



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias
Escuela de Licenciatura en Ciencias

PROFESORA PATROCINANTE
DRA. MARIE-LAURE GUILLEMIN
INSTITUTO DE CIENCIAS
AMBIENTALES Y EVOLUTIVAS
FACULTAD DE CIENCIAS

"EL PELILLO (*AGAROPHYTON CHILENSE*) EN NUEVA ZELANDA, SU ZONA DE ORIGEN: ANÁLISIS DE SU ESTRUCTURA GENÉTICA BASADO EN SNPs"

Seminario de Titulación presentado como parte de los requisitos para optar al **Título de Biólogo**

MIEMBROS DE LA COMISIÓN
DR. JOSÉ J. NUÑEZ
DR. PABLO SAENZ AGUDELO

CRISTIAN ALBERTO RÍOS MOLINA

VALDIVIA - CHILE

2020

AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue realizada en marco del proyecto FONDECYT Regular 1170541, a cargo de la Dra. Marie-Laure Guillemin. No podría poner en palabras cuanto agradezco la oportunidad de trabajar con ella, y el nivel de su dedicación. Destaco además la enorme colaboración de Sarai Morales, quien me introdujo al flujo de trabajo y me ayudó de buena gana con todos los análisis, y también de Oscar Huanel.

DEDICATORIA

Considero el contexto apropiado para extender mis agradecimientos, y distinguir la labor, de mis profesores José J. Nuñez y Sven N. Nielsen, quienes a lo largo de mi estancia en la Universidad dispusieron de su ánimo mucho más allá de la instrucción curricular, brindándome - con simpatía y dedicación- invaluable orientación para mi formación académica y crecimiento personal. Con ellos especialmente estoy muy agradecido.

Finalmente, dedico también un abrazo a todas las personas con con quienes he compartido personalmente. Con quienes viví todo este proceso universitario. Hablo de mi familia, mi compañera, mis amigas y amigos. Dejo además un abrazo escondido a mi pequeña Lucía, por si algún día decide escudriñar en mis papeles empolvados.

ÍNDICE

| | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 1. RESUMEN..... | 4 |
| 1.1 Abstract..... | 5 |
| 2. INTRODUCCIÓN..... | 6 |
| 2.1 <i>Agarophytum chilense</i> | 6 |
| 2.2 Nueva Zelanda..... | 11 |
| 2.3 Problemática..... | 16 |
| 2.4 Hipótesis..... | 16 |
| 2.5 Objetivo principal..... | 17 |
| 2.6 Objetivos específicos..... | 17 |
| 3. MATERIALES Y MÉTODOS..... | 18 |
| 3.1 Zona de estudio y muestreo..... | 18 |
| 3.2 Extracción de ADN y preparación de biblioteca ddRADseq..... | 19 |
| 3.3 Ensamble <i>de novo</i> y filtración..... | 20 |
| 3.4 Diversidad genética..... | 22 |
| 3.5 Estructuración genética y análisis de agrupación..... | 22 |
| 3.6 Efecto de la última glaciación sobre la estructuración genética..... | 24 |
| 3.7 Congruencia con barreras biogeográficas..... | 25 |
| 4. RESULTADOS..... | 26 |
| 4.1 Secuencias en bruto, ensamble <i>de novo</i> y filtrado..... | 26 |
| 4.2 Diversidad genética..... | 27 |
| 4.3 F_{ST} entre pares de poblaciones..... | 29 |
| 4.4 Análisis de Componentes Principales (PCA)..... | 30 |
| 4.5 Red filogenética (<i>Neighbor-Net</i>)..... | 33 |
| 4.6 Análisis de asignación a poblaciones ancestrales y admixtura (LEA)..... | 34 |
| 4.7 Recolonización post-glacial en CASS..... | 37 |
| 4.8 Relación entre diversidad genética y distancia geográfica..... | 38 |
| 4.9 Análisis de varianza molecular (AMOVA)..... | 40 |
| 5. DISCUSIÓN..... | 41 |
| 5.1 Presencia de una posible especie críptica en la costa oeste de Isla Norte..... | 42 |
| 5.2 Patrón de divergencia en congruencia con barreras biogeográficas..... | 43 |
| 5.3 Efecto de la última glaciación en las poblaciones australes de Isla Sur, evidencia de recolonización postglacial..... | 46 |
| 5.4 Zona de origen de la colonización transoceánica de Isla Chatham..... | 47 |
| 5.5 Conclusión..... | 49 |
| 6. LITERATURA CITADA..... | 51 |

1. RESUMEN

Agarophyton chilense es un macroalga roja descrita originalmente en Chile, con un rango de distribución que incluye a Nueva Zelanda, las islas Chatham, Chile y el Sur de Perú. A diferencia de América del Sur, en Nueva Zelanda -su área de origen- las poblaciones han sido escasamente sujetas a perturbación antropogénica, lo que hace a *A. chilense* un interesante modelo biológico para evaluar el efecto de potenciales barreras históricas y actuales a la dispersión. Un estudio filogeográfico previo en la región determinó la existencia de un patrón de estructuración genética a priori concordante con la zonación biogeográfica propuesta para las costas neozelandesa, pero las conclusiones fueron limitadas por el bajo número de localidades estudiadas y la baja resolución de los marcadores utilizados. En el presente estudio, se exploró la estructura genética a fina escala usando 2.429 marcadores de tipo SNP obtenidos en 17 poblaciones. Los resultados muestran una fuerte concordancia entre grupos genéticos y regiones biogeográficas, con un patrón principal de divergencia de Norte a Sur entre las islas principales, Este a Oeste en la zona del Estrecho de Cook y una reducción de la diversidad hacia el Sur. En el caso de la costa Oeste de Isla Norte, la divergencia es tan extrema que se propone la existencia de una posible especie críptica. Se sugiere un importante efecto de procesos oceanográficos contemporáneos (corrientes, remolinos y surgencias) y de eventos geológicos pasados (glaciaciones, cambios en el nivel del mar y de la línea costera) sobre la conectividad y últimamente los patrones de estructuración en *A. chilense*.

1.1 Abstract

Agarophyton chilense is a red macroalga with an actual distribution range that includes New Zealand, Chatham Islands, Chile and Southern Peru. Contrarily to South America, in New Zealand, its area of origin, populations have suffered little anthropogenic disturbance, which makes *A. chilense* an interesting biological model to study the effect of potential historical and contemporary barriers on dispersion. A previous phylogeographic study in New Zealand shows that genetic structure is a priori concordant with the limits of biogeographic marine regions proposed along these coasts, but conclusions were limited by the low number of sites sampled and low resolution of the markers used. In the present study, fine-scale genetic structure was explored using 2.429 SNP loci genotyped in 17 sampled populations. The importance of biogeographic limits on *A. chilense* was tested. Results show a strong congruence between genetic and biogeographic structure. Main North-South and East-West divergences were observed along the coasts of the two main islands. In the case of the West coast of North Island, divergence was so extreme that the existence of a putative cryptic species is proposed. Genetic diversity decreases from North Island to the Cook Strait and South Island. Important effect of contemporary oceanographic processes (currents, eddies and upwellings) and historical geologic events (glaciations, changes in the sea level and the coast line) on genetic diversity and structure of the alga is proposed.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 *Agarophyton chilense*

Agarophyton chilense (C.J.Bird, McLachlan et E.C.Oliveira) Gurgel, J.N.Norris et Fredericq (básionimo *Gracilaria chilense* C.J.Bird, McLachlan & E.C.Oliveira), denominada comúnmente como pelillo, es una macroalga roja (Rhodophyta) de la familia Gracilariaeae (Gurgel *et al.*, 2018). Fue descrita originalmente en Chile (Bird *et al.*, 1986), pero su rango de distribución incluye Nueva Zelanda -identificada como su zona de origen-, las islas Chatham y el Sur de Perú (Cohen *et al.*, 2004; Guillemin *et al.*, 2014; Arakaki *et al.*, 2015). Las poblaciones naturales proliferan en un amplio rango de temperaturas, con tolerancia de 5 a 28°C y crecimiento óptimo a 15°C (Bird *et al.*, 1986; Usandizaga *et al.*, 2019), distribuyéndose de manera discontinua a lo largo de zonas de línea costera de baja o nula exposición, como bahías y estuarios (Bird *et al.*, 1986).

La especie presenta un ciclo de vida complejo, con alternancia de fases isomórficas haploide (gametofito masculino y femenino) y diploide (tetrasporofito). Los individuos reclutados desde el ciclo sexual -cualquiera sea su fase- forman talos erectos cuyo disco se adhiere fuertemente a sustrato duro. Adicionalmente, en ambas fases es posible la reproducción vegetativa mediante fragmentación del talo, formando poblaciones clonales de algas sin capacidad de anclaje que se entierran en sedimento blando (Kain y Destombe, 1995). Tanto los gametos masculinos como las esporas haploides y diploides carecen de estructuras motiles, presentando en consecuencia una capacidad de dispersión muy limitada en la columna de agua.

Se ha observado para el género *Gracilaria* que los gametos sobreviven un máximo de 5 horas una vez liberados, mientras que las esporas alcanzan una distancia efectiva de tres a cinco metros antes de su sedimentación (Destombe *et al.*, 1992; 1990). A su vez, los talos de *A. chilense* -así como los de las demás especies de Gracilariaeae- carecen de flotadores, limitando su capacidad de dispersión.

A pesar de las limitaciones descritas en su capacidad de dispersión, *A. chilense* presenta una distribución transoceánica, sobre la que se ha estimado su expansión hacia las Islas Chatham hace unos 100.000 (54.000-290.000) años y a Chile hace 19.000 (7.000-45.000) años en base a datos moleculares (Guillemin *et al.*, 2014). Esta fecha de llegada a Chile, próxima al comienzo del período interglaciar del Holoceno, es además apoyada por registros arqueológicos en el sitio Monte Verde, Región de Los Lagos, de hace 14.600 años (Dillehay *et al.*, 2008). Aunque los eventos de dispersión transoceánica son muy poco comunes en algas marinas no flotantes (Thiel y Gutow, 2005), existe evidencia de que algas rojas como *Bostrychia intricata* (Fraser *et al.*, 2013) y *Capreolia implexa* (Boo *et al.*, 2014) migraron desde Nueva Zelanda hacia Chile mediante canotaje de fragmentos de talo asociados a algas flotantes. Precisamente este mecanismo ha sido ampliamente descrito como uno de los más relevantes para la dispersión a larga distancia de flora y fauna marina no flotante, mediante la formación de comunidades epífitas o entrelazamiento con algas flotantes como *Macrocystis pyrifera* y *Durvillaea antarctica*, ambas con una extensa distribución a latitudes altas (Hoek, 1987; Macaya *et al.*, 2016; Norton, 1992; Santelices, 1990; Thiel y Gutow, 2005). En este sentido, se ha planteado este como el

vector más probable para la migración de *A. chilense* hacia sus zonas de dispersión (Guillemin *et al.*, 2014).

En Chile, la diversidad genética de *A. chilense* se encuentra muy reducida debido al efecto fundador, al haberse originado las poblaciones naturales de Chile a partir de sólo un subconjunto de las poblaciones de la costa Oeste de Nueva Zelanda (Guillemin *et al.*, 2014). A lo largo de la costa no se observa diferenciación genética clara entre regiones. La existencia de haplotipos y genotipos ampliamente distribuidos se ha atribuido a un crecimiento poblacional desde un origen único después del evento fundador y al frecuente intercambio de individuos y fragmentos de talo entre regiones vía actividad de los granjeros (Guillemin *et al.*, 2008, 2014). En consecuencia, esta historia compleja de introducción y expansión del rango de distribución, seguida de una intensa perturbación antropogénica, ha configurado profundas modificaciones sobre la distribución y estructura genética de *A. chilense* en Chile, oscureciendo así las dinámicas y patrones poblacionales de la especie en su estado natural.

En contraste, en Nueva Zelanda no se ha desarrollado extracción o uso comercial de *A. chilense* más allá de cultivos experimentales (Schiel y Nelson, 1990), insinuando que en este territorio las poblaciones naturales de *A. chilense* no habrían estado sujetas a alteraciones antropogénicas importantes. Aunque los estudios poblacionales en esta especie son aún limitados, se ha descrito la existencia de un patrón de estructuración a lo largo de la línea costera de Nueva Zelanda, evidenciado a partir del análisis genético de 8 poblaciones naturales representativas de 5 regiones biogeográficas realizado con secuencias de ADN nuclear ribosomal (ITS2) y respaldado con 5 loci microsatélites (Guillemin *et al.*, 2014; Figura 1). En este estudio, la región ITS2

muestra dos grupos fuertemente diferenciados, con una separación clara entre las costas Este y Oeste de las islas principales y cierta divergencia entre las islas Norte y Sur. Sólo los microsatélites separan claramente Isla Chatham de Nueva Zelanda, un patrón no observado por el ITS2 debido a la baja diversidad mostrada por este marcador. Esta diferencia indica que la imagen de la estructuración genética en Nueva Zelanda entregada por la región ITS2 es aún incompleta (Guillemin *et al.*, 2014). A priori, este patrón de divergencia entre las costas Este y Oeste de las islas principales pareciera ser congruente con una barrera a la dispersión en el Estrecho de Cook Sur, que ya ha sido previamente identificada en estudios con el mejillón *Perna canaliculus* y la estrella de mar *Patiriealla regularis* (Apte y Gardner, 2002; Ayers y Waters, 2005) y atribuida a regímenes de surgencia. En adición, los estudios de estructuración poblacional en otros modelos, como las algas *Bostrychia intricata* (Rhodomelaceae) y *Carpophyllum maschalocarpum* (Phaeophyceae) o el bivalvo *Austrovenus stutchburyi* (Veneridae), han mostrado importantes patrones de heterogeneidad espacial sobre la diversidad genética de las poblaciones, que también han sido vinculados a barreras biogeográficas, oceanográficas e históricas (Buchanan y Zuccarello, 2012; Muangmai *et al.*, 2015; Ross *et al.*, 2012). Lo anterior hace patente la importancia de generar estudios poblacionales que permitan evaluar las potenciales barreras que podrían estar configurando los patrones de estructuración genética de *A. chilense* en Nueva Zelanda, arrojando luces sobre los factores que los explican.

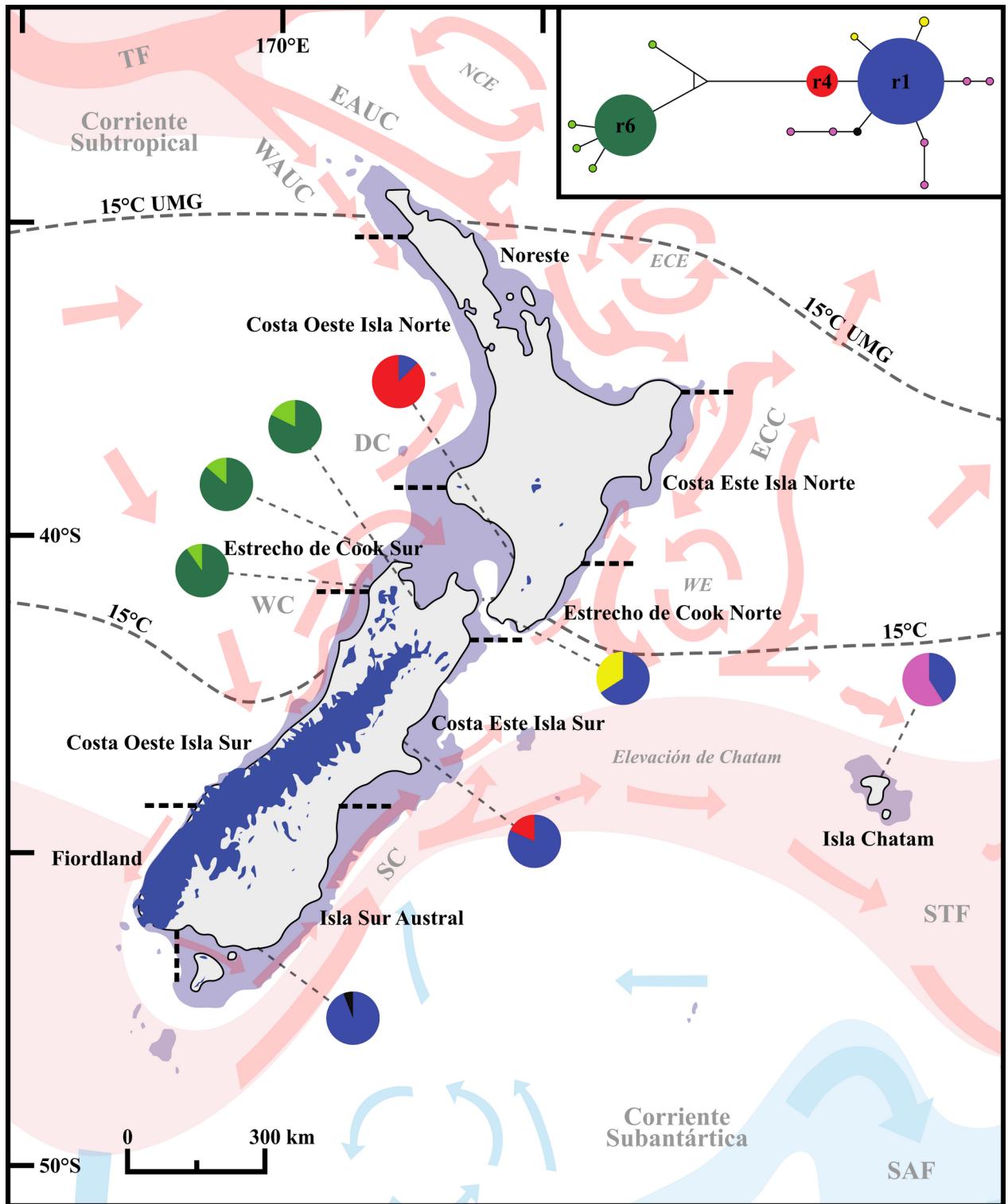


Figura 1. Mapa de Nueva Zelanda e Isla Chatham con características biogeográficas actuales y paleogeográficas durante el Último Máximo Glacial (UMG; ~22.000 años antes del presente). Se presentan, **las diez regiones biogeográficas** con presencia de *A. chilense* (nombradas en letra negra) y las barreras que las separan (en línea punteada negra; Ministry of Fisheries y Department of Conservation, 2008); **la red de haplotipos ITS2** y su distribución geográfica reportadas para *A. chilense* (cuadro superior derecho y gráficos de torta; Guillemin et al., 2014); **los sistemas de corrientes oceánicas** subtropicales (en flecha rosa) y subantárticos (en flecha celeste), por sus siglas en inglés: D'Urville Current (DC), East Auckland Current (EAUC), East Cape Current (ECC), East Cape Eddie (ECE), North Cape Eddie (NCE), Southland Current (SC), SubAntarctic Front (SAF), Subtropical Front (STF), Tasman Front (TF), Wairarapa Eddie (WE), West Auckland Current (WAUC), Westland Current (WC) (Thomas, 2012); **las isolíneas de temperatura promedio anual a 15°C** de las aguas oceánicas superficiales, actual y durante el UMG (en línea punteada gris; Barrows y Juggins, 2005); **la cobertura glacial durante el UMG** (en azul) y el territorio expuesto por la extensión de la línea de costa también durante el UMG (en azul gris) (Alloway et al., 2007).

2.2 Nueva Zelanda

Nueva Zelanda es un archipiélago situado a unos 1.600 km al este de Australia, entre el Océano Pacífico Suroeste y el Mar de Tasmania. El territorio tiene un área total de 268.000 km², delimitado por 15.000 km de línea costera. Está comprendido por dos islas principales, la Isla Norte y la Isla Sur (33° a 47°S y 166 a 177°W), además de numerosas islas periféricas menores

(entre las que se encuentran las islas Chatham, 1.000 km hacia el Este). El clima es controlado principalmente por la gradiente latitudinal de temperatura, variando desde condiciones subtropicales en el norte a subantárticas en el sur (Figura 1). La oceanografía de esta región es compleja, en gran parte debido a que la Convergencia Subtropical cruza latitudinalmente el sur de Nueva Zelanda (Butler *et al.*, 1992). Alrededor del territorio, los sistemas de corrientes mayores se dividen al alcanzar la plataforma continental, creando numerosas corrientes menores y remolinos (Figura 1) (Lange *et al.*, 2003). Adicionalmente, la interacción de las corrientes, mareas y vientos genera regímenes de surgencia en distintos puntos, como en Cape Farewell al oeste del Estrecho de Cook (Shlrlcliffe *et al.*, 1990), en la costa norte de Canterbury (Heath, 1972) y entre Cape Brett y Hauraki Gulf hacia la costa noreste de Isla Norte (Sharples y Greig, 1998).

El archipiélago data su origen en formaciones sedimentarias Cámbricas a Devónicas (hace 541 a 359 millones de años [Ma]) depositadas por el borde costero de Gondwana, correspondiente al actual margen occidental del continente Antártico. Durante el Cretácico tardío (hace 83 Ma), un proceso de rift intracontinental desprendió esta región del resto de Gondwana, resultando además en la apertura gradual del Mar de Tasmania (Mortimer *et al.*, 2019). Paralelamente, la evolución de un margen convergente en Antártica hacia uno pasivo da origen a la Elevación de Chatham, que habría sido un pasaje terrestre hasta el Paleoceno medio-tardío (alrededor de 59 Ma atrás) y del que las islas Chatham son la única región actualmente emergente (Stilwell y Consoli, 2012). Es hacia el Plioceno (hace 5,3 a 2,6 Ma), posterior al clímax de la orogenia que origina los Alpes del Sur (iniciada hace 25 Ma), que el archipiélago de Nueva

Zelanda comienza a asemejar su geografía actual (Fleming, 1975). La historia más reciente de Nueva Zelanda está marcada por los ciclos de glaciación del Pleistoceno (hace 2,6 Ma a 11.700 años) que afectaron fuertemente a la Isla Sur, dejando su huella en la topografía y la conformación de los fiordos en la región de Fiordland (Figura 1) (Fleming, 1975). Hacia el Pleistoceno tardío, durante el Último Máximo Glacial (hace ~22.000 años), los cambios eustáticos en el nivel del mar extendieron la línea costera y conformaron un amplio corredor terrestre entre las islas Norte y Sur, que volvería a inundarse hacia comienzos del período interglaciar Holoceno en paralelo al retiro de los hielos (Beu y Edwards, 1984) (Figura 1).

Su aislamiento geográfico e historia geológica le otorgan a Nueva Zelanda un grado asombroso de endemismo, con sobre un 80% de las ~2.500 especies nativas de plantas y un 71% de las 245 especies de aves que habitaban previo a la llegada de los humanos (Brockie, 2007). Esto ha llevado al reconocimiento de Nueva Zelanda como un hotspot mundial para la biodiversidad, con un ecosistema estructuralmente complejo dadas las interrelaciones con las variables físicas del país (Shears *et al.*, 2008). Debido a esta complejidad de la diversidad biológica dentro del archipiélago, diversas investigaciones se han enfocado en la definición y delimitación de regiones biogeográficas tanto en áreas terrestres como marinas, como estrategia para la conservación y el estudio de los ecosistemas y sus componentes (Shears *et al.*, 2008; Department of Conservation y Ministry of Fisheries, 2011).

Las regiones biogeográficas, como unidades espaciales significativamente diferenciadas, están orientadas a reflejar los patrones de estructuración de la diversidad biológica a gran escala (cientos a miles de kilómetros). Dado que la biodiversidad comprende múltiples niveles de

organización, con características particulares a cada taxón y además variables en el tiempo, los límites biogeográficos son inherentemente difusos, dinámicos y no en absoluto universales (Shears *et al.*, 2008). A lo largo de la costa de Nueva Zelanda, diferencias importantes en composición biológica y variables abióticas han permitido la definición con suficiente claridad de 14 regiones biogeográficas costeras en el archipiélago (de estas, se representan en la Figura 1 las 10 regiones con presencia de *A. chilense*: 4 corresponden a Isla Norte, 5 a la Isla Sur y una a las Islas Chatham. Las otras 4 regiones corresponden a las islas Kermadec, Three Kings, Snares y Subantárticas) (Ministry of Fisheries y Department of Conservation, 2008). Existen taxa marinos con una amplia distribución a lo largo de varias regiones biogeográficas, como las langostas *Jasus edwardsii*, *J. verreauxi* y el gastrópodo *Nerita atramentosa*, que carecen de estructuración genética intraespecífica. No obstante, esto ha sido explicado por los prolongados estados larvales pelágicos de estas especies (Brasher *et al.*, 1992; Ovenden *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1980; Waters *et al.*, 2005). De forma opuesta, diversos estudios filogeográficos en múltiples taxa de amplia distribución soportan la existencia de importantes barreras al flujo genético a lo largo de la línea costera, generalmente concordante con los límites de las regiones biogeográficas en que se distribuyen (Ross *et al.*, 2009).

El patrón más prominente observado en estudios filogeográficos de taxones marinos de amplia distribución es una diferenciación entre las poblaciones de Isla Norte e Isla Sur, observada por al menos 16 estudios poblacionales que consistentemente han reportado la divergencia hacia las vecindades del Estrecho de Cook o al Norte de la Isla Sur (Ross *et al.*, 2009). Esta divergencia ha sido atribuida a regímenes de surgencia que actúan como barreras a la dispersión. En la Isla

Norte, se ha descrito además divergencia entre las costas Este y Oeste en el anfípodo *Paracorophium lucasi* (Stevens y Hogg, 2004), el quitón *Sypharochiton pelliserpentis* (Veale y Lavery, 2011) y el pasto marino *Zostera muelleri* (Jones *et al.*, 2008). Se ha sugerido como posible causa una surgencia al Norte de Isla Norte, hipótesis que hasta el momento no ha sido puesta a prueba. Hacia el Noreste, en East Cape, se ha demostrado que los remolinos grandes y persistentes pueden actuar como limitantes de la dispersión de larvas pelágicas, al retenerlas por tiempos que exceden a su viabilidad (Chiswell y Booth, 1999; Chiswell y Roemmich, 1998). Hacia el Sur, el gradiente de temperaturas relacionado a la Convergencia Subtropical podría estar generando diferencias regionales en la biodiversidad, aunque la evidencia es ambigua (Ross *et al.*, 2012). Se ha planteado la posibilidad de que la estructuración hacia el Sur está fuertemente influenciada por el retiro de los hielos posterior al Último Máximo Glacial, al ser este seguido por una expansión de las poblaciones, como ha sido reportado para especies crípticas del alga roja *Bostrychia intricata* (Muangmai *et al.*, 2015). Por otra parte, Fiordland, al Suroeste de la Isla Sur, se constituye como una región aislada debido a las limitaciones impuestas por la baja salinidad y la circulación semi-cerrada de los fiordos (Ross *et al.*, 2009). Finalmente, las islas Chatham muestran una conectividad significativa con las islas principales, facilitada por las corrientes y vientos contemporáneos, pero diferenciada debido a la vasta distancia que las aísla, como evidencia la estructuración genética del pasto marino *Carpophyllum maschalocarpum* (Buchanan y Zuccarello, 2012).

2.3 Problemática

Las investigaciones realizadas hasta la fecha en *Agarophyton chilense* han revelado ciertos patrones de estructuración genética en Nueva Zelanda, pero existen datos genéticos sólo para un número reducido del total de regiones biogeográficas descritas para el país. Además, se han caracterizado los patrones de estructura genética sólo en base a secuencias de un gen nuclear (ITS2) y genotipos de cinco loci microsatélites, los que entregan una visión poco precisa de los posibles efectos de las barreras biogeográficas sobre la estructura genética de esta especie. De acuerdo con lo expuesto previamente, se plantean las siguientes preguntas:

- a) ¿Cuál es la estructura genética a escala fina (entre localidades), basada en miles de marcadores nucleares de tipo SNPs, de las poblaciones de *A. chilense* en Nueva Zelanda?
- b) ¿Cómo se relaciona esta estructuración genética de *A. chilense* con las barreras biogeográficas de Nueva Zelanda y los factores geográficos que las configuran?

2.4 Hipótesis

Agarophyton chilense en Nueva Zelanda presenta una estructuración genética estrechamente relacionada a las barreras biogeográficas descritas en la literatura (por ej., por efecto de barreras oceanográficas a la dispersión y procesos geológicos históricos).

2.5 Objetivo principal

Determinar la estructuración genética de las poblaciones de *Agarophytton chilense* en Nueva Zelanda y su congruencia con las barreras biogeográficas descritas, usando miles de marcadores genéticos nucleares de tipo SNPs.

2.6 Objetivos específicos

- a) Obtener genotipos para miles de SNPs adquiridos vía secuenciación masiva, en poblaciones de *A. chilense* muestreadas a lo largo de las 10 regiones biogeográficas donde la especie está reportada en Nueva Zelanda e Isla Chatham.
- b) Establecer el patrón de estructuración genética de *A. chilense* en Nueva Zelanda e Isla Chatham.
- c) Contrastar el patrón de estructuración genética de *A. chilense* con las barreras biogeográficas descritas para Nueva Zelanda.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Zona de estudio y muestreo

Se analizaron muestras provenientes de individuos de *Agarophyton chilense* originados desde el ciclo sexual, provenientes de 17 poblaciones naturales en Nueva Zelanda -incluyendo Isla Chatham-, cubriendo al menos 1 punto por cada región biogeográfica (de acuerdo a la definición otorgada por Ministry of Fisheries y Department of Conservation, 2008) con presencia de la especie (Tabla 1): 176 tetrasporófitos (individuos diploides), 169 gametófitos (individuos haploides) y 18 individuos inmaduros (nivel de ploidía indeterminado). Los individuos fueron colectados por la Dra. Marie-Laure Guillemin entre Noviembre y Diciembre de 2017. El nivel de ploidía de los individuos fue determinado por observación de los órganos reproductivos bajo microscopio binocular. La identificación de las poblaciones, información sobre las localidades y detalle de los individuos incluidos en el estudio son dados en la Tabla 1.

Tabla 1. Localidades muestreadas según su denominación de rótulo (Población), localización (Localidad y Coordenadas) y correspondencia con las regiones biogeográficas de Nueva Zelanda (Bioregión). Para cada población, se detallan las muestras secuenciadas en ddRADseq según su nivel de ploidía asignado en laboratorio: individuos diploides ($2n$), haploides (n), indeterminados (veg) y la suma total (Tot).

| POBL. | LOCALIDAD | BIOREGIÓN | COORDENADAS | | N para ddRAD | | | |
|-------|--------------------------|---------------------------|-------------|-----------|--------------|----|-----|-----|
| | | | Lat | Long | 2n | n | veg | Tot |
| WITI | Whitanga | Noreste | -36° 50' | 175° 41' | 12 | 10 | 0 | 22 |
| OHOP | Ohope | Noreste | -37° 58' | 177° 04' | 13 | 12 | 0 | 25 |
| SHEL | Shelly Beach | Costa Oeste de Isla Norte | -36° 34' | 174° 22' | 12 | 11 | 0 | 23 |
| RAGL | Raglan | Costa Oeste de Isla Norte | -37° 48' | 174° 53' | 10 | 10 | 0 | 20 |
| AHUR | Ahuriri Napier | Costa Este de Isla Norte | -39° 28' | 176° 53' | 10 | 10 | 0 | 20 |
| PARE | Paremata | Estrecho de Cook Norte | -41° 06' | 174° 52' | 10 | 10 | 0 | 20 |
| WAIN | Whanganui Inlet | Estrecho de Cook Sur | -40° 34' | 172° 32' | 12 | 10 | 0 | 22 |
| MOUT | Moutere Inlet | Estrecho de Cook Sur | -40° 59' | 173° 01' | 11 | 11 | 0 | 22 |
| MOMO | Momorangi Bay | Estrecho de Cook Sur | -41° 16' | 173° 56' | 10 | 9 | 0 | 19 |
| OKAR | Okari River | Costa Oeste de Isla Sur | -41° 48' | 171° 27' | 12 | 10 | 0 | 22 |
| BRIG | Sth Brighton | Costa Este de Isla Sur | -43° 31' | 172° 43' | 11 | 11 | 0 | 22 |
| CASS | Fjordland-Cascade Bassin | Fiordland | -45° 55' | 166° 54' | 1 | 3 | 16 | 20 |
| OTAG | Otago Harbour | Isla Sur Austral | -45° 50' | 170° 39' | 11 | 11 | 0 | 22 |
| HINA | Hinahina | Isla Sur Austral | -46° 28' | 169° 40' | 10 | 10 | 0 | 20 |
| STEW | Stewart Island-Deep Bay | Isla Sur Austral | -46° 54' | 168° 07' | 10 | 9 | 1 | 20 |
| RIVE | Riverton | Isla Sur Austral | -46° 21' | 168° 00' | 10 | 9 | 1 | 20 |
| CHIS | Chatham Island | Islas Chatham | -43° 52' | -176° 33' | 10 | 6 | 0 | 16 |

3.2 Extracción de ADN y preparación de biblioteca ddRADseq

El ADN fue extraído usando el kit NucleoSpin Plant II (Macherey Nagel, Düren, Alemania). La concentración de ADN fue luego determinada usando el ensayo de cuantificación PicoGreen (Molecular Probes, Eugene, EEUU) y normalizado a una concentración de 2.5 ng/ μ l. Las bibliotecas de ADN asociado a sitios de restricción de digestión doble (ddRADseq) fueron preparadas usando 100 ng de ADN de alta calidad por cada muestra, usando de base el protocolo descrito por Peterson *et al.* (2012). En breve, el ADN genómico fue digerido usando las enzimas de restricción Hhal y PstI seguido de un paso de ligación, donde a cada muestra se asoció un adaptador. Los individuos fueron amplificados en PCR adicionando un partidor de indexación (indexadores Illumina, N = 12) de acuerdo con el protocolo estándar de secuenciación multiplexado de Illumina. La combinación de los adaptadores usados y de los 12 indexadores Illumina permiten tener combinaciones únicas para cada individuo, las que se usan para reconocer las secuencias de cada individuo al finiquitar el proceso de secuenciación masiva realizado con todos los ADN mezclados (multiplexación). Todos los individuos fueron combinados en concentraciones equimolares (para obtener una cobertura similar por cada individuo) y se seleccionaron los fragmentos de 400-800 bp. La secuenciación por extremos pareados de la biblioteca tomó lugar en un equipo Hiseq2500 Rapid Run (Illumina, San Diego, CA), usando dos carriles de celdas de flujo, en corridas de 2x100bp por Fasteris SA (Geneva, Switzerland).

3.3 Ensamble *de novo* y filtración

Las secuencias fueron desmultiplexadas y filtradas por calidad usando la pipeline "*process_radtags.pl*" en STACKS v2.4 (Catchen *et al.*, 2011). Las lecturas individuales con puntajes inferiores a la media o con barcodes ambiguos fueron descartadas. Posteriormente, los loci fueron ensamblados *de novo* usando la pipeline "*denovo_map.pl*", también en STACKS. Se evaluaron distintas combinaciones de los parámetros m (profundidad mínima de lectura para formar un stack o alelo putativo), M (desajuste máximo permitido entre stacks dentro de los individuos para agrupar en un locus putativo) y n (desajuste máximo permitido entre loci para construir catálogos entre individuos) para decidir las especificaciones más coherentes con el set de datos completo, siguiendo la metodología propuesta por Paris *et al.* (2017). Se determinaron como óptimos los parámetros $m = 3$, $M = 4$ y $n = 4$.

Posterior al mapeo *de novo*, se realizó una filtración de loci con el componente "*populations*" de STACKS, reteniendo solamente los loci presentes en al menos un 60% de los individuos por cada sitio (opción *-r 0.6*) y en 16 de los 17 sitios totales (*-p 16*). Además, se descartaron loci con frecuencias alélicas < 0.02 (*--min-maf 0.02*) y heterocigosidad observada máxima > 0.5 (*--max-obs-het 0.5*). Los datos se restringieron al primer SNP por locus (*--write_single_snp*) y finalmente fueron exportados a archivos en formato VCF (*--vcf*). Para la conversión de archivos a otros formatos, según los requerimientos de cada software para análisis posteriores, se utilizó PGDSpider v.2.1.1.5 (Lischer y Excoffier, 2012).

A partir del set de datos ya preparado, se verificó la plodía para controlar por posibles errores de asignación y para asignar a los individuos cuya plodía no pudo ser establecida

mediante la inspección visual (vegetativos). Para esto, se utilizó como criterio de reasignación la heterocigosidad observada (promedio a través de todos los loci) de cada individuo dentro de cada población, observando su agrupación según H_o (en este caso la agrupación fue clara, por lo que no se usaron criterios estadísticos). La exploración del set de datos fue llevada a cabo en R (R Core Team, 2019) con las utilidades de los paquetes "vcfR" (Knaus y Grünwald, 2017) y "adegenet" (Jombart, 2008), las herramientas de graficación de "ggplot2" (Wickham, 2016) y todo bajo el entorno RStudio Desktop v.1.2.5 (RStudio Team, 2015).

Para un último paso de filtración, se identificaron loci parálogos a partir del subset de individuos haploides corregido. Ya que se espera homocigosidad para todos los loci en individuos haploides, los loci que mostraran una $H_o > 0$ fueron considerados como loci potencialmente parálogos y descartados del análisis. Los loci $H_o = 0$ fueron retenidos incorporándose a una lista blanca como opción a la pipeline "*populations*" (--whitelist), manteniendo los demás parámetros, obteniendo finalmente el set de datos completamente depurado.

3.4 Diversidad genética

Se calcularon parámetros básicos de diversidad genética por población a partir de individuos diploides, utilizando los softwares GenAIEx v6.5 (Peakall y Smouse, 2012), Arlequin v.3.5.2.2 (Excoffier y Lischer, 2010) y el paquete "genepop" (Rousset, 2008) en R: número promedio de alelos diferentes (N_A), número promedio de alelos efectivos (N_E), porcentaje de loci polimórficos (%P), heterocigosidad observada (H_o), heterocigosidad esperada (H_E) e índice de fijación (F_{IS} , 10.000 permutaciones con corrección de Bonferroni). Se evaluó además desviación

al equilibrio de Hardy-Weinberg a nivel de población con el paquete "diveRsity" (Keenan *et al.*, 2013) y "pegas" (Paradis, 2010) de R. Finalmente, se evaluó desequilibrio de ligamiento (LD) a través del índice estandarizado de asociación ($rBar_D$; Agapow y Burt, 2001) por población en el paquete de R "poppr" (Kamvar *et al.*, 2014), para estudiar el sistema de reproducción. En poblaciones con influencia de reproducción clonal, se espera que se generen asociaciones no aleatorias entre loci, debido a que la reproducción clonal imita el ligamiento físico completo sobre el genoma (Meeùs y Balloux, 2004).

3.5 Estructura genética y análisis de agrupación

Para explorar la estructura genética, a fin de facultar el estudio de los factores que explican los patrones de estructuración y de las relaciones entre las poblaciones, se contrastaron los resultados de cinco aproximaciones distintas:

- a) Primero, se estimó el estadístico F_{ST} entre todos los pares de poblaciones. El análisis fue conducido con Arlequin. La significancia de los F_{ST} por pares fue evaluada con 10.000 permutaciones.
- b) Segundo, se realizó un análisis de componentes de principales (PCA) sobre la matriz de genotipos de todos los individuos con la función "pca" del paquete de R "LEA" (Fritchot y Francois, 2015). El objetivo de este análisis es resumir la variación genotípica entre todas muestras, dando una visión general de la forma en que se agrupan y distancian.

- c) Tercero, se construyó una red filogenética en SplitsTree v4.14.1 (Kloepper y Huson, 2008) con el algoritmo "*Neighbor-Net*" (NT), un método basado en el "*Neighbor-Joining*" (NJ) que permite representar señales conflictivas o historias filogenéticas alternativas a partir de sets de datos genéticos complejos (Bryant y Moulton, 2002). A diferencia del NJ, el NT permite la representación de divisiones ("splits") incompatibles ya que espera a que un nodo se aparezca por segunda vez para establecer una aglomeración. Para este método se calculó una matriz de distancias con el método de distancias no corregido ("*Uncorrected_P*"), ignorando las comparaciones entre loci ambiguos o con datos perdidos.
- d) Cuarto, se llevó a cabo un análisis de asignación a poblaciones ancestrales (K) a partir de la estimación de coeficientes de admixtura por individuo en el paquete "LEA" de R. Los cálculos se realizaron con la estimación del criterio de entropía y 10 repeticiones por cada valor de K . Este análisis provee resultados similares a los análisis Bayesianos, como STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000). El análisis de *LEA* presenta dos principales ventajas en contraposición a STRUCTURE: por una parte, permite estudiar poblaciones que no se encuentran estrictamente en equilibrio de Hardy-Weinberg, como podría ser el caso de poblaciones mixtas de individuos haploides y diploides; por otra, los tiempos de procesamiento computacional son mucho menores, de unos pocos minutos en *LEA* contra varias semanas en STRUCTURE, dependiendo del set de datos.

En conjunto, estas distintas aproximaciones contribuyen a una interpretación cruzada con distintas formas de representación y exploración, permitiendo lograr una visión más completa de los patrones de estructuración genética de *A. chilense* en Nueva Zelanda. Por ejemplo, la distribución de los datos en el *PCA* y las relaciones en la *Neighbor-Net* orientan a la significación de la subestructura a distintos *K* en el *LEA*, mientras que los valores de F_{ST} se relacionan con la magnitud de las divisiones entre los grupos observados en *LEA*.

3.6 Efecto de la última glaciación sobre la estructuración genética

Se estudió la hipótesis de recolonización postglacial de la población CASS (región Fiordland), ubicada en un área que fue completamente cubierta por glaciares permanentes durante el Último Máximo Glacial, mientras que las regiones vecinas (las regiones de la Costa Oeste y Austral) no fueron directamente afectadas (Trewick y Bland, 2012). Para esto, se compararon las estimaciones de probabilidad de asignación (*LEA*) entre CASS y sus poblaciones vecinas (OKAR hacia el norte, RIVE hacia el sur) para evaluar si la recolonización ocurrió desde ambos frentes o desde uno solo.

Se puso a prueba además la relación entre diversidad genética y geografía. En primer lugar, se realizaron pruebas de correlación de Kendall entre los estimadores de diversidad genética y latitud, para pesquisar la presencia de un posible gradiente de diversidad. Esta prueba fue conducido en R con el paquete "Kendall" (McLeod, 2011). Posteriormente, se ejecutó una prueba de correlación de Mantel con la matriz de distancia genética F_{ST} linearizada ($F_{ST}/1-F_{ST}$) y una matriz de distancia oceánica entre los pares de poblaciones, para evaluar aislamiento por

distancia de acuerdo a Rousset (1996), utilizando el paquete de R "ade4" (Dray y Dufour, 2007). Las distancias oceánicas fueron calculadas a partir de un rasterizado del mapa de polígonos y líneas costeras de Nueva Zelanda y sus islas (proyección WGS 84 EPGS:4326 Geographic; LINZ – Land Information New Zealand, 2019), utilizando los paquetes de R “fasterize” (Ross, 2020), “raster” (Hijmans, 2020), “rgdal” (Bivand, *et al.*, 2020), “rgeos” (Bivand y Rundel, 2020), “sf” (Pebesma, 2018) y “sp” (Pabesma y Bivand, 2005).

3.7 Congruencia con barreras biogeográficas

Finalmente, la congruencia entre el patrón de estructuración genética y las barreras biogeográficas fue puesta a prueba siguiendo el método de Ross *et al.* (2012), de acuerdo al cual las poblaciones muestreadas fueron asignadas primero a regiones según la zonación biogeográfica propuesta por Ministry of Fisheries y Department of Conservation (2008), para luego realizar un análisis de varianza molecular (AMOVA) con el que evaluar que tan bien esta clasificación representa la distribución espacial de la variación genética en *A. chilense*. Este análisis fue realizado con Arlequin.

4. RESULTADOS

4.1 Secuencias en bruto, ensamble *de novo* y filtrado

Se recuperó un total de 918.837 loci putativos para los 355 individuos muestreados en las 17 localidades de Nueva Zelanda e Isla Chatham. Después de los pasos de filtración iniciales (presencia en 16 de las 17 poblaciones y en 60% de los individuos, frecuencia alélica mínima de 0.02 y heterocigosidad observada máxima de 0.5) se retuvieron 5.726 loci con 3.945 sitios variables (SNP). Con este set de datos, se calculó la H_o por individuo, a partir de la que se reasignó la ploidía de 24 individuos (Figura 2). Posteriormente, se identificó en el subset de haploides corregido 1.514 loci heterocigotos (potencialmente parálogos), que fueron descartados del set de datos. Concluidos los pasos de filtración, se retuvo finalmente un total de 2.429 loci compartidos entre las 17 poblaciones con 5,72% de datos perdidos.

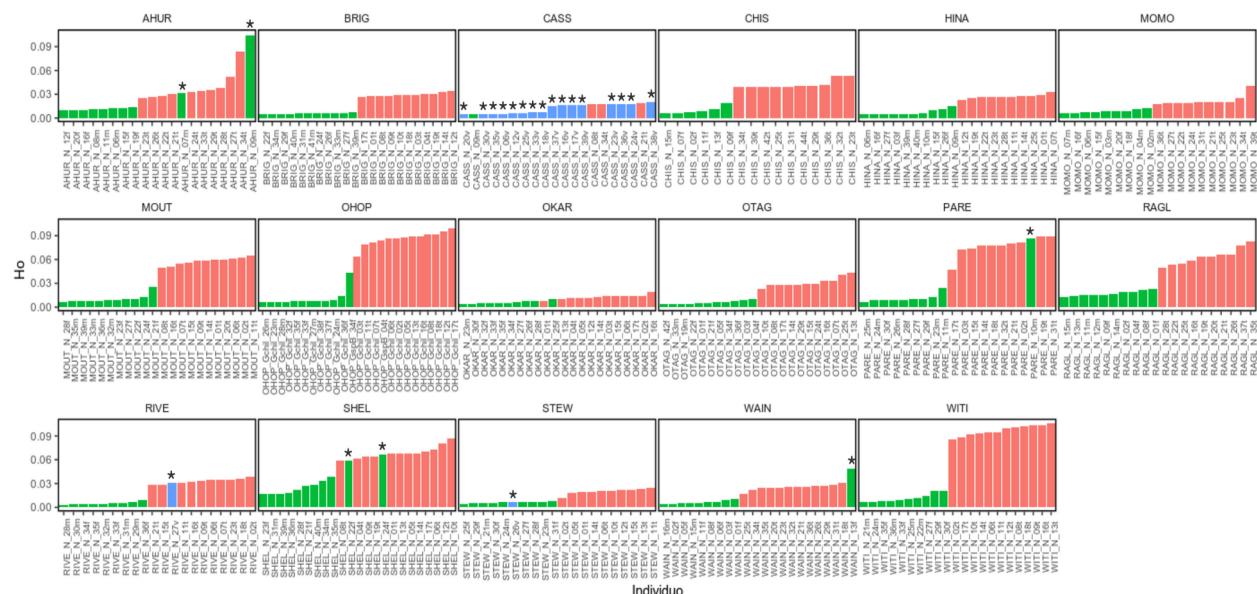


Figura 2. Heterocigosidad observada (H_o) por individuo, separados por población. Los colores corresponden a la asignación de ploidía realizada previamente en laboratorio: haploide (verde), diploide (rojo) y vegetativo (azul). Los individuos reasignados están marcados con una estrella.

4.2 Diversidad genética

Sobre el set de datos de diploides (192 individuos) los SNPs mostraron en general una diversidad alélica baja, con un promedio de alelos diferentes (N_A) de 1,112 a través de todas las poblaciones y un porcentaje de loci polimórfico siempre menor a 28,38%. La heterocigosidad observada (H_o), con valores también bajos (promedio 0,0337 a través de las poblaciones), no difiere significativamente de los de la heterocigosidad esperada (H_E ; promedio 0,0322 a través de las poblaciones). El índice de fijación (F_{IS}) muestra en general valores ligeramente menores a 0, con algunas poblaciones (CHIS, OTAG, MOMO) con valores menores a -0,1 y sólo una población (WAIN) con un valor superior a 0,1. No obstante, los valores no son significativos ($p > 0,05$ en todas las poblaciones). Los resultados completos son entregados en la Tabla 2.

Tabla 2. Localidades de muestreo y medidas de diversidad obtenidas a partir de individuos diploides: (N_A) número promedio de alelos diferentes, (N_E) número efectivo de alelos ($1 / \sum pi^2$, siendo pi las frecuencias alélicas de la población), (%P) porcentaje de alelos polimórficos, (H_o) heterocigosidad observada, (H_E) heterocigosidad esperada, (F_{IS}) índice de fijación.

| POBLACIÓN | | N_A | N_E | %P | H_o | H_E | F_{IS} |
|-----------|-------------|-------|-------|--------|-------|-------|----------|
| | WITI | 1,276 | 1,138 | 28,38% | 0,087 | 0,087 | -0,04442 |
| | PARE | 1,251 | 1,109 | 26,24% | 0,076 | 0,074 | -0,04125 |
| Isla | OHOP | 1,224 | 1,112 | 23,57% | 0,074 | 0,074 | -0,02435 |
| Norte | RAGL | 1,155 | 1,073 | 16,54% | 0,054 | 0,050 | -0,09733 |
| | SHEL | 1,193 | 1,072 | 20,40% | 0,052 | 0,051 | -0,04905 |
| | AHUR | 1,187 | 1,030 | 21,14% | 0,037 | 0,037 | -0,01252 |
| Chatham | CHIS | 1,080 | 1,028 | 9,75% | 0,029 | 0,028 | -0,11073 |
| | MOUT | 1,135 | 1,067 | 13,70% | 0,043 | 0,041 | 0,00125 |
| | BRIG | 1,051 | 1,027 | 5,47% | 0,019 | 0,018 | -0,05024 |
| | OTAG | 1,051 | 1,025 | 5,39% | 0,018 | 0,016 | -0,10217 |
| | WAIN | 1,094 | 1,017 | 10,98% | 0,017 | 0,022 | 0,18414 |
| Isla | RIVE | 1,051 | 1,025 | 5,10% | 0,016 | 0,015 | -0,05014 |
| Sur | MOMO | 1,059 | 1,018 | 6,33% | 0,016 | 0,014 | -0,11666 |
| | HINA | 1,038 | 1,019 | 3,87% | 0,012 | 0,012 | -0,05446 |
| | STEW | 1,019 | 1,005 | 3,13% | 0,010 | 0,010 | -0,00424 |
| | CASS | 1,018 | 1,004 | 2,80% | 0,008 | 0,008 | 0,09214 |
| | OKAR | 1,017 | 1,005 | 2,18% | 0,006 | 0,006 | -0,0397 |

La estimación de LD con el índice de asociación alternativo ($rBar_D$) muestra un patrón complejo, con diez poblaciones en desequilibrio (AHUR, BRIG, CASS, HINA, MOMO, OKAR, OTAG, RIVE, SHEL, WAIN; $rBar_D$ fuera de la curva y $p < 0,05$) y siete sin desequilibrio significativo (CHIS, MOUT, OHOP, PARE, RAGL, STEW, WITI; $rBar_D$ en la curva y $p > 0,05$) (Figura 3), indistintamente de la ubicación geográfica de las poblaciones.

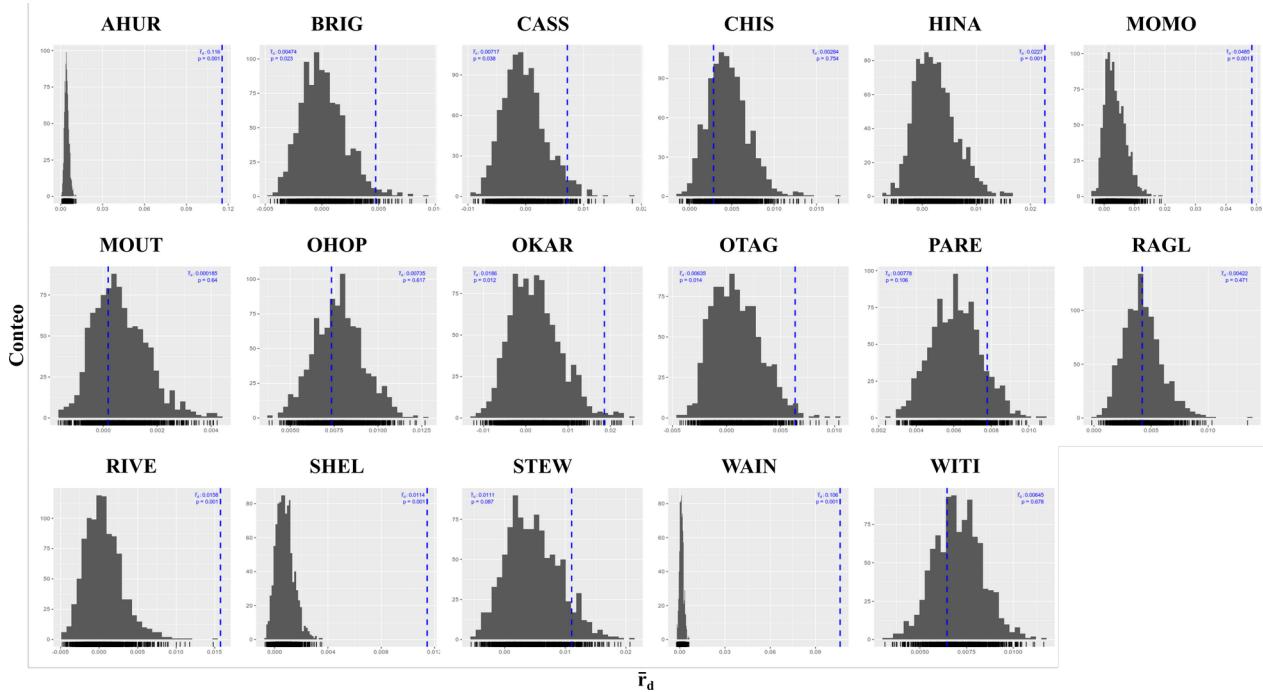


Figura 3. Prueba de desequilibrio de ligamiento ($rBar_d$) en las poblaciones de estudio. La curva en gris corresponde a la simulación de una población en cruzamiento aleatorio y la línea punteada azul al valor estimado de $rBar_D$. Se entrega además el valor de probabilidad p .

4.3 F_{ST} entre pares de poblaciones

En general, los valores de F_{ST} muestran una importante diferenciación entre las poblaciones, con un rango de 0,328 a 0,958, en promedio 0,726 y todos significativos ($p < 0,05$). La mayor diferenciación (F_{ST} cercano o mayor a 0,9) se observa entre el par SHEL y RAGL (Costa Oeste de Isla Norte) con todas las demás poblaciones. Otras poblaciones que muestran una diferenciación importante con respecto a las demás son AHUR (Costa Este de Isla Norte), CHIS (Isla Chatham) y MOMO (Estrecho de Cook Sur). Los valores más bajos de F_{ST} (cercano a 0,3) se observan entre poblaciones vecinas dentro de regiones biogeográficas: entre SHEL y RAGL (Costa Oeste de Isla Norte), entre WITI y OHOP (Noreste) y entre RIVE, HINA y STEW (Isla Sur Austral). Los valores de F_{ST} entre todos los pares de poblaciones se entregan en la Figura 4.

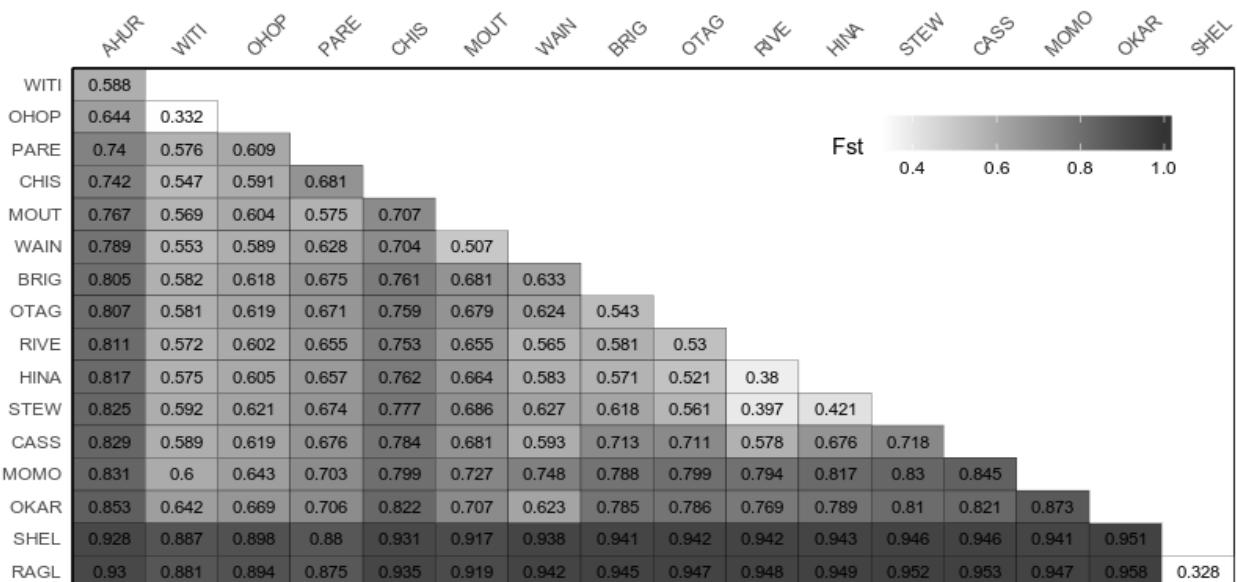


Figura 4. Valores de F_{ST} entre pares de poblaciones, descritos en una escala de grises de 0,3 en blanco a 1 en negro.

4.4 Análisis de Componentes Principales (PCA)

Los primeros tres componentes principales (*PC*) explican 66,6% de la variación (Figura 6A). Entre estos, el *PC* 1 da cuenta de la mayoría de la variación (56,4%), dada por la gran separación del grupo RAGL y SHEL (Costa Oeste de Isla Norte) de todas las demás poblaciones. En menor escala, se observa una diferenciación de PARE (Estrecho de Cook Norte), mientras que las demás poblaciones de Isla Norte logran distinguirse de MOUT (Estrecho de Cook Sur), CHIS (Isla Chatham) y de las demás poblaciones de Isla Sur, que aparecen estrechamente agrupadas (Figura 6A). Los *PC* 2 y 3, aunque explican una variación menor (6,7% y 3,5%, respectivamente), logran discriminar muy bien entre todas las poblaciones mostrando además un interesante patrón de agrupación entre estas. En la gráfica de ambos *PC* 2 y 3, SHEL y RAGL se posicionan en el origen, desde el que se separan hacia el primer cuadrante las poblaciones del Estrecho de Cook (PARE más lejana, mientras que MOMO, MOUT y WAIN más cercanas al origen y al cuarto cuadrante), hacia el segundo cuadrante las del Noreste, hacia el tercer cuadrante AHUR y CHIS (esta última más cercana al origen), y hacia el cuarto cuadrante las demás poblaciones de Isla Sur, estrechamente agrupadas (Figura 6A).

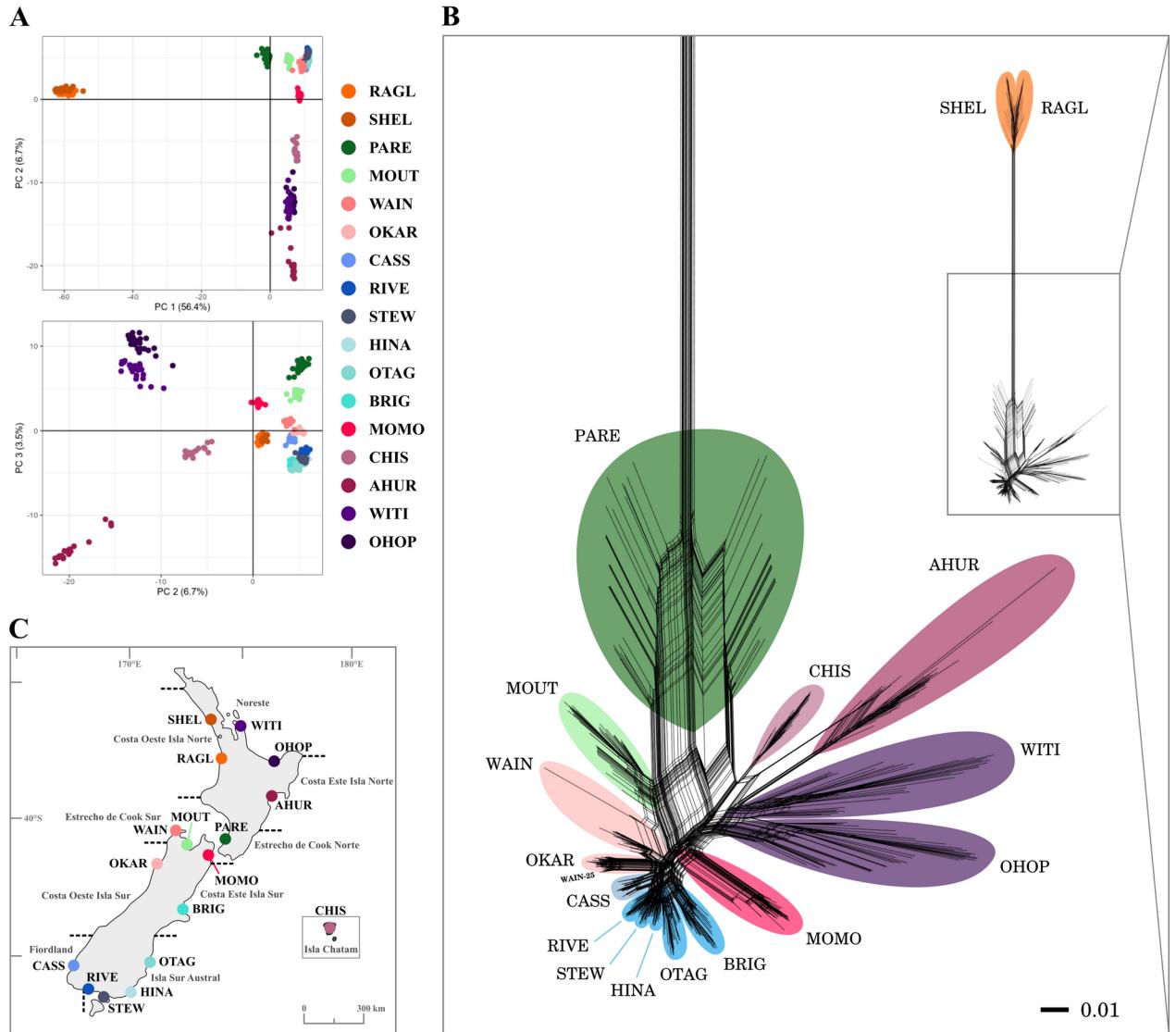


Figura 5. A. Análisis de Componentes Principales con gráficos de los primeros tres componentes principales (PC), asignados los individuos (cada punto) a sus respectivas poblaciones de origen (colores). **B.** Neighbor-Net de las relaciones filogenéticas entre todos los individuos, rotulados por población de origen, con código de color en cada población de acuerdo a los resultados del análisis LEA ($K = 8$) y escala según la distancia genética (método "Uncorrected_P"). **C.** Mapa

de Nueva Zelanda con la posición de los puntos de muestreo y la denominación de las barreras biogeográficas delimitadas en línea punteada.

4.5 Red filogenética (*Neighbor-Net*)

El gráfico de *Neighbor-Net* muestra una diferenciación clara de todas las poblaciones, con una agrupación que sigue estrechamente a su ubicación geográfica (Figura 6B y C). En primer lugar, y al igual que en el PCA, el par SHEL y RAGL (Costa Oeste de Isla Norte) diverge notablemente de las demás poblaciones, que aparecen mucho más conectadas. Estas dos poblaciones se conectan en la base de su ramificación con PARE (Estrecho de Cook Norte), que diverge desde una serie de nodos no muy bien definido. Próximas a PARE, las demás poblaciones de Isla Norte divergen significativamente, con AHUR (Costa Este de Isla Norte) separada de las demás más claramente, mientras que WITI y OHOP (Noreste) están más agrupadas. CHIS (Isla Chatham) diverge moderadamente entre PARE y AHUR, visiblemente más próxima a la última. Por otra parte, las poblaciones del Estrecho de Cook Sur muestran una divergencia moderada, de las que MOUT y WAIN aparecen más asociadas con PARE, mientras que MOMO se separa con claridad y se posiciona más cerca de las poblaciones de Isla Sur. Estas poblaciones -OKAR, CASS, RIVE, STEW, HINA, OTAG- se muestran como ramificaciones mucho más cortas, de todas maneras diferenciables, asociadas en una secuencia de oeste a este que sigue a la línea costera por el sur. De estas, CASS (Fiordland) aparece algo más separada de las demás, entre OKAR (Costa Oeste de Isla Sur) y RIVE (Isla Sur Ausrtal).

4.6 Análisis de asignación a poblaciones ancestrales y mezcla (*LEA*)

Incluyendo todas las poblaciones en el análisis *LEA*, el criterio de entropía cruzada sugirió el modelo con $K = 2$ poblaciones como el que explica en mayor parte el set de datos (Figura 6A). En esta partición se observa una separación de SHEL y RAGL (grupo naranjo) de todas las demás poblaciones (grupo celeste). Además, se observa en PARE aproximadamente un 20% de admixtura con el grupo naranjo, y algo menor a 10% en MOUT (Figura 6B). No obstante, la tendencia en forma de curva para después de $K = 2$ es indicativa de una subestructura significativa. Al estudiar la subestructura del grupo celeste, excluyendo del análisis a SHEL y RAGL, el gráfico de entropía cruzada muestra una forma de curva decreciente con mínimo en $K = 14$ del gráfico del criterio de entropía cruzada, considerado como evidencia de un patrón de subestructuración en este grupo desde una escala más amplia a una más fina (Figura 6A), por lo que se presentan los resultados completos para cada valor de K de 2 a 14 (Figura 6B).

La subestructura en el segundo *LEA* indica un patrón global en $K = 2$ correspondiente a una separación de las poblaciones del norte AHUR, WITI y OHOP (grupo morado) con las demás (grupo celeste) y mezcla aproximadamente del 50% en CHIS y en menor medida MOMO. Posteriormente, en $K = 3$, se diferencia en el Estrecho de Cook PARE (grupo verde) del grupo celeste, con admixtura del 50% en MOUT y en menor medida a WAIN. Estos tres grupos mayores (morado, celeste y verde) muestran posteriormente un significativo patrón de subestructuración con bastante complejidad. Es relevante la diferenciación a valores menores de K primero de AHUR (grupo violeta, $K = 4$), MOMO (grupo rosado, $K = 5$, que luego pasa a fucsia), MOUT (grupo verde claro, $K = 7$) y OKAR (ahora grupo rosado, $K = 7$). La resolución

de CHIS es algo más interesante, ya que antes de resolverse en $K = 8$ (grupo amarillo) aparece como una mezcla más cosmopolita de distintos grupos (en $K = 7$, de los grupos de AHUR, OKAR, WITI y OHOP). De igual forma, WAIN muestra una señal conflictiva como mezcla de los grupos correspondientes a MOUT, OKAR y CASS, hasta resolverse en $K = 14$ (grupo verde limón). Por su parte, CASS muestra una interesante señal de admixtura desde $K = 6$ a 11, hasta resolverse a un grupo propio en $K = 12$. Las demás poblaciones de Isla Sur -desde RIVE a BRIG- se mantienen homogéneas en el grupo celeste, hasta diferenciarse primero BRIG (en $K = 11$), luego OTAG (en $K = 13$), manteniéndose RIVE, STEW y HINA en el mismo grupo celeste.

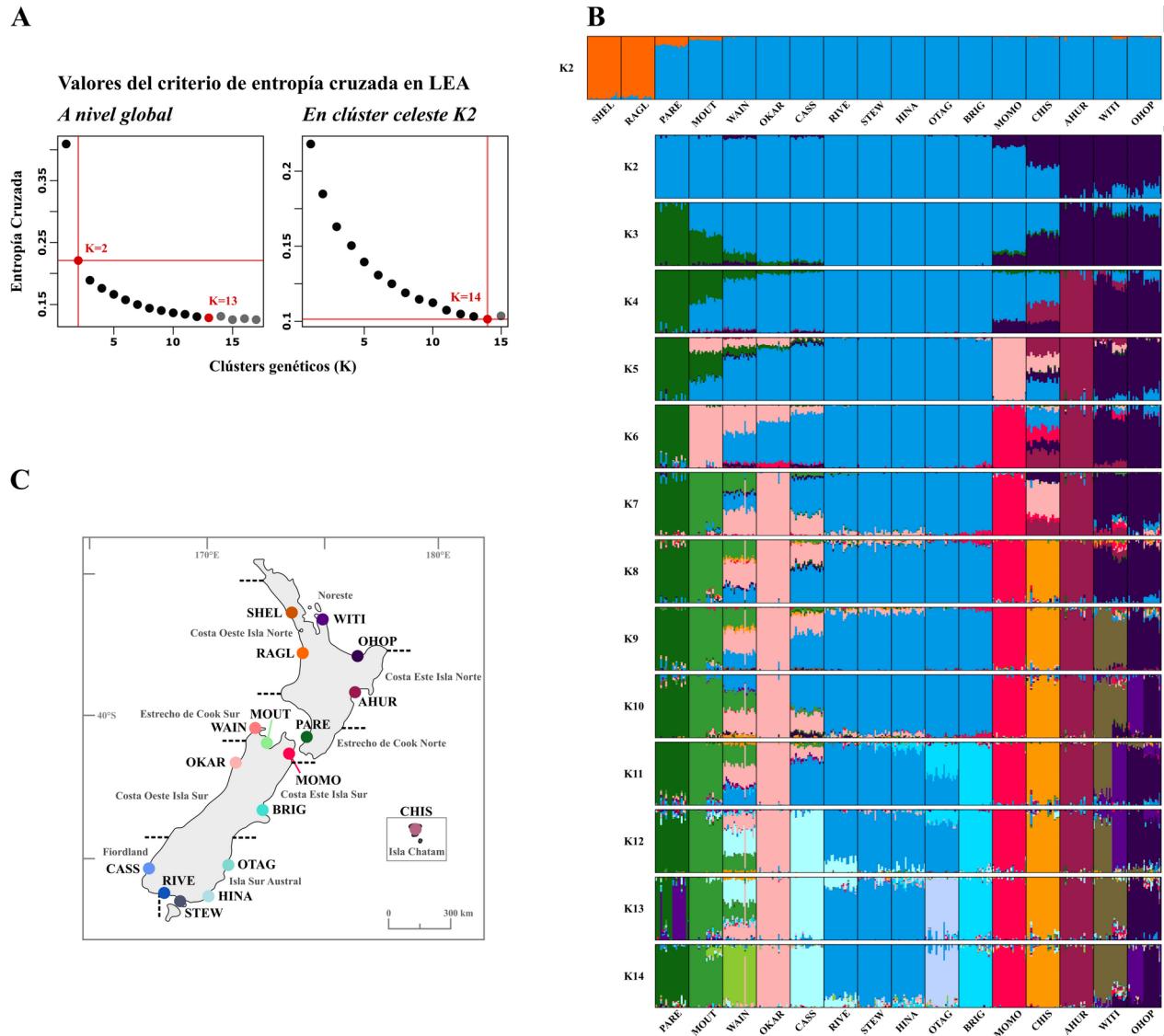


Figura 6. *A.* Criterio de entropía cruzada para cada valor de K (número de poblaciones ancestrales) para el análisis LEA conducido a nivel global (arriba) y al excluir las poblaciones SHEL y RAGL en concordancia con el grupo celeste del análisis global (abajo). *B.* Resultados de asignación a grupos genéticos (poblaciones ancestrales) mediante índice de admixtura para los individuos dentro de cada población, primero para LEA global en $K = 2$ (arriba) y luego para la subestructura del cluster celeste considerando resultados de $K = 2$ a 14 (abajo). *C.* Mapa de

Nueva Zelanda con la posición de los puntos de muestreo y la denominación de las barreras biogeográficas delimitadas en línea punteada.

4.7 Recolonización post-glacial en CASS

Se utilizaron los resultados de *LEA* de coeficiente de admixtura para graficar la asignación de poblaciones ancestrales en torno a CASS. Desde $K = 7$ hasta $K = 11$, CASS aparece como una mezcla genética entre dos cluster principales, mientras que desde $K = 12$ hasta $K = 14$, CASS se resuelve como grupo separado. Los valores de asignación por individuo se promediaron para $K = 7$ para obtener una asignación por población a grupos genético (Figura 7). Esta gráfica muestra claramente a CASS como una población intermedia entre las vecinas OKAR (Costa Oeste de Isla Sur) y RIVE (Isla Sur Austral), aunque más cercana a esta última.

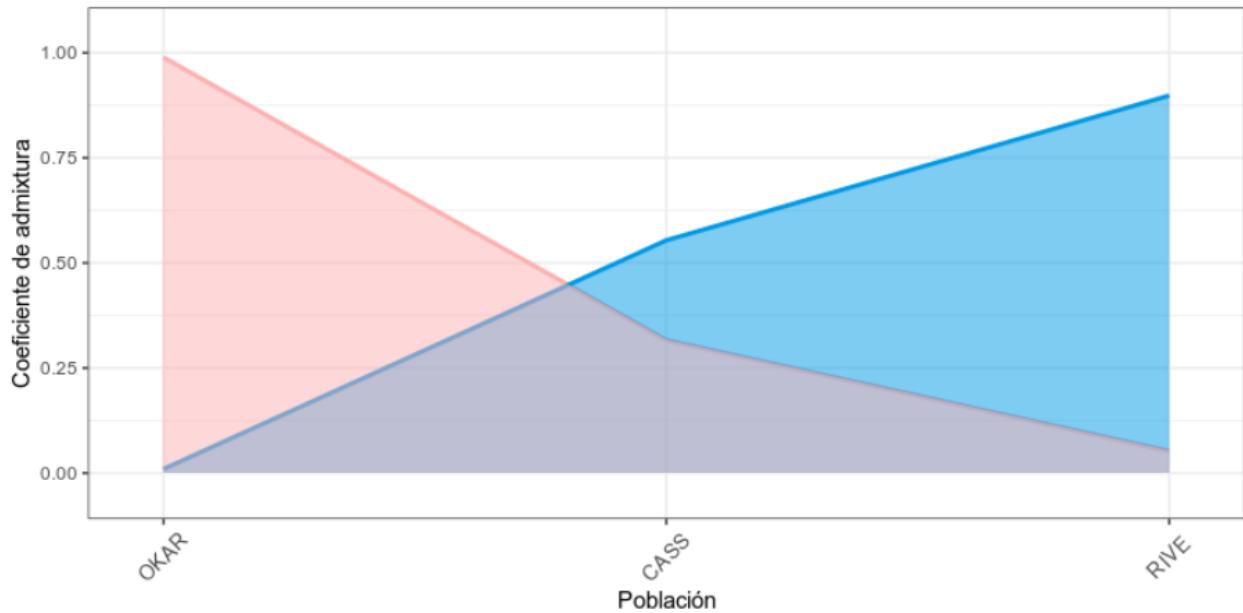


Figura 7. Asignación de poblaciones a grupos genéticos a partir de los resultados de K = 7 de LEA. La población CASS (Fiordland) en el centro y sus poblaciones vecinas OKAR (Costa Oeste de Isla Sur; grupo rosado) hacia la izquierda y RIVE (Isla Sur Austral, grupo celeste) hacia la derecha están indicadas.

4.8 Relación entre diversidad genética y distancia geográfica

A nivel global, distintos indicadores de diversidad genética (N_a , N_e y H_o) muestran un patrón significativo de disminución en la diversidad hacia latitudes mayores (prueba de correlación de Kendall, $p < 0,05$; Figura 8A). Al estudiar cada isla por separado la correlación desaparece ($p > 0,05$; Figuras 8B y C), indicando que el patrón general se debe más bien a una menor diversidad en Isla Sur en comparación a Isla Norte. No obstante, cabe notar que en Isla Sur, aunque el análisis no arroje significancia estadística, se observa que todas las poblaciones del extremo austral muestran una diversidad mínima, mientras que hacia el extremo septentrional existen poblaciones tanto con diversidad muy baja como más alta. Esto bien puede explicar que no se haya encontrado una correlación robusta.

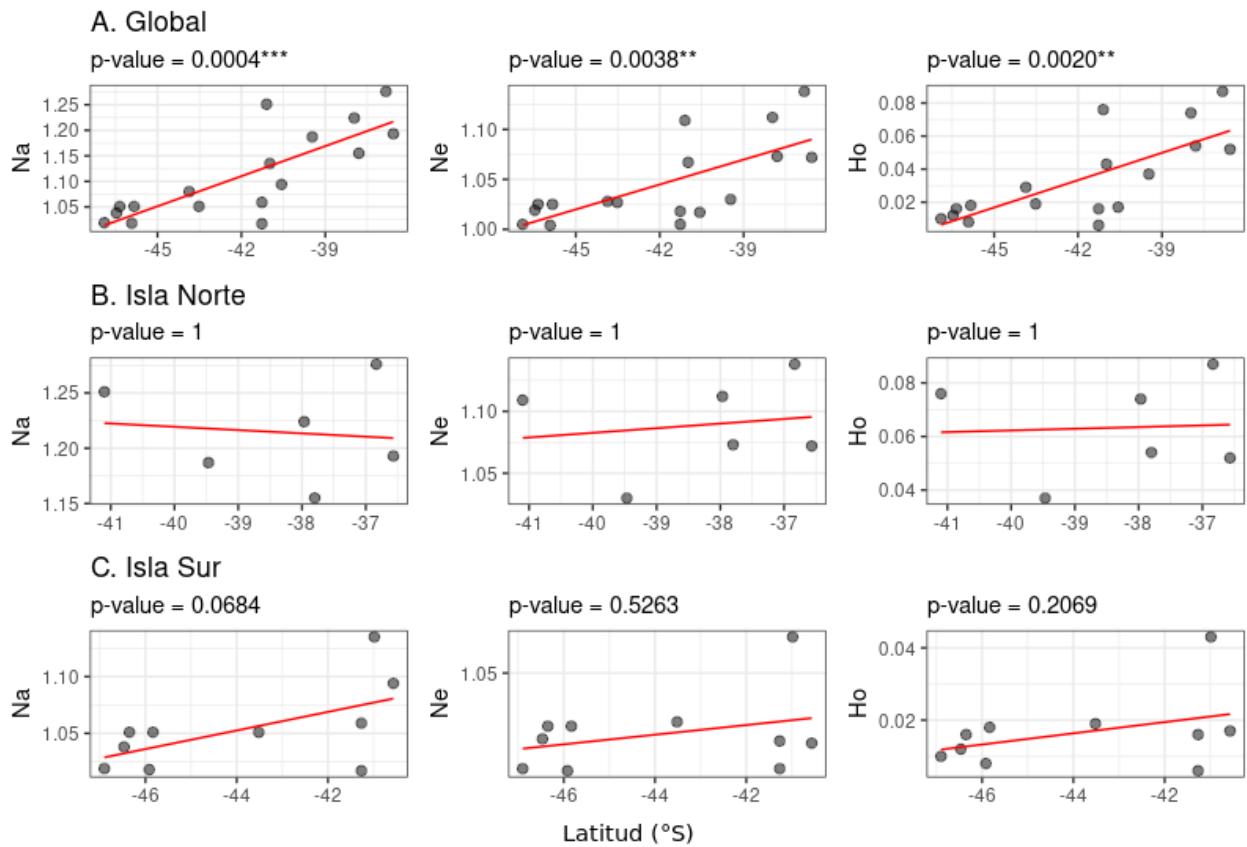


Figura 8. A. Prueba de correlación de Kendall entre latitud y distintos indicadores de diversidad intra poblacional a nivel global (todas las poblaciones): número de alelos distintos (Na), número de alelos efectivos (Ne), heterocigosidad observada (Ho). **B.** Prueba de Kendall con las poblaciones de Isla Norte.. **C.** Prueba de Kendall con las poblaciones de Isla Sur.

Por otra parte, al evaluar por aislamiento por distancia oceánica en el grupo de poblaciones más conectadas (excluyendo a RAGL y SHEL, en correspondencia al grupo celeste de LEA en $K = 2$), no se evidencia correlación entre distancia genética (F_{ST} linearizada) y distancia geográfica (Km) a esta escala ($p > 0,05$; Figura 9).

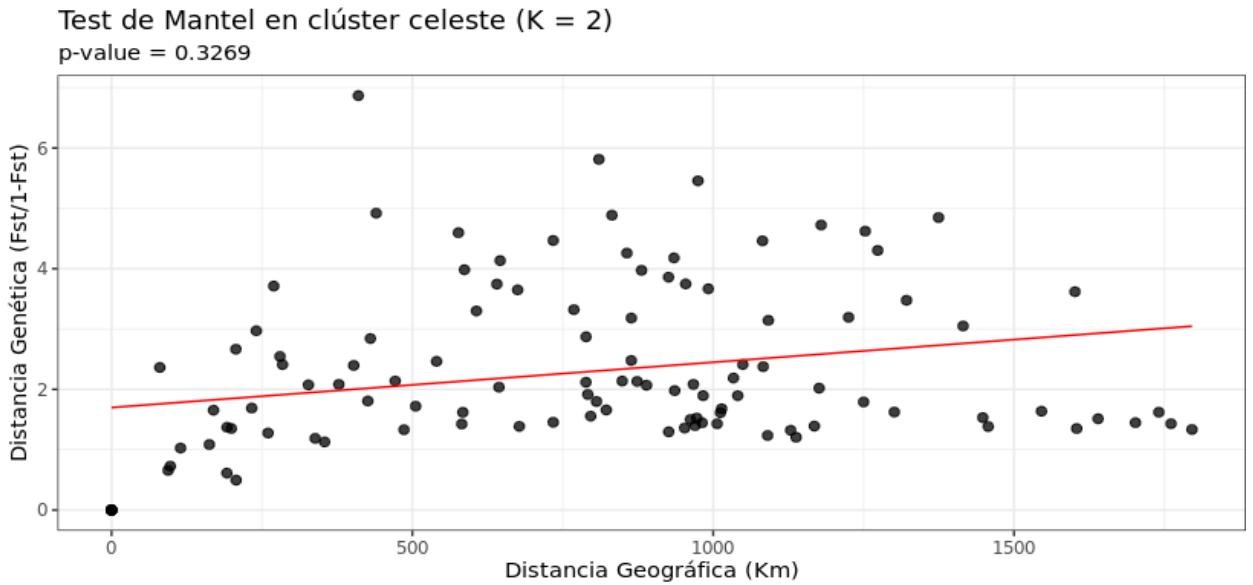


Figura 9. Prueba de correlación de Mantel entre la matriz de distancia genética ($F_{ST}/1-F_{ST}$) y la matriz de distancia geográfica (en Km) para los pares de poblaciones definidos por el grupo celeste en $K = 2$ del análisis LEA (excluye del análisis a RAGL y SHEL).

4.9 Análisis de varianza molecular (AMOVA)

Al agrupar las 17 poblaciones dentro de las 10 regiones biogeográficas, el AMOVA indicó una diferenciación genética significativa entre las regiones biogeográficas ($F_{CT} = 0,738, p < 0,05$), explicando un 73,84% de la variación genética total (Tabla 4). Las poblaciones ubicadas dentro de cada región biogeográfica muestran también una diferenciación a menor escala (11,43% de la variación genética) pero significativa ($F_{SC} = 0,437, p < 0,05$), indicando que dentro de cada región las poblaciones no son completamente homogéneas. Por último, el análisis indica cierta heterogeneidad dentro de las poblaciones (14,73%; $F_{ST} = 0,852, p < 0,05$).

Tabla 3. Tabla completa de resultados de AMOVA jerarquizado a los niveles de región biogeográfica (Entre regiones), población (Entre poblaciones, intra regiones), individuo (Entre Individuos, intra poblaciones) y molecular (Intra individuos) y prueba de significancia para los índices de fijación asociados a cada componente de varianza.

| Fuente de variación | g.l. | Suma de cuadrados | Componentes de varianza | Porcentaje de variación |
|------------------------------------------------------|------|-------------------|------------------------------------|-------------------------|
| <i>Entre regiones</i> | 9 | 44321,347 | 120,09154 (<i>V_a</i>) | 73,84% |
| <i>Entre poblaciones, intra regiones</i> | 7 | 3089,257 | 18,58991 (<i>V_b</i>) | 11,43% |
| <i>Intra poblaciones</i> | 367 | 8792,342 | 23,95734 (<i>V_c</i>) | 14.73% |
| Total | 383 | 56202,945 | 162,63879 | |
| Prueba de significancia (10000 permutaciones) | | | | |
| Índice de fijación | | Valor | | <i>p</i> -valor |
| <i>F_{CT} (V_a)</i> | | 0,73839 | | < 0,0001 |
| <i>F_{SC} (V_b)</i> | | 0,43692 | | < 0,0001 |
| <i>F_{ST} (V_c)</i> | | 0,85170 | | < 0,0001 |

5. DISCUSIÓN

En términos generales, los análisis genéticos en *Agarophyton chilense* basados en SNPs revelaron un intrincado patrón de diversidad y estructuración genética a través del archipiélago de Nueva Zelanda, evidenciando una compleja historia demográfica y evolutiva muy relacionada con determinantes geográficas. A nivel global, se observó una alta diversidad y diferenciación genética en las poblaciones de Isla Norte -especialmente de las poblaciones SHEL y RAGL de la costa este-, algo menor en el Estrecho de Cook Sur e Isla Chatham, y una diversidad muy reducida y mayor homogeneidad entre las poblaciones de la porción más austral de Isla Sur. Esta última zona fue afectada directamente por la última glaciación -el área ocupada por CASS, en Fiordland, fue cubierta completamente por glaciares durante el UMG-, por lo que podría ser esta un factor importante que explique el patrón genético en la zona. Al excluir a SHEL y RAGL del análisis, debido a la diferenciación extrema de este grupo, no se encontró evidencia de aislamiento por distancia que permita explicar el distanciamiento genético. Más bien se observa que los patrones de diferenciación genética (en unos casos hasta de existencia de quiebre genético) concuerdan muy bien con la regionalización biogeográfica propuesta para la costa de Nueva Zelanda, observación que es reforzada por los resultados del AMOVA, sugiriendo un importante efecto de barreras a la dispersión sobre la estructuración genética.

5.1 Presencia de una posible especie críptica en la costa oeste de Isla Norte

Una característica muy sobresaliente en todos los análisis es la divergencia entre SHEL y RAGL (región Costa Oeste Isla Norte) con las demás poblaciones. Esta diferenciación se muestra extremadamente significativa, con valores de F_{ST} entre SHEL y RAGL y las demás poblaciones todos superior 0,9 y representando además el primer quiebre en la estructura del LEA. La magnitud de la divergencia indica que estas dos poblaciones llevan una cantidad relevante de tiempo desconectadas de las demás, tratándose probablemente de una especie críptica. En otros estudios con SNPs se ha considerado valores de F_{ST} bastante menores que los encontrados en *A. chilense* como evidencia de diversidad críptica. En el caso del género *Mytilus* se observa una divergencia con un F_{ST} de 0,313 promedio entre *M. chilensis* y *M. platensis* (Zbawicka *et al.*, 2019), y en el isópodo neozelandés *Isocladus armatus* las poblaciones de Isla Norte separadas de Isla Sur con un F_{ST} de 0,6 se consideraron como especies cripticas (Wells y Dale, 2018). Por otra parte, en el caso de *A. chilense*, los quiebres genéticos del grupo SHEL y RAGL se corresponden con los quiebres biogeográficos que separan las costas oeste y este de Isla Norte, patrón también identificado en otras especies como el anfípodo *Paracorophium lucasi* (Schnabel *et al.*, 2010; Stevens y Hogg, 2004), la planta acuática *Zostera muelleri* (Jones *et al.*, 2008) y el quitón *Sypharochiton pelliserpentis* (Veale y Lavery, 2011). Hacia el extremo norte, se ha atribuido la divergencia a corrientes estacionales y regímenes actuales prevalentes de surgencia entre Spirit Bay y Shipwreck Bay (Stanton, 1973; Ridgway, 1980). No obstante, dado el grado de divergencia en *A. chilense*, se plantea la posibilidad de que este grupo fue aislado antes de las glaciaciones del Pleistoceno. Durante el Plioceno, los cambios tectónicos y climáticos configuraron la Isla Norte

de Nueva Zelanda como una colección de islas menores (Craw, 1988; Trewick y Bland, 2012). Sobre esto, se postula además una disminución de la conectividad entre estas islas a comienzos del Pleistoceno ligado a la bajada del nivel del mar (Stevens y Hogg, 2004), facultando así la especiación alopátrica de SHEL y RAGL durante estos períodos históricos. Además, el cierre del Estrecho de Cook durante los períodos de máximo avance glacial durante el Pleistoceno (Fleming, 1975; Alloway *et al.*, 2007) podría posteriormente haber aislado a RAGL y SHEL de la población PARE en el Estrecho de Cook Norte. Este escenario podría explicar el hecho de que el análisis *LEA* resalta la posible existencia de un muy leve rastro de introgresión (relacionado con un flujo génico histórico pero no actual) desde SHEL y RAGL hacia PARE y MOUT en el Estrecho de Cook. No obstante, este resultado podría ser también explicado por la existencia de alelos ancestrales todavía compartidos por ambos grupos de poblaciones.

5.2 Patrón de divergencia en congruencia con barreras biogeográficas

Con respecto a las demás poblaciones (es decir, excluyendo SHEL y RAGL), el patrón más prominente a gran escala es una divergencia desde Norte a Sur, con una fuerte diferenciación en Isla Norte de las poblaciones de la costa Noreste y Este; una diferenciación también relevante del Estrecho de Cook, que sin embargo muestra las costas de Isla Norte y de Isla Sur con significativa conexión; y una diferenciación más leve de las poblaciones el resto de Isla Sur, con una disminución relevante en la diversidad hacia la zona más austral. Existe también una fuerte divergencia Este-Oeste al nivel del Estrecho de Cook. Patrones de divergencia similares han sido descritos a través de múltiples taxa de amplia distribución en Nueva Zelanda y vinculado a

múltiples fenómenos oceanográficos, incluyendo turbulencias fuertes, remolinos y surgencias (Ross *et al.*, 2009; Apte y Gardner, 2002; Apte *et al.*, 2003; Ayers y Waters, 2005).

Un primer quiebre Norte-Sur ocurre entre las poblaciones más septentrionales de Isla Norte (AHUR, WITI y OHOP) con las demás, en congruencia con los límites de la región biogeográfica del Estrecho de Cook Norte. Sobre este límite se ha descrito la fuerte influencia del Wairarapa Eddy y de la East Cape Current, que limitan el intercambio de propágulos (Chiswell y Roemmich, 1998; Chiswell y Booth, 1999; de Lange, 2003; Ross *et al.*, 2009). Dentro del mencionado grupo septentrional se encontró a su vez una diferenciación importante entre la costa Noreste (en donde se encuentran WITI y OHOP) con la costa Este (AHUR). Esta discontinuidad ha sido reportada en la zona de East Cape por muchos estudios (Stevens y Hogg, 2004; Waters y Roy 2004; Ayers y Waters, 2005; Zuccarello y Martin, 2016) y clasificada como límite biogeográfico (revisados en Ross *et al.*, 2009; Shears *et al.*, 2008), siendo principalmente atribuida al efecto del East Cape Eddy, que captura la corriente East Auckland y la empuja mar adentro (Stanton *et al.*, 1997). No obstante, otros estudios, principalmente en peces (Francis, 1996; Roberts y Stewart, 2006), han identificado esta discontinuidad más bien como una zona de transición, apuntado a que no se ha estudiado realmente su causa precisa.

La divergencia en *A. chilense* está también marcada por dos puntos de quiebre en los límites Este y Oeste de la región del Estrecho de Cook Sur. Hacia el Este, en el límite con la región de la Costa Oeste de Isla Sur, se observa una transición desde el grupo genético de MOUT y WAIN (Estrecho de Cook Sur) al de OKAR (Costa Oeste de Isla Sur), con un cierto grado de admixtura. En esta zona, sobre Farewell Spit, cabe destacar que tanto en la estrella de mar

Patiriella regularis como en *A. chilense* se observó un quiebre genético (Ayers y Waters, 2005). A la altura del Farewell Spit, existe una intensa surgencia costera con movimiento de aguas mar adentro (Shlrlcliffe *et al.*, 1990), que tiene capacidad de interrumpir el flujo de propágulos en el área (Bradford-Grieve *et al.*, 1993). No obstante, también se ha indicado que la misma hidrología de la surgencia podría estar promoviendo la mezcla y dispersión de propágulos a distintas áreas del Estrecho de Cook, siendo más bien un factor que comunica las costas Norte y Sur del estrecho, y en menor medida con la costa Oeste de Isla Sur, aunque el efecto varía según la naturaleza del propágulo (movilidad y duración, por ejemplo; Ross *et al.*, 2009; Shanks y Brinks, 2005). A priori, esto podría explicar el patrón de continuidad observado entre ambas costas del Estrecho de Cook (entre PARE, MOUT y WAIN), y que también ha sido observado en otras especies como *Patiriella regularis* (Ayers y Waters, 2005) o en el complejo *Lessonia variegata* (Zuccarello y Martin, 2016). Hacia el Oeste, en el límite de la región del Estrecho de Cook Sur con la de Costa Oeste de Isla Sur, se observa un quiebre marcado entre MOMO y BRIG. Esta divergencia ha sido descrita consistentemente en múltiples especies como el quitón *Sypharochiton palliserpentis*, la estrella de mar *Patiriella regularis* y el mejillón *Perna canaliculus* (Veale y Lavery, 2011; Ayers y Waters, 2004; Apte y Gardner, 2002). Aunque se han descrito en esta zona, de Cloudy/Clifford Bay, surgencias como barreras significativas a la dispersión, se ha señalado también que estas son muy recientes (posterior a la última glaciación) y podrían no ser la causa histórica de la divergencia genética, apuntando a la existencia de fenómenos paleoceanográficos aún desconocidos en esta región (Goldstien *et al.*, 2006).

5.3 Efecto de la última glaciación en las poblaciones australes de Isla Sur, evidencia de recolonización postglacial

Considerando la Isla Sur sin tomar en cuenta las poblaciones del Estrecho de Cook, los análisis revelan un patrón de subestructura más bien distinto a los previamente analizados, caracterizado por una baja diversidad en comparación a la Isla Norte, decreciente hacia latitudes mayores, con un patrón de continuidad genética bordeando la costa sur desde OKAR (Costa Oeste de Isla Sur) hasta BRIG (Costa Este de Isla Sur). En relación a la baja diversidad en la Isla Sur, sobre todo en las poblaciones más australes (RIVE, STEW y HINA), se postula que esta podría deberse a temperaturas por debajo el nivel de tolerancia de *A. chilense* durante el Último Máximo Glacial, generando una total extirpación de estas poblaciones de la zona. De acuerdo a estudios de la fisiología de *A. chilense*, esta tiene una tolerancia mínima de temperatura de 5°C, no encontrándose naturalmente en zonas con temperaturas promedio menores (Bird *et al.*, 1986). Se ha reportado también que las poblaciones naturales de la especie muestran un crecimiento y actividad óptimos a 15°C, decreciendo bastante en rendimiento ya a los 10°C (Uzandizaga *et al.*, 2019). Durante el Último Máximo Glacial, las temperaturas superficiales promedio de las aguas bajaron a 4°C promedio anual por debajo de los 45°S aproximadamente (Barrows y Juggins, 2005). Además, la población CASS (Fiordland) se encuentra en una zona costera que fue completamente cubierta por el avance glaciar durante el UMG (Trewick y Bland, 2012). Los análisis realizados muestran a CASS en una posición intermedia en relación a poblaciones directamente al norte (OKAR y WAIN) y sur (RIVE, STEW y HINA), con una clara señal de admixtura entre los dos grupos genéticos presentes en la región. Se propone que, posterior al

retiro de los hielos y el aumento de las temperaturas, se habría iniciado una rápida recolonización al extremo sur desde la costa Este (OTAG) y hacia Fiordland desde la costa Oeste (OKAR). La población mixta de CASS correspondería entonces a una región de contacto secundario entre los dos grupos genéticos. Las señales genéticas observadas en *A. chilense* siguen las predicciones tradicionales de los modelos de refugio glacial: baja diversidad genética en áreas previamente glaciadas y mayor diversidad en los refugios, incluyendo diversidad de alelos privados (Maggs *et al.*, 2008). Por otra parte, un patrón similar de diversidad decreciente hacia el sur de Nueva Zelanda, que ha sido atribuido a un retiro de las poblaciones durante el UMG por el avance glaciar y la disminución de la temperatura más una posterior expansión de rango a latitudes altas en conjunto al calentamiento postglacial, ha sido descrito para el alga roja *Bostriochia intricata* (Muangmai *et al.*, 2015) y el pasto marino *Carpophyllum maschalocarpum* (Buchanan y Zuccarello, 2012).

5.4 Zona de origen de la colonización transoceánica de Isla Chatham

Un último punto de interés respecta a la población CHIS de Isla Chatham. Previamente, Guillemin *et al.* (2014) determinaron el origen de esta población de *A. chilense* desde la costa Este de Nueva Zelanda. Ampliando estos resultados, los análisis llevados a cabo en el actual trabajo permiten avanzar en la discusión sobre la procedencia de la Isla Chatham, aunque subsiste bastante incertidumbre. En primer lugar, CHIS muestra los menores valores de F_{ST} con las poblaciones WITI y OHOP (Noreste de Isla Norte, $F_{ST} < 0.6$) y PARE (Estrecho de Cook Norte, $F_{ST} < 0.7$), mientras que se distancia bastante más de las demás poblaciones ($F_{ST} > 0.7$). El

Neighbor-Net muestra la población de CHIS colindante a las poblaciones de Isla Norte AHUR y PARE, diferenciándose moderadamente desde una rama única bien definida. Por su parte, el *LEA* no indica un origen claro, mostrando más bien una señal conflictiva entre grupos que agrupan poblaciones tanto del Norte como del Sur.

Considerando estos resultados en su conjunto, parece probable un origen desde la costa Este de la Isla Norte de Nueva Zelanda, desde una población ancestral más relacionada a la actual de AHUR. Esta conectividad estaría facultada por la East Cape Current, que desde su origen en el Tasman Sea, se acopla a la costa Este de la Isla Norte de Nueva Zelanda, recirculando luego en torno al Wairarapa Eddy para fluir finalmente hacia el Este por el flanco Norte del Chatham Rise (Chiswell, 2009). Un escenario de colonización muy similar se ha reportado para el quitón neozelandés *Sypharochiton pelliserpentis*, sobre el que describe una colonización remota en el tiempo desde la costa Este de Isla Norte (Veale y Lavery, 2011). No obstante, se ha demostrado que prácticamente toda la costa Este de Nueva Zelanda, desde la costa más Noreste (en donde se encuentran WITI y OHOP) hasta el extremo Sur (RIVE, HINA y STEW), tiene una potencial conectividad hacia Isla Chatham -en el caso de la Isla Sur, debido al fluir de la Southland Current por la costa este hacia el flanco sur de Chatham Rise- (Chiswell y Rickard, 2011). De hecho, en el alga *Carpophyllum maschalocarpum* se ha descrito la presencia de cuatro haplotipos en la Isla Chatham, provenientes de distintas regiones de la Isla Norte y Sur de Nueva Zelanda (Buchaman y Zuccarello, 2012). Los tiempos de dispersión hacia Isla Chatham desde Nueva Zelanda, tomando en cuenta la existencia de un mecanismo de dispersión vía rafting transoceánico

facilitado por acople a algas flotantes (Thiel y Gutow, 2005), rondan los 100 días (Chiswell y Rickard, 2011).

5.5 Conclusión

En conclusión, el análisis de la estructura genética en *Agarophyton chilense* a lo largo de toda la costa de Nueva Zelanda e Isla Chatham confirma que el ddRADseq es una herramienta poderosa y apropiada para las preguntas biogeográficas a gran escala. Este método proveyó un nivel muy satisfactorio de polimorfismo entre los loci recuperados, alcanzando una resolución muy fina con estructura genética demostrada incluso entre sitios con escasa diversidad. Al comparar con el estudio anterior en *A. chilense*, basado en secuencias del gen nuclear ITS2 y cinco microsatélites (Guillemin *et al.*, 2014), se aprecia que la resolución lograda no sólo muestra un patrón de estructuración similar, si no que entrega detalles de subestructura a escalas muy locales, dentro de las regiones biogeográficas.

En gracia de lo anterior, se logró demostrar efectivamente la estrecha relación que existe entre el patrón de diversidad y estructuración genética de *A. chilense* con el esquema de regionalización biogeográfica propuesto para Nueva Zelanda. En particular, los quiebres genéticos encontrados en *A. chilense* reflejan una compleja influencia tanto de procesos oceanográficos contemporáneos (corrientes, remolinos y surgencias) como de eventos geológicos pasados (glaciaciones, cambios en el nivel del mar y de la línea costera) en las zonas de límite entre regiones biogeográficas. En relación a ello, este estudio sirve de evidencia para el perfeccionamiento de los esquemas de regionalización biogeográfica de Nueva Zelanda,

poniendo también en énfasis la necesidad de investigar a fondo las causas concretas que han conducido a la diferenciación de su biodiversidad costera.

Finalmente, a partir de los resultados y análisis entregados, se abre la perspectiva de profundizar en los fenómenos que han dado forma al patrón de estructuración genética de *A. chilense* en Nueva Zelanda, y arrojar más luz sobre su historia evolutiva. Algunos ejemplos serían dilucidar los tiempos de divergencia entre los grupos de poblaciones, para evaluar la relevancia de eventos históricos o fenómenos contemporáneos en los quiebres genéticos; identificar loci outliers para determinar el rol de la selección y la deriva sobre el patrón de estructuración actual; o evaluar la convergencia entre modelos oceanográficos, migración de propágulos en el mar y taza de migración entregada por datos genéticos. Para esto, el presente estudio se establece como un mapa sobre el que planificar futuras y más profundas investigaciones en *A. chilense*.

6. LITERATURA CITADA

- Agapow, P.-M., Burt, A. (2001). Indices of multilocus linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Notes*, 1(1–2), 101–102. <https://doi.org/10.1046/j.1471-8278.2000.00014.x>
- Alloway, B. V., Lowe, D. J., Barrell, D. J. A., Newnham, R. M., Almond, P. C., Augustinus, P. C., Bertler, N. A. A., Carter, N., Litchfield, N. J., McGlone, M. S., Shulmeister, J., Vandergles, M. J., Williams, P. W. (2007). Towards a climate event stratigraphy for New Zealand over the past 30 000 years (NZ-INTIMATE project). *Journal of Quaternary Science*, 22(1), 9–35. <https://doi.org/10.1002/jqs.1079>
- 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. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2002.01554.x>
- Apte, S., Star, B., Gardner, J. P. (2003). A comparison of genetic diversity between cultured and wild populations, and a test for genetic introgression in the New Zealand greenshell mussel *Perna canaliculus* (Gmelin 1791). *Aquaculture*, 219(1–4), 193–220. [https://doi.org/10.1016/S0044-8486\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0044-8486(03)00003-6)
- Arakaki, N., Schmidt, W. E., Carbajal, P., Fredericq, S. (2015). First occurrence of *Gracilaria chilensis*, and distribution of *Gracilariaopsis lemaneiformis* (Gracilariaeae, Gracilariales) in Peru on the basis of rbcL sequence analysis. *Phytotaxa*, 208(2), 175. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.208.2.7>
- Ayers, K. L., Waters, J. M. (2005). Marine biogeographic disjunction in central New Zealand. *Marine Biology*, 147(4), 1045–1052. <https://doi.org/10.1007/s00227-005-1632-7>
- Barrows, T. T., Juggins, S. (2005). Sea-surface temperatures around the Australian margin and Indian Ocean during the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 24(7–9), 1017–1047. <https://doi.org/10.1016/j.quascirev.2004.07.020>
- Beu, A. G., Edwards, A. R. (1984). New Zealand Pleistocene and late Pliocene glacio-eustatic cycles. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 46(1–3), 119–142. [https://doi.org/10.1016/0031-0182\(84\)90030-0](https://doi.org/10.1016/0031-0182(84)90030-0)

- Bivand, R., Keitt, T., Rowlingson, B. (2020). *rgdal: Bindings for the ‘Geospatial’ Data Abstraction Library*. Recuperado de <https://CRAN.R-project.org/package=rgdal>
- Bivand, R., Rundel, C. (2020). *rgeos: Interface to Geometry Engine – Open Source ('GEOS')*. <https://CRAN.R-project.org/package=rgeos>
- Bird, C. J., McLachlan, J., Oliveira, E. C. de. (1986). *Gracilaria chilensis* sp.nov. (Rhodophyta, Gigartinales), from Pacific South America. *Canadian Journal of Botany*, 64(12), 2928–2934. <https://doi.org/10.1139/b86-387>
- Boo, G. H., Mansilla, A., Nelson, W., Bellgrove, A., Boo, S. M. (2014). Genetic connectivity between trans-oceanic populations of *Capreolia implexa* (Gelidiales, Rhodophyta) in cool temperate waters of Australasia and Chile. *Aquatic Botany*, 119, 73–79. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.08.004>
- Bradford-Grieve, J. M., Murdoch, R. C., Chapman, B. E. (1993). Composition of macrozooplankton assemblages associated with the formation and decay of pulses within an upwelling plume in greater Cook Strait, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 27(1), 1–22. <https://doi.org/10.1080/00288330.1993.9516541>
- Brasher, D. J., Ovenden, J. R., Booth, J. D., White, R. W. G. (1992). Genetic subdivision of Australian and New Zealand populations of *Jasus verreauxi* (Decapoda: Palinuridae)—preliminary evidence from the mitochondrial genome. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 26(1), 53–58. <https://doi.org/10.1080/00288330.1992.9516499>
- Brockie, B. (2007). Native plants and animals – overview. Recuperado 2 de julio de 2019, de Te Ara - the Encyclopedia of New Zealand website: <https://teara.govt.nz/en/native-plants-and-animals-overview/print>
- Bryant, D. (2003). Neighbor-Net: An Agglomerative Method for the Construction of Phylogenetic Networks. *Molecular Biology and Evolution*, 21(2), 255–265. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh018>
- Buchanan, J., Zuccarello, G. C. (2012). Decoupling of short- and long-distance dispersal pathways in the endemic New Zealand seaweed *Carpophyllum maschalocarpum* (Phaeophyceae, Fucales). *Journal of Phycology*, 48(3), 518–529. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2012.01167.x>
- Butler, E. C. V., Butt, J. A., Lindstrom, E. J., Teldesley, P. C., Pickmere, S., Vincent, W. F. (1992). Oceanography of the Subtropical Convergence Zone around southern New Zealand. *New*

Zealand Journal of Marine and Freshwater Research, 26(2), 131–154.
<https://doi.org/10.1080/00288330.1992.9516509>

Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. *G3 (Bethesda, Md.)*, 1(3), 171–182. <https://doi.org/10.1534/g3.111.000240>

Chiswell, S. (2009). Colonisation and connectivity by intertidal limpets among New Zealand, Chatham and Sub-Antarctic Islands. II. Oceanographic connections. *Marine Ecology Progress Series*, 388, 121–135. <https://doi.org/10.3354/meps08167>

Chiswell, S., Booth, J. (1999). Rock lobster *Jasus edwardsii* larval retention by the Wairarapa Eddy off New Zealand. *Marine Ecology Progress Series*, 183(July 1999), 227–240. <https://doi.org/10.3354/meps183227>

Chiswell, S. M., Rickard, G. J. (2011). Larval connectivity of harbours via ocean currents: A New Zealand study. *Continental Shelf Research*, 31(10), 1057–1074. <https://doi.org/10.1016/j.csr.2011.03.012>

Chiswell, S. M., Roemmich, D. (1998). The East Cape Current and two eddies: A mechanism for larval retention? *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32(3), 385–397. <https://doi.org/10.1080/00288330.1998.9516833>

Cohen, S., Faugeron, S., Martínez, E. A., Correa, J. A., Viard, F., Destombe, C., Valero, M. (2004). Molecular identification of two sibling species under the name *Gracilaria chilensis* (Rhodophyta, Gracilariales). *Journal of Phycology*, 40(4), 742–747. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2004.03203.x>

Craw, R. (1988). Continuing the Synthesis Between Panbiogeography, Phylogenetic Systematics and Geology as Illustrated by Empirical Studies on the biogeography of New Zealand and the Chatham Islands. *Systematic Biology*, 37(3), 291–310. <https://doi.org/10.1093/sysbio/37.3.291>

Department of Conservation, Ministry of Fisheries. (2011). *Coastal marine habitats and marine protected areas in the New Zealand Territorial Sea: a broad scale gap analysis*. Wellington, New Zealand.

Destombe, C., Godin, J., Lefebvre, C., Dehorter, O., Vernet, P. (1992). Differences in Dispersal Abilities of Haploid and Diploid Spores of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Botanica Marina*, 35(2), 93–98. <https://doi.org/10.1515/botm.1992.35.2.93>

- Destombe, Christophe, Godin, J., Remy, J.-M. (1990). Viability and dissemination of spermatia of *Gracilaria verrucosa* (Gracilariales, Rhodophyta). *Hydrobiologia*, 204–205(1), 219–223. <https://doi.org/10.1007/BF00040237>
- Dillehay, T. D., Ramirez, C., Pino, M., Collins, M. B., Rossen, J., Pino-Navarro, J. D. (2008). Monte Verde: Seaweed, Food, Medicine, and the Peopling of South America. *Science*, 320(5877), 784–786. <https://doi.org/10.1126/science.1156533>
- Dray, S., Dufour, A.-B. (2007). The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists. *Journal of Statistical Software*, 22(4). <https://doi.org/10.18637/jss.v022.i04>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>
- Fleming, C. A. (1975). Biogeography and Ecology in New Zealand. En G. Kuschel (Ed.), *The Journal of Animal Ecology*. <https://doi.org/10.1007/978-94-010-1941-5>
- Francis, M. P. (1996). Geographic distribution of marine reef fishes in the New Zealand region. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 30(1), 35–55. <https://doi.org/10.1080/00288330.1996.9516695>
- Fraser, C. I., Zuccarello, G. C., Spencer, H. G., Salvatore, L. C., Garcia, G. R., Waters, J. M. (2013). Genetic Affinities between Trans-Oceanic Populations of Non-Buoyant Macroalgae in the High Latitudes of the Southern Hemisphere. *PLoS ONE*, 8(7), e69138. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069138>
- Goldstein, S. J., Schile, D. R., Gemmell, N. J. (2006). Comparative phylogeography of coastal limpets across a marine disjunction in New Zealand. *Molecular Ecology*, 15(11), 3259–3268. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02977.x>
- Guillemin, M.-L., Faugeron, S., Destombe, C., Viard, F., Correa, J. A., Valero, M. (2008). Genetic variation in wild and cultivated populations of the haploid-diploid red alga *Gracilaria chilensis*: how farming practices favor asexual reproduction and heterozygosity. *Evolution*, 62(6), 1500–1519. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2008.00373.x>
- Guillemin, M.-L., Valero, M., Faugeron, S., Nelson, W., Destombe, C. (2014). Tracing the Trans-Pacific Evolutionary History of a Domesticated Seaweed (*Gracilaria chilensis*) with Archaeological and Genetic Data. *PLoS ONE*, 9(12), e114039. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114039>

- Gurgel, C. F. D., Norris, J. N., Schmidt, W. E., Le, H. N., Fredericq, S. (2018). Systematics of the Gracilariales (Rhodophyta) including new subfamilies, tribes, subgenera, and two new genera, Agarophyton gen. nov. and Crassa gen. nov. *Phytotaxa*, 374(1), 1. <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.374.1.1>
- Heath, R. A. (1972). Oceanic upwelling produced by northerly winds on the north Canterbury coast, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 6(3), 343–351. <https://doi.org/10.1080/00288330.1972.9515429>
- Hijmans, R. J. (2020). *raster: Geographic Data Analysis and Modeling*. Recuperado de <https://cran.r-project.org/package=raster>
- Hoek, C. (1987). The possible significance of long-range dispersal for the biogeography of seaweeds. *Helgoländer Meeresuntersuchungen*, 41(3), 261–272. <https://doi.org/10.1007/BF02366191>
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24(11), 1403–1405. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btn129>
- Jones, T. C., Gemmill, C. E. C., Pilditch, C. A. (2008). Genetic variability of New Zealand seagrass (*Zostera muelleri*) assessed at multiple spatial scales. *Aquatic Botany*, 88(1), 39–46. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2007.08.017>
- Kain, J. M., Destombe, C. (1995). A review of the life history, reproduction and phenology of Gracilaria. *Journal of Applied Phycology*, 7(3), 269–281. <https://doi.org/10.1007/BF00004001>
- Kamvar, Z. N., Tabima, J. F., Grünwald, N. J. (2014). Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ*, 2, e281. <https://doi.org/10.7717/peerj.281>
- Kloepper, T. H., Huson, D. H. (2008). Drawing explicit phylogenetic networks and their integration into SplitsTree. *BMC Evolutionary Biology*, 8(1), 22. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-22>
- Knaus, B. J., Grünwald, N. J. (2017). vcfr: a package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 44–53. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12549>

- Lange, W. de, Bell, R., Reid, S. (2003). Physical Oceanography of Physical Oceanography of. En J. R. Goff, S. L. Nichol, & H. L. Rouse (Eds.), *Physical Oceanography* (1st Editio, p. 312). Palmerston North, New Zealand: Dunmore Press.
- Lischer, H. E. L., Excoffier, L. (2012). PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. *Bioinformatics*, 28(2), 298–299. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642>
- Macaya, E. C., López, B., Tala, F., Tellier, F., Thiel, M. (2016). Float and Raft: Role of Buoyant Seaweeds in the Phylogeography and Genetic Structure of Non-buoyant Associated Flora. En Z.-M. Hu & C. Fraser (Eds.), *Seaweed Phylogeography* (p. 395). <https://doi.org/10.1007/978-94-017-7534-2>
- Maggs, C. A., Castilho, R., Foltz, D., Henzler, C., Jolly, M. T., Kelly, J., ... Wares, J. (2008). Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology*, 89(sp11), S108–S122. <https://doi.org/10.1890/08-0257.1>
- Mcleod, A. A. I. (2011). Package ‘Kendall’. Recuperado de <https://cran.r-project.org/package=Kendall>
- Meeûs, T., Balloux, F. (2004). Clonal reproduction and linkage disequilibrium in diploids: a simulation study. *Infection, Genetics and Evolution*, 4, 345-351. doi:10.1016/j.meegid.2004.05.002
- Ministry of Fisheries, Department of Conservation. (2008). *Marine Protected Areas: Classification, Protection Standard and Implementation Guidelines*. Wellington, New Zealand.
- Mortimer, N., van den Bogaard, P., Hoernle, K., Timm, C., Gans, P. B., Werner, R., Riefstahl, F. (2019). Late Cretaceous oceanic plate reorganization and the breakup of Zealandia and Gondwana. *Gondwana Research*, 65, 31–42. <https://doi.org/10.1016/j.gr.2018.07.010>
- Muangmai, N., Fraser, C. I., Zuccarello, G. C. (2015). Contrasting patterns of population structure and demographic history in cryptic species of *Bostrychia intricata* (Rhodomelaceae, Rhodophyta) from New Zealand. *Journal of Phycology*, 51(3), 574–585. <https://doi.org/10.1111/jpy.12305>
- Norton, T. A. (1992). Dispersal by macroalgae. *British Phycological Journal*, 27(3), 293–301. <https://doi.org/10.1080/00071619200650271>

- Ovenden, J. R., Brasher, D. J., White, R. W. G. (1992). Mitochondrial DNA analyses of the red rock lobster *Jasus edwardsii* supports an apparent absence of population subdivision throughout Australasia. *Marine Biology*, 112(2), 319–326. <https://doi.org/10.1007/BF00702478>
- Pabesma, E. (2005). Classes and methods for spatial data in R. *R News* 5(2). Recuperado de <https://cran.r-project.org/doc/Rnews/>
- Pabesma, E. (2018). Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data. *The R Journal* 10(1), 439-446. <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009>
- Paradis, E. (2010). pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. *Bioinformatics*, 26(3), 419–420. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp696>
- Paris, J. R., Stevens, J. R., Catchen, J. M. (2017). Lost in parameter space: a road map for "stacks". *Methods in Ecology and Evolution*, 8(10), 1360–1373. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12775>
- Peakall, R., Smouse, P. E. (2012). GenALEX 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. *Bioinformatics*, 28(19), 2537–2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Peterson, B. K., Weber, J. N., Kay, E. H., Fisher, H. S., Hoekstra, H. E. (2012). Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS one*, 7(5), e37135. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945–959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037135>
- R Core Team. (2019). *R: A language and environment for statistical*. Recuperado de <https://www.r-project.org/>
- Ridgway, N. M. (1980). Hydrological conditions and circulation off the west coast of the North Island, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 14(2), 155–167. <https://doi.org/10.1080/00288330.1980.9515857>
- Roberts, C. D., Stewart, A. L. (2006). Diversity and biogeography of coastal fishes of the East Cape Region of New Zealand. En *Science for Conservation* (Vol. 260). Wellington, New Zealand: Science & Technical Publishing.

- Ross, N. 2020. *fasterize: Fast Polygon or Raster Conversion*. Recuperado de <https://CRAN.R-project.org/package=fasterize>
- Ross, P. M., Hogg, I. D., Pilditch, C. A., Lundquist, C. J. (2009). Phylogeography of New Zealand's coastal benthos. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 43(5), 1009–1027. <https://doi.org/10.1080/00288330.2009.9626525>
- Ross, Philip M., Hogg, I. D., Pilditch, C. A., Lundquist, C. J., Wilkins, R. J. (2012). Population Genetic Structure of the New Zealand Estuarine Clam *Austrovenus stutchburyi* (Bivalvia: Veneridae) Reveals Population Subdivision and Partial Congruence with Biogeographic Boundaries. *Estuaries and Coasts*, 35(1), 143–154. <https://doi.org/10.1007/s12237-011-9429-z>
- Rousset, François. (2008). genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8(1), 103–106. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01931.x>
- Rousset, Frangois. (1996). Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics*, 142(4), 1357–1362. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8846911>
- Santelices, B. (1990). Patterns of Reproduction, Dispersal and Recruitment in Seaweeds (2). *Oceanography and Marine Biology Annual Review*, 28, 177–276.
- Schiel, D. R., Nelson, W. A. (1990). The harvesting of macroalgae in New Zealand. *Hydrobiologia*, 204–205(1), 25–33. <https://doi.org/10.1007/BF00040211>
- Schnabel, K. E., Hogg, I. D., Chapman, M. A. (2000). Population genetic structures of two New Zealand corophiid amphipods and the presence of morphologically cryptic species: Implications for the conservation of diversity. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 34(4), 637–644. <https://doi.org/10.1080/00288330.2000.9516964>
- Shanks, A., Brink, L. (2005). Upwelling, downwelling, and cross-shelf transport of bivalve larvae: test of a hypothesis. *Marine Ecology Progress Series*, 302(November 2005), 1–12. <https://doi.org/10.3354/meps302001>
- Sharples, J., Greig, M. J. N. (1998). Tidal currents, mean flows, and upwelling on the north-east shelf of New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 32(2), 215–231. <https://doi.org/10.1080/00288330.1998.9516821>

- Shears, N. T., Smith, F., Babcock, R. C., Duffy, C. A. J., Villouta, E. (2008). Evaluation of Biogeographic Classification Schemes for Conservation Planning: Application to New Zealand's Coastal Marine Environment. *Conservation Biology*, 22(2), 467–481. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2008.00882.x>
- Shlrlcliffe, T. G. L., Moore, M. I., Cole, A. G., Viner, A. B., Baldwin, R., Chapman, B. (1990). Dynamics of the Cape Farewell upwelling plume, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 24(4), 555–568. <https://doi.org/10.1080/00288330.1990.9516446>
- Smith, P. J., McKoy, J. L., Machin, P. J. (1980). Genetic variation in the rock lobsters *Jasus edwardsii* and *Jasus novaehollandiae*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 14(1), 55–63. <https://doi.org/10.1080/00288330.1980.9515843>
- Stanton, B R. (1973). Hydrological investigations around northern New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 7(1–2), 85–110. <https://doi.org/10.1080/00288330.1973.9515457>
- Stanton, Basil R, Sutton, P. J. H., Chiswell, S. M. (1997). The East Auckland Current, 1994–95. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 31(4), 537–549. <https://doi.org/10.1080/00288330.1997.9516787>
- Stevens, M. I., Hogg, I. D. (2004). Population genetic structure of New Zealand's endemic corophiid amphipods: evidence for allopatric speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(1), 119–133. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2004.00270.x>
- Stilwell, J. D., Consoli, C. P. (2012). Tectono-stratigraphic history of the Chatham Islands, SW Pacific—The emergence, flooding and reappearance of eastern ‘Zealandia’. *Proceedings of the Geologists' Association*, 123(1), 170–181. <https://doi.org/10.1016/j.pgeola.2011.06.003>
- Team, Rs. (2015). *RStudio: Integrated Development for R*. Recuperado de <http://www.rstudio.com/>
- Thiel, M., Gutow, L. (2005). The Ecology of Rafting in the Marine Environment. II. the Rafting Organisms and Community. En J. D. M. G. R. N. Gibson, R. J. A. Atkinson (Ed.), *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* (1st Editio, pp. 279–418). <https://doi.org/10.1201/9781420037449.ch7>
- Thomas, L. (2012). Population Genetics of the Red Rock Lobster, *Jasus edwardsii*. *A thesis submitted to the Victoria University of Wellington in partial fulfilment of the requirements for*

the degree of Master of Science in Marine Biology. Victoria University of Wellington, Wellington, New Zealand.

- Trewick, S., Bland, K. (2012). Fire and slice: palaeogeography for biogeography at New Zealand's North Island/South Island juncture. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 42(3), 153–183. <https://doi.org/10.1080/03036758.2010.549493>
- Usandizaga, S., Camus, C., Kappes, J. L., Guillemin, M.-L., Buschmann, A. H. (2019). Effect of temperature variation in *Agarophyton chilensis*: contrasting the response of natural and farmed populations. *Journal of Applied Phycology*, 31(4), 2709–2717. <https://doi.org/10.1007/s10811-019-1757-6>
- Veale, A. J., Lavery, S. D. (2011). Phylogeography of the snakeskin chiton *Sypharochiton pelliserpentis* (Mollusca: Polyplacophora) around New Zealand: are seasonal near-shore upwelling events a dynamic barrier to gene flow? *Biological Journal of the Linnean Society*, 104(3), 552–563. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01743.x>
- 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02635.x>
- Waters, J. M., Roy, M. S. (2004). Phylogeography of a high-dispersal New Zealand sea-star: does upwelling block gene-flow? *Molecular Ecology*, 13(9), 2797–2806. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02282.x>
- Wells, S. J., Dale, J. (2018). Contrasting gene flow at different spatial scales revealed by genotyping-by-sequencing in *Isocladus armatus*, a massively colour polymorphic New Zealand marine isopod. *PeerJ*, 6, e5462. <https://doi.org/10.7717/peerj.5462>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd Editio). Recuperado de <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Zbawicka, M., Gardner, J. P. A., Wenne, R. (2019). Cryptic diversity in smooth-shelled mussels on Southern Ocean islands: connectivity, hybridisation and a marine invasion. *Frontiers in Zoology*, 16(1), 32. <https://doi.org/10.1186/s12983-019-0332-y>
- Zuccarello, G. C., Martin, P. (2016). Phylogeography of the *Lessonia variegata* species complex (Phaeophyceae, Laminariales) in New Zealand. *ALGAE*, 31(2), 91–103. <https://doi.org/10.4490/algae.2016.31.4.15>