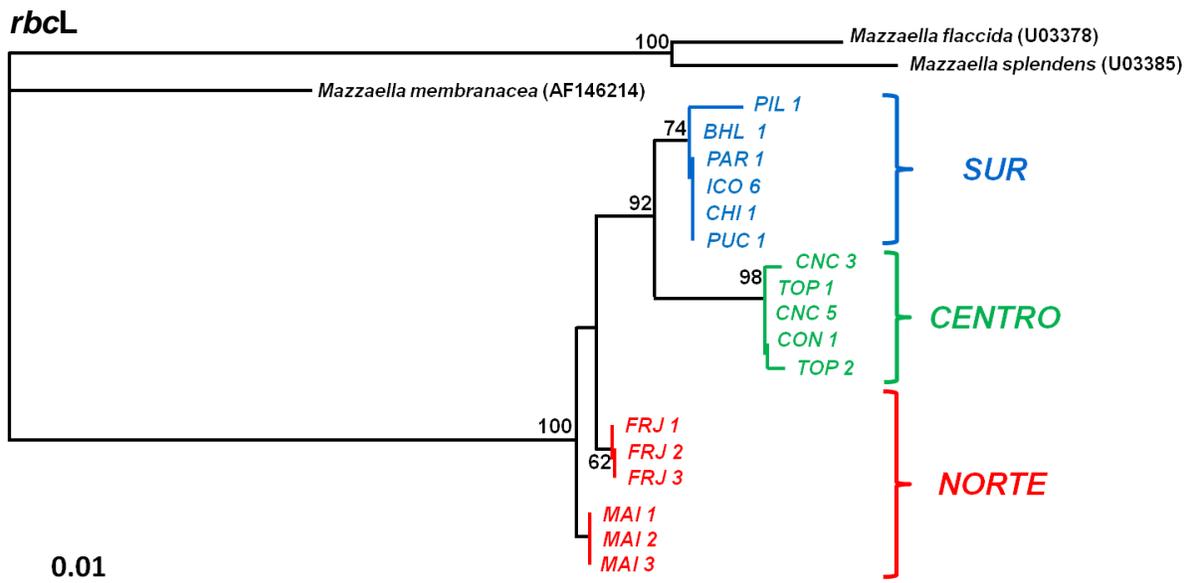


Figura 6. Reconstrucción filogenética de MV para el marcador *rbcl* (922pb). Se utilizaron los modelos TN para los codones 1, 2, mientras que para el codón 3 se utilizó el modelo J3+I. Los valores de soporte de cada rama fueron calculados usando 1000 bootstrap, sólo los valores mayores a 60 son mostrados en el árbol. Como grupo externo fueron utilizadas especies del género *Mazzaella*, publicadas en Genbank.

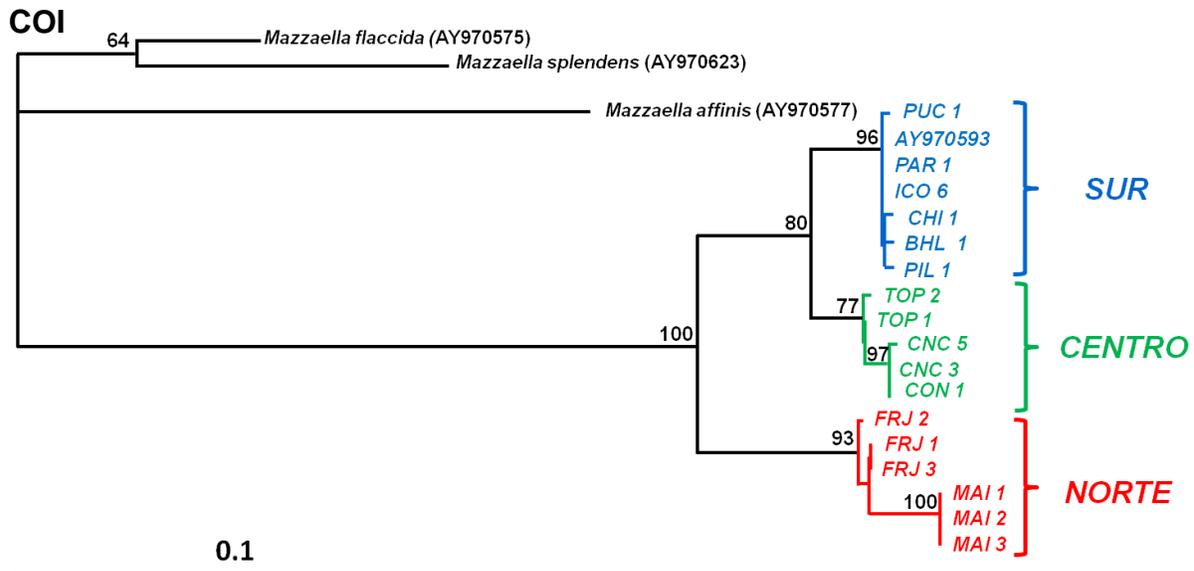


Figura 7. Reconstrucción filogenética de MV para el marcador COI (574pb). Se utilizaron los modelos J1 para el codón 1, TN para el 2 y HKY para el 3. Los valores de soporte de cada rama fueron calculados usando 1000 bootstrap, sólo los valores mayores a 60 son mostrados en el árbol. Como grupo externo fueron utilizadas especies del género *Mazzaella*, publicadas en Genbank.

Los marcadores *rbcL* y COI muestran que todos los individuos secuenciados en este estudio (i.e. “*M. laminarioides*”) forman un grupo monofilético sostenido por un valor de 100 bootstrap (Figuras 6, 7). Como en un estudio filogenético en el orden de las Gigartinales, realizado por Hommersand y colaboradores (1999) con el marcador *rbcL*, *M. membranacea* (Genbank AF146214, especie presente en la costa Chilena) aparece como el grupo externo más cercano de *M. laminarioides* en nuestro estudio (Figura 6). Las distancias genéticas entre *M. membranacea* y *M. laminarioides*, son mostradas en la Tabla 2 para los marcadores *rbcL* e ITS1. Lamentablemente, no existen secuencias disponibles en Genbank de *M. membranacea* para el marcador COI, y para este gen, *M. affinis* (Genbank AY970577, especie presente solamente en el hemisferio Norte) aparece como el grupo externo más cercano de *M. laminarioides* (Figura 7).

Tabla 2.- Valores de Kimura 2-parametros (Kimura 1980) calculados entre los haplotipos encontrados en los marcadores COI y *rbcL*. Los grupos fueron definidos de acuerdo a los tres grupos monofiléticos encontrados para el marcador COI. Para el marcador ITS1 las distancias genéticas son mostradas como la tasa de sitios polimórficos (calculado como el número de sitios polimórficos incluyendo los gaps, dividido por número de los sitios total). Entre paréntesis se indica el número de pares de bases, sobre las cuales que se calcularon los valores de distancia genética y sus respectiva desviación estándar. Para las seis secuencias de *M. laminarioides* encontradas en GENBANK, se calcularon las distancias genéticas entre cada una de ellas y el haplotipo más cercano dentro de nuestro set de datos (anotado en *itálico*). ‡ Saunders (2005); † Hommersand et al. (1994); * Hughey et al. (2001).

	Kimura 2-parametros		S/N° Sitios total
	COI (574pb)	<i>rbcL</i> (922pb)	ITS1 (+/- 163)
Intra grupo			
<i>Grupo Norte</i>	0.009089 +/- 0.003062	0.001957 +/- 0.001066	0.043
<i>Grupo Centro</i>	0.003158 +/- 0.001564	0.000869 +/- 0.000584	0.030
<i>Grupo Sur</i>	0.002333 +/- 0.001090	0.001087 +/- 0.000586	0.079
Promedio	0.004860 +/- 0.002095	0.001304 +/- 0.000745	0.051 +/- 0.025
Entre grupos			
<i>Norte/Centro/Sur</i>	0.054606 +/- 0.011144	0.010066 +/- 0.002940	0.101 +/- 0.025
<i>Mazzaella laminarioides</i> GENBANK			
AY970593‡ (574pb), Chiloé	0.000 (<i>ICO6</i>)		
U03380† (922pb), Valparaíso		0.060 (<i>FRJ1</i>)	
EU082420 (529pb), Horcón		0.000 (<i>MAI1</i>)	
EU082421 (529pb), El Desembocadero		0.000 (<i>MAI1</i>)	
AF400052* (115pb), Valparaíso			0 (<i>TOP1</i>)
AF400055* (165pb), Concepción			0.006 (<i>TOP1</i>)
<i>Especies más cercanas del género Mazzaella</i>			
<i>M. affinis</i> ‡ AY970577 (574pb), British Columbia	0.136 (<i>FRJ1</i>)		
<i>M. membranacea</i> AF146214 (922pb), Magallanes		0.042 (<i>FRJ1</i>)	
<i>M. membranacea</i> EU090993 (173pb), Magallanes			0.23 (<i>PAR1</i>)

Para el marcador COI, el grupo monofilético “*M. laminarioides*” de nuestro estudio, incluye la secuencia de *M. laminarioides* publicada en Genbank AY970593 (Figura 7), que corresponde a la secuencia de barcoding propuesta para esta especie (Saunders 2005). Para el marcador *rbcL*, existe una gran discrepancia entre las tres secuencias publicadas en Genbank para esta especie (Tabla 2) y ninguna de ellas fueron incluidas en la reconstrucción del árbol. Dos de

estas tres secuencias (Genbank EU082420 y EU082421), no presentan ninguna diferencias con las secuencias obtenidas en este estudio (Tabla 2). Las secuencias de *M. laminarioides* AF400052 y AF400055 publicadas en Genbank para el marcador ITS1 presentaron muy pocas diferencias con las secuencias obtenidas en este estudio (0 y 0.006 respectivamente, Tabla 2).

En este grupo monofilético "*M. laminarioides*", hemos detectado tres linajes de haplotipos genéticamente diferenciados y geográficamente relacionados: (1) un grupo "**Norte**" que corresponde a individuos de las poblaciones de FRJ y MAI (ubicadas entre los 30°40'S - 32°37'S), (2) Grupo "**Centro**" que corresponde a individuos de las poblaciones de TOP, CON y CNC (ubicadas entre los 34°05'S - 36°31'S); (3) un grupo "**Sur**" que corresponde a individuos de las poblaciones de CDA, PIL, PUC, CHI, BHL, ICO, PAR y ICL (ubicadas entre los 39°40'S - 54°03'S).

Los grupos Centro y Sur constituyen linajes monofiléticos para ambos marcadores, y son soportados por altos valores de bootstrap (77 y 96 para el COI y 98 y 74 para el *rbcL*, respectivamente, Fig. 6). La monofilia del grupo Norte solo fue observada para el marcador COI, y está sostenida por un alto valor de bootstrap (93, Figura 7). Las distancia genéticas obtenidas mediante el modelo K2P (Kimura 2-Parametros, Kimura 1980) entre los tres linajes para el COI y el *rbcL* son al menos 10 veces más altas que las distancias calculadas entre secuencias dentro de cada linaje (Tabla 2). Usando el criterio propuesto por Hebert y colaboradores para el COI (2003, i.e. 10 veces más diferencias entre linajes que dentro de cada linaje) se podrían reconocer tres especies crípticas dentro de *M. laminarioides*: el linaje "Norte", el linaje "Centro" y el linaje "Sur". En el resto de este trabajo los datos serán tratados en su totalidad para todo Chile y para cada uno de los tres linajes.

B- Distribución geográfica de los polimorfismos.

Para el marcador ITS1, ningún caso de Heterocigosidad fue encontrado (ninguna secuencias con sobreposición de picos de lectura en los cromatogramas) en los 84 individuos secuenciados y las secuencias fueron tratadas como haplotipos. Los valores de diversidad encontradas en las 13 poblaciones muestreadas son mostrados en la Tabla 3, mientras que la distribución geográfica de los haplotipos para estos dos marcadores está presentada en la Figura 8.

Tabla 3. – Índices de diversidad para los marcadores COI e ITS-1 en las 13 localidades muestreadas de *M. laminarioides*. **N**, número de individuos secuenciados; **nh**, número de haplotipos encontrados; **h_{corr}**, número de haplotipos encontrados corregidos por tamaño de muestra (COI=12; ITS-1=3); **He**, diversidad haplotípica; **π** , diversidad nucleotídica.

	COI						ITS-1					
	N	nh	h _{corr}	h _{priv}	He	π	N	nh	h _{corr}	h _{priv}	He	π
<u>Linaje Norte</u>												
Fray Jorge	21	3	1.8	3	0.58	0.0036	10	6	1.7	3	0.88	0.0151
Maitencillo	23	2	0.8	2	0.17	0.0003	10	1	-	0	0	0
Promedio	22	2.5	1.3	2.5	0.38	0.0019	10	3.5	0.85	1.5	0.44	0.0075
<u>Linaje Centro</u>												
Topocalma	17	3	2	3	0.60	0.0011	11	4	1.9	2	0.69	0.0109
Constitución	17	1	-	0	0	0	9	2	0.3	0	0.22	0.0014
Concepción	15	2	1	1	0.42	0.0006	-	-	-	-	-	-
Promedio	16.3	2	1	1.3	0.34	0.0005	10	3	1.1	1	0.46	0.0062
<u>Linaje Sur</u>												
Ch. de Aceituno	12	1	-	0	0	0	4	1	0	0	0	0
Pilolcura	21	4	3	3	0.76	0.0017	-	-	-	-	-	-
Pucatrihue	19	3	1.6	2	0.57	0.0009	4	4	2	1	1	0.0294
Chiloé	20	3	1.9	2	0.59	0.0010	10	5	1.4	1	0.80	0.0366
Bahía Low	18	2	1	1	0.42	0.0006	4	3	1.5	1	0.83	0.0159
Isla Concoto	18	1	-	0	0	0	3	2	1	0	0.66	0.0128
Punta Arenas	20	1	-	0	0	0	10	1	-	1	0	0
Isla Clarence	15	1	-	0	0	0	7	1	-	0	0	0
Promedio	17.8	2	1	1	0.30	0.0005	6.3	2.7	1	0.7	0.54	0.0160
TOTALES	235	19	-	17	0.82	0.0274	84	18	-	9	0.90	0.0221

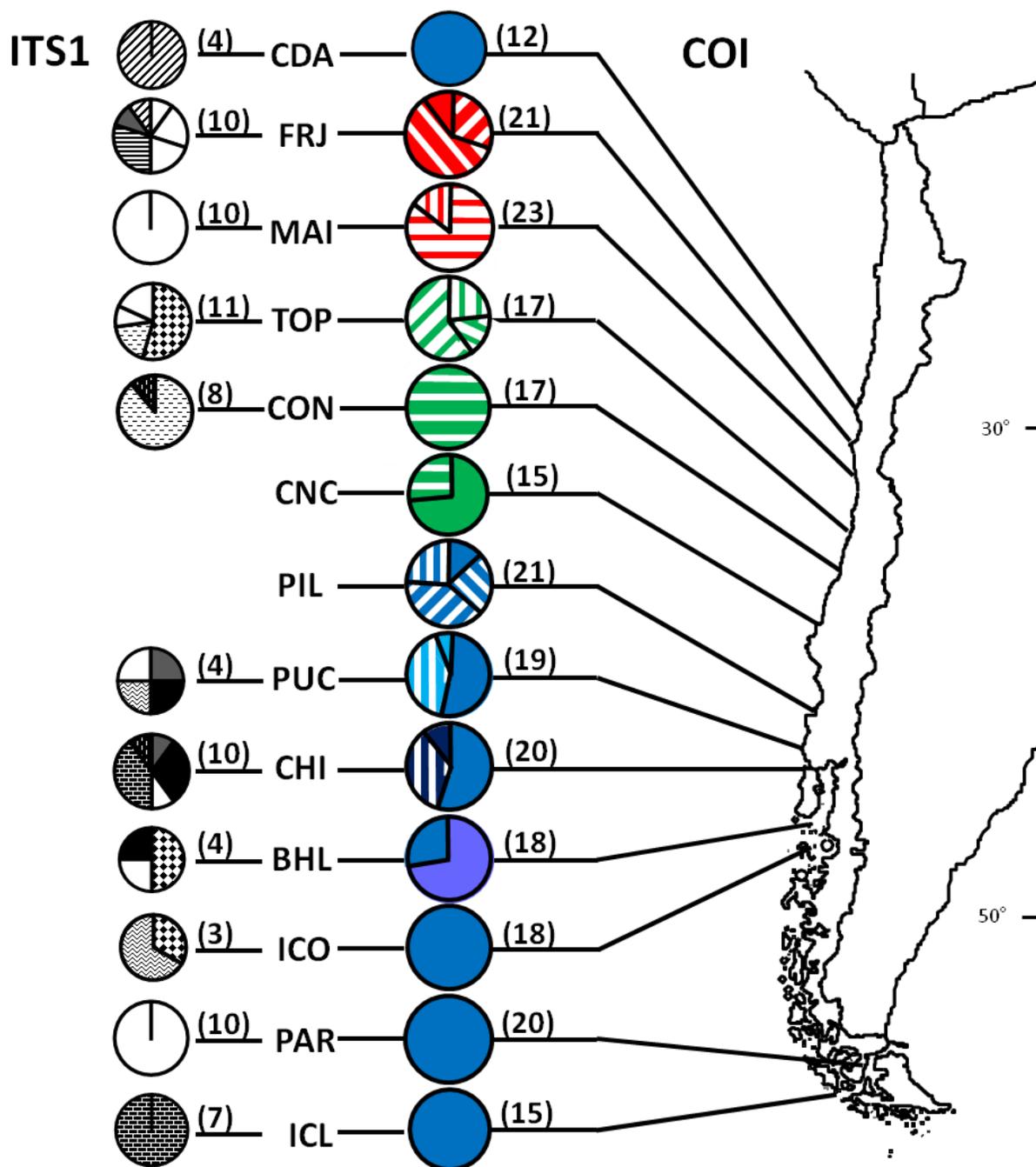


Figura 8. Distribución geográfica de los haplotipos de *M. laminarioides*: ITS1 (en blanco y negro); COI (en color). Entre paréntesis se indica el número de individuos secuenciados.

Para el marcador COI, la distribución geográfica de los haplotipos de las 13 poblaciones muestreadas (Figura 8), confirma los primeros resultados obtenidos anteriormente (Figura 6) y muestra la presencia clara de tres linajes separados geográficamente. Ninguna de las poblaciones muestreadas presenta mezclas de haplotipos de distintos linajes y los tres linajes se encuentran separados por dos zonas de transición: (1) $\sim 33^{\circ}\text{S}$ entre MAI y TOP para el linaje Norte y Centro, (2) $\sim 37^{\circ}\text{S}$ entre CNC y PIL para los linajes Centro y Sur (Fig. 7). Por lo contrario, para el marcador ITS1, esta separación clara no existe entre las poblaciones del Norte, Centro y Sur (Fig. 8). Para el marcador ITS1, este resultado discrepante podría ser debido al patrón mutacional muy poco común encontrado en este marcador, que podría generar una alta homoplasia (Figura 9). En este marcador se encontró sola una sustitución, el resto de la variabilidad genética fue generada por la presencia de gaps. Los poli-T, poli-C y poli-CAA presentes, parecen comportarse como microsátélites (o secuencias repetidas) independientes, lo que genera una red de haplotipos que no permite la resolución de las relaciones ancestrales entre haplotipos (Figura 10).

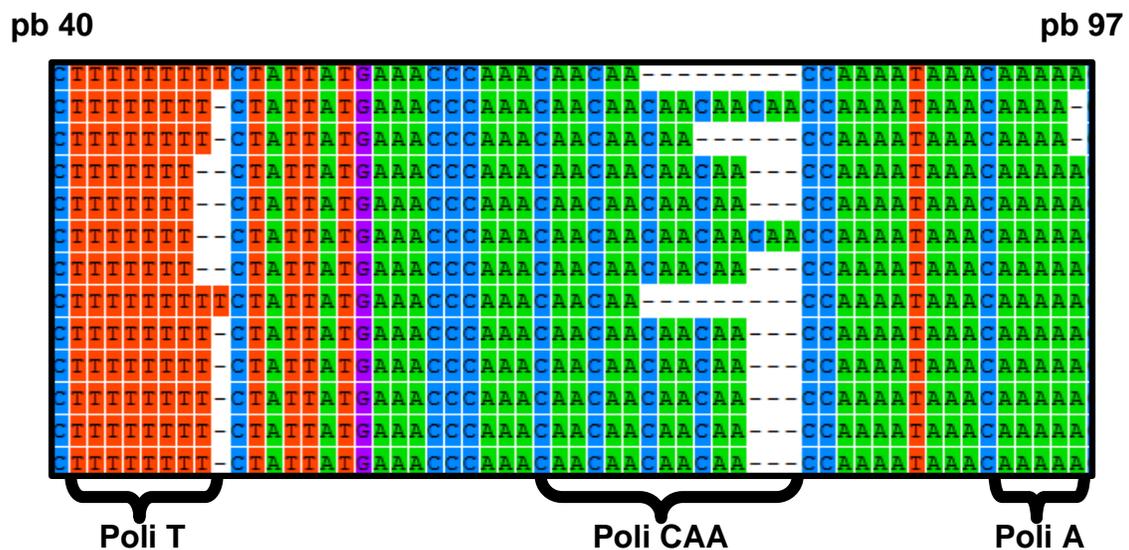


Figura 9. Patrón mutacional del marcador ITS1, se muestran las repeticiones Poli T, Poli CAA y Poli A.

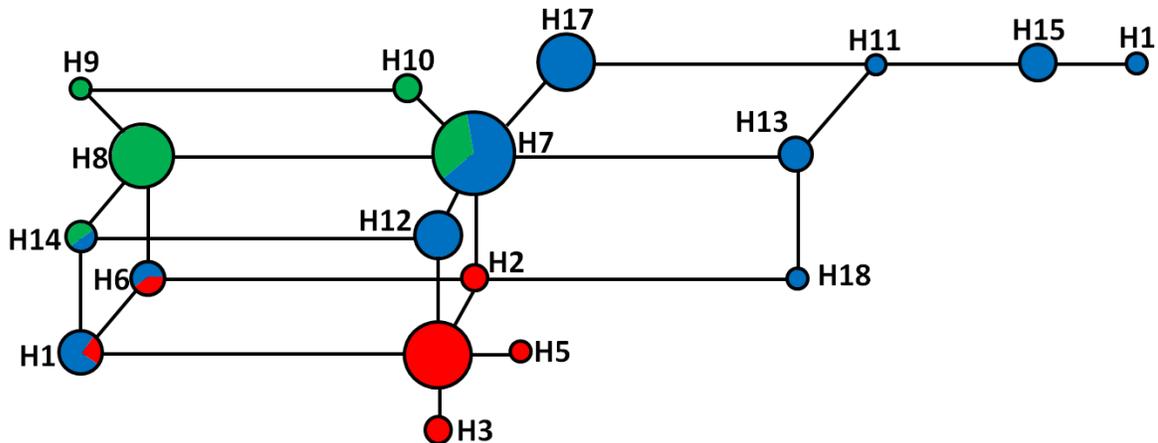


Figura 10. Red de Haplotipos construida con el programa Network (Bandelt et al. 1999) para los haplotipos encontrados con el marcador ITS1. Se atribuyeron colores de acuerdo a los linajes encontrados en el marcador COI. Rojo: linaje Norte; Verde: linaje Centro; Azul: linaje Sur. Las separaciones pequeñas entre haplotipos son un paso mutacional de T o A, mientras que las separaciones mayores son inserciones/delecciones de CAA.

A parte del caso particular del haplotipo H19 (COI), compartido entre todas las poblaciones del linaje Sur, los haplotipos generalmente se encuentran en una sola población (ver haplotipos privados, h_{priv} , Tabla 3) o en unas pocas poblaciones cercanas (Figura 8, COI haplotipo H9 compartido entre CON y CNC). Este patrón de haplotipos compartidos solamente entre poblaciones cercanas es particularmente claro para el ITS1 (Fig. 8). Los valores promedios de diversidad encontrados fueron altos en las poblaciones muestreadas para los dos marcadores (Tabla 3), con valores de diversidad haplotípica (He) y de número de haplotipos corregido por el tamaño del muestreo (h_{corr}), muy similares entre los tres linajes (COI: $He = 0,30-0,38$, $h_{corr} = 1-1,3$; ITS1: $He = 0,44-0,54$, $h_{corr} = 0,85-1,1$; Tabla 3). La diversidad nucleotídica (π) para el marcador COI, fue más alta en el linaje “Norte” (0,0019) que en los otros linajes (0,0005), mientras que el linaje “Sur” presento valores más alto de π para el ITS1 (0,016 > 0,0062-0,0075, Tabla 3). El número de alelos privados (h_{priv}) encontrados en el linaje “Norte”, fue mayor

al número encontrado en los dos otros linajes para los dos marcadores (aproximadamente el doble para el marcador COI, Tabla 3).

Para los dos marcadores, Fray Jorge fue la localidad con mayor diversidad genética en el linaje Norte y la de Topocalma en el linaje Centro (He respectivamente de 0,58 y 0,60 para el COI y 0,88 y 0,69 para el ITS1; Tabla 4). En el linaje Sur, las poblaciones ubicadas al límite norte de éste (Pilolcura, Pucatrihue y Chiloé), fueron las que presentaron los mayores valores de diversidad genética (He desde 0,59 hasta 0,76 para el COI y 0,80 hasta 1,0 para el ITS1; Tabla 4). De hecho, para el linaje Sur, existe un claro patrón de disminución de la diversidad genética desde Pilolcura y Pucatrihue (zona de mayor diversidad), hasta el extremo sur Punta Arenas y Isla Clarence, en donde un solo haplotipo fue encontrado para el COI como para el ITS1 (Figura 8). La población más al Norte, Chañaral de Aceituno, presenta un patrón muy particular. En esta población se encuentra un solo haplotipo para el marcador COI como para ITS1 (Figura 8, Tabla 3). En el caso del marcador COI, este haplotipo corresponde al haplotipo más común del linaje Sur (H19), mientras que en ITS1 este haplotipo corresponde a un haplotipo presente en la población cercana de Fray Jorge H1 (Figuras 8, 10). Existe otros tres haplotipos de ITS compartidos entre linajes: H6 encontrado en las poblaciones del centro y del Norte y H7 y H14 en las poblaciones del Centro y del Sur (Figura 8 y 10).

C- Demografía Histórica:

En los análisis de distribución mismatch para el marcador COI, tanto los linajes Norte como Centro, presentaron una distribución multimodal (Figura 11), que se ajusta de manera muy imperfecta a las distribuciones esperadas bajo los modelos de expansión repentina como espacial (Tabla 4). De hecho, se rechaza el modelo de expansión repentina en el linaje Norte ($p=0,037$, Tabla 4) y del mismo modo el ajuste de la expansión espacial son muy bajos para el linaje Centro ($p=0,07$ cercano a la significativo). Los linajes Centro y Norte presentan valores de los índices D de Tajima y F_S de Fu positivos aunque no significativos (Tabla 5), lo

que sugiere un equilibrio demográfico para ambos linajes. Para el linaje Sur se observó una distribución mismatch del tipo unimodal (Figura 11), la que se ajusta a un modelo de expansión repentina ($p=0,816$, Tabla 4). Estos datos están corroboradas por los índices de D de Tajima, F_S de F_u negativos (solo significativos para el caso de el índice $F_S = -3.50$; $p= 0.07$, Tabla 4) y por una red de haplotipos en estrella generalmente asociada con una expansión poblacional reciente (Figura 11).

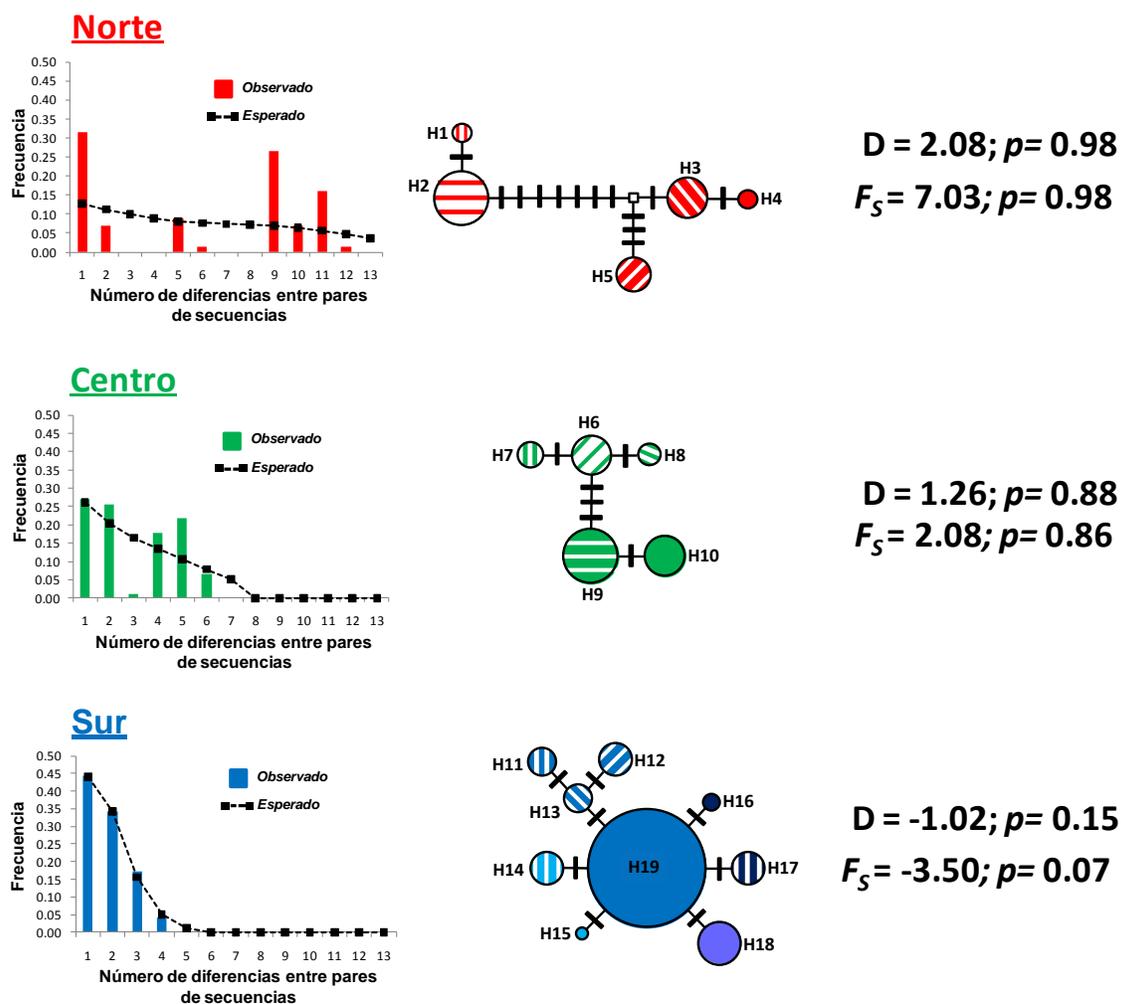


Figura 11. Inferencias de la historia demográfica de cada linaje. El linaje Sur no incluye la población de CDA debido a su ubicación geográfica. Los análisis realizados de izquierda a derecha son: distribución Mismatch con el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer 2010), una red de Haplotipos con el programa Network v4.6.0 (Bandelt et al. 1999), y fueron calculados los índices D de Tajima y F_S de F_u con el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

D- Datación de los eventos divergencia entre linajes y de expansión poblacional.

Para el marcador rbcL, el tiempo de divergencia se calculó solo entre los dos linajes monofiléticos Centro y Sur, y se estimó que la divergencia corresponde a una fecha entre 4.200.000 (mínimo) – 4.900.000 (máximo) años atrás. Para el COI, usando la tasa promedio de divergencia en plantas se obtiene una separación entre los linajes Centro y Sur hace 3.200.000 años atrás y una separación entre el linaje Norte y estos dos linajes hace 8.600.000 años atrás. Todas las fechas de divergencia entre linajes de *M. laminarioides* son ubicadas en el Plioceno. En el único linaje que presenta una clara expansión poblacional reciente (linaje Sur, Tabla 4), se calculó la fecha de la expansión más reciente, usando los valores de τ calculados por el modelo expansión repentina que mejor se ajusta a los datos (0.00-2.58, Tabla 4). Considerando un tiempo generacional de un año en *M. laminarioides*, se obtiene una fecha de expansión hace 175.438 años atrás. Las fechas calculadas se ubican entre el Holoceno y Pleistoceno, con un rango de 0 – 495.000 años atrás, basado en el intervalo de confianza de 95% del valor de τ (Tabla 4).

Tabla 4- Pruebas de neutralidad calculadas usando las secuencias de COI en los tres linajes y ajuste de la distribución mismatch con modelos de expansión poblacional. Los valores de significancia de los índices D de Tajima y F_S de Fu, fueron calculados usando 1000 muestras simuladas. Los valores de τ fueron estimados bajo los modelos de expansión repentina y expansión espacial.

	D Tajima	F_S Fu	τ <i>repentina</i>	τ <i>espacial</i>
Linaje Norte	2.08 $p=0.98$	7.03 $p=0.98$	10.0 (0.00-25.20) $p=0.037$	8.73 (0.00-22.05) $p=0.264$
Linaje Centro	1.26 $p=0.88$	2.08 $p=0.86$	4.6 (0.00-14.46) $p=0.23300$	0.02650 (0.00-88.72) $p=0.070$
Linaje Sur	-1.02 $p=0.15$	-3.50 $p=0.07$	1 (0.00-2.84) $p=0.816$	0.79 (0.00-2.58) $p=0.739$

DISCUSIÓN.

El resultado de esta investigación, basado en un muestreo que cubre prácticamente todo el rango de distribución de *M. laminarioides*, ha demostrado congruentemente para los marcadores COI (mitocondrial) y *rbcL* (cloroplástico), la presencia de tres linajes monofiléticos (Norte, Centro y Sur), formando posiblemente un complejo de tres especies crípticas. El marcador COI muestra que los tres linajes se encuentran separados geográficamente por dos zonas de transición: (1) entre los 32°37'S-34°05'S, ubicada entre los linajes Norte y Centro y (2) entre 36°31'S-39°40'S, ubicada entre los linajes Centro y Sur. Sin embargo, se ha encontrado una discrepancia de este patrón con en el marcador ITS1, él que no muestra ningún gran quiebre filogeográfico en la distribución de los haplotipos. El origen, la localización y la importancia de estos quiebre genéticos, en comparación con los quiebre biogeográficos ya estudiados en Chile, son discutidos a continuación.

1) *M. laminarioides*, un potencial complejo de tres especies crípticas.

Los altos niveles de biodiversidad en el ambiente marino, sugieren que la divergencia genética y eventual especiación pueden ser comunes en estos ambientes (Knowlton 1993, Mathews 2006). Posibles especies hermanas o especies que son difícilmente diferenciables morfológicamente, han sido descritas anteriormente para varios taxas: algas (Tellier et al. 2009), peces (Colborn et al. 2001), esponjas (Klautau et al. 1999) y copépodos (Lee 2000, Rocha-Olivares et al. 2001). Las algas marinas proveen un importante número de ejemplos, en que los análisis genéticos han jugado un importante rol para definir los límites entre especies (Knowlton 2000), esto debido su simplicidad morfológica que lleva a complicaciones por la falta de caracteres diagnósticos (Van Oppen et al. 1996), a su plasticidad fenotípica (ej.: Bakker et al. 1996, Benzie et al. 1997) y sus historias de vida heteromórficas (Knowlton 2000). Los resultados del estudio filogeográfico de *M. laminarioides*, muestran evidencia consistente sobre la presencia de un

complejo de tres entidades genéticamente muy diferentes, las que podrían ser consideradas como un complejo de especies crípticas (*M. laminarioides* spp.). Primero, las reconstrucciones filogenéticas para los marcadores COI y *rbcL*, evidenciaron la presencia de tres linajes monofiléticos soportados por altos valores de bootstrap dentro de *M. laminarioides* (Figura 6; 7). Segundo, a pesar de que los valores estimados de distancia (K2P) fueron bajos entre linajes (0.054606 +/- 0.011144, Tabla 2), en comparación a los reportados en otras taxas, ej.: peces; 0.39 (Ward et al. 2005), éstos se encuentran en el rango de los valores reportados en otras especies de algas estrechamente relacionadas (0.00613 - 0.06982) (análisis realizado en 14 especies del orden Scytosiphonales, Kogame et al. 1999). Además, se encontró 10 veces más diferencias genéticas entre linajes (COI: 0.054606; *rbcL* 0.010066) que dentro de cada linaje (COI: 0.004860; *rbcL*: 0.001304), lo que corresponde al criterio de código de barras para delimitar especies propuesto por Hebert y colaboradores (2003, i.e. 10 veces más diferencias entre grupos monofiléticos que dentro de cada grupo). Aunque los resultados son congruentes entre los marcadores COI y *rbcL*, se hace necesario corroborar la idea de un complejo de tres especies hermanas dentro de *M. laminarioides* spp., principalmente mediante experimentos de aislamiento reproductivo e hibridación introgresiva (Palumbi 1994, Bickford et al. 2007).

Las grandes diferencias genéticas entre linajes, para los marcadores COI y *rbcL*, sugieren que las divergencias entre ellos ocurrieron hace mucho tiempo. Lamentablemente, la capacidad de estimar las fechas de divergencia entre linajes en algas es limitada, debido a la ausencia de registros fósiles (Provan & Bennett 2008). Por esto, las estimaciones de fechas de divergencia en algas se basan en tasas de sustitución determinadas de formas indirectas, como extrapolaciones en base a procesos geológicos y procesos de divergencia (Knowlton & Weight 1998, Zuccarello & West 2002) o utilizando tasas de sustitución propuestas para grupos cercanos (Hoarau et al. 2007). Las estimaciones indirectas de las fechas de divergencia entre los linajes de *M. laminarioides* spp., fueron estimadas usando tasas de sustitución sugeridas para plantas para el marcador COI (Cho et al. 2004)

y de un alga roja para el marcador *rbcL* (Kamiya et al. 2004) y sugieren una divergencia ancestral en un rango entre 3.000.000 a 4.000.000 (Plioceno – inicios del Pleistoceno) de años atrás aproximadamente para la divergencia entre el grupo “centro” y el grupo “sur”. Aunque la precisión de estas estimaciones de las fechas de divergencia es baja, las dos especies “centro” y “sur” se originaron mucho antes de los eventos glaciares del cuaternario (Avice 2000, Dawson 2005, Maggs et al. 2008).

Al contrario de las grandes diferencias encontradas entre linajes para marcadores COI y *rbcL*, el marcador ITS1 no mostró ningún gran quiebre filogeográfico. Para el marcador nuclear (ITS1) si bien existe una estructuración genética entre los linaje determinados con el marcador COI, algunos haplotipos de ITS1 son compartidos entre poblaciones geográficamente cercanas de los tres distintos linajes. Este patrón podría estar ligado a procesos de introgresión recientes, los que ocurrirían en las zonas de transición y son sólo visibles en marcadores nucleares (Rieseberg & Wendel). Pero este patrón no se debe necesariamente a una conexión existente entre las poblaciones ya que el tipo de mutaciones en este marcador (inserción/delección) lleva a tener una alta probabilidad de homoplasia entre haplotipos de diferentes poblaciones. Esta alta probabilidad de homoplasia en el marcador ITS1, no permite estimar el flujo génico real entre las poblaciones y por ende no permite detectar el patrón originado por barreras a la dispersión. Para este marcador, ha sido reportada una alta tasa de mutación en una otra alga, *Macrosystis sp.* (Coyer et al., 2001), lo que mantendría un alto número de homoplasias entre haplotipos. Nuestros datos no nos permiten distinguir entre efectos de introgresión recientes y/o homoplasia, y sería de interés de completarlo con un estudio usando otros marcadores nucleares como los microsatélites.

II) Zonas de transición.

La concordancia entre quiebres genéticos y zonas de transición biogeográficas, ha sido descrita para muchas especies en diferentes partes del mundo (Avice 2000, Collin 2001, Hellberg et al. 2001, Jolly et al. 2005). La zona más estudiada ha sido Point Concepción ubicada entre los 33°N-34°N en la costa del Pacífico Norte, en esta zona se han encontrado para varias especies congruencias entre quiebres genéticos y esta zona de transición (Burton 1998, Dawson 2001).

En la costa chilena, se han reportado congruencias entre la zona de transición de los 30°S-33°S y quiebres genéticos (Tellier et al. 2009, Zakas et al. 2009). Estos quiebres genéticos varían tanto en su ubicación como en la magnitud de la estructuración sobre las especies estudiadas (Tabla 5). Tellier y colaboradores (2009), sugieren para el alga parda *Lessonia nigrescens*, que posee una limitada capacidad de dispersión, la presencia de dos linajes divergentes - posiblemente especies crípticas - asociados a la zona de transición de los 30°S. Para *Macrosystis pyrifera*, un alga parda con alta capacidad de dispersión, se encontraron dos discontinuidades genéticas (la magnitud de estos quiebres es menor a los encontrados a *L. nigrescens*, solo pocos pasos mutacionales de diferencia entre haplotipos) a través de su rango de distribución (Macaya & Zuccarello 2010), el primero ubicado en los 33°S y un segundo ubicado a los 42°S, congruentes con las zonas de transición descritas por Camus (2001). Por otra parte Zakas et al. (2009), sugieren para el cirripedio *Notochthamalus scabrosus*, que posee una fase de dispersión larval de un mes aproximadamente, un quiebre genético dado por una restricción al reclutamiento de ciertos haplotipos relacionado a la zona de transición de los 30°S. Al contrario de este patrón de congruencia, en el murícido *Concholepas concholepas*, no se evidenció ningún quiebre genético a través de su rango de distribución, el que cubre toda la costa chilena (Cárdenas et al. 2009), este resultado fue principalmente atribuido a su alta capacidad de dispersión larval (como mínimo 3 meses en la columna de agua, Di Salvo 1988).

Tabla 5.- Tabla modificada de Tellier 2009 (Tesis doctoral). Comparación de los patrones de estructuración genética, de especies marinas, que atraviesan al menos una de las dos zonas de transición descritas para la costa chilena. Para cada especie, se indica las principales características del ciclo de vida y las principales características del estudio. **Rango Distrib.:** área de distribución conocida en la costa chilena; **Hábitat:** tipo de hábitat (arena pelágicos, rocosos); **Dispersión:** Duración de la etapa larval en el caso de invertebrados, en el caso de las algas es indicada su capacidad de dispersión mediante esporas y/o talos; **Rango estudio:** rango en el cual fueron realizados los muestreos; **Marcador:** tipo de marcador molecular (mitocondrial, cloroplástico, nuclear); **Ubic. disc. genética:** muestra el rango o la ubicación exacta en donde se ubican el o los quiebres genéticos; **Autor:** indica el nombre del primer autor.

Especie	Clasific.	Rasgos de Historia de Vida			Información del estudio			
		Rango Distrib.	Hábitat	Dispersión (capacidad)	Región estudio	Marcador	Ubic. disc. genética	Autor
<i>Notochthamalus scabrosus</i>	Crustáceo Maxilipedo	SD	Intermareal	Larva planctónica (20-37 días)	28°23'S- 34°24'S	COI (mit.) EF1 (nuc.)	30°-31°S	Zakas et al.
<i>Mesodesma donacium</i>	Molusco Bivalvo	5°S- 42°S	Intermareal Submareal (arena)	Larva planctónica (26-28 días)	18°18'S- 42°38'S	COI (mit.)	32°21'S- 33°57'S	Peralta et al.
<i>Crepidatella dilatata</i>	Molusco Gasterópodo	20°S- 34°S	Intermareal Submareal (rocoso)	Desarrollo directo	28°29'S- 33°23'S	COI (mit.)	29°28'S- 29°58'S	Brante et al.
<i>Exirolana hirsuticauda</i>	Crustáceo Isópodo	23°S- 41°S	Intermareal (arena)	Desarrollo directo	SD	COI (mit.)	30°S-32°S	Varela & Haye
<i>Acanthina monodon</i>	Molusco Murícido	28°S- 55°S	Intermareal Submareal (rocoso)	Desarrollo directo	28°24'- 52°59'	COI (mit.)	30°S 42°S	Sánchez et al.
<i>Lessonia nigrescens</i>	Alga Laminariales	18°S- 55°S	Intermareal (rocoso)	Baja	15°S- 40°S	ITS1, ITS2 (núc.) Rub. Spacer (clo.) atp8/trns (mit.)	30°S	Tellier et al.
<i>Macrosystis pyrifera</i>	Alga Laminariales	17°S- 56°S	Intermareal Submareal (rocoso)	Alta	17°S- 56°S	atp8/trns	33°S 42°S	Macaya & Zuccarello

En *M. laminarioides*, el tamaño reducido de las poblaciones asociado a una baja capacidad de dispersión podría generar rápidamente una estructuración genética muy fuerte aun sin existencia de clara barrera física para los flujos génicos. Para estos tipos de organismos, algunos eventos estocásticos como levantamientos continentales o eventos ENSO podrían generar fuertes cuellos de

botella y extinciones locales. De hecho se ha demostrado que en poblaciones donde la deriva actúa muy fuerte se pueden generar quiebres genéticos sin la existencia de barreras geográficas a los flujos génicos (Irwin et al. 2002).

Este estudio, evidenció la presencia de dos zonas de transición para *Mazzaella laminarioides* a lo largo de su distribución en la costa chilena: (1) entre los 32°37'S-34°05'S: separando los linajes Norte y Centro (2) entre los 36°31'S-39°40'S separando los linajes Centro y Sur. La primera zona de transición (32°S – 34°S), podría corresponder a la zona de transición (30°S-33°S) que separa la Provincia Peruana del Área Intermedia (Camus 2001). Por otra parte, la segunda zona de transición (36°S – 39°S) que separa los linajes Centro y Sur, no coincide con ninguna zona de transición actualmente descrita para la costa Chilena. La ubicación de la zona de transición que separa la Provincia Peruana del Área Intermedia no es clara y varía dependiendo tanto de los taxas estudiados como de los autores (Camus 2001, Thiel et al. 2007, Tellier et al. 2009, Zakas et. al. 2009). En esta zona han sido reportado en la actualidad patrones oceanográficos característicos como fuertes remolinos cinéticos (Hormazabal et al. 2004), que podrían limitar la conectividad entre poblaciones localizada en ambos lados. La zona cercana de los 30°S ha sido descrita como una de las zonas de mayor surgencia en la Costa chilena (Thiel et al. 2007), esto se ha usado como la potencial razón para explicar importantes cambios en el patrón de reclutamiento de algunas especies de invertebrados entre los 30°S-32°S (Broitman et al. 2001, Navarrete et al. 2005). Estos patrones oceanográficos podrían explicar la falta de conectividad entre los linajes Norte y Centro de *Mazzaella laminarioides*.

La ubicación de la segunda zona de transición (entre los linajes Centro y Sur) se encuentra entre la zona de Concepción y Valdivia (36°S - 39°S). Entre estas localidades, se han descritos procesos oceanográficos como características geográficas de la costa propios de esta zona. Ambos factores, podrían afectar la conectividad de poblaciones de especies, cuyo rango de distribución atraviesa esta zona. En particular, la zona de los 37°S ha sido descrita como una de las zonas con mayores niveles de surgencia en la costa chilena (Thiel et al. 2007).

Además, un estudio realizado en la costa chilena desde los 18°S hasta los 42°S, ha descrito la zona entre los 36°S y los 40°S como la zona con las mayores extensiones de playas de arena en la costa Chilena (+/- 4 Kilómetros de extensión total), separadas por cortas distancias entre ellas (+/- 1 Kilómetro) (Thiel et al. 2007). La ausencia de hábitat, para especies que habitan el intermareal rocoso (como *M. laminarioides*) en esta zona, ha sido la principal hipótesis planteada para explicar los patrones de estructuración genética encontrados en *Lontra felina* (Vianna et al. 2010) y *Durvillea antártica* (Fraser et al. 2010) dos organismos con mucho mayor potencial de dispersión que *M. laminarioides*. Ambos, largas distancia geográficas entre hábitats rocosos (existencia de playas de más de 4 Km., Thiel et al. 2007) y diferencias en el régimen de surgencia podrían explicar la falta de conectividad entre los linajes Centro y Sur de de *M. laminarioides*.

III) Demografía Histórica:

Los análisis realizados para inferir la historia demográfica de los linajes sugieren para los linajes Norte como Centro, un equilibrio poblacional, sin grandes cambios demográficos en estos linajes (Figura 11, Tabla 4). El linaje sur, por el contrario, muestra una historia demográfica distinta de expansión poblacional, con interesantes patrones genéticos resultantes posiblemente de procesos ocurridos durante el UMG (extinciones) como posteriores a este periodo (recolonizaciones).

El UMG ha sido descrito como el evento que tuvo el mayor efecto en la actual distribución de las especies (Avice 2000), forzando a muchos taxos de climas templados a retroceder en su rango de distribución durante el avance de las capas de hielo (Hewit 2003). El efecto de este evento sobre la distribución de algas marinas ha sido estudiado en el hemisferio norte (Coyer et al 2003, Provan et al. 2005, Hoarau et al. 2007, Olsen et al. 2010), describiendo patrones similares en la distribución de la diversidad genética entre las especies estudiadas. Nuevos estudios hechos en la costa Chilena han demostrado en las algas marinas *Durvillea antártica* (Fraser et al. 2009) y *Macrosystis pyrifera* (Macaya & Zuccarello

2010), un patrón similar de homogeneidad genética en la zona patagónica ubicada al sur de los 44°S, atribuido como consecuencia de procesos de recolonización posteriores al UMG. Para *D. antártica*, es sugerida una recolonización desde una fuente transoceánica, debido a la cercana relación genética entre las muestras del extremo sur de Chile y de Nueva Zelanda (Fraser et al. 2010), mientras que para *M. pyrifera* se sugiere una recolonización desde la zona libre de hielo al Norte de Chiloé (Macaya & Zuccarello 2010). El linaje Sur de *M. laminarioides*, muestra una disminución de su diversidad genética cuando aumenta la latitud (Figura 8, Tabla 3), con la presencia de un solo haplotipo (H19, ver Figuras 8, 11) en el extremo sur de Chile. Además, este linaje muestra una red de haplotipos de tipo estrella (Figura 11) característica de procesos de expansión poblacional reciente, en donde el Haplotipo 19 (H19) es señalado como el haplotipo ancestral. Para *M. laminarioides*, el patrón de disminución en la diversidad genética en la zona sur y la presencia de un haplotipo compartido entre las poblaciones del extremo Sur y las poblaciones localizadas al Norte de Chiloé, sugiere (1) una extinción de las poblaciones del extremo Sur durante el UMG y (2) una recolonización de esta zona desde la zona libre de hielo posiblemente al final del UMG. Este proceso de recolonización es congruente con el gráfico de distribución Mismatch para este linaje, el que se ajusta a un modelo de expansión poblacional reciente y con los índices D de Tajima y F_s de Fu negativos. Este patrón de disminución de la diversidad genética encontrado en el marcador COI, también es evidenciado para el marcador ITS1, corroborando los procesos de extinción y posterior recolonización desde la zona norte del linaje Sur. La población del extremo Norte (CDA) presenta un solo haplotipo para el marcador ITS1 como para el marcador COI (en el caso del COI este haplotipo corresponde al más común del linaje Sur, H19) lo que hace pensar que esta población fue una colonización muy reciente, probablemente ligada a actividades humanas o fenómenos de rafting.

BIBLIOGRAFÍA.

- Avise J., Arnold J., Bal R., Bermingham E., Lamb T., Neigel J., ReeB C., Saunders N. (1987).** Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.
- Avise J. (1998).** The history and purview the phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7: 371-379.
- Avise J. (2000).** *Phylogeography: The History and Formation of Species.* Haward University Press, Cambridge.
- Avise J. (2009).** Phylogeography retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* 36: 3-15.
- Bakker F., Olsen J. Stam W., (1995).** Evolution of nuclear rDNA ITS sequences in the *Cladophora albida/sericea* clade (Chlorophyta). *Journal of Molecular Evolution* 40: 640-651.
- Bandelt H., Forster P., Röhl A. (1999).** Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1):37-48.
- Bennett K.D., Tzedakis P. C., Willis K. J. (1991).** Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* 18: 103-115.
- Bermingham E. & Moritz C. (1998).** Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367-369.
- Bernatchez L. & Wilson C. (1998).** Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7:431-452.

- Benzie J., Price I., Ballment E. (1997).** Population genetics and taxonomy of *Caulerpa* (Chlorophyta) from the Great Barrier Reef, Australia. *Journal of Phycology* 33: 491-504.
- Bickford D., Lohman D., Sodhi N., Ng P., Meier R., Winker K., Ingram K. Das I. (2007).** Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22 (3): 148-155.
- Briggs J. (1995).** *Global biogeography*. Amsterdam: Elsevier.
- Broitman B.R., Navarrete S.A., Smith F., Gaines S.D. (2001).** Geographic variation of southeastern Pacific intertidal communities. *Marine Ecology Progress Series* 224: 21-34.
- Burton R. (1998).** Intraspecific phylogeography across the Point Conception biogeographic boundary. *Evolution* 52: 734-745.
- Buschmann A., Correa J., Westermeier R., Hernández M., Norambuena R.. (2001).** Red algal farming in Chile: a review. *Aquaculture* 194: 203-220.
- Buschmann A., Santelices B. (1987).** Micrograzers and spore release in *Iridaea laminarioides* Bory (Rhodophyta: Gigartinales). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 108: 171-179.
- Camus P. (2001).** Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 587-617.
- Castilla J., Navarrete S., Lubchenco J. (1993).** Southeastern Pacific coastal environments: main features, large scale perturbations, and global climate change. *Earth system responses to global change* (ed. by H. Mooney, E. Fuentes and B. Kronberg). Academic Press 167-188.

- Cho Y., Mower J., Qiu Y-L., Palmer J. (2004).** Mitochondrial substitution rates are extraordinarily elevated and variable in a genus of flowering plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101: 17741-17746.
- Colborn J., Crabtree R., Shaklee J., Pfeiler E., Bowen BW. (2001).** The evolutionary enigma of bonefishes (*Albula* spp.): cryptic species and ancient separations in a globally distributed shorefish. *Evolution* 55: 807-820.
- Collin R. (2001).** The effects of mode of development on phylogeography and population structure of North Atlantic *Crepidula* (Gastropoda: Calyptraeidae). *Molecular Ecology* 10: 2249–2262.
- Comes H., Kadereit J. (1998).** The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3: 432–438.
- Coyer J., Smith G., Andersen R. (2001).** Evolution of *Macrosystis* spp. (phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. *Journal of Phycology* 37: 574: 585.
- Cox B., Moore P. (2000).** *Biogeography: An ecological and evolutionary approach*. 6th Ed., Blackwell Science, Oxford.
- Dahlgreen T., Weinberg J., Halanych K. (2000).** Phylogeography of the ocean quahog (*Arctica islandica*): influences of paleoclimate on genetic diversity and species range. *Marine Biology* 137: 487-495.
- Dalén L., Nystro V., Valdiosera C., Germonpre M., Sablin M., Turner E., Angerbjö A., Arsuaga J., Götherström A. (2007).** Ancient DNA reveals lack of postglacial habitat tracking in the Arctic fox. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 6726–6729.

- Dawson M. (2001).** Phylogeography in coastal marine animals: a solution from California? *Journal of Biogeography* 28: 723-736.
- Dawson M. (2005).** Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography* 32: 515-533.
- DiSalvo L. (1988).** Observations on the larval and postmetamorphic life of *Concholepas concholepas* (Bruguière, 1789) in laboratory culture. *The Veliger* 30: 358–368.
- Dumolinn-Lapègue S., Demesure B., Fineschi S., Le Corre V., Petit R. (1997).** Phylogeographic structure of White Oaks Throughout the European Continent. *Genetics* 146: 1475-1487.
- Excoffier L., Smouse P., Quattro J. (1992).** Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Excoffier L. & P. Smouse P. (1994).** Using allele frequencies and geographic subdivision to reconstruct gene trees within a species: molecular variance parsimony. *Genetics* 136: 343-359.
- Excoffier L. (2004).** Patterns of DNA sequence diversity and genetic structure after a range expansion: lessons from the infinite-island model. *Molecular Ecology* 13: 853-864.
- Excoffier L. & Lischer H. (2010).** Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 56.

- Faugeron S., Valero M., Destombe C., Martínez E., Correa J. (2001).** Hierarchical spatial structure and discriminant analysis of genetic diversity in the red alga *Mazzaella laminarioides* (Gigartinales. Rhodophyta). *Journal of Phycology* 37: 705- 716.
- Fraser C., Thiel M., Spencer H., Waters M. (2010).** Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC Evolutionary Biology* 10:203.
- Fredericq S. & López-Bautista J. (2002).** Characterization and phylogenetic position of the red alga *Besa papillaeformis* Setchell: an example of progenetic heterochrony? *Constancea* 83.
- Freshwater W., Fredericq S., Butler B., Hommersand M., Chase M. (1994).** A gene phylogeny of the red algae (Rhodophyta) based on plastid *rbcL*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 7281-7285.
- Fu Y. (1997).** Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Gielly L., Taberlet P. (1994).** The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: non-coding vs. *rbcL* sequences. *Molecular Biology and Evolution* 11: 769–777.
- Hebert P., Ratnasingham S., de Waard J. (2003).** Barcoding animal life: cytochrome c oxidase 1 divergences among related species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: S96-S99.
- Helberg M., Burton R., Neigel J. Palumbi S. (2002).** Genetic assessment of connectivity among marine populations. *Bulletin of Marine Science* 70 (1): 273-290.

- Hewitt G. (1993).** Hybrid zones and Evolutionary Process. Ed. Harrison R., New York: Oxford University Press.
- Hewitt G. (1999).** Post-glacial re-colonization of European biota. *B Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.
- Hewitt G. (2000).** The genetic legacy of the the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt G. (2003).** Ice ages: their impact on species distributions and evolution. In *Evolution on Planet Earth*, Rothschild, L.J. and Lister, A.M., eds. Academic Press 339-361.
- Hewitt, G. (2004).** Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359: 183–195.
- Hoarau G., Coyer J., Veldsink J., Stam W., Olsen J. (2007).** Glacial refugia and recolonization pathways into the brown seaweed *Fucus serratus*. *Molecular Ecology* 16: 3606-3616.
- Hoffmann J., Cammus P. (1989).** Sinking rates and viability of spores from benthic algae in central Chile. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 126:281-91.
- Hoffmann, A., Santelices B. (1997).** *Flora Marina de Chile Central*. Ediciones Universidad Católica de Chile.
- Hommersand M., Guiry M., Fredericq S., Leister G. (1993).** New perspectives in the taxonomy of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta). *Hydrobiologia* 260/261: 105-120.

- Hommersand, M.H., Fredericq, S., and Freshwater, D.W. (1994).** Phylogenetic systematics and biogeography of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on sequence analysis of *rbcL*. *Botanica Marina* 37: 193-203.
- Hommersand M., Fredericq S., Freshwater W., Hughey J. (1999).** Recent developments in the systematic of the Gigartinaceae (Gigartinales, Rhodophyta) based on *rbcL* sequence analysis and morphological evidence. *Phycological Research* 47: 139-151.
- Hormazabal S., Shaffer G., Leth O. (2004).** Coastal transitions zone off Chile. *Journal of Geophysical Research* 109: 1-13.
- Hughey J., Silva P., Hommersand M. (2001).** Solving taxonomic and nomenclatural problems in Pacific gigartinacea (Rodophyta) using Dna from Type Material. *Journal of Phycology* 37: 1091-1109.
- Hulton N., Purves R., McCulloch R., Sugden D., Bentley M. (2002).** The Last Glacial Maximum and deglaciations in southern South America. *Quaternary Science Reviews* 21: 233-241.
- Irwin D. (2002).** Philogeographic breaks without geographic barriers to gen flow. *Evolution* 56: 2383-2394.
- Jara H., Moreno C. (1984).** Herbivory and structure in a Midlittoral Rocky Community: a case in southern Chile. *Ecology* 65: 28-38.
- Jobb G., Von Haeseler A., Strimmer K. (2004).** TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC Evolutionary Biology* 4:18.

- Jolly M., Jollivet D., F. Gentil, E. Thiebaut and F. Viard. (2005).** Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria korenni*, along the coast of France. *Heredity* 94: 23-32.
- Kamiya M., Zuccarello G., West J. (2004).** Phylogeography of *Calaglossa lepreurii* and related species (Delesseriaceae, Rhodophyta) based on the *rbcL* gene sequences. *The Japanese Journal of Phycology* 52: 147-151.
- Kimura M (1980).** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Klautau M., Russo C., Lazoski C., Boury-Esnault N., Thorpe J., Solé-Cava A. (1999).** Does cosmopolitanism in morphologically simple species result from overconservative systematics? A case study using the marine sponge *Chondrilla nucula*. *Evolution* 53: 1414–1422.
- Knowlton N. (1993).** Sibling species in the sea. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 189–216.
- Knowlton N, Weigt LA .(1998).** New dates and new rates for divergence across the Isthmus of Panama. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 265: 2257–2263.
- Knowlton N. (2000).** Molecular genetics analyses of species boundaries in the sea. *Hydrobiologia* 420: 73-90.
- Kogame K., Horiguchi T., Masuda M. (1999).** Phylogeny of the order Scytosiphonales (Phaeophyceae) based on DNA sequences of *rbcL*, partial *rbcS*, and partial LSU nrDNA. *Phycologia* 38 (6): 496-502.

- Konnert M., Bergman F. (1995).** The geographical distribution of genetic variation of silver fir (*Abies alba*, Pinaceae) in relation to its migration history. *Plant Systematics and Evolution* 196: 19-30.
- Kuhner M., Yamato J., Felsenstein J. (1998).** Maximum likelihood estimation of population growth rates based on coalescent. *Genetics* 149: 429-434.
- Lane C., Lindstrom S., Saunders G. (2007).** A molecular assessment of northeast Pacific Alaria species (Laminariales, Phaeophyceae) with reference to the utility of DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44: 634-648.
- Lane C., Mayes C., Druehl L., Saunders G., 2006.** A multi-gene molecular investigation of the kelp (Laminariales, Phaeophyceae) supports substantial taxonomic re-organization. *Journal of Phycology* 42: 493-512.
- Lee C. (2000).** Global phylogeography of a cryptic copepod species complex and reproductive isolation between genetically proximate 'populations'. *Evolution* 54: 2014-2027.
- Lin S., Fredericq S., Hommersand M. (2001).** Systematics of the Delesseriaceae (Ceramiales, Rhodophyta) based on LSU rDNA and *rbcL* sequences, including the Phycodryoideae, subfam. Nov. *Journal of Phycology* 37: 881-899.
- Macaya E. & Zucarello G. (2010).** Genetic structure of giant kelp *Macrosystis pyrifera* along the southeastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series* 420: 103-112.

- Maggs C., Castilho R., Foltz D., Henzler C., Taimour M., Kelly J, Olsen J., Perez K., Stam W., Vainola R., Viard F., Wares J. (2008).** Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic. *Ecology* 89 (11):108-122.
- Marko P., Hoffman J., Emme S., McGovern T., Keever C., Cox N. (2010).** The Expansion-Contraction model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change? *Molecular Ecology* 19: 146-149.
- Mathews L., (2006).** Cryptic biodiversity and phylogeographical patterns in a snapping shrimp species complex. *Molecular Ecology* 15: 4049-4063.
- McCulloch R., Bentley M., Purves R., Hulton N., Sugden D., Clapperton C. (2000).** Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary* 15: 409-417.
- McCarthy C. (1997).** *Chromas*. Griffith University, Brisbane, Queensland.
- Moreno C. A., Jaramillo E. (1983).** The role of grazers in the zonation of intertidal macroalgae of the Chilean coast. *Oikos* 42: 73-76.
- Navarrete S., Wieters E., Broitman B., Castilla J. (2005).** Scales of benthic–pelagic coupling and the intensity of species interactions: from recruitment limitation to top–down control. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102: 18046-18051
- Nei M. (1987).** *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New.

- Olsen J., Zechman F., Hoarau, Coyer J., Stam W, Valero M. and Åberg P. (2010).** The phylogeographic architecture of the furoid seaweed *Ascophyllum nodosum*: an intertidal 'marine tree' and survivor of more than one glacial–interglacial cycle. *Journal of Biogeography* 37: 842-856.
- Palumbi S. (1994).** Genetic divergence, reproductive isolation and marine speciation. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 25: 547-72.
- Petit R., El Mousadik A., Pons O. (1998).** Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology* 12: 844-855.
- Petit R., Aguinagalde I., de Beaulieu J., Bittkau C., Brewer S., Cheddadi R., Ennos R., Fineschi S., Grivet D., Lascoux M., Mohanty A., Müller-Starck G., Demesure-Musch B., Palme A., Martín J., Rendell S., Vendramin G. (2003).** Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. *Science* 300: 1563-1565.
- Provan J., Remi A., Wattier A., Maggs C. (2005).** Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology* 14: 793-803.
- Provan J., Bennet K. (2008).** Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia.. *Trends in Ecology and Evolution* 23 (10):564-571.
- Reeb C., Avise J. (1990).** A genetic discontinuity in a continuously distributed species: mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics* 124:397-406.

- Robba L., Russell J., Barker G., Brodie J. (2006).** Assessing the use of the mitochondrial COX1 marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *American journal of Botany* 93 (8): 1101-1108.
- Rocha-Olivares A, Fleeger JW, Foltz DW (2001).** Decoupling of molecular and morphological evolution in deep lineages of a meiobenthic harpacticoid copepod. *Molecular Biological and Evolution* 18: 1088-1102.
- Rogers A., Harpending H. (1992).** Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- Rozas J., Rozas R. (1999).** DnaSP version 3: an integrated program for molecular population genetics and molecular evolution analysis. *Bioinformatics* 15:174–175.
- Ruzzante D., Walde S., Cussac V., Dalebout M., Seibert J., Ortubay S., Habit E. (2005).** Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia. *Molecular Ecology* 15: 2949-2968.
- Saunders G. (1993).** Gel purification of red algal genomic DNA: an inexpensive and rapid method for the isolation of polymerase chain reaction-friendly DNA. *Journal of Phycology* 29: 251-254.
- Saunders G. (2005).** Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1879-1888.
- Santelices B., Correa J. A., Avila M. (1983).** Benthic algal spores surviving digestion by sea urchins. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 70: 263-269.

- Santelices B., Ugarte R. (1987).** Algal life-history strategies and resistance to digestion. *Marine Ecology Progress Series* 35: 267-275.
- Santelices B., (1989).** Algas marinas de Chile: distribución, ecología, utilización y diversidad. Universidad Católica de Chile, Santiago.
- Santelices B. (1991).** Littoral and sublittoral communities of continental Chile. In *Ecosystems of the World*, Mathieson, A.C., Nienhuis, P.H. Eds. Elsevier Science, New York.
- Santelices B., Martínez E. (1997).** Hierarchical analysis of reproductive potential in *Mazzaella laminarioides* (Gigartinaceae, Rhodophyta). *Phycologia* 36: 195-207.
- Soltis D. E., Gitzendanner M. A., Strenge D., Soltis P S. (1997).** Chloroplast Dna intraspecific phylogography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution* 196:19–30.
- Strub, T., Mesias, J., Montecinos, V., Rutllant, J. & Salinas, S. (1998).** Coastal ocean circulation off western South America. Coastal segment (6,E). In *The Sea*, Vol. 11, A.R. Robinson, K.H. Brink Eds. John Wiley & Sons, New York.
- Taberlet P., Bouvet J. (1994).** Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography and conservation genetics of the brown bear *Ursus arctos* in Europe. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 255: 195-200.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A-G., Cossons J. (1998).** Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7:453-464.

- Tajima F. (1989).** Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585–595.
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. and Kumar S. (2011)** MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* (submitted).
- Tellier F., Meynard A., Correa J., Faugeron S., Valero M. (2009).** Phylogeographic analyses of the 30° south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Molecular Phylogenetic and Evolution* 53:679-693.
- Thiel M., Macaya E., Acuña E., Arntz W., Bastias H., Brokordt K., Camus, P., Castilla J., Castro L., Cortés M., Dumont C., Escribano R., Fernandez M., Gajardo, J., Gaymer C., Gomez I., González A., González H., Haye, P.A., Illanes, J., Iriarte J., Lancellotti, D., Luna-Jorquera G., Luxoro C., Manriquez P., Marín V., Muñoz P., Navarrete S., Perez E., Poulin E., Sellanes J., Sepúlveda H., Stotz W., Tala F., Thomas A., Vargas C., Vasquez J., Vega J. (2007).** The Humboldt Current System of northern and central Chile. *Oceanography and Marine Biology Annual Reviews* 45: 195-344.
- Trontelj P., Machino Y., Sket B. (2005).** Phylogenetic and phylogeographic relationships in the crayfish genus *Austropotamobius* inferred from mitochondrial COI gene sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 34: 212-226.

- Van Oppen, M. J. H., H. Klerk, J. L. Olsen & W. T. Stam, 1996.** Hidden diversity in marine algae: some examples of genetic variation below the species level. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 76: 239–242.
- Vergara P., Buschmann A, Kuschel F. (1990).** Abundancia de amphipodos en el intermareal expuesto de Pucatrihue, Chile. *Revista de Biología Marina* 25:93-107.
- Vianna J., Ayerdi* P., Medina-Vogel G., Mangel J., Zeballos H., Apaza M., Faugeron S. (2011).** Phylogeography of the Marine Otter (*Lontra felina*): Historical and Contemporary Factors Determining Its Distribution. *Journal of Heredity* 101 (6): 676-689.
- Vianna J., Ayerdi* P., Medina-Vogel G., Chehébar C., Sielfeld W., Olavarría C., Faugeron S. (2011).** Phylogeography of the Patagonian Otter *Lontra provocax*: Adaptive divergence to marine habitat or signature of southern glacial refugia? *BMC Evolutionary Biology* 11:53.
- Ward R., Zemlak T., Innes B., Last P., Hebert P. (2005).** Dna Barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 360: 1847-1857
- Wares J., Cunningham C. (2001).** Phylogeography and historical ecology of the north atlantic intertidal. *Evolution* 55 (12): 2455-2469.
- Wiens J. (2004).** What is speciation and how should we study it? *American Naturalist* 163: 914-923.
- Williams M., Dunkerley D., De Deckker P., Kershaw P., Chappell J. (1998).** Quaternary environments. Edward Arnold, London.

- Wilson A., Cann R., Carr S., George M., Gyllensten U., Helm-Bychowski K. (1985).** Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological Journal of the Linnean Society* 26: 375-400.
- Weir B. & Cockerham C. (1984).** Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Xu J., Pérez-Losada M., Jara C., Crandall K. (2009).** Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Molecular Ecology* 15: 904-918.
- Zakas C., Binford J., Navarrete S., Wares J. (2009).** Restricted gene flow in Chilean barnacles reflects an oceanographic and biogeographic transition zone. *Marine Ecology Progress Series* 394: 165-177.
- Zuccarello G., Burger G., West J., King R. (1999).** A mitochondrial marker for red algal intraspecific relationship. *Molecular Ecology* 8: 1443-1447.
- Zuccarello G., Sandercock B., West J. (2002).** Diversity within red algal species: variation in world-wide samples of *Spyridia filamentosa* (Ceramiaceae) and *Murayella pericladus* (Rhodomelaceae) using DNA markers and breeding studies. *European Journal of Phycology* 37: 403-17.
- Zuccarello G & West J. (2002).** Phylogeography of the *Bostrychia calliptera* — *B. pinnata* complex (Rhodomelaceae, Rhodophyta) and divergence rates based on nuclear, mitochondrial and plastid DNA markers. *Phycologia* 41: 49–60.
- Zuccarello G. Lokhorst G. (2005).** Molecular phylogeny of the genus *Tribonema* (Xanthophyceae) using *rbcl* gene sequence data: monophyly of morphologically simple algal species. *Phycologia* 44: 384-392.