



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**DELIMITACIÓN DE UNIDADES EVOLUTIVAMENTE
SIGNIFICATIVAS EN *PARASTACUS PUGNAX*
(POEPPIG, 1835)**



Tesis pregrado de Biología.

**HUMBERTO JAVIER GODOY ARTEAGA
CONCEPCIÓN - CHILE
2020**

Profesor Guía: Dr. Pedro Victoriano Sepúlveda
Departamento de Zoología
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Universidad de Concepción

Agradecimientos

Se agradece principalmente a mi familia por el apoyo incondicional en estos años de formación universitaria.

Se hace mención especial a los participantes en la realización de este estudio, en específico a Lorena Rivera, Melissa Pincheira, Dr. Christian Muñoz-Escobar y el Dr. Pedro Victoriano, los cuales han aportado en mi formación y aprendizaje tanto de manera personal mediante el apoyo y simpatía, como en el aspecto académico proporcionándome la información y herramientas necesarias.

Se agradece también al proyecto FONDECYT 1161650 para realización de este estudio.



INDICE

RESUMEN	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCION	6
OBJETIVO GENERAL.....	12
OBJTIVOS ESPECIFICOS.....	12
METODOLOGÍA.....	13
TOMA DE MUESTRAS	13
EXTRACCION Y AMPLIFICACIÓN	14
ANALISIS DE SECUENCIAS.....	14
MORFOMETRIA GEOMETRICA	15
RESULTADOS	19
ANALISIS GENETICOS.....	19
MORFOMETRIA GEOMETRICA	21
DISCUSION.....	24
BIBLIOGRAFIA.....	27
ANEXO	34

RESUMEN

Parastacus pugnax (Poepig, 1835), conocida comúnmente como “camarón de vega”, es una especie endémica de Chile y se encuentra distribuido entre las regiones de Valparaíso y de la Araucanía. Esta especie es poco vágil y se distribuye en hábitats de vegas altamente disgregadas y con reducida conectividad. Este crustáceo se encuentra actualmente amenazado por la fragmentación de su hábitat y la extracción para el consumo humano. Por tanto, es necesario identificar unidades prioritarias de conservación para mantener la diversidad intraespecífica de esta especie. Las Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) se definen como aquellas poblaciones que presentan monofilia recíproca entre áreas, basadas en alelos de ADN mitocondrial. Cada ESU es considerada como una unidad prioritaria de conservación intraespecífica, con el fin de asegurar el potencial evolutivo dentro de una especie. Tales unidades definidas genéticamente debieran ser además justificadas a partir de evidencia morfológica y ecológica. El presente proyecto contempló la delimitación de ESUs de *P. pugnax*, identificando monofilias recíprocas en una genealogía mitocondrial (gen COI) mediante un análisis de inferencia bayesiana. Además, se exploró la variación morfológica, en quelas y cefalotórax por medio de morfometría geométrica, realizando análisis de variantes canónicas, con el fin de evaluar el patrón de asociación genealogía-forma. Los resultados obtenidos permitieron la evaluación a 3 escalas genealógicas para la asignación de ESUs, poniendo énfasis en aquella escala que presentó congruencias entre los datos genéticos y morfométricos, delimitando 3 ESUs. Se discute acerca de las implicancias de los resultados en términos de la filogeografía de la especie y su conservación.

FONDECYT 1161650

Palabras clave: Unidades Evolutivamente Significativas, Camarón de vega, Conservación, ESUs, Morfometría Geométrica.

ABSTRACT

Parastacus pugnax (Poëppig, 1835), known as "vega shrimp", is an endemic species in Chile and is distributed between the Valparaíso and Araucanía regions. This species has reduced vagility and is distributed in highly disaggregated swamp habitats with reduced connectivity. This crustacean is currently threatened by the fragmentation of its habitat and extraction for human consumption. Therefore, it is necessary to identify priority conservation units to maintain the intraspecific diversity of this species. Evolutionarily Significant Units (ESU) are defined as certain populations that exhibit reciprocal monophilia between areas, based on alleles of mitochondrial DNA. Each ESU is like a priority unit of intraspecific conservation, in order to guarantee the evolutionary potential within a species. Such genetically defined units should also be justified from morphological and ecological evidence. The present project contemplated the delimitation of *P. pugnax* ESUs, identifying reciprocal monophily in a mitochondrial genealogy (COI gene) through a Bayesian inference analysis. In addition, morphological variation was explored, in chelae and cephalothorax through geometric morphometry analysis of canonical variations, in order to evaluate the pattern of genealogy-shape association. The results obtained allowed the evaluation to 3 genealogical scales for the allocation of ESU, highlighting in that scale that presented congruencies between the genetic and morphometric data, delimiting 3 ESU. The implications of the results in terms of the phylogeography of the species and its conservation are discussed.

FONDECYT 1161650

Keywords: Evolutionary Significant Units, burrowing crayfish, Conservation, ESUs, Geometric Morphometry.

INTRODUCCION

El concepto de biodiversidad abarca tres niveles jerárquicos (Lovejoy 1980): el ecosistémico, referido a las interacciones de las especies con su ambiente y la diversidad de comunidades que existen; el específico, que consiste en la pluralidad de linajes que evolucionan independientemente; y el nivel genético, que comprende la variedad de genes entre individuos de una especie. Con respecto a este último nivel jerárquico, la diversidad genética ya sea en cualquiera de sus atributos (*i.e.* composición, estructura o función) debe ser considerada en los planes de conservación, debido a que representa la fuente y base para la variación de los niveles jerárquicos superiores (Noss 1990). La variabilidad genética tiene como principal origen las mutaciones; sin embargo, fuerzas naturales como la selección natural, el efecto fundador, la deriva génica y el flujo génico son las que modulan las frecuencias alélicas de una generación a otra dentro una población (Herrera-Paz 2013). Por otra parte, eventos extrínsecos mediados por procesos vicariantes (*e.g.* formación de barreras geográficas), modulan la la separación y/o aislamiento entre poblaciones lo cual modifica la estructura espacial de los linajes ancestrales o restringiendo el flujo génico entre poblaciones (Morrone 2008). Poblaciones aisladas y con baja variabilidad genética son más susceptibles a presiones de selección (ambientales, depredación, antrópicas, etc.), lo cual provoca una disminución en el número de individuos, y por ende, una reducción en la diversidad genética (Martínez-Abraín 2006). Este atributo de variabilidad genética es relevante dada su condición de supeditar el potencial de evolutivo de las poblaciones, ya que determinará si ciertas poblaciones sobreviven o se extinguen localmente producto de una determinada presión selectiva. Dado lo anterior, la diversidad genética dentro de especies (*i.e.* intraespecífica) es un tema recurrente en el ámbito de la conservación (Hughes 2008).

El conocimiento acerca de la diversidad genética de las poblaciones presentes en un ecosistema ayuda a direccionar medidas para la conservación de éstas, concentrándose en aquellas que puedan presentar importancia en el

mantenimiento de las funciones y servicios ecosistémicos (Oliver 1993). Una de las maneras de considerar y aplicar estos aspectos intrínsecos de las especies en determinados ambientes, es el uso de las Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), las cuales tienen como propósito reconocer poblaciones que han sido históricamente aisladas y posean un potencial adaptativo distinto (Moritz 1994). Por definición, las ESUs corresponden a poblaciones o linajes que poseen monofilias recíprocas asociadas a un área en particular (e.g. cuencas), considerando loci de ADN mitocondrial y que muestran una divergencia significativa de frecuencias alélicas en loci nucleares (Moritz 1994).

Tradicionalmente, las ESUs se delimitan a través de criterios geográficos, genéticos y/o morfológicos, los cuales varían según los autores (e.g. Banguera-Hinestroza 2002; Murphy 2015). Al respecto, el criterio de separación geográfica actual y pasada, considera la dinámica de cambios geomorfológicos del hábitat por las cuales las poblaciones han sido sometidas, lo que generó los cambios adaptativos observados en el presente (Moritz 1994). De esta manera, al observar la capacidad de resiliencia de éstas, se puede proyectar hacia el futuro y generar prioridades para la conservación (Crandall 2000), ya que no sólo se estará conservando un linaje en particular sino también las adaptaciones que dieron cuenta de los cambios históricos que tuvieron tales poblaciones (Lande & Shannon 1996). Esto último, puede además no ser sólo desde el punto de vista evolutivo, sino además ecológico o económico (Moritz 1994).

En términos de historia geomorfológica, la vertiente sur-occidental de los Andes en la cual hoy se emplaza Chile, presentó una serie de eventos geológicos y climáticos que provocaron cambios en los biotopos, tales como el levantamiento de los Andes (Ramos 1989), el Último Máximo Glacial (UGM) (Hulton *et al.* 2002) y transgresiones marinas (Le Roux 2012). Tales eventos generaron un aumento en la rugosidad del paisaje, lo cual pudo generar resistencias a la dispersión del flujo génico que condicionó la distribución de alelos en el ambiente para diversos taxa (Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez 2009). Teniendo en cuenta este tipo de eventos históricos, Chile constituye un modelo idóneo para evaluar criterios

de separación geográfica actual y pasada, y así identificar aquellas poblaciones que fueron aisladas. En este sentido, el uso de marcadores moleculares (e.g. ADNmt) permite inferir relaciones genéticas entre poblaciones en un contexto espacio-temporal (Avice 2000). De esta manera, se puede identificar poblaciones que han presentado un aislamiento reproductivo histórico, las cuales pueden producir combinaciones únicas e irremplazables de genotipos (Fraser & Bernatchez 2001). Lo anterior ocurre especialmente en especies con amplio rango de distribución, presentes en una amplia gama de ecosistemas y altamente sensibles a perturbaciones ambientales (e.g. *Philodryas chamissonis*), ya que tienden a presentar patrones de estructuración genética congruentes con el patrón geográfico latitudinal y/o con ecosistemas en los cuales están presentes, facilitando la delimitación de ESUs y sus consecuentes planes de conservación (Banguera-Hinestroza 2002; Sallaberry-Pincheira 2011).

Entre los criterios para definir ESUs también se encuentra el uso de rasgos fenotípicos (Waples 1991; Crandall 2000). Estos permiten identificar atributos morfológicos como respuesta a adaptaciones locales y como consecuencia del aislamiento reproductivo (Fraser & Bernatchez 2001). La morfometría geométrica, permite evaluar cambios morfométricos al remover los efectos de la escala, la rotación y la traslación de un objeto para así examinar las tendencias centrales de forma, variación de la forma y asociaciones de forma con factores extrínsecos (Benítez & Püschel 2014).

Al determinar congruencias entre aspectos geográficos, genéticos y/o morfológicos y la distribución de las poblaciones, es posible evaluar hipótesis relacionadas a especies crípticas (Bickford 2007). Estas son aquellas que son morfológicamente similares, pero diferentes genéticamente. Esta similitud puede ser debido a ciertas condiciones del ambiente que restringen a los individuos a poseer una respuesta morfológica similar para adaptarse a esta, pero pueden poseer estructuras internas que difieran entre poblaciones (Pfenninger 2007). Las especies crípticas requieren una consideración especial en la planificación de conservación, porque la prevalencia de complejos crípticos en especies nominales

presenta un doble problema: las especies ya consideradas amenazadas podrían estar compuestas de múltiples especies que son aún más raras de lo que se suponía y las diferentes especies pueden requerir diferentes estrategias de conservación (Cook 2008). Un ejemplo de estudio con estos criterios, es el desarrollado por Larson *et al.* (2012) en una especie de camarón de río, *Pacifastacus leniusculus* (Malacostraca: Astacoidea), invasor en Asia, Europa y zonas de Norte América. Su amplia distribución geográfica, al noroeste del borde costero América del Norte, aísla poblaciones por la gran cantidad de cuencas presentes (alta fragmentación de hábitat) y una baja capacidad de dispersión, lo que da indicios de altos niveles de diversidad génica. En ese estudio se utilizaron fuentes históricas, taxonomía basada en la morfología y datos de secuencias de ADN mitocondrial. Se encontró una sustancial diversidad críptica, con tres grupos muy distintos a *P. leniusculus* en regiones que sirvieron de refugio glacial durante el Pleistoceno, poniendo en duda si es nativa de algunas áreas de su distribución. Este tipo de investigación posee criterios que sirven de ejemplo para delimitar ESUs en especies con las mismas características (alta fragmentación de hábitat y baja capacidad de dispersión), como es el caso de los crustáceos parastácidos.

Los camarones de vega (Parastacidae) corresponden a un grupo de origen gondwánico (Toon 2010), con distribución en Sudamérica, Madagascar y Australasia y habitan aguas subterráneas, arroyos, ríos y lagos (Crandall & Buhay 2008). En Chile se registran seis especies de Parastacidae: *Samastacus spinifrons* (Philippi 1882), *Parastacus pugnax* (Poeppig 1835), *P. nicoleti* (Philippi 1882), *Virilastacus araucanius* (Faxon 1914), *V. rucapihuelensis* (Rudolph & Crandall 2005) y *V. retamali* (Rudolph & Crandall 2007) (Rudolph 2013). Estas especies se encuentran amenazadas actualmente en parte por la acción antrópica, la cual modifica sus hábitats y están sometidas a una alta presión extractiva para consumo humano (Rudolph 2013). Entre estas, *Parastacus pugnax* (“camarón de las vegas”) es endémica de Chile y se encuentra distribuida entre las cuencas de los ríos Aconcagua en la región de Valparaíso (33°03' S) y el río Imperial en la Región de la Araucanía (38°43' S), desde el borde costero hasta la cordillera de los Andes (Rudolph 2010). Habita en aguas subterráneas existentes en terrenos

semipantanosos conocidos como vegas. Posee una conducta excavadora, construyendo galerías relativamente complejas, con una cámara habitacional situada a nivel de la napa freática, desde la cual emerge un corto túnel ascendente hacia la superficie. Esta especie posee desarrollo directo, con cuidados parentales extendidos (Rudolph 2010). Estudios filogenéticos revelan que esta especie se encuentra más relacionada con parastácidos brasileños que chilenos y, teniendo en cuenta la gran distancia y la presencia grandes barreras (*i.e.* Cordillera de los Andes), nos permite inferir la presunta antigüedad de este taxón (Crandall & Buhay 2008; Stern *et al.* 2017).

Los rasgos morfológicos distintivos de esta especie son: Cefalotórax liso y comprimido lateralmente; surco cervical con forma de “V”; rostro corto, subtriangular, e inclinado hacia los ojos; abdomen grueso (Rudolph 2013). Especímenes colectados en las cercanías de Chillán, en comparación con especímenes procedentes de Talcahuano y Concepción, presentaron diferencias, como quelas de mayor tamaño. Al respecto los autores hipotetizan que estas diferencias morfológicas se deberían a que *P. pugnax* es una especie polimórfica (Rudolph 2013). Esto es cuando en una población hay dos o más fenotipos claramente diferenciados y generalmente tiene que ver con la capacidad adaptativa de la especie ante ambientes variados (Theodosius 1970). Teniendo en cuenta estas observaciones, se considera que sería recomendable poner a prueba la hipótesis del polimorfismo, a través de análisis morfométricos (Rudolph 2013).

Se estima que las poblaciones de *P. pugnax* poseen una baja capacidad migratoria dada su escasa capacidad natatoria, ausencia de estados larvales y a la efectividad de barreras geográficas (*e.g.* cuencas hidrográficas) (Rudolph 2013). Actualmente, esta especie se encuentra amenazada por la alta fragmentación de hábitat (ya sea por cambio de uso de suelo o sequía) y extracción para uso humano, principalmente en las regiones del Maule y Biobío. Estimaciones recientes indican que se extraen 43,5 millones de especímenes solo para satisfacer las demandas de Concepción, Chillán y Coelemu en un año (Silva & Spoerer 2006). En estas zonas de extracción masiva es normal la realización de

las llamadas “Fiestas del Camarón”, siendo este tipo de actividades una amenaza para la subsistencia de esta especie (Rudolph 2013). Actualmente estas actividades extractivas se realizan sin ningún tipo de regulación que proteja a la especie, ya que la legislación vigente no reconoce a esta especie como recurso pesquero. El 2013, el Ministerio del Medio Ambiente clasificó a esta especie bajo la categoría de Preocupación Menor (LC); sin embargo, el comité encargado destacó que si la explotación directa y el drenaje de humedales continúa, esta especie podría entrar a categoría Vulnerable (MMA 2013).

La distribución actual de *P. pugnax* consiste en varias cuencas tanto andinas como costeras, principalmente en la zona mediterránea de Chile central, de manera que existen vegas que se encuentran aisladas, tanto por la geomorfología e hidrografía como por presencia de asentamientos humanos. El aislamiento de las poblaciones de *P. pugnax*, intra e intercuenca, podría estar afectando la diversidad de esta, diferenciándola genéticamente al restringir el flujo génico y por efecto de deriva génica. En síntesis, dadas las características biológicas de la especie, una alta fragmentación de su hábitat y la probable antigüedad de esta, es esperable una alta presencia de monofilias recíprocas y una alta diferenciación morfológica, que derivaría en un considerable número de ESUs.

Dadas las características biológicas de *Parastacus pugnax*, como una baja capacidad migratoria y un desarrollo directo (*i.e.* sin larvas) que faciliten el flujo de genes entre poblaciones, además de una alta fragmentación de su hábitat debido a la efectividad de barreras geográficas y la probable antigüedad de este taxón, se espera la existencia de dos o más linajes mitocondriales recíprocamente monofileticos diferenciables morfológicamente que derivaría a la delimitación de ESUs.

OBJETIVO GENERAL

Delimitar Unidades Evolutivamente Significativas en *Parastacus pugnax*.

OBJTIVOS ESPECIFICOS

- Identificar monofilias recíprocas utilizando reconstrucciones filogenéticas
- Caracterizar morfológicamente los distintos linajes de *P. pugnax* por medio de morfometría geométrica en quelas y cefalotórax
- Evaluar la congruencia entre los patrones de variación morfológica y genética



METODOLOGÍA

TOMA DE MUESTRAS

Las muestras de *P.pugnax* fueron obtenidas entre los años 2015 y 2018 en el marco del proyecto Fondecyt n° 1161650, mediante el uso de “Bombas de Vacío” que permiten extraer individuos de sus galerías. Todos los individuos fueron preservados en alcohol y registrada la localidad donde fue realizada la extracción. Se consideraron 64 localidades (Figura 1) a lo largo de su distribución entre las cuencas de los ríos Aconcagua en la región de Valparaíso ($33^{\circ}03' S$) y el río Imperial en la Región de la Araucanía ($38^{\circ}43' S$).

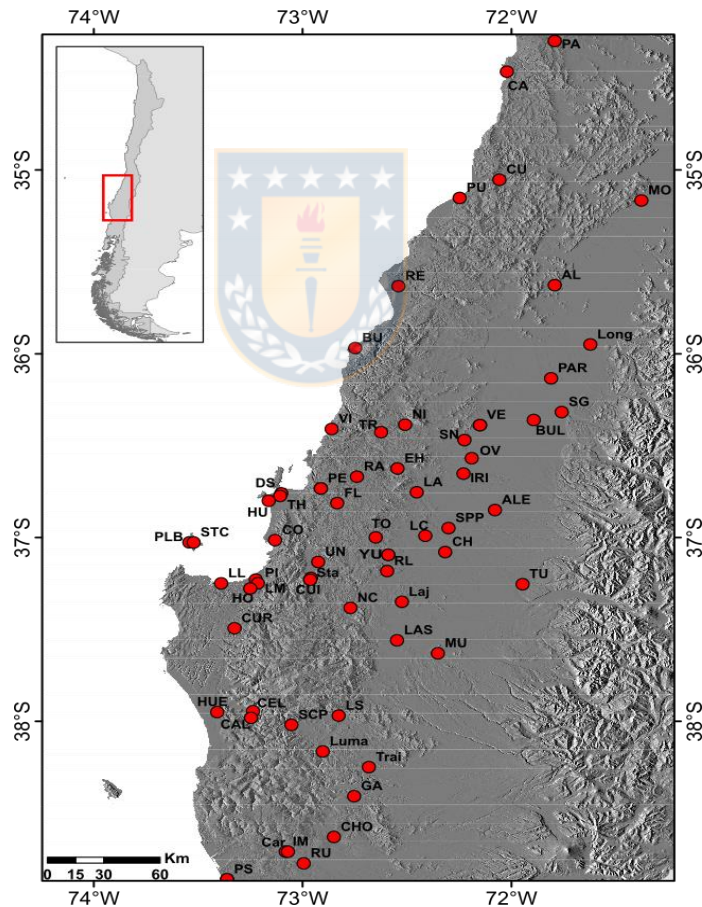


Figura 1. Mapa de localidades consideradas para el muestreo. / Figure 1. Map of localities considered for sampling.

EXTRACCION Y AMPLIFICACIÓN

Para realizar el análisis genético de esta especie se seleccionó el gen mitocondrial citocromo oxidasa I. Las muestras de tejido fueron extraídas por medio de una biopsia de las quelas de los individuos. El ADN fue extraído utilizando el kit Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega USA) y luego se almacenó a una temperatura de -20°C. La amplificación de ADN fue realizada mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando los primers LCO1490 (Folmer *et al.* 1994) y HCP2198 (Folmer *et al.* 1994). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: una desnaturación inicial a 95°C por 1 minuto, 40 ciclos de desnaturación a 95°C por 30 segundos, la fase de a 54°C por 30 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto; el proceso finalizó con una extensión final a 72°C por 10 minutos. En todos los experimentos se incluyó un control positivo. Finalizado el proceso de amplificación, se preparó un gel de agarosa al 1% y se realizó una electroforesis para chequear el resultado. Los productos de PCR fueron secuenciados en ambos sentidos por Macrogen, Korea.

ANALISIS DE SECUENCIAS

Secuencias fowards y reverse fueron alineadas y editadas utilizando el programa CodonCode Aligner(v. 3.5, Codon Code Corporation). Con el fin de estudiar la relación entre los principales linajes de *P.pugnax*, se realizó un análisis de inferencia bayesiana, con el programa Beast2 (Bouckaert R. 2014), el modelo seleccionado fue GTR+I+G, realizándose 100 millones de generaciones con muestreo de árbol cada 1000. Se utilizó como outgroup la especie *Parastacus defossus* (Faxon 1898). El programa Figtree v 1.2.2 (Rambaut 2009) fue usado para visualizar y editar el árbol obtenido. La delimitación de ESUs se realizó identificando aquellos clados que correspondan a monofilias recíprocas. La asociación de ESUs y la variación morfológica se realizó de forma cualitativa, considerando que en estudios posteriores puede evaluarse formalmente mediante asociación multivariada.

MORFOMETRIA GEOMETRICA

Para el análisis de morfometría geométrica de la zona de las quelas y el cefalotórax se utilizaron 5 individuos de cada localidad. Cada individuo fue limpiado utilizando papel absorbente y alcohol. Las imágenes fueron obtenidas con una cámara Canon Powershot sx50 hs. Se eligieron 10 landmarks para la zona del cefalotórax (Fig. 2); los puntos 1 al 6 fueron elegidos ya que corresponden a rasgos distintivos de esta especie, los cuales son rostro corto, subtriangular e inclinado hacia los ojos y surco cervical en forma de “V” (Jara 1994). Los puntos 7 al 10 fueron escogidos de acuerdo a observaciones preliminares, dada la variación morfológica entre los individuos registrados, en la zona de la areola y el margen posterior del pereion. Casi todos los landmarks corresponden al tipo 1, con excepción de los landmarks 7 y 8 que son de tipo 2 (Toro *et al.* 2010). Para la digitalización de las imágenes se utilizaron los softwares tpsUTIL y tpsDIG, para transformar el formato de las imágenes y sobreponer los landmarks, respectivamente (Rohlf 2018). Cada imagen fue escalada en referencia a un tubo de hematocrito de 1,5 mm.



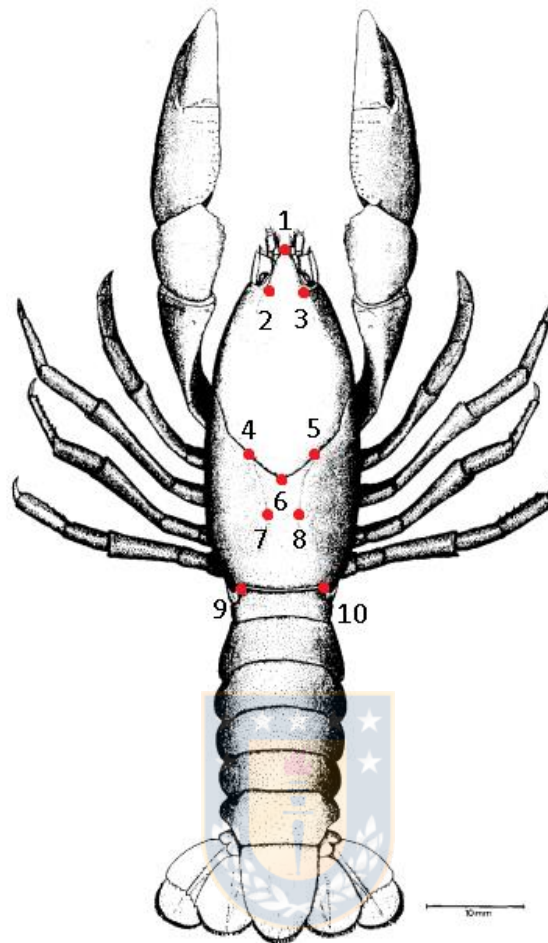


Figura 2. Landmarks utilizados para el análisis de morfometría geométrica del cefalotórax en *Parastacus pugnax*./ Figure 2.Landmarks used for the analysis of geometric morphometry of cephalothorax in *Parastacus pugnax*.

De cada individuo se desprendió una quela completa, izquierda o derecha dependiendo de la ausencia de alguna y discriminando aquellas posiblemente regeneradas en base a la ausencia de dientes; se utilizaron quelas de 2,5 – 3,5 cm de longitud, estandarizando la abertura del dactilopodito mediante la separación entre éste y la porción fija de la quela usando un cilindro de 1,5 mm de diámetro, la cual también es utilizada para escalar las imágenes. Se seleccionaron 13 landmarks para cada quela (Figura 3), distribuidos tanto en la porción rígida de

estas, como en el dactilopodito, y que permiten registrar diversas variaciones en la totalidad de la forma. Dichos puntos se escogieron en base a la observación minuciosa de los ejemplares, de la que se rescataron diferencias de curvatura, amplitud y/o separación entre distintas estructuras, principalmente en el dactilopodito y en la zona proximal de las quelas. En su mayoría, los landmarks pertenecen al tipo 1, con excepción de los landmarks 3 y 10 que corresponden al tipo 2 (Toro et al. 2010).

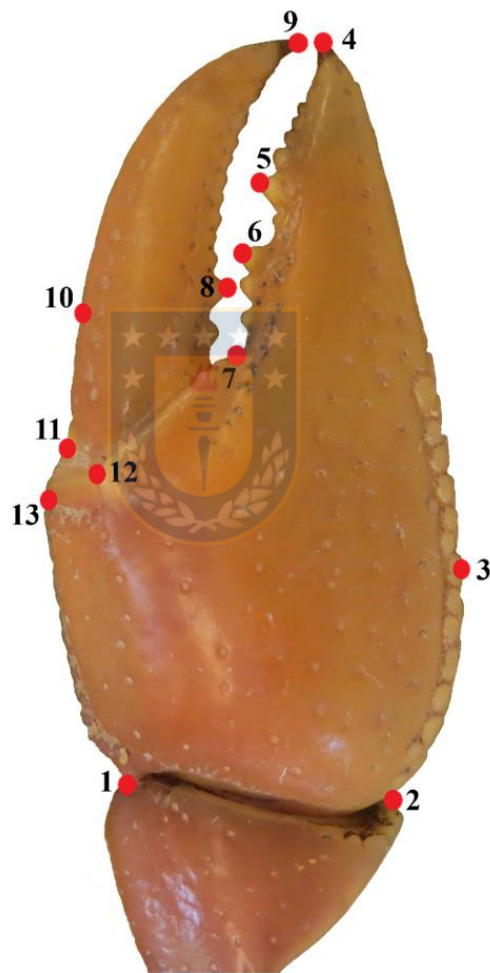


Figura3. Landmarks utilizados para el análisis de morfometría geométrica de quelas en *Parastacus pugnax*./ Figure 3. Landmarks used for the analysis of geometric morphometry of chelas in *Parastacus pugnax*.

Los análisis morfométricos fueron realizados con el software MorphoJ (Klingenberg 2011), con el cual se realizó la superposición de los centroides con el fin de minimizar los efectos del tamaño, rotación y translación, y posteriormente el análisis de procrustes, para reducir la diferencia entre especímenes (Toro *et al.* 2010). Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) en base a la forma, relacionado con las ESUs propuestas. Finalmente, la variación de la forma entre ESUs fue explorada a través de un análisis de varianza canónica (CVA), el cual se asume que las muestras pueden asignarse a grupos predefinidos y luego evalúa qué tan bien pueden usarse los datos para respaldar esa asignación (Webster 2010).



RESULTADOS

ANALISIS GENETICOS

En el árbol filogenético obtenido (Figura 4) se identificaron varias monofilias recíprocas, éstas fueron clasificadas en función de 3 escalas espaciales (*i.e.* Macro, Meso y Micro). Estas escalas sirvieron como base para delimitar diversos tipos de ESUs los que ayudaran a generar prioridades de conservación. De esta forma, a Macro escala se observaron 2 grandes ESUs que corresponden a la zona Norte-Centro y Sur; la primera se encuentra desde la zona Pailimo hasta Huentelolén y la segunda desde Elicura (Contulmo, sur Biobio) hasta Puerto Saavedra. Por otra parte, a Meso escala se delimitaron 3 ESUs, correspondientes a las zonas Norte, Centro y Sur; la zona norte compete las áreas de Pailimo y Cahuil, mientras que la zona Centro, desde Curepto a Huentelolen y la zona sur, desde Camino a Elicura hasta Puerto Saavedra. Finalmente, el mayor detalle en términos del número y ubicación de los ESUs, se obtiene a Micro escala donde se delimitan 18 ESUs, siendo 9 de ellas definidas sólo por una localidad (ver detalle Anexo 1).

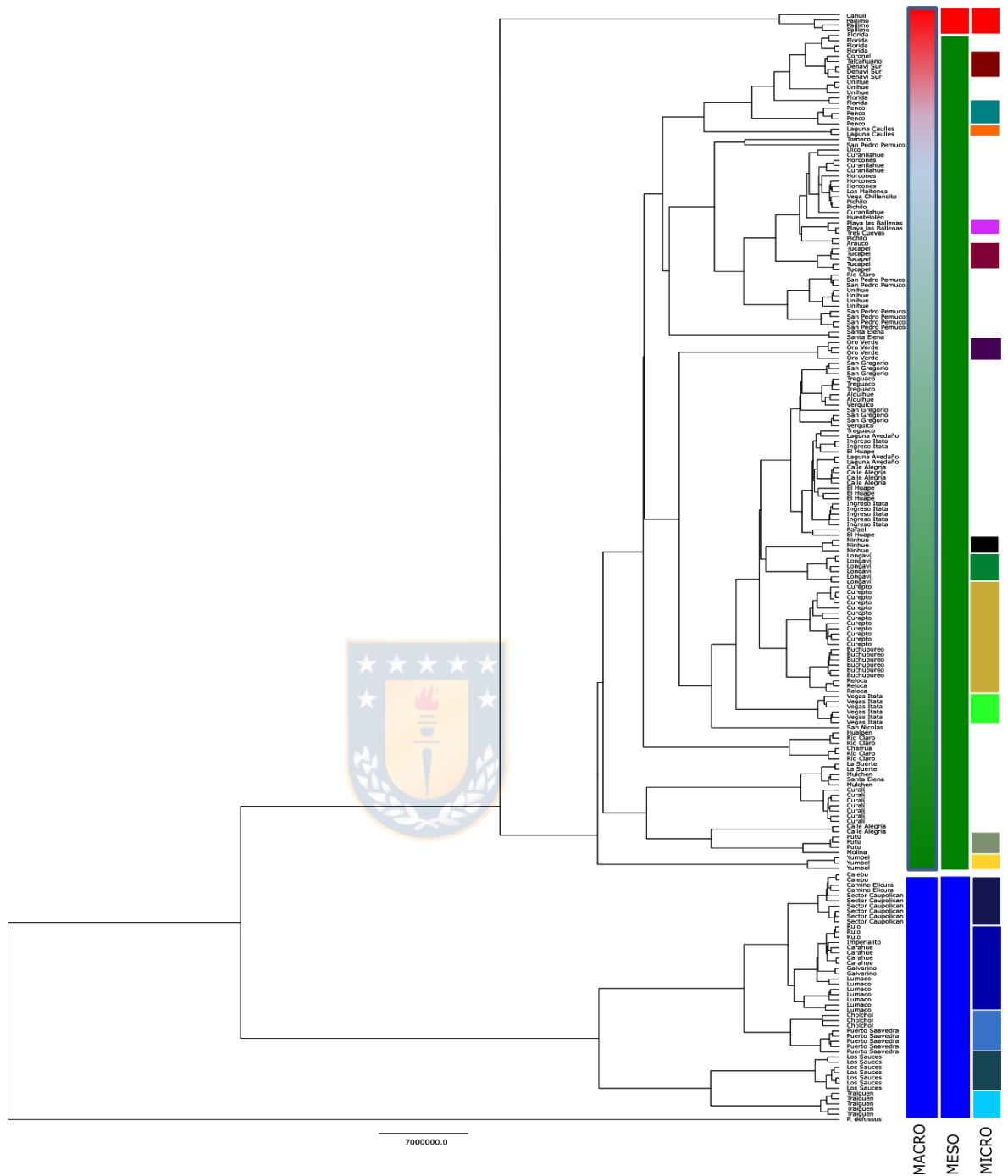


Figura 4. Cladograma de *P. pugnax*. Los polígonos de colores corresponden a las escalas propuestas para la delimitación de ESUs. Macro 2 ESUs, Meso 3 ESUs y Micro 18 ESUs. /Figure 4. Cladogram of *P. pugnax*. The colored polygons correspond to the levels proposed for the delimitation of ESUs. Macro 2 ESUs, Meso 3 ESUs and Micro 18 ESUs.

MORFOMETRIA GEOMETRICA

Al considerar las características del análisis de morfometría geométrica (*i.e.* número de muestras por localidad), estos no fueron viables de realizar al considerar que el número de individuos no fue suficiente en algunos ESUs a Micro escala. Por otra parte, realizar estos análisis a Macro escala pierde sentido en términos de fijar unidades espaciales útiles para la conservación. Por estas razones se decidió ejecutar a escala Meso espacial los análisis morfométricos ya que permitieron, capturar la mayor variación de las formas a lo largo del rango de distribución de las poblaciones de *P. pugnax*. El análisis ANOVA para la media de la forma entre las ESUs, demostró ser significativo para cefalotórax (Tabla 1) y quelas (Tabla 2). Para cefalotórax CV1 y CV2 corresponden a 58,06% y 41,93% de la variación entre grupos respectivamente (Figura 5). En el caso de las quelas se encontró que CV1 y CV2 corresponden a 58,9 % y 41,08% de la variación respectivamente (Figura 6).



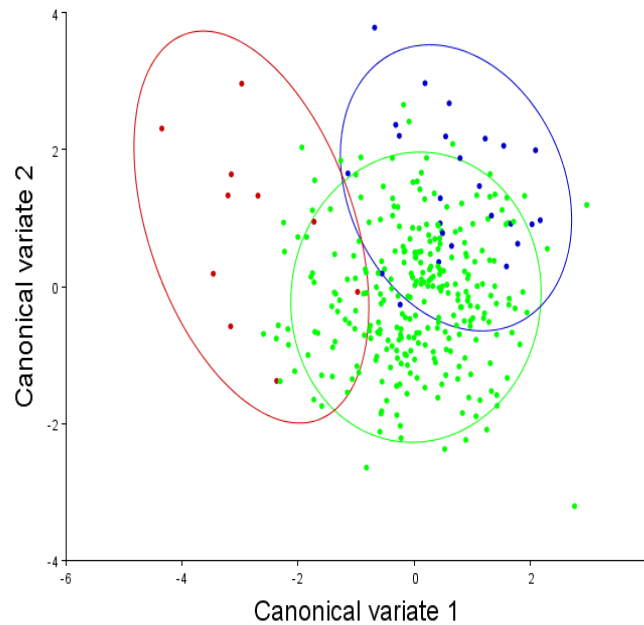


Figura 5. Análisis de varianza canónica en la zona del Cefalotórax, colores indican ESUs a nivel Meso. Rojo: Norte, Azul: Sur, Verde: Centro./ Figure 5. Analysis of canonical variance in the Cephalothorax area, colors indicate ESUs at Meso level. Red: North, Blue: South, Green: Center.

Tamaño Centroide:							
Efecto	SS	MS	df	F	P		
Individual	34,782	17,391	2	1,27	0,2819		
Residual	2 496,342	13,641	183				
Forma, Procrustes ANOVA:							
Efecto	SS	MS	df	F	P	Pillai tr.	P
Individual	0,023714	0,00054	44	3,99	<.0001	0,62	<.0001
Residual	0,544462	0,00014	4026				

Tabla 1. ANOVA de tamaño de centroide y forma en Cefalotorax./ Table 1. ANOVA of centroid size and shape in Cephalotorax.

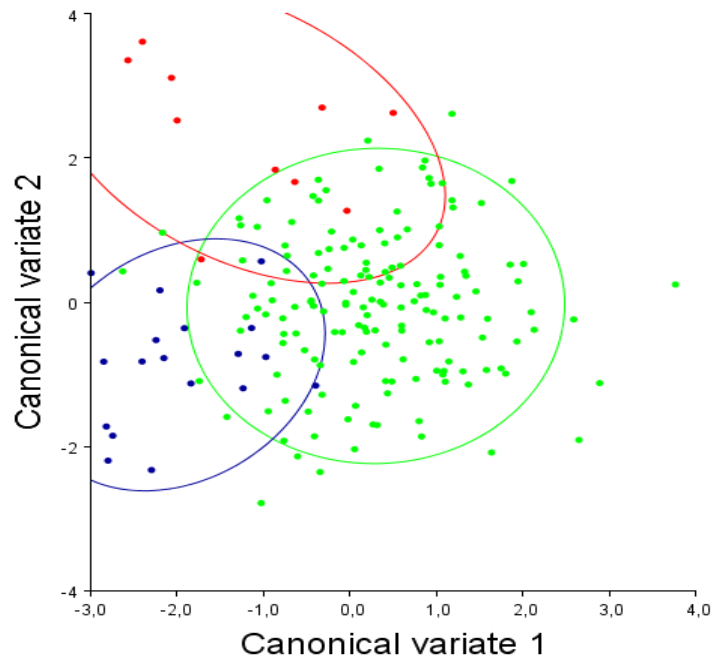


Figura 6. Análisis de varianza canónica en la zona de Quelas, colores indican ESUs a nivel Meso. Rojo: Norte, Azul: Sur, Verde: Centro./ Figure 6. Analysis of canonical variance in the Chelas area, colors indicate ESUs at Meso level. Red: North, Blue: South, Green: Center.

Tamaño Centroide					
Efecto	SS	MS	df	F	P
Individual	509351,395	254675,698	2	8,58	0,0002
Residual	3264750,911	29634,714	312		

Forma, Procrustes ANOVA:							
Efecto	SS	MS	df	F	P	Pillai tr.	P
Individual	0,0432	0,0013	32	8,68	<.0001	0,4	<.0001
Residual	0,7758	0,000155	4992				

Tabla 2. ANOVA de tamaño de centroide y forma en Quelas./ Table 2. ANOVA of centroid size and shape in Chelas.

DISCUSION

La noción de ESU ha sido apoyada y adaptada según varios criterios y escenarios (Ryder 1986; Waples 1991; Dizon et al. 1992; Moritz 1994; Vogler&Desalle 1994; Fraser & Bernatchez 2001) y no existe una definición universal, válida para todas las especies y por ende cada definición debe ser trabajada caso a caso de manera flexible. Actualmente estudios en taxa bajo alguna categoría de amenaza han ido en aumento así como la evaluación de ESUs, basándose únicamente en evidencia genética (O'Meara 2012), la cual ha ido en desmedro para otras fuentes de información (e.g. etológica, ecológica, geográficos y morfológicos). Es aquí donde se genera un aporte con este estudio a la conservación al emplear diversos criterios para asignar ESUs ya que se consideraron evidencia genéticas y morfométricas los cuales fueron utilizados para evaluar congruencia entre distintas fuentes de información y que pudiesen ser relevantes a la hora de generar políticas de conservación.

Generalmente estudios que delimitan ESUs con información genética sólo utilizan como criterio la obtención de clados en localidades específicas, aisladas y/o geográficamente acotadas (e.g. Manceau *et. al.* 1999; Holland & Hadfield 2002; Deef 2019). De lo anterior solo se desprende una escala de análisis, la cual no permite vislumbrar la posible conectividad entre poblaciones si se consideran procesos que ocurren a mayores escalas espaciales. De aquí el aporte de este estudio al proponer una aproximación que delimite ESUs a distintas escalas espaciales. Al analizar la zona Sur definida tanto a Macro como a Meso escala, se observa una estructuración genética (ESUs Micro escala) de acuerdo a localidades geográficamente cercanas, lo cual es explicado por su ubicación de estas en la cordillera de Nahuelbuta y dada la rugosidad (Alvarado 2016) de la zona y ambientes contrastantes permite la demarcación clara de ESUs debido la escasa vagilidad de la especie.

Al considerar la Macro zona Norte-Centro, se observa que en el área norte se consideran solo 2 localidades septentrionales aisladas (Pailimo- Cahuil) de la zona de Chile central, correspondientes a la cuenca hidrológica del Río Mataquito (VII Región). Por otra parte, el área centro (Meso escala) está definida por un gran clado que define un gran número de ESUs (Micro escala). La alta conectividad de esta zona podría ser producto de la depresión intermedia y la baja rugosidad del paisaje, por ende propenso a efectos de pulsos de inundación, que contribuirían a la estructura genética observada (Garrido-Garduño & Vázquez-Domínguez 2012). A su vez la actividad antrópica, la explotación de la especie y la elevada urbanización, y en consecuencia el aislamiento de algunas poblaciones, nos permite justificar la existencia de monofilias recíprocas en Micro escala, como por ejemplo Talcahuano-Denavi Sur-Coronel. Cabe destacar la ESU delimitada en la Isla Santa María, ya que nos permite inferir una antigua conectividad de las poblaciones con el continente y posterior aislamiento debido a la presencia de una barrera oceanográfica.

Los procesos de fijación de caracteres morfológicos son más graduales en el tiempo (Rodríguez 2006), por lo tanto no serían adecuados para delimitar grupos que recientemente han perdido conectividad en términos de flujo génico. De esta forma se recomienda trabajar en linajes que presenten un ancestro más basal, como en el caso de este estudio con grupos definidos a Meso escala. Las diferencias en la forma en cefalotórax y quelas observada entre las ESUs nos indica posibles eventos de adaptaciones locales (Kawecki & Ebert 2014). Esto se explica dado el gradiente climático latitudinal en la distribución que nos indica climas contrastantes, así como diferentes composiciones del suelo (Bonelli & Schlatter 1995) que funcionan como agentes en la variación de la forma, producto del hábito excavador de la especie.

La convergencia entre los resultados genéticos y morfométricos de este estudio, provee evidencia significativa para la delimitación de ESUs (Meso escala) (Casacci *et.al.* 2014). La obtención de ESUs ha sido de utilidad en el conocimiento de diferentes taxa, ya sea para conocer el estado de poblaciones estudiadas

(Borges *et. al.* 2018; Labisko *et. al.* 2018) y direccionar el manejo en términos de conservación (Karl & Bowen 1999; Holand & Hadfield 2002). En el caso de *P. pugnax* existe una alta tasa de extracción, cercana a las 1.525 toneladas al año (Rudolph 2013), un hecho que pone en cuestión la regulación en torno a esta especie, la cual no es reconocida como recurso pesquero. Con el fin de asegurar la protección a largo plazo del legado genético, es relevante regular mediante planes de manejo integral y políticas medio ambientales, instaurando medidas tales como vedas, cuotas de captura, registro estadístico de capturas, fiscalización en fiestas de camarón y protección de poblaciones más aisladas.

Los resultados de esta investigación sugieren una alta diversidad genética que debe ser resguardada en *P. pugnax*, una especie endémica y altamente extraída. A lo anterior también se suma el riesgo inminente de extinciones locales debido al aumento de periodos de sequía, producto del cambio climático. Dados estos antecedentes se sugiere la consideración de las ESUs delimitadas a escala Meso y no perder del foco la escala Micro, ya que, aunque no fue evaluada la congruencia entre datos genealógicos y morfométricos, se pone en evidencia un aislamiento de poblaciones individuales, las cuales pueden poseer un legado genético importante para esta especie.

BIBLIOGRAFIA

- ALVARADO, C. 2016. Evolución Tectonoestratigráfica de la cordillera principal occidental, entre 34°20'S y 34°40'S, Chile Central. Tesis de Magister. Universidad de Chile, Facultad de ciencias físicas y matemáticas, Santiago, Chile.
- AVISE, J.C. 2000. Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts. 328-335.
- BANGUERA-HINESTROZA, E., CÁRDENAS, H., RUIZ-GARCÍA, M., MARMONTEL, M., GAITÁN, E., VÁZQUEZ, R. & GARCÍA-VALLEJO, F. 2002. Molecular Identification of Evolutionarily Significant Units in the Amazon River Dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae), *Journal of Heredity* 93:312–322
- BENÍTEZ, H. A. & PÜSCHEL, T. A. 2014. Modelando la varianza de la forma: morfometría geométrica aplicaciones en biología evolutiva. *Int. J. Morphol* 32(3) :998-1008.
- BICKFORD, D. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution* 22: 148-155.
- BONELLI, C. & SCHLATTER, J. 1995. Caracterización de suelos rojos arcillosos en la zona Centro-Sur de Chile. *Bosque* 16 (2): 21-37.
- BORGES, V., SANTIAGO, P., LIMA, N., COUTINHO, M., ETEROVICK, P. & CARVALHO, D., 2018. Evolutionary Significant Units within Populations of Neotropical Broad-Snouted Caimans (*Caiman latirostris*, Daudin, 1802). *Journal of Herpetology* 52 (3): 282-288.
- BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, C-H., XIE, D., SUCHARD, MA., RAMBAUT, A., & DRUMMOND, A. J. 2014. BEAST 2: A

Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. PLoS Computational Biology, 10(4).

CASACCI, L., BARBERO, F. & BALLETO, E. 2014. The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. Italian Journal of Zoology 81(2): 182-193.

COOK, B. 2008. Importance of cryptic species for identifying ‘representative’ units of biodiversity for freshwater conservation. Biological Conservation 141: 2821-2831.

CRANDALL KEITH, A., 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. Elsevier Science 15 (7): 290-295.

CRANDALL, K.A. & BUHAY. J.E. 2008. Global diversity of crayfish (Astacidae, Cambaridae, and ParastacidaeDecapoda) in freshwater. Hydrobiology 595: 295- 301.

DEEF, L., 2019. Genetic diversity of Egyptian populations of the African Common Toad (*Sclerophrys regularis*, Reuss 1833). Amphibian & Reptile Conservation 13(1):104-110.

DIZON, A., LOCKYER, C., PERRIN, W., DEMASTER, D. & SISSON, J. 1992. Rethinking the stock concept: A phylogeographic approach. Conservation Biology 6:24–36.

DOMÍNGUEZ–DOMÍNGUEZ, O. & VÁZQUEZ–DOMÍNGUEZ, E., 2009. Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. Animal Biodiversity and Conservation 32.1: 59–70.

FOLMER, E. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. Molecular marine biology and biotechnology 3: 294-9.

- FRASER, J. & BERNATCHEZ, L. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741-2752.
- GARRIDO-GARDUÑO, T. & VÁZQUEZ-DOMÍNGUEZ, E. , 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84: 1031-1054.
- HERRERA-PAZ, E. 2013. La genética de poblaciones y el origen de la diversidad humana. *Revista médica hondureña* 81 (1): 41-45.
- HOLLAND, B. & HADFIELD, M. 2002. Islands within an island: phylogeography and conservation genetics of the endangered Hawaiian tree snail *Achatinella mustelina*. *Molecular Ecology* 11: 365-375.
- HUGHES, J. & HILLYER, M. 2003. Patterns of connectivity among populations of *Cherax destructor* (Decapoda:Parastacidae) in western Queensland, Australia. *Marine and Freshwater Research* 54: 587-596.
- HUGHES, R. 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters* 11:609-623.
- HULTON, N., PURVES, R.S., MCCULLOCH, R.D., SUGDEN, D.E. & BENTLEY, M.J. 2002. The last glacial maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews* 21: 233–241.
- JARA, C.G. 1994. Camarones dulceacuícolas en Chile. Informe técnico-científico. Instituto de Zoología, Universidad Austral de Chile, Valdivia, 15 pp.
- JELIC, M., KLOBUCAR, G.I., GRANDJEAN, F., PUILLANDRE, N., FRANJEVIC, D., FUTO, M., AMOURET, J. & MAGUIRE, I. 2016. Insights into the molecular phylogeny and historical biogeography of the white-clawed crayfish (Decapoda, Astacidae). *Mol. Phylogenetic Evolution* 103: 26-40.

- KARL, S. & BOWEN, B., 1997. Evolutionary Significant Units versus Geopolitical Taxonomy: Molecular Systematics of an Endangered Sea Turtle (genus *Chelonia*). *Conservation Biology* 13 (5): 990-999.
- KAWECKI, T. & EBERT D. 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters* 7:1225-1241.
- KLINGENBERG, C.P. 2011. MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Research* 11: 353–357.
- LABISKO, J., GRIFFITHS, R., CHONG-SENG, L., BUNBURY, N., MADDOCK, S., BRADFIELD, K., TAYLOR, M. & GROOMBRIDGE, J. 2019. Endemic, endangered and evolutionarily significant: cryptic lineages in Seychelles frogs (Anura: Sooglossidae). *Biological Journal of the Linnean Society* 126: 417-435.
- LANDE, R., & SHANNON, S. 1996. The role of genetic variation in adaptation and population persistence in a changing environment. *Evolution* 50(1): 434–437
- LARSON, E.R., ABBOTT, C., USIO, N., AZUMA, K.A, WOOD, L., HERBORG, M. & OLDEN, J. 2012. The signal crayfish is not a single species: cryptic diversity and invasions in the Pacific Northwest range of *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Biology* 57: 1823-1838.
- LE ROUX, J.P. 2012. A review of Tertiary climate changes in southern South America and the Antarctic Peninsula. Part 1: Oceanic conditions. *Sedimentary Geology*, Departamento de Geología, Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas, Universidad de Chile 247–248: 1-20
- LOVEJOY, T.E. 1980. A projection of species extinctions, in *The Global 2000 Report to the President*. Council on Environmental Quality, Washington DC 2:328–31.

- MANCEAU, V., CAMPRE, J., BOURSOT, P., & TABERLET, P. 1998. Identification of evolutionary significant units in the Spanish wild goat, *Capra pyrenaica* (Mammalia, Artiodactyla). *Animal Conservation* 2: 33-39.
- MARTINEZ-ABRAÍN, A. 2006. Pequeñas poblaciones, grandes problemas. *Quercus* 245: 36-39
- MORITZ, C., 1994. "Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation". *Trends in Ecology and Evolution* 9 (10): 373-375.
- MORRONE, J., 2008. Endemism. *Encyclopedia of Ecology*. Oxford. Elseiver. 1254-1259 pp.
- MURPHY, P., 2015. Species, ESUs or populations? Delimiting and describing morphologically cryptic diversity in Australian desert spring amphipods. *Invertebrate Systematics* 29: 457-467
- NOSS, R., 1990. "Indicators for Monitoring Biodiversity: A Hierarchical Approach". *Conservation Biology* 4: 355-364.
- O'MEARA, B. C. 2012. Evolutionary inferences from phylogenies: A review of methods. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 43: 267–285.
- OLIVER, T. 1993. Biodiversity and Resilience of Ecosystem Functions, *Trends in Ecology & Evolution* 20, pp12.
- PFENNINGER, M. & SCHWENK, K., 2007. Cryptic animal species are homogeneously distributed among taxa and biogeographical regions. *BMC Evolutionary Biology*: 7, 12.
- RAMOS, V.A. 1989. The birth of southern South America. *American Scientist* 77: 444–450

RAMBAUT, A. 2009. FigTree version 1.3.2. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>. Accessed 9 November 2012.

RIBEIRO, FB, BUCKUP, L., GOMES, K. & ARAUJO, P. 2016. Two new species of South American freshwater crayfish genus *Parastacus* Huxley, 1879 (Crustacea: Decapoda: Parastacidae). *Zootaxa* 4158 (3):301-324.

RODRIGUEZ, V. 2006. Forma de la Distribución cuasietacionaria de una cadena de Markov bivariada: Aplicación a un modelo genético. Tesis de Maestro en Ciencias. Centro de Investigación en Matemáticas, Guanajato, México.

ROHLF, F. 2018. tps file utility program. 18-Apr-18, de Suny Stony Brook Sitio web: <http://life.bio.sunysb.edu/morph/soft-utility.html>

RUDOLPH, E. ,2013. *Parastacus pugnax* (Poepfig, 1835) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): conocimiento biológico, presión extractiva y perspectivas de cultivo. *Latin American Journal of Aquatic Research* 41:611-632.

RUDOLPH, E. 2002. Sobre la biología del camarón de río *Samastacus spinifrons* (Philippi, 1882) (Decapoda, Parastacidae). *Gayana* 66(2): 147-159.

RUDOLPH, E. & VERDI, A.C.. 2010. Intersexuality in the burrowing crayfish *Parastacus pilimanus* (Von Martens, 1869) (Decapoda, Parastacidae). *Crustaceana* 83(1): 73-87.

SALLABERRY-PINCHEIRA, N., GARIN, C., GONZÁLEZ-ACUA, D., SALLABERRY, M., VIANNA, J. 2011. Genetic divergence of Chilean long-tailed snake (*Philodryas chamissonis*) across latitudes: conservation threats for different lineages. *Diversity and Distributions* 17(1):152-162

SILVA, P. & M. SPOERER. 2006. Estudio de prefactibilidad para la comercialización de camarones de vega. Tesis, Ingeniería Industrial, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 177 pp.

- STERN, D.B., BREINHOLT, J., PEDRAZA LARA, C., LÓPEZ-MEJÍA, M., OWEN, C.L., BRACKEN-GRISSOM, H., FETZNER, J.W. JR . & CRANDALL, K.A. 2017. Cave adaptation is an evolutionarily stable, absorbing state for freshwater crayfish. *Evolution*.71: pp10.
- THEODOSIUS, D. 1970. *Genetics of the Evolutionary Process*. Nueva York: Columbia : Columbia University Press. Pp 169-171.
- TORO, I., MANRIQUEZ, V., & GALDAMES, S. 2010. Morfometría Geométrica y el Estudio de las Formas Biológicas: De la Morfología Descriptiva a la Morfología Cuantitativa. *International Journal of Morphology* 28(4): 977-990.
- TOON A., PEREZ-LOSADA, M. SCHWEITZER, C.E., FELDMANN, R.M., CARLSON, M. & CRANDALL, A., 2010 Godwanan radiation of the Southern Hemisphere crayfishes (Decapoda: Parastacidae): evidence from fossils and molecules. *Journal Biogeography* 37: 2275–2290.
- UNMACK, P.J., YOUNG, M.J., GRUBER, B. ,WHITE, D.; KILIAN, A., ZHANG, X. & GEORGES, A. 2019. Phylogeography and species delimitation of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae) using genome-wide SNPs. *Marine Freshwater* 70: 857–869.
- VOGLER, A.P. & DESALLE, R. 1994. Diagnosing units of conservation management. *Conservation Biology* 8:354–363
- WAPLES, R.S. 1991. Pacific Salmon, *Oncorhynchus* spp., and the Definition of "Species" Under the Endangered Species Act. *Marine Fisheries Review* 53(3):11-22..
- WEBSTER, M. & SHEETS, D. 2001. A Practical Introduction To Landmark-Based Geometric Morphometrics. *The Paleontological Society Papers* 16: 163-188

ANEXO

Localidad	Latitud	Longitud	Macro	Meso	Micro
Cahuil	-34,466033	-72,021467	Norte-Centro	Norte	1
Pailimo	-34,299633	-71,792083	Norte-Centro	Norte	1
Florida	-36,813889	-72,833361	Norte-Centro	Centro	-
Coronel	-37,015033	-73,131233	Norte-Centro	Centro	2
Talcahuano	-36,773717	-73,107000	Norte-Centro	Centro	2
Denavi Sur	-36,760383	-73,101317	Norte-Centro	Centro	2
Unihue	-37,133139	-72,925167	Norte-Centro	Centro	-
Penco	-36,734056	-72,912028	Norte-Centro	Centro	3
L. Caulles	-36,991028	-72,412111	Norte-Centro	Centro	4
Tomeco	-36,999694	-72,649278	Norte-Centro	Centro	-
S.P. Pemuco	-36,948861	-72,300528	Norte-Centro	Centro	-
Llico	-37,859987	-73,389274	Norte-Centro	Centro	-
Curanilahue	-37,424889	-73,387389	Norte-Centro	Centro	-
Horcones	-37,236829	-73,228034	Norte-Centro	Centro	-
Los Maitenes	-37,241133	-73,230567	Norte-Centro	Centro	-
V. Chillancito	-37,229333	-73,223667	Norte-Centro	Centro	-
Pichilo	-37,249167	-73,213806	Norte-Centro	Centro	-
Huentelolén	-37,950500	-73,408556	Norte-Centro	Centro	-
P. Las Ballenas	-37,027028	-73,542083	Norte-Centro	Centro	5
Tres Cuevas	-37,027694	-73,521194	Norte-Centro	Centro	5
Arauco	-37,278750	-73,250487	Norte-Centro	Centro	-
Tucapel	-37,254333	-71,946012	Norte-Centro	Centro	6
Río Claro	-37,183222	-72,594583	Norte-Centro	Centro	-
Oro Verde	-36,570639	-72,188694	Norte-Centro	Centro	7
San Gregorio	-36,317780	-71,758334	Norte-Centro	Centro	-
Verquico	-36,388854	-72,150101	Norte-Centro	Centro	-
L. Avedaño	-36,754111	-72,453194	Norte-Centro	Centro	-
C. Alegría	-36,850917	-72,078333	Norte-Centro	Centro	-
El Huape	-36,624967	-72,544900	Norte-Centro	Centro	-
Itata	-36,652833	-72,229083	Norte-Centro	Centro	-
Rafael	-36,670917	-72,750833	Norte-Centro	Centro	-
Ninhue	-36,386500	-72,508278	Norte-Centro	Centro	8
Longaví	-35,950400	-71,621400	Norte-Centro	Centro	9
Curepto	-35,079833	-72,030653	Norte-Centro	Centro	10

Buchupureo	-36,075183	-72,763983	Norte-Centro	Centro	10
Reloca	-35,632812	-72,540729	Norte-Centro	Centro	10
Vegas Itata	-36,412899	-72,868664	Norte-Centro	Centro	11
San Nicolas	-36,470611	-72,224667	Norte-Centro	Centro	-
Hualpén	-36,801418	-73,160939	Norte-Centro	Centro	-
Charrua	-37,079116	-72,316721	Norte-Centro	Centro	-
La Suerte	-37,559900	-72,547875	Norte-Centro	Centro	-
Mulchén	-37,630635	-72,351954	Norte-Centro	Centro	-
Santa Elena	-37,350800	-72,524100	Norte-Centro	Centro	-
Curalí	-37,220050	-72,959450	Norte-Centro	Centro	-
Putú	-35,152694	-72,247556	Norte-Centro	Centro	-
Molina	-35,166300	-71,377230	Norte-Centro	Centro	12
Yumbel	-37,097250	-72,591650	Norte-Centro	Centro	13
Calebu	-37,963517	-73,249283	Sur	Sur	14
Elicura	-37,945583	-73,237583	Sur	Sur	14
Caupolicán	-38,020183	-73,053233	Sur	Sur	14
Rulo	-38,773444	-72,994472	Sur	Sur	15
Imperialito	-38,713139	-73,075222	Sur	Sur	15
Carahue	-38,710000	-73,070000	Sur	Sur	15
Galvarino	-38,408028	-72,753028	Sur	Sur	15
Lumaco	-38,164200	-72,902900	Sur	Sur	15
Cholchol	-38,628917	-72,851000	Sur	Sur	16
P. Saavedra	-38,860800	-73,361300	Sur	Sur	16
Los Sauces	-37,969778	-72,826861	Sur	Sur	17
Traiguén	-38,250100	-72,681823	Sur	Sur	18

Anexo1. Tabla de localidades consideradas para este estudio, su ubicación geográfica (Latitud y Longitud) y la ESU correspondiente para cada escala propuesta (Macro, Meso y Micro). Los números en columna Micro escala corresponden a los polígonos en figura 4 enumerados de arriba hacia abajo./
Annexed 1. Table of localities considered for this study, their geographical location (Latitude and Longitude) and the corresponding ESU for each proposed scale (Macro, Meso and Micro). The numbers in the Micro-scale column correspond to the polygons in figure 4 listed from top to bottom.