



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

PATRONES FILOGEOGRÁFICOS DE
DOS MOLUSCOS INTERMAREALES A
LO LARGO DE UN GRADIENTE
BIOGEOGRÁFICO EN LA COSTA
NORTE DEL PERÚ

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN
CIENCIAS DEL MAR

BACH. SERGIO BARAHONA PADILLA

LIMA – PERÚ

2017

ASESOR DE LA TESIS

Aldo Santiago Pacheco Velásquez

PhD. en Ciencias Naturales

Profesor invitado de la Maestría en Ciencias del Mar de la
Universidad Peruana Cayetano Heredia

Laboratorio CENSOR, Instituto de Ciencias Naturales Alexander Von
Humboldt, Universidad de Antofagasta, Chile

CO-ASESORA DE LA TESIS

Ximena Vélez Zuazo

PhD. en Ecología y Evolución

Directora del Programa Marino de Monitoreo y Evaluación de la Biodiversidad (BMAP) del Instituto Smithsonian de Biología de la Conservación, Perú

JURADO EVALUADOR DE LA TESIS

Dr. Dimitri Gutiérrez Aguilar (Presidente)

Dr. Pedro Tapia Ormeño (Secretario)

Dr. Jorge Rodríguez Bailón (Vocal)

DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada a mi amada familia, a mis dos padres y a mi hermana, quienes estuvieron, están y estarán siempre allí, apoyándome y dándome ánimos para seguir adelante en esta ardua pero satisfactoria labor que es la investigación.

AGRADECIMIENTOS

La presente tesis fue financiada por la beca de estudios de posgrado otorgada por FONDECYT (Fondo Nacional de Desarrollo Científica, Tecnológico y e Innovación Tecnológica), CIENCIACTIVA y el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONCYTEC) del Ministerio de Educación del Perú, en el marco del programa de posgrado de Ciencias del Mar de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

A mi asesor, Aldo Pacheco Velásquez, por su paciencia y significativos aportes de conocimiento que permitieron atacar la tesis desde varias perspectivas. A mi co-asesora Ximena Vélez-Zuazo, a quien considero una hermana mayor, por el constante ánimo y soporte durante la ejecución de la tesis. A ambos, por ser excelentes asesores, ¡Gracias!

A los profesores del programa de Maestría de Ciencias del Mar, y en especial al profesor Dimitri Gutiérrez, por todas las enseñanzas que me han permitido entender al océano y ampliar mi visión sobre el estudio de la genética de organismos marinos. Finalmente, puedo ver las dos caras de la misma moneda: la parte molecular y la parte ecológica-oceanográfica.

A Mónica Santa María, Directora Técnica del Laboratorio de Análisis Biomoleculares (BIOAL SAC), quien me apoyó directamente en la ejecución de la tesis y de quien recibí continuas y acertadas sugerencias para conseguir mi objetivo.

Al equipo de BIOAL SAC, Jorge Luis Lara y Karin Vega Rivera, gracias por su apoyo también.

A Bruno Ibáñez por sus valiosos consejos para la salida de campo y a Claudia Tejada por enseñarme a identificar las especies de moluscos intermareales. A André Ampuero por ayudarme a fotografiar mis especímenes y a Paola Castro por sus acertadas sugerencias.

Un agradecimiento especial a Johnny Dávila, quien me acompañó en la aventura del muestreo desde Ecuador hasta el centro de la costa peruana. A Danny Solís y a Johan Maguiña por su enorme apoyo desinteresado y cordial durante mi corta estadía en Ecuador ¡Gracias totales!

RESUMEN

La zona de transición marino-costera ubicado entre los 4°-6°S es el único límite biogeográfico reconocible en el ecosistema marino del Perú. A pesar de su relevancia oceanográfica, biogeográfica y ecológica, no se conocen las implicancias de dicha región en la conectividad genética entre especies marinas cuyos rangos de distribución atraviesen este límite biogeográfico. El presente estudio evaluó el efecto de esta zona de transición sobre el flujo génico de dos especies de moluscos intermareales (*Echinolittorina paytensis* y *Brachidontes adamsianus*) haciendo uso de análisis filogeográficos y de genética de poblaciones basados en secuencias de dos marcadores mitocondriales: Citocromo Oxidasa I y 16SrRNA. Se encontró que los linajes genéticos detectados en ambas especies no son concordantes con la zonación biogeográfica, sugiriendo que la presencia de la zona de transición no ha funcionado como una barrera para el flujo génico. Los altos niveles de flujo génico y la falta de estructuración genética en estas especies parecen ser el efecto de sus altas capacidades de dispersión larval. Pero debido a los cambios oceanográficos interanuales provocados por los eventos ENSO es posible que la zona de transición constituya una barrera inestable. Por ello se propone que los Eventos ENSO son la causa de la falla en la barrera al flujo de genes en la zona de transición siendo un factor importante en gatillar la conectividad genética en *Echinolittorina paytensis*. Así mismo, los análisis de historia demográfica revelaron que *Echinolittorina paytensis* pasó por una expansión demográfica ancestral, mientras que el mitílido *B. adamsianus* mantuvo un tamaño poblacional constante a través del tiempo. Se propone que la aparición de los eventos ENSO durante el Pleistoceno tardío generó condiciones ambientales ideales para una expansión poblacional en *E. paytensis*. Se

concluye que la especie intermareal *Echinolittorina paytensis* puede traspasar tres unidades biogeográficas sin presentar estructuración genética.

Palabras Clave: Zona de Transición, ADN mitocondrial, Biogeografía, Flujo génico, Intermareal rocoso, eventos ENSO

ABSTRACT

The marine transition zone located between 4°-6°S is the only recognizable biogeographical boundary in the Peruvian marine ecosystem. Despite its oceanographic, biogeographic and ecological relevance, studies regarding genetic connectivity in marine species whose distribution ranges across this transition zone are lacking. This study researched the transition zone effect on gene flow of two intertidal mollusk species (*Echinolittorina paytensis* and *Brachidontes adamsianus*) using both phylogeographical and population genetics analyses based on two mitochondrial markers (Cytochrome Oxidase I and 16SrRNA). No concordant genetic lineages in both species with biogeographical zonation were found, which it suggests that the presence of the transition zone has not functioned as a historical barrier to gene flow.

The high levels of gene flow and lack of genetic structure across the transition zone appear to be the effect of their high capacities of larval dispersion. But due to the interannual oceanographic changes provoked by the ENSO events, it is possible that the transition zone constitutes an unstable barrier. Therefore it is proposed that these events are the cause of the failure in the barrier to gene flow through the transition region and are responsible for triggering the genetic connectivity in *E. paytensis*. Likewise, historical demography analyses revealed that *Echinolittorina paytensis* went through an ancestral demographic expansion, while that *B. adamsianus* maintained a constant population size through the time. It is discussed and proposed that the appearance of ENSO events during the late Pleistocene generated ideal environmental conditions for a population expansion in *E.*

paytensis. It is concluded that the intertidal species *Echinolittorina paytensis* can cross the three biogeographic units without presenting genetic structure.

Keywords: Transition Zone, Mitochondrial DNA, Biogeography, Gene Flow, Rocky Intertidal, ENSO events

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN	3
2.1. Planteamiento del problema	3
2.2. Marco teórico	5
2.2.1. Flujo génico a través de las barreras oceanográficas	5
2.2.2. Límites biogeográficos marino-costeros.....	6
2.2.3. Análisis genético	7
2.2.4. Estudios de filogeografía en zonas de transición biogeográfica.....	12
2.2.5. La zona de transición biogeográfica de la costa norte del Perú.....	16
2.2.6. Capacidad de dispersión en invertebrados intermareales	19
2.2.7. Marcadores mitocondriales: COI y 16SrRNA.....	19
2.2.8. Especies en estudio	20
2.3. Justificación del estudio	22
2.4. Objetivos	24
2.4.1. General.....	24
2.4.2. Específicos	24
2.5. Hipótesis.....	25
3. METODOLOGÍA	26
3.1. Diseño del estudio	26
3.2. Población	26
3.3. Muestra.....	26
3.4. Operacionalización de variables.....	27
3.5. Procedimientos y técnicas	28
3.5.1. Procedimiento de Muestreo	28
3.5.2. Procedimiento de Laboratorio	30
3.6. Consideraciones éticas	33
3.7. Plan de análisis	34
3.7.1. Ensamblaje y comprobación de secuencias de ADN.....	34
3.7.2. Alineamiento.....	35
3.7.1. Código de barras de ADN.....	35

3.7.2. Diversidad genética.....	36
3.7.3. Redes de haplotipos	36
3.7.4. Análisis de clados anidados	36
3.7.5. Análisis filogenético	38
3.7.6. Estructura genética.....	38
3.7.7. Flujo génico	39
3.7.8. Historia demográfica.....	40
4. RESULTADOS	43
4.1. Muestreo y obtención de secuencias	43
4.2. Identificación morfológica y genética.....	46
4.3. Diversidad genética	51
4.4. Redes de haplotipos y Análisis de clados anidados	54
4.5. Análisis filogenético.....	62
4.6. Estructura genética	63
4.7. Flujo génico.....	67
4.8. Historia demográfica	69
5. DISCUSIÓN.....	75
5.1. Estructura genética	75
5.1.1. Factor biológico: capacidad de dispersión larval.....	76
5.1.2. Factor climático-ambiental: eventos ENSO	79
5.2. Filogeografía e Historia demográfica.....	85
6. CONCLUSIONES.....	91
7. RECOMENDACIONES	92
8. REFERENCIAS	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Ubicación geográfica de la Zona de Transición de la costa norte del Perú. Se indican algunas localidades importantes. Leyenda de corrientes superficiales: PCC (Peruvian Coastal Current) y EPCC (Ecuador-Peru Coastal Current) (Fuente: Sergio Barahona)..... 18
- Figura 2. Ubicación de los genes 16S y COI en el genoma mitocondrial20
- Figura 3. Mapa indicando las localidades de muestreo y las zonas biogeográficas a las que pertenecen. El mapa en la esquina superior derecha indica el contexto geográfico del estudio (Fuente: Sergio Barahona)29
- Figura 4. Ciclos de una reacción en cadena de la Polimerasa32
- Figura 5. Poblaciones y zonas biogeográficas de *E. paytensis* utilizados para el análisis molecular (Fuente: Sergio Barahona)44
- Figura 6. Poblaciones y zonas biogeográfica de *B. adamsianus* utilizados para el análisis molecular (Fuente: Sergio Barahona)45
- Figura 7. Ejemplares de *Echinolittorina paytensis* colectados en A) Cangrejos (Paita), B) Anconcito (Ecuador) y C) Bonanza (Zorritos) mostrando la apertura con el opérculo retirado. Se aprecia el color blanco del último anfracto con un patrón de puntos propio de cada individuo y la banda color marrón oscuro en la apertura.46
- Figura 8. Árbol Neighbor-Joining (modelo de sustitución Kimura 2-parámetros) construido con las secuencias COI de los especímenes colectados de *E. paytensis* (azul) y secuencias COI obtenidos del GenBank de las especies evolutivamente más cercanas (en colores).....47
- Figura 9. Barcode gap en *E. paytensis*48
- Figura 10. Diferentes especímenes *B. adamsianus* colectados en la costa norte del Perú. Se aprecia una variabilidad en el patrón de coloración y en la forma. Fotografías en posición dorsal49
- Figura 11. Árbol de distancias Neighbor-Joining (construido bajo el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros) con las secuencias COI de *Brachidontes adamsianus* mostradas como haplotipos (azul) y secuencias COI de especies cercanas (en colores).50
- Figura 12. Barcode gap en *B. adamsianus*.51
- Figura 13. Segmento del alineamiento del marcador 16SrRNA en *B. adamsianus* mostrando eventos indels de gran longitud.53
- Figura 14. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (izquierda) y red de haplotipos anidado (derecha) para *E. paytensis* en base al marcador mitocondrial COI. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermediarios que no fueron encontrados en la muestra. Las frecuencias se indican en la parte inferior..... 57
- Figura 15. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Tamura-Nei (TrN) (izquierda) y red de haplotipos anidado (derecha) para *E. paytensis* en base al marcador mitocondrial 16SrRNA. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan

haplotipos intermediarios que no fueron encontrados en la muestra. Las frecuencias se indican en la parte inferior.....58

Figura 16. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) y red de haplotipos anidado para *B. adamsianus* en base al marcador mitocondrial COI. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermediarios que no fueron encontrados en la muestra. La clave de frecuencias haplotípicas es mostrada como semicircunferencias en la derecha.....60

Figura 17. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) Y red de haplotipos anidado para *B. adamsianus* en base al marcador mitocondrial 16SrRNA. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermediarios que no fueron encontrados en la muestra. La clave de frecuencias haplotípicas es mostrada como semicircunferencias en la derecha61

Figura 18. Ubicación geográfica de las dos barreras genéticas principales (mostradas como líneas gruesas rojas) detectadas en *E. paytensis* y en *B. adamsianus*. Las barreras genéticas fueron detectadas usando matrices de distancias F_{ST} con el software BARRIER. Se muestra la triangulación de Delaunay y el teselado de Voronoi como líneas verdes y cuadriláteros azules respectivamente.66

Figura 19. Niveles y direccionalidad del flujo génico en *E. paytensis* y *B. adamsianus* expresados como número de inmigrantes hembras por generación (N_m) entre las zonas biogeográficas. La Provincia Panameña (1-rojo), Zona de Transición (2-verde) y Provincia Peruana (3-azul) son representadas por circunferencias cuyos tamaños son proporcionales a sus respectivos tamaños efectivos poblacionales (Θ) estimados por el programa MIGRATE.....68

Figura 20. Distribuciones Mismatch de *E. paytensis*. Se muestran los valores de las pruebas de bondad de ajuste (SSD y Hri) a la curva esperada bajo el modelo de expansión. Leyenda: SSD = Suma de las desviaciones de los cuadrados, Hri = Harpending's Ragedness Index.....69

Figura 21. Distribuciones Mismatch en *B. adamsianus*. Se muestran los valores de las pruebas de bondad de ajuste (SSD y Hri) a la curva esperada bajo el modelo de expansión. Leyenda: SSD = Suma de las desviaciones de los cuadrados, Hri = Harpending's Ragedness Index.....71

Figura 22. Bayesian Skyline Plots (BSP) mostrando las tendencias en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo en *E. paytensis*. Las estimaciones del tiempo a lo largo del eje-x fueron obtenidos asumiendo una tasa de mutación de 2.6% por millón de años para ambos marcadores genéticos. El eje-y muestra el número efectivo de individuos (N_e). La línea negra sólida representa el estimado promedio del tamaño poblacional. La zona sombreada de azul muestra los intervalos de 95% HPD (Highest posterior density). Leyenda: LGM = Último Glacial Máximo73

Figura 23. Bayesian Skyline Plot (BSP) mostrando las tendencias en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo en *B. adamsianus*. Las estimaciones del tiempo a lo largo del eje-x fueron obtenidos asumiendo una tasa de mutación de 2% por millón de años para ambos marcadores genéticos. El eje-y muestra el número efectivo de individuos (N_e). La línea negra sólida representa el estimado promedio del tamaño poblacional mientras que la zona sombreada de azul muestra los intervalos de 95% HPD (Highest posterior density). Leyenda: LGM = Último Glacial Máximo ..74

Figura 24. Probable secuencia de eventos históricos que determinaron el patrón filogeográfico de *E. paytensis* en la costa peruana. Leyenda: LGM = Last Glacial Maximum, ka = mil años, ma = millón de años, ENSO = El Niño-Southern Oscillation, // = Pleistoceno temprano y medio.89

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Información de las localidades de muestreo.....	27
Tabla 2. Operacionalización de variables.....	28
Tabla 3. Cebadores de los marcadores COI y 16SrRNA	33
Tabla 4. Número de individuos secuenciados para ambos marcadores genéticos por población y zona biogeográfica en <i>E. paytensis</i>	43
Tabla 5. Número de individuos secuenciados para ambos marcadores genéticos por población y zona biogeográfica en <i>B. adamsianus</i>	45
Tabla 6. Índices de diversidad genética en <i>E. paytensis</i>	52
Tabla 7. Índices de diversidad genética en <i>B. adamsianus</i>	54
Tabla 8. Cadena de inferencia para clados significativos en <i>E. paytensis</i> provistos por el análisis NCA para el marcador COI.....	55
Tabla 9. Cadena de inferencia para clados significativos en <i>E. paytensis</i> provistos por el análisis NCA para el marcador 16SrRNA.....	56
Tabla 10. Cadena de inferencia para clados significativos en <i>B. adamsianus</i> provistos por el análisis NCA para el marcador COI.....	59
Tabla 11. Pruebas de AMOVA en <i>E. paytensis</i>	63
Tabla 12. Pruebas de AMOVA en <i>B. adamsianus</i>	64
Tabla 13. Distancias genéticas FST a pares de poblaciones para ambos marcadores en <i>E. paytensis</i> . Por debajo de la diagonal se muestran las distancias FST para el marcador COI y por encima las distancias FST para el marcador 16SrRNA.....	64
Tabla 14. Distancias genéticas FST a pares de poblaciones para ambos marcadores en <i>B. adamsianus</i> . Por debajo de la diagonal se muestran las distancias FST para el marcador COI (660pb) y por encima las distancias FST para el marcador 16SrRNA (536 pb). * Distancias genéticas significativas, $P < 0.05$).....	65
Tabla 15. Estimaciones del flujo génico en <i>E. paytensis</i> y <i>B. adamsianus</i>	67
Tabla 16. Tests de Neutralidad y estadísticos de Distribución Mismatch en <i>E. paytensis</i>	70
Tabla 17. Tests de Neutralidad y Distribución Mismatch en <i>B. adamsianus</i>	71
Tabla 18. Comparación de la estructura genética global (Φ ST) y el modo de desarrollo larval entre distintos gastrópodos marinos intermareales.....	77

ABREVIATURAS

AES	Aguas Ecuatoriales Superficiales
ATS	Aguas Tropicales Superficiales
16SrRNA	Subunidad Mayor ribosomal 16S
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
COI	Citocromo Oxidasa I
dNTP	<i>Deoxynucleotide triphosphates</i>
LGM	<i>Last Glacial Maximum</i>
MCMC	<i>Markov Chain Monte Carlo</i>
mM	milimolar
μl	microlitros
μM	micromolar
ng	nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TAMA	<i>Termally Anomalous Molluscan Assemblages</i>
TSM	Temperatura Superficial del Mar
U	Unidad enzimática
UV	Ultra Violeta

1. INTRODUCCIÓN

Los límites biogeográficos marinos juegan un rol importante en la conectividad de las poblaciones al actuar potencialmente como barreras para la dispersión. En particular, los patrones de circulación marina y los gradientes abióticos presentes en estos límites biogeográficos pueden limitar el reclutamiento y fomentar la retención larval. A escalas de tiempo evolutivo, estos factores pueden demarcar linajes genéticamente distintos dentro de las especies e impactar la estructura genética vía selección natural o regulación del flujo génico interpoblacional. La existencia de linajes genéticos asociados con límites biogeográficos son conocidos como “quiebres filogeográficos”.

La costa norte del Perú presenta un escenario oceanográfico complejo debido a la convergencia entre el sistema de la corriente de Humboldt y el Pacífico Este tropical. La consecuencia ecológica directa es el establecimiento de límites en los rangos de distribución de las especies dependiendo de su afinidad biogeográfica por uno u otro ecosistema. Este límite biogeográfico no constituye un cambio brusco sino una zona de transición gradual dado los reportes de coexistencia de especies marinas provenientes de la Provincia Panameña y Peruana. Aunque esta zona de transición ha sido objeto de estudios biogeográficos y taxonómicos, hasta la fecha no se han reportado estudios de genética molecular que investiguen el rol de esta zona de transición de los 4°-6°S sobre la conectividad marina y su influencia en la estructuración genética de las especies distribuidas a lo largo de esta región (e.g. invertebrados intermareales).

Los análisis genéticos de especies distribuidas en ambos sistemas adyacentes contrastantes pueden proveer una prueba adecuada para evaluar la concordancia entre la distribución de linajes genéticos y la biogeografía. Los moluscos, al ser organismos conspicuos en el hábitat intermareal y tener historia de vida particulares (e.g. dispersión larval y sesilidad adulta), constituyen un taxa apropiado para estudiar estos procesos de conectividad y formación de linajes genéticos. Así, en el presente trabajo se investigó el rol de la zona de transición en el flujo de genes y, por ende, en la conectividad genética de las poblaciones de dos especies moluscos intermareales: el litorínido *Echinolittorina paytensis* y el mitílido *Brachidontes adamsianus*, haciendo uso de las herramientas de la filogeografía y genética de poblaciones. Principalmente, se examinó la hipótesis de que la zona de transición del norte peruano constituye una barrera para el flujo de genes que provoca la aparición de linajes genéticos concordantes con las zonas biogeográficas.

2. PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACIÓN

2.1. Planteamiento del problema

Las barreras oceanográficas constituyen todos los cambios en las condiciones físico-químicas del océano capaces de restringir la dispersión de los organismos marinos. Las zonas limítrofes entre provincias biogeográficas marino-costeras, o zonas de transición, son un ejemplo de barrera oceanográfica. Estas zonas suelen aparecer generalmente en puntos de convergencia entre sistemas marinos asociados con corrientes marinas o giros oceánicos.

Se han reportado quiebres filogeográficos en especies marinas en varios límites biogeográficos alrededor del mundo. Por ejemplo, en la Península de Florida, la cacerola de mar *Limulus polyphemus* y la ostra del Atlántico *Crassostrea virginica* exhiben discontinuidades genéticas concordantes con el extremo sur de la península de Florida (Saunders *et al.*, 1986; Reeb & Avise, 1990). A los 30°S de la costa chilena, límite entre la Provincia Peruana y el Área Intermedia, el cirrípedo *Notochthamalus scabrosus*, el alga parda *Lessonia nigrescens*, y los gastrópodos *Acanthina monodon* y *Crepidatella dilatata* también exhiben discontinuidades genéticas a lo largo de este quiebre biogeográfico (Tellier *et al.*, 2009; Zakas *et al.*, 2009; Sánchez *et al.*, 2011; Brante *et al.*, 2012; Zakas *et al.*, 2014).

Desde el punto de vista biogeográfico, el litoral peruano se encuentra dividido en dos provincias: la Provincia del Pacífico Sureste Templado-cálido y la Provincia del Pacífico Este Tropical (Spalding *et al.*, 2007) conocidas también como Provincia Peruana y Provincia Panameña respectivamente. La región costera comprendida entre los 4°S y 6°S es considerada la zona de transición entre estas

dos provincias (Olsson, 1961; Hooker, 2013; Ibáñez, 2016; Tejada, 2016). Contrastantes creando un ecotono. En aguas superficiales, convergen dos corrientes marinas: la Corriente Costera Peruana (PCC: *Peruvian Coastal Current* o Corriente de Humboldt) y la Corriente Costera Ecuador-Perú (EPCC: *Ecuador-Peru Coastal Current* o Corriente El Niño) (Strub et al., 1998).

Hasta la fecha, no se conoce si la zona de transición de los 4°-6°S actúa como una barrera para el flujo génico en especies marinas ¿Afecta este límite biogeográfico a la conectividad de las especies marinas, en específico, de las especies de invertebrados del intermareal rocoso? Para responder esta pregunta, se realizó un estudio filogeográfico y genético-poblacional empleando los marcadores mitocondriales Citocromo Oxidasa I (COI) y 16SrRNA en dos especies de moluscos comunes en el intermareal rocoso de la costa norte del Perú: *Echinolittorina paytensis* (Philippi, 1847) (Gastropoda: Littorinidae) y *Brachidontes adamsianus* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) (Ramírez et al., 2003; Paredes et al., 2016).

2.2. Marco teórico

2.2.1. Flujo génico a través de las barreras oceanográficas

Debido a la aparente ausencia de barreras físicas en el océano, es generalmente predicho que el flujo génico está correlacionado con la capacidad de dispersión larval (Scheltema, 1975; Hedgecock, 1986). Las larvas pueden dispersarse grandes distancias al ser transportadas por las corrientes y conectar poblaciones separadas por cientos de kilómetros (Lessios *et al.*, 1998; Waples, 1998) y debido a esto se creó la expectativa de que las poblaciones marinas son demográficamente “abiertas” (Cowen *et al.*, 2000). El reporte de larvas de invertebrados costeros a menudo muy alejadas de la costa (Scheltema, 1988) y el bajo nivel estructuración genética comúnmente encontrado reforzaba esta premisa (Palumbi, 1994; Kinlan & Gaines, 2003; Levin, 2006). Sin embargo, altos niveles de dispersión no siempre se traducen en altos niveles de flujo génico (Weersing & Toonen, 2009). Hay reportes de estructuración genética en organismos marinos con alta capacidad de dispersión (Jolly *et al.*, 2005; Kenchington *et al.*, 2006; Ayre *et al.*, 2009). Estas faltas de correlación entre el potencial de dispersión y la dispersión real revelaron que existen factores conocidos como barreras oceanográficas que pueden restringir la dispersión larval.

Existen varias barreras oceanográficas alrededor del mundo que funcionan a su vez como barreras al flujo génico. Por ejemplo, las barreras oceanográficas más grandes son las que se encuentran entre cuencas oceánicas, e.g. la Barrera del Pacífico Oriental (Lessios *et al.*, 1998), la Barrera Indo-Pacífica (Gaither *et al.*, 2010) y la Barrera Sureste-Australiana (Coleman *et al.*, 2011). A una escala espacial

menor, algunas barreras oceanográficas incluyen las plumas de agua dulce (Lessios *et al.*, 2003), los focos de afloramiento (Henriques *et al.*, 2014; Rocha *et al.*, 2005), los frentes oceánicos (Gilg & Hilbish, 2003; Galarza *et al.*, 2009; Patarnello *et al.*, 2007), los giros oceánicos (Weersing & Toonen, 2009) y la convergencia entre corrientes marinas (Palumbi, 1994; Zane *et al.*, 1998; Rocha-Olivares & Vetter, 1999; Zane & Patarnello, 2000; Barber *et al.*, 1998; White *et al.*, 2010; Schunter *et al.*, 2011). Estas últimas barreras oceanográficas usualmente coinciden con zonas de transición biogeográfica (Collin, 2001; Dawson, 2001; Luttikhuisen *et al.*, 2008; Kelly & Palumbi, 2010; Teske *et al.*, 2011; Haye *et al.*, 2014; Villamor *et al.*, 2014).

El flujo génico en el medio marino depende de la dispersión larval, la cual es el producto de la interacción entre factores biológicos (e.g. modo de desarrollo, duración pelágica, comportamiento gregario) (Toonen & Pawlik, 2001) y factores físicos tales como las mencionadas barreras oceanográficas (Toonen & Pawlik, 2001; Sköld *et al.*, 2003; Ayre *et al.*, 2009).

2.2.2. Límites biogeográficos marino-costeros

Una de las barreras oceanográficas más reconocidas son los límites entre provincias biogeográficas marinas (Avisé, 2000; Dawson, 2001). Los límites biogeográficos aparecen en zonas donde coinciden los límites de distribución de varias especies ampliamente distribuidas (Briggs, 1974). En América, estos límites ocurren típicamente sobre varios grados de latitud exhibiendo un gradiente de reemplazo gradual de especies, i.e. son zonas de transición (Hayden & Dolan, 1976; Seapy & Littler, 1993). Las zonas de transición son áreas con características físicas, condiciones ambientales y/o factores ecológicos que permiten el solapamiento o co-

ocurrencia de dos o más componentes bióticos con afinidades biogeográficas distintas (Ferro & Morrone, 2014).

En el medio marino, las características físicas que originan zonas de transición suelen estar relacionadas con la convergencia o divergencia entre corrientes y/o giros costeros/oceánicos. Debido a que las corrientes tienen su origen en latitudes y profundidades diferentes, estas se componen por masas de agua con distintas características. En particular, sus temperaturas son usualmente diferentes. Como resultado, la convergencias de corrientes generan cambios abruptos en la temperatura del agua los cuales imponen cambios fisiológicos en algunos organismos marinos limitando su distribución geográfica y por ende generando un límite biogeográfico (Gaylord & Gaines, 2000). Por tanto, se espera que las zonas de transición actúen como barreras oceanográficas para la dispersión larval debido a que poseen (i) regímenes hidrodinámicos que limitan el reclutamiento larval y (ii) gradientes en parámetros abióticos, e.g. TSM y salinidad, que limitan potencialmente el rango de tolerancia fisiológica de las especies marinas (Briggs, 1974; Fischer, 1960).

2.2.3. Análisis genético

2.2.3.1. Diversidad genética

La diversidad genética se define la cantidad o suma de la variación genética presente en una población o especie como consecuencia de su evolución (Frankham et al 2002). La diversidad genética actúa como un reservorio que permite la adaptación a los cambios ambientales y es estimada mediante

parámetros o índices que cuantifican la variación genética encontrada en los marcadores moleculares empleados.

Por ejemplo, en base a alineamientos de secuencias de ADN (e.g. marcadores mitocondriales) se puede contar directamente varios estimadores de diversidad genética tales como (1) el número de sitios polimórficos (S), el cual indica el número de posiciones en el alineamiento donde ha ocurrido un polimorfismo (el cual puede ser una transición o una transversión), (2) los indels o eventos de inserción-delección, los cuales también pueden ser considerados como sitios polimórficos, (3) el número de mutaciones (E_{ta}) que indica el número de cambios mutacionales y (4) el número de haplotipos (H) indica el número de secuencias diferentes que existen en la población. Un haplotipo mitocondrial se define como una variante de secuencia producto de la combinación determinada de polimorfismos.

Pero los índices de diversidad genética más utilizados son (1) la diversidad haplotípica (H_d) (Nei, 1987), definida como la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes, y (2) la diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987), definida como la probabilidad de que dos nucleótidos tomados al azar sean diferentes. El valor de la diversidad haplotípica es cero cuando todos los individuos de la población poseen el mismo haplotipo, y 1 cuando todos los individuos exhiben haplotipos diferentes. Este índice depende tanto del número de haplotipos como de sus frecuencias (número de individuos que posean un determinado haplotipo). Si las frecuencias de los haplotipos son relativamente equitativas, sin predominancia de un haplotipo en particular, la diversidad haplotípica será alta. Por el contrario, si un haplotipo en particular es predominante en la población, se espera que la

diversidad haplotípica de dicha población sea baja. Por su lado, la diversidad nucleotídica depende de las frecuencias de los haplotipos como del número de diferencias nucleotídicas entre ellos (i.e. diferencias a pares de secuencias).

2.2.3.2. Redes de haplotipos

Una red de haplotipos (*haplotype network*, en inglés) es un gráfico que permite visualizar, además de las relaciones genéticas entre los haplotipos, las frecuencias de estos, los pasos mutacionales que los separan y los haplotipos faltantes o no muestreados. También permite investigar el nivel de flujo génico, el grado de estructuración genética, la asociación geográfica e incluso dar información acerca del pasado demográfico de la población. En estas redes, los haplotipos son representados como circunferencias con tamaños proporcionales a sus frecuencias, y las conexiones entre haplotipos representan a los eventos coalescentes. En base a los principios de coalescencia se pueden hacer las siguientes predicciones: (i) los haplotipos de mayor frecuencia tienen alta probabilidad de ser ancestrales, (ii) los haplotipos que tienen múltiples conexiones muy probablemente sean ancestrales, (iii) dentro de la red los haplotipos ancestrales son interiores y los haplotipos nuevos tienen mayor probabilidad de ser periféricos o “de punta”, (iv) se espera que los haplotipos ancestrales tengan una amplia distribución geográfica básicamente porque los individuos han tenido más tiempo para dispersarse, y (v) los haplotipos con una única conexión se espera que estén unidos a haplotipos de la misma población dado que han evolucionado recientemente y no han tenido mucho tiempo para dispersarse (Clement et al., 2000).

2.2.3.3. Estructura genética

La estructura genética se define como la distribución espacial de la diversidad genética (Chakraborty, 1993). Una estructuración genética alta implica fuertes diferencias en las frecuencias genéticas (frecuencias de los haplotipos) entre las poblaciones. En contraste, una baja estructura genética implica que las poblaciones que la constituyen son casi idénticas a nivel genética, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias de los haplotipos.

La estructura genética está determinada por dos fuerzas principales: la deriva génica y el flujo génico (migración). Si una población está estructurada es casi seguro que la población ha sido pequeña (ha habido una intensa deriva génica) y/o ha existido poco flujo génico (migración). Si la población es pequeña la deriva génica es la fuerza principal que determina las frecuencias de los haplotipos, lo cual genera pérdida de diversidad genética y por tanto es más factible que la población se estructure. Sin embargo si existe flujo génico, esto contrarrestaría los efectos de la deriva. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente (aislada). Si hay una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, todas estas poblaciones evolucionan juntas (homogeneidad geográfica), es decir, el flujo génico funcionaría como una fuerza evolutiva cohesiva; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente (estructuración genética).

2.2.3.4. Flujo génico

El flujo génico es la transferencia de material genético entre poblaciones como producto del movimiento de individuos o sus gametos. El flujo génico es notoriamente dificultoso de monitorear directamente, pero comúnmente es inferido de la distribución espacial de los marcadores genéticos empleando métodos estadísticos a través de estimadores tales como la tasa de migración (M) y número de migrantes (Nm) (Larson et al 1984).

2.2.3.5. Filogeografía

La filogeografía es el análisis de la distribución de linajes de genes de una especie con la finalidad de inferir los procesos históricos que determinaron dicha distribución (Avice, 2000). La filogeografía engloba tanto aspectos temporales (procesos evolutivos) como espaciales (estructura genética) y utiliza básicamente dos métodos de análisis: un método gráfico, basado en árboles de genes o en coalescencia, y un método que considera estadísticos de resumen y parámetros demográficos (Posada & Crandall, 2001). Las genealogías o linajes de genes trazan las relaciones evolutivas entre los haplotipos, y los métodos para construirlas se basan en coalescencia, que es una herramienta matemática que permite "rastrear hacia atrás" en el tiempo hasta el punto en que los haplotipos "coalescen" en un haplotipo ancestral común. La coalescencia también permite estimar parámetros poblacionales tales como las tasas de mutación, migración y otros procesos (Rosenberg & Nordborg, 2002). Para ello, usualmente se utilizan secuencias de ADN altamente variables y selectivamente neutrales, e.g. ADN mitocondrial, que

permitan reconstruir genealogías y estudiarlas en un contexto geográfico (Avice, 2000).

La filogeografía se considera una rama de la biogeografía histórica. Por ello, tanto los estudios biogeográficos como los filogeográficos son muy similares en cuanto a su alcance: ambos se enfocan en comprender la distribución geográfica de la diversidad y los procesos responsables de estos patrones. La diferencia es que la biogeografía se enfoca en la distribución de especies y comunidades, mientras que los estudios filogeográficos se enfocan en la distribución de la diversidad genética (Avice, 2000).

Los primeros trabajos en filogeografía consideraron que los límites genéticos en especies ampliamente distribuidas podrían coincidir con límites biogeográficos (Avice *et al.*, 1987; Avice, 1992;) puesto que los mismos procesos físicos que limitan las distribuciones de las especies pueden actuar como filtros al flujo génico, creando el paradigma de la “concordancia entre la filogeografía y la biogeografía”.

2.2.4. Estudios de filogeografía en zonas de transición biogeográfica

La presencia de linajes genéticos dentro de las especies marinas parece estar correlacionada con los límites biogeográficos. Estas discontinuidades filogenéticas fueron inicialmente reportadas en la costa este de Estados Unidos en el quelicerado *Limulus polyphemus* (Saunders *et al.*, 1986) y en el ostión americano *Crassostrea virginica* (Reeb & Avice, 1990). Ambos casos de discontinuidad filogenética fueron atribuidos a barreras al flujo génico originadas por convergencia entre corrientes locales. En la costa Pacífica de Estados Unidos, un estudio filogeográfico en 50 especies costeras encontró que el centro de surgencias de Cabo Mendocino funciona

como una importante barrera al intercambio genético, principalmente para especies que habitan el intermareal superior (Kelly & Palumbi, 2010).

En Indonesia, la denominada “Línea de Wallace” constituye un quiebre biogeográfico que separa la flora y fauna terrestres del norte y sur de dicho país y que bisecta los océanos Índico y Pacífico simultáneamente. Se pensaba que esta “barrera” no afectaba a la fauna marina y que la velocidad de las corrientes locales (de hasta 1 m/s) facilitaría la dispersión larval existiendo la hipótesis de una fuerte conectividad genética entre poblaciones. Sin embargo, un estudio en el camarón de arrecife *Haptosquilla pulchella*, con una duración larval pelágica entre 4-6 semanas, encontró altos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones del norte y sur de Indonesia de esta especie sugiriendo la presencia de un equivalente marino a la Línea de Wallace. Estos resultados han sido atribuidos a la vicarianza provocada por la disminución de los niveles del mar durante el Pleistoceno (levantamiento de las plataformas continentales Sahul y Sonda) (Barber *et al.*, 2000). En un estudio posterior, con un muestreo más extensivo colectando individuos de Papua Nueva Guinea, se logró encontrar otro quiebre genético adicional, el cual fue atribuido a la retroflección de la Corriente Sur-Ecuatorial la cual estaría limitando la dispersión larval (Barber *et al.*, 2002).

Un estudio en el Triángulo de Coral (Pacífico suroeste) encontró fuertes concordancias entre los patrones filogeográficos y las ecorregiones marinas propuestas por Spalding *et al.* (2007) en tres especies de almejas del género *Tridacna* (De Boer *et al.*, 2014). Estos resultados sugieren que los mismos factores físicos relacionados con la formación de límites biogeográficos, e.g. corrientes y

temperatura, también estarían limitando la conectividad genética de estas tres especies a través del Triángulo de Coral.

La costa sur de Australia constituye una importante barrera biogeográfica marina (Ayre *et al.*, 2009). Varios estudios filogenéticos en invertebrados intermareales han encontrado quiebres filogeográficos significativos concordantes con el Promontorio Wilsons, península que en el pasado fue parte de un puente de tierra entre Tasmania y Australia, lo que en actualidad se conoce como Estrecho de Bass (Dawson, 2005; Waters *et al.*, 2005; York *et al.*, 2008; Ayre *et al.*, 2009). Estos estudios concuerdan que esta zona del sur de Australia, debido a la convergencia de corrientes antagónicas, constituye una importante barrera al flujo génico.

Nueva Zelanda también constituye un escenario biogeográfico interesante debido a la expectativa de que los procesos oceanográficos en el Estrecho de Cook tales como un intenso afloramiento costero, fuertes flujos de marea y turbulencia puedan restringir el flujo génico y promover la diferenciación genética. Un estudio en la estrella de mar *Patiriella regularis* encontró linajes genéticos concordantes entre el norte y el sur además de una divergencia genética sugiriendo un flujo génico restringido (Waters & Roy, 2004). Similares hallazgos se encontraron en el ofiuroido *Amphipholis squamata* (Sponer & Roy, 2002), en el mitílido *Perna canaliculus* (Apte & Gardner, 2002; Star *et al.*, 2003) y en especies del género *Cellana* (Goldstien *et al.*, 2006) y *Nacella* (Goldstien *et al.*, 2006).

La costa de Sudáfrica constituye la zona de transición entre los océanos Atlántico e Índico. En esta importante zona de transición, ubicada entre Punta del Cabo y Punta de las Agujas, se han detectado varios quiebres filogeográficos en organismos marinos (Gopal *et al.*, 2006; Teske *et al.*, 2006; Zardi *et al.*, 2007; Teske

et al., 2008; Teske et al., 2011). Estos quiebres han sido atribuidos a discontinuidades en parámetros ambientales tales como temperatura del agua, salinidad y concentraciones de nutrientes, además de factores físicos como corrientes y celdas de afloramiento (Teske et al., 2011).

En la costa de Chile, a los 30°S, se encuentra el límite biogeográfico entre la Provincia Peruana y la zona biogeográfica denominada Área Intermedia (Camus, 2001). Varios organismos marinos han mostrado un quiebre filogeográfico consistente con este límite biogeográfico: el cirrípedo *Notochthamalus scabrosus* (Zakas et al., 2009; Zakas et al., 2014), las algas *Lessonia nigrescens* (Tellier et al., 2009), *Mazzaella laminarioides* (Montecinos et al., 2012) y *Macrocytis pyrifera* (Macaya & Zuccarello, 2010), y los gastrópodos con desarrollo directo *Acanthina monodon* (Sánchez et al., 2011) y *Crepidatella dilatata* (Brante et al., 2012). Un estudio en ocho especies costeras, cinco con larga duración de tiempo larval pelágica (*Emerita analoga*, *Petrolisthes violaceus*, *Heliaster heliantus*, *Stichaster striatus* y *Tetrapyrgus niger*), dos de corta duración larval (*Scurria scurra* y *Tegula atra*) y una especie con desarrollo directo o “brooder” (*Oschestoidea tuberculata*) reportó baja diferenciación en cuatro de las cinco especies con alta capacidad de dispersión y quiebres filogeográficos concordantes con el límite de los 30°S en las especies con baja o nula dispersión larval (Haye et al., 2014). Estos resultados sugirieron que la divergencia entre linajes al norte y al sur de los 30°S es consecuencia de la interacción entre este límite biogeográfico y la capacidad de dispersión larval.

2.2.5. La zona de transición biogeográfica de la costa norte del Perú

A lo largo del Pacífico Suroriental, la zona de transición en el norte de Perú es considerada un importante límite biogeográfico (Briggs, 1974). Esta zona de transición constituye el límite entre la Provincia del Pacífico Sureste Templado Cálido y la Provincia del Pacífico Este Tropical (4° - 6° S) (Spalding et al., 2007), conocidas también como Provincia Peruana y Provincia Panameña (Forbes, 1856) (Figura 1). Las corrientes costeras superficiales que convergen frente a esta línea de costa son la Corriente Costera Peruana y la corriente Costera Ecuador-Perú (Cucalón, 1987; Strub et al., 1998; Chaigneau et al., 2013). La Corriente Costera Peruana, proveniente de Chile, fluye por las costas peruanas con aguas frías hasta el sur de Punta Aguja (6° S), donde se desvía hacia el oeste hacia las Islas Galápagos (Strub *et al.*, 1998). La Corriente Costera Ecuador-Perú por su lado constituye una rama de la Contracorriente Ecuatorial que se desplaza con dirección hacia el sur a lo largo de las costas de Ecuador y del norte del Perú. Al llegar a Cabo Blanco ($4^{\circ}15'S$) esta corriente se desvía hacia el oeste para formar parte de la corriente Ecuatorial (Chaigneau et al., 2013). Esta convergencia de corrientes genera gradientes en la TSM y la salinidad por lo que se considera una zona de mezcla (Flores et al., 2013). Dependiendo de la estación del año, en la zona de transición prevalecen condiciones de uno u otro sistema: en el invierno-primavera prevalecen las condiciones frías del Sistema de Humboldt, y en el verano-otoño las condiciones cálidas del Sistema Tropical (Flores et al., 2013).

La zona de transición de la costa norte del Perú es dinámica en cuanto a su rango latitudinal debido a los cambios oceanográficos que vienen ocurriendo desde la aparición de los eventos ENSO (*El Niño-Southern Oscillation*). ENSO es un

fenómeno acoplado océano-atmósfera de macroescala que presenta dos fases alternadas con características opuestas: una fase cálida llamada El Niño y una fase fría llamada La Niña (Philander, 1985). Generalmente, la manifestación oceanográfica de la fase cálida en la costa norte del Perú es la proyección hacia el sur de las ATS (ubicadas normalmente al norte de los 4°S, TSM > 25°C) hasta los 6°S, y de las AES (ubicadas normalmente al norte de los 6°S, 19°C < TSM < 25°C) usualmente hasta los 8°S (Zuta & Guillén, 1970). La fase fría se asocia a un repliegue hacia el norte de las AES y a una surgencia de aguas frías (Morón, 2000). Debido a estos flujos de agua, la zona de transición puede desplazarse hacia el norte de los 4°S durante el invierno y años La Niña, hacia el sur de los 6°S durante el verano, y hacia el sur de los 7°S durante años El Niño (Strub et al., 1998).

Históricamente, esta zona de transición ya ha sido reportada por varios autores. En base a la ocurrencia de peces tropicales y templados, se propuso al área comprendida entre la Bahía de Caráquez (Ecuador) y Punta Aguja (Península de Illescas) como una zona de transición entre ambas provincias (Koepcke, 1957, 1958; López, 1963; Medina, 1969). Estudios zoogeográficos basados en moluscos también han sugerido la existencia de una zona de transición (Dall, 1909; Balech, 1954; Olsson, 1961; Stuardo, 1964). Específicamente Olsson (1961), quien trabajó con bivalvos, propuso a la región comprendida entre Cabo Blanco (4°15'S) y Punta Aguja (6°S) como una zona de transición. Más adelante, se planteó una subdivisión de cuatro distritos biogeográficos para la costa sureste del Pacífico, proponiéndose al rango de los 3°30'S - 7°S como una zona intermedia (Vegas-Vélez, 1980).

Un trabajo biogeográfico reciente en comunidades de invertebrados y algas intermareales de la costa centro-norte del Perú reportó agrupamientos concordantes

con las tres zonas biogeográficas: una unidad biogeográfica norte ($3^{\circ}30'S - 4^{\circ}30'S$) concordante con la Provincia Panameña, seguida de una unidad biogeográfica intermedia concordante con la zona de transición ($5^{\circ}S - 5^{\circ}30'S$) y una unidad biogeográfica centro-sur ($6^{\circ}S - 13^{\circ}30'S$) concordante con la Provincia Peruana (Ibáñez, 2016).

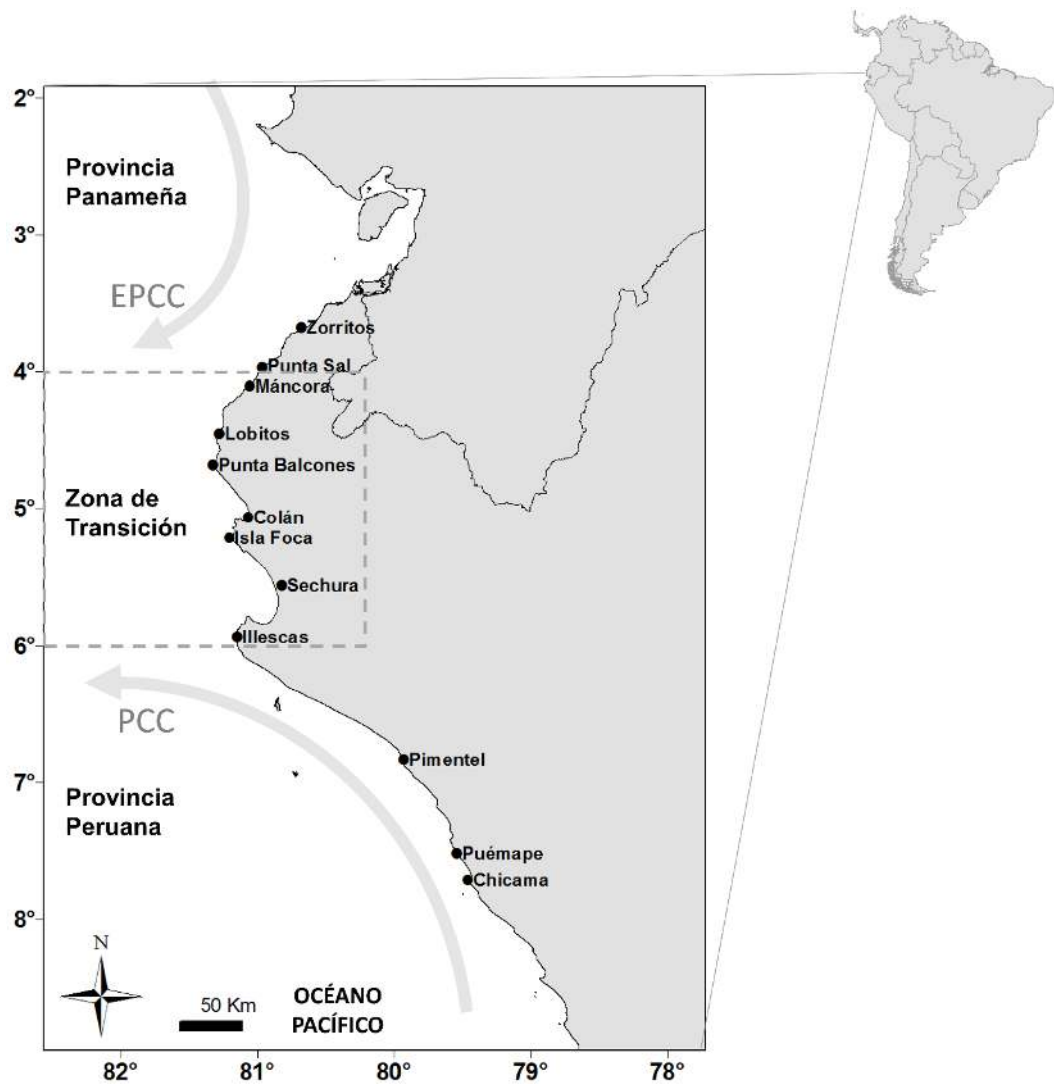


Figura 1. Ubicación geográfica de la Zona de Transición de la costa norte del Perú. Se indican algunas localidades importantes. Leyenda de corrientes superficiales: PCC (Peruvian Coastal Current) y EPCC (Ecuador-Peru Coastal Current) (Fuente: Sergio Barahona)

2.2.6. Capacidad de dispersión en invertebrados intermareales

Los invertebrados intermareales poseen generalmente una historia de vida bipartita caracterizada por una fase larval pelágica y una fase post-aseñamiento sedentaria. Al ser el estadio adulto predominantemente sésil o hemisésil, la larva es considerada como la fase dispersiva y la que influye notablemente en la conectividad en estas especies (Hedgecock, 1986). La capacidad de dispersión de una larva depende mayormente de su modo de desarrollo y de la duración de su larva pelágica en la columna de agua (PLD, *Pelagic Larval Duration*), puesto que estos factores están involucrados con una menor diferenciación genética entre poblaciones (Scheltema, 1971; Kyle & Boulding, 2000). Las larvas pueden presentar un modo de desarrollo pelágico planctotrófico (alta capacidad de dispersión y alto PLD), pelágico lecitotrófico (limitada capacidad de dispersión y un PLD corto) o un desarrollo no pelágico o directo (PLD cero, “brooders” o vivíparos, eclosionan en juveniles) (Thorson, 1950).

2.2.7. Marcadores mitocondriales: COI y 16SrRNA

Los marcadores mitocondriales Citocromo Oxidasa I (COI) y 16SrRNA (subunidad mayor ribosomal) son fragmentos internos de sus respectivos genes (Figura 2). El marcador COI exhibe una tasa de evolución molecular intermedia-moderada siendo de gran utilidad para abordar cuestiones de genética intrapoblacional (Avice, 2000), así como para la identificación genética de especies mediante el Código de Barras de ADN (Hebert et al., 2003). El marcador 16SrRNA (RNA de la subunidad mayor ribosomal) suele exhibir una tasa de evolución

molecular alta, por lo que es utilizado generalmente como marcador a nivel intra-poblacional (Romano & Palumbi, 1996; Saccone et al., 1999).

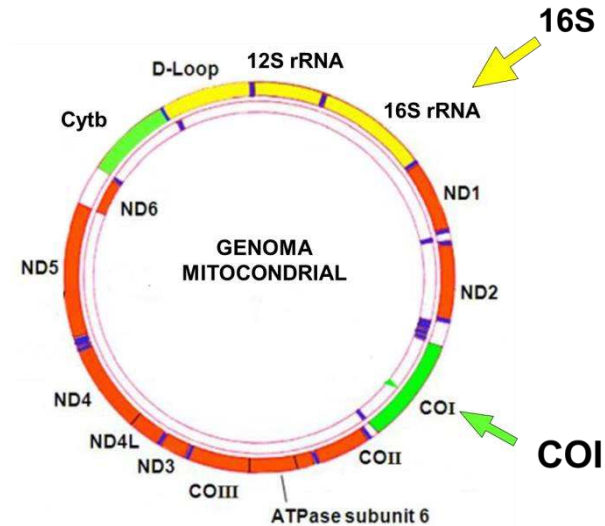


Figura 2. Ubicación de los genes 16S y COI en el genoma mitocondrial

Fuente: (http://www.larapedia.com/scienze/tassonomia_significato.html)

2.2.8. Especies en estudio

Los modelos biológicos escogidos para la presente investigación fueron los moluscos intermareales *Echinolittorina paytensis* y *Brachidontes adamsianus*. Los criterios para elegir estas especies fueron (1) su distribución geográfica, el cual atraviesa la zona de transición, (2) son moluscos abundantes en el intermareal rocoso del norte peruano, que los hace fáciles de muestrear, (3) su no importancia económica, puesto que al no ser especies extraídas, explotadas o cultivadas por el hombre, su diversidad y estructura genética es natural.

2.2.8.1. *Echinolittorina paytensis*

El caracol *Echinolittorina paytensis* (Philippi, 1847) (Gastropoda: Littorinidae) habita el intermareal rocoso desde Costa Rica hasta el norte del Perú

(Reid, 2002; Giraldo-Cardona et al., 2014). En el Perú ha sido reportada como abundante en la costa norte (Ramírez et al., 2003), pero también ha sido reportada más al sur (como *Littorina paytensis*) hasta Pimentel (6°50'S) (Peña, 1970) y Pacasmayo (7°31'S) (Vegas-Vélez, 1968; Peña, 1970; Álamo & Valdivieso, 1997). La morfología de esta especie (como *Nodilittorina paytensis*) ha sido descrita en detalle (Reid, 2002). Esta especie fue incluida en un estudio de filogenia molecular dentro del género *Echinolittorina* (Williams & Reid, 2004), pero no reporta estudios genético-poblacionales ni filogeográficos.

2.2.8.2. *Brachidontes adamsianus*

El mitílido *Brachidontes adamsianus* (Dunker, 1857) (Bivalvia: Mytilidae) habita el intermareal rocoso desde el Golfo de California hasta Paita, incluyendo las Islas Galápagos (Olsson, 1961). Esta especie ha sido incluida recientemente en la lista de especies de bivalvos de la costa peruana (Paredes et al., 2016). No ha sido considerada en estudios filogeográficos hasta la fecha.

2.3. Justificación del estudio

Las zonas de transición son ecosistemas de interés para estudiar la diversidad genética y estructura poblacional de especies costeras. Esto se debe a que estos lugares son puntos de convergencia entre sistemas con características oceanográficas contrastantes que pueden potencialmente restringir el flujo génico. En especial, permiten poner a prueba la hipótesis de la barrera oceanográfica y como consecuencia, la existencia de linajes afines a las zonas biogeográficas. Debido a que el estudio de la conectividad poblacional utilizando métodos directos (e.g. marcaje de larvas para seguimiento) es difícil, e inferir la historia evolutiva de las especies con métodos tradicionales es prácticamente imposible, la aplicación de herramientas moleculares, e.g. marcadores del genoma mitocondrial, resulta valioso para abordar estas interrogantes.

La zona de transición en el rango latitudinal costero de los 4°- 6°S merece una atención especial debido a que, aparte de ser el único límite biogeográfico reconocible dentro del extenso ecosistema marino del Perú, su estudio es crítico para entender la historia evolutiva y conectividad de aquellas especies cuyas distribuciones geográficas incluyen a este límite biogeográfico.

Los moluscos, especialmente los gasterópodos y bivalvos, son taxa conspicuos en el intermareal rocoso y son especialmente sensibles a cambios oceanográficos tales como El Niño. Las especies *Echinolittorina paytensis* (Gastropoda: Littorinidae) y *Brachidontes adamsianus* (Bivalvia: Mytilidae) constituyen excelentes modelos biológicos para testear la hipótesis filogeográfica debido a su amplia distribución en el intermareal rocoso del norte peruano.

La importancia de este estudio también radica en la generación de conocimiento nuevo para la costa peruana, escalando desde genes a la estructuración en la distribución biogeográfica de invertebrados. Este tipo de estudios que investiguen procesos de conectividad genética y filogeografía, no ha sido aún considerado en el cuerpo de conocimiento sobre el ecosistema marino del Perú. Además, la información obtenida puede ser potencialmente usada a futuro para desarrollar o implementar áreas marinas protegidas basadas en conocimientos de conectividad genética.

2.4. Objetivos

2.4.1. General

- Describir los patrones filogeográficos de los moluscos intermareales *Echinolittorina paytensis* (Gastropoda: Littorinidae) y *Brachidontes adamsianus* (Bivalvia: Mytilidae) a través de la zona de transición y parte de las Provincias Biogeográficas Panameña y Peruana.

2.4.2. Específicos

- Identificar genéticamente mediante el uso del marcador mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI) a las especies estudiadas.
- Estimar la diversidad genética de las especies estudiadas en base a los dos marcadores genéticos utilizados (COI y 16SrRNA)
- Determinar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones y la biogeografía para ambas especies
- Determinar la estructura genética en base a los dos marcadores utilizados en ambas especies.
- Describir la historia demográfica de las especies estudiadas.

2.5. Hipótesis

La zona de transición de los 4°-6°S actúa como una barrera para la conectividad genética de los moluscos intermareales *Echinolittorina paytensis* y *Brachidontes adamsianus*. Como consecuencia, existen linajes genéticos separados geográficamente y ubicados a ambos lados de este límite biogeográfico existiendo una concordancia filogeográfica con las provincias biogeográficas Panameña y peruana.

3. METODOLOGÍA

3.1. Diseño del estudio

La presente investigación es un estudio descriptivo, observacional y transversal. No hubo intervención por parte del investigador y sólo se recogieron los datos de secuencias de ADN de los individuos. El esquema de muestreo fue diseñado para analizar el efecto genético de la zona de transición sobre las especies *Echinolittorina paytensis* y *Brachidontes adamsianus*.

3.2. Población

La población investigada constituye el conjunto total de individuos asentados de las especies *E. paytensis* y *B. adamsianus* en el intermareal rocoso entre las costas de Anconcito (Salinas, Ecuador) y Puémape (La Libertad, Perú) durante el mes de mayo del 2016.

3.3. Muestra

La muestra constituye el subconjunto de individuos de ambas especies que fueron colectados durante el viaje de campo. Se seleccionaron a priori 18 localidades costeras que presentaron intermareal rocoso desde Anconcito (Cantón Salinas, Provincia de Santa Elena, Ecuador) hasta Puémape (Distrito de San Pedro de Lloc, Provincia de Pacasmayo, La Libertad) (Tabla 1), cubriendo de esta manera la totalidad de la Zona de Transición y partes adyacentes de la Provincia Panameña y Peruana (Figura 3).

Tabla 1. Información de las localidades de muestreo

Zona Biogeográfica	Localidad	Código de Localidad	Fecha de colecta	Longitud (W)	Latitud (S)
Provincia Panameña	Anconcito	ANC	16/05/2016	80°53'	2°19'S
Provincia Panameña	Bonanza	BON	18/05/2016	80°45'	3°43'S
Provincia Panameña	Acapulco	ACA	19/05/2016	80°46'	3°44'S
Provincia Panameña	Punta Mero	PME	19/05/2016	80°52'	3°54'S
Provincia Panameña	Punta Sal	PSA	19/05/2016	80°59'	3°59'S
Provincia Panameña	El Bravo	BRA	19/05/2016	80°59'	4°00'S
Zona de Transición	La Punta	PUN	19/05/2016	81°03'	4°06'S
Zona de Transición	Las Pocitas	POC	19/05/2016	81°05'	4°06'S
Zona de Transición	Punta Veleros	PVE	20/05/2016	81°08'	4°10'S
Zona de Transición	El Ñuro	ÑUR	20/05/2016	81°10'	4°13'S
Zona de Transición	Cabo Blanco	CAB	20/05/2016	81°13'	4°15'S
Zona de Transición	Yacila	YAC	21/05/2016	81°10'	5°07'S
Zona de Transición	Cangrejos	CAN	21/05/2016	81°10'	5°08'S
Zona de Transición	Islilla	ISL	21/05/2016	81°11'	5°12'S
Zona de Transición	La Tortuga	TOR	21/05/2016	81°07'	5°17'S
Zona de Transición	Punta Aguja	AGU	22/05/2016	81°03'	5°47'S
Provincia Peruana	Media Luna	MED	23/05/2016	79°51'	6°57'S
Provincia Peruana	Puémape	PUE	24/05/2016	79°32'	7°31'S

3.4. Operacionalización de variables

Considerando a un individuo como unidad de análisis, el dato es su secuencia de ADN. Pero una secuencia de ADN no constituye un dato numérico. Debido a la presencia de mutaciones, no todos los individuos en la muestra poseerán la misma secuencia. Una secuencia de ADN es una variable discreta politómica, debido a que puede tomar varias categorías (haplotipos). Un individuo se clasificará en una categoría y solo en una categoría (haplotipo). En la muestra, varios individuos pertenecerán al mismo haplotipo por lo que se podrá calcular las frecuencias de cada haplotipo. Considerando a la población como unidad de análisis (llámese “población” al conjunto de individuos muestreados provenientes una misma localidad geográfica) es posible reconocer algunas variables numéricas basado en

el alineamiento de secuencias: el número de sitios polimórficos (S), el número de haplotipos (H) y la diversidad haplotípica (Hd) (Tabla 2).

Tabla 2. Operacionalización de variables

Variable	Tipo de variable	Escala de medición	Indicadores	Técnica
Haplotipo (Polimorfismo de secuencia)	Categórica politómica	Nominal	1- n categorías	Secuenciamiento de ADN
Número de Sitios polimórficos (S)	Cuantitativa discreta	Razón	0 - n	Secuenciamiento de ADN
Número de haplotipos (H)	Cuantitativa discreta	Razón	1 - n	Secuenciamiento de ADN
Diversidad haplotípica (Hd)	Cuantitativa continua	Razón	0 – Hd mínima 1 – Hd máxima	Secuenciamiento de ADN

3.5. Procedimientos y técnicas

3.5.1. Procedimiento de Muestreo

La salida de campo fue realizada durante el mes de mayo del 2016 en dirección de norte a sur. Se muestrearon de dos a tres localidades por día durante la bajamar. La búsqueda de especímenes adultos consistió en la exploración completa de la zona intermareal, revisando también entre grietas y por debajo de las rocas. De preferencia, se colectaron individuos solitarios, pero en caso de agregaciones se colectaron individuos alejados entre sí. En promedio, se colectaron entre 10-15 individuos por cada localidad los cuales fueron almacenados en tubos de plástico conteniendo agua de mar. Los tubos de plástico contuvieron además papel

impermeable para codificar al individuo. Posteriormente los individuos fueron almacenados en alcohol 96%.

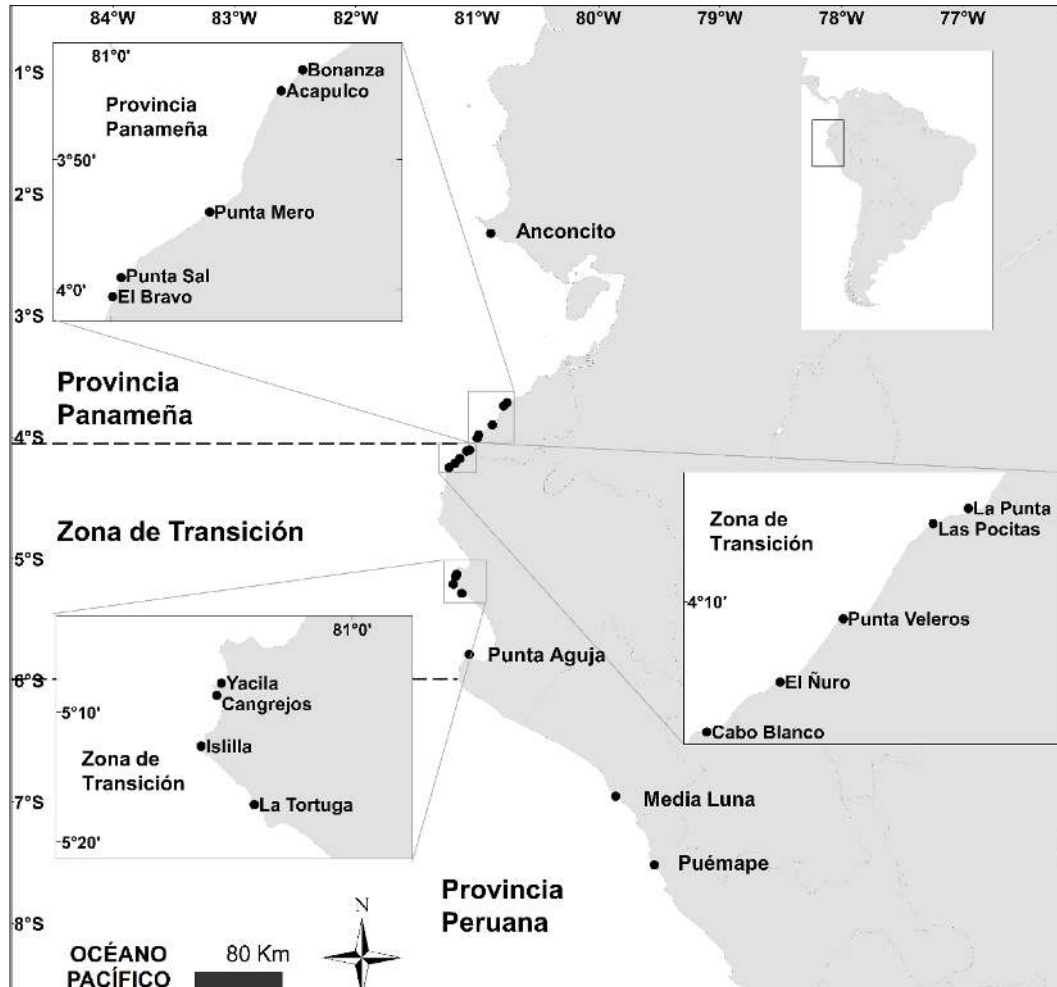


Figura 3. Mapa indicando las localidades de muestreo y las zonas biogeográficas a las que pertenecen. El mapa en la esquina superior derecha indica el contexto geográfico del estudio (Fuente: Sergio Barahona)

Los caracteres morfológicos externos de la concha fueron utilizados para verificar los especímenes colectados a nivel taxonómico. Para la especie *Echinolittorina paytensis*, se empleó el artículo sobre especies del género *Nodilittorina* (antiguo nombre del género *Echinolittorina*) del Océano Pacífico oriental (Reid, 2002), y para los individuos de *Brachidontes adamsianus* se emplearon dos artículos que describen a moluscos bivalvos de la Provincia

Panameña (Olsson, 1961; Keen, 1971). Previo a la disección en laboratorio, los animales fueron registrados fotográficamente con ayuda de un estereoscopio.

Los tejidos blandos de cada individuo (tejido del pie en caso de *E. paytensis* y músculo abductor en caso de *B. adamsianus*) fueron separados de sus conchas, lavados con agua destilada estéril y almacenados en etanol 70%. Se realizaron recambios de alcohol cada cinco horas por un lapso tres días para depurar la carga de sales marinas y microalgas. Finalmente, los tejidos fueron almacenados en etanol 100% y transportados al laboratorio Análisis Biomoleculares (BIOAL SAC, Lima, Perú) para su procesamiento molecular desde extracción de ADN hasta purificación de productos de PCR.

3.5.2. Procedimiento de Laboratorio

3.5.2.1. Extracción de ADN y electroforesis

Para el aislamiento de ADN genómico se utilizó el E.Z.N.A[®] Mollusc DNA Kit (Omega BioTek, Inc) siguiendo el protocolo sugerido por el fabricante. Este kit está basado en las propiedades del detergente catiónico CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio) el cual permite la eliminación selectiva de mucopolisacáridos, sustancias inhibitorias abundantes en los tejidos de los moluscos (Sokolov, 2000). Al finalizar la extracción, el ADN de cada individuo fue cuantificado (ng/μl) empleando el método fluorimétrico QuBit[®] (dsDNA-BR) y se evaluó el grado de fragmentación en geles de agarosa.

3.5.2.2. Reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica de biología molecular que permite amplificar (copiar) millones de veces una secuencia de ADN específica y poderle efectuar diversas técnicas posteriores tales como el secuenciamiento. El producto final del PCR se denomina “producto de PCR” o “amplicón”. Esta técnica utiliza una enzima ADN Polimerasa y consiste en ciclos térmicos (que usualmente son 35) de tres etapas (Figura 4):

- 1) **Desnaturalización:** En esta etapa la temperatura es de 94°C-95°C generando que el ADN se desnaturalice, esto es, que las hebras se separen.
- 2) **Alineamiento:** En esta etapa la temperatura varía de 35°C-60°C y depende de los cebadores a utilizarse. Los cebadores son pequeñas secuencias de ADN de cadena simple que flanquean la región de interés.
- 3) **Extensión:** La temperatura en esta etapa es usualmente de 72°C, que es la temperatura óptima para la activación de la enzima ADN polimerasa.

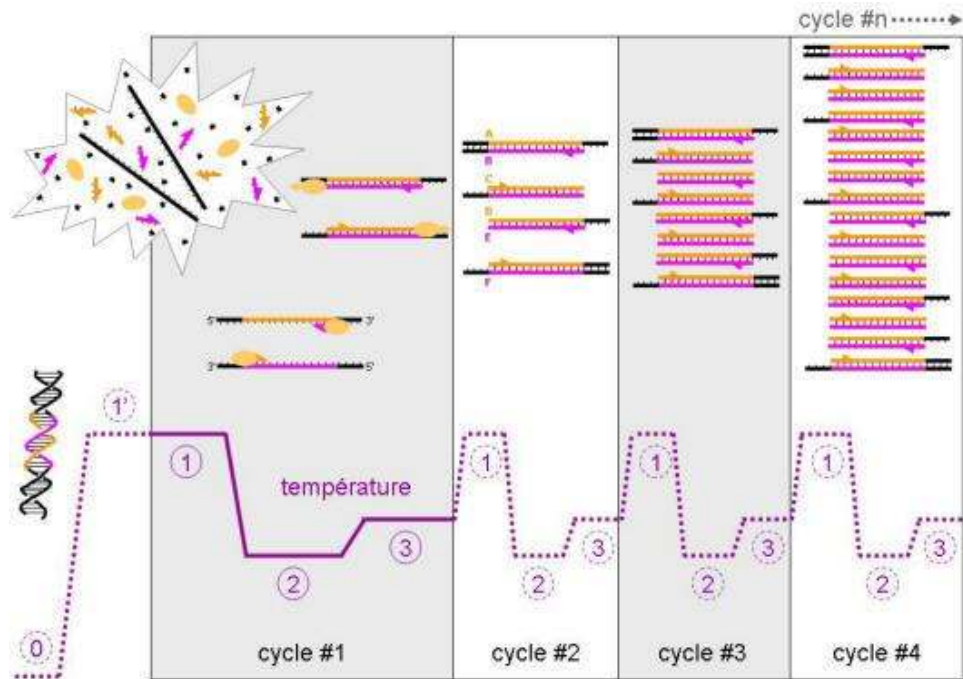


Figura 4. Ciclos de una reacción en cadena de la Polimerasa (PCR)
(Fuente: http://www.btcj.org/k12/bft/pcr/PCR_studentscenario_files/PCR_basic_principle1.jpg)

Para amplificar por PCR los marcadores COI y 16SrRNA se utilizaron los cebadores universales reportados en la literatura (Tabla 3). Se estandarizaron las reacciones de PCR variando las concentraciones finales de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$), la cantidad de ADN (ng) y la temperatura de alineamiento (T_a). Las condiciones de amplificación estandarizadas para cada marcador fueron similares, solo diferenciándose en la concentración de Cloruro de Magnesio ($MgCl_2$) y la temperatura de alineamiento. Se utilizaron las siguientes concentraciones finales para un volumen de 25 μ l de reacción: 10X Buffer Taq (1X), $MgCl_2$ (1.5 mM para COI y 2 mM para 16SrRNA), cebadores (0.5 μ M cada uno), dNTPs (0.2 mM cada uno), ADN (25 ng) y Maxima Hot Start Taq Polimerasa (0.5 U). El perfil térmico

de la reacción utilizado fue: 95°C (3 min), 35 ciclos de [95°C (40 s), 46°C (1 min, para COI) o 52°C (40 s, para 16S), 72°C (1 min)], 72°C (7 min).

Tabla 3. Cebadores de los marcadores COI y 16SrRNA

Gen	Cebador	Secuencia (5' → 3')	Referencia
COI	LCO1490	GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG	Folmer <i>et al</i> 1994
COI	HCO2198	TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA	Folmer <i>et al</i> 1994
16S	16S-ar	CGCCTGTTTATCAAAAACAT	Palumbi, 1996
16S	16S-br	CCGGTCTGAACTCAGATCATGT	Palumbi, 1996

Finalizando la reacción se procedió a verificar las amplificaciones corriendo los productos de PCR en geles de agarosa 2%, los cuales fueron previamente teñidos con bromuro de etidio y posteriormente visualizados en un transiluminador UV. Luego, los productos de PCR fueron tratados con las enzimas Exonucleasa I y Fosfatasa Alcalina para eliminar los dNTPs y cebadores no incorporados.

3.5.2.3. Secuenciamiento de ADN

Para obtener las secuencias de ADN, los productos de PCR ya purificados fueron enviados a la empresa MACROGEN (Maryland, USA). Esta empresa presta el servicio de secuenciamiento con el método de Sanger. Se solicitó el secuenciamiento de los amplicones para ambos marcadores genéticos utilizando los dos sentidos (Forward y Reverse).

3.6. Consideraciones éticas

El proyecto de investigación de la presente tesis, titulado “Patrones filogeográficos de moluscos intermareales a lo largo de un gradiente biogeográfico en la costa norte del Perú” con código de Inscripción SIDISI 66621, fue aprobada en la sesión CIEA (Comité Institucional de Ética para el uso de animales) el día 11

de julio del 2016, por lo que los objetivos y procedimientos desarrollados en la presente investigación están de acuerdo a lo estipulado en el protocolo del comité.

3.7. Plan de análisis

3.7.1. Ensamblaje y comprobación de secuencias de ADN

El ensamblaje de secuencias de cada individuo, i.e. la generación de una secuencia consenso a partir de las hebras forward y reverse, fue realizado con la ayuda del programa SequencherTM 5.4.6 (Gene Codes Corporation, MI). Este programa permite el recorte automático de extremos de baja fidelidad así como del ensamblaje y de la curación de bases nitrogenadas ambiguas. Las secuencias ensambladas finalmente fueron exportadas en formato Fasta (*.fas) para su alineamiento.

Un paso importante es la comparación de secuencias contra una base de datos. BLAST, del inglés *Basic Local Alignment Search Tool* (Altschul et al., 1990), es un programa de búsqueda de similaridad que permite encontrar secuencias similares o evolutivamente cercanas a la secuencia problema dentro de la base de datos del Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Esta herramienta otorga también la significancia estadística de los matches.

BOLDSYSTEMS (<http://boldsystems.org/>) es una plataforma web de la iniciativa BOLD (*The Barcode of Life Data*) que provee herramientas para el ensamble y uso de datos de código de barras. Una de estas herramientas es el IDS (*The BOLD Identification System*), que con un algoritmo similar al BLAST permite identificar a nivel de especie secuencias de Citocromo Oxidasa I. Se utilizó el

BLAST para verificar los resultados de ambos marcadores, mientras que el BOLDSYSTEMS para las secuencias COI únicamente.

3.7.2. Alineamiento

El alineamiento múltiple de secuencias es la comparación de dos o más secuencias de ADN de tal manera que los sitios homólogos compartan la misma posición vertical. El alineamiento permite identificar posiciones que posean polimorfismos, i.e. mutaciones. Este paso fue realizado con la ayuda de la herramienta CLUSTAL-W (Thompson et al., 1994) disponible en el software BIOEDIT v.7.0.5.3 (Hall, 1999). Para el alineamiento se utilizaron los parámetros que el programa utiliza por defecto (Gap Open Penalty = 10, Gap Extension Penalty = 0.05, Weight Transition = 0.05, Weight Matrix = CLUSTAL W).

3.7.1. Código de barras de ADN

Se construyeron árboles de distancia Neighbor-Joining empleando el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros (K2P) en base a las secuencias COI obtenidas en este estudio y de otras secuencias de especies evolutivamente cercanas disponibles en la base de datos del Genbank. Otro enfoque utilizado fue el análisis de divergencia genética intra vs interespecífica (“barcode gap”) (Hebert et al., 2003) El Código de barras de ADN se considera efectivo cuando la distancia genética intraespecífica (entre individuos de una misma especie) es mucho menor que la distancia genética interespecífica (entre individuos de especies diferentes). Si estas divergencias se superponen (“Barcoding overlap”) sería señal de la presencia de especies crípticas en la muestra (Meyer & Paulay, 2005).

3.7.2. Diversidad genética

El número de sitios polimórficos (S), el número de mutaciones (Eta), el número de haplotipos (H), la diversidad haplotípica y la diversidad nucleotídica fueron calculados con el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Las fórmulas para calcular los dos últimos índices de diversidad genética son especificadas en el Anexo 1.

3.7.3. Redes de haplotipos

Se construyeron redes de haplotipos para cada marcador y especie con ayuda del software TCS v1.1 (Clement et al., 2000) el cual emplea el algoritmo de parsimonia estadística (Templeton et al., 1992). Este algoritmo simplifica patrones de ramificación compleja y representa las relaciones más parsimoniosas (i.e. con una probabilidad > 95%) entre los haplotipos. Las conexiones ambiguas representadas típicamente como reticulaciones o “loops” fueron resueltas de acuerdo a los criterios sugeridos en la literatura (Crandall & Templeton, 1993).

3.7.4. Análisis de clados anidados

Las redes de haplotipos resultantes fueron usadas para aplicar el Análisis de Clados Anidados (NCA, del inglés *Nested Clade Analysis*) (Templeton, 1998). El NCA permite testear la hipótesis nula (H0) de no asociación geográfica entre haplotipos, i.e. una distribución aleatoria de haplotipos. El software ANeCA v 1.1 (Panchal, 2007), el cual implementa el programa GeoDis (Posada et al, 2000), fue utilizado para realizar el análisis NCA.

El primer paso del NCA consiste en definir un diseño de clados anidados jerárquicamente sobre la red de haplotipos. Primero se establecen los clados de

primer nivel (de un paso) agrupando haplotipos de punta con el haplotipo inmediato superior el cual se encuentra separado por una sola mutación (puede ser un haplotipo intermediario o faltante). Estos clados de primer nivel se anidan a su vez en clados de segundo nivel (de dos pasos) y se continúa el anidamiento hasta que el último nivel de anidamiento contenga a toda la red. Como resultado, los niveles más altos de anidamiento corresponden a los eventos de coalescencia más antiguos y viceversa (Vásquez-Domínguez et al., 2009). Este paso es realizado automáticamente por ANeCA el cual utiliza el algoritmo de anidamiento provisto en la literatura (Templeton & Sing, 1993; Templeton et al., 1987).

El siguiente paso es testear las asociaciones geográficas mediante los estadísticos D_c (distancia de clado) y D_n (distancia del clado anidado) los cuales son calculados para cada clado. La significancia de la asociación geográfica de los clados es obtenida mediante un análisis de contingencia de permutación categórica (análisis chi-cuadrado χ^2) realizado por GeoDis. Finalmente, en todos aquellos clados donde se rechace la hipótesis nula, los mecanismos evolutivos más probables que expliquen estos patrones filogeográficos fueron inferidos usando la clave de inferencia de Templeton (Templeton, 2004). Esta clave proporciona una serie de criterios que permiten discriminar el papel que han tenido procesos recurrentes (e.g. restricción al flujo génico principalmente debido al aislamiento por distancia) y procesos históricos no recurrentes (e.g. colonizaciones por efecto fundador, vicarianza, expansiones de rango). La clave de inferencia implementada en ANeCA v1.1 corresponde a la del 4 de noviembre del 2005.

3.7.5. Análisis filogenético

Para reconstruir la historia evolutiva de ambas especies basada en los especímenes colectados se construyeron árboles de haplotipos con el método Máxima Verosimilitud (Maximum Likelihood o ML) usando el software RAxML (Stamatakis, 2014). El mejor modelo de sustitución nucleotídica que se ajuste a las secuencias fue el sugerido por el software jModelTest v.0.1.1 (Posada, 2008) basado en el Criterio de Información Bayesiana (BIC). Árboles filogenéticos

Un clado en un árbol filogenético se define como un grupo de haplotipos presente en una serie de ramas anidadas, y para proporcionar soporte estadístico a cada nodo del árbol se aplicaron 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985).

3.7.6. Estructura genética

Para conocer si existe estructura genética a través de la zona de transición se utilizó el Análisis de Varianza Molecular (AMOVA). Este test calcula las contribuciones de varianza molecular y los estadísticos Φ en tres niveles: Φ_{CT} (entre grupos), Φ_{SC} (entre poblaciones dentro de grupos) y Φ_{ST} (dentro de las poblaciones) (Excoffier et al., 1992). Las significancias para cada cálculo fueron calculadas mediante 10000 permutaciones. Se testearon tres posibles estructuraciones genéticas asociadas con las zonas biogeográficas.

Para conocer las diferencias genéticas entre poblaciones se calcularon las distancias genéticas F_{ST} a pares de poblaciones empleando 1000 permutaciones y un nivel de significancia de 0.05. Ambas pruebas fueron llevadas a cabo usando el programa Arlequín.

Las distancias genéticas F_{ST} a pares también fueron usadas para detectar barreras putativas al flujo génico con ayuda del software BARRIER v2.2. (Manni et al., 2004). Este software construye las barreras sobre una triangulación de Delaunay (construida sobre las coordenadas geográficas) usando el algoritmo de diferencia máxima de Monmonier (Monmonier, 1973) el cual identifica los bordes poblacionales con mayores tasas de cambio en las distancias genéticas.

3.7.7. Flujo génico

Para inferir los patrones de dispersión histórica, i.e. niveles y dirección del flujo génico, se realizaron estimaciones del parámetro Nm (número de inmigrantes hembras por generación) entre las tres zonas biogeográficas utilizando el software MIGRATE-n v3.6.4 (Beerli, 2006). Este software estima las tasas de migración ($M = m/\mu$, donde m = tasa de inmigración, μ = tasa de mutación por generación y por sitio) y los tamaños poblacionales efectivos ($\Theta = N\mu$, donde N = tamaño poblacional efectivo) utilizando un enfoque bayesiano basado en coalescencia MCMC (Beerli & Felsenstein, 2001). El valor de Nm entre cada par de zonas biogeográficas se obtuvo multiplicando M por Θ . Este análisis fue ejecutado con el modelo de migración que el software trae por defecto (*full migration Matrix model*) y previo a la corrida se ajustó tanto la tasa de transición/transversión de acuerdo al valor que proporciona el software jModelTest (el valor por defecto es 2.0, adecuado para ADN nuclear) como el número de pasos registrados en cadena a 10 000 (el valor por defecto es 5000). Además se configuró para la corrida un esquema de calentamiento estático con la finalidad de correr múltiples cadenas MCMC de forma simultánea.

3.7.8. Historia demográfica

Para responder a la pregunta ¿las especies estudiadas sufrieron una expansión poblacional en el pasado? se evaluaron las distribuciones mismatch (Rogers & Harpending, 1992). Este análisis representa las frecuencias de las diferencias entre pares de secuencias a modo de histogramas (Rogers & Harpending, 1992). Se ha demostrado que la forma de la curva de la distribución mismatch es una señal genética provocada por eventos demográficos pasados. Por ejemplo, una curva en forma de campana o unimodal es señal de un cuello de botella genético seguido de una expansión poblacional súbita. Así mismo, una curva con varios picos (errática o multimodal) sería señal de una estabilidad demográfica a largo plazo (Rogers & Harpending, 1992). Para medir el ajuste de la curva observada a una curva esperada bajo un modelo teórico de expansión poblacional se realizaron dos pruebas de bondad de ajuste: el índice de Irregularidad (*Raggedness*) de Harpending (Hri) y la desviación de la suma de cuadrados (SSD). Valores bajos y no significativos de Hri y SSD indican un buen ajuste al modelo de expansión poblacional mientras que valores altos significativos permiten rechazar el modelo de expansión. El cálculo y estimación de la significancia de ambas pruebas bajo 10000 permutaciones fueron realizados con el programa Arlequin v3.5.

Con la finalidad de calcular la fecha de una posible expansión poblacional se calculó el estimador de tiempo de expansión (τ) en unidades de tiempo generacional empleando 1000 permutaciones y un 95% de intervalos de confianza. Se utilizó la ecuación $t = \tau/2u$ (Rogers & Harpending, 1992), donde t es la fecha de la expansión en generaciones y u es tasa de mutación acumulativa por generación

que se calcula como $u = 2\mu k$ (μ es la tasa de mutación por nucleótido y k es la longitud del marcador en pares de bases). Para el cálculo del tiempo de expansión en *Echinolittorina paytensis* se usó una tasa de mutación de 2.6% por millón de años, la cual está basado en un registro fósil del género *Echinolittorina* (Williams & Reid, 2004), mientras que para *B. adamsianus* se usó la tasa de mutación para el genoma mitocondrial animal de 2% por millón de años (Brown et al., 1979). Para calcular el tiempo de expansión, se consideró un tiempo generacional de un año para ambas especies.

Los test de Neutralidad Fu's Fs (Fu, 1997) y R2 (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) fueron calculados para examinar el pasado demográfico de la especie. Valores negativos de Fu's Fs y valores positivos de R2 sugieren expansión poblacional. La significancia de estos test fueron evaluadas empleando 10000 simulaciones de coalescencia con el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009).

Se utilizó la técnica del Bayesian Skyline Plot (BSP) implementado en el software BEAST v.1.6.1. (Drummond & Rambaut, 2007) para estimar las tendencias en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo. Se utilizó un modelo de reloj molecular estricto, usando las tasas de mutación de 1.3×10^{-8} para *E. paytensis* ($\mu = 2.6\%$ por millón de años, Williams & Reid, 2004) y 1.0×10^{-8} para *B. adamsianus* ($\mu = 2\%$ por millón de años, Brown et al., 1979). Además se empleó mejor modelo de sustitución sugerido por el software jModelTest v.0.1.1. Se realizaron tres corridas independientes con 100 millones de iteraciones MCMC muestreando cada 1000 generaciones. Las primeros 10 millones de cadenas fueron descartadas como burn-in. El número de intervalos agrupados fue establecido en 10 y se utilizó el modelo piecewise-constant para realizar el BSP. Los archivos log y

tree de las corridas independientes fueron agrupadas usando LogCombiner v.1.8.1 (implementado en BEAST). Finalmente, el gráfico BSP fue plotado usando el software Tracer v1.5 (Rambaut & Drummond, 2009).

4. RESULTADOS

4.1. Muestreo y obtención de secuencias

Los ejemplares de la especie *Echinolittorina paytensis* pudieron ser colectados en cinco localidades dentro de la Provincia Panameña, en ocho dentro de la Zona de Transición y en dos dentro de la Provincia Peruana. Debido a las pocas localidades en la Provincia Peruana las localidades de las otras dos zonas biogeográficas fueron agrupadas en poblaciones. Para el análisis genético se consideraron finalmente nueve poblaciones divididas en tres zonas biogeográficas para un total de 95 individuos analizados (Figura 5, Tabla 4).

Tabla 4. Número de individuos secuenciados para ambos marcadores genéticos por población y zona biogeográfica en *E. paytensis*

Zona Biogeográfica	Localidades	Población	Código	COI	16S
Provincia Panameña (n = 28)	Anconcito	Anconcito	ANC	10	10
	Bonanza, Acapulco	Zorritos	ZOR	8	8
	Punta Sal, El Bravo	Punta Sal	PSA	10	10
Zona de Transición (n = 37)	Las Pocitas	Máncora	MAN	8	8
	Punta Veleros, El Ñuro, Cabo Blanco	El Ñuro	ÑUR	8	8
	Yacila, Cangrejos, Islilla, Tortuga	Paita	PAI	13	13
	Punta Aguja	Punta Aguja	AGU	8	8
Provincia Peruana (n = 30)	Media Luna	Media Luna	MED	15	15
	Puémape	Puémape	PUE	15	15
Total (n)				95	95

Leyenda: n: número de individuos secuenciados



Figura 5. Poblaciones y zonas biogeográficas de *E. paytensis* utilizados para el análisis molecular (Fuente: Sergio Barahona)

En la especie *B. adamsianus*, los especímenes pudieron ser encontrados desde Zorritos hasta Paita, abarcando la Provincia Panameña y la Zona de Transición. Se obtuvieron 55 secuencias para el marcador COI y 38 secuencias para el marcador 16SrRNA, las cuales fueron repartidas en dos zonas biogeográficas y cada una de ellas presentan tres poblaciones (Tabla 5, Figura 6).

Tabla 5. Número de individuos secuenciados para ambos marcadores genéticos por población y zona biogeográfica en *B. adamsianus*

Zona biogeográfica	Localidad	Población	COI	16SrRNA
Provincia	Acapulco	Zorritos	9	6
Panameña (n = 28)	Punta Mero	Punta Mero	9	6
	El Bravo	Punta Sal	10	5
Zona de Transición (n = 27)	La Punta	Máncora	8	6
	Punta Veleros, El Ñuro	El Ñuro	9	6
	Yacila	Paita	10	9
Total			55	38

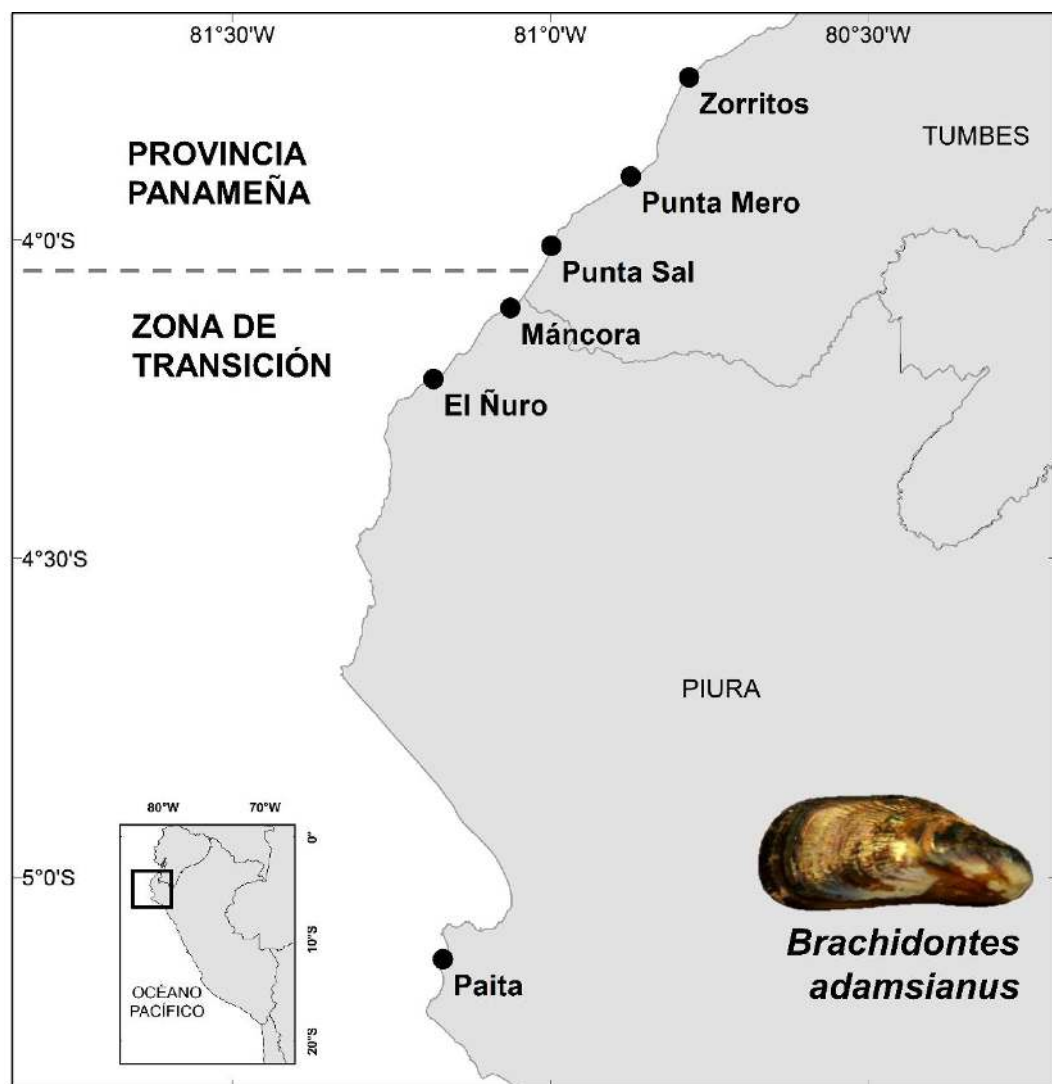


Figura 6. Poblaciones y zonas biogeográfica de *B. adamsianus* utilizados para el análisis molecular (Fuente: Sergio Barahona)

4.2. Identificación morfológica y genética

La forma y patrón de coloración de la concha de los especímenes de *Echinolittorina paytensis* coinciden con los caracteres diagnóstico previamente reportados (Reid, 2002): color de la concha de blanco a crema con puntos de color marrón a gris, presencia de una banda oscura marrón en el interior del último anfracto y una apertura color crema con banda color marrón (Figura 7).

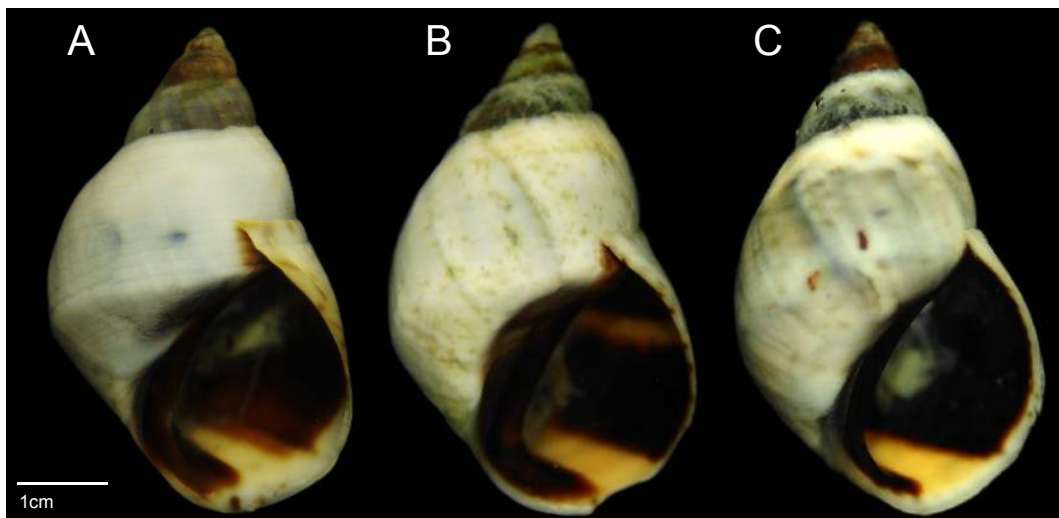


Figura 7. Ejemplares de *Echinolittorina paytensis* colectados en A) Cangrejos (Paíta), B) Anconcito (Ecuador) y C) Bonanza (Zorritos) mostrando la apertura con el opérculo retirado. Se aprecia el color blanco del último anfracto con un patrón de puntos propio de cada individuo y la banda color marrón oscuro en la apertura.

Los resultados tanto el BLAST como del BOLDSYSTEMS para el marcador COI identifican con una alta probabilidad a las especies *E. paytensis* y *E. apicina* (Anexo 2 y Anexo 3), lo cual es corroborado por el árbol Neighbor-Joining (Figura 8). Sin embargo, *E. apicina* no habita en la costa peruana y las características morfológicas de los especímenes colectados no coinciden con lo reportado para esta especie (Reid, 2002), por lo que las dos secuencias COI publicadas de *E. apicina* (Accession numbers: AJ622977 y AJ622978) corresponderían a secuencias de *E. paytensis*. El

BLAST para el marcador 16SrRNA sugiere por su lado, con un 93% de identidad, a la especie *Echinolittorina interrupta* (Anexo 4) lo cual se debe a la escasez de secuencias publicadas de este marcador para el género *Echinolittorina* y en general para la familia Littorinidae.

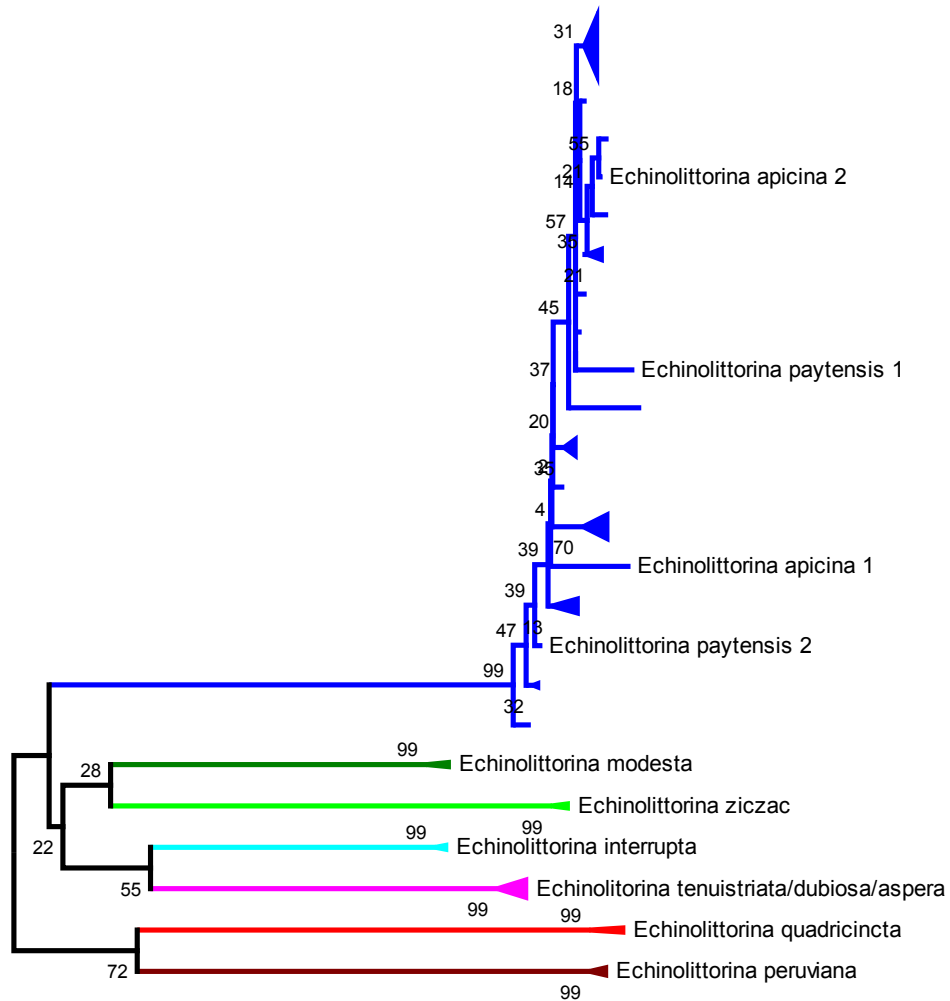


Figura 8. Árbol Neighbor-Joining (modelo de sustitución Kimura 2-parámetros) construido con las secuencias COI de los especímenes colectados de *E. paytensis* (azul) y secuencias COI obtenidos del GenBank de las especies evolutivamente más cercanas (en colores)

La divergencia genética entre los especímenes colectados de *E. paytensis* fue de 0 - 2% y la distancia genética interespecífica fue de 9% como mínimo (Figura 9), mostrando un barcode gap aceptable.

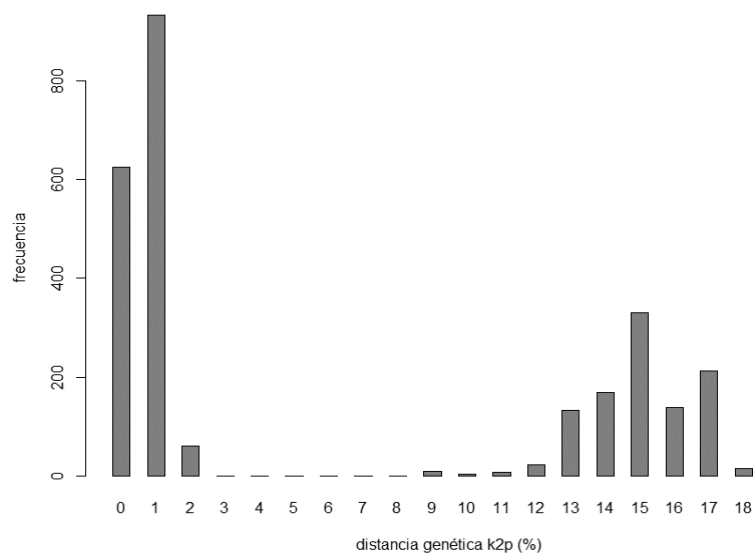


Figura 9. Barcode gap en *E. paytensis*

Las características externas de las valvas de los ejemplares de *Brachidontes adamsianus* colectados coinciden con lo reportado para la especie: una concha estrecha y alargada, con el lado dorsal con una cresta umbonal alta, angulada y abovedada, y el lado ventral aplanado: color del periostraco púrpura en el lado dorsal y blanco en el lado ventral, costillas granuladas en el lado dorsal y. medidas de la concha promedio entre 15 mm de largo, 7 mm de diámetro y 9 mm de alto (Figura 10).

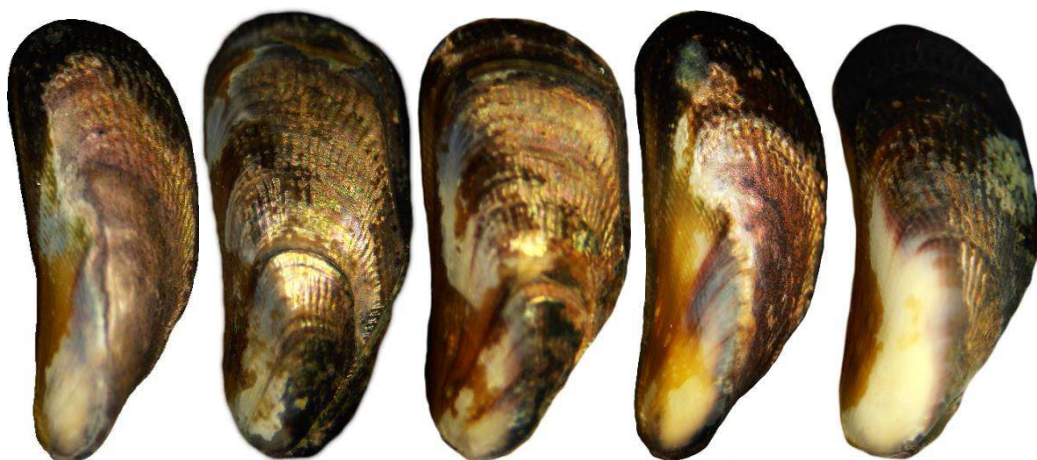


Figura 10. Diferentes especímenes *B. adamsianus* colectados en la costa norte del Perú. Se aprecia una variabilidad en el patrón de coloración y en la forma. Fotografías en posición dorsal

Los resultados del BLAST del marcador COI identificaron con un 99% de identidad a la especie *Brachidontes adamsianus* (Anexo 5). A diferencia del BLAST, BOLDSYSTEMS hasta la fecha no almacena secuencias de la especie *B. adamsianus* (Anexo 6). Por su lado, el BLAST del marcador 16SrRNA sugirió con un 83% a las especies *Brachidontes pharaonis* y *Brachidontes exustus* debido a la carencia de secuencias de marcador en la base de datos (Anexo 7). El árbol de distancias Neighbor-Joining agrupó a todas las secuencias COI de los especímenes colectados en un solo clado (Figura 11). Se visualiza también la lejanía genética de *B. adamsianus* con otras especies tales como *Semimytilus algosus* y *Perumytilus purpuratus* quienes son habitantes comunes del intermareal rocoso de la Provincia Peruana. Las otras especies del género *Brachidontes* incluidas en el árbol no se encuentran en el mar peruano.

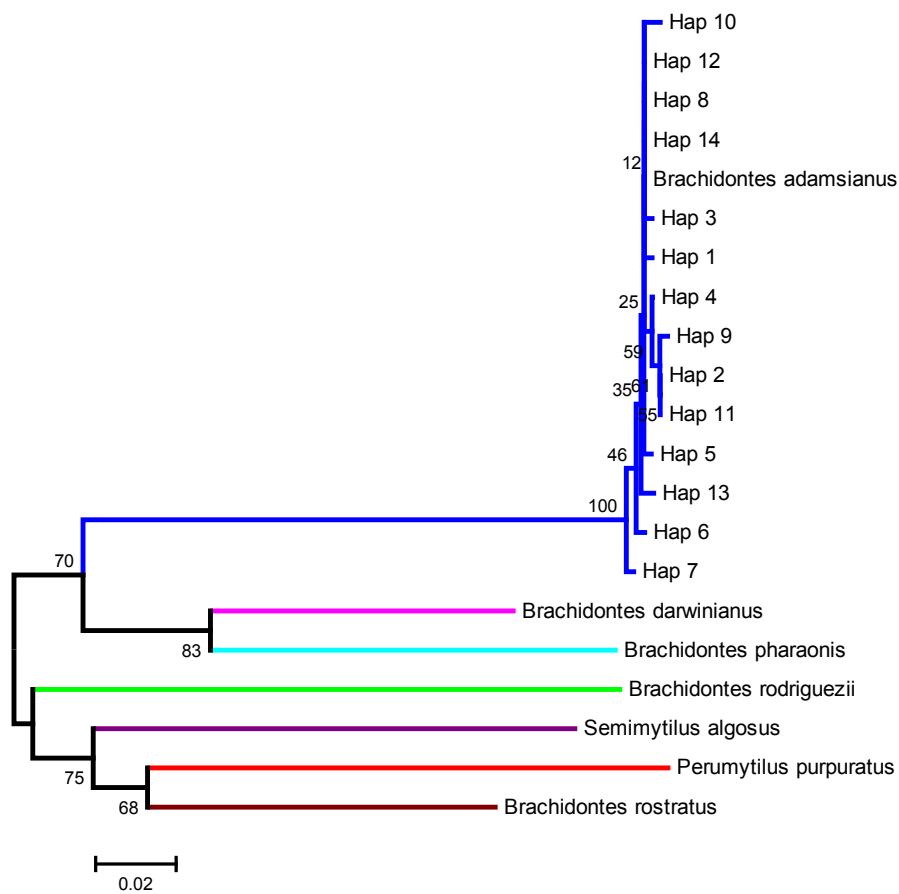


Figura 11. Árbol de distancias Neighbor-Joining (construido bajo el modelo de sustitución Kimura 2-parámetros) con las secuencias COI de *Brachidontes adamsianus* mostradas como haplotipos (azul) y secuencias COI de especies cercanas (en colores).

El análisis de *barcode gap* también fue consistente con la presencia de una única especie mostrando una divergencia genética intraespecífica máxima de 1% y divergencia interespecífica mínima de 13% (Figura 12).

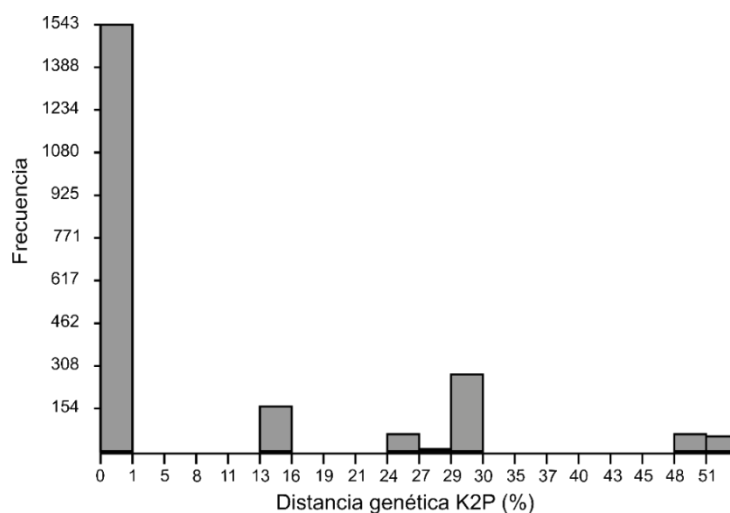


Figura 12. Barcode gap en *B. adamsianus*.

4.3. Diversidad genética

En 95 secuencias del marcador COI (604 pb) de *E. paytensis* se detectaron 58 sitios polimórficos, 53 haplotipos y ningún evento indel, mientras que para el marcador 16SrRNA (475 pb) se detectaron 32 sitios polimórficos, 31 haplotipos y un evento indel. El marcador COI exhibió valores más altos de diversidad haplotípica ($Hd_{COI} = 0.786 - 1.00$) en comparación con en el marcador 16SrRNA ($Hd_{16S} = 0.464 - 0.893$). Los valores más altos de diversidad haplotípica fueron encontrados en las poblaciones de Media Luna ($Hd_{COI} = 1.000$; $Hd_{16S} = 0.800$) y Máncora ($Hd_{COI} = 0.964$; $Hd_{16S} = 0.893$), mientras que los valores más bajos de diversidad haplotípica fueron encontrados en la población de Zorritos ($Hd_{COI} = 0.786$, $Hd_{16S} = 0.464$).

La diversidad nucleotídica detectada para el marcador COI fue en promedio tres veces mayor que la diversidad nucleotídica del marcador 16SrRNA ($\pi_{COI} = 0.00804$; $\pi_{16S} = 0.00270$). Los valores más altos de diversidad nucleotídica se encontraron en Media Luna ($\pi_{COI} = 0.01072$; $\pi_{16S} = 0.00374$) y Máncora ($\pi_{COI} =$

0.01236; $\pi_{16S} = 0.00316$), y los valores más bajos se encontraron en Zorritos ($\pi_{COI} = 0.00290$; $\pi_{16S} = 0.00158$) (Tabla 6).

Tabla 6. Índices de diversidad genética en *E. paytensis*

Población	COI						16SrRNA				
	n	S	Eta	h	Hd	π	S	Eta	h	Hd	π
Anconcito	10	17	18	8	0.956	0.01019	5	5	5	0.756	0.00277
Zorritos	8	5	5	5	0.786	0.00290	3	3	3	0.464	0.00158
Punta Sal	10	21	21	9	0.978	0.00909	7	7	5	0.667	0.00295
Máncora	8	25	25	7	0.964	0.01236	6	6	6	0.893	0.00316
El Ñuro	8	16	17	6	0.893	0.00786	5	5	5	0.786	0.00264
Paita	13	18	18	11	0.962	0.00811	7	7	5	0.538	0.00281
Punta Aguja	8	10	10	6	0.893	0.00520	5	5	6	0.893	0.00301
Media Luna	15	29	29	15	1.000	0.01072	10	10	9	0.800	0.00374
Puémape	15	17	18	12	0.962	0.00598	5	5	4	0.371	0.00165
Total	95	58	62	53	0.963	0.00851	32	32	31	0.662	0.00269

Leyenda: N = Número de secuencias, S = Número de sitios polimórficos, Eta = Número de mutaciones, h = Número de haplotipos, Hd = Diversidad haplotípica, π = Diversidad nucleotídica.

En 55 secuencias del marcador COI (660 pb) de *B. adamsianus* se encontraron 22 sitios polimórficos, 14 haplotipos y ningún evento indel, mientras que en 38 secuencias del marcador 16SrRNA (536 pb) se detectaron 55 sitios polimórficos y 36 posiciones con eventos indels (Figura 13) dando un total de 91 sitios polimórficos. Considerando a los indels como sitios polimórficos, se detectaron 11 haplotipos para este marcador (Tabla 7).

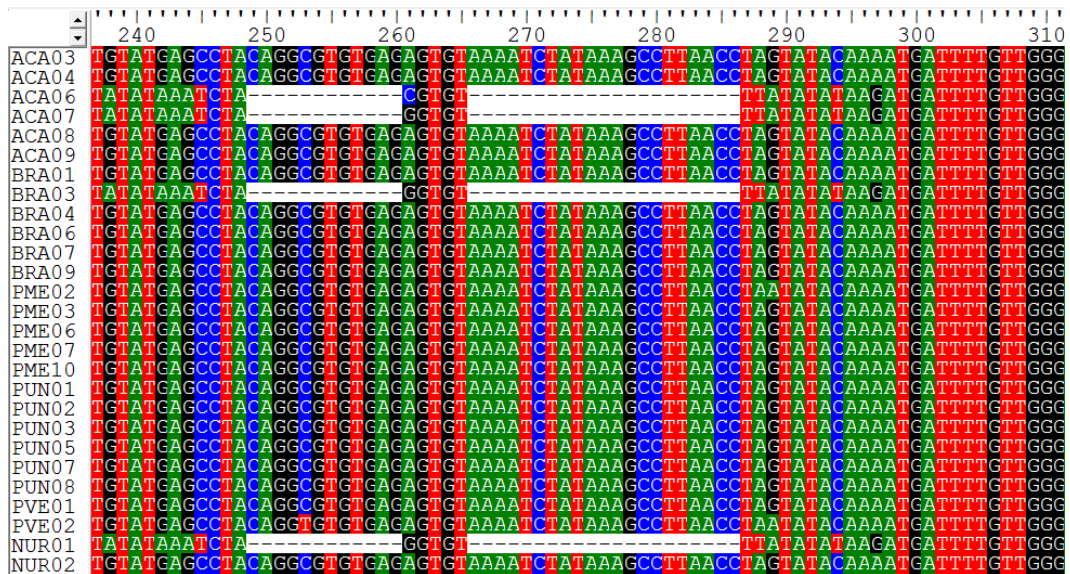


Figura 13. Segmento del alineamiento del marcador 16SrRNA en *B. adamsianus* mostrando eventos indels de gran longitud.

La diversidad genética de *B. adamsianus* fue baja para ambos marcadores ($Hd_{COI} = 0.420$, $Hd_{16S} = 0.533$). Punta Mero fue la población con menor cantidad de sitios polimórficos y de haplotipos. Máncora y Punta Sal, al presentar un único haplotipo en COI, presentan una diversidad haplotípica igual a cero. Las poblaciones con mayor diversidad haplotípica en base a ambos marcadores genéticos fueron El Ñuro ($Hd_{COI} = 0.722$, $Hd_{16S} = 0.800$) y Paita ($Hd_{COI} = 0.667$, $Hd_{16S} = 0.805$). La diversidad nucleotídica para la población total en base al marcador COI fue de 0.0026, y en base al marcador 16SrRNA de 0.0434, siendo esta última 10 veces mayor que el otro marcador debido a que se consideraron los indels como sitios polimórficos.

Tabla 7. Índices de diversidad genética en *B. adamsianus*

Población	COI					16SrRNA						
	n	S	h	Hd	π	n	S*	Ts+Tv	Indels	h	Hd	π
Zorritos	9	6	4	0.583	0.0023	6	85	49	36	3	0.600	0.0832
Punta Mero	10	0	3	0.378	0.0031	5	3	3	0	2	0.400	0.002
Punta Sal	9	0	1	0.000	0.0000	6	82	47	35	2	0.333	0.0510
Máncora	8	0	1	0.000	0.0000	6	0	0	0	1	0.000	0.0000
El Ñuro	9	13	5	0.722	0.0056	6	85	51	35	4	0.800	0.0542
Paita	10	7	5	0.667	0.0033	9	86	51	35	5	0.805	0.0622
Total	55	22	14	0.420	0.0026	38	91	56	36	11	0.533	0.0434

Leyenda: n = número de individuos, S = Número de sitios polimórficos, Ts + Tv = Número de sustituciones, indels = gaps, * Considerando sustituciones e indels

4.4. Redes de haplotipos y Análisis de clados anidados

La topología de la red de haplotipos basado en el marcador COI del caracol *E. paytensis* es compleja y atípica (Figura 14). Los haplotipos H2, H4, H7, H14 y H15 fueron los más frecuentes estando presentes en las tres zonas biogeográficas, mientras que los haplotipos H5, H17, H20 y H30 estuvieron presentes en dos zonas biogeográficas. Los haplotipos restantes fueron exclusivos de una sola población (Anexo 8). Los haplotipos se distancian entre sí comúnmente por un único paso mutacional, a excepción del haplotipo H39 el cual se distancia del haplotipo 2 por varias mutaciones. Se detectan varios haplotipos intermediarios o faltantes en la red de haplotipos. Las poblaciones con mayor número de haplotipos fueron Media Luna, Puémape, Paita, Punta Sal y Anconcito con 15, 12, 11, 9 y 8 haplotipos respectivamente. Media Luna y Puémape fueron las poblaciones con el mayor número de haplotipos privados con 11 y siete respectivamente. El diseño anidado de la red de 53 haplotipos fue agrupado por el programa ANeCA en 31 clados de primer nivel, 11 clados de segundo nivel, cuatro clados de tercer nivel, dos clados de cuarto nivel y el Cladograma total. De todos los clados, solo tres clados tuvieron

asociaciones significativas con la geografía ($P < 0.05$) mientras que en los demás clados no se pudo rechazar la hipótesis nula de no asociación geográfica (Anexo 12). Se pudo inferir eventos de restricción al flujo génico en los clados 2-2 y 3-3, mientras que el clado más grande 4-1 se detectó un patrón de expansión de rango de contiguo (Tabla 8).

Tabla 8. Cadena de inferencia para clados significativos en *E. paytensis* provistos por el análisis NCA para el marcador COI

Clado	Cadena de Inferencia	Evento demográfico inferido
2-2	1-2-3-4-NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
3-3	1-2-3-4-NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
4-1	1-2-11-12-NO	Expansión de rango contiguo
Cladograma Total (5-1)	No se puede rechazar la hipótesis nula	

La cadena de inferencia corresponde a la clave del año 2005 disponible en (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>), H_0 = No hay asociación entre haplotipos con la geografía

La red de haplotipos del marcador 16SrRNA para el caracol *E. paytensis* exhibe una topología tipo estrella, i.e. presencia de un haplotipo de alta frecuencia de donde nacen varios haplotipos recientes y de baja frecuencia. H2 aparece como el haplotipo más frecuente y extendido debido a que está presente en todas las poblaciones. El haplotipo H5, si bien de baja frecuencia (7 individuos), fue encontrado en seis poblaciones. Media Luna, Máncora y Punta Aguja son las poblaciones con el mayor número de haplotipos (nueve, seis y seis respectivamente) (

Anexo 9). El análisis de clados anidados agrupó a la red de haplotipos en 12 clados de un paso, tres clados de dos pasos y el Cladograma total (Figura 15). Los únicos clados con asociación significativa con la geografía fueron el clado 2-1 y el Cladograma total (Tabla 9, Anexo 13).

Tabla 9. Cadena de inferencia para clados significativos en *E. paytensis* provistos por el análisis NCA para el marcador 16SrRNA

Clado	Cadena de Inferencia	Evento demográfico inferido
2-1	1-2-11-17-4-NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
Cladograma Total (3-1)	1-2-11-12-NO	Expansión de rango contiguo

La cadena de inferencia corresponde a la clave del año 2005 disponible en (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>)

La topología de la red de haplotipos en base al marcador COI para el mitócondrio *B. adamsianus* exhibe una conformación tipo estrella. H2 es el haplotipo más frecuente con 42 individuos de donde surgen otros nueve haplotipos de baja frecuencia (1 individuo). Los haplotipos H13, H7, H6 y H10 se separan del haplotipo H12 por más de evento mutacional. Paita, El Ñuro y Zorritos fueron las poblaciones con mayor número de haplotipos (cinco, cinco y cuatro respectivamente), mientras que Máncora y Punta Sal solo presentaron un único haplotipo (H2) (Anexo 10).

El Análisis de Clados Anidados agrupó a la red de haplotipos en nueve clados de un paso, tres clados de dos pasos y el Cladograma total (clado 3-1) (Figura 16). Los clados internos no mostraron asociación geográfica significativa (no se pudo rechazar la H0) mientras que el Cladograma total sugirió una restricción del flujo génico por aislamiento por distancia (Tabla 10, Anexo 14).

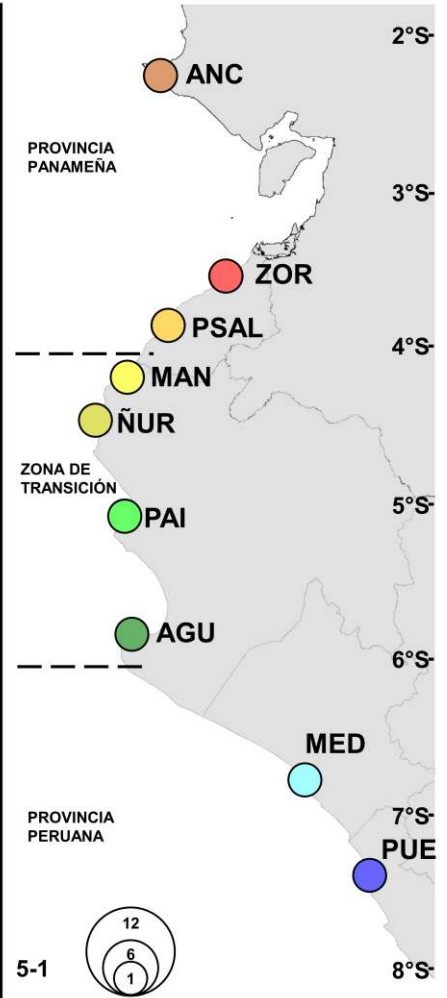
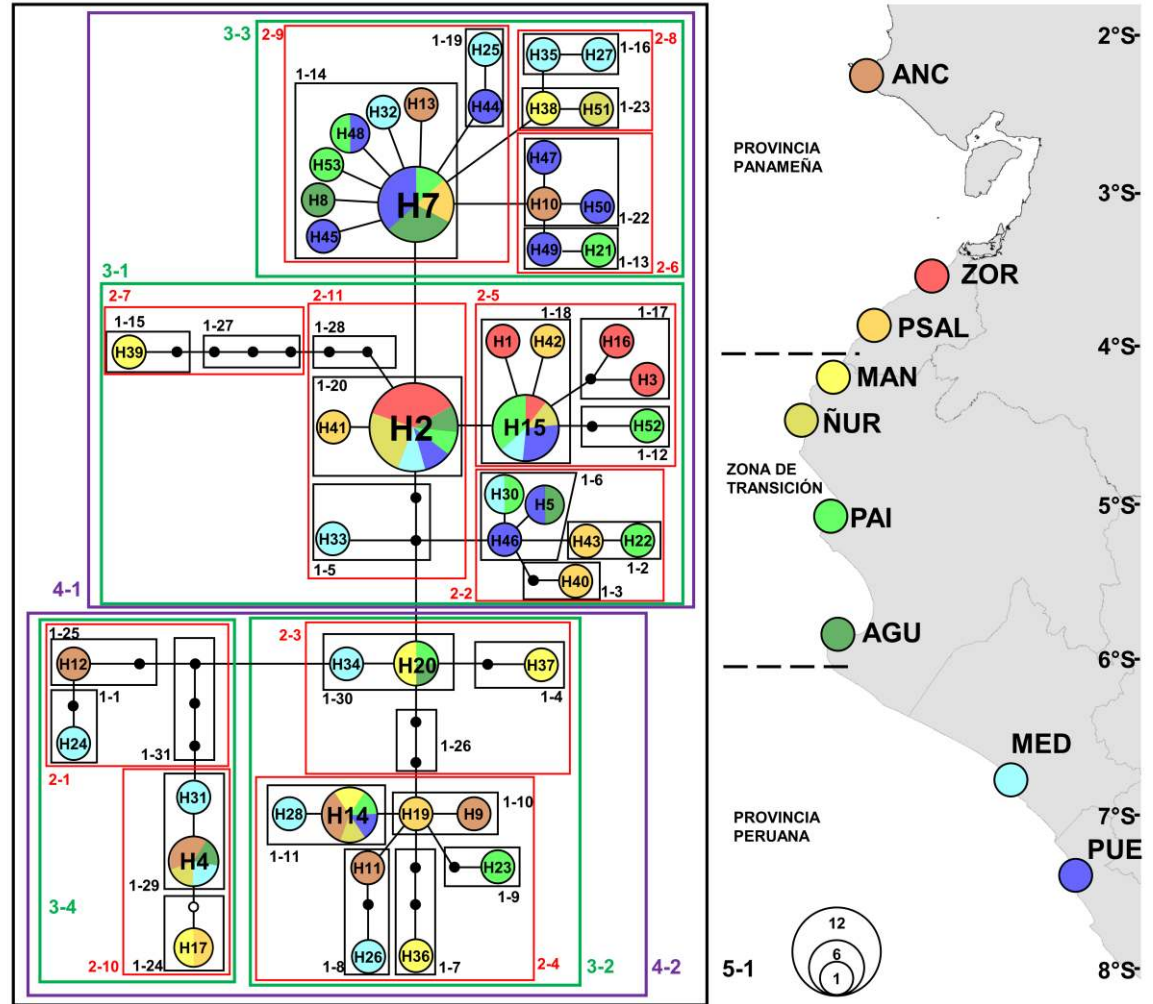
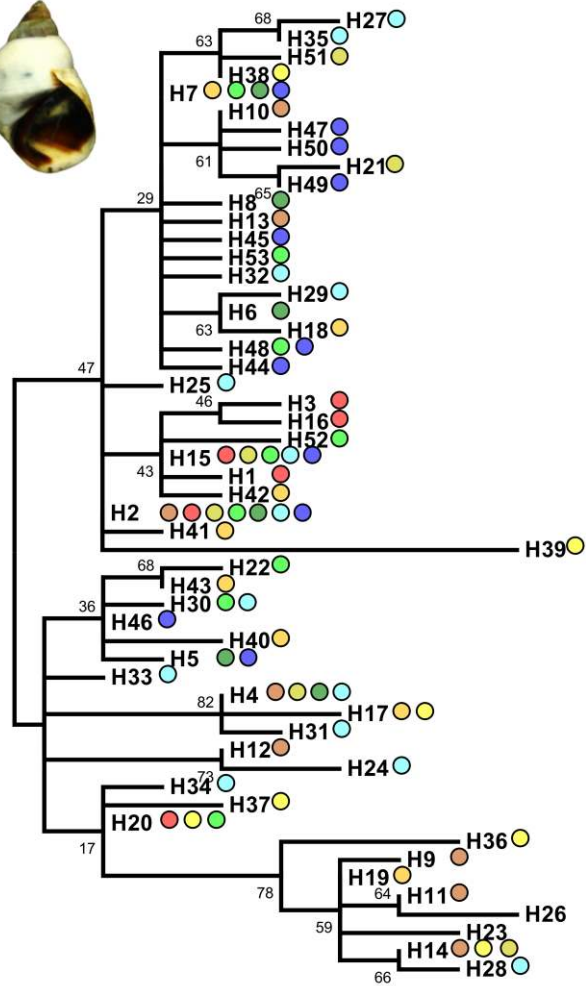


Figura 14. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (izquierda) y red de haplotipos anidado (derecha) para *E. paytensis* en base al marcador mitocondrial COI. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermedios que no fueron encontrados en la muestra. Las frecuencias se indican en la parte inferior.

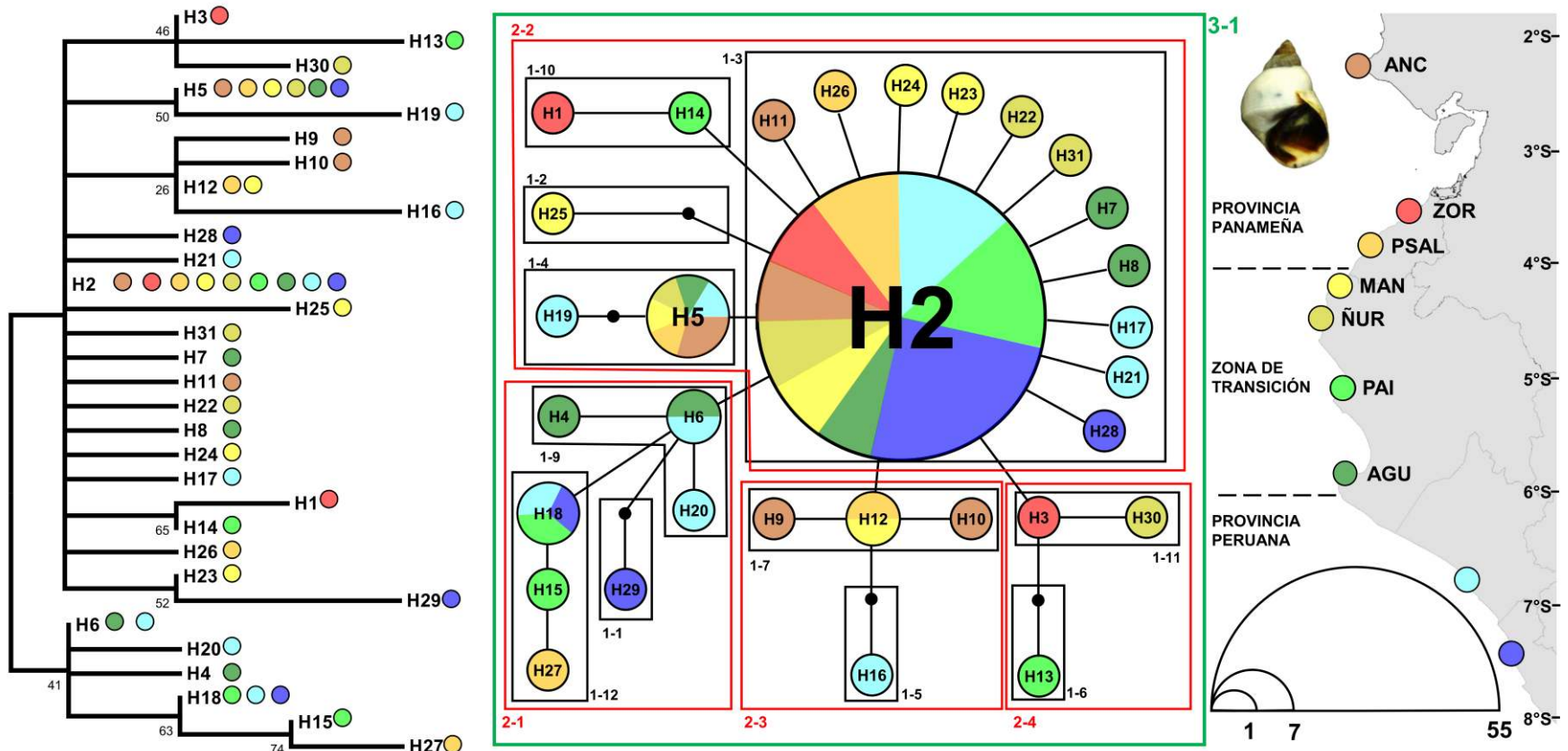


Figura 15. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Tamura-Nei (TrN) (izquierda) y red de haplotipos anidado (derecha) para *E. paytensis* en base al marcador mitocondrial 16SrRNA. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermediarios que no fueron encontrados en la muestra. Las frecuencias se indican en la parte inferior.

Tabla 10. Cadena de inferencia para clados significativos en *B. adamsianus* provistos por el análisis NCA para el marcador COI

Clado	Cadena de Inferencia	Evento demográfico inferido
Cladograma Total (3-1)	1-2-3-4-NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia

La cadena de inferencia corresponde a la clave del año 2005 disponible en (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>), H0 = No hay asociación entre haplotipos con la geografía

La red de haplotipos en base al marcador 16SrRNA para el mitílido *B. adamsianus* exhibe dos haplogrupos claros y separados por varios pasos mutacionales (Figura 17). El haplotipo H1 estuvo presente en todas las poblaciones y fue el haplotipo más frecuente (26 individuos). Los haplotipos dentro de cada haplogrupo se separan genéticamente por un máximo de dos eventos mutacionales. Al igual que con el marcador COI, las poblaciones de Paita, El Ñuro y Zorritos fueron las que presentaron mayor número de haplotipos, mientras que Máncora solo presentó un haplotipo (H1) (Anexo 11). El programa ANeCA agrupó a esta red en ocho clados de primer nivel, tres clados de segundo nivel y dos clados de tercer nivel. Ningún clado tuvo una asociación geográfica estadísticamente significativa (Anexo 15).

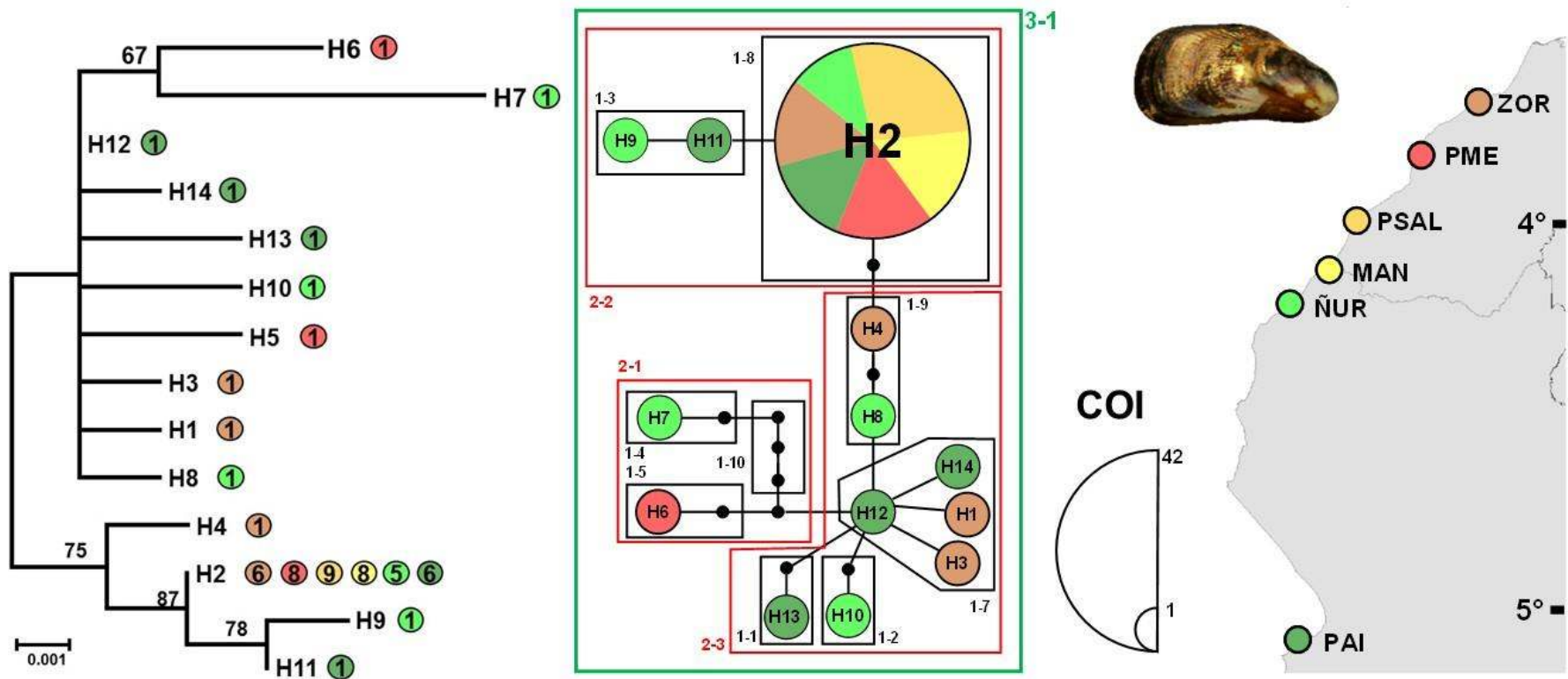


Figura 16. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) y red de haplotipos anidado para *B. adamsianus* en base al marcador mitocondrial COI. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermedios que no fueron encontrados en la muestra. La clave de frecuencias haplotípicas es mostrada como semicircunferencias en la derecha.

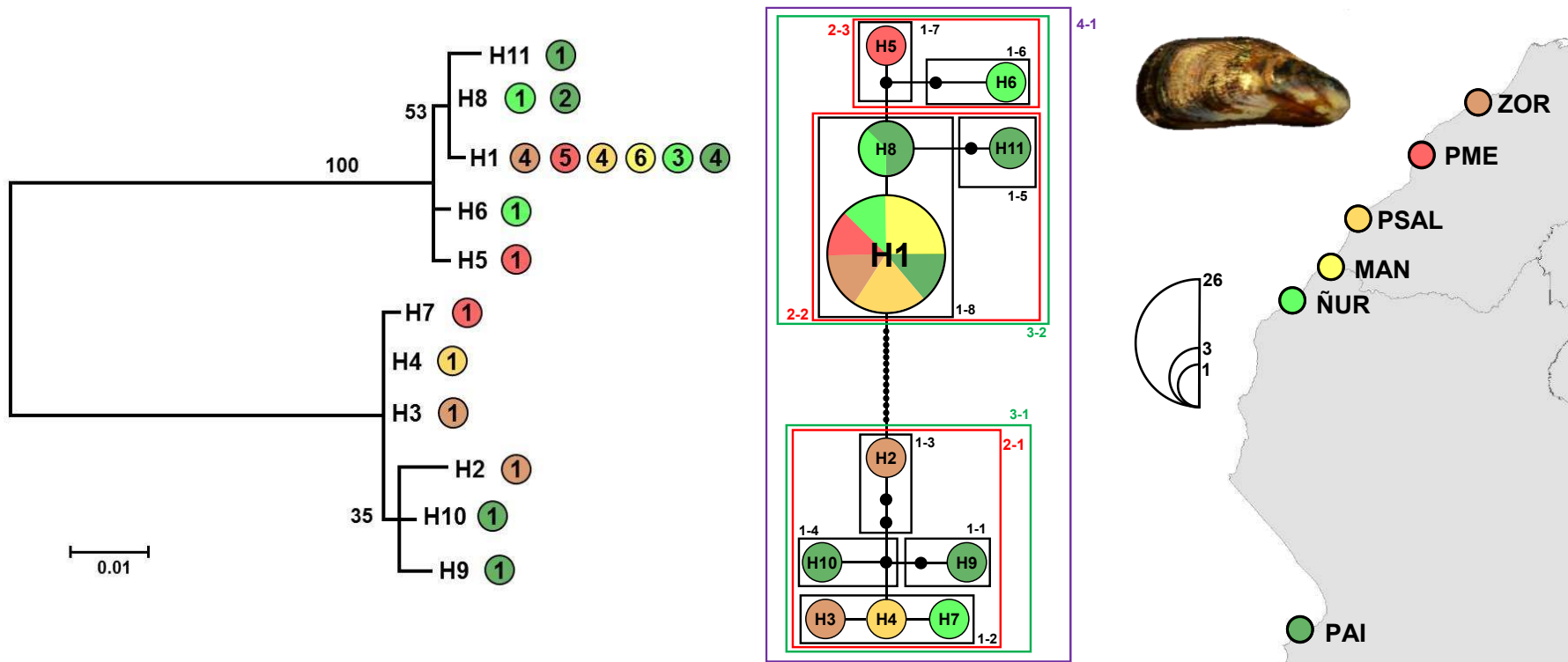


Figura 17. Árbol filogenético Maximum Likelihood construido bajo el modelo de sustitución Hasegawa-Kishino-Yano (HKY) Y red de haplotipos anidado para *B. adamsianus* en base al marcador mitocondrial 16SrRNA. Los clados son enumerados de acuerdo a su nivel. Los colores indican las poblaciones correspondientes a cada haplotipo y los círculos negros representan haplotipos intermediarios que no fueron encontrados en la muestra. La clave de frecuencias haplotípicas es mostrada como semicircunferencias en la derecha

4.5. Análisis filogenético

Para el caracol *E. paytensis*, el árbol filogenético basado en el marcador COI construido con el modelo HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano, BIC = 3940.3356, $-\ln L = 1355.4247$) exhibió dos clados con un relativo soporte estadístico (bootstrap = 47). Se observan algunas politomías y varios clados internos fuertemente soportados (bootstrap > 50). En general, las posiciones filogenéticas de los haplotipos no muestran una asociación con sus distribuciones geográficas (Figura 14). Para esta misma especie, la filogenia basada en el marcador 16S fue construida con el modelo de sustitución Tamura-Nei (TrN, BIC = 2970.5972, $-\ln L = 890.5387$). El árbol exhibió dos clados también con relativo soporte estadístico (bootstrap = 41) pero con un alto grado de politomías debido a la alta similitud genética entre secuencias (Figura 15).

Para *B. adamsianus*, los árboles filogenéticos para ambos marcadores fueron construidos con el modelo de sustitución HKY85. Se aprecian dos clados fuertemente soportados (bootstrap = 75) en el árbol basado en el marcador COI, concordantes con los haplogrupos de la red de haplotipos. El clado más grande exhibe varias politomías debido a la cercanía genética de las secuencias y tampoco se aprecia asociación con la biogeografía (Figura 16). Para el árbol 16SrRNA, principalmente debido a la presencia de indels, los haplogrupos se visualizan como grupos completamente separados con un soporte estadístico máximo (bootstrap = 100). Similar al árbol filogenético de COI, esta discontinuidad filogenética no se relaciona con la biogeografía (Figura 17).

4.6. Estructura genética

El test de AMOVA para el caracol *E. paytensis* mostró que la variación genética entre grupos (i.e. entre zonas biogeográficas) fue prácticamente cero revelándose ninguna concordancia genética regional con las zonas biogeográficas ($\Phi_{CT} < 0$, $P > 0.05$). La mayor parte de la variación genética fue encontrada dentro de las poblaciones independientemente de la zona biogeográfica. En el caso del marcador COI aproximadamente el 95% de la variación genética se encontró dentro de las poblaciones y mostró una estructura genética débil pero significativa ($\Phi_{ST} = 0.044$, $P < 0.05$). En el marcador 16SrRNA, la totalidad de la variación genética se encontró dentro de las poblaciones sugiriendo una diferenciación genética global prácticamente nula ($\Phi_{ST} < 0$, $P > 0.05$) (Tabla 11).

Tabla 11. Pruebas de AMOVA en *E. paytensis*

Agrupamientos	FV	COI			16SrRNA		
		% V	Φ	P	% V	Φ	P
PA/TR/PE	A	-3.87	$\Phi_{CT} = -0.03$	0.9850	-0.800	$\Phi_{CT} = -0.008$	0.830
	B	7.440	$\Phi_{SC} = 0.071$	0.003*	-0.150	$\Phi_{SC} = -0.001$	0.563
	C	96.43	$\Phi_{ST} = 0.035$	0.017*	100.9	$\Phi_{ST} = -0.009$	0.683
PA-TR/PE	A	-2.32	$\Phi_{CT} = -0.02$	0.772	-0.200	$\Phi_{CT} = -0.002$	0.554
	B	5.680	$\Phi_{SC} = 0.055$	0.012*	-0.660	$\Phi_{SC} = -0.006$	0.661
	C	96.64	$\Phi_{ST} = 0.030$	0.012*	100.8	$\Phi_{ST} = -0.008$	0.688
PA/TR-PE	A	-2.26	$\Phi_{CT} = -0.02$	0.899	-0.290	$\Phi_{CT} = -0.002$	0.548
	B	5.610	$\Phi_{SC} = 0.054$	0.009*	-0.620	$\Phi_{SC} = -0.006$	0.656
	C	96.60	$\Phi_{ST} = 0.033$	0.023*	100.9	$\Phi_{ST} = -0.009$	0.681
PA-TR-PE	B	4.490	$\Phi_{ST} = 0.044$	0.016*	-0.750	$\Phi_{ST} = -0.007$	0.687
	C	95.50			100.7		

Leyenda: PA = Provincia Panameña, TR = Zona de transición, PE = Provincia Peruana, FV = Fuente de variación, %V = Porcentaje de varianza, * = $P < 0.05$, A = Entre grupos (entre zonas biogeográficas), B = Entre poblaciones dentro de grupos (entre poblaciones dentro de las zonas biogeográficas), C = Dentro de las poblaciones

Para el mitótipo *B. adamsianus* se examinaron con el AMOVA dos agrupaciones posibles (Tabla 12). En ambos marcadores prácticamente la totalidad de la varianza molecular se encontró dentro de la jerarquía “dentro de las poblaciones”. Todos los estadísticos Φ fueron no significativos.

Tabla 12. Pruebas de AMOVA en *B. adamsianus*

Agrupación	FV	COI			16SrRNA		
		%V	Φ	P	%V	Φ	P
PA/TR	A	-2.07	$\Phi_{CT} = -0.02$	0.487	-4.1	$\Phi_{CT} = -0.040$	0.777
	B	2.55	$\Phi_{SC} = 0.025$	0.216	-2.37	$\Phi_{SC} = -0.022$	0.526
	C	99.5	$\Phi_{ST} = 0.004$	0.324	106.4	$\Phi_{ST} = -0.064$	0.671
PA-TR	B	1.30	$\Phi_{ST} = 0.013$	0.294	-4.74	$\Phi_{ST} = -0.047$	0.638
	C	98.7			104.7		

Leyenda: PA = Provincia Panameña, TR = Zona de transición, FV = Fuente de variación, %V = Porcentaje de varianza, * = $P < 0.05$, A = Entre grupos (entre zonas biogeográficas), B = Entre poblaciones dentro de grupos (entre poblaciones dentro de las zonas biogeográficas), C = Dentro de las poblaciones

Las distancias genéticas F_{ST} a pares de poblaciones para el caracol *E. paytensis* se muestran en la Tabla 13. Según el marcador COI, Zorritos exhibe distancias genéticas significativas con Anconcito ($F_{STCOI} = 0.300^*$), Punta Aguja ($F_{STCOI} = 0.213^*$) y Máncora ($F_{STCOI} = 0.262^*$). Anconcito y Máncora también exhiben distancias genéticas significativas con otras poblaciones. Para el caso del marcador 16SrRNA, la única distancia genética F_{ST} significativa fue detectada entre las poblaciones de Anconcito y Puémape ($F_{ST16S} = 0.06^*$).

Tabla 13. Distancias genéticas F_{ST} a pares de poblaciones para ambos marcadores en *E. paytensis*. Por debajo de la diagonal se muestran las distancias F_{ST} para el marcador COI y por encima las distancias F_{ST} para el marcador 16SrRNA

	ANC	ZOR	PSAL	MAN	ÑUR	PAI	AGU	MED	PUE
ANC	0	0.033	-0.026	-0.039	-0.046	0.0500	0.0230	-0.014	0.060*
ZOR	0.300*	0	-0.007	0.0000	-0.032	-0.025	0.0280	0.011	0.0110
PSAL	0.0180	0.145*	0	-0.034	-0.040	-0.038	-0.023	-0.041	-0.019
MAN	-0.057	0.262*	-0.024	0	-0.047	0.0200	0.0030	-0.016	0.0140

ÑUR	0.0410	0.071*	-0.043	0.032	0	0.0030	0.0030	-0.022	0.0240
PAI	0.0590	0.0820	-0.039	0.033	-0.041	0	-0.005	-0.007	-0.023
AGU	0.158*	0.213*	-0.016	0.129*	-0.026	0.033	0	-0.031	0.0050
MED	-0.009	0.134*	-0.044	-0.017	-0.034	-0.005	0.010	0	-0.004
PUE	0.172*	0.138*	0.0270	0.163*	-0.024	0.019	-0.037	0.055	0

* = Distancias F_{ST} significativas ($P < 0.05$). Leyenda: ANC = Anconcito, ZOR = Zorritos, PSAL = Punta Sal, MAN = Máncora, ÑUR = El Ñuro, PAI = Paita, AGU = Punta Aguja, MED = Media Luna, PUE = Puémape

En el mitílido *B. adamsianus*, las mayores distancias genéticas F_{ST} fueron encontradas entre Zorritos y Punta Sal ($F_{STCOI} = 0.125$), Zorritos y Máncora ($F_{STCOI} = 0.107$, $F_{ST16S} = 0.193$) y Zorritos y Punta Mero ($F_{ST16S} = 0.148$). Todas las distancias genéticas F_{ST} a pares de poblaciones fueron no significativas (Tabla 14).

Tabla 14. Distancias genéticas F_{ST} a pares de poblaciones para ambos marcadores en *B. adamsianus*. Por debajo de la diagonal se muestran las distancias F_{ST} para el marcador COI (660pb) y por encima las distancias F_{ST} para el marcador 16SrRNA (536 pb). * Distancias genéticas significativas, $P < 0.05$)

	Zorritos	Punta Mero	Punta Sal	Máncora	El Ñuro	Paita
Zorritos	0	0.1480	-0.113	0.193	-0.110	-0.115
Punta Mero	-0.055	0	0.0000	0.040	-0.038	0.028
Punta Sal	0.1250	0.047	0	0.000	-0.188	-0.138
Máncora	0.1070	0.032	0.000	0	0.011	0.067
El Ñuro	-0.057	-0.034	0.118	0.100	0	-0.142
Paita	-0.066	-0.045	0.138	0.121	-0.059	0

En el caracol *E. paytensis*, el software BARRIER detectó las dos barreras genéticas principales en base a la matriz de distancias F_{ST} . La barrera más importante según ambos marcadores se encuentra entre Anconcito y Zorritos. Entre Zorritos y Punta Sal y entre El Ñuro y Paita también son sugeridos como barreras genéticas. En el mitílido *B. adamsianus*, ambos marcadores coincidieron en que existe una barrera genética entre Máncora y El Ñuro (Figura 18).

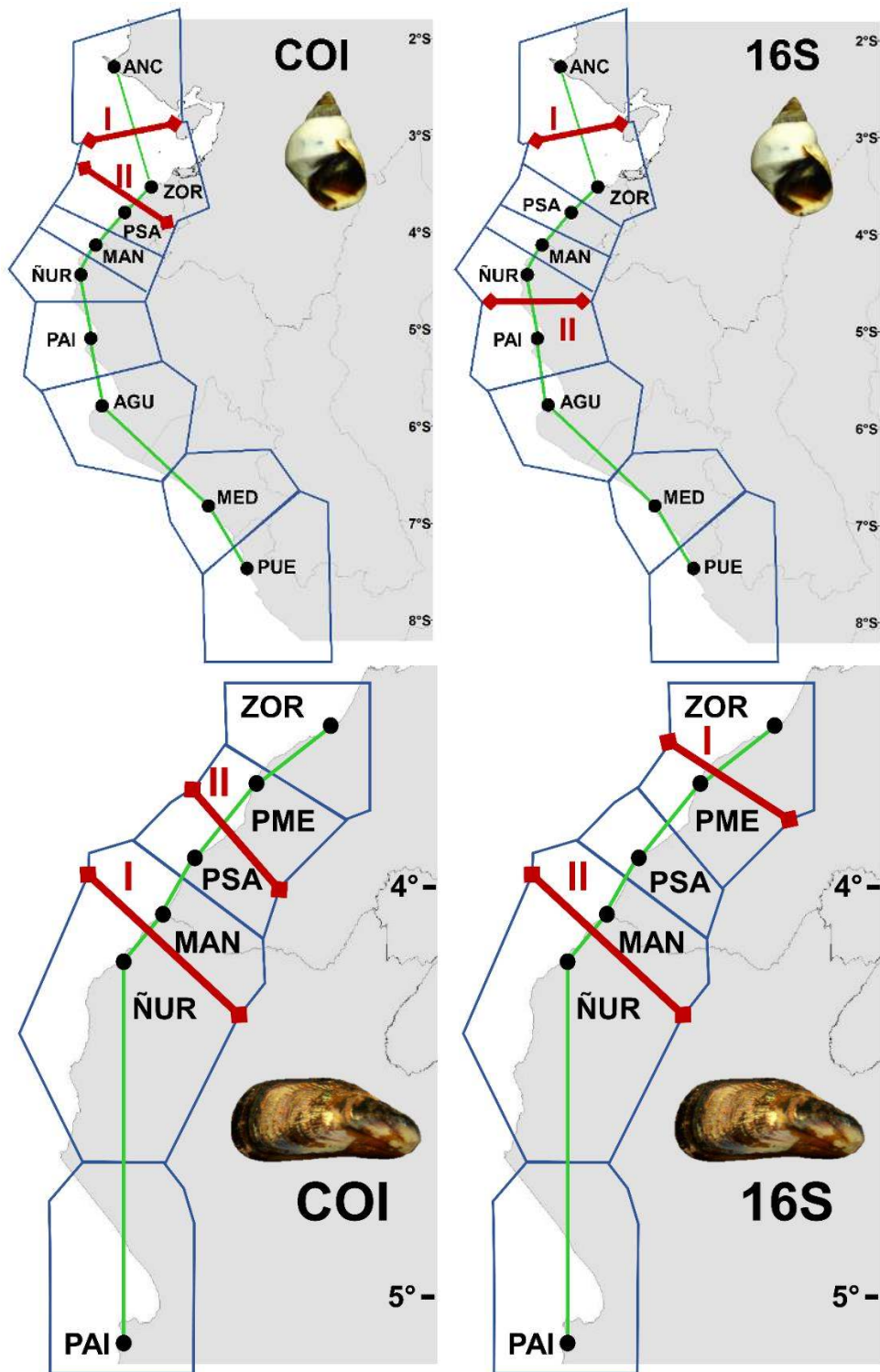


Figura 18. Ubicación geográfica de las dos barreras genéticas principales (mostradas como líneas gruesas rojas) detectadas en *E. paytensis* y en *B. adamsianus*. Las barreras genéticas fueron detectadas usando matrices de distancias F_{ST} con el software BARRIER. Se muestra la triangulación de Delaunay y el teselado de Voronoi como líneas verdes y cuadriláteros azules respectivamente.

4.7. Flujo génico

Para el análisis de flujo génico en el caracol *E. paytensis* se utilizaron los ratios transición/transversión (sugeridos por jModeltest) los cuales fueron 11.8 y 14.9 para los marcadores COI y 16SrRNA respectivamente. Los valores obtenidos del parámetro Nm sugirieron un flujo génico bidireccional y asimétrico. Sin embargo los niveles sugeridos por ambos marcadores parecen ser contradictorios. En el caso de *B. adamsianus*, el ratio transición/transversión fueron 4.7 y 12.1 para los marcadores COI y 16SrRNA respectivamente. Ambos marcadores fueron concordantes: flujo génico débil desde de la Zona de Transición a la Provincia Panameña y un flujo génico fuerte en sentido contrario (Tabla 15, Figura 19).

Tabla 15. Estimaciones del flujo génico en *E. paytensis* y *B. adamsianus*.

Especie	Marcador	ZB	Θ	M	Nm
<i>E. paytensis</i>	COI	PA (1)	0.05633	$M_{2 \rightarrow 1} = 879.9$	$Nm_{2 \rightarrow 1} = 49.5$
				$M_{3 \rightarrow 1} = 556.6$	$Nm_{3 \rightarrow 1} = 31.3$
		TR (2)	0.01469	$M_{1 \rightarrow 2} = 274.1$	$Nm_{1 \rightarrow 2} = 4.00$
				$M_{3 \rightarrow 2} = 381.1$	$Nm_{3 \rightarrow 2} = 5.60$
		PE (3)	0.06688	$M_{1 \rightarrow 3} = 521.0$	$Nm_{1 \rightarrow 3} = 34.8$
				$M_{2 \rightarrow 3} = 914.8$	$Nm_{2 \rightarrow 3} = 61.1$
	16SrRNA	PA (1)	0.00528	$M_{2 \rightarrow 1} = 238.8$	$Nm_{2 \rightarrow 1} = 1.26$
				$M_{3 \rightarrow 1} = 137.8$	$Nm_{3 \rightarrow 1} = 0.72$
		TR (2)	0.06947	$M_{1 \rightarrow 2} = 889.5$	$Nm_{1 \rightarrow 2} = 61.7$
				$M_{3 \rightarrow 2} = 611.4$	$Nm_{3 \rightarrow 2} = 42.4$
PE (3)	0.05898	$M_{1 \rightarrow 3} = 839.9$	$Nm_{1 \rightarrow 3} = 49.5$		
		$M_{2 \rightarrow 3} = 524.3$	$Nm_{2 \rightarrow 3} = 30.9$		
<i>B. adamsianus</i>	COI	PA (1)	0.0315	$M_{2 \rightarrow 1} = 545.5$	$Nm_{2 \rightarrow 1} = 1.71$
				TR (2)	0.05629
	16SrRNA	PA (1)	0.00624		
				TR (2)	0.04274

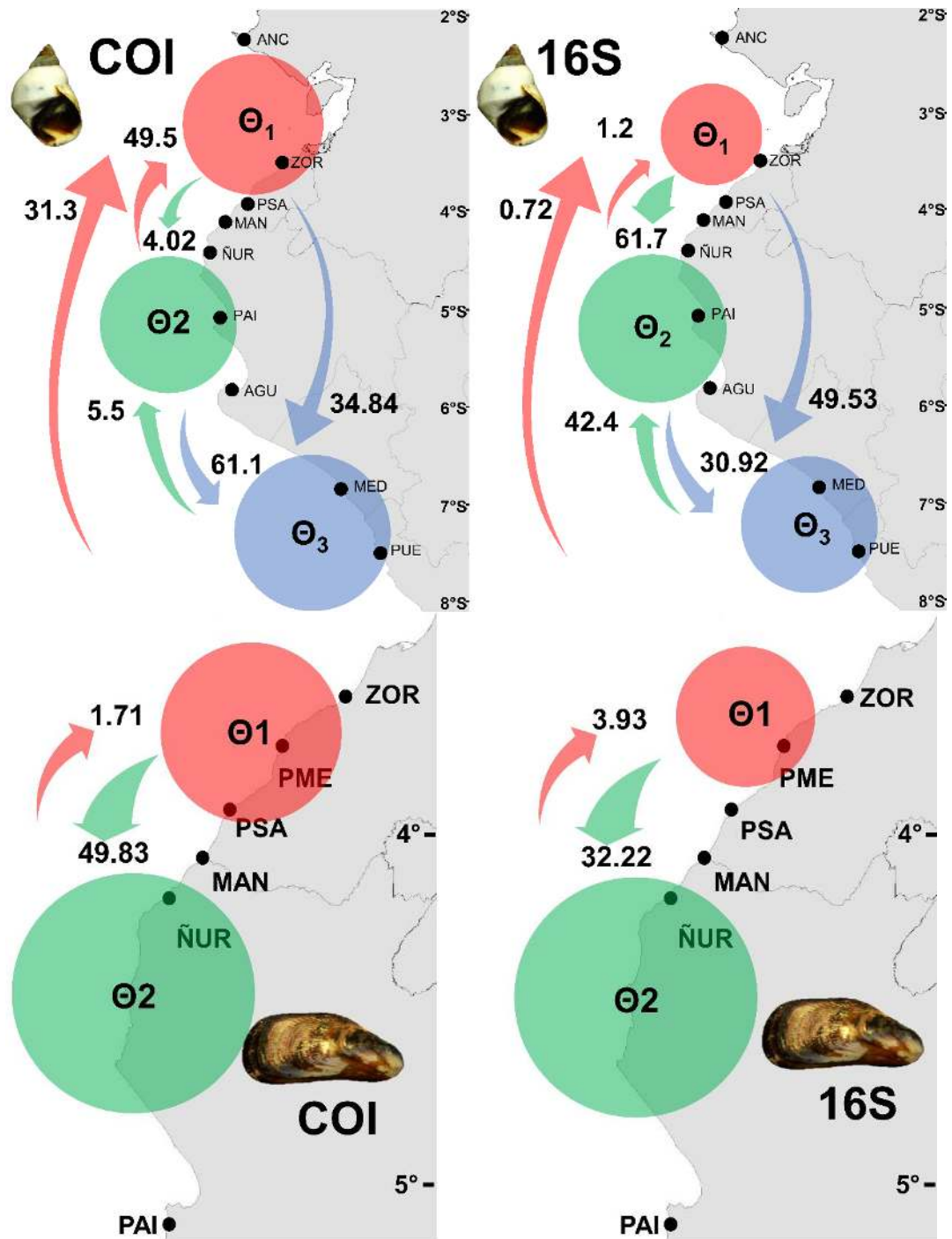


Figura 19. Niveles y direccionalidad del flujo génico en *E. paytensis* y *B. adamsianus* expresados como número de inmigrantes hembras por generación (N_m) entre las zonas biogeográficas. La Provincia Panameña (1-rojo), Zona de Transición (2-verde) y Provincia Peruana (3-azul) son representadas por circunferencias cuyos tamaños son proporcionales a sus respectivos tamaños efectivos poblacionales (Θ) estimados por el programa MIGRATE.

4.8. Historia demográfica

La distribución Mismatch para el caracol *E. paytensis* en base al marcador COI exhibe una curva con dos picos, mientras que en base al marcador 16SrRNA la distribución mismatch es una semicurva (Figura 20). Ambas curvas sugieren una expansión poblacional. Las dos pruebas de bondad de ajuste (SSD y Hri) arrojaron valores bajos aunque no significativos. El parámetro demográfico tau para la muestra total en base al marcador COI fue de 6.13 (COI, 95% CI: 2.16 - 10.85) y en base al marcador 16SrRNA fue de 1.78 (95% CI: 0.00 - 4.15), coincidiendo ambos con las crestas de sus respectivas curvas de Mismatch. Considerando una tasa de mutación de 2.6% por millón de años, el tiempo de expansión poblacional de *E. paytensis* estimado en base al marcador COI es de 97 631 años (95% CI: 172, 758 – 34, 386 años) y en base a 16SrRNA es de 36 214 años (95% CI: 84, 000 – 0 años).

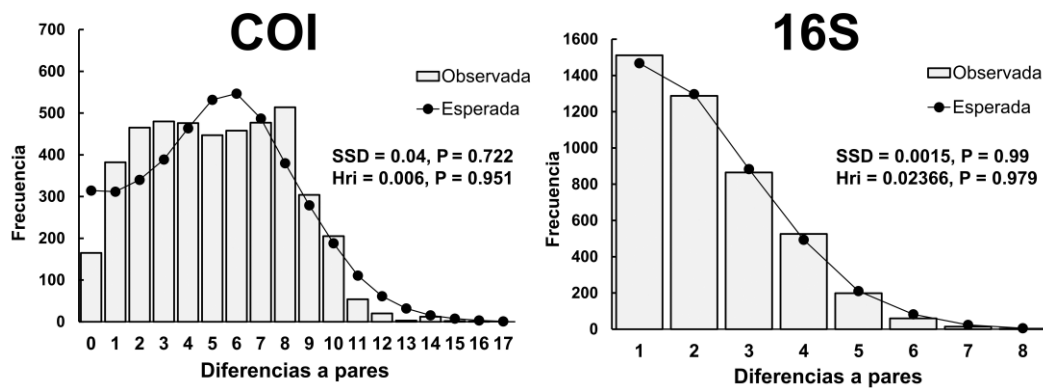


Figura 20. Distribuciones Mismatch de *E. paytensis*. Se muestran los valores de las pruebas de bondad de ajuste (SSD y Hri) a la curva esperada bajo el modelo de expansión. Leyenda: SSD = Suma de las desviaciones de los cuadrados, Hri = Harpending's Ragedness Index

Para la población total de *E. paytensis*, los valores del estadístico F_s de F_u en ambos marcadores fueron altamente negativos y significativos (F_u 's $F_{sCOI} = -$

25.4*; Fu's F_s $_{16S} = -28.6^*$). Esto es una prueba de una expansión poblacional ancestral. Los valores de estadístico R2, bajos y significativos, sugieren también una expansión poblacional (Tabla 16).

Tabla 16. Tests de Neutralidad y estadísticos de Distribución Mismatch en *E. paytensis*

Población	COI					16SrRNA				
	Fu's F_s	R2	SSD	Hri	Tau	Fu's F_s	R2	SSD	Hri	Tau
Anconcito	-1.44	0.14	0.09*	0.198	8.26	-1.58	0.11*	0.002	0.05	1.50
Zorritos	-1.44	0.13	0.03	0.145	2.71	-0.30	0.23	0.010	0.13	2.21
Punta Sal	-3.28	0.08	0.01	0.020	5.88	-1.43	0.16	0.037	0.14	0.94
Máncora	-1.03	0.10*	0.03	0.108	5.84	-3.4*	0.11*	0.022	0.16	1.70
El Ñuro	-0.59	0.11*	0.02	0.062	5.75	-2.2*	0.13*	0.008	0.10	1.39
Paita	-4.6*	0.10	0.01	0.013	2.35	-1.04	0.12	0.38*	0.17	0.00
Punta Aguja	-1.5	0.12	0.07	0.141	6.86	-3.1*	0.10*	0.011	0.10	1.82
Media Luna	-10.1*	0.08*	0.01	0.012	6.45	-5.0*	0.07*	0.002	0.02	1.64
Puémape	-6.5*	0.09*	0.01	0.030	1.69	-0.8*	0.11	0.025	0.28	2.75
Total	-25.4*	0.04*	0.004	0.006	6.13	-28.6*	0.01*	0.0001	0.023	1.78

Leyenda: Tests de Neutralidad: Fu's F_s = Estadístico F_s de Fu, R2 = Estadístico R2 de Onsins-Ramos y Rozas; Test de bondad de ajuste: SSD = Desviación de la suma de cuadrados, Hri = Harpending's Ragendess Index, * $P < 0.05$

La distribución mismatch del mitócondrio *B. adamsianus* en base al marcador COI muestra una distribución multimodal con dos picos principales y para el marcador 16SrRNA exhibe una curva errática con muchas diferencias a pares debido a la presencia de indels en las secuencias (Figura 21). Las pruebas de bondad de ajuste (SSD y Hri) arrojaron valores bajos y positivos para ambos marcadores genéticos, a excepción de SSD_{COI} , lo cual indicaría un ajuste moderado para la curva de expansión poblacional en COI, pero un mal ajuste en la curva del marcador 16SrRNA. En cuanto a los test de neutralidad, el valor del estadístico F_s de Fu en base al marcador COI es negativo y significativo para la muestra total, aunque las poblaciones exhiben valores positivos, a excepción de Punta Sal y Máncora donde

no fue posible calcular este estadístico por exhibir solamente un haplotipo. El índice R2 muestra un valor positivo y significativo para la población total ($R2 = 0.208^*$). Ambos tests de neutralidad para el marcador COI sugieren, aunque de forma no contundente, una expansión poblacional en esta especie. Sin embargo, en base al marcador 16SrRNA, ambos estadísticos son no significativos y exhibe valores positivos para la muestra total, y curiosamente los estadísticos Fs de Fu exhiben valores positivos (Tabla 17).

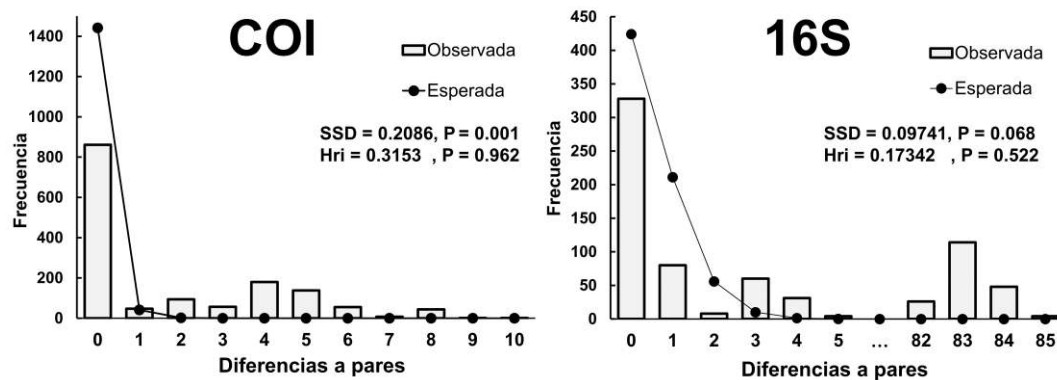


Figura 21. Distribuciones Mismatch en *B. adamsianus*. Se muestran los valores de las pruebas de bondad de ajuste (SSD y Hri) a la curva esperada bajo el modelo de expansión. Leyenda: SSD = Suma de las desviaciones de los cuadrados, Hri = Harpending's Ragedness Index

Tabla 17. Tests de Neutralidad y Distribución Mismatch en *B. adamsianus*

Población	COI					16SrRNA				
	Fu's Fs	R2	SSD	Hri	Tau	Fu's Fs	R2	SSD	Hri	Tau
Zorritos	0.331	0.132	0.166	0.551	4.9	9.891	0.245	0.648	0.737	0.0
Punta Mero	2.064	0.144	0.124	0.459	0.0	1.687	0.4	0.197	0.680	3.0
Punta Sal	0.000	N.A.	0.000	0.000	3.0	12.26	0.372	0.154	0.666	4.2
Máncora	0.000	N.A.	0.000	0.000	0.0	0.00	N.A.	0.000	0.000	0.0
El Ñuro	0.525	0.135	0.052	0.155	7.1	5.125	0.349	0.102	0.164	83.4
Paita	-0.38	0.137	0.037	0.085	5.3	7.354	0.120	0.092	0.111	0.2
Total	-6.61*	0.04*	0.208*	0.315	0.0	12.22	0.120	0.097	0.173	0.5

Leyenda: n = Número de secuencias, h = número de haplotipos, Tests de Neutralidad: Fs = Estadístico Fs de Fu, R2 = Estadístico R2 de Onsin-Ramos y Rozas; Test de bondad de ajuste: SSD = Desviación de la suma de cuadrados, Hri = Harpending's Ragedness Index (* $P < 0.05$), N.A. = No puede calcularse (un solo haplotipo presente en dicha población)

El Bayesian Skyline Plot basado en las secuencias COI para el caracol *E. paytensis* mostró una expansión del tamaño poblacional que tuvo inicio aproximadamente hace 100 000 años. Por su parte, el BSP basado en secuencias 16SrRNA sugiere una expansión poblacional más reciente (aprox. 40 000 años) (Figura 22). Las fechas de expansión poblacional en estas dos pruebas son cercanamente coincidentes con las fechas de expansión calculadas con el parámetro demográfico tau.

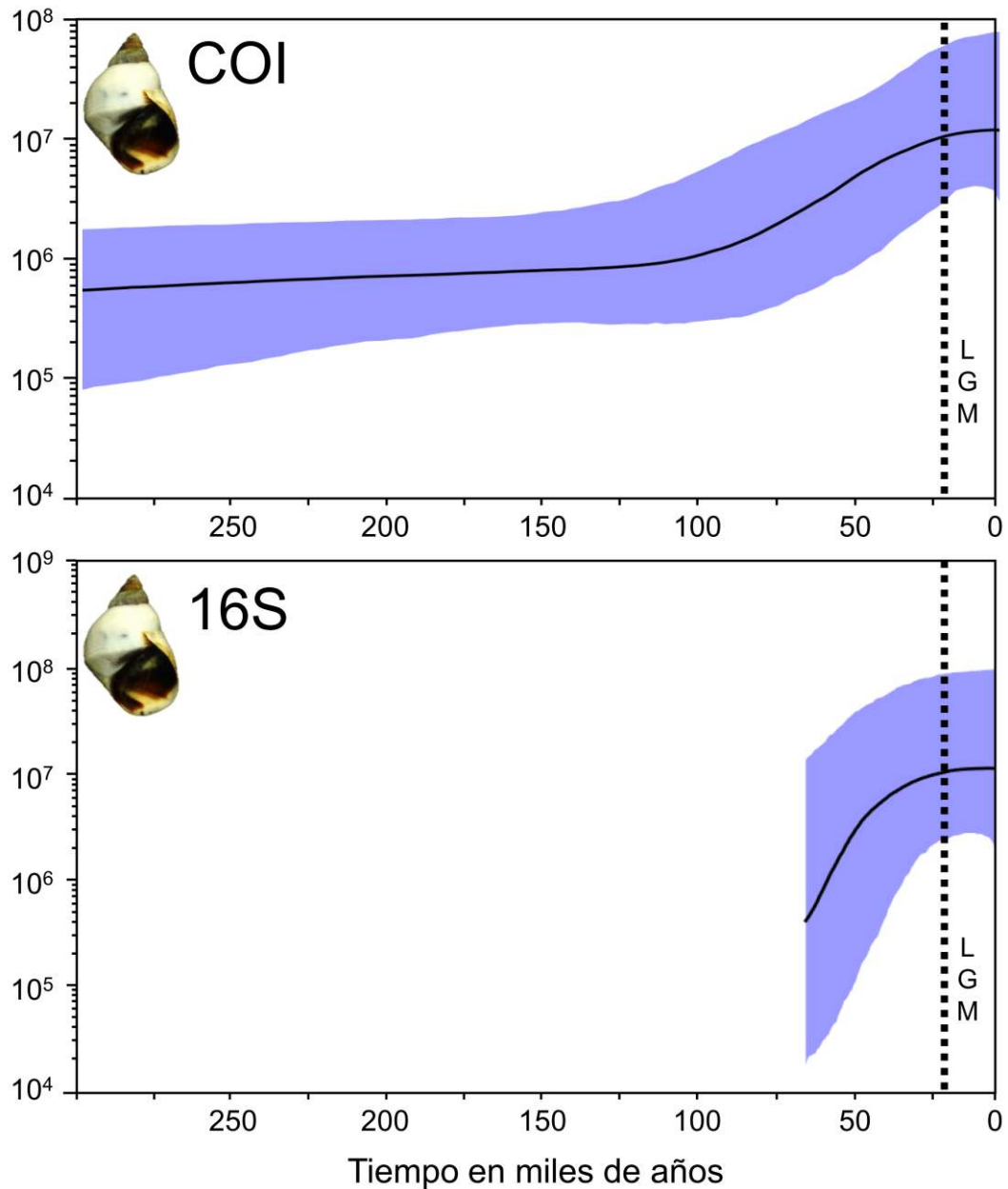


Figura 22. Bayesian Skyline Plots (BSP) mostrando las tendencias en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo en *E. paytensis*. Las estimaciones del tiempo a lo largo del eje-x fueron obtenidos asumiendo una tasa de mutación de 2.6% por millón de años para ambos marcadores genéticos. El eje-y muestra el número efectivo de individuos (N_e). La línea negra sólida representa el estimado promedio del tamaño poblacional. La zona sombreada de azul muestra los intervalos de 95% HPD (Highest posterior density). Leyenda: LGM = Último Glacial Máximo

Los Bayesian Skyline Plot basados en ambos marcadores para el mitílido *B. adamsianus* sugieren un tamaño poblacional constante a través del tiempo (Figura 23).

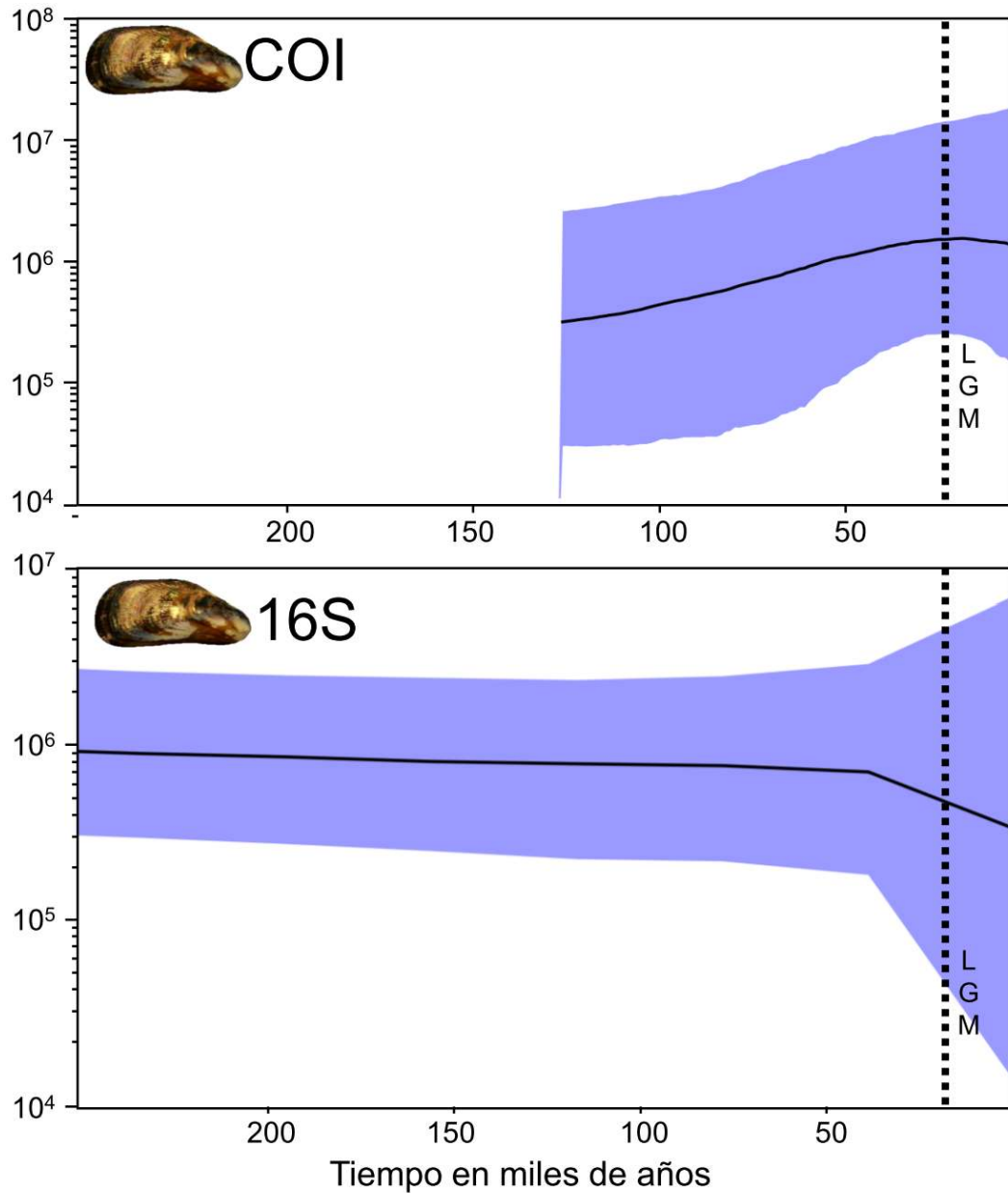


Figura 23. Bayesian Skyline Plot (BSP) mostrando las tendencias en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo en *B. adamsianus*. Las estimaciones del tiempo a lo largo del eje-x fueron obtenidos asumiendo una tasa de mutación de 2% por millón de años para ambos marcadores genéticos. El eje-y muestra el número efectivo de individuos (N_e). La línea negra sólida representa el estimado promedio del tamaño poblacional mientras que la zona sombreada de azul muestra los intervalos de 95% HPD (Highest posterior density). Leyenda: LGM = Último Glacial Máximo

5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos para *E. paytensis* no proveen apoyo a la predicción de concordancia entre límites biogeográficos y quiebres filogeográficos (Avice, 2000). La carencia de una estructura genética en esta especie a través de la zona de transición contradice la hipótesis aquí propuesta de que dicho límite biogeográfico funciona como una barrera efectiva para el flujo de genes. Pero este resultado se encuentra en concordancia con el “paradigma de la conectividad” el cual predice una alta homogeneidad genética en especies con fase larval dada la aparente ausencia de barreras a la dispersión en el medio marino (Levin, 2006). Esta falla de la barrera al flujo génico en la zona de transición en *E. paytensis* ha sido atribuida en esta investigación a su (1) probable alta capacidad de dispersión que le permite romper los mecanismos de retención larval producto de la convergencia de corrientes, y a la (2) incidencia de los eventos ENSO, los cuales aparecen de forma interanual y que han traído cambios oceanográficos importantes en la costa oeste de Sudamérica desde el Pleistoceno Superior. Así mismo, se concluye que esta especie ha pasado por una expansión poblacional reciente, probablemente gatillada por los eventos ENSO. Por otro lado, en el mitílido *Brachidontes adamsianus* se detectó la carencia de estructura genética en la costa norte del Perú y que esta especie mantuvo constante su tamaño poblacional efectivo a través del tiempo.

5.1. Estructura genética

Los datos demostraron que, en el rango latitudinal estudiado, tanto la especie *E. paytensis* como la especie *B. adamsianus* constituyen una sola unidad genética. En *E. paytensis*, la carencia de una estructura genética concordante con la

biogeografía sugiere altos niveles de flujo génico, lo cual es soportado por el NCA (comportamiento panmíctico). El marcador 16SrRNA sugiere una panmixis mayor que la sugerida por el marcador COI (tests de AMOVA y distancias genéticas a pares). El análisis de migrantes (Nm) sugirió que existe una conectividad genética bidireccional asimétrica, la cual puede estar correlacionado con las corrientes marinas superficiales. En general, ambos marcadores sugieren que la zona de transición no actúa como una barrera efectiva para el flujo génico en *E. paytensis*. Las causas para explicar esta falla de la barrera al flujo de genes son explicadas tanto del punto de vista larval (biológico) como climático-ambiental.

5.1.1. Factor biológico: capacidad de dispersión larval

La planctotrofia podría explicar satisfactoriamente la falta de estructuración genética de *E. paytensis* a través de la zona de transición biogeográfica. A pesar de que la historia de vida de esta especie no ha sido caracterizada hasta la fecha, es muy probable que presente larva planctotrófica puesto que se ha reportado este modo de desarrollo en este género. Por ejemplo, las especies *E. hawaiiensis* y *E. peruviana*, criadas en laboratorio, reportaron larvas velíger con duraciones larvales de 28 y 37 días respectivamente, desde el desove hasta la metamorfosis (Struhsaker & Costlow, 1968; Jordán & Ramorino, 1975). Dadas las similitudes estructurales del oviducto y de la protoconcha larval en algunas especies del género *Echinolittorina*, se ha sugerido que el modo de desarrollo y duración pelágica de las larvas de los miembros de este género deben ser típicas (Reid, 2002). Por ello, es factible asumir que la larva de *E. paytensis* sea planctotrófica y presente una duración pelágica promedio de su género (i.e. entre tres a cinco semanas).

Dados los altos niveles de flujo génico detectados en esta especie, es probable que esta larva tenga un fuerte comportamiento natatorio que le permita traspasar los mecanismos de retención generados por la convergencia de corrientes en la zona de transición. A diferencia de las larvas de los crustáceos exhiben un comportamiento de migración vertical (Young, 1996), es poco probable que las larvas de *E. paytensis* presenten este comportamiento pues deben mantenerse a flote en la superficie cerca del intermareal en donde deben asentarse (Hohenlohe, 2004).

La planctotrofia ha sido atribuida como el factor biológico que explica la carencia de estructuración genética en varios gastrópodos intermareales (Tabla 18). Las especies planctotróficas *Littorina keenae* (Lee & Boulding, 2007) y *Littorina scutulata* (Lee & Boulding, 2009) en la costa Pacífica de Estados Unidos no mostraron estructuración genética incluso a través del quiebre biogeográfico de Punta Concepción. El gastrópodo *Concholepas concholepas*, el cual presenta una duración larval mayor de tres meses, tampoco exhibió estructuración genética a través de tres provincias biogeográficas en la costa de Chile (Cárdenas et al., 2009). Inversamente, gastrópodos con desarrollo directo o lecitotrófico, i.e. con baja capacidad de dispersión larval, mostraron fuerte estructuración genética a lo largo de la costa de Chile (Sánchez et al., 2011; Brante et al., 2012; Haye et al., 2014) (Tabla 18).

Tabla 18. Comparación de la estructura genética global (Φ_{ST}) y el modo de desarrollo larval entre distintos gastrópodos marinos intermareales.

Especie	Desarrollo	Gen	Φ_{ST}	EG	Referencia
---------	------------	-----	-------------	----	------------

<i>Littorina keenae</i>	Planctotrófico	Cytb	0.005	No	Lee & Boulding (2007)
<i>Littorina sitkana</i>	Directo	Cytb	0.279*	Sí	Lee & Boulding (2009)
<i>Littorina subrotundata</i>	Directo	Cytb	0.058*	Sí	Lee & Boulding (2009)
<i>Littorina scutulata</i>	Planctotrófico	Cytb	0.019	No	Lee & Boulding (2009)
<i>Littorina plena</i>	Planctotrófico	Cytb	0.050*	Sí	Lee & Boulding (2009)
<i>Plicopurpura pansa</i>	Planctotrófico	Cytb	-0.004	No	López et al (2016)
<i>Concholepas concholepas</i>	Planctotrófico	COI	0.003	No	Cárdenas et al (2009)
<i>Acanthina monodon</i>	Directo	COI	0.800*	Sí	Sánchez et al (2011)
<i>Crepidatella dilatata</i>	Directo	COI	0.97*	Sí	Brante et al (2012)
<i>Scurria scurra</i>	Lecitotrófico	COI	0.797*	Sí	Haye et al (2014)
<i>Tegula atra</i>	Lecitotrófico	COI	0.362*	Sí	Haye et al (2014)
<i>Echinolittorina paytensis</i>	Planctotrófico	COI	0.044*	Sí	Este estudio
<i>Echinolittorina paytensis</i>	Planctotrófico	16S	-0.007	No	Este estudio

Leyenda: número de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π), diferenciación genética intrapoblacional (Φ_{ST}), Cytb (Citocromo b), COI (citocromo c oxidasa Subunidad I), 16S (16SrRNA), Estructuración genética (EG), * (estadísticamente significativo, $P < 0.05$)

El marcador 16SrRNA sugirió una falta total de estructura genética en *E. paytensis* ($\Phi_{ST} = -0.007$, $P > 0.05$). El marcador COI, en cambio, sugirió una estructura genética global débil pero significativa ($\Phi_{ST} = 0.044$, $P = 0.016$). Esta diferenciación global sugerida por el AMOVA se puede analizar con mayor facilidad con las distancias genéticas Φ_{ST} a pares. Fueron detectadas varias diferencias significativas entre poblaciones, las cuales podrían ser señales de barreras locales a la conectividad larval. La distancia genética significativa entre Zorritos y Anconcito, detectada como barrera genética por el software BARRIER, posiblemente sea la consecuencia de un impedimento al flujo larval producida por la pluma de agua dulce del río Guayas (Lessios et al., 2003). Zorritos se encuentra adyacente a potenciales barreras al flujo génico según las distancias genéticas a pares y el análisis realizado en BARRIER. Es posible que debido el predominio de

litoral arenoso adyacente a dicha zona (e.g. desde Caleta La Cruz hasta Puerto Pizarro) y a la posible existencia de giros cercanos a la costa, las larvas estén siendo retenidas y mantenidas cerca de su lugar de nacimiento (Largier et al., 2003).

Las franjas arenosas largas también han demostrado funcionar como barreras al flujo génico en caracoles que habitan playas rocosas (Hurtado et al., 2007). La larga franja litoral arenosa entre Punta Aguja y Media Luna (175km aprox.) podría representar una zona de aislamiento debido a que representa una potencial área no favorable para el asentamiento de larvas en *E. paytensis*. Pero contrario a lo que podría esperarse, las distancias genéticas entre poblaciones adyacentes a esta franja sugieren que no existe una dificultad para la conectividad larval.

5.1.2. Factor climático-ambiental: eventos ENSO

Las zonas de transición marina en el mundo son generalmente estables. Esto debido a que los procesos oceanográficos asociados normalmente no presentan variabilidad tanto espacial como temporal lo cual ha permitido aparición de linajes alopátricos dada la restricción para la dispersión larval (Dawson, 2001; Waters et al., 2005; Teske et al., 2007). Pero la zona de transición de la costa norte del Perú es un caso particular, pues debido a su ubicación geográfica se ve influenciada por los eventos ENSO (Ortlieb & Macharé, 1989).

La hipótesis que se propone para explicar la falta de diferenciación genética en *E. paytensis* es que la barrera al flujo génico en la zona de transición está siendo constantemente relajada o debilitada por los eventos ENSO. Por ejemplo, durante eventos El Niño extraordinarios, fuertes, moderados y/o débiles, las masas de agua

cálidas (ATS y AES) que se desplazan hacia el sur provocan el transporte de larvas hacia el sur, y durante los eventos La Niña el repliegue hacia el norte de las AES provocan el transporte de las larvas hacia el norte (Díaz & Ortlieb, 1993; Paredes et al., 1998). De esta manera, las larvas de individuos de la Provincia Panameña se estarían asentando en sustratos rocosos de la Zona de Transición y de la Provincia Peruana durante años El Niño, y en dirección inversa durante años La Niña. Este intercambio de larvas estaría implicando un intercambio de genes (e.g. haplotipos). El constante transporte de larvas hacia el norte por parte de la Corriente de Humboldt y el transporte de larvas hacia el sur por parte de El Niño con cierta regularidad estarían creando un flujo génico bidireccional que previene cualquier grado de diferenciación genética a través de la zona de transición en esta especie.

Esta hipótesis que propone a los eventos ENSO como el factor climático-ambiental que relaja la barrera al flujo génico en la zona de transición, y que influye directamente en la homogeneidad genética de *E. paytensis* se apoya en las siguientes evidencias:

(i) El hecho de que *E. paytensis*, siendo una especie típica de la Provincia Panameña (Reid, 2002), habite hasta los 7°S (Pacasmayo, La Libertad) en pleno Sistema de Humboldt. Dado que la corriente de Humboldt se mueve en dirección norte, la única forma de que esta especie haya llegado hasta los 7°S es por una expansión promovida por El Niño. El Niño expande temporalmente el rango de distribución de varias especies marinas endémicas de la Provincia Panameña hasta el centro y sur del Perú (Vélez & Zeballos, 1985; Paredes et al., 1998; Paredes et al., 2004) e incluso hasta Chile (Guzmán et al., 2001; Ashton et al., 2008).

Hallazgos de depósitos malacológicos fosilizados de ambas provincias biogeográficas (e.g. TAMAs en la región de Santa y en tablazos en Piura) prueban de que este efecto expansor de El Niño viene ocurriendo desde el Pleistoceno (DeVries, 1987; DeVries & Wells, 1990; Díaz & Ortlieb, 1993; Macharé & Ortlieb, 1993). Pero a diferencia de la mayoría de la mayoría de especies tropicales las cuales amplían su distribución geográfica durante El Niño solo de forma temporal, la expansión de la distribución geográfica de *E. paytensis* hasta los 7°S parece haber sido permanente. Una presunta tolerancia larval a las aguas frías puede explicar esta permanencia.

(ii) Las bajas distancias genéticas entre Puémape (la población más adentrada en la Provincia Peruana) y las otras poblaciones evidencian una elevada conectividad genética en esta especie. Este flujo de genes debe estar necesariamente influenciado por procesos oceanográficos: el desplazamiento de larvas desde Puémape hacia el norte debe estar siendo mantenido por la Corriente de Humboldt, y el desplazamiento de larvas desde las poblaciones norteñas hacia Puémape debe estar siendo promovido por El Niño.

(iii) La hipótesis propuesta de que las variaciones temporales pueden relajar la barrera efectiva al flujo de genes en zonas de convergencia de corrientes marinas (Hohenlohe, 2004). En dicho estudio, se realizaron modelos de simulación de flujo génico basados en las corrientes cerca de Punta Concepción (California, Estados Unidos) y en las historias de vida de dos especies de litorínidos con desarrollo planctotrófico (*Littorina scutulata* y *Littorina plena*). Los resultados sugirieron que variaciones temporales largas e infrecuentes en las corrientes tienen un efecto mayor sobre el flujo génico que las variaciones más cortas y frecuentes.

Por tanto, cambios raros en las corrientes (i.e. escala interanual) como en El Niño, el cual puede persistir por un año o más, deberían tener un efecto mayor a largo plazo en las barreras al flujo génico que la variación estacional de las corrientes. También se ha sugerido que escalas de variación temporal más grandes pueden remover de manera efectiva las barreras creadas por la convergencia de corrientes (Hohenlohe, 2004).

No obstante, para que la hipótesis propuesta sea factible, se deben cumplir los siguientes requisitos:

(i) Mortandades larvales mínimas durante los eventos ENSO. Por ejemplo, los incrementos en la TSM durante El Niño suelen tener un impacto negativo en varias especies endémicas del Sistema de Humboldt, adaptados al ambiente frío. Especies tales como *Semimytilus algosus*, *Perumytilus purpuratus*, *Aulacomya ater*, *Choromytilus chorus*, *Gari solida*, *Fisurella* sp., *Concholepas concholepas* y *Stichaster striatus* son fuertemente sensibles a los incrementos en la TSM y han sufrido serias declinaciones poblaciones durante los últimos episodios fuertes de El Niño (Tarazona *et al.*, 1985; Romero, 2001). Otras especies como el pectínido *Argopecten purpuratus*, el gastrópodo *Thais chocolata* y el cefalópodo *Octopus mimus* se ven favorecidas por El Niño debido a que son especies tropicales adaptadas a las condiciones frías (Arntz *et al.*, 1988; Arntz & Arancibia, 1989; Tarazona & Arntz, 2001; Mendo & Wolff, 2003). Probablemente, dado que se trata de una especie originaria de la Provincia Panameña, *E. paytensis* se vea favorecida con El Niño. Pero también debe haber desarrollado mecanismos de tolerancia para adaptarse a las temperaturas frías de

la Corriente de Humboldt y para eventos La Niña, e.g. aumentando su tasa metabólica (Paine, 1986). Esta presunta tolerancia larval a los cambios de TSM indudablemente le ha otorgado *E. paytensis* una ventaja para colonizar zonas frías, como por ejemplo hasta los 7°S, y soportar eventos ENSO con mortalidades larvales mínimas.

(ii) Los eventos ENSO deben ser un proceso antiguo para ser atribuidos como el factor climático-ambiental que explique la falla de la barrera al flujo génico. En primer lugar, la zona de transición del norte del Perú probablemente haya aparecido luego de la formación del istmo de Panamá (Plioceno, hace 3.5 millones de años) puesto que este evento permitió el establecimiento del patrón moderno de circulación oceánica en el Océano Pacífico (Keigwin, 1978; Duque-Caro, 1990; Coates *et al.*, 1992) así como el nacimiento del actual Sistema de Corriente de Humboldt y la intensificación del afloramiento costero (Tsuchi, 1997). Estudios sobre la composición paleo-faunística de los tablazos de la costa norte del Perú sugieren que la zona de transición ha persistido intacta durante el último millón de años (DeVries, 1985, 1986, 1988). En segundo lugar, los eventos ENSO no estuvieron presentes durante el Plioceno pues la evidencia paleoceanográfica sugiere que en dicha época se dio una condición El Niño permanente (Molnar & Cane, 2002; Wara *et al.*, 2005; Fedorov *et al.*, 2006; Bonham *et al.*, 2009). Según un estudio paleoceanográfico que utilizó como proxy a la composición isotópica del oxígeno 18 ($\delta^{18}\text{O}$) de corales fósiles de Papua Nueva Guinea, los eventos ENSO hicieron aparición hace 130 000 años durante el Pleistoceno, específicamente durante el penúltimo interglaciar (estadios isotópicos Mis5a – Mis5d, 140 000 – 110 000 años) y se mantuvieron constantes durante en el último periodo glacial y

en el Holoceno sin cambios importantes en su regularidad y periodicidad (Tudhope *et al.*, 2001). Es posible que desde hace 130 000 años, las fases El Niño y La Niña empezaron a relajar de forma interanual la barrera al flujo génico en la zona de transición, siendo de gran importancia para la conectividad en *E. paytensis*.

De esta forma, la barrera al flujo génico en la zona de transición se estaría relajando o volviendo más permeable cada cierto tiempo debido a los eventos ENSO. Esta inestabilidad temporal explicaría por qué este límite biogeográfico no funciona como una barrera efectiva al flujo génico, al menos para *E. paytensis*.

Pero la zona de transición de la costa norte del Perú no es el único límite biogeográfico impactado por los eventos ENSO. Si bien El Niño es considerado generalmente como un evento tropical, también influye en el Sistema de Afloramiento de California, en la costa Pacífica de Estados Unidos. En Punta Concepción (34°26'N), límite biogeográfico entre las provincias biogeográficas Californiana y Oregoniana (Briggs, 1974), El Niño ha sido considerado como un importante factor de dispersión larval (Behrens, 1974; Connolly & Roughgarden, 1999; Zacherl *et al.*, 2003). Dado que El Niño transporta cada cierto tiempo las larvas hacia el norte alrededor de Punta Concepción (Glynn, 1988), mientras la corriente de California transporta las larvas hacia el sur (Wares *et al.*, 2001), tal flujo génico bidireccional previene la diferencia genética en varios taxa (Kelly & Palumbi, 2010). Precisamente, alrededor de Punta Concepción se han reportado muy pocos casos de especies marinas con diferenciación genética (Wares *et al.*, 2001; Sotka *et al.*, 2004; Cassone & Boulding, 2006) pues la mayoría muestran poco o nada de divergencia (Hellberg, 1996; Burton, 1998; Kyle & Boulding, 2000;

Dawson, 2001; Dawson *et al.*, 2002; Miner, 2002; Lee & Boulding, 2007; Kelly & Palumbi, 2010; Craig *et al.*, 2012).

5.2. Filogeografía e Historia demográfica

Dado el gran número de casos de quiebres filogeográficos concordantes con las zonas de transición (Patrón Filogeográfico tipo I) en zonas marino-costeras, se esperaba un patrón similar en *E. paytensis*. Sin embargo, *E. paytensis* exhibió el Patrón filogeográfico tipo II, el cual consiste en la presencia de clados sin una concordancia geográfica (Avice *et al.*, 1987). Una primera explicación para este tipo de patrón filogeográfico es la existencia de una barrera reproductiva entre dos especies gemelas simpátricas (Avice *et al.*, 1987). Esta hipótesis es poco probable debido a que la máxima divergencia intraespecífica detectada en el marcador COI fue de 2% y el umbral recomendado para diagnosticar especies es del 3% (Hebert *et al.*, 2003). Además, las especies hermanas dentro del género *Echinolittorina* suelen tener distribución alopátrica con muy poco o nada de solapamiento (Williams & Reid, 2004).

La segunda hipótesis para explicar el patrón filogeográfico de *E. paytensis*, y la más probable, es que estamos frente a una zona de contacto entre dos poblaciones previamente alopátricas (Avice *et al.*, 1987). Para explicar esta hipótesis es necesario analizar la historia evolutiva de *E. paytensis*.

En primer lugar, se ha sugerido que el evento de especiación entre las especies *E. paytensis* y *E. apicina* ocurrió luego de la formación del istmo de Panamá, i.e. hace 3.5 millones de años (Williams & Reid, 2004). En segundo lugar, el patrón de variación genética observado en *E. paytensis* sugiere una expansión

poblacional. La alta diversidad haplotípica y la baja diversidad nucleotídica, productos del exceso de haplotipos raros y las altas similitudes entre los haplotipos, han sido encontrados también en otras especies de invertebrados marinos con altas capacidades de dispersión larval (Uthicke & Benzie, 2003; Cassone & Boulding, 2006). Esta retención de un exceso de variantes de secuencia raras podría ser la firma evolutiva de una expansión poblacional reciente en *E. paytensis*, lo cual implica que esta especie no ha alcanzado el equilibrio mutación-deriva. Esta hipótesis es soportada por los test de neutralidad (Fu's F_s y R_2) los cuales permiten comprobar una desviación significativa del tamaño poblacional constante, requisito del equilibrio mutación-deriva (Aris-Brosou & Excoffier, 1996). Las formas de las curvas de las distribuciones mismatch así como los test de bondad de ajuste (SSD y Hri) también soportan la hipótesis de una expansión demográfica (Slatkin & Hudson, 1991). Por su lado, las relaciones genealógicas entre haplotipos arrojaron topologías de tipo estrella más claramente en el marcador 16SrRNA, donde el haplotipo más común (H2), presuntamente ancestral, da origen a los haplotipos raros. Según la teoría coalescente esto puede ser interpretado como un indicativo de una población recientemente expandida luego de un cuello de botella genético (Slatkin & Hudson, 1991). Se ha sugerido que topologías similares a estrella y tests de neutralidad significativos son producidos luego de una expansión solo si la especie intercambia un gran número de migrantes debido a su alta capacidad de dispersión (Ray *et al.*, 2003). Los gráficos de Bayesian Skyline Plot también sugirieron un evento demográfico de expansión ancestral. Y de acuerdo a los valores calculados en base al parámetro demográfico tau, las estimaciones del tiempo de expansión (97 631 años para COI, 36 214 años para 16SrRNA)

concuerdan con el último periodo glacial del Pleistoceno (periodos isotópicos MIS4 – MIS2, 110 000 – 10 000 años).

Dada que ambas estimaciones de expansión poblacional son posteriores a la aparición de los eventos ENSO (130 000 años) y previas al apogeo de último periodo glacial, i.e. el LGM (20 000 – 18 000 años), es factible que la expansión poblacional de *E. paytensis* haya sido provocada por la aparición de los eventos ENSO (Figura 24). Pero ¿Qué tan probable es que los eventos ENSO hayan provocado una expansión poblacional en *E. paytensis*?

Es conocido que para organismos sensibles a la temperatura, las eras de hielo del Pleistoceno suelen dejar una huella genética (Hewitt, 2000). Probablemente, el penúltimo periodo glacial (estadio isotópico mis6, 200 000 – 140 000 años) haya provocado una disminución en la población de *E. paytensis*, pero ésta pudo haberse recuperado en el subsiguiente periodo interglaciar con la aparición de los eventos ENSO. Como los eventos ENSO fueron recurrentes en el Pleistoceno (Tudhope *et al.*, 2001), probablemente estos hayan creado condiciones ambientales ideales para *E. paytensis*. Esta hipótesis propuesta aquí se fundamenta en lo siguiente:

(i) La TSM no cambió drásticamente durante el LGM en la zona ecuatorial. En esta zona, la diferencia de la TSM fue muy pequeña: Ratios de Mg/Ca del foraminífero *Globigerinoides sacculifer* en las islas Galápagos sugirieron que durante el LGM la temperatura superficial del mar en la lengua fría del Pacífico Ecuatorial Oriental estuvo solo $\sim 1.2^{\circ}\text{C}$ por debajo de la temperatura actual (Koutavas *et al.*, 2002). En contraste, en las altas latitudes la diferencia en la TSM

fue elevada (entre 9° y 15°C) y gruesas capas de hielo cubrieron gran parte del hemisferio norte (Clark & Mix, 2002; Dyke *et al.*, 2002) y los andes del sur de Chile (Hulton *et al.*, 2002).

(ii) Las fluctuaciones en el nivel del mar no parecen haber afectado a *E. paytensis*. Durante el LGM el nivel del mar cayó 120 m en promedio a nivel mundial (Lambeck & Chappell, 2001). Este evento generó la exposición de gran parte de la plataforma continental peruana provocando que la línea de costa se desplazara hacia el oeste 100 km entre los 7°-9°S y 20 km a los 4°40'S (Ortlieb & Macharé, 1989). Esta fuerte regresión marina probablemente haya ocasionado la reducción del hábitat y subsecuente declinación poblacional en varias especies pelágicas e invertebrados bentónicos (Hewitt, 2000; Hewitt, 2004). Sin embargo, el hábitat rocoso de *E. paytensis* puede haberlo hecho menos susceptible a los cambios en el nivel del mar. Incluso, la exposición de nuevos terrenos rocosos pertenecientes a la plataforma continental pudo haberlo favorecido (Williams & Reid, 2004).

Dado que la última época glacial no tuvo un impacto significativo en la zona ecuatorial y las fluctuaciones en el nivel del mar posiblemente no hayan mermado la población de esta especie, los eventos ENSO pudieron haber tenido la intensidad y tiempo suficiente para provocar la aparición de condiciones ideales para un crecimiento demográfico en *E. paytensis*, e.g. mediante el calentamiento de las aguas y la expansión de larvas.

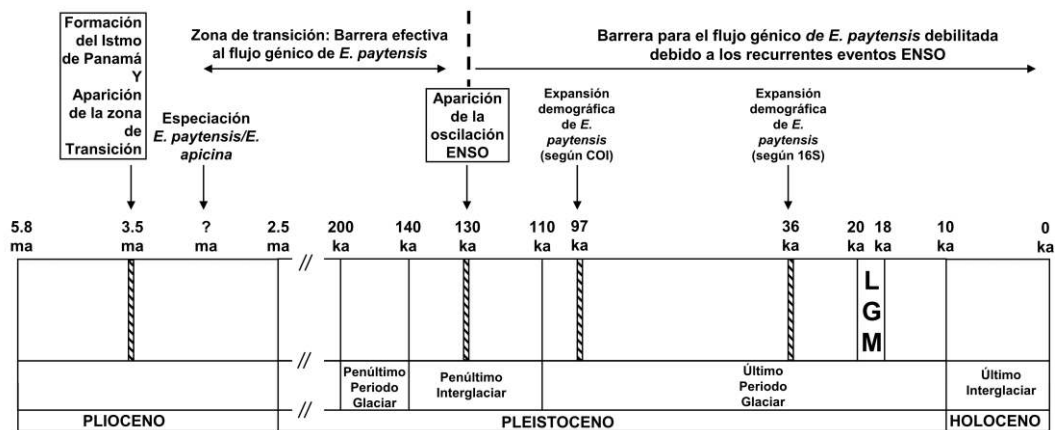


Figura 24. Probable secuencia de eventos históricos que determinaron el patrón filogeográfico de *E. paytensis* en la costa peruana. Leyenda: LGM = Last Glacial Maximum, ka = mil años, ma = millón de años, ENSO = El Niño-Southern Oscillation, // = Pleistoceno temprano y medio.

Se plantea la hipótesis de que la zona de transición del norte peruano apareció cuando se estableció el patrón moderno de circulación marina en el Océano Pacífico luego de la formación del Istmo de Panamá, durante el Plioceno. Como su aparición fue mucho más antigua que la aparición de la oscilación ENSO, este límite biogeográfico sí pudo haber representado una barrera significativa para el flujo génico de *E. paytensis*. En este lapso de tiempo la convergencia entre la Corriente de Humboldt y la Corriente El Niño pudo establecer un proceso ininterrumpido de retención larval (barrera efectiva) que restringió el flujo génico provocando una separación alopátrica entre las poblaciones fundadoras en la Provincia Peruana y las poblaciones originales de la Provincia Panameña. Luego, estas poblaciones alopátricas fueron obligadas a ponerse en un contacto mediante la dispersión larval promovida por los eventos ENSO.

Resumiendo, se plantea que la aparición de la oscilación ENSO hace 130 000 años provocó (i) el debilitamiento de la barrera a la dispersión larval promoviendo el flujo génico bidireccional entre poblaciones de ambas provincias

biogeográficas, y (ii) la aparición de condiciones propicias para una expansión demográfica durante el último periodo glacial del Pleistoceno (Figura 24).

6. CONCLUSIONES

- Los patrones filogeográficos del litorínido *Echinolittorina paytensis* y del mitílido *Brachidontes adamsianus* sugieren una falta de concordancia entre la filogeografía y la biogeografía. Este hallazgo sugiere que la zona de transición de los 4°-6°S no funciona como una barrera efectiva para el flujo génico en estas dos especies, lo cual parece ser consecuencia del efecto combinado de las altas capacidades de dispersión larval y la incidencia de los eventos ENSO.
- La diversidad genética de ambas especies resultó ser baja-moderada para el litorínido *E. paytensis* y baja para el mitílido *B. adamsianus*
- No se detectó una asociación significativa filogenética con la biogeografía en las dos especies estudiadas en base a los dos marcadores genéticos empleados.
- Ambas especies reportaron una carencia de estructuración genética a través de la zona de transición y una carencia de estructuración genética a nivel global.
- Las pruebas de historia demográfica en el litorínido *E. paytensis* confirmaron que esta especie pasó por una expansión poblacional reciente luego de un cuello de botella, evento que ocurrió muy probablemente en el Pleistoceno Superior. En contraste, el mitílido *Brachidontes adamsianus*, no sufrió una expansión poblacional sino que mantuvo un equilibrio demográfico a través del tiempo (tamaño poblacional constante).

7. RECOMENDACIONES

- De acuerdo a los dos marcadores mitocondriales utilizados, la zona de transición del norte peruano no funciona como una barrera efectiva para el flujo génico del caracol *E. paytensis*. Dado que este hallazgo no puede ser generalizado para otros taxa, se recomienda la ejecución de estudios moleculares considerando a otras especies marinas (cuyos rangos de distribución atraviesen este límite biogeográfico) que puedan funcionar como mejores modelos. Estudios que contrasten especies con historias de vida diferentes, e.g. con diferentes modos de desarrollo larval, comportamiento y duración pelágica, son altamente recomendables (Filogeografía comparativa).
- Se recomienda la utilización de marcadores moleculares con diferente modo de herencia, tales como los del genoma nuclear (e.g. microsatélites y SNPs), para obtener resultados de estructura genética con mejor resolución.
- Para comprobar el rol que juega la capacidad de dispersión larval sobre el flujo génico a través de la zona de transición, es necesario correlacionar los índices de estructuración genética y de flujo génico con la duración pelágica larval (PLD). Otros datos tales como la habilidad de dispersión larval (en Km) y las temporadas de desove también son de vital importancia. Se recomienda la recolección de este tipo de datos para conocer a detalle la historia de vida de las especies destinadas a estudiarse con herramientas moleculares.
- La hipótesis propuesta de que la barrera al flujo génico se relaja durante los eventos ENSO requiere comprobación. Se recomienda llevar a cabo investigaciones de conectividad poblacional (mediciones directas de dispersión

larval) y modelamiento (simulaciones de dispersión larval y de flujo génico)
comparando años normales (No ENSO) contra años ENSO.

8. REFERENCIAS

- Álamo, V., & Valdivieso, V. (1997). Lista sistemática de moluscos marinos del Perú (2da edición, revisada y actualizada). Publicación Especial, Instituto del Mar del Perú (183 pp).
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., *et al.* (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–10.
- Apte, S., & Gardner, J. P. A. (2002). Population genetic subdivision in the New Zealand greenshell mussel (*Perna canaliculus*) inferred from single-strand conformation polymorphism analysis of mitochondrial DNA. *Molecular Ecology*, 11(9), 1617–1628.
- Arntz, W. E., & Arancibia, H. (1989). Fluctuaciones en el ecosistema bentodemersal del Pacífico suroriental y el del norte de Europa: una comparación. *Revista Pacífico Sur* (Número especial), 35–48.
- Arntz, W. E., Valdivia, E., & Zeballos, J. (1988). Impact of El Niño 1982-83 on the commercially exploited invertebrates (mariscos) of the Peruvian shore. *Meeresforschungen*, 32(1), 3–22.
- Aris-Brosou, S. & Excoffier, L. (1996). The impact of population expansion and mutation rate heterogeneity on DNA sequence polymorphism. *Molecular Biology and Evolution*, 13, 494–504.
- Ashton, T., Riascos, J. M., & Pacheco, A. (2008). First record of *Cymatium keenae* Beu, 1970 (Mollusca: Ranellidae) from Antofagasta Bay, northern Chile, in connection with El Niño events. *Helgoland Marine Research*, 62(SUPPL.1), 107–110.
- Awise, J. C. (1992). Molecular population structure and the biogeographic history of a regional fauna: a case history with lessons for conservation biology. *Oikos*, 63(1), 62–76.
- Awise, J. C. (2000). *Phylogeography: The History and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Awise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., *et al.* (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489–522.
- Ayre, D. J., Minchinton, T. E., & Perrin, C. (2009). Does life history predict past and current connectivity for rocky intertidal invertebrates across a marine biogeographic barrier? *Molecular Ecology*, 18(9), 1887–1903.
- Balech, E. (1954). División zoogeográfica del litoral sudamericano. *Revista de Biología Marina*, 4, 148–195.
- Barber, P. H., Palumbi, S. R., Erdmann, M. V., & Moosa, M. K. (2002). Sharp genetic breaks among populations of *Haptosquilla pulchella* (Stomatopoda) indicate limits to larval transport: Patterns, causes, and consequences. *Molecular Ecology*, 11(4), 659–674.
- Barber, P. H., Palumbi, S. R., Erdmann, M. V., & Moosa, M. K. (2000). A marine Wallace's line? *Nature*, 406(6797), 692–3.
- Beerli, P. (2006). Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics*, 22(3), 341–345.
- Beerli, P., & Felsenstein, J. (2001). Maximum likelihood estimation of a migration matrix and effective population sizes in n subpopulations by using a coalescent approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 98(8), 4563–8.
- Behrens, Y. S. (1974). Ecological Interactions of Three Littorina (Gastropoda, Prosobranchia) Along the West Coast of North America. PhD Thesis, University of Oregon, Eugene, Oregon.
- Bohonak, A. J. (1999). Dispersal, gene flow, and population structure. *Quarterly Review of Biology*, 74(1), 21–45
- Bonham, S. G., Haywood, A. M., Lunt, D. J., Collins, M., & Salzmann, U. (2009). El Niño-Southern Oscillation, Pliocene climate and equifinality. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 367, 127–156.
- Brante, A., Fernandez, M., & Viard, F. (2012). Phylogeography and Biogeography Concordance in the Marine Gastropod *Crepipatella dilatata* (Calyptraeidae) along the Southeastern Pacific Coast. *Journal of Heredity*, 103(5), 630–637.
- Briggs, J. C. (1974). *Marine Zoogeography*. McGraw-Hill, New York.

- Brown, W. M., George, M. & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76, 1967–1971.
- Burton, R. S. (1998). Intraspecific Phylogeography across the Point Conception Biogeographic Boundary. *Evolution*, 52(3), 734–745.
- Camus, P. (2001). Biogeografía marina de Chile continental. *Revista Chilena de Historia Natural*, 74(3), 587–617.
- Cárdenas, L., Castilla, J. C., & Viard, F. (2009). A phylogeographical analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *Journal of Biogeography*, 36(5), 969–981.
- Cassone, B. J., & Boulding, E. G. (2006). Genetic structure and phylogeography of the lined shore crab, *Pachygrapsus crassipes*, along the northeastern and western Pacific coasts. *Marine Biology*, 149(2), 213–226.
- Chaigneau, A., Dominguez, N., Eldin, G., Vasquez, L., *et al.* (2013). Near-coastal circulation in the Northern Humboldt Current System from shipboard ADCP data. *Journal of Geophysical Research: Oceans*, 118(10), 5251–5266.
- Chakraborty, R. 1993. Analysis of genetic structure of populations: meaning, methods and implications. Human Population Genetics. Springer, Boston
- Clark, P. U., & Mix, A. C. (2002). Ice sheets and sea level of the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 21, 1–7.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659.
- Coates, A. G., Jackson, J. B. C., Collins, *et al.* (1992). Closure of the Isthmus of Panama : The near-shore marine record of Costa Rica and western Panama. *Geological Society of America Bulletin*, 104(7), 814–828.
- Coleman, M. A., Roughan, M., Macdonald, H. S., Connell, S. D., *et al.* (2011). Variation in the strength of continental boundary currents determines continent-wide connectivity in kelp. *Journal of Ecology*, 99(4), 1026–1032.
- 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.
- Connolly, S.R. & Roughgarden J. (1999). Increased recruitment of northeast Pacific barnacles during the 1997 El Niño. *Limnology and Oceanography* 44: 466–469.
- Cowen, R. K., Lwiza, K., Sponaugle, S., Paris, C. B., & Olson, D. B. (2000). Connectivity of Marine Populations: Open or Closed? *Science*, 287.
- Craig, M. T., Fodrie, F. J., Carolina, N., Hill, C., *et al.* (2011). Discordant phylogeographic and biogeographic breaks in California Halibut. *Bulletin of the Southern California Academy of Sciences*, 110(3), 141–151
- Crandall, K. A., & Templeton, A. R. (1993). Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics*, 134(3), 959–969.
- Cucalon, E. (1987). Oceanographic variability off Ecuador associated with an El Niño Event in 1982–1983. *Journal of Geophysical Research*, 92, 14309–14322.
- Dall, W. H. (1909). Report on a collection of shells from Peru, with a summary of the littoral marine Mollusca of the Peruvian zoological province. *Proceedings of the United States National Museum*, 37, 147–294.
- Dawson, M. N. (2001). Phylogeography in coastal marine animals: A solution from California? *Journal of Biogeography*, 28(6), 723–736.
- Dawson, M. N. (2005). Incipient speciation of *Catostylus mosaicus* (Scyphozoa, Rhizostomeae, Catostylidae), comparative phylogeography and biogeography in south-east Australia. *Journal of Biogeography*, 32, 515–533.
- Dawson, M. N., Louie, K. D., Barlow, M., Jacobs, D. K., & Swift, C. C. (2002). Comparative phylogeography of sympatric sister species, *Clevelandia ios* and *Eucyclogobius newberryi* (Teleostei, Gobiidae), across the California Transition Zone. *Molecular Ecology*, 11(6), 1065–1075.
- De Boer, T. S., Naguit, M. R. A., Erdmann, M. V., *et al.* (2014). Concordance between phylogeographic and biogeographic boundaries in the Coral Triangle: Conservation

- implications based on comparative analyses of multiple giant clam species. *Bulletin of Marine Science*, 90(1), 277–300.
- DeVries, T. J. (1985). Pliocene and Pleistocene counterparts to the modern Peruvian Province: a Molluscan record. *Memorias del VI Congreso Latinoamericano de Geología*, 301–305.
- DeVries, T. J. (1986). The geology and paleontology of the tablazos in northwest Peru. PhD Dissertation, Ohio State University (964 pp).
- DeVries, T. (1987). A review of geological evidence for ancient El Niño activity in Peru. *Journal of Geophysical Research*, 92(C-13), 14471–14479.
- DeVries, T. J. (1988). The geology of late Cenozoic marine terraces (tablazos) in northwestern Peru. *Journal of South American Earth Sciences*, 1(2), 121–136.
- DeVries, T., & Wells, L. E. (1990). Thermally-anomalous Holocene molluscan assemblages from coastal Peru: evidence for paleogeographic, not climatic, change. *Paleogeography, Paleoclimatology, Palaeoecology*, 81, 11–32.
- Díaz, A., & Ortlieb, L. (1993). El fenómeno “El Niño” y los moluscos de la Costa peruana. *Bulletin de l’Institut français d’études andines*, 22(1), 159–177.
- Drummond, A. J., & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7(1), 214.
- Duque-Caro, H. (1990). Neogene stratigraphy, paleoceanography and paleobiology in northwest South America and the evolution of the Panama Seaway. *Paleogeography, Paleoclimatology, Palaeoecology*, 77, 203–234.
- Dyke, A. S., Andrews, J. T., Clark, P. U., England, J. H., Miller, G. H., Shaw, J., & Veillette, J. J. (2002). The Laurentide and Innuitian ice sheets during the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 21, 9–31.
- Excoffier, L., & Lischer, H. E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), 564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P. E., & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479–491.
- Fedorov, A. V., Dekens, P. S., McCarthy, M., Ravelo, A. C., *et al.* (2006). The Pliocene Paradox (Mechanisms for a Permanent El Niño). *Science*, 312, 1485–1489.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence Limits on Phylogenies: An Approach Using the Bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783–791.
- Ferro, I., & Morrone, J. J. (2014). Biogeographical transition zones: A search for conceptual synthesis. *Biological Journal of the Linnean Society*, 113(1), 1–12.
- Fischer, A. G. (1960). Latitudinal variations in organic diversity. *Evolution*, 14(1), 64–81.
- Flores, R., Espino, M., & Luque, G. (2013). Patrones de variabilidad ambiental en el mar peruano. *Revista Peruana de Biología*, 20(1), 21–28.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294–299.
- Forbes, E. (1856). Map of the distribution of marine life, illustrated chiefly by fishes, molluscs and radiata; showing also the extent and limits of the homoizoic belts. *The Physical Atlas of Natural Phenomena (Plate 31)*.
- Frankham, R., Ballou, J.D., Briscoe, D.A. (2002). Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press
- Fu, Y.X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915–925.
- Gaither, M. R., Toonen, R. J., Robertson, D. R., Planes, S., & Bowen, B. W. (2010). Genetic evaluation of marine biogeographical barriers: perspectives from two widespread Indo-Pacific snappers (*Lutjanus kasmira* and *Lutjanus fulvus*). *Journal of Biogeography*, 133–147.
- Galarza, J., Carreras-Carbonell, J., Macpherson, E., Pascual, M., Roques, S., Turner, G. F., & Rico, C. (2009). The influence of oceanographic fronts and early-life-history traits on connectivity among littoral fish species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(5), 1473–8.
- Gaylord, B., & Gaines, S. (2000). Temperature or Transport? Range limits in marine species mediated solely by flow. *The American Naturalist*, 155(6), 769–789.

- Gilg, M. R., & Hilbish, T. J. (2003). The geography of marine larval dispersal: Coupling genetics with fine-scale physical oceanography. *Ecology*, 84(11), 2989–2998.
- Giraldo-Cardona, A., Gonzáles-Zapata, F. L., López Mesa-Agudelo, L. A., Londoño-Cruz, E., & Cantera-K, J. R. (2014). El género *Echinolittorina* Habe, 1956 (Gastropoda: Littorinidae) de los ecosistemas rocosos de la costa pacífica colombiana. *Caldasia*, 36(1), 157–164.
- Glynn P. W. A (1988). El Niño-southern oscillation 1982–1983: near-shore population, community, and ecosystem responses. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 19, 309–345
- Goldstien, S. J., Gemmell, N. J., & Schiel, D. R. (2006). Molecular phylogenetics and biogeography of the nacellid limpets of New Zealand (Mollusca: Patellogastropoda). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38(1), 261–265.
- Goldstien, S. J., Schiel, D. R., & Gemmell, N. J. (2006). Comparative phylogeography of coastal limpets across a marine disjunction in New Zealand. *Molecular Ecology*, 15, 3259–3268.
- Gopal, K., Tolley, K. a., Groeneveld, J. C., & Matthee, C. a. (2006). Mitochondrial DNA variation in spiny lobster *Palinurus delagoae* suggests genetically structured populations in the southwestern Indian Ocean. *Marine Ecology Progress Series*, 319, 191–198.
- Guzmán, N., Díaz, A., Ortlieb, L., & Clarke, M. (2001). “TAMAS”, ocurrencia episódica de moluscos tropicales en el norte de Chile y evento El Niño. In J. Tarazona, W. E. Arntz, & E. Castillo de Maruenda (Eds.), *El Niño en América Latina: Impactos Biológicos y Sociales*, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Lima (pp. 385–393).
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41, 95–98.
- Hayden, B. P., & Dolan, R. (1976). Coastal Marine Fauna and Marine Climates of the Americas. *Journal of Biogeography*, 3(1), 71–81.
- Haye, P. A., Segovia, N. I., Muñoz-Herrera, N. C., Gálvez, *et al.* (2014). Phylogeographic structure in benthic marine invertebrates of the southeast pacific coast of Chile with differing dispersal potential. *PLoS ONE*, 9(2), 1–15.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings Biological Sciences*, 270(1512), 313–21.
- Hedgecock, D. (1986). Is gene flow from pelagic larval dispersal important in the adaptation and evolution of marine invertebrates? *Bulletin of Marine Science*, 39(2), 550–564.
- Hellberg, M. E. (1996). Dependence of gene flow on geographic distance in two solitary corals with different larval dispersal capabilities. *Evolution*, 50(3), 1167–1175.
- Henriques, R., Potts, W. M., Santos, C. V., Sauer, W. H. H., & Shaw, P. W. (2014). Population connectivity and phylogeography of a coastal fish, *Atractoscion aequidens* (Sciaenidae), across the Benguela Current region: Evidence of an ancient vicariant event. *PLoS ONE*, 9(2).
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907–913.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 359, 183–195.
- Hohenlohe, P. A. (2004). Limits to gene flow in marine animals with planktonic larvae: models of *Littorina* species around Point Conception, California. *Biological Journal of the Linnean Society*, 82(2), 169–187.
- Hooker, Y., Prieto-rios, E., & Solís-Marín, F. A. (2013). Echinoderms of Peru. In J. J. Alvarado & F. A. Solis-Marín (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America*, Springer Berlin Heidelberg (pp. 277–299).
- Hulton, N. R. J., Purves, R. S., McCulloch, R. D., Sugden, D. E., & Bentley, M. J. (2002). The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews*, 21(1–3), 233–241.
- Hurtado, L. A., Frey, M., Gaube, P., Pfeiler, E., & Markow, T. A. (2007). Geographical subdivision, demographic history and gene flow in two sympatric species of intertidal snails, *Nerita scabricosta* and *Nerita funiculata*, from the tropical eastern Pacific. *Marine Biology*, 151(5), 1863–1873.
- Ibáñez, B. (2016). *Zonación biogeográfica del macrobentos del intermareal rocoso del norte y centro del Perú (3.5-13.5°S)*. Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias del Mar, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú.
- Jolly, M. T., Jollivet, D., Gentil, F., Thiébaud, E., & Viard, F. (2005). Sharp genetic break between Atlantic and English Channel populations of the polychaete *Pectinaria koreni*, along the North coast of France. *Heredity*, 94(1), 23–32.

- Jordán, J., & Ramorino, L. (1975). Reproducción de *Littorina (Austrolittorina) peruviana* (Lamarck, 1822) y *Littorina (Austrolittorina) araucana* Orbigny, 1840. *Revista de Biología Marina*, 15(3), 227–261.
- Keen, A. (1971). Sea shells of tropical west America, marine mollusks from Baja California to Peru. Stanford University Press, Stanford, California, 2nd Edition.
- Keigwin, L. D. (1978). Pliocene closing of the Isthmus of Panama, based on biostratigraphic evidence from nearby Pacific Ocean and Caribbean Sea cores. *Geology*, 6, 630–634
- Kelly, R. P., & Palumbi, S. R. (2010). Genetic structure among 50 species of the northeastern Pacific rocky intertidal community. *PloS One*, 5(1), e8594.
- Kenchington, E. L., Patwary, M. U., Zouros, E., & Bird, C. J. (2006). Genetic differentiation in relation to marine landscape in a broadcast-spawning bivalve mollusc (*Placopecten magellanicus*). *Molecular Ecology*, 15(7), 1781–1796.
- Kinlan, B. P., & Gaines, S. D. (2003). Propagule dispersal in marine and terrestrial environments: A community perspective. *Ecology*, 84(8), 2007–2020.
- Koepcke, H. W. (1957). Problemas ictiográficos del Perú. *Scientia*, 4(3), 47–53.
- Koepcke, H. W. (1958). Contribución a la Zoogeografía del mar peruano. *Pesca y Caza Lima*, 9, 82–89.
- Koutavas, A., Lynch-stieglitz, J., Marchitto, T. M., & Sachas, J. P. (2002). El Niño-Like Pattern in Ice Age Tropical Pacific Sea Surface Temperature. *Science*, 297, 226–230.
- Kyle, C. J., & Boulding, E. G. (2000). Comparative population genetic structure of marine gastropods (*Littorina spp.*) with and without pelagic larval dispersal. *Marine Biology*, 137(5–6), 835–845.
- Lambeck, K., & Chappell, J. (2001). Sea level change through the last glacial cycle. *Science*, 292(5517), 679–686.
- Largier, J. L. (2003). Considerations in estimating larval dispersal distances from oceanographic data. *Ecological Applications*, 13(SUPPL.), 71–89.
- Larson, A., Wake, D.B & Yanev, KP. (1984). Measuring gene flow among populations having high levels of genetic fragmentation. *Genetics*, 106, 293–308
- Lee, H. J., & Boulding, E. G. (2007). Mitochondrial DNA variation in space and time in the northeastern Pacific gastropod, *Littorina keenae*. *Molecular Ecology*, 16, 3084–3103.
- Lee, H. J., & Boulding, E. G. (2009). Spatial and temporal population genetic structure of four northeastern Pacific littorinid gastropods: the effect of mode of larval development on variation at one mitochondrial and two nuclear DNA markers. *Molecular Ecology*, 2165–2184.
- Lessios, H. A., Kessing, B. D., & Robertson, D. R. (1998). Massive gene flow across the world's most potent marine biogeographic barrier. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 265(1396), 583–588.
- Lessios, H. A., Kane, J., & Robertson, D. R. (2003). Phylogeography of the pantropical sea urchin *Tripneustes*: contrasting patterns of population structure between oceans. *Evolution*, 57(9), 2026–2036.
- Levin, L.A. (2006). Recent progress in understanding larval dispersal: New directions and digressions. *Integrative and Comparative Biology*, 46, 282–297.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11), 1451–1452.
- López, R. (1963). Problemas sobre la distribución geográfica de los peces marinos suramericanos. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia*, 1(3), 111–135.
- López-Chávez, F. J., Chassin-Noria, O., Ríos-Chávez, P., & Rocha-Ramírez, V. (2016). Phylogeography of the purple snail *Plicopurpura pansa* along the Mexican Pacific coast. *Ciencias Marinas*, 42(1), 1–14.
- Luttikhuisen, P. C., Campos, J., Bleijswijk, J. van, Peijnenburg, K. T. C. A., & van der Veer, H. W. (2008). Phylogeography of the common shrimp, *Crangon crangon* (L.) across its distribution range. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 46(3), 1015–1030.
- Macaya, E. C., & Zuccarello, G. C. (2010). Genetic structure of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* along the southeastern Pacific. *Marine Ecology Progress Series*, 420, 103–112
- Macharé, J., & Ortlieb, L. (1993). Registros del Fenómeno El Niño en el Perú. *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, 22(1), 35–52.

- Manni, F., Guerard, E., & Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: How barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human Biology*, 76(2), 173–190.
- Medina, W. (1969). Introducción a la ictiogeografía del Perú. *Museo de Historia Natural Javier Prado, Serie de divulgación* 3, 1–18.
- Meiklejohn, C. D., Montooth, K. L., & Rand, D. M. (2007). Positive and negative selection on the mitochondrial genome. *Trends in Genetics*, 23(6), 259–263.
- Mendo, J., & Wolff, M. (2003). El impacto de El Niño sobre la producción de concha de abanico (*Argopecten purpuratus*) en Bahía Independencia, Pisco, Perú. *Ecología Aplicada*, 2(1), 1–7.
- Meyer, C. P. & Paulay, G. (2005). DNA barcoding: Error rates based on comprehensive sampling. *PLoS Biology*, 3, 1–10
- Miner, B. G. (2002). Are the two physiological races of *Pollicipes polymerus* (Cirripedia) genetically divided along the California coast? *Invertebrate Biology*, 121(2), 158–162.
- Molnar, P., & Cane, M. (2002). El Niño's tropical climate and teleconnections as a blueprint for pre-Ice Age climates. *Paleoceanography*, 17(2), 11-1-11–11.
- Monmonier, M. (1973). Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, 5, 245–261.
- Montecinos, A., Broitman, B., Faugeron, S., Haye, P. A., Tellier, F., & Guillemin, M.-L. (2012). Species replacement along a linear coastal habitat: phylogeography and speciation in the red alga *Mazzaella laminarioides* along the South East Pacific. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 97.
- Morón, O. (2000). Características del ambiente marino frente a la costa peruana. *Boletín Del Instituto del Mar del Perú*, 19(1-2), 179-204
- Nei, M. (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York
- Olsson, A. A. (1961). Mollusks of the tropical eastern Pacific, particularly from the southern half of the Panamic-Pacific faunal province (Panama to Peru); Panamic-Pacific Pelecypoda. Paleontological Research Institution, Ithaca, N.Y.
- Ortlieb, L., & Macharé, J. (1989). Evolución climática al final del Cuaternario en las regiones costeras del norte peruano: Breve reseña. *Bulletin de l'Institut français d'études andines*, 18(2), 143–160.
- Paine, R. T. (1986). Benthic community-water column coupling during the 1982-1983 El Niño. Are community changes at high latitudes attributable to cause or coincidence? *Limnology and Oceanography*, 31(2), 351–360.
- Palumbi, S. R. (1994). Genetic divergence, reproductive isolation, and marine speciation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25(1994), 547–572.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In D. M. Hillis, C. M. Moritz, & N. K. Mable (Eds.), *Molecular Systematics*, 2nd Edition (pp. 205–247). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Palumbi, S. R. (2004). Marine reserves and ocean neighbourhoods: The spatial scale of marine populations and their management. *Annual Review of Environment and Resources*, 29(1), 31–68.
- Panchal, M. (2007). The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, 23(4), 509–510.
- Paredes, C., Tarazona, J., Canahuire, E., Romero, L., Cornejo, O., & Cardoso, F. (1998). Presencia de moluscos tropicales de la Provincia Panameña en la costa central del Perú y su relación con los eventos “El Niño”. *Revista Peruana de Biología*, 5(2), 123–128.
- Paredes, C., Cardoso, F., & Tarazona, J. (2004). Distribución temporal de moluscos y crustáceos tropicales en la Provincia Peruana y su relación con los eventos El Niño. *Revista Peruana de Biología*, 11(2), 213–218.
- Paredes, C., Cardoso, F., Santamaría, J., Esplana, J & Llaja, L. (2016). Lista anotada de los bivalvos marinos del Perú. *Revista Peruana de Biología*, 23(2), 127–150.
- Patarnello, T., Volckaert, F. A. M. J., & Castilho, R. (2007). Pillars of Hercules: Is the Atlantic-Mediterranean transition a phylogeographical break? *Molecular Ecology*, 16(21), 4426-4444
- Peña, G. M. (1970). Zonas de distribución de los gasterópodos marinos del Perú. *Anales Científicos de la Universidad Agraria*, 8, 154-170
- Philander, S. G. (1985). El Niño and La Niña. *Journal of Atmospheric Sciences*, 42(23), 2652–2662.

- Posada, D. (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25(7), 1253–1256.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(1), 37–45.
- Posada, D., Crandall, K. A., & Templeton, A. R. (2000). GeoDis: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, (9), 487–488.
- Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2009). Tracer v1.5. Disponible en <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>
- Ramírez, R., Paredes, C., & Arenas, J. (2003). Moluscos del Perú. *Revista de Biología Tropical*, 51(3), 225–284.
- Ramos-Onsins, S. E., & Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19(12), 2092–2100.
- Ray, N., Currat, M., & Excoffier, L. (2003) Intra-deme molecular diversity in spatially expanding populations. *Molecular Biology and Evolution*, 20, 76–86.
- Reeb, C. A., & Avise, J. C. (1990). A genetic discontinuity in a continuously distributed species: Mitochondrial DNA in the American oyster, *Crassostrea virginica*. *Genetics*, 124(2), 397–406.
- Reid, D. G. (2002). The Genus *Nodilittorina* von Martens, 1897 (Gastropoda: Littorinidae) in the Eastern Pacific Ocean, with a discussion of biogeographic provinces of the rocky-shore fauna. *The Veliger*, 45(2), 85–170.
- Reid, D. G., Lal, K., Mackenzie-Dodds, J., Kaligis, F., Littlewood, D. T. J., & Williams, S. T. (2006). Comparative phylogeography and species boundaries in *Echinolittorina* snails in the central Indo-West Pacific. *Journal of Biogeography*, 33(6), 990–1006.
- Rocha-Olivares, A., & Vetter, R. D. (1999). Effects of oceanographic circulation on the gene flow, genetic structure, and phylogeography of the rosethorn rockfish (*Sebastes helvomaculatus*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 56(5), 803–813.
- Rocha, L. A., Robertson, D. R., Rocha, C. R., Van Tassell, *et al.* (2005). Recent invasion of the tropical Atlantic by an Indo-Pacific coral reef fish. *Molecular Ecology*, 14(13), 3921–3928.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9(3), 552–569.
- Romano, S. L., & Palumbi, S. R. (1996). Evolution of Scleractinian Corals Inferred from Molecular Systematics. *Science*, 271, 640–642.
- Romero, L. (2001). Densidad de *Stichaster striatus* en la orilla rocosa de Ancón durante El Niño 1997-98. In J. Tarazona, W. E. Arntz, & E. Castilla de Maruenda (Eds.), *El Niño en América Latina: Impactos Biológicos y Sociales*, Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Lima (pp. 147–151).
- Rosenberg, N. A., & Nordborg, M. (2002). Genealogical Trees, Coalescent Theory and the Analysis of Genetic Polymorphisms. *Nature Reviews Genetics*, 3(5), 380–390.
- Saccone, C., De Giorgi, C., Gissi, C., *et al.* (1999). Evolutionary genomics in Metazoa: The mitochondrial DNA as a model system. *Gene*, 238(1), 195–209.
- Sánchez, R., Sepúlveda, R. D., Brante, A., & Cárdenas, L. (2011). Spatial pattern of genetic and morphological diversity in the direct developer *Acanthina monodon* (Gastropoda: Mollusca). *Marine Ecology Progress Series*, 434, 121–131.
- Saunders, N. C., Kessler, L. G., & Avise, J. C. (1986). Genetic Variation and Geographic Differentiation in Mitochondrial DNA of the Horseshoe Crab, *Limulus polyphemus*. *Genetics*, 112, 613–627.
- Scheltema, R. S. (1971). Larval dispersal as a means exchange between geographically separated populations of shallow-water benthic marine gastropods. *Biological Bulletin Marine Biological Laboratory Woods Hole*, 140, 284–322.
- Scheltema, R. S. (1975). Relationship of larval dispersal, gene flow and natural selection to geographic variation of benthic invertebrates in estuaries and along coastal regions. *Estuarine Resources*, 1, 371–389.
- Scheltema, R. S. (1988). Initial Evidence for the Transport of Teleplanic Larvae of Benthic Invertebrates across the East Pacific Barrier. *Biological Bulletin*, 174(2), 145.

- Schunter, C., Carreras-Carbonell, J., MacPherson, E., *et al.* (2011). Matching genetics with oceanography: Directional gene flow in a Mediterranean fish species. *Molecular Ecology*, 20(24), 5167–5181.
- Seapy, R. R. & Littler, M. M. (1993). Biogeography of rocky intertidal macroinvertebrates of the Southern California islands. In D. M. Power (Ed.), *The California Islands: Proceedings of a Multidisciplinary Symposium* (pp. 307-323), Santa Barbara, Museum of Natural History, Santa Barbara, California.
- Sköld, M., Wing, S. R., & Mladenov, P. V. (2003). Genetic subdivision of a sea star with high dispersal capability in relation to physical barriers in a fjordic seascape. *Marine Ecology Progress Series*, 250, 163–174.
- Slatkin, M. & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparison of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555-562
- Sokolov, E. P. (2000). An improved method for DNA isolation from mucopolysaccharide-rich molluscan tissues. *Journal of Molluscan Studies*, 66(4), 573–575.
- Sotka, E. E., Wares, J. P., Barth, J. A., Grosberg, R. K., & Palumbi, S. R. (2004). Strong genetic clines and geographical variation in gene flow in the rocky intertidal barnacle *Balanus glandula*. *Molecular Ecology*, 13(8), 2143–2156.
- Spalding, M. D., Fox, H. E., Allen, G. R., *et al.* (2007). Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience*, 57(7), 573.
- Sponer, R., & Roy, M. S. (2002). Phylogeographic analysis of the brooding brittle star *Amphipholis squamata* (Echinodermata) along the coast of New Zealand reveals high cryptic genetic variation and cryptic dispersal potential. *Evolution*, 56(10), 1954–67.
- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30, 1312–1313.
- Star, B., Apte, S., & Gardner, J. P. A. (2003). Genetic structuring among populations of the greenshell mussel *Perna canaliculus* revealed by analysis of randomly amplified polymorphic DNA. *Marine Ecology Progress Series*, 249, 171–182.
- Strub, P. T., Mesías, J. M., Montecino, V., Rutilant, J., & Salinas, S. (1998). Coastal ocean circulation off western South America. In A. R. Robinson & K. H. Brink (Eds.). *The Sea*, Vol 11, Chapter 10 (pp. 273–313). John Wiley & Sons.
- Struhsaker, J. W., & Costlow, J. D. (1968). Larval development of *Littorina picta* (Prosobranchia, Mesogastropoda) reared in the laboratory. *Proceedings of the Malacological Society of London*, 38, 153–160.
- Stuardo, J. (1964). Distribución de los moluscos marinos litorales en Latinoamérica. *Boletín Del Instituto de Biología Marina*, 7 (51-55).
- Tarazona, J., & Arntz, W. E. (2001). The Peruvian Coastal Upwelling System. In U. Seeliger & B. Kjerfve (Eds.), *Coastal Marine Ecosystems of Latin America*, Ecological Studies, Vol. 144 (pp. 228-244).
- Tarazona, J., Paredes, C., Romero, *et al.* (1985). Características de la vida planctónica y colonización de los organismos bentónicos epilíticos durante el Fenómeno “El Niño.” In W.E. Arntz, A. Landa, A. & J. Tarazona, J (Eds), *El Niño y su impacto en la fauna marina*, Boletín del Instituto del Mar del Perú Volumen Extraordinario (pp. 41–49).
- Tejada, C. (2016). Gradiente latitudinal en la diversidad de moluscos del intermareal rocoso del Pacífico Sureste (3-14°S): Buscando procesos causales. Tesis para optar al grado de Maestro en Ciencias del Mar, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima-Perú.
- Tellier, F., Meynard, A. P., Correa, J. A., Faugeron, S., & Valero, M. (2009). Phylogeographic analyses of the 30°S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or parapatry? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), 679–693.
- Templeton, A. R. (1998). Nested clade analysis of phylogeographical data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7(4), 381–397.
- Templeton, A. R. (2004). Statistical phylogeography: Methods of evaluating and minimizing inference errors. *Molecular Ecology*, 13(4), 789–809.
- Templeton, A. R., Boerwinkle, E., & Sing, C. F. (1987). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic Theory and an Analysis of Alcohol Dehydrogenase Activity in *Drosophila*. *Genetics*, 117(2), 343-351

- Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2), 619–633.
- Templeton, A. R., & Sing, C. F. (1993). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, 134(2), 659–669.
- Teske, P. R., McQuaid, C. D., Froneman, P. W., & Barker, N. P. (2006). Impacts of marine biogeographic boundaries on phylogeographic patterns of three South African estuarine crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*, 314, 283–293.
- Teske, P. R., Papadopoulos, I., Mmonwa, K. L., Matumba, T. G., *et al.* (2011). Climate-driven genetic divergence of limpets with different life histories across a southeast African marine biogeographic disjunction: Different processes, same outcome. *Molecular Ecology*, 20(23), 5025–5041.
- Teske, P. R., Papadopoulos, I., Newman, B. K., *et al.* (2008). Oceanic dispersal barriers, adaptation and larval retention: an interdisciplinary assessment of potential factors maintaining a phylogeographic break between sister lineages of an African prawn. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 341.
- Teske, P. R., Papadopoulos, I., Zardi, G. I., McQuaid, C. D., *et al.* (2007). Implications of life history for genetic structure and migration rates of southern African coastal invertebrates: Planktonic, abbreviated and direct development. *Marine Biology*, 152(3), 697–711.
- Teske, P. R., Von der Heyden, S., McQuaid, C. D., & Barker, N. P. (2011). A review of marine phylogeography in southern Africa. *South African Journal of Science*, 107(5/6), 1–11.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W : improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), 4673–4680.
- Thorson, G. 1950. Reproductive and larval ecology of marine bottom invertebrates. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*, 25, 1-45.
- Toonen, R. J. & Pawlik, J. R. (2001). Foundations of gregarious: a dispersal polymorphism among the larvae of a marine invertebrate. *Evolution*, 55, 2439-2454.
- Tsuchi, R. (1997). Marine climatic responses to Neogene tectonics of the Pacific Ocean seaways. *Tectonophysics*, 281(1–2), 113–124.
- Tudhope, A. W., Chilcott, C. P., Mcculloch, M. T., *et al.* (2001). Variability in the El Niño–Southern Oscillation through a Glacial-Interglacial Cycle. *Science*, 291, 1511–1517.
- Uthicke, S. & Benzie, J.A.H. (2003). Gene flow and population history in high dispersal marine invertebrates: mitochondrial DNA analysis of *Holothuria nobilis* (Echinodermata: Holothuroidea) populations from the Indo-Pacific. *Molecular Ecology*, 12, 2635–2648.
- Vásquez-Domínguez, E., Castañeda-Rico, S., Garrido-Garduño, T. & Gutiérrez-García, T. A. (2009). Avances metodológicos para el estudio conjunto de la información genética, genealógica y geográfica en análisis evolutivos y de distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82, 277–297.
- Vegas-Vélez, M. (1968). Revisión taxonómica y zoogeográfica de algunos gasterópodos y lamelibranquios marinos del Perú. *Anales Científicos de La Universidad Agraria*, 6, 1–29.
- Vegas-Vélez, M. (1980). Algunas consideraciones biogeográficas sobre el Pacífico Sudoriental. *Boletim do Instituto Oceanográfico*, 29, 371–373.
- Vélez, J., & Zeballos, J. (1985). Ampliación de la distribución de algunos peces e invertebrados durante el Fenómeno “El Niño” 1982-83. In W. E. Arntz, A. Landa, & J. Tarazona (Eds.), *El Niño y su impacto en la fauna marina* (pp. 173–180). Boletín del Instituto del Mar del Perú, Volumen Extraordinario.
- Vélez, J., & Zeballos, J. (1985). Ampliación de la distribución de algunos peces e invertebrados durante el Fenómeno “El Niño” 1982-83. In W. E. Arntz, A. Landa, & J. Tarazona (Eds.), *El Niño y su impacto en la fauna marina*, Boletín del Instituto del Mar del Perú Volumen Extraordinario (pp. 173–180).
- Villamor, A., Costantini, F., & Abbiati, M. (2014). Genetic structuring across marine biogeographic boundaries in rocky shore invertebrates. *PloS One*, 9(7), e101135.
- Waples, R. S. (1998). Separating the wheat from the chaff: patterns of genetic differentiation in high gene flow species. *Journal of Heredity*, 89(5), 438–450.

- Wara, M. W., Ravelo, A. C., & Delaney, M. L. (2005). Permanent El Niño-like conditions during the Pliocene warm period. *Science*, 309, 758–761.
- Wares, J. P., Gaines, S. D., & Cunningham, C. W. (2001). A comparative study of asymmetric migration events across a marine biogeographic boundary. *Evolution*, 55(2), 295–306.
- Waters, J. M., King, T. M., O’Loughlin, P. M., & Spencer, H. G. (2005). Phylogeographical disjunction in abundant high-dispersal littoral gastropods. *Molecular Ecology*, 14(9), 2789–2802.
- Waters, J., & Roy, M. S. (2004). Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Molecular Ecology*, 13(9), 2797–806.
- Weersing, K., & Toonen, R. J. (2009). Population genetics, larval dispersal, and connectivity in marine systems. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 1–12.
- Williams, S. T., & Reid, D. G. (2004). Speciation and diversity on tropical rocky shores: a global phylogeny of snails of the genus *Echinolittorina*. *Evolution*, 58(10), 2227–2251.
- York, K. L., Blacket, M. J., & Appleton, B. R. (2008). The Bassian Isthmus and the major ocean currents of southeast Australia influence the phylogeography and population structure of a southern Australian intertidal barnacle *Catomerus polymerus* (Darwin). *Molecular Ecology*, 17(8), 1948–1961.
- Young, C. M. (1995). Behavior and locomotion during dispersal phase of larval life. In L. McEdward (Ed.), *Ecology of marine invertebrate larvae*, Chapter 8, (pp. 249–278). CRC Press, Boca Raton, Florida.
- Zacherl, D., Gaines, S. D., & Lonhart, S. I. (2003). The limits to biogeographical distributions: insights from the northward range extension of the marine snail, *Kelletia kelletii* (Forbes, 1852). *Journal of Biogeography*, 30, 913–924.
- Zakas, C., Binford, J., Navarrete, S. A., & Wares, J. P. (2009). Restricted gene flow in Chilean barnacles reflects an oceanographic and biogeographic transition zone. *Marine Ecology Progress Series*, 394(2), 165–177.
- Zakas, C., Jones, K., & Wares, J. P. (2014). Homogeneous nuclear background for mitochondrial cline in northern range of *Notochthamalus scabrosus*. *G3: Genes|Genomes|Genetics*, 4(2), 225–30.
- Zane, L., Ostellari, L., Maccatrozzo, L., Bargelloni, *et al.* (1998). Molecular evidence for genetic subdivision of Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) populations. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*, 265(1413), 2387–2391.
- Zane, L., & Patarnello, T. (2000). Krill: a possible model for investigating the effects of ocean currents on the genetic structure of a pelagic invertebrate. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 57(S3), 16–23.
- Zardi, G. I., McQuaid, C. D., Teske, P. R., & Barker, N. P. (2007). Unexpected genetic structure of mussel populations in South Africa: Indigenous *Perna perna* and invasive *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Ecology Progress Series*, 337, 135–144.
- Zuta, S., & Guillén, O. (1970). Oceanografía de las aguas costeras del Perú. *Boletín Del Instituto del Mar del Perú*, 2(5), 157–324.

ANEXOS

Anexo 1. Fórmulas para calcular los índices de diversidad genética

1. Diversidad haplotípica (H_d) (Nei, 1987)

$$H_d = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum p_i^2 \right)$$

Donde:

n = número de secuencias,

p_i = frecuencia de cada haplotipo

2. Diversidad nucleotídica (π) (Nei, 1987)

$$\pi = \frac{2n}{n-1} \sum p_i p_j d_{ij}$$

Donde:

n = número de secuencias

p_i = frecuencia del haplotipo i

p_j = frecuencia del haplotipo j

d_{ij} = proporción de nucleótidos diferentes entre los haplotipos i y j

Anexo 2. Resultados del BLAST para el marcador COI en *E. paytensis*

Individuo	Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover (%)	E-Value	Ident (%)
ANC01	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1206	1206	96	0	99
ANC02	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1175	1175	99	0	99
ANC03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1133	1133	100	0	99
ANC04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1206	1260	94	0	99
ANC05	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1160	1160	99	0	99
ANC06	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1175	1175	96	0	99
ANC07	<i>Echinolittorina apicina</i>	1184	1184	97	0	99
ANC08	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1175	1175	99	0	99
ANC09	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1079	1079	100	0	99
ANC10	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1142	1142	99	0	99
BON01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1170	1170	99	0	99
BON02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1195	1195	97	0	99
BON04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1168	1168	99	0	99
BON05	<i>Echinolittorina apicina</i>	1197	1197	99	0	99
ACA01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1123	1123	100	0	99
ACA02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1168	1168	97	0	99
ACA04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1173	1173	100	0	99
PSA01	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1153	1153	99	0	99
PSA02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1182	1182	97	0	99
PSA03	<i>Echinolittorina apicina</i>	1166	1166	99	0	99
PSA04	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1162	1162	99	0	99
PSA05	<i>Echinolittorina apicina</i>	1162	1162	99	0	99
BRA01	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1184	1184	97	0	99
BRA02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1179	1179	97	0	99
BRA03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1162	1162	99	0	99
BRA04	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1195	1195	97	0	99
BRA05	<i>Echinolittorina apicina</i>	1171	1171	99	0	99
POC01	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1162	1162	98	0	99
POC02	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1158	1158	99	0	99
POC03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1173	1173	99	0	99
POC04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1184	1184	97	0	99
POC05	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1194	1194	99	0	99
POC06	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1160	1160	100	0	99
POC07	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1129	1129	99	0	99
POC08	<i>Echinolittorina apicina</i>	1134	1134	99	0	98
PVE01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1175	1175	99	0	99
PVE02	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1162	1162	98	0	99
PVE03	<i>Echinolittorina apicina</i>	1151	1151	99	0	99
ÑUR01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1175	1175	99	0	99
ÑUR02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1173	1173	100	0	99

NUR03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1194	1194	99	0	99
CAB01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1173	1173	99	0	99
CAB02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1182	1182	99	0	99
YAC01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1164	1164	97	0	99
YAC02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1179	1179	97	0	99
YAC03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1164	1164	97	0	99
YAC04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1184	1184	98	0	99
CAN01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1192	1192	99	0	99
CAN02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1171	1171	100	0	99
CAN03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1123	1123	100	0	98
ISL01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1166	1166	99	0	99
ISL02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1201	1201	98	0	99
ISL03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1149	1149	99	0	99
ISL04	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1129	1129	98	0	98
TOR02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1190	1190	99	0	99
TOR04	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1160	1160	99	0	99
AGU01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1195	1195	97	0	99
AGU02	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1195	1195	99	0	99
AGU03	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1166	1166	98	0	99
AGU04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1162	1162	99	0	99
AGU05	<i>Echinolittorina apicina</i>	1188	1188	99	0	99
AGU06	<i>Echinolittorina apicina</i>	1168	1168	99	0	99
AGU07	<i>Echinolittorina apicina</i>	1184	1184	98	0	99
AGU08	<i>Echinolittorina apicina</i>	1168	1168	98	0	99
MED01	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1158	1158	99	0	99
MED02	<i>Echinolittorina apicina</i>	1175	1175	99	0	99
MED03	<i>Echinolittorina apicina</i>	1170	1170	99	0	99
MED04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1188	1188	97	0	99
MED05	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1151	1151	98	0	99
MED06	<i>Echinolittorina apicina</i>	1173	1173	97	0	99
MED07	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1144	1144	98	0	99
MED08	<i>Echinolittorina apicina</i>	1158	1158	99	0	99
MED09	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1179	1179	99	0	99
MED10	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1170	1170	98	0	99
MED11	<i>Echinolittorina apicina</i>	1166	1166	99	0	99
MED12	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1195	1195	99	0	99
MED13	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1179	1179	98	0	98
MED14	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1179	1179	98	0	99
MED15	<i>Echinolittorina apicina</i>	1160	1160	99	0	99
PUE01	<i>Echinolittorina apicina</i>	1184	1184	97	0	99
PUE02	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1133	1133	99	0	99
PUE03	<i>Echinolittorina apicina</i>	1155	1155	98	0	99
PUE04	<i>Echinolittorina apicina</i>	1190	1190	99	0	99
PUE05	<i>Echinolittorina apicina</i>	1164	1164	100	0	99
PUE06	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1155	1155	99	0	99

PUE07	<i>Echinolittorina apicina</i>	1160	1160	99	0	99
PUE08	<i>Echinolittorina paytensis</i>	1179	1179	97	0	99
PUE09	<i>Echinolittorina apicina</i>	1155	1155	99	0	99
PUE10	<i>Echinolittorina apicina</i>	1173	1173	99	0	99
PUE11	<i>Echinolittorina apicina</i>	1195	1195	99	0	99
PUE12	<i>Echinolittorina apicina</i>	1147	1147	97	0	99
PUE13	<i>Echinolittorina apicina</i>	1158	1158	100	0	99
PUE14	<i>Echinolittorina apicina</i>	1162	1162	99	0	99
PUE15	<i>Echinolittorina apicina</i>	1181	1181	98	0	99

Códigos de individuos: ANC = Anconcito (Anconcito), BON = Bonanza (Zorritos), ACA = Acapulco (Zorritos), PSA = Punta Sal, BRA = El Bravo (Punta Sal), POC = Las Pocitas (Máncora), PVE = Punta Veleros (El Ñuro), ÑUR = El Ñuro, CAB = Cabo Blanco (El Ñuro), YAC = Yacila (Paita), CAN = Cangrejos (Paita), ISL = Islilla (Paita), TOR = Tortuga (Paita), AGU = Punta Aguja, MED = Media Luna, PUE = Puémape

Anexo 3. Primeros 20 resultados de la Identificación mediante BOLDSYSTEMS del haplotipo H3 del marcador COI de *E. paytensis*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Sim. (%)
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	paytensis	99.83
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	apicina	98.83
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	paytensis	98.33
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	apicina	98.33
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	galapagensis	88.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	galapagensis	88.5
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	modesta	88.17
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	penicillata	88.17
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	modesta	88
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	interrupta	88
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	penicillata	87.83
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	quadricincta	87.83
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	pulchella	87.83
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	interrupta	87.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	quadricincta	87.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	pulchella	87.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	pulchella	87.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	pulchella	87.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	punctata	87.67
Mollusca	Gastropoda	Littorinimorpha	Littorinidae	Echinolittorina	interrupta	87.67

Anexo 4. Resultados del BLAST para el marcador 16SrRNA en *E. paytensis*

Código	Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover	E-Value	Ident (%)
ANC01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	98	0	93
ANC02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	771	771	100	0	93
ANC03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	745	745	99	0	94
ANC04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	789	789	97	0	93
ANC05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	769	769	100	0	93
ANC06	<i>Echinolittorina interrupta</i>	778	778	99	0	93
ANC07	<i>Echinolittorina interrupta</i>	780	780	100	0	93
ANC08	<i>Echinolittorina interrupta</i>	752	752	99	0	94
ANC09	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	100	0	93
ANC10	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	100	0	93
BON01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	100	0	93
BON02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	780	780	99	0	93
BON04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	754	754	100	0	93
BON05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	761	761	99	0	94
ACA01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	99	0	93
ACA02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	776	776	100	0	93
ACA04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	774	774	100	0	93
PSA01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	769	769	100	0	93
PSA02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	99	0	93
PSA03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	99	0	94
PSA04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	743	743	100	0	93
PSA05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	99	0	94
BRA01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	769	769	100	0	93
BRA02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	778	778	100	0	93
BRA03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	758	758	100	0	93
BRA04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	789	789	100	0	93
BRA05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	784	784	100	0	93
POC01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	100	0	93
POC02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	754	754	100	0	93
POC03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	745	745	99	0	94
POC04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	765	765	99	0	94
POC05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	100	0	93
POC06	<i>Echinolittorina interrupta</i>	767	767	99	0	94
POC07	<i>Echinolittorina interrupta</i>	747	747	100	0	94
POC08	<i>Echinolittorina interrupta</i>	758	758	99	0	94
PVE01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	760	760	100	0	93
PVE02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	99	0	93
PVE03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	778	778	100	0	94
ÑUR01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	758	758	100	0	93
ÑUR02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	749	749	0	0	93
ÑUR03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	99	0	94
CAB01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	776	776	100	0	93

CAB02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	100	0	93
YAC01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	765	765	99	0	93
YAC02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	776	776	100	0	93
YAC03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	780	780	97	0	93
YAC04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	754	754	100	0	93
CAN01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	761	761	99	0	94
CAN02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	787	787	100	0	93
CAN03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	577	577	9E-161	0	92
ISL01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	761	761	100	0	93
ISL02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	754	754	99	0	94
ISL03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	763	763	100	0	93
ISL04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	739	739	100	0	94
TOR02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	784	784	99	0	93
TOR04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	100	0	93
AGU01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	771	771	99	0	93
AGU02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	761	761	98	0	94
AGU03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	769	769	99	0	93
AGU04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	100	0	93
AGU05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	99	0	93
AGU06	<i>Echinolittorina interrupta</i>	771	771	100	0	93
AGU07	<i>Echinolittorina interrupta</i>	771	771	100	0	93
AGU08	<i>Echinolittorina interrupta</i>	754	754	100	0	93
MED01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	761	761	100	0	93
MED02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	739	739	99	0	94
MED03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	773	773	100	0	93
MED04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	758	758	100	0	93
MED05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	739	739	100	0	94
MED06	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	99	0	93
MED07	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	100	0	93
MED08	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	99	0	94
MED09	<i>Echinolittorina interrupta</i>	763	763	100	0	93
MED10	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	100	0	93
MED11	<i>Echinolittorina interrupta</i>	739	739	100	0	94
MED12	<i>Echinolittorina interrupta</i>	771	771	100	0	93
MED13	<i>Echinolittorina interrupta</i>	776	776	100	0	93
MED14	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	100	0	93
MED15	<i>Echinolittorina interrupta</i>	776	776	100	0	93
PUE01	<i>Echinolittorina interrupta</i>	752	752	99	0	94
PUE02	<i>Echinolittorina interrupta</i>	784	784	100	0	93
PUE03	<i>Echinolittorina interrupta</i>	782	782	99	0	93
PUE04	<i>Echinolittorina interrupta</i>	771	771	100	0	93
PUE05	<i>Echinolittorina interrupta</i>	741	741	99	0	94
PUE06	<i>Echinolittorina interrupta</i>	728	728	99	0	93
PUE07	<i>Echinolittorina interrupta</i>	747	747	99	0	93
PUE08	<i>Echinolittorina interrupta</i>	765	765	99	0	93

PUE09	<i>Echinolittorina interrupta</i>	785	785	100	0	93
PUE10	<i>Echinolittorina interrupta</i>	767	767	100	0	93
PUE11	<i>Echinolittorina interrupta</i>	756	756	99	0	94
PUE12	<i>Echinolittorina interrupta</i>	760	760	100	0	93
PUE13	<i>Echinolittorina interrupta</i>	743	743	100	0	94
PUE14	<i>Echinolittorina interrupta</i>	774	774	100	0	93
PUE15	<i>Echinolittorina interrupta</i>	763	763	100	0	93

Códigos de individuos: ANC = Anconcito (Anconcito), BON = Bonanza (Zorritos), ACA = Acapulco (Zorritos), PSA = Punta Sal, BRA = El Bravo (Punta Sal), POC = Las Pocitas (Máncora), PVE = Punta Veleros (El Ñuro), ÑUR = El Ñuro, CAB = Cabo Blanco (El Ñuro), YAC = Yacila (Paita), CAN = Cangrejos (Paita), ISL = Islilla (Paita), TOR = Tortuga (Paita), AGU = Punta Aguja, MED = Media Luna, PUE = Puémape

Anexo 5. Resultados del BLAST del marcador COI para *B. adamsianus*

Individuo	Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover (%)	E-Value	Ident (%)
ACA01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1208	1208	100	0	99
ACA03	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ACA04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ACA05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ACA06	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1208	1208	100	0	99
ACA07	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ACA08	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1208	1208	100	0	99
ACA09	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ACA10	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA02	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA06	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA07	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA08	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA09	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
BRA10	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ÑUR01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1186	1186	100	0	99
ÑUR02	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ÑUR03	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ÑUR04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
ÑUR05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1203	1203	100	0	99
PME01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME02	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1208	1208	100	0	99
PME03	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME06	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME07	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME08	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME09	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PME10	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN02	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN06	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN07	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PUN08	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PVE01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99

PVE02	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1192	1192	100	0	99
PVE03	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PVE04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
PVE05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1214	1214	100	0	99
YAC01	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC02	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC03	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC04	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC05	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1214	1214	100	0	99
YAC06	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC07	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1203	1203	100	0	99
YAC08	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC09	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1197	1197	100	0	99
YAC10	<i>Brachidontes adamsianus</i>	1208	1208	100	0	99

Anexo 6. Primeros 20 resultados de la Identificación mediante BOLDSYSTEMS del haplotipo H4 del marcador COI de *B. adamsianus*.

Phylum	Class	Order	Family	Genus	Species	Sim (%)
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Perna	perna	81.62
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.4
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.21
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.21
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.21
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.21
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.21
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.21
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	darwinianus	78.03
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	pharaonis	77.63
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	pharaonis	77.49
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	pharaonis	77.47
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	pharaonis	77.47
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	pharaonis	77.47
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Hormomya	exustus	77.43
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Hormomya	exustus	77.28
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Hormomya	exustus	77.28
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Hormomya	exustus	77.28
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	pharaonis	77.23
Mollusca	Bivalvia	Mytilida	Mytilidae	Brachidontes	niger	77.18

Anexo 7. Resultados del BLAST del marcador 16SrRNA para *B. adamsianus*

Individuo	Descripción	Max Score	Total Score	Query Cover	E-Value	Ident (%)
ACA03	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
ACA04	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	2.00E-114	83
ACA06	<i>Brachidontes exustus</i>	453	453	99	2.00E-113	83
ACA07	<i>Brachidontes exustus</i>	460	460	99	1.00E-125	84
ACA08	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
ACA09	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
BRA01	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
BRA03	<i>Brachidontes exustus</i>	464	464	99	9.00E-127	84
BRA04	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
BRA06	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
BRA07	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
BRA09	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
ÑUR01	<i>Brachidontes exustus</i>	459	459	99	4.00E-125	84
ÑUR02	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
ÑUR04	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
ÑUR05	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PME02	<i>Brachidontes pharaonis</i>	429	429	92	3.00E-116	83
PME03	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PME06	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PME07	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PME10	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PUN01	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PUN02	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PUN03	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PUN05	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PUN07	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PUN08	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PVE01	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
PVE02	<i>Brachidontes pharaonis</i>	424	424	92	2.00E-114	83
YAC01	<i>Brachidontes pharaonis</i>	424	424	92	2.00E-114	83
YAC02	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
YAC03	<i>Brachidontes exustus</i>	464	464	99	9.00E-127	84
YAC04	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
YAC05	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
YAC07	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
YAC08	<i>Brachidontes exustus</i>	459	459	99	4.00E-125	84
YAC09	<i>Brachidontes pharaonis</i>	435	435	92	7.00E-118	83
YAC10	<i>Brachidontes pharaonis</i>	424	424	92	2.00E-114	83

Anexo 8. Distribución de las frecuencias de los haplotipos COI por población en *E. paytensis*

Haplotipo	ANC	ZOR	PSAL	MAN	ÑUR	PAI	AGU	MED	PUE	TOTAL
H1		1								1
H2	1	4			3	1	1	1	1	12
H3		1								1
H4	2				1		1	1		5
H5							1		1	2
H6							1			1
H7			2			1	3		3	9
H8							1			1
H9	1									1
H10	1									1
H11	1									1
H12	1									1
H13	1									1
H14	2			1	1	1			1	6
H15		1			1	3		1	2	8
H16		1								1
H17			1	1						2
H18			1							1
H19			1							1
H20			1	2		1				4
H21					1					1
H22						1				1
H23						1				1
H24								1		1
H25								1		1
H26								1		1
H27								1		1
H28								1		1
H29								1		1
H30						1		1		2
H31								1		1
H32								1		1
H33								1		1
H34								1		1
H35								1		1
H36				1						1
H37				1						1
H38				1						1
H39				1						1
H40			1							1
H41			1							1
H42			1							1

H43			1							1
H44									1	1
H45									1	1
H46									1	1
H47									1	1
H48						1			1	2
H49									1	1
H50									1	1
H51					1					1
H52						1				1
H53						1				1
TOTAL	10	8	10	8	8	13	8	15	15	95

Legenda de poblaciones: ANC = Anconcito, ZOR = Zorritos, PSA = Punta Sal, MAN = Máncora, ÑUR = El Ñuro, PAI = Paita, AGU = Punta Aguja, MED = Media Luna, PUE = Puémape.

Anexo 9. Distribución de las frecuencias haplotípicas 16SrRNA por población en *E. paytensis*

Haplotipo	ANC	ZOR	PSAL	MAN	ÑUR	PAI	AGU	MED	PUE	TOTAL
H1		1								1
H2	5	6	6	3	4	9	3	7	12	55
H3		1								1
H4							1			1
H5	2		1	1	1		1	1		7
H6							1	1		2
H7							1			1
H8							1			1
H9	1									1
H10	1									1
H11	1									1
H12			1	1						2
H13						1				1
H14						1				1
H15						1				1
H16								1		1
H17								1		1
H18						1		1	1	3
H19								1		1
H20								1		1
H21								1		1
H22					1					1
H23				1						1
H24				1						1
H25				1						1
H26			1							1
H27			1							1
H28									1	1
H29									1	1
H30					1					1
H31					1					1
TOTAL	10	8	10	8	8	13	8	15	15	95

Leyenda de poblaciones: ANC = Anconcito, ZOR = Zorritos, PSA = Punta Sal, MAN = Máncora, ÑUR = El Ñuro, PAI = Paita, AGU = Punta Aguja, MED = Media Luna, PUE = Puémape.

Anexo 10. Distribución de las frecuencias haplotípicas COI por población en *B. adamsianus*

Haplotipo	Zorritos	Punta Mero	Punta Sal	Máncora	El Ñuro	Paita	TOTAL
H1	1						1
H2	6	8	9	8	5	6	42
H3	1						1
H4	1						1
H5		1					1
H6		1					1
H7					1		1
H8					1		1
H9					1		1
H10					1		1
H11						1	1
H12						1	1
H13						1	1
H14						1	1
TOTAL	9	10	9	8	9	10	55

Anexo 11. Distribución de las frecuencias de los haplotipos 16SrRNA por población en *B. adamsianus*

Haplotipo	Zorritos	Punta Mero	Punta Sal	Máncora	El Ñuro	Paita	TOTAL
H1	4	4	5	6	3	4	26
H2	1						1
H3	1						1
H4			1				1
H5		1					1
H6					1		1
H7					1		1
H8					1	2	3
H9						1	1
H10						1	1
H11						1	1
TOTAL	6	5	6	6	6	9	38

Anexo 12. Estadísticos del Análisis de clados anidados (NCA) e inferencia filogeográfica de *E. paytensis* en base al marcador COI.

Clado	χ^2	Clados	Distancias de Clado		Distancias Interior-Punta		Cadena de Inferencia e Interpretación
			Dc	Dn	I-Tc	I-Tn	
2-1	2.0	1-1	0.0	316.07	0.0	-105.32	No se pudo rechazar la H0
		1-25	0.0	210.75			
2-2	7.2	1-2	67.49	1682.55	3694.24	1631.04	1-2-3-4-NO (Flujo génico restringido con aislamiento por distancia)
		1-3	0.0	1677.43			
		1-6	3739.23*L	1631.04			
2-3	1.2	1-4	0.0	49.30	95.10	40.16	No se pudo rechazar la H0
		1-30	95.10	89.47			
2-4	21.3	1-7	0.0	29.89	-59.21	-48.26	No se pudo rechazar la H0
		1-8	252.88	253.78			
		1-9	0.0	124.03			
		1-11	166.87	163.05			
		1-10	92.96	115.63			
2-5	7.47	1-12	0.0	70.60	143.33	39.09	No se pudo rechazar la H0
		1-17	0.0	113.56			
		1-18	143.33	138.34			
2-6	2.22	1-13	185.54	190.78	106.03	102.22	No se pudo rechazar la H0
		1-22	291.57	293.00			
2-8	4.00	1-16	0.09	222.17	7.84	-103.40	No se pudo rechazar la H0
		1-23	7.84	118.76			
2-9	7.42	1-19	35.48	2878.95	1394.58	293.49	No se pudo rechazar la H0
		1-21	4305.72	4191.57			
		1-14	3993.21	3960.01			
2-10	8.00	1-24	8.22	1394.46	2968.54	1279.01	No se pudo rechazar la H0
		1-29	2976.76	2673.47			
2-11	6.46	1-5	0.0	699.08	-	-	No se pudo rechazar la H0
		1-20	1437.23	1412.74			
3-1	49*	2-2	2646.48	2026.14	341.895	139.076	No se pudo rechazar la H0
		2-5	129.09	646.066			
		2-7	0.0	669.65			
		2-11	1380.53	1288.06			
3-2	4.961	2-4	151.65	152.99	-70.30	-80.60	No se pudo rechazar la H0
		2-3	81.35	72.383			
3-3	23.96*	2-6	246.90	2063.89	3712.79*L	1549.54*L	1-2-3-4-NO (Flujo génico restringido por aislamiento por distancia)
		2-8	154.73	2094.32			
		2-9	3918.73*L	2626.98*L			
3-4	1.66	2-10	2317.46	2162.35	-2064.57	-1030.47	No se pudo rechazar la H0
		2-1	252.88	1131.87			
4-1	12.84	3-3	3157.08*L	2720.95*L	-	-	1-2-11-4 12-NO
		3-1	1183.42*S	1717.63*S	1973.6*S	1003.32*S	

							(Expansión de rango contiguo)
4-2	5.91	3-4	1986.20	1456.42	-1860.2	-1026.12	No se pudo rechazar la H0
		3-2	126.000	430.302			
Cladograma total	24.66*	4-1	2150.319	196.843	-	-	No se pudo rechazar la H0
		4-2	784.771	1313.580	-	-	

Leyenda: χ^2 = estadístico chi-cuadrado, *L = largamente significativo, *S = poco significativo, H0 = No hay asociación entre haplotipos con la geografía. La cadena de inferencia corresponde a la clave del año 2005 disponible en (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>)

Anexo 13. Estadísticos del Análisis de clados anidados (NCA) e inferencia filogeográfica de *E. paytensis* en base al marcador 16SrRNA

Clado	χ^2	Clados	Distancias de Clado		Distancias Interior-Punta		Evento demográfico inferido
			Dc	Dn	I-Tc	I-Tn	
2-1	11.0	1-1	0.0	2529.76	3822.1	2263.4*1	1-2-11-17-4-NO (Flujo génico restringido con aislamiento por distancia)
		1-12	149.10	2653.00			
		1-9	3946.42	4895.87*L			
2-2	32.34	1-2	0.0	947.33	-715.9	-764.76	No se pudo rechazar la H0
		1-4	2317.46	2009.92			
		1-8	4178.17	5257.17			
		1-10	80.73	931.90			
		1-3	1365.38	1497.15			
2-3	5.0	1-5	0.0	371.90	96.59	-274.70	No se pudo rechazar la H0
		1-7	96.59	97.20			
2-4	3.0	1-6	0.0	106.97	35.39	-64.84	No se pudo rechazar la H0
		1-11	35.39	42.13			
Cladograma Total (3-1)	22.70	2-1	3670.16*L	3010.39*L	-453.8	-430.7	1-2-11-12-NO (Expansión de rango contiguo)
		2-3	134.45	1016.12			
		2-4	57.38	1021.32			
		2-2	1632.07	1694.15			

Anexo 14. Estadísticos del Análisis de clados anidados (NCA) e inferencia filogeográfica de *B. adamsianus* en base al marcador COI.

Clado	χ^2	Clados	Distancias de Clado		Distancias Interior-Punta		Evento demográfico inferido
			Dc	Dn	I-Tc	I-Tn	
2-1	17.25	1-1	0.0	100.54	68.68	14.81	No se pudo rechazar la H0
		1-2	0.0	23.23			
		1-6	0.0	49.40			
		1-7	85.34	85.16			
		1-9	35.39	47.28			
2-2	5.03	1-3	55.39	65.50	-18.36	-27.41	No se pudo rechazar la H0
		1-8	37.02	38.08			
2-3	2.0	1-4	0.0	23.50	-	-	No se pudo rechazar la H0
		1-5	0.0	25.60			
Cladograma total (3-1)	11.11	2-2	39.28	40.33	28.391*L	24.74*L	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
		2-3	24.25	26.92			
		2-1	67.02*L	64.54*L			

Leyenda: χ^2 = estadístico chi-cuadrado, *L = largamente significativo, *S = poco significativo, H0 = No hay asociación entre haplotipos con la geografía. La cadena de inferencia corresponde a la clave del año 2005 disponible en (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>)

Anexo 15. Estadísticos del Análisis de clados anidados (NCA) e inferencia filogeográfica de *B. adamsianus* en base al marcador 16SrRNA

Clado	χ^2	Clados	Distancias de Clado		Distancias Interior-Punta		Interpretación (Evento demográfico inferido)
			Dc	Dn	I-Tc	I-Tn	
2-1	8.0	1-1	0.0	111.13	-13.71	55.27	No se pudo rechazar la H0
		1-2	22.85	35.70			
		1-3	0.0	61.06			
		1-4	0.0	111.13			
2-2	3.39	1-5	0.0	114.26	38.84	-74.24	No se pudo rechazar la H0
		1-8	38.84	40.02			
2-3	2.0	1-6	0.0	24.31	0.0	0.0023	No se pudo rechazar la H0
		1-7	0.0	24.32			
3-2	4.69	2-2	41.75	41.29	-	-	No se pudo rechazar la H0
		2-3	24.32	26.92			
Cladograma	3.73	3-1	58.46	57.08	-	-	No se pudo rechazar la H0
Total (4-1)		3-2	40.35	40.75			

Leyenda: χ^2 = estadístico chi-cuadrado, *L = largamente significativo, *S = poco significativo, H0 = No hay asociación entre haplotipos con la geografía. La cadena de inferencia corresponde a la clave del año 2005 disponible en (<http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>)