



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y OCEANOGRÁFICAS
Programa de Magíster en Ciencias con mención en Zoología

**DIVERSIDAD DEL GÉNERO *PSOLUS* OKEN, 1815 (ECHINODERMATA:
HOLOTHUROIDEA) EN LA PROVINCIA MAGALLÁNICA**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al grado académico de Magíster en
Ciencias con mención en Zoología

POR: Catalina Victoria Jara Vásquez

Profesor Guía: Dr. Claudio Luis Correa Quezada

Abril, 2025
Concepción, Chile

© 2025, Catalina Victoria Jara Vásquez

Ninguna parte de esta tesis puede reproducirse o transmitirse bajo ninguna forma o por ningún medio o procedimiento, sin permiso por escrito del autor.

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.

I. AGRADECIMIENTOS

Primeramente, agradezco a la beca de articulación pre-postgrado otorgada por mi casa madre, la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, con la cual pude ingresar al programa de Magíster. Agradezco al Instituto Biodiversidad de Ecosistemas Antárticos y Subantárticos por el apoyo del fondo ICN2021_002 con el cual pude dedicarme exclusivamente a la investigación de este trabajo. Igualmente, agradezco al Museo Nacional de Historia Natural de Santiago por facilitarme algunas de sus muestras.

Agradezco a mis colegas y compañeros de la universidad, especialmente a María Belén De la Puente por acompañarme y apoyarme en mi proceso de enseñanza. Igualmente, al laboratorio de Mastozoología a cargo del Dr. Enrique Rodríguez por guiarme en este proceso de elaboración y término de tesis. Y, sobre todo, al apoyo de mi madre y mi familia y, sobre todo a mi pareja Andrés Ibarra en esta etapa de mi vida.

Igualmente quiero mencionar la autoría de mi colega Darío Navarrete por su ilustración del osículo terminal de podio perteneciente al morfotipo *Psolus segregatus* (Tabla 10). Y finalmente a mi amiga Paulina Cortés por las ilustraciones digitales de los esquemas de los anillos calcáreos (Fig. 8; E y F).

II. TABLA DE CONTENIDO

I.	AGRADECIMIENTOS.....	i
II.	TABLA DE CONTENIDO	ii
III.	Índice de Tablas.....	v
IV.	Índice de Ilustraciones.....	viii
V.	RESUMEN.....	xi
VI.	ABSTRACT	xiii
I.	INTRODUCCIÓN.....	1
II.	HIPÓTESIS.....	10
III.	OBJETIVOS	11
3.1.	Objetivo general	11
3.2.	Objetivos específicos.....	11
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1.	Caracteres merísticos y análisis de macroestructuras.....	13
4.2.	Análisis de microestructuras calcáreas.....	15
4.3.	Análisis moleculares	18
4.4.	Análisis de diferenciación genética.....	19
4.5.	Relaciones genealógicas.....	19
4.6.	Reconstrucción filogenética.....	20

4.7.	Análisis de Delimitación de especies.....	21
4.8.	Integración de los métodos para conocer la diversidad de especies..	23
V.	RESULTADOS	24
5.1.	Caracteres merísticos y análisis de macroestructuras.....	24
5.2.	Análisis de microestructuras calcáreas.....	26
5.3.	Análisis moleculares	34
5.4.	Distancia genética	35
5.5.	Relaciones genealógicas.....	37
5.6.	Relaciones filogenéticas: Máxima verosimilitud (MV).....	39
5.7.	Relaciones filogenéticas: Inferencia Bayesiana.....	40
5.8.	Análisis de Delimitación de especies.....	42
5.9.	Integración de métodos	44
VI.	DISCUSIÓN	47
6.1.	El género <i>Psolus</i> en la Provincia Magallánica	49
6.2.	Caracteres merísticos morfológicos.....	52
6.3.	¿El género <i>Psolus</i> es un complejo o es críptico?	53
VII.	CONCLUSIÓN	58
	ANEXO	61
	Anexo 1: Tabla Escamas dorsales.....	61

Anexo 2: Tabla Valvas orales	64
Anexo 3: Tabla Podios	67
Anexo 4: Descripción de los morfotipos identificados con base en caracteres externos	69
7.1. Morfotipo <i>Psolus patagonicus</i> Ekman, 1925.....	69
7.2. Morfotipo <i>Psolus segregatus</i> Perrier, 1905.....	70
REFERENCIAS	72

III. Índice de Tablas

Tabla 1: Caracteres morfológicos de las valvas orales del género <i>Psolus</i> obtenidos de la revisión bibliográfica. Simbología “s/i” significa sin información.	14
Tabla 2: Caracteres morfológicos de los podios presentes en la región ventral del género <i>Psolus</i> obtenidos de la revisión bibliográfica. Simbología “s/i” significa sin información.	14
Tabla 3: Caracteres morfológicos de los podios presentes en la región ventral del género <i>Psolus</i> obtenidos de la revisión bibliográfica. Simbología “s/i” significa sin información.	15
Tabla 4: Características morfológicas de las estructuras internas, osículos, de importancia taxonómica para la identificación a nivel de especie en <i>Psolus</i> . Simbología “s/i” significa sin información.	17
Tabla 5: Primers y condiciones de la PCR usados en este estudio para obtener el gen mitocondrial COI y el gen nuclear 18S.	18
Tabla 6: Tamaños corporales máximos de las tres especies del género <i>Psolus</i> de la Provincia Magallánica, según diferentes autores.	25
Tabla 7: Ejemplares pertenecientes a los haplotipos identificados mediante COI y 18S.	26

Tabla 8: Osículos de suela identificados pertenecientes a los dos morfotipos, <i>Psolus patagonicus</i> y <i>P. segregatus</i> , identificados mediante los caracteres taxonómicos.....	28
Tabla 9: Osículos de tentáculo identificados pertenecientes a los dos morfotipos, <i>Psolus patagonicus</i> y <i>P. segregatus</i> , identificados mediante los caracteres taxonómicos.	29
Tabla 10: Osículos de podio identificados pertenecientes a los dos morfotipos, <i>Psolus patagonicus</i> y <i>P. segregatus</i> , identificados mediante los caracteres taxonómicos.....	30
Tabla 11: Correspondencia entre los morfotipos pertenecientes a los haplotipos encontrados mediante COI y 18S y la división de los clados (ver en fig. 15)....	34
Tabla 13: Presencia y ausencia de caracteres morfológicos pertenecientes a los dos morfotipos identificados por haplotipo (COI).	45
Tabla 14: Matriz de caracteres morfológicos externos, escamas dorsales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (1/3).	61
Tabla 15: Matriz de caracteres morfológicos externos, valvas orales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (1/3).	64

Tabla 16: Matriz de caracteres morfológicos externos, podios por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (1/2)..... 67

IV. Índice de Ilustraciones

Figura 1: Morfología externa del ejemplar PJI3 de <i>Psolus</i> Oken, 1815. a) vista dorsal; b) vista ventral.....	6
Figura 2: Distribución de especies del género de <i>Psolus</i> en la Provincia Magallánica. En rojo: <i>Psolus patagonicus</i> Ekman, 1925; Verde: <i>Psolus segregatus</i> Perrier, 1905 y; en azul: <i>Psolus antarcticus</i> (Philippi, 1857).	8
Figura 3: Localidades de muestreo de los ejemplares de <i>Psolus</i> Oken, 1815..	12
Figura 4: Caracteres morfológicos externos identificados para la caracterización de los morfotipos (Individuo PJI3, apertura oral: PWP12).	24
Figura 5: Terminología utilizada en la descripción de los osículos identificados. (A) Placa perforada con protuberancias perteneciente a <i>P. segregatus</i> . (B) Placas perforadas curvadas de los tentáculos pertenecientes al morfotipo <i>P. patagonicus</i> , al igual que (C), placas perforadas con proyecciones en el borde pertenecientes a la suela.	27
Figura 6: Imagen del tejido de suela bajo microscopio de los dos morfotipos identificados. A la izquierda morfotipo <i>Psolus patagonicus</i> y a la derecha morfotipo <i>Psolus segregatus</i>	31
Figura 7: Estructura no reportada en la literatura, encontrada entre los tentáculos de individuos asociados al morfotipo <i>Psolus patagonicus</i>	32
Figura 8: Morfotipos identificados. Columna izquierda morfotipo <i>Psolus patagonicus</i> (PWP12) y en la columna derecha morfotipo <i>Psolus segregatus</i>	

(PIN9). (A-B) vista dorsal, valvas orales y valvas anales (flechas verde y roja, respectivamente), (C-D) vista ventral. La barra debajo de las estructuras son 10 milímetros. 33

Figura 9: Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas entre todas las especies del género *Psolus* de la Provincia Magallánica. Cada círculo representa un haplotipo, y su tamaño la frecuencia. El color indica la localidad. Las siglas señalan los haplotipos. Los haplogrupos fueron encerrados dentro de las líneas rojas. 38

Figura 10: Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas del gen 18S entre las especies del género *Psolus* de la Provincia Magallánica. Cada círculo representa un haplotipo, y su tamaño la frecuencia. El color indica la localidad. 38

Figura 11: Reconstrucción filogenética del género *Psolus* con los genes de COI y 18S concatenados, bajo el criterio de Máxima verosimilitud. El número junto al nodo indica el soporte de bootstrap (1000 pseudoréplicas). Valores menores del 50% se omiten. La barra de escala indica el número de sustituciones por unidad de longitud de rama. 40

Figura 12: Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior. El color morado claro representa el clado de morfotipo *Psolus patagonicus*, clado morado oscuro interior. 41

Figura 13: Árbol de inferencia bayesiana que muestra la agrupación de las distintas UTOs obtenidas con los análisis de delimitación de especies. Las barras verdes representan las UTOs delimitadas por PTP y las azuladas a mPTP, las barras con tonalidades rosadas las UTOs delimitadas por GMYC y la última barra a la derecha de coloración azul la delimitación por BPP..... 43

Figura 14: Árbol de inferencia bayesiana construido con los genes COI y 18S. Se muestran diferentes morfologías de los morfotipos de los diferentes haplotipos dentro de los clados. Los individuos pertenecientes al clado A1 pertenecen al Haplotipo 4, dentro podemos observar a los individuos de izquierda a derecha (PWP13, PIN8 y PWP17), clado A2 perteneciente al haplotipo 35 (PUS17) y en el clado B perteneciente al haplotipo 38 (PIN9). La barra debajo de los individuos indica 10 mm. 46



V. RESUMEN

La importancia de documentar la biodiversidad es vital para proteger y conservar las especies. Sin embargo, la biodiversidad marina ha sido menos estudiada e investigada debido a su difícil acceso y morfología compleja. Es notable el caso de la familia Psolidae dentro de la clase Holothuroidea, que presenta una morfología única en relación con los demás pepinos de mar, dorsoventralmente aplanados, con escamas en su dorso y una región ventral plana con podios marginales.

Dentro de este conjunto, el género *Psolus* es el más diverso, contando con 58 especies nominales, de las cuales *P. patagonicus*, *P. antarcticus* y *P. segregatus* se encuentran en la Provincia Magallánica. En este contexto, este estudio tiene como objetivo esclarecer las diferencias genéticas y morfológicas de estas tres especies de *Psolus* recolectadas en la Provincia Magallánica, a través de un enfoque de taxonomía integrativa. Los análisis morfológicos externos e internos permitieron la identificación de dos morfotipos y dos clados bien diferenciados.

Además, la delimitación de especies mediante los métodos PTP y GYMC identificó dos unidades taxonómicas operativas (UTO), *P. patagonicus* y *P. segregatus*, mientras que el método de validación se basa en la existencia de especies hipotéticas primarias que pueden probarse a posteriori mediante el método de validación BPP que agrupó todas las muestras en una única especie. Estos resultados demuestran la amplia variación fenotípica externa que puede presentar *P. patagonicus*, y cómo puede ser fácilmente confundida con *P. segregatus*.

Además, ponen en cuestión la presencia de *P. antarcticus* en la Provincia

Magallánica, subrayando la necesidad de futuras investigaciones para aclarar la distribución de esta especie en la región.

VI. ABSTRACT

The importance of documenting biodiversity is vital to protect and conserve species. However, marine biodiversity has been less studied and researched due to its difficult access and complex morphology. The case of the family Psolidae within the class Holothuroidea is outstanding, which presents a unique morphology in relation to other sea cucumbers, as its species are characterized by dorsoventrally flattened bodies, with scales on their dorsum and a flat ventral region with marginal podia. Within the family, the genus *Psolus* is the most diverse, with 58 nominal species, of which *P. patagonicus*, *P. antarcticus* and *P. segregatus* are found in the Magellanic Province. In this context, this study aims to clarify the genetic and morphological differences of these three *Psolus* species collected in the Magellanic Province, through an integrative taxonomy approach. External and internal morphological analyses allowed the identification of two morphotypes and two distinct clades. In addition, species delimitation using the PTP and GYMC methods identified two operational taxonomic units (OTU), *P. patagonicus* and *P. segregatus*, while the validation method, Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP) grouped all samples into a single species. These results demonstrate the wide external phenotypic variation that *Psolus patagonicus* can exhibit, and how it can be easily confused with *P. segregatus*. Furthermore, they call into question the presence of *P. antarcticus* in the Magellanic Province, highlighting the need for future research to clarify the distribution of this species in the region

I. INTRODUCCIÓN

La biodiversidad es un amplio concepto multidimensional que abarca la variedad de la vida en todos sus posibles niveles organizativos. La medida más simple y común utilizada en los estudios sobre biodiversidad corresponde a la riqueza de especies, es decir, el número de especies. Con esto se compara la diversidad taxonómica entre y/o dentro de ecosistemas en una determinada escala de tiempo (Sala & Knowlton, 2006).

Desde hace un tiempo, diversos trabajos científicos han señalado que la biodiversidad estaría experimentando una acelerada disminución, debido a dos principales problemáticas: 1) la pérdida concreta de seres vivos, causada por la acción antrópica mediante disminución y pérdida de hábitat, la sobreexplotación, contaminación, introducción de especies invasoras, el cambio climático y la acidificación de los océanos (Craig, 2023) y 2) el impedimento taxonómico, que surge de la falta de especialistas que permitan la determinación de nuevas especies, lo que conlleva a una pérdida de biodiversidad aún desconocida (Sala & Knowlton, 2006; Rull, 2022; Craig, 2023). En este contexto, los impedimentos taxonómicos incluyen también a aquellas descripciones poco robustas, aquellas que son incongruentes y otras que han resultado ser sobre estadios puntuales del ciclo de vida (Godfray, 2002; Mace, 2004; Sattler, 2022), contribuyendo a un registro incompleto de la biodiversidad global (Martens & Segers, 2005). Esta denominada biodiversidad desconocida es aún más evidente en el ambiente marino (Sala & Knowlton, 2006; Craig, 2023), ya sea porque la biota posee una

compleja morfología o por el difícil acceso tanto a cierto lugares y profundidades, como a ejemplares para su estudio (Godfray, 2002; Mace, 2004; Sala & Knowlton, 2006).

La identificación de una especie depende del concepto que se utilice, lo que generalmente depende, además, del objetivo del estudio. Actualmente se han descrito muchos conceptos de especie (Mayr, 1942; Simpson, 1951; Mishler, 1985; Andersson, 1990; Ball et al., 1990; Nixon & Wheeler, 1990; Lambert & Spencer, 1995; Mallet, 1995; Templeton, 1998; Hennig, 1999), siendo los más conocidos el concepto ecológico, evolutivo, filogenético y el biológico, este último el más utilizado para la determinación de una especie (Wright, 1940). Sin embargo, al existir diferentes conceptos de especie, muchos de ellos resultan ser incongruentes entre sí debido a las diferentes propiedades que enfatiza cada uno, dificultando aún más una adecuada estimación de la biodiversidad. Ante esto, el concepto unificado de especie propuesto por De Queiroz (2007), se presenta como una apropiada solución al considerar a una especie como un linaje metapoblacional que evoluciona por separado y utiliza múltiples criterios de diagnóstico para su delimitación. A través de un método de taxonomía integrativa, término introducido en la literatura por Dayrat (2005) y Will et al. (2005), que busca incluir no solo datos moleculares, como el ADN mitocondrial, sino también caracteres morfológicos y otros tipos de información tales como filogeografía, morfología comparativa, genética de poblaciones, ecología, desarrollo, comportamiento, entre otros que, puedan ayudar a formular hipótesis sobre la delimitación de especies, es posible resolver discrepancias. La literatura reporta

que este método es cada vez más utilizado para resolver problemáticas taxonómicas, como las que surgen con las especies crípticas (Borges et al., 2017; Baeza & Prakash, 2019; Conforti & Costantini, 2022; Layeghi et al., 2022) y tiende a reportar nuevas especies para la ciencia (Saucède et al., 2015; BurrIDGE et al., 2019; Bellodi et al., 2019; Bellodi et al., 2022; Knauber et al., 2022). No obstante, aún varias taxa marinos siguen siendo poco conocidos y estudiados (Gómez Daglio & Dawson, 2019). Según el trabajo de Robin Craig en 2023, a nivel global el porcentaje de la biodiversidad de animales marinos conocida es de solo un 15%.

Un grupo marino diverso y con morfología compleja es el phylum de los equinodermos, grupo de invertebrados estrictamente marinos que se encuentran en todos los océanos (Pawson et al., 2010). Habitan desde el intermareal hasta las profundidades abisales, ya sea enterrados en la arena, en el fango, entre rocas y en arrecifes (Toral-Granda & Islands, 2006; Prieto Ríos, 2010).

Este phylum está conformado por cinco clases: Crinoidea (lirios de mar), Asteroidea (estrellas de mar), Ophiuroidea (estrellas frágiles), Echinoidea (erizos de mar) y, la más reciente y diferenciada, la clase Holothuroidea (pepinos de mar) (Prieto Ríos, 2010; Smirnov, 2012; Solís-Marín et al., 2014). Si bien este phylum es diverso con un rico y extenso registro fósil (Alvarado & Solís-Marín, 2013), aún existen importantes vacíos en áreas como la taxonomía, sistemática, biogeografía y ecología (Saucède et al., 2015; Martínez et al., 2018). En Chile, este phylum está representado por alrededor de 400 especies nominales con registros en ambientes intermareales de bloques y canto (Ríos et al., 2005), en ambientes sublitorales

someros y profundos, en sistema de fiordos y canales australes (Mutschke & Ríos, 2006) y en sustratos biogénicos (Ríos et al., 2007).

Según Larraín (1995), la clase Holothuroidea está representada en las costas de Chile por 74 especies, no obstante, se considera que existirían 69 especies (Martínez, julio de 2020, comunicación personal).

Estos animales presentan un cuerpo más o menos cilíndrico con una boca situada en el extremo anterior rodeada por tentáculos bucales (Pawson, 1980; Alvarado & Solís-Marín, 2013) y presentan la singular característica de que su endoesqueleto (carácter diagnóstico del Phylum) está reducido a microestructuras calcáreas entre 20 y 600 μm llamadas “osículos”, compuestos de carbonato de calcio (Pawson, 1980; Prieto Ríos, 2010). La forma de estas minúsculas estructuras internas es de valor taxonómico para la discriminación a nivel de especie, ya que es recurrente que un tipo de forma sea característica de algún tejido para una determinada especie (Solís-Marín et al., 2005; Pawson et al., 2010; Martínez, 2014; Prata et al., 2020). Además, los holoturoideos presentan una macroestructura calcárea llamada “anillo calcáreo”, que también es de valor taxonómico, pero a nivel de familia, como también lo son la forma y disposición de las vesículas de Poli, gónadas, músculos retractores, árboles respiratorios, forma de los músculos longitudinales, disposición y trayectoria del intestino (Arriaga Ochoa & Solís-Marín, 2007; Prieto Ríos, 2010). No obstante, a pesar de todas estas características morfológicas de valor taxonómico, aún existe desconocimiento sobre la taxonomía y biodiversidad de esta clase (Mutschke & Ríos, 2006).

La clase Holoturoidea está conformada por seis órdenes: Aspidochirotida (Grube, 1840), Elasipodida (Théel, 1882), Molpadiida (Haeckel 1896), Apodida (Brandt, 1835) y Dendrochirotida (Grube, 1840), siendo este último el más diverso (Smirnov, 2012; Miller et al., 2017) y del cual destaca la familia Psolidae (Burmeister, 1837), cuyo cuerpo está recubierto por escamas de carbonato de calcio en la región dorsal y lateral, lo que les da una apariencia más rígida y aplanada dorsoventralmente, con una región ventral (denominada “suela”) libre de escamas con podios marginales que permiten la adhesión al sustrato (Fig. 1) (O’Loughlin & Whitfield, 2010). Esta familia se subdivide en seis géneros (*Ceto* Gistel, 1848; *Ekkentropelma* Pawson, 1971; *Lissothuria* Verrill, 1867; *Neopsolidium* Pawson, 1964; *Psolidium* Ludwig, 1887; y *Psolus* Oken, 1815), siendo de particular interés *Psolus*, el que, con 58 especies en todo el mundo, es el más diverso de la familia (Martínez, 2014; Miller et al., 2017). Este género se caracteriza porque las escamas están muy bien desarrolladas (imbricadas o continuas) formando una especie de escudo rígido que cubre casi toda la superficie dorsal, con podios presentes principalmente en la parte ventral y lateral del cuerpo (podios dorsales están reducidos o completamente ausentes), lo que refuerza la capacidad del animal para adherirse firmemente a superficies duras, con una marcada separación de la zona ventral o suela (Fig. 1). Suelen presentar diez tentáculos orales dendríticos, ocho largos y dos pequeños, que son más robustos y ramificados, adaptados para capturar partículas de alimento del agua

(O'Loughlin & Whitfield, 2010; Fernández-Rodríguez et al., 2018; Martins & Tavares, 2019).

Varios autores han señalado que algunas descripciones taxonómicas para un importante número de especies de *Psolus* no son suficientemente robustas, con caracteres diagnósticos poco útiles (Ekman, 1923; Deichmann, 1941, 1947; O'Loughlin & Whitfield, 2010; Martínez, 2014). Por ejemplo, ya en el año 1923 Ekman mencionó que los osículos, principal carácter para determinar a nivel de especie, no serían suficientemente útiles porque no existirían diferencias significativas para una adecuada determinación, poniendo en duda la diversidad de especies establecida para *Psolus*. Los caracteres de diagnóstico para las especies de *Psolus* son comúnmente macroestructurales, como la forma de las valvas orales y número de escamas dorsales entre las aberturas oral y anal (Ekman, 1925; Pawson, 1969; Martínez, 2014), mientras que a nivel interno, son los mencionado osículos (Ekman 1923, 1953; Deichmann, 1958; Arriaga Ochoa & Solís-Marín, 2007; Pawson et al., 2010; Prieto Ríos, 2010; Davey & Whitfield, 2013; Martínez, 2014; Prata et al., 2020).

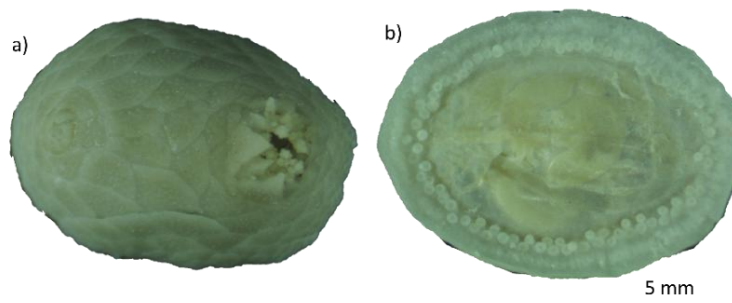


Figura 1: Morfología externa del ejemplar PJI3 de *Psolus* Oken, 1815. a) vista dorsal; b) vista ventral.

El conocimiento científico sobre las especies del género *Psolus* presentes en la costa de Chile aún es precario, más aún en la zona sur en la Provincia Magallánica, donde la complejidad de la costa con los sistemas de fiordos y canales ha repercutido en la realización de pocos estudios. La Provincia biogeográfica Magallánica abarca cinco ecorregiones marinas¹ (Spalding et al., 2007) y se extiende desde los 41°S por el sector Pacífico hacia el sur y luego hacia el sector Atlántico de Sudamérica hasta los ~42°S (Regan, 1914; Briggs, 1974; Camus, 2001). En esta extensa Provincia se han descrito tres especies del género *Psolus* que comparten y sobreponen parte de su distribución (Fig. 2): *Psolus segregatus* (Perrier, 1905), que se distribuye por la costa del Pacífico desde 41°30"S hasta aproximadamente 42°S en el océano Atlántico, incluyendo Tierra del Fuego, Estrecho de Magallanes, Isla de los Estados, Cabo de Hornos y la Península Antártica entre los 7 y 207 metros de profundidad (Pawson, 1969; Martínez, 2014; Barboza et al., 2011; Häussermann et al., 2021;); *Psolus patagonicus* (Ekman, 1925), se distribuye el sector Pacífico en Cabo de Hornos y en el Estrecho de Magallanes (52°-53°S), incluida la Península Antártica hasta por el lado Atlántico entre los 38°S y 54°S, con una distribución batimétrica desde el intermareal hasta los 308 metros, presentando una distribución amplia en la Provincia Magallánica (Mutschke & Ríos, 2006; Barboza et al., 2011; Martínez, 2014; Martínez et al., 2024); *Psolus antarcticus* (Philippi, 1857), se distribuye en el Estrecho de Magallanes y aguas aledañas, incluyendo la Isla de los Estados, las

¹ Las Ecorregiones Marinas del Mundo (MEOW) y las provincias pelágicas son: el Golfo Norpatagónico, la Plataforma Continental Patagónica, las Islas Malvinas/Falkland; los Canales y Fiordos del Sur de Chile y la región Chiloense, según Spalding et al., 2007.

islas Malvinas/Falkland, hasta las islas subantárticas y la Península Antártica, con rangos batimétricos entre los 35 a 310 metros de profundidad (Vaney, 1906; Pawson, 1969; Barboza et al., 2011; Martínez, 2014).

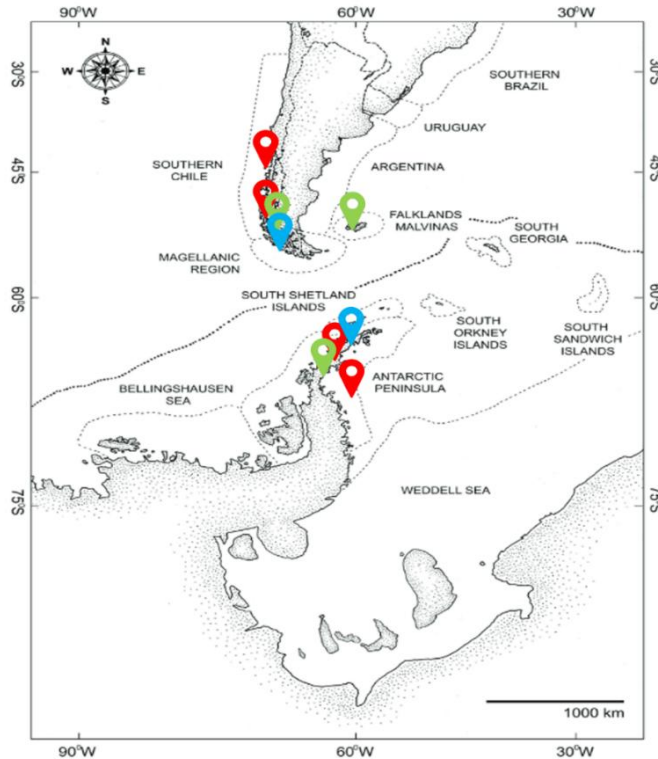


Figura 2: Distribución de especies del género de *Psolus* en la Provincia Magallánica. En rojo: *Psolus patagonicus* Ekman, 1925; Verde: *Psolus segregatus* Perrier, 1905 y; en azul: *Psolus antarcticus* (Philippi, 1857).

Estas tres especies se diferencian por las valvas orales y número de escamas dorsales entre las aberturas oral y anal (Ekman, 1925; Pawson, 1969; Martínez, 2014). No obstante, se ha reportado que estos caracteres no aplican para ejemplares pequeños o para aquellos que no se sabe en qué estado del desarrollo se encuentran (Martínez, 2014). Por ejemplo, Ekman (1923) revisó ejemplares de la subespecie determinada por Perrier *Psolus squamatus* var. *segregatus* provenientes del Cabo de Hornos y determinó que sus diferencias morfológicas no

serían suficientes para separar a estos individuos de *P. squamatus*, presente en el norte de Europa. Luego, Massin & Hendrickx (2011) plantean que el problema taxonómico que representa el “complejo *P. squamatus*” no se resolvería hasta que se disponga de evidencia molecular. Sin embargo, Martínez (2014) determinó que Perrier (1905) y Ekman (1923), se basaron solamente en caracteres externos, encontrando diferencias significativas en el número y forma de las valvas orales y el número de escamas entre la boca y el ano entre individuos adultos de ambas especies.

Actualmente, estudios genéticos sobre el género *Psolus* siguen siendo en extremo escasos. El único trabajo es el de O’Loughlin et al. (2011), quienes, investigando la diversidad de pepinos de mar de la Región Antártica, proponen la presencia de un complejo *Psolus antarcticus*, debido a que obtienen diferentes Unidades Evolutivas Significativas (ESUs; Moritz, 1994), que probablemente se habrían diferenciado hace poco tiempo, recomendando más estudios moleculares (O’Loughlin et al., 2011). Gracias a este trabajo, se dispone de secuencias de la especie *P. antarcticus* en las bases de datos Genbank y BoldSystem (fragmento mitocondrial del gen COI), mientras que aún falta información molecular para las otras dos especies que habitan la Provincia Magallánica, *P. segregatus* y *P. patagonicus*. Por lo tanto, debido a que las descripciones taxonómicas del género *Psolus* son poco robustas y útiles para la determinación de especies y que esto conlleva al desconocimiento de la diversidad de este género en la Provincia Magallánica, este proyecto busca a través de una aproximación integrativa dar cuenta de la diversidad de especies de *Psolus* en la Provincia de Magallanes.

II. HIPÓTESIS

Debido a que las tres especies del género *Psolus* reportadas para la Provincia Magallánica tienen distribuciones geográficas parcialmente superpuestas, sus descripciones basadas en caracteres morfológicos han sido reportadas como poco robustas y que el único trabajo molecular sobre una de ellas (*P. antarcticus*) reporta la posible presencia de especies aún no descritas, la diversidad de holoturias del género *Psolus* presentes en la Provincia Magallánica es mayor a tres especies.

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Reevaluar la diversidad de especies del género *Psolus* presentes en la Provincia Magallánica mediante una aproximación integrada de análisis morfológicos y métodos filogenéticos.

3.2. Objetivos específicos

1. Caracterizar la morfología de las macro y microestructuras calcáreas, y los caracteres merísticos de importancia taxonómica de especímenes del género *Psolus* procedentes de la Provincia Magallánica.
2. Reconstruir las relaciones filogenéticas utilizando una aproximación multilocus.
3. Determinar el número de especies del género *Psolus* de la Provincia Magallánica mediante métodos de delimitación de especies y taxonomía integrativa.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Para reevaluar la diversidad de especies del género *Psolus* presentes en la Provincia Magallánica mediante una aproximación integrada, se analizaron especímenes conservados en etanol al 70%, que fueron recolectados en el submareal somero mediante buceo (batimetría de 0 a 30 metros) (por la Dra. Angie Díaz Lorca^{1,2} y Andrea Martínez^{1,3}) de diversas localidades. Sector Atlántico: Islas Malvinas/Falkland (50 individuos). Sector Pacífico: Isla Carlos III (11 individuos); Cabo de Hornos (10 individuos); Canal Ocasión (2 individuos); Puerto Williams (9 individuos) y Ushuaia (28 individuos).

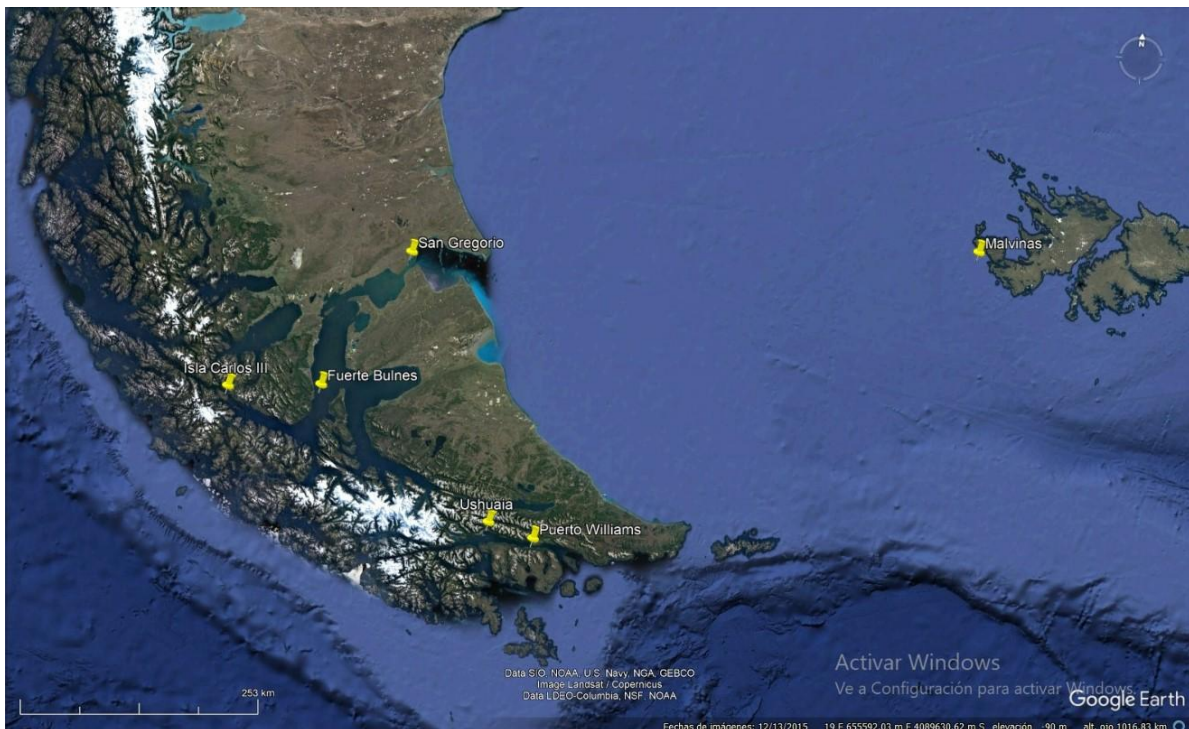


Figura 3: Localidades de muestreo de los ejemplares de *Psolus* Oken, 1815.

¹Instituto Milenio de Ecosistemas Antárticos y Subantárticos (BASE) and Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile; ²Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile; ³Área Zoología de Invertebrados, Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile
Financiamiento: BASE ICN2021_002

4.1. Caracteres merísticos y análisis de macroestructuras

Mediante una revisión bibliográfica exhaustiva sobre los caracteres diagnósticos utilizados para la determinación de especies del género *Psolus*, se elaboró una matriz con la presencia (1) y la ausencia (0) de cada carácter descrito por cada autor (Ver Anexos 1, 2 y 3). Con base en esta revisión, los caracteres fueron separados en tres categorías para una rápida y mejor comprensión: (1) caracteres de escamas dorsales (Tabla 1); (2) caracteres de valvas orales (Tabla 2); y (3) caracteres de podios (Tabla 3). Es importante recalcar la existencia del sesgo personal de no “ver” o identificar el carácter, y más aún si las descripciones son poco claras.

Posteriormente, se realizó una detallada clasificación preliminar de los caracteres obtenidos desde la literatura para todos los individuos (110 individuos). Mediante una lupa estereoscópica binocular (8X-50X) AC240V 12V 29W y un pie de metro, cada ejemplar fue observado y medido para registrar los siguientes caracteres externos: largo y ancho del individuo, número de tentáculos, número y disposición de podios, número de filas de podios, tipo de suela, número de escamas entre la abertura oral y anal, y diámetro de la abertura oral y anal. Tomando además registro fotográfico de cada ejemplar con una lupa AmScope 3.7, que posee una cámara integrada tipo TOUPCAM™ FMA 050.

Tabla 1: Caracteres morfológicos de las valvas orales del género *Psolus* obtenidos de la revisión bibliográfica. Simbología “s/i” significa sin información.

Referencias	Valvas orales		
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. segregatus</i>
Deichmann, 1941	con dientes radiales en el interior de las valvas	s/i	Numerosas valvas no regulares, excepto en juveniles
Pawson, 1968	formas regulares	5 valvas, sin escamas pequeñas circundantes	s/i
Pawson, 1969	pequeñas valvas radiales	Sin valvas radiales	desarrolladas irregularmente, numerosas, más de 5 valvas
Hernández, 1985	cubierto por 10 valvas	boca y ano cubierto por 5 valvas triangulares	cubierto por varias valvas
Mackenzie & Whitfield, 2011	s/i	5 valvas grandes, a veces compuestas, con poca o ninguna invasión por escamas cercanas de la pared corporal	s/i
Davey & Whitfield, 2013	s/i	sin invasión por escamas	s/i
Martínez, 2014	5 valvas triangulares y 5 valvas interdentes	5 valvas triangulares	6-7 valvas y 5 valvas interdentes

Tabla 2: Caracteres morfológicos de los podios presentes en la región ventral del género *Psolus* obtenidos de la revisión bibliográfica. Simbología “s/i” significa sin información.

Referencias	Escamas dorsales		
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. segregatus</i>
Deichmann, 1941	Pequeñas escamas intercaladas entre las escamas principales	s/i	12 escamas entre boca y ano.
Pawson, 1968	s/i	s/i	s/i
Pawson, 1969	s/i	s/i	delgadas, lisas a cubiertas por gránulos
Hernández, 1985	s/i	granuladas	fina con gránulos
Mackenzie & Whitfield, 2011	s/i	grandes dorso- laterales irregulares, hasta 10 mm longitud finamente granulados	s/i
Davey & Whitfield, 2013	s/i	s/i	s/i
Martínez, 2014	5 a 8 escamas entre oral y anal	>10 escamas entre oral y anal	verrugas en cara dorsal 10 a 14 escamas entre oral y anal

Tabla 3: Caracteres morfológicos de los podios presentes en la región ventral del género *Psolus* obtenidos de la revisión bibliográfica. Simbología “s/i” significa sin información.

Referencias	Podios		
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. segregatus</i>
Deichmann, 1941	1-2 filas	s/i	con podios marginales
Pawson, 1968	s/i	2 filas de podios alrededor del margen, 5 podios anteriores y posteriores. Sin podios midventral	s/i
Pawson, 1969	s/i	s/i	s/i
Hernández, 1985	corona marginal de podios y medio ventral desnuda	s/i	bordea la suela, ausentes en medio ventral
Mackenzie & Whitfield, 2011	s/i	hileras internas pareadas, zig-zag más grandes y periféricas más pequeños dispersos, desnudos en la parte central, aunque los pies tabulares se extienden de forma variable a los extremos sobre línea media ventral	s/i
Davey & Whitfield, 2013	s/i		s/i
Martínez, 2014	al margen en hilera simple disposición en zig-zag.	dispuestos en 3 bandas, 2 laterales en zig-zag y una central en zona extremo anterior y posterior	Dispuesto al margen de la suela, en zig-zag, doble hilera e hilera simple en ejemplares pequeños. Región media con hilera simple intermitente

4.2. Análisis de microestructuras calcáreas.

Para el análisis de las microestructuras internas, se seleccionó un subconjunto de ejemplares a partir de los resultados moleculares obtenidos para el fragmento mitocondrial COI, priorizando la elección de los haplotipos únicos. No obstante, en el caso particular del haplotipo 4, que se presenta en tres localidades distintas, se optó por seleccionar un individuo de cada una de las tres localidades; Islas Malvinas/ Falkland, Ushuaia y Puerto Williams (ver Tabla 11).

Los individuos seleccionados fueron diseccionados mediante un bisturí Nr. 11, para separar 10 diferentes tejidos: suela, podios, intestino, tentáculos orales, anillo

calcáreo, músculo suspensor de la cloaca, músculo longitudinal, vesícula de Poli, gónada y árbol respiratorio. Cada tejido fue conservado en etanol al 70%. Se elaboró un protocolo de trabajo para la extracción y aislamiento de osículos bajo microscópico (ZEISS Axioscope 5), para observar y describir los osículos de las partes corporales de importancia taxonómica para la identificación a nivel de especie. Estos son: podios, tentáculos, suela e intestino (ver Tabla 4). Igualmente, para mantener un registro mediante una cámara ZEISS Axiocam 208 color.

El protocolo de extracción y aislamiento de osículos se llevó a cabo con un pequeño fragmento de cada tejido dispuesto sobre un portaobjeto, adicionando un pequeño volumen de una solución de hipoclorito de sodio concentrado durante ~5 segundos, hasta lograr la precipitación de los osículos. Posteriormente, los residuos de la solución de hipoclorito de sodio fueron eliminados mediante lavados consecutivos con agua destilada, retirando el sobrenadante con la ayuda de papel absorbente. Luego, se deshidrataron los osículos para finalmente realizar el montaje sobre un nuevo portaobjeto para su observación y registro fotográfico.

Por otra parte, se realizó una revisión bibliográfica exhaustiva sobre las descripciones de los osículos de importancia taxonómica para la determinación a nivel de especie para el género *Psolus* (Tabla 4). Con esto, las observaciones de los osículos fueron tabuladas (Tabla 8, 9 y 10) para sistematizar el análisis cualitativo de estos caracteres morfológicos y facilitar una correcta determinación de los ejemplares a nivel taxonómico más bajo posible (a nivel de especie), de acuerdo con la literatura revisada.

Tabla 4: Características morfológicas de las estructuras internas, osículos, de importancia taxonómica para la identificación a nivel de especie en *Psolus*. Simbología “s/i” significa sin información.

	Referencias	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>
Suela	Deichmann, 1941	levemente cóncavos, botones con 4 hoyos pequeños, con número variado de bultos a veces unidos en cruz.	botones delicados de 4 hoyos, proyecciones cortas y largas marginales, algunas con verrugas.	s/i
	Pawson, 1968	s/i	s/i	Botones con proyecciones, con 4 perforaciones grandes, y más pequeñas al margen
	Hernández, 1985	canastas y placas tuberculadas	placas tetra perforadas, algunas barras	botones tetra perforados con protuberancias marginales
	Davey & Whitfield, 2013	s/i	s/i	ausencias de tazas/cups
	Martínez, 2014	placas multiperforadas con bordes lobulados, 4 orificios con concavidad	placas de hasta 10 orificios con 2-3 proyecciones en los extremos de cada orificio	s/i
Podios	Deichmann, 1941	Placa terminal y placas perforadas	Placa terminal y algunas varillas perforadas	s/i
	Pawson, 1968	s/i	s/i	s/i
	Hernández, 1985	s/i	barras largas y perforadas	s/i
	Martínez, 2013	barras y placa terminal	barras de 5-9 huecos	barras perforadas y placas terminales circulares con múltiples perforaciones
Tentáculos	Deichmann, 1941	placas perforadas anchas	s/i	s/i
	Hernández, 1985	placas curvas	placas oblongas multiperforadas	placas irregulares multiperforadas
	Martínez, 2014	barras	barras curvas de 6- 11 huecos y rosetas	barras perforadas

4.3. Análisis moleculares

La extracción de ADN de los 110 individuos fue realizada usando el kit “E.Z.N.A Mollusc DNA Kit” (Omega Bio-tek, Omega Bio-Tek, Norcross, GA, USA), siguiendo el protocolo de manufactura, modificando únicamente el tiempo de reacción de la proteinasa K (24 horas adicionales). La amplificación del fragmento génico correspondiente a la región mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI), se llevó a cabo para todos los individuos, obteniendo 63 secuencias de dicho fragmento. Para la obtención de un fragmento del ARN ribosómico 18S, se seleccionaron ocho individuos en base a los ocho haplotipos obtenidos para el fragmento mitocondrial COI, utilizando técnicas de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en el laboratorio del LEMMAR, ubicado en la Universidad de Concepción (UdeC), siguiendo protocolos propios (Tabla 5). Los productos de PCR fueron purificados y enviados a secuenciar a la empresa MACROGEN (Korea) y AUSTRAL-Omics (Valdivia).

Tabla 5: Primers y condiciones de la PCR usados en este estudio para obtener el gen mitocondrial COI y el gen nuclear 18S.

Gen	Primers	Secuencia del primer	Ciclos de PCR	Fuente
COI	CO1e-F	ATAATGATAGGAGGRT TTGG	95°C/1 min; 45 x (95°C/30s, 50°C/45s, 72°C/80s); 72°C/10 min	Arndt et al., 1996
	COI1e-R	GCTCGTGTRTCTACRTCCAT		
18S	18S_F2	CTGGTTGATYCTGCAGT	94°C/3 min; 35 x (94°C/30s, 55°C/45s, 72°C/80s); 72°C/10 min	
	18S_R2	ATTACCGCGGCTGCTGGC		

4.4. Análisis de diferenciación genética

Las secuencias fueron editadas, corregidas y alineadas con el programa PROSEQ ver.3 (Filatov, 2002), realizando la corrección del marco de lectura con el código genético para ADN mitocondrial de invertebrados en el programa MEGA (Kumar et al., 2018). El análisis de distancia genética intra y entre especies fue calculado utilizando el fragmento del gen mitocondrial COI de diferentes especies del género *Psolus*, disponibles en GenBank del National Center for Biotechnology (NCBI, por sus siglas en inglés). Para estimar el distancia p, proporción (p) de sitios nucleotídicos entre dos secuencias comparadas, se utilizó el programa Mega11 versión 11.0.13 (Tamura et al., 2021). Durante el proceso, se consideraron tanto las transiciones como las transversiones, y se trató adecuadamente la presencia de espacios vacíos y datos faltantes mediante la eliminación por pares.

4.5. Relaciones genealógicas

Las secuencias de cada fragmento fueron alineadas con MUSCLE (Edgar, 2004), implementado en MEGA X (Kumar et al., 2018). La saturación de las secuencias fue evaluada mediante el test de Xia (Xia et al., 2002) en DAMBE7 (Xia, 2001, 2018).

Para determinar las relaciones genealógicas entre las localidades del género *Psolus*, se realizaron redes de haplotipos utilizando el algoritmo de “TCS Network” (Clement et al., 2000) a través de software PopART (Leigh & Bryant, 2015). Este

análisis permite determinar el número y la frecuencia de haplotipos, junto con su distribución en las localidades de la Provincia Magallánica, además de reconocer aquellos haplotipos más antiguos.

4.6. Reconstrucción filogenética

Para complementar el estudio morfológico en la identificación de linajes evolutivos de equinodermos de manera acertada y eficiente (Ward et al., 2008; Corstorphine, 2010; Sonet et al., 2022), se utilizaron fragmentos de dos genes para la reconstrucción filogenética de *Psolus* (Hoareau & Boissin, 2010; Yamasaki & Fujimoto, 2014; Randsø et al., 2019). Debido a que el marcador mitocondrial COI representa una región conservada, se incluyó el fragmento del ARN ribosómico 18S (Tabla 7, sección 2.2).

Las secuencias COI y 18S, fueron concatenadas en Mesquite 3.81, utilizando a *Psolidium tenue* Mortensen, 1925 como outgroup (GenBank code: HM196733). Se realizaron los análisis de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB) utilizando solamente los haplotipos únicos del marcador COI y 18S. Las reconstrucciones para ML se generaron utilizando un modelo de partición de codones y estimó el mejor modelo de sustitución de acuerdo a los datos en RAxML v 8.1.2 (Stamatakis, 2014) a través de la interfaz raxmlGUI (Silvestro & Michalak, 2012). Para evaluar el soporte de las ramas, se realizarán 10 ejecuciones con 1.000 bootstraps cada una. Para las reconstrucciones de IB, se utilizó CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010) y el software PartitionFinder v2 (Lanfear et al., 2017) para seleccionar los esquemas de partición y los modelos

de evolución más adecuados, esto se realizó con MrBayes 3.2 (Ronquist et al., 2011) que utiliza el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). El set de secuencias del gen mitocondrial y nuclear fueron analizados mediante inferencia Bayesiana en BayesPhylogenies (Pagel & Meade, 2004). Se empleó el modelo evolutivo de Tiempo Generalizado Reversible (GTR) con seis categorías gamma (G+I) mediante cuatro Cadenas de Markov y Monte Carlo (MCMC); las iteraciones fueron 10.000.000 para asegurar que las cadenas de MCMC alcanzaran la estacionalidad, la que fue verificada con Tracer v1.7.1 (Rambaut et al., 2018). Las cadenas muestrearon 20 millones de generaciones y la frecuencia muestreo fue cada 10.000 árboles. Se descartó el 25% como burning en TreeAnnotator v.2.7.6, 2002-2023 (Bouckaert et al., 2014) y obtener un árbol de máxima credibilidad de clado (MCC). El árbol obtenido fue editado en FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

4.7. Análisis de Delimitación de especies.

Debido a que las especies bajo estudio presentan modo de desarrollo directo, la revisión de Luo et al. (2018) propone que los análisis de delimitación a realizar para este tipo de desarrollo son dos métodos de descubrimiento, Poisson Tree Processes (PTP) y Generalized mixed Yule-coalescent (GMYC) y, un método de validación Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP) (Carstens et al., 2013). Es importante mencionar que sólo se ha reportado por *P. pataonicus* y *P. antarcticus* que presentan método de desarrollo directo mediante incubación, sin embargo, no aplica para todas las especies del género *Psolus*.

Los métodos con un enfoque de descubrimiento identifican grupos putativos sin una identificación a priori, mientras que los enfoques de validación se basan en la existencia de especies hipotéticas primarias que pueden probarse a posteriori (Carstens et al., 2013).

Mediante el software BEAST2 version 2.7.4. (27 de marzo 2023), se aplicó el método Generalized mixed Yule-coalescent (GMYC) (Fujisawa & Barraclough, 2013; Michonneau, 2017), que utiliza un marco bayesiano para proporcionar valores a priori, permitiendo inferir la topología y la longitud de las ramas del árbol mediante análisis independiente de Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Se utilizó un árbol ultramétrico, con un reloj molecular relajado lognormal, que contempla una tasa de divergencia molecular heterogénea entre linajes con diferente distribución estadísticas, donde las tasas tienden a agruparse alrededor de un valor medio y permanecen constantes (Drummond et al., 2006).

Para el método Poisson tree processes (PTP) (Kapli et al., 2017), que modela eventos de especiación o ramificación en términos del número de sustituciones, requiriendo únicamente un árbol filogenético, se empleó un árbol de inferencia Bayesiana (IB) (Zhang et al., 2013). PTP delimitó especies basándose en el concepto filogenético de especie, por lo que las entidades resultantes fueron consideradas especies hipotéticas. UTO-picking, por su definición, se empleó para delimitar la Unidad Taxonómica Operativa (UTO). Esencialmente, las UTO se definen como agrupaciones de secuencias, y los métodos de selección de UTO aplican algoritmos de agrupación a estas secuencias (Zhang et al., 2013). En algunas circunstancias las especies y las OTUs se consideran sinónimos debido a

un pequeño tamaño poblacional y una baja tasa de natalidad. Cuando se cumplen estos criterios y las especies están bien diferenciadas, los clusters o agrupaciones de secuencias corresponderían a especies. Dado que, el género *Psolus* ha presentado complejos de especies (O'Loughlin et al., 2011), se utilizará el término Unidad Taxonómica Operativa (UTO), que permite validar a las especies identificadas mediante GMYC. Se utilizó el servicio web en línea (disponible en <http://mptp.hits.org>) para realizar la delimitación. Adicionalmente, se aplicó el método mPTP, que permite variaciones en las tasas de evolución entre diferentes linajes, utilizando el árbol filogenético de Inferencia Bayesiana (BayesPhylogenies). Con el objetivo de evaluar la validez de la delimitación de especies obtenida mediante PTP, se utilizó el análisis A10 en el software Bayesian Phylogenetics and Phylogeography (BPP) (Yang, 2015a), que asume una delimitación de especies fija y conocida de antemano. Para esto se utilizó el análisis BI, considerando las especies identificadas con PTP como árbol guía, para calcular las probabilidades posteriores de las especies bajo el modelo bayesiano.

4.8. Integración de los métodos para conocer la diversidad de especies

Finalmente, se compararon e integraron los datos morfológicos y los análisis moleculares. Los datos morfológicos fueron mapeados sobre el árbol filogenético con datos concadenados (COI y 18S), para visualizar la congruencia entre las características morfológicas y las relaciones filogenéticas de los especímenes de *Psolus*.

V. RESULTADOS

5.1. Caracteres merísticos y análisis de macroestructuras.

De la literatura revisada se encontraron diferentes caracteres morfológicos externos utilizados para una identificación rápida de las especies en estudio. Estas son; tamaño del largo total, forma y número de valvas orales y anales, forma y número de escamas dorsales entre la boca y el ano, y número de filas y disposición de los podios ventrales (Fig. 4).



Figura 4: Caracteres morfológicos externos identificados para la caracterización de los morfotipos (Individuo PJI3, apertura oral: PWP12).

Todos los ejemplares (110 ejemplares) fueron medidos desde el extremo anterior hasta su extremo posterior de su cuerpo, presentando un tamaño máximo de 1,68 cm y mínimo de 0,48 cm (promedio de 0,96 cm). Considerando solo este carácter todas las muestras se ajustan principalmente al morfotipo *P. patagonicus* (Tabla 6).

Tabla 6: Tamaños corporales máximos de las tres especies del género *Psolus* de la Provincia Magallánica, según diferentes autores.

	Tamaño				
	Deichmann,1940	Pawson, 1968, 1969	Pawson, 1969; McEuen & Chia, 1991	McEuen & Chia, 1991	Mackenzie & Whitfield, 2011; Davey & Whitfield, 2013
<i>P.segregatus</i>	13 cm	80 mm	/	/	/
<i>P. antarcticus</i>	/	/	55 mm	/	51 mm
<i>P. patagonicus</i>	2 cm	20 mm	/	hasta 21mm	/

No obstante, algunos presentaron un carácter morfológico descrito para *P. antarcticus*, que es la diferencia de tamaño o proporción entre la apertura oral y anal (3:1), pero no se identificaron como tales debido a que no cumplían con ningún otro carácter descrito para esta especie.

Los resultados para las escamas dorsales (Anexo 1), mostraron que un 15% de los ejemplares se ajustan a los caracteres mencionados por la autora Deichmann (1941) y un 66% de acuerdo con Martínez (2014) para el morfotipo *P. patagonicus*. En cuanto a los caracteres de valvas orales (Anexo 2), se observó que un 94% de las muestras concuerdan con el morfotipo *P. patagonicus* de los autores Deichmann (1941), Pawson (1968, 1969), Hernández (1985) y Martínez (2014). El análisis del carácter “podios” (Anexo 3) indicó que un 100% de las muestras se ajustan a los caracteres descritos por Deichmann (1941) para ambos morfotipos,

P. patagonicus y *P. segregatus*. Un resultado similar se obtuvo para la descripción de Hernández (1985), según la cual un 97% de los ejemplares ambos morfotipos, mientras que un 97% se ajustan solo al morfotipo *P. patagonicus* según la descripción de Martínez (2014).

Al analizar estos resultados, observamos que un mayor porcentaje (98%) de las muestras se ajustan a las características descritas para el morfotipo *P.*

patagonicus y dos ejemplares (PIN8 y PUS9), correspondientes a un único haplotipo central (ver sección 2.3.2), pertenecientes a la localidad de Puerto Williams y Ushuaia, respectivamente, se ajustan a las características descritas para el morfotipo *Psolus segregatus*.

5.2. Análisis de microestructuras calcáreas.

Siguiendo la metodología señalada para el análisis de las microestructuras internas, se seleccionaron 10 ejemplares que presentaron haplotipos únicos del gen COI. En el caso de haplotipo compartido por tres localidades “Hap_4”, se seleccionó un ejemplar de cada localidad (Tabla 7).

Tabla 7: Ejemplares pertenecientes a los haplotipos identificados mediante COI y 18S.

	COI	18S	
Individuo	Haplotipo	Haplotipo	Localidad
PUS17	Hap_35	Hap_3	Ushuaia
PJI1	Hap_1		Islas Malvinas/Falkland
PIN8	Hap_4	Hap_2	Puerto Williams
PWP11		Hap_3	Ushuaia
PUS11			Islas Malvinas/Falkland
PWP8	Hap_5		
PJI32	Hap_18	Hap_5	
PIN6	Hap_26	Hap_1	Puerto Williams
PUS13	Hap_34	Hap_3	Ushuaia
PIN9	Hap_38	Hap_4	Puerto Williams

Los osículos analizados fueron de aquellos tejidos de importancia taxonómica de acuerdo con la literatura: podios, tentáculos y suela. Para facilitar la identificación de los osículos encontrados, se estableció una terminología simple para las características descritas (Fig. 5).

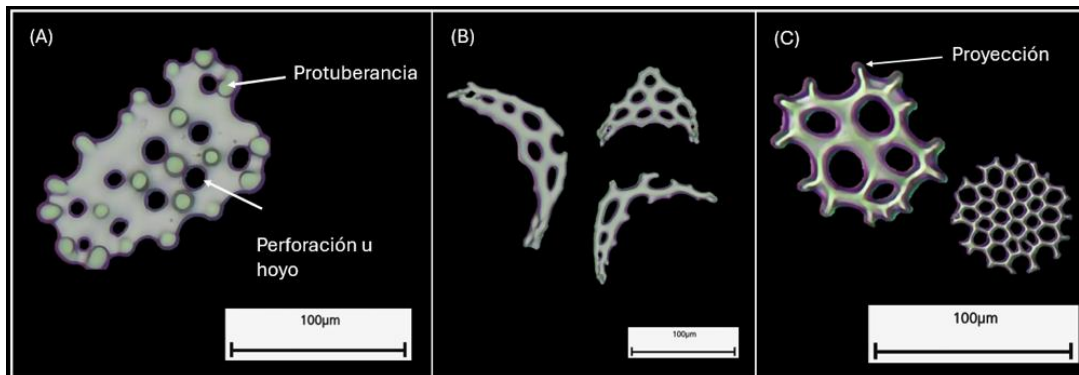


Figura 5: Terminología utilizada en la descripción de los osículos identificados. (A) Placa perforada con protuberancias perteneciente a *P. segregatus*. (B) Placas perforadas curvadas de los tentáculos pertenecientes al morfotipo *P. patagonicus*, al igual que (C), placas perforadas con proyecciones en el borde pertenecientes a la suela.

El análisis de las microestructuras indicó que, para los tres tejidos, 9 de los 10 individuos seleccionados se ajustan a las descripciones del morfotipo *Psolus patagonicus* y solo el individuo "PIN9" (Hap_38) se ajusta a la descripción del morfotipo *P. segregatus* (Tablas 8, 9 y 10). Es interesante el resultado obtenido para el individuo PIN8, perteneciente a la localidad de Puerto Williams (Hap_4 del COI), el cual es asignado al morfotipo *P. patagonicus* mediante sus osículos, pero según las características morfológicas externas fue asignado al morfotipo *P. segregatus*.

Tabla 8: Osículos de suela identificados pertenecientes a los dos morfotipos, *Psolus patagonicus* y *P. segregatus*, identificados mediante los caracteres taxonómicos.

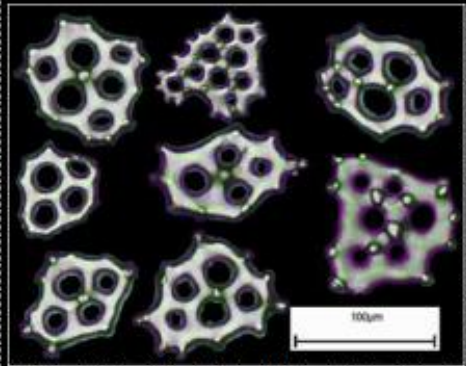
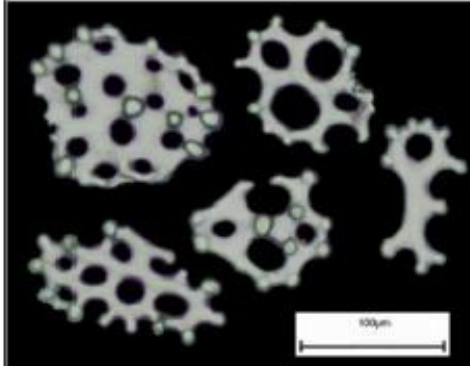
		Suela	
		Morfotipo <i>Psolus patagonicus</i> Ekman, 1925	Morfotipo <i>Psolus segregatus</i> Perrier, 1905
		placas multiperforadas con bordes lobulados, con 4 orificio con concavidad (70 μ m - 170 μ m).	placas de hasta 10 orificios con 2 -3 proyecciones (100 μ m - 150 μ m), botones de 4 hoyos, proyecciones cortas y largas marginales, con verrugas.
			
1	Haplotipo 35	Presente	Ausente
	PUS17, localidad: Ushuaia		
2	Haplotipo 1	Se observan osículos donde predominan placas perforadas con 4 hoyos, pero igualmente se encuentran osículos con hasta 8 hoyos. Algunos son concavos con protuberancias y algunas proyecciones marginales.	
	PJI1, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
3	Haplotipo 4		
	PIN8, localidad: Puerto Willimas		
	PWP11, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
PUS11, localidad: Ushuaia			
4	Haplotipo 5		
	PWP8, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
6	Haplotipo 18		
	PJI32, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
7	Haplotipo 26		
	PIN6, localidad: Puerto Williams		
8	Haplotipo 34		
	PUS13, localidad: Ushuaia		
9	Haplotipo 38	Presente	
	PIN9, localidad: Puerto Williams	Ausente	Se observan placas multiperforadas, placas con 3 hasta 12 perforaciones y barras con proyecciones y un hoyo. Igualmente las placas presentan protuberancias grandes y proyecciones.

Tabla 9: Osículos de tentáculo identificados pertenecientes a los dos morfotipos, *Psolus patagonicus* y *P. segregatus*, identificados mediante los caracteres taxonómicos.

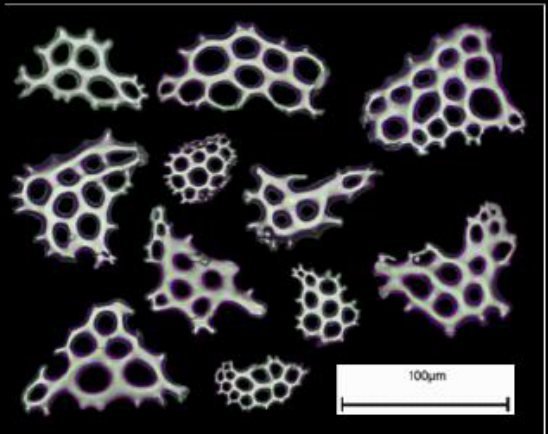
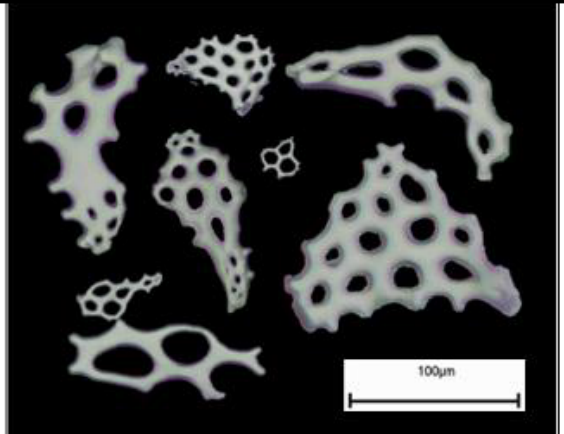
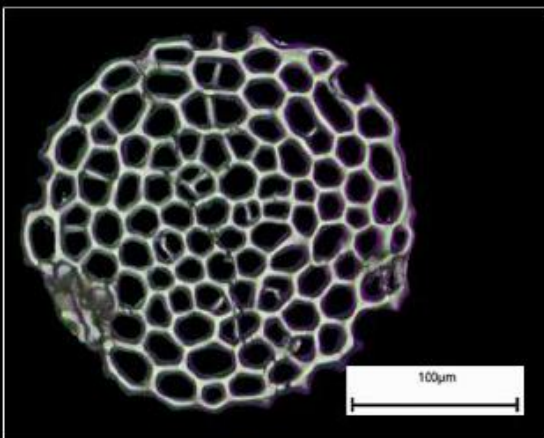
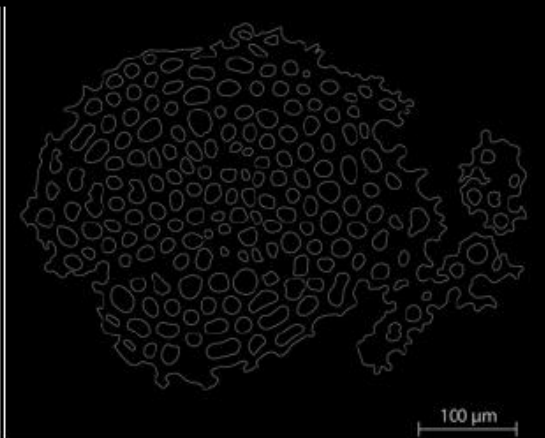
		Tentáculos	
		Morfotipo <i>Psolus patagonicus</i> Ekman, 1925	Morfotipo <i>Psolus segregatus</i> Perrier, 1905
		Placas perforadas anchas, placas curvas y barras (70 μm - 130 μm).	Placas oblongas multiperforadas, barras curvas de 6 a 11 huecos (170 μm – 270 μm) y rosetas (70 μm - 100 μm).
			
1	Haplotipo 35 PUS17, localidad: Ushuaia	Presente	Ausente
2	Haplotipo 1 PJI1, localidad: Islas Malvinas/ Falkland	presentan principalmente placas perforadas curvadas delgadas, con proyecciones marginales de una gran variedad de tamaños.	
3	Haplotipo 4 PIN8, localidad: Puerto Williams		
	PWP11, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
	PUS11, localidad: Ushuaia		
4	Haplotipo 5 PWP8, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
6	Haplotipo 18 PJI32, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
7	Haplotipo 26 PIN6, localidad: Puerto Williams		
8	Haplotipo 34 PUS13, localidad: Ushuaia		
9	Haplotipo 38 PIN9, localidad: Puerto Williams	Ausente	Presente presentan principalmente placas multiperforadas más gruesas que delgadas, barras curvas con pequeñas perforaciones.

Tabla 10: Osículos de podio identificados pertenecientes a los dos morfotipos, *Psolus patagonicus* y *P. segregatus*, identificados mediante los caracteres taxonómicos.

		Podios	
		Morfotipo <i>Psolus patagonicus</i> Ekman, 1925	Morfotipo <i>Psolus segregatus</i> Perrier, 1905
		Placas terminal (400 μ m), placas perforadas y barras (150 μ m - 200 μ m).	Placa terminal y algunas varillas perforadas, barras largas (150 μ m - 220 μ m) y perforadas de 5- 9 huecos.
			
1	Haplotipo 35 PUS17, localidad: Ushuaia	Presente	Ausente
2	Haplotipo 1 PJI1, localidad: Islas Malvinas/ Falkland	La placa terminal tiene aprox. 200 μ m, multiperforada con algunas barrillas simples y algunas en forma de "T" atravesando los hoyos.	
3	Haplotipo 4 PIN8, localidad: Puerto Willimas		
	PWP11, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
	PUS11, localidad: Ushuaia		
4	Haplotipo 5 PWP8, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
6	Haplotipo 18 PJI32, localidad: Islas Malvinas/ Falkland		
7	Haplotipo 26 PIN6, localidad: Puerto Williams		
8	Haplotipo 34 PUS13, localidad: Ushuaia		
9	Haplotipo 38 PIN9, localidad: Puerto Williams	Ausente	Presente Placa terminal de aprox. 300 μ m, multiperforada, acompañada por barras largas.

La disposición de los osículos presentes en el tegumento de la suela del haplotipo 38 dispusieron entrelazados formando una red, mientras que en el resto de los haplotipos se dispusieron de manera segregada (Fig.6).

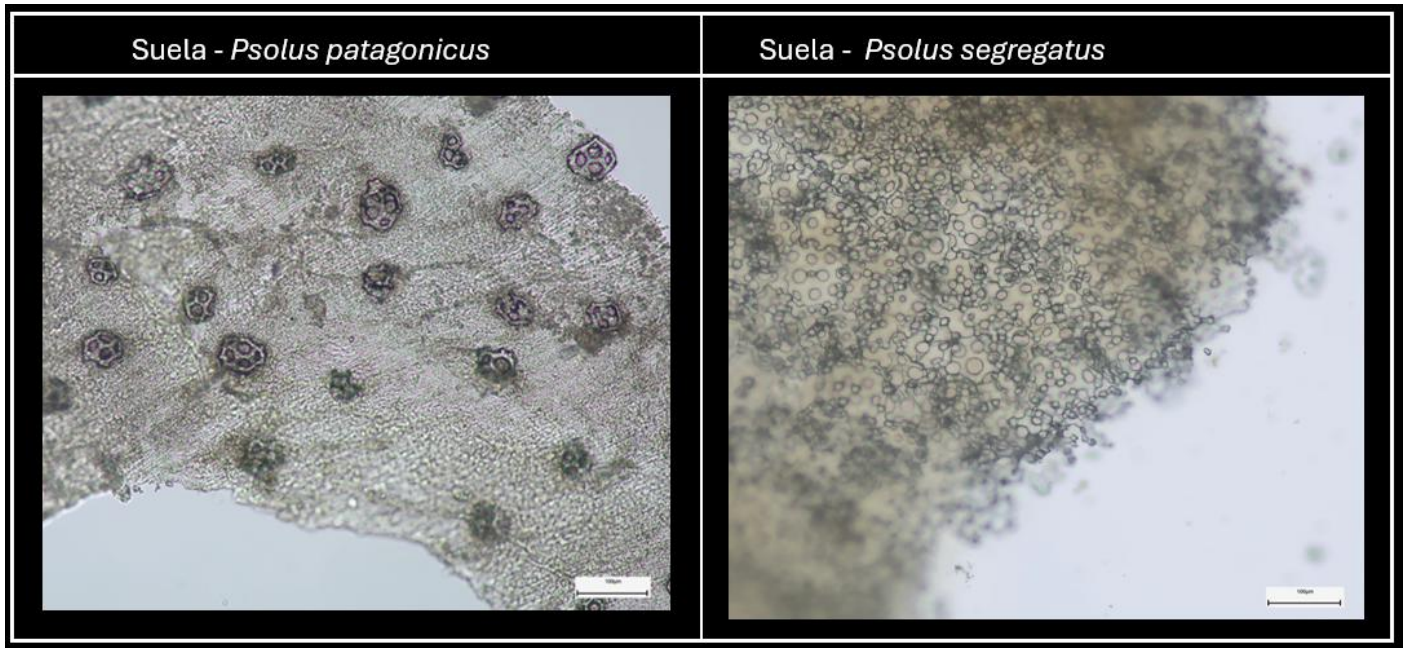


Figura 6: Imagen del tejido de suela bajo microscopio de los dos morfotipos identificados. A la izquierda morfotipo *Psolus patagonicus* y a la derecha morfotipo *Psolus segregatus*.

Además, durante el proceso de disección y análisis de la anatomía interna de las muestras pertenecientes al morfotipo *Psolus patagonicus*, se encontró una estructura compuesta por formaciones digitiformes entre los tentáculos (Fig. 7), asociada principalmente a individuos masculinos con gónadas desarrolladas, que no ha sido reportada en la literatura.

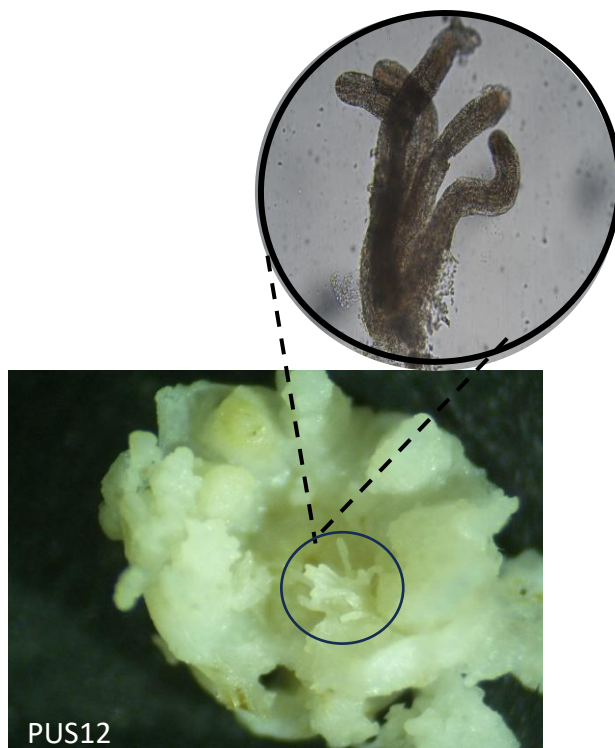


Figura 7: Estructura no reportada en la literatura, encontrada entre los tentáculos de individuos asociados al morfotipo *Psolus patagonicus*.

Los anillos calcáreos obtenidos para ambos morfotipos identificados presentan diferencias significativas. El anillo calcáreo perteneciente al morfotipo *P. patagonicus* comprende cinco piezas radiales y cinco interradales unidas en una base ancha y estirada, ambas con un proceso anterior. Cada pieza radial tiene una hendidura profunda y estrecha en la zona anterior. La base de las piezas radiales e interradales son alargadas y con forma de onda (Fig. 8E). El segundo morfotipo *P. segregatus* presenta un anillo calcáreo que comprende cinco piezas radiales y cinco interradales unidas en la base más estrecha y engrosada, ambas con un proceso anterior. Cada pieza radial tiene una abolladura leve en la zona anterior. Las piezas interradales tienen una terminación en punta (Fig. 8F).

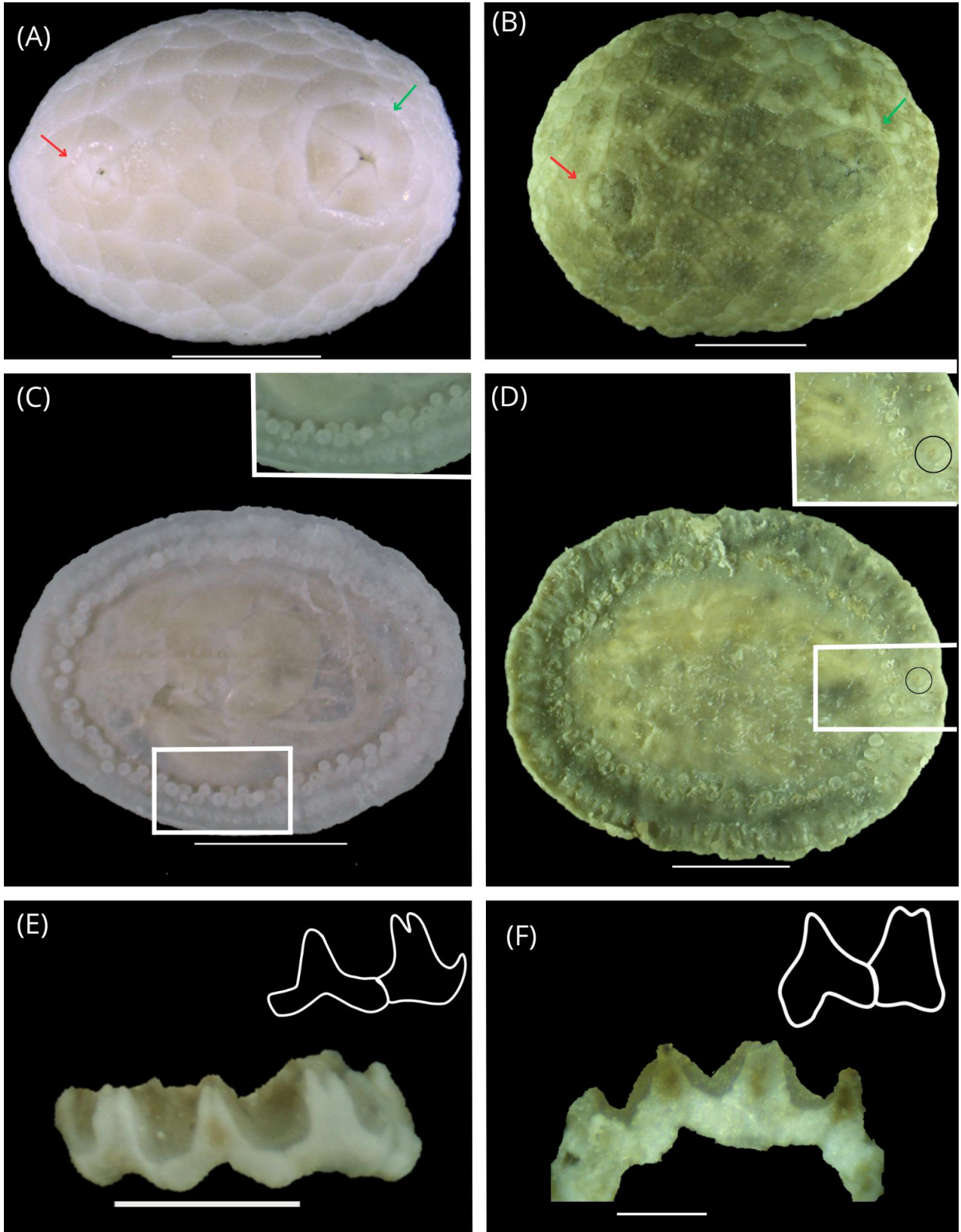


Figura 8: Morfotipos identificados. Columna izquierda morfotipo *Psolus patagonicus* (PWP12) y en la columna derecha morfotipo *Psolus segregatus* (PIN9). (A-B) vista dorsal, valvas orales y valvas anales (flechas verde y roja, respectivamente), (C-D) vista ventral. La barra debajo de las estructuras son 10 milímetros.

5.3. Análisis moleculares

Del total de 110 individuos analizados, se obtuvieron un total de 63 secuencias del fragmento mitocondrial citocromo oxidasa subunidad I (COI), cuya extensión fue 658 pb y ocho secuencias del gen ARN ribosomal 18S de 572 pb (secuencias seleccionadas desde los resultados de los haplotipos únicos del COI). El resultado del test de Xia arrojó ausencia de saturación para el set de datos.

A continuación, se les denominará a los ejemplares mediante la combinación de los morfotipos identificados con la enumeración del haplotipo identificados mediante COI (Tabla 11).

Tabla 11: Correspondencia entre los morfotipos pertenecientes a los haplotipos encontrados mediante COI y 18S y la división de los clados (ver en fig. 15)

		COI	18S	
Nombre	Localidad	Haplotipo	Haplotipo	Clado
Morfotipo_P_patagonicus_H35	Ushuaia	Hap_35	Hap_3	A2
Morfotipo_P_patagonicus_H1	Islas Malvinas/Falkland	Hap_1		
Morfotipo_P_patagonicus-segregatus_H4	Puerto Williams	Hap_4	Hap_2	A1
	Ushuaia		Hap_3	
Morfotipo_P_patagonicus_H5	Islas Malvinas/Falkland	Hap_5	Hap_5	
Morfotipo_P_patagonicus_H18		Hap_18		
Morfotipo_P_patagonicus_H26	Puerto Williams	Hap_26	Hap_1	
Morfotipo_P_patagonicus_H34	Ushuaia	Hap_34	Hap_3	
Morfotipo_P_segregatus_H38	Puerto Williams	Hap_38	Hap_4	B

5.4. Distancia genética

Se observó una baja distancia genética entre los siguientes haplotipos H35, H1, H4, H5, H18, H26 y H34, no superando un 2,5%. En contraste, el haplotipo 38 ejemplar presentó altos valores de distancia p aprox. 10%, siendo el más alto el haplotipo H35 (11,02%) (Tabla 12a).

Para el set de secuencias de COI de especies del género *Psolus* obtenido de GenBank, se observaron mayores valores de distancia p entre las especies. La más alta fue entre *P. rufus* y *P. antarcticus complex* (24,13%), al igual que *P. rufus* con *P. charcoti*. La menor distancia observada fue entre *P. fabrici* y *P. charcoti* (5,2%). Algo interesante de notar es la nula p-distancia entre *P. charcoti* y *P. koehleri* (Tabla 12b). La menor distancia entre los haplotipos del set de datos muestreado con las especies de *Psolus* de GenBank fue de 0% entre morfotipo_*P. patagonicus*_H5 y *P. dubiosus complex*, y la distancia más grande fue entre *P. charcoti* y morfotipo_*P. segregatus*_H38 con 22,68%.

Tabla 9: Matriz de distancia p entre a) secuencias concatenadas de COI y 18S del set de datos, b) secuencias de COI obtenidas de GenBank del género *Psolus* y c) integración de ambos sets de datos.

a)

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Morfotipo_P.patagonicus_H35								
2. Morfotipo_P.patagonicus_H1	0,0200							
3. Morfotipo_P.patagonicus-segregatus_H4	0,0213	0,0032						
4. Morfotipo_P.patagonicus_H5	0,0189	0,0042	0,0041					
5. Morfotipo_P.patagonicus_H18	0,0256	0,0074	0,0091	0,0099				
6. Morfotipo_P.patagonicus_H26	0,0241	0,0053	0,0025	0,0067	0,0116			
7. Morfotipo_P.patagonicus_H34	0,0213	0,0032	0,0016	0,0041	0,0091	0,0041		
8. Morfotipo_P.segregatus_H38	0,1102	0,0892	0,1067	0,1069	0,1076	0,1070	0,1066	

b)

	1	2	3	4	5	6	7
1. <i>P. chitonoides</i>							
2. <i>P. dubiosus</i> _complex	0,1801						
3. <i>P. antarcticus</i> _complex	0,1280	0,1896					
4. <i>P. koehleri</i>	0,1848	0,0094	0,1927				
5. <i>P. charcoti</i>	0,1280	0,1896	0	0,1927			
6. <i>P. fabricii</i>	0,2098	0,0078	0,2098	0,0052	0,2098		
7. <i>P. rufus</i>	0,2320	0,2065	0,2413	0,2088	0,2413	0,2092	

c)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. MorfotipoP.patagonicusH35															
2. MorfotipoP.patagonicusH1	0,0189														
3. MorfotipoP.patagonicus-segregatusH4	0,0213	0,0021													
4. MorfotipoP.patagonicusH5	0,0189	0,0032	0,0041												
5. MorfotipoP.patagonicusH18	0,0256	0,0063	0,0091	0,0099											
6. MorfotipoP.patagonicusH26	0,0241	0,0042	0,0025	0,0067	0,0116										
7. MorfotipoP.patagonicusH34	0,0213	0,0021	0,0016	0,0041	0,0091	0,0041									
8. MorfotipoP.segregatusH38	0,1102	0,0887	0,1067	0,1069	0,1076	0,1070	0,1066								
9. <i>P. chitonoides</i>	0,1754	0,2098	0,1817	0,1801	0,1785	0,1848	0,1817	0,2251							
10. <i>P. dubiosus</i> _complex	0,0362	0,0078	0,0063	0	0,0173	0,0094	0,0079	0,1981	0,1801						
11. <i>P. antarcticus</i> _complex	0,1848	0,2098	0,1927	0,1896	0,1969	0,1927	0,1927	0,2268	0,1280	0,1896					
12. <i>P. koehleri</i>	0,0425	0,0052	0,0031	0,0094	0,0173	0,0000	0,0047	0,1981	0,1848	0,0094	0,1927				
13. <i>P. charcoti</i>	0,1848	0,2098	0,1927	0,1896	0,1969	0,1927	0,1927	0,2268	0,1280	0,1896	0	0,1927			
14. <i>P. fabricii</i>	0,0466	0,0000	0,0026	0,0078	0,0130	0,0052	0,0052	0,2098	0,2098	0,0078	0,2098	0,0052	0,2098		
15. <i>P. rufus</i>	0,2042	0,2038	0,1995	0,2019	0,2019	0,2042	0,2019	0,2141	0,2297	0,2019	0,2390	0,2042	0,2390	0,2038	

5.5. Relaciones genealógicas

El set de datos del COI presentó un total de 38 haplotipos. La representación gráfica de sus relaciones genealógicas muestra tres haplogrupos. El haplogrupo 1 está compuesto por un único haplotipo perteneciente a la localidad de Ushuaia, distanciado por 9 pasos mutacionales del haplogrupo 2, y este por 34 pasos mutacionales del haplogrupo 3. El haplogrupo 2 es el más diverso y central, compuesto por 6 haplotipos (Hap- 1, 4, 5, 18, 26 y 34), siendo el haplotipo central y de alta frecuencia "Hap_4", el que está presente en tres localidades (Malvinas, Puerto Williams y Ushuaia), en distintas proporciones. De este haplotipo Hap_4 surgen 4 haplotipos únicos (Hap-5, 18, 26 y 34) de baja frecuencia, que representan solo a una localidad y solo el haplotipo 1 presenta alta frecuencia, aunque se encuentra en solo una localidad (Malvinas). El haplogrupo 3 está compuesto por un único haplotipo perteneciente a la localidad de Pto. Williams, distanciado por 34 pasos mutacionales del haplogrupo 2, y por 9 pasos mutacionales del haplogrupo 1 (Fig. 9). El set de datos de 18S presentó un total de 5 haplotipos, cuya representación gráfica mostró un haplotipo central de alta frecuencia "H3", presente en dos localidades en distintas proporciones (Malvinas y Puerto Williams). De este haplotipo surgen haplotipos (H-5, 2, 1 y 4) únicos de

baja frecuencia, tres que representan a una única localidad y uno a Malvinas (Fig. 10).

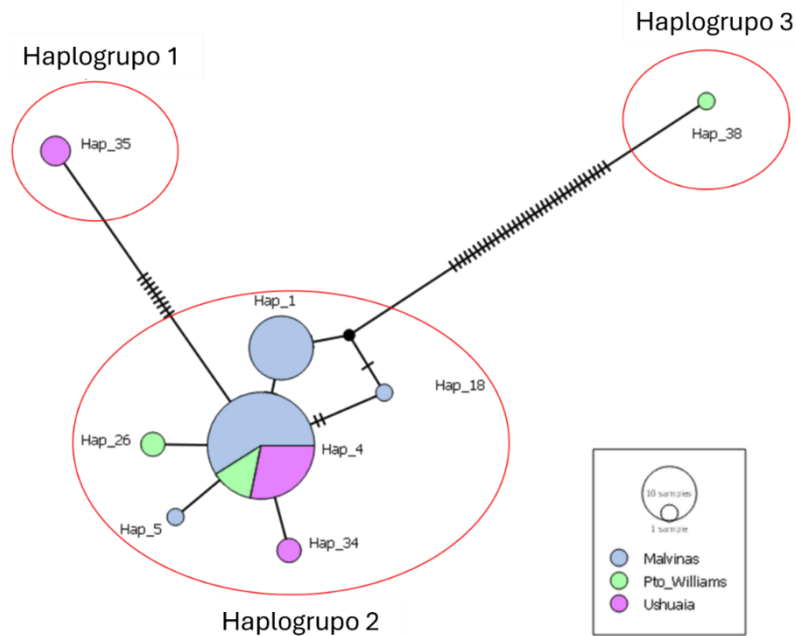


Figura 9: Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas entre todas las especies del género *Psolus* de la Provincia Magallánica. Cada círculo representa un haplotipo, y su tamaño la frecuencia. El color indica la localidad. Las siglas señalan los haplotipos. Los haplogrupos fueron encerrados dentro de las líneas rojas.

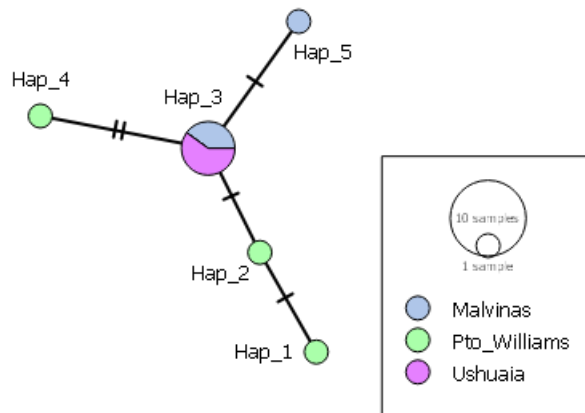


Figura 10: Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas del gen 18S entre las especies del género *Psolus* de la Provincia Magallánica. Cada círculo representa un haplotipo, y su tamaño la frecuencia. El color indica la localidad.

5.6. Relaciones filogenéticas: Máxima verosimilitud (MV)

La reconstrucción de MV con genes concatenados, COI y 18S, fue realizada con 8 secuencias que representan a los haplotipos encontrados con el fragmento COI, que pertenecen además a los dos morfotipos identificados por la revisión de las macro- y microestructuras.

El modelo evolutivo utilizado para la reconstrucción del árbol de MV fue GTR (General Time Reversible) con Covarion-Autocorrelation model (CAT) y 4 gammas, sin embargo, cuya reconstrucción filogenética resultó tener bajo soporte. No obstante, todas las muestras analizadas conforman un único grupo monofilético, con una primera separación de *P. segregatus* H38 del resto de las secuencias identificadas como *P. patagonicus*, del cual se separa *P. patagonicus* 26, que representa al individuo PIN6 (Fig. 11).

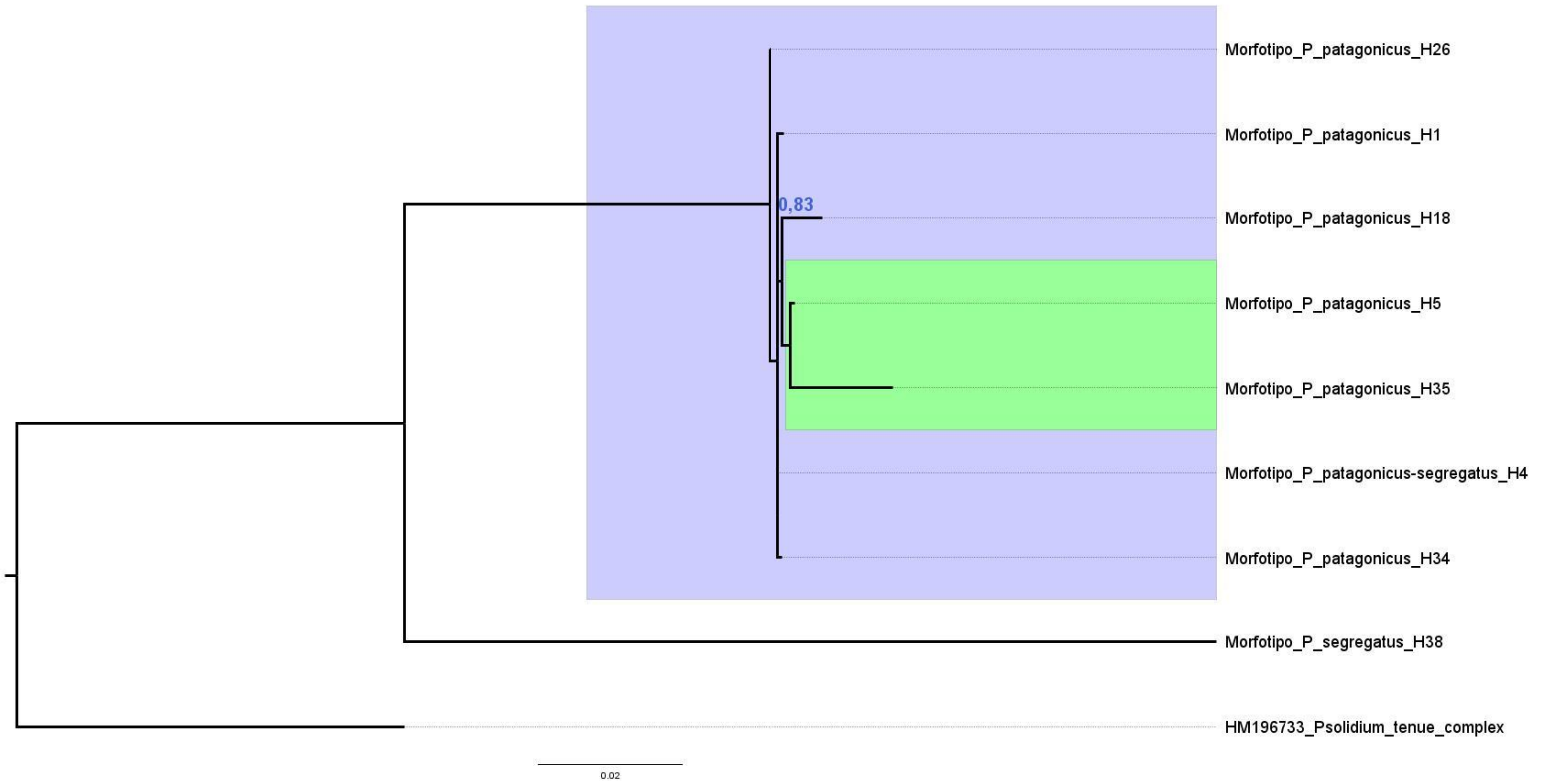


Figura 11: Reconstrucción filogenética del género *Psolus* con los genes de COI y 18S concatenados, bajo el criterio de Máxima verosimilitud. El número junto al nodo indica el soporte de bootstrap (1000 pseudoréplicas). Valores menores del 50% se omiten. La barra de escala indica el número de sustituciones por unidad de longitud de rama.

5.7. Relaciones filogenéticas: Inferencia Bayesiana

De acuerdo con el análisis de Inferencia Bayesiana, todas las secuencias analizadas también conforman un grupo monofilético, del cual se separa el morfotipo_P_segregatus_H38 del set identificado como morfotipo *P. patagonicus*, el que a su vez se separa del morfotipo P_patagonicus_H35 (Fig. 12).

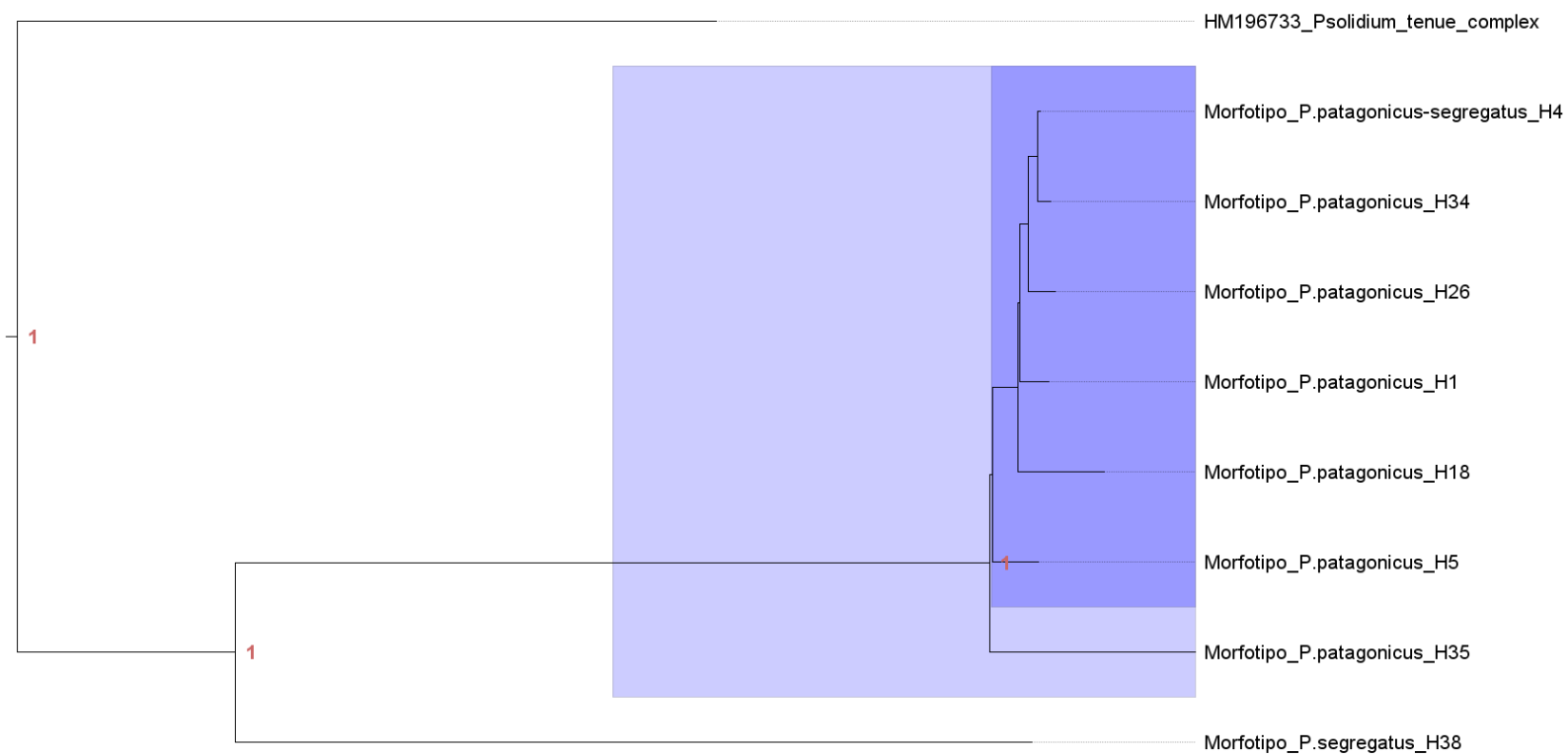


Figura 12: Árbol filogenético obtenido por inferencia bayesiana. Los números junto a los nodos indican la probabilidad posterior. El color morado claro representa el clado de morfotipo *Psolus patagonicus*, clado morado oscuro interior.

5.8. Análisis de Delimitación de especies

El método de delimitación PTP identificó 3 Unidades Taxonómicas Operativas (UTOs), al clado morado oscuro *P. patagonicus* (Fig. 13), morfotipo *P.patagonicus*_H35 y a morfotipo *P.segregatus*_38. El método de delimitación mPTP identificó a 2 UTOs, conformadas por el clado demarcado por la coloración de tonalidad morada, perteneciente principalmente al morfotipo *P. patagonicus* y el morfotipo *P.segregatus*_H38, que fue confirmado por el método GYMC. El método de validación BPP arrojó que las muestras pertenecientes a los clado morado claro presentan una probabilidad a posteriori de 0,26 para ser consideradas especies diferentes, y el ejemplar morfotipo *P.segregatus*_H38 con el clado morado claro presentan una probabilidad a posteriori de 0,29. Esto indica que los morfotipos identificados no pueden reconocerse como especies diferentes (Fig. 13).

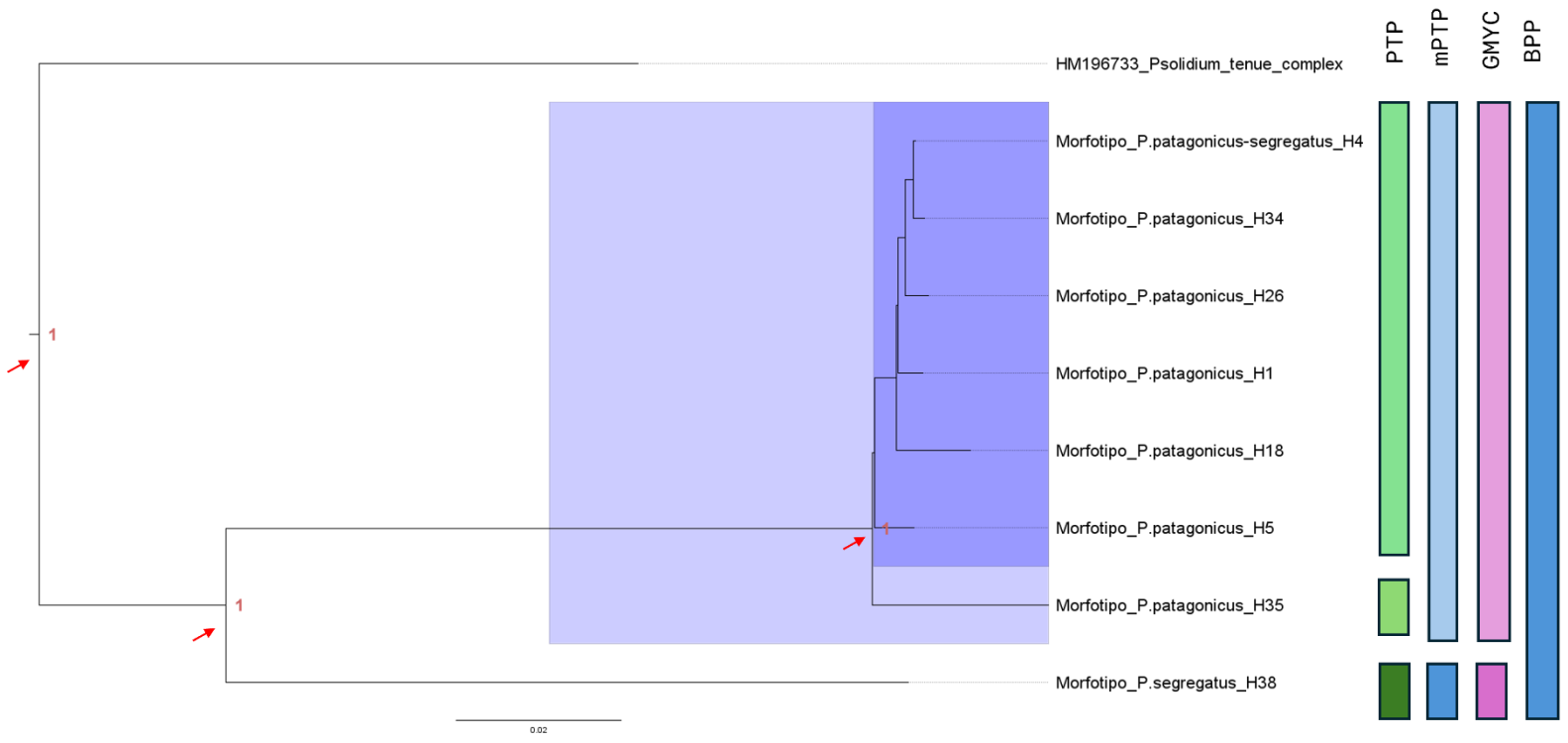


Figura 13: Árbol de inferencia bayesiana que muestra la agrupación de las distintas UTOs obtenidas con los análisis de delimitación de especies. Las barras verdes representan las UTOs delimitadas por PTP y las azuladas a mPTP, las barras con tonalidades rosadas las UTOs delimitadas por GMYC y la última barra a la derecha de coloración azul la delimitación por BPP.

5.9. Integración de métodos

De acuerdo con los resultados externos obtenidos de ambos morfotipos (Fig. 9; Anexos 1, 2 y 3) y las topologías obtenidas con los análisis filogenéticos, se obtuvo que en el clado A1 se agrupan ambos morfotipos (Fig. 14), representados en el haplotipo 4, que está presente en 3 localidades (Islas Malvinas/Falkland, Puerto Williams y Ushuaia) (Fig. 9). Sin embargo, al considerar la morfología interna, tales como los osículos y el anillo calcáreo, el clado A representa al morfotipo *P. patagonicus* (Fig. 14). En el caso del individuo identificado bajo el morfotipo *P. patagonicus*_H35, sólo uno de los cuatro métodos de delimitación lo identificó como una UTO distinta, por lo que la morfología con el clado B. Sólo el clado B, que es identificado como una UTO separada del clado A por tres de los cuatro métodos de delimitación utilizados (Fig. 14), es además congruente con la determinación realizada para este individuo según sus características morfológicas (internas y externas), como morfotipo *P. segregatus* Perrier, 1905 (Fig. 8, Tabla 8-10).

En el análisis de los haplotipos presentes en los dos genes examinados en este estudio, se identificó una correspondencia particular entre los haplotipos y los morfotipos.

Los haplotipos- (35, 1, 5 y 34) encontrados mediante el gen COI, coinciden con el haplotipo 3 encontrado para el gen 18S (Tabla 11), corresponden al mismo morfotipo, *P. patagonicus*. Además, el Hap_4 (COI) es representativo del morfotipo *P. patagonicus* y del morfotipo *P. segregatus*, que han sido identificados sólo por su morfología externa como diferentes morfos. Asimismo, los haplotipos anteriormente mencionados corresponden a los haplotipos- (2 y 3) del gen 18S.

Los haplotipos- (18 y 26), identificados mediante el COI se representan mediante los haplotipos- (5,1 y 4) del 18S respectivamente y, identificados como morfotipo *P. patagonicus*, excepto haplotipo 38 (COI) y haplotipo 4 (18S) identificados como *P. segregatus* (Tabla 11).

Tabla 12: Presencia y ausencia de caracteres morfológicos pertenecientes a los dos morfotipos identificados por haplotipo (COI).

		Morfología			
		Externa		Interna	
Haplogrupos	Haplotipos	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>
1	Hap_35	1	0	1	0
2	Hap_1	1	0	1	0
	Hap_4	1	1	1	0
	Hap_5	1	0	1	0
	Hap_18	1	0	1	0
	Hap_26	1	0	1	0
	Hap_34	1	0	1	0
3	Hap_38	0	1	0	1

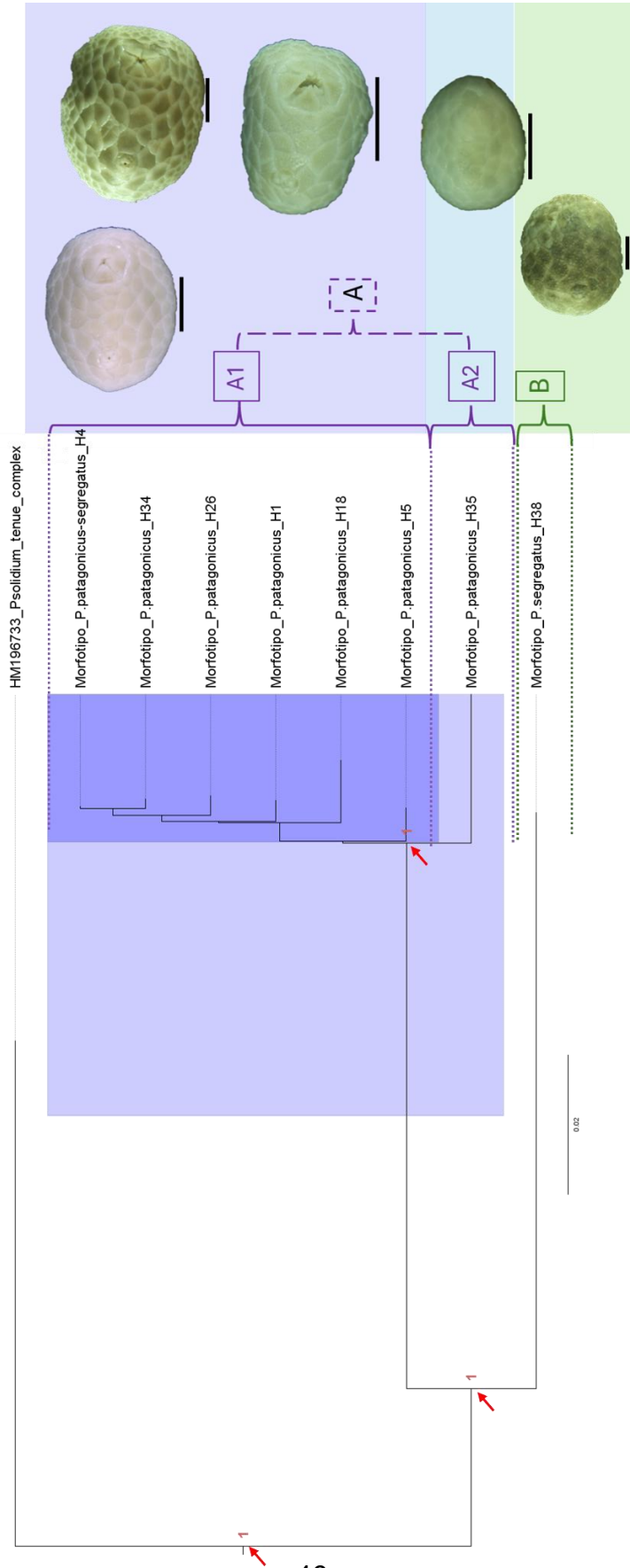


Figura 14: Árbol de inferencia bayesiana construido con los genes COI y 18S. Se muestran diferentes morfologías de los morfotipos de los diferentes haplotipos dentro de los clados. Los individuos pertenecientes al clado A1 pertenecen al Haplotipo 4, dentro podemos observar a los individuos de izquierda a derecha (PWP13, PIN8 y PWP17), clado A2 perteneciente al haplotipo 35 (PUS17) y en el clado B perteneciente al haplotipo 38 (PIN9). La barra debajo de los individuos indica 10 mm.

VI. DISCUSIÓN

Los ejemplares de *Psolus* analizados en esta investigación representan una diversidad menor de especies a la reportada por la literatura para la Provincia Magallánica, rechazando de este modo la hipótesis propuesta.

Los resultados indican que la morfología externa puede sobreestimar el número de especies en el género *Psolus*, como podemos observar en el caso de los ejemplares identificados como haplotipo H4 mediante el gen COI presentan individuos provenientes de tres localidades (Malvinas/ Falkland, Ushuaia y Puerto Williams) identificados como dos morfotipos, *P. patagonicus* y *P. segregatus*. Sin embargo, los análisis moleculares determinan la presencia de una sola especie del género *Psolus* en la Provincia Magallánica. Hay una mayor diversidad morfológica en *Psolus patagonicus*, pero ésta sigue bien diferenciada de su especie simpátrica *P. segregatus*. Además, la determinación a priori a ojo descubierto para *Psolus patagonicus* no es confiable, por lo que la determinación de esta especie requiere el análisis de las microestructuras calcáreas, los osículos, que son las estructuras de importancia taxonómica a nivel de especie para este género. A partir de esto, un análisis más detallado de los osículos pertenecientes a la suela determinaría una rápida identificación de estas especies sin mayor intervención en el espécimen. Por otra parte, en este trabajo se propone una descripción más detallada de la morfología externa de ambas especies (Anexo 4, sección 4.3), que incluye la descripción de la granulación sobre las escamas dorsales, que no siempre se

menciona, y la presencia de una segunda hilera de podios al margen de la suela, que se ha visto en todos los individuos analizados. Estos podios son muy pequeños, por lo que se recomienda su observación a contraluz en el microscopio óptico. Otro carácter como la diferencia de tamaño entre la apertura oral y anal con una proporción 1:3, se ha utilizado en la determinación de la especie *Psolus antarcticus*. Sin embargo, nuestros resultados indican que esta proporción no es determinante para esta especie dado que se ha observado en individuos determinados como *P. patagonicus*, por lo que este carácter debiese ser descartado para la identificación de esta especie.

De este modo, mediante la revisión de los caracteres de importancia morfológica, se estableció que la propuesta realizada por Martínez (2014) es más robusta para determinar a la especie *Psolus patagonicus* (Anexos 1,2 & 3).

Se desprende de estos resultados que las descripciones de las valvas orales de diferentes autores permiten identificar a un porcentaje importante bajo el morfotipo *P. patagonicus* (94%).

El análisis de distancias genéticas entre diferentes especies de holotúridos del género *Psolus* revela información significativa sobre las relaciones evolutivas entre estas especies. La menor distancia genética observada, que fue del 0% entre el morfotipo *P. patagonicus_H5* y el complejo de *P. dubiosus*, sugiere que estos dos morfotipos son genéticamente muy similares, lo que podría indicar que pertenecen a la misma especie o que están muy cercanamente relacionados. Esto puede ser

un indicativo de que las diferencias morfológicas observadas entre ellos son superficiales o recientes en términos evolutivos.

Por otro lado, la mayor distancia genética, de 22.68% entre *P. charcoti* y el morfotipo *P. segregatus_H38*, sugiere una divergencia evolutiva más significativa.

6.1. El género *Psolus* en la Provincia Magallánica

El sector Pacífico de la Provincia Magallánica se caracteriza por un sistema de fiordos y estrechos con presencia de una biota austral y meridional (Camus, 2001), además de las aguas frías de origen subantártico, debido a la influencia de la Corriente del Cabo de Hornos y baja salinidad, por la influencia de las características estuarinas de los fiordos al sur de 42°S (Martínez et al., 2024). Por el sector atlántico, la Provincia Magallánica está influenciada por dos corrientes principales: la cálida Corriente de Brasil y la fría Corriente de Malvinas (que es la continuidad de la corriente del Cabo de Hornos, potenciada por la CCA), que se encuentran en la Confluencia Brasil/Malvinas (Spalding et al., 2007). El sector Pacífico de la Provincia Magallánica se caracteriza por un sistema de fiordos y estrechos con presencia de una biota austral y meridional (Camus, 2001), además de aguas frías de origen subantártico, debido a la influencia de la Corriente del Cabo de Hornos y baja salinidad, por la influencia de las características estuarinas de los fiordos al sur de 42°S (Martínez et al., 2024). Por el sector atlántico, la Provincia Magallánica está influenciada por dos corrientes principales: la cálida

Corriente de Brasil y la fría Corriente de Malvinas (que es la continuidad de la corriente del Cabo de Hornos, potenciada por la corriente circumpolar antártica), que se encuentran en la Confluencia Brasil/Malvinas (Spalding et al., 2007).

Nuestros hallazgos indican que *Psolus patagonicus* posee una distribución extensa en la Provincia Magallánica. Esta especie ha sido documentada en los canales y fiordos del sur de Chile, así como también en la costa atlántica de Argentina, desde el sur de Chile hasta el norte de la Patagonia argentina. Adicionalmente, hemos registrado su presencia en las Islas Malvinas/Falkland, específicamente en las islas Jason (-60,843317) y West Point (-60,646883), lo que no ha sido reportado previamente en la literatura, por lo que este trabajo extiende la distribución descrita para esta especie.

Los mecanismos responsables de esta amplia distribución no quedan resueltos, dado su modo de vida incubante y poca vagilidad asociada. No obstante, se ha reportado que *P. patagonicus* se encuentra asociada a la macroalga *Macrocystis pyrifera* (Giménez & Penchaszadeh, 2010; Hernández, 1985), la cual se desprende de su sustrato y puede flotar o ir a la deriva a merced de las corrientes y los vientos, lo que facilita su dispersión y conectividad (Macaya et al., 2020), lo que además puede ser eventualmente un vector de dispersión para los organismos que viven adheridos a ella. En este sentido, Macaya et al. (2020) reportan que frondas de *M. pyrifera* pueden permanecer en la superficie del mar por periodos de tiempo considerables, permitiendo incluso la conexión entre poblaciones distantes de Georgias del Sur e Isla Rey Jorge (Islas Shetland del Sur). Si bien aún no hay reportes de la dispersión de *P. patagonicus* por medio de macroalgas, el

mecanismo de dispersión a gran distancia mediada por rafting en macroalgas si ha sido señalado como un mecanismo probable para especies que forman parte de la comunidad epifaunística e incubadora de especies como *Durvillaea antártica* (Cumming et al., 2014; Waters et al., 2018; González-Wevar et al., 2022). Por otra parte, el rango batimétrico de *P. patagonicus*, desde los 0 a 368 metros (Deichmann, 1941; Hernández, 1985; Larraín, 1975; Martínez et al., 2024; O'Loughlin et al., 2016; Pawson, 1969), permite una amplia exposición de la especie a la influencia de la Corriente de Cabo de Hornos, pudiendo ser esta un vector adicional.

Otro aspecto que se desprende de la presencia del género *Psolus* en la Provincia Magallánica, es que de los 110 individuos analizados solo uno fue determinado para el morfotipo *P. segregatus* (proveniente de la localidad de Puerto Williams). Este resultado llama la atención, considerando la amplia distribución descrita para esta especie en la Provincia Magallánica, para lo cual, una causa plausible es que el rango batimétrico descrito (7-2179 metros), no sea el adecuado y esta especie comience su distribución a una mayor profundidad, considerando que las muestras en este estudio fueron recolectadas a una profundidad promedio de 15 metros. En este sentido, el rango batimétrico descrito para *P. antarcticus* (35 a 310 metros, Vaney, 1906; Pawson, 1969; Barboza et al., 2011; Martínez, 2014), también se propone como causa para no haber encontrado a representantes en el set de muestras.

6.2. Caracteres merísticos morfológicos

Varios autores han mencionado que existen incongruencias dentro de la morfología de las especies del género *Psolus*. Como resultado de este estudio también se exponen algunas incongruencias, como fue el caso de algunos ejemplares portadores del haplotipo 4 (Fig.14), ya que este haplotipo se observó en tres ejemplares cuyas características morfológicas externas los diferenció en dos especies, *P. segregatus* y *P. patagonicus*. Por otra parte, siguiendo solo el carácter utilizado por Pawson (1969), el 100% de los individuos se ajustaron a la descripción del morfotipo *P. segregatus*, demostrando ser una descripción muy genérica para las escamas dorsales. Mientras que, en el otro extremo, podemos considerar que la diferencia de tamaño entre la apertura oral y anal (carácter utilizado para *Psolus antarcticus*) fue consistente, al no observar individuos de este morfotipo. Estos resultados nos permiten corroborar que los caracteres diagnósticos externos no son suficientemente robustos para la identificación a nivel de especie, a lo que debemos sumar la posibilidad de que los ejemplares utilizados en este estudio puedan representar a juveniles (>2 cm de longitud), lo que sí ha conducido a errores en determinación (Martínez, 2014).

Considerando que uno de los caracteres de diagnóstico más importante a nivel de especie en los holotúridos, es la forma de los osículos presentes en diferentes tejidos (Solís-Marín et al., 2005; Pawson et al., 2010; Martínez, 2014; Prata et al., 2020), los resultados obtenidos para los 3 ejemplares de diferentes localidades

que presentaron el Haplotipo 4, fueron congruentes al identificar el morfotipo *P. patagonicus* (Fig. 9 y 15) y diferencias significativas con los osículos pertenecientes al morfotipo *P. segregatus* (Haplotipo 38). Confirmando la utilidad de los osículos para la identificación a nivel de especies en el género *Psolus*.

6.3. ¿El género *Psolus* es un complejo o es críptico?

Las relaciones filogenéticas inferidas por máxima verosimilitud (Fig. 12) presentan muy bajo sustento, lo que puede indicar que no existe diferenciación entre las especies. Sin embargo, las relaciones filogenéticas mediante inferencia bayesiana si presentan una alta probabilidad a posteriori formando dos clados, A y B (Fig. 13).

La utilización de únicamente 63 secuencias concatenadas de los genes COI mitocondrial y 18S ribosomal nuclear en holotúridos del género *Psolus* presenta limitaciones metodológicas clave. Estudios en holotúridos mediterráneos demuestran que el COI muestra una diversidad genética intrapoblacional variable (p-distancia de 0.009 en *H. polii* vs. 0.029 en *H. tubulosa*) (Ribani et al., 2024), lo que sugiere que en linajes recientes su poder resolutivo podría ser insuficiente para establecer relaciones filogenéticas precisas. Por otro lado, el gen 18S presenta una elevada conservación evolutiva, con solo el 20-30% de sus regiones variables (V2, V4, V9) mostrando resolución taxonómica a nivel de género en copépodos (Wu et al., 2015), limitando su utilidad para diferenciar especies cercanas. Además, el bajo soporte nodal ML puede deberse a varios factores,

como una señal filogenética limitada e.g. radiaciones recientes o violaciones del modelo evolutivo al utilizar secuencias concadenadas.

La alta probabilidad posterior bayesiana para los clados A y B podría reflejar una mayor eficiencia del muestreo MCMC para explorar el espacio de árboles en datos con señal débil, además, la sobreestimación de soportes nodal en análisis bayesianos con datos concatenados, fenómeno documentado en simulaciones donde el 70% de nodos mostraron probabilidad posteriori >0.95 vs bootstrap ML <50% (Suzuki et al., 2002).

Lo que fue corroborado en parte por los métodos de delimitación de especies (PTP, mPTP y GMYC). No obstante, el método de validación utilizado (BPP) estableció que no existen diferencias significativas entre los clados y que todo pertenecería a una misma especie. Esto se puede deber a que tiene un enfoque bayesiano multispecies coalescente, que tiene como función la capacidad para inferir árboles de especies y delimitar especies al tener en cuenta la discordancia de los árboles génicos causada por la clasificación incompleta de linajes (ILS, por sus siglas en inglés) (Yang, 2015a). El modelo MSC reconoce que diferentes genes o regiones genómicas pueden tener historias evolutivas distintas (Zhang et al., 2014). El método BPP prioriza la hipótesis nula (H₀: una especie) hasta que la evidencia multilocus demuestre divergencia congruente (Hillis et al., 2021). Esto significa que la suposición inicial es que no existe suficiente divergencia genética significativa entre las poblaciones para justificar el reconocimiento de múltiples especies.

Los datos genéticos de un sólo locus pueden tener limitaciones para reflejar con precisión la filogenia de las especies debido a fenómenos como la clasificación incompleta de linajes (ILS), la hibridación u otros procesos evolutivos (Zhang et al., 2014; Jackson et al., 2017; Flouri et al., 2022). Confiar en un solo locus puede llevar a inferencias incorrectas sobre los límites de las especies (Jackson et al., 2017; Flouri et al., 2022), ya que la historia evolutiva de un solo gen puede verse influenciada por factores que no son representativos de la historia general de la especie. En contraste, la combinación de información de múltiples loci independientes proporciona una estimación más robusta de las relaciones y la divergencia entre especies (Yang, 2015; Flouri et al., 2018; Zhang et al., 2014). Los datos multilocus ayudan a promediar la estocasticidad y los efectos específicos de cada gen presentes en los datos de un solo locus (Flouri et al., 2018, 2022). Al analizar múltiples genes, se aumenta la cantidad de evidencia independiente a favor o en contra de la hipótesis nula, lo que mejora la fiabilidad de la delimitación de especies. La combinación de información de múltiples loci independientes proporciona una estimación más robusta de las relaciones y la divergencia entre especies (Yang, 2015b). Los datos multilocus ayudan a promediar la estocasticidad y los efectos específicos de cada gen presentes en los datos de un solo locus (Flouri et al., 2018, 2022). Al analizar múltiples genes, se aumenta la cantidad de evidencia independiente a favor o en contra de la hipótesis nula, lo que mejora la fiabilidad de la delimitación de especies. Es por esto por lo que es de gran importancia incorporar otros genes para dar mayor sustento.

O'Loughlin et al. (2011) catalogó al género *Psolus* como un complejo de especies dado que son especies taxonómicamente difíciles de identificar. Pero dado los resultados moleculares presentados en este estudio, podemos argumentar que la denominación de este grupo es más congruente con pseudo-críptico (Lizano et al., 2024) o diversidad oculta (Korshunova et al., 2019), ya que estas especies simpátricas de la Provincia Magallánica pueden presentar morfologías externas diferentes, pero a un nivel interno presentan diferencias significativas (principalmente en osículos de la suela), lo que contradice la definición de especies crípticas o complejo de especies (Struck et al., 2018).

El presente estudio pudo reconocer variaciones morfológicas a nivel externo para el morfotipo *P. patagonicus* y claras diferencias en las microestructuras internas de valor taxonómico (osículos de la suela) entre *P. patagonicus* y *P. segregatus*. Esto último es congruente con la información molecular de los fragmentos COI y 18S, relaciones filogenéticas mediante inferencia bayesiana y delimitación de especies. Aunque el método de validación utilizado indica la presencia de una sola unidad, el análisis integrado de la evidencia generada direcciona a considerar la presencia de *P. patagonicus* y *P. segregatus* en la Provincia Magallánica. La aproximación integrada de este estudio demuestra su utilidad y revela que la diversidad del género *Psolus* aún no ha sido completamente caracterizada. Esto se debe en parte a la dificultad de acceso a los ambientes donde habitan estas especies, la logística de muestreos y a los mencionados problemas operacionales, como la falta de especialistas. En particular, para *Psolus* spp. se vuelve relevante identificar caracteres diagnósticos que consideren los posibles cambios

fenológicos durante la ontogenia. Por lo tanto, la evidencia generada y disponible por el momento refuerza la utilidad de métodos que integren morfología con datos moleculares. Finalmente, se destaca la relevancia de estudiar el género *Psolus*, para evitar la subestimación de su diversidad y con ello de la biodiversidad de la Provincia Magallánica, lo cual tiene implicaciones importantes para su comprensión y posterior formulación de estrategias efectivas de manejo y conservación.

VII. CONCLUSIÓN

Los resultados de esta investigación indican que la diversidad de especies del género *Psolus* en la Provincia Magallánica es menor de lo que se había reportado previamente en la literatura, lo que lleva al rechazo de la hipótesis inicial. El estudio sugiere que la morfología externa puede llevar a una sobreestimación del número de especies, como se observa en ejemplares con el mismo haplotipo (H4) del gen COI que fueron identificados morfológicamente como *P. patagonicus* y *P. segregatus* en diferentes localidades. Sin embargo, los análisis moleculares apuntan a la presencia de una sola especie de *Psolus* en la región.

Se encontró una mayor variabilidad morfológica en *Psolus patagonicus*, aunque se mantiene diferenciada de *P. segregatus*. La identificación de *P. patagonicus* basada únicamente en la morfología externa no es confiable, siendo necesario el análisis de los osículos (microestructuras calcáreas) para una determinación precisa a nivel de especie. Se propone una descripción más detallada de la morfología externa de ambas especies, incluyendo la granulación de las escamas dorsales y la presencia de una segunda hilera de podios en el margen de la suela. Se descarta la proporción 1:3 entre la apertura oral y anal como carácter diagnóstico para *Psolus antarcticus*, ya que se observó en individuos identificados como *P. patagonicus*.

La propuesta de Martínez (2014) para la determinación de *Psolus patagonicus* se considera robusta tras la revisión de los caracteres morfológicos. El análisis de

distancias genéticas revela una alta similitud entre el morfotipo *P. patagonicus_H5* y el complejo de *P. dubiosus*, sugiriendo una posible sinonimia o relación muy cercana. Por otro lado, se observa una divergencia genética significativa entre *P. charcoti* y *P. segregatus_H38*.

El estudio extiende la distribución conocida de *Psolus patagonicus* al registrar su presencia en las Islas Malvinas/Falkland. Se sugiere que la dispersión de esta especie podría estar asociada a la macroalga *Macrocystis pyrifera*. La baja frecuencia de *P. segregatus* en las muestras podría deberse a que su rango batimétrico se extiende a profundidades mayores que las muestreadas en este estudio.

Se encontraron incongruencias entre la morfología externa y los datos moleculares en algunos ejemplares, lo que subraya la importancia del análisis de los osículos para la identificación de especies en el género *Psolus*. Si bien los análisis filogenéticos de máxima verosimilitud presentaron bajo soporte, la inferencia bayesiana sugirió la existencia de dos clados. Sin embargo, el método de delimitación de especies BPP, que prioriza la hipótesis de una sola especie hasta obtener fuerte evidencia multilocus de divergencia congruente, no encontró diferencias significativas entre los clados, sugiriendo que podrían pertenecer a la misma especie.

Finalmente, se argumenta que el género *Psolus* en la Provincia Magallánica podría considerarse pseudo-críptico o representar diversidad oculta, con variaciones morfológicas externas, pero diferencias significativas a nivel interno (osículos). Se destaca la necesidad de integrar datos morfológicos y moleculares

para una correcta caracterización de la diversidad del género, lo cual es crucial para la comprensión y conservación de la biodiversidad en la Provincia Magallánica.



Anexo 1: Tabla Escamas dorsales

Tabla 13: Matriz de caracteres morfológicos externos, escamas dorsales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (1/3).

Código	Escamas dorsales						
	Deichmann, 1941		Pawson, 1969	Martínez, 2013			Davey & Whitfield, 2013
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>
Pequeñas escamas intercaladas entre las escamas principales.	12 escamas entre boca y ano	delgadas, lisas a cubiertas por gránulos	>10 escamas entre oral y anal.	5 a 8 escamas entre oral y anal.	verrugas en cara dorsal, 10 a 14 escamas entre oral y anal.	grandes dorso-laterales irregulares, hasta 10 mm longitud finamente granulados	
PJ11	0	0	1	0	1	0	0
PJ12	1	0	1	0	1	0	0
PJ13	0	0	1	0	1	0	0
PJ14	0	0	1	0	1	0	0
PJ15	0	0	1	0	1	0	0
PWP6	1	0	1	0	0	0	0
PWP7	0	0	1	0	0	0	0
PWP8	0	0	1	0	0	0	0
PWP9	0	0	1	0	0	0	0
PWP10	0	0	1	0	0	0	0
PWP11	0	0	1	0	0	0	0
PWP12	0	0	1	0	1	0	0
PWP13	0	0	1	0	0	0	0
PWP14	1	0	1	0	1	0	0
PWP15	0	0	1	0	0	0	0
PWP16	0	0	1	0	1	0	0
PWP17	0	0	1	0	0	0	0
PWP18	0	0	1	0	1	0	0
PWP19	0	0	1	0	0	0	0
PWP20	0	0	1	0	1	0	0
PWP21	0	0	1	0	1	0	0
PJ122	0	0	1	0	0	0	0
PJ123	0	0	1	0	1	0	0
PJ124	0	0	1	0	0	0	0
PJ125	0	0	1	0	1	0	0
PJ126	1	0	1	0	1	0	0
PJ127	0	0	1	0	1	0	0
PJ128	0	0	1	0	0	0	0
PJ129	0	0	1	0	1	0	0
PJ130	0	0	1	0	0	0	0
PJ131	0	0	1	0	0	0	0
PJ132	1	0	1	0	0	0	0
PJ133	0	0	1	0	0	0	0
PJ134	1	0	1	0	0	0	0
PJ135	1	0	1	0	1	0	0
PJ136	0	0	1	0	1	0	0
PJ137	1	0	1	0	1	0	0
PJ138	0	0	1	0	1	0	0
PJ139	0	0	1	0	1	0	0



Universidad de Concepción

Tabla 14: Matriz de caracteres morfológicos externos, escamas dorsales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (2/3).

Código	Escamas dorsales						
	Deichmann, 1941		Pawson, 1969	Martínez, 2013			Davey & Whitfield, 2013
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>
	Pequeñas escamas intercaladas entre las escamas principales.	12 escamas entre boca y ano	delgadas, lisas a cubiertas por gránulos	>10 escamas entre oral y anal.	5 a 8 escamas entre oral y anal.	verrugas en cara dorsal, 10 a 14 escamas entre oral y anal.	grandes dorso-laterales irregulares, hasta 10 mm longitud finamente granulados
PJI40	1	0	1	0	1	0	0
PJI41	0	0	1	0	1	0	0
PJI42	1	0	1	0	1	0	0
PJI43	1	0	1	0	1	0	0
PJI44	0	0	1	0	0	0	0
PJI45	0	0	1	0	0	0	0
PJI46	0	0	1	0	1	0	0
PJI47	1	0	1	0	0	0	0
PJI48	0	0	1	0	1	0	0
PJI49	1	0	1	0	0	0	0
PJI50	0	0	1	0	0	0	0
PIN1	0	0	1	0	1	0	0
PIN2	0	0	1	0	0	0	0
PIN3	0	0	1	0	0	0	0
PIN4	0	0	1	0	0	0	0
PIN5	0	0	1	0	1	0	0
PIN6	0	0	1	0	1	0	0
PIN7	0	0	1	0	1	0	0
PIN8	1	0	1	0	1	0	0
PIN9	0	0	1	0	0	0	0
PUS1	0	0	1	0	1	0	0
PUS2	0	0	1	0	0	0	0
PUS3	0	0	1	0	1	0	0
PUS4	0	0	1	0	0	0	0
PUA5	0	0	1	0	1	0	0
PUS6	0	0	1	0	1	0	0
PUS7	0	0	1	0	1	0	0
PUS8	0	0	1	0	0	0	0
PUS9	0	0	1	0	1	0	0
PUS 10	1	0	1	0	1	0	0
PUS 11	0	0	1	0	1	0	0
PUS 12	0	0	1	0	0	0	0
PUS 13	0	0	1	0	1	0	0
PUS 14	0	0	1	0	1	0	0
PUS 15	0	0	1	0	1	0	0
PUS 16	1	0	1	0	1	0	0
PUS 17	0	0	1	0	1	0	0



Universidad de Concepción

Tabla 14: Matriz de caracteres morfológicos externos, escamas dorsales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (3/3).

Código	Escamas dorsales						
	Deichmann, 1941		Pawson, 1969	Martínez, 2013			Davey & Whitfield, 2013
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>
	Pequeñas escamas intercaladas entre las escamas principales.	12 escamas entre boca y ano	delgadas, lisas a cubiertas por gránulos	>10 escamas entre oral y anal.	5 a 8 escamas entre oral y anal.	verrugas en cara dorsal, 10 a 14 escamas entre oral y anal.	grandes dorso-laterales irregulares, hasta 10 mm longitud finamente granulados
PUS 18	0	0	1	0	1	0	0
PUS 19	0	0	1	0	1	0	0
PUS 20	0	0	1	0	1	0	0
PUS 21	0	0	1	0	0	0	0
PUS 22	0	0	1	0	0	0	0
PUS 23	0	0	1	0	0	0	0
PUS 24	0	0	1	0	1	0	0
PUS 25	0	0	1	0	1	0	0
PUS 26	1	0	1	0	1	0	0
PUS 27	0	0	1	0	0	0	0
PUS 28	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16898	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16899	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16900	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16901	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16902	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16903	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16904	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16905	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16906	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16907	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16908	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16911	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16912	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16913	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16914	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16915	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16916	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16917	0	0	1	0	0	1	0
MNHNCL EQUI-16918	0	0	1	0	0	0	0
MNHNCL EQUI-16919	0	0	1	1	0	0	0
MNHNCL EQUI-16920	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16926	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16927	0	0	1	0	1	0	0



Universidad de Concepción

Anexo 2: Tabla Valvas orales

Tabla 14: Matriz de caracteres morfológicos externos, valvas orales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (1/3).

		Valvas orales													
		Deichmann, 1941		Pawson, 1968		Pawson, 1969		Hernández, 1995		MacKenzie & Whitfield, 2011		Martín, 2014			
	Código	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>		
		Valvas orales distintas de anales y dientes radiales en el interior. Escamas con proyecciones perlaadas.	Numerosas valvas no regulares, excepto en juveniles.	5 valvas, Sin escamas pequeñas circundantes	Valvas con formas regulares	Sin valvas radiales	5 pequeñas valvas radiales	Desarrolladas irregularmente, numerosas, + de 5 valvas	Boca y ano cubierto por 5 valvas triangulares	Cubierto por 10 valvas	Cubierto por varias valvas	5 valvas orales grandes y 5 valvas anales más pequeñas, a veces compuestas, con poca o ninguna invasión por escamas cercanas de la pared corporal	5 valvas triangulares y 5 valvas interdentales	6-7 valvas y 5 valvas interdentales	5 valvas triangulares
	PJ11	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ12	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ13	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ14	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ15	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP6	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP7	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP8	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP9	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP10	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP11	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP12	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP13	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP14	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP15	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP16	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP17	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP18	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP19	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP20	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PWP21	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ122	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ123	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ124	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ125	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ126	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ127	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ128	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ129	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ130	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ131	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ132	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ133	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ134	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ135	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ136	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ137	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ138	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ139	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
	PJ140	1	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0



Tabla 15: Matriz de caracteres morfológicos externos, valvas orales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (2/3).

Código	Valvas orales													
	Deichmann, 1941		Pavson, 1968		Pavson, 1969		Hernández, 1985		Mackenzie & Whitfield, 2011		Martinez, 2013			
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	
	Valvas orales distintas de anales, y dientes radiales en el interior de las valvas. Escamas con proyecciones perlaadas.	Numerosas valvas no regulares, excepto en juveniles.	5 valvas, sin escamas pequeñas circundantes	Valvas con formas regulares	Sin valvas radiales	5 pequeñas valvas radiales	Desarrolladas irregularmente, numerosas, + de 5 valvas	Boca y ano cubierto por 5 valvas triangulares	Cubierto por 10 valvas	Cubierto por varias valvas	5 valvas orales grandes y 5 valvas anales más pequeñas, a veces compuestas, con poca o ninguna invasión por escamas cercanas de la pared corporal	5 valvas triangulares y 5 valvas interdentales	6-7 valvas y 5 valvas interdentales	5 valvas triangulares
PJ141	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ142	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ143	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ144	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ145	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ146	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ147	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ148	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ149	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PJ150	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PIN1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN2	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0
PIN3	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN4	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN5	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN6	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN7	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN8	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PIN9	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PUS2	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PUS3	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0
PUS4	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
PUA5	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
PUS6	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS7	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS8	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS9	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
PUS10	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS11	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS12	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
PUS13	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS14	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0
PUS15	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0



Tabla 15: Matriz de caracteres morfológicos externos, valvas orales por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (3/3).

Código	Valvas orales												
	Deichmann, 1941		Pawson, 1968		Pawson, 1969		Hernández, 1985		Mackenzie & Whitfield, 2011		Martinez, 2013		
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. sequegatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. sequegatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. sequegatus</i>	<i>P. antarcticus</i>
PUS 16	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 17	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 18	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 19	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 20	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 21	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 22	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 23	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 24	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 25	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 26	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 27	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 28	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16898	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16899	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
MINHNCL EQUI-16900	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
MINHNCL EQUI-16901	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1
MINHNCL EQUI-16902	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16903	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16904	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16905	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16906	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16907	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16908	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16911	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16912	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16913	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16914	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16915	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16916	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0
MINHNCL EQUI-16917	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0
MINHNCL EQUI-16918	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
MINHNCL EQUI-16919	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MINHNCL EQUI-16920	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
MINHNCL EQUI-16926	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0
MINHNCL EQUI-16927	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0



Universidad de Concepción

Anexo 3: Tabla Podios

Tabla 15: Matriz de caracteres morfológicos externos, podios por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (1/2).

Código	Podios								
	Deichmann, 1940		Pawson, 1968	Hernández, 1985		Mackenzie & Whitfield, 2011; Davey & Whitfield, 2013	Martínez, 2013		
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. segregatus</i>
	1-2 filas	con podios marginales	2 filas de podios alrededor del margen. 5 podios anteriores y posteriores. Sin podios midventral.	corona marginal de podios y medio ventral desnuda.	bordes la suela, ausentes en medio ventral.	hilera interna pareada zig-zag más grandes y periféricos más pequeños dispersos, desnudos en la parte central aunque los pies tubulares se extienden de forma variable a los extremos sobre la línea media ventral.	al margen en hilera simple, disposición en zig-zag.	dispuesto en 3 bandas, 2 laterales en zig-zag y una central en zona extremo anterior y posterior.	dispuestos al margen de la suela, en zig-zag, doble hilera e hilera simple en ejemplares pequeños. Región media con hilera simple intermitente
PJI1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI2	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI3	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI4	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI5	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP6	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP7	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP8	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP9	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP10	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP11	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP12	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP13	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP14	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP15	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP16	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP17	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP18	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP19	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP20	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PWP21	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI22	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI23	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI24	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI25	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI26	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI27	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI28	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI29	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI30	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI31	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI32	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI33	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI34	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI35	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI36	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI37	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI38	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI39	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI40	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI41	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI42	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI43	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI44	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI45	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI46	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI47	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI48	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI49	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PJI50	1	1	0	1	1	0	1	0	0



Universidad de Concepción

Tabla 16: Matriz de caracteres morfológicos externos, podios por autores. Los colores indican la procedencia de la localidad; azul, Islas Malvinas/ Falkland, verde: Puerto Williams, rosado: Ushuaia, amarillo: Isla Carlos III, naranja: Cabo de Hornos y verde: Canal Ocasión (2/2).

Código	Podios								
	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. segregatus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. patagonicus</i>	<i>P. antarcticus</i>	<i>P. segregatus</i>
	1-2 filas	con podios marginales	2 filas de podios alrededor del margen, 3 podios anteriores y posteriores. Sin podios midventral.	corona marginal de podios y medio ventral desnuda.	bordes de la suela, ausentes en medio ventral.	hilera interna pareada: zig-zag más grandes y periféricos más pequeños dispersos, desnudos en la parte central aunque los pies tubulares se extienden de forma variable a los extremos sobre la línea media ventral.	al margen en hilera simple, disposición en zig-zag.	dispuesto en 3 bandas, 2 laterales en zig-zag y una central en zona extremo anterior y posterior.	dispuestos al margen de la suela, en zig-zag, doblé hilera e hilera simple en ejemplares pequeños. Región media con hilera simple intermitente
PIN1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN2	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN3	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN4	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN5	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN6	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN7	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN8	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PIN9	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS1	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS2	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS3	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS4	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS5	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS6	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS7	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS8	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS9	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 10	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 11	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 12	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 13	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 14	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 15	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 16	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 17	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 18	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 19	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 20	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 21	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 22	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 23	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 24	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 25	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 26	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 27	1	1	0	1	1	0	1	0	0
PUS 28	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16898	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16899	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16900	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16901	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16902	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16903	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16904	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16905	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16906	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16907	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16908	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16911	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16912	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16913	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16914	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16915	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16916	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16917	1	1	1	0	0	0	0	1	0
MNHNCL EQUI-16918	1	1	0	1	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16919	1	1	0	1	0	1	0	1	1
MNHNCL EQUI-16920	1	1	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16926	1	1	0	0	1	0	1	0	0
MNHNCL EQUI-16927	1	1	1	1	0	0	0	1	0



Universidad de Concepción

Anexo 4: Descripción de los morfotipos identificados con base en caracteres externos

Descripción enmendada de Hernández (1985) & Martínez (2014), las partes del texto modificadas por mi autoría están subrayadas.

7.1. Morfotipo *Psolus patagonicus* Ekman, 1925

Descripción: Cuerpo de forma ovalada, con una superficie dorsal convexa a plana cubierta por escamas imbricadas que presentan pequeños gránulos conspicuos agudos; éstos recubren cada una de las escamas de manera homogénea; algunos individuos presentan las escamas lisas (estas no están relacionadas con el tamaño de los individuos). Las escamas son grandes en la línea media superior, pero disminuyen en tamaño hacia el margen. En la cara dorsal anterior se encuentra la apertura oral o boca, cubierta por 5 valvas triangulares, y 5 dientes intervalvales más pequeños, alargados y con punta aguda. Asimismo, la apertura anal presenta 5 valvas grandes y 5 dientes intervalvales. La apertura oral tiene un mayor tamaño que la apertura anal (Fig. 8A).

En la cara ventral presenta una suela desnuda translúcida que deja ver los órganos internos; se observa que una parte del intestino se encuentra pegado a la suela en la parte media. La suela está rodeada de dos hileras de podios, la más próxima a la suela presenta un mayor tamaño; estos se disponen en zig-zag. La segunda hilera es de menor tamaño, con podios mayoritariamente retraídos que se pueden observar a contraluz. Estos podios más pequeños se disponen en una fila recta única, casi al borde externo de la suela (Fig. 8C).



Universidad de Concepción

El anillo calcáreo comprende cinco piezas radiales y cinco interradales unidas en la base, ambas con un proceso anterior. Cada pieza radial tiene una hendidura profunda y estrecha en la zona anterior. La base de las piezas radiales e interradales son alargadas y con forma de onda (Fig. 8E).

Cabe mencionar que se identificó una estructura nueva no descrita anteriormente, ubicada entre los tentáculos. Esta se compone de 5 piezas alargadas y digitiformes, presente solo en individuos machos con gónadas engrosadas (Fig. 7).

7.2. Morfotipo *Psolus segregatus* Perrier, 1905

Cuerpo aplanado ovalado, con una superficie dorsal más plana que convexa. Dorso cubierto por escamas imbricadas que presentan gránulos a lo largo de su borde marginal; estos van desapareciendo, acercándonos a las escamas más pequeñas al borde de la superficie dorsal y comienzo de la suela. En la cara dorsal anterior se encuentra la apertura oral o boca, cubierta por 5 valvas pentagonales y 5 dientes intervalvales basales más pequeños. La apertura anal presenta numerosas escamas: 7 escamas triangulares obtusas superpuestas de a 2 escamas sobre una escama de fila interna de escamas. La apertura oral es más grande que la apertura oral (Fig. 8B). En la cara ventral se encuentra una suela gruesa desprovista de podios en la zona central. La rodean 2 hileras de podios; la primera hilera próxima al margen exterior de la suela está compuesta por podios de pequeño tamaño dispuestos en una línea simple; en cambio, la segunda hilera interna exhibe podios más grandes, dispuestos en zig-zag o en hilera simple (Fig. 8D).



Universidad de Concepción

El anillo calcáreo comprende cinco piezas radiales y cinco interradales unidas en la base, ambas con un proceso anterior. Cada pieza radial tiene una abolladura leve en zona anterior. Las piezas interradales tienen una terminación en punta (Fig. 8)



REFERENCIAS

- Alvarado, J., & Solís-Marín, F. (2013). Echinoderm Research and Diversity in Latin America. En J. J. Alvarado & F. A. Solis-Marin (Eds.), *Echinoderm Research and Diversity in Latin America* (pp. 1–9). Springer.
- Andersson, L. (1990). The Driving Force: Species Concepts and Ecology. *TAXON*, 39(3), 375–382.
- Arriaga Ochoa, J., & Solís-Marín, F. A. (2007). *Holoturoideos (Echinodermata: Holothuroidea) del Golfo de California*.
- Baeza, J. A., & Prakash, S. (2019). An integrative taxonomic and phylogenetic approach reveals a complex of cryptic species in the ‘peppermint’ shrimp *Lysmata wurdemanni* sensu stricto. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 185(4), 1018–1038.
- Ball, R. M., Jr., Neigel, J. E., & Avise, J. C. (1990). GENE GENEALOGIES WITHIN THE ORGANISMAL PEDIGREES OF RANDOM-MATING POPULATIONS. *Evolution*, 44(2), 360–370.
- Barboza, C. A. de M., Moura, R. B., Lanna, A. M., Oackes, T., & Campos, L. S. (2011). ECHINODERMS AS CLUES TO ANTARCTIC ~ SOUTH AMERICAN CONNECTIVITY. *Oecologia Australis*, 15(01), 86–110.
- Bellodi, A., Benvenuto, A., Melis, R., Mulas, A., Barone, M., Barría, C., Cariani, A., Carugati, L., Chatzistryrou, A., Desrochers, M., Ferrari, A., Guallart, J., Hemida, F., Mancusi, C., Mazzoldi, C., Ramírez-Amaro, S., Rey, J.,



Universidad de Concepción

- Scannella, D., Serena, F., Tinti, F., Vella, A., Follesa, M. & Cannas, R. (2022). Call me by my name: Unravelling the taxonomy of the gulper shark genus *Centrophorus* in the Mediterranean Sea through an integrated taxonomic approach. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 195(3), 815–840.
- Borges, P., Terzopoulou, R., Emerson, B. C., & Serrano, A. R. M. (2017). Cryptic diversity in the Azorean beetle genus *Tarphius* Erichson, 1845 (Coleoptera: Zopheridae): An integrative taxonomic approach with description of four new species. *Zootaxa*, 4236(3), Article 3.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.-H., Xie, D., Suchard, M. A., Rambaut, A., & Drummond, A. J. (2014). BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLOS Computational Biology*, 10(4).
- Briggs, J. C. (1974). *Marine zoogeography / [by] John C. Briggs*. — New York; Montreal: McGraw-Hill.
- Burridge, A. K., Van Der Hulst, R., Goetze, E., & Peijnenburg, K. T. C. A. (2019). Assessing species boundaries in the open sea: An integrative taxonomic approach to the pteropod genus *Diacavolinia*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 187(4), 1016–1040.
- Camus, P. A. (2001). Biogeografía marina de Chile continental. *Revista chilena de historia natural*, 74(3), 587–617.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22(17), 4369–4383.
- Clement, M., Posada, D., & Crandall, K. A. (2000). TCS : A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10), 1657–1659.



Universidad de Concepción

- Conforti, S., & Costantini, F. (2022). Potential crypticity within two decapod (Crustacea) genera: *Galathea* Fabricius, 1793 and *Eualus* Thallwitz, 1891 suggested by integrative taxonomic approach. *Mediterranean Marine Science*, 23(3), Article 3.
- Corstorphine, E. A. (2010). *DNA Barcoding of Echinoderms: Species diversity and patterns of molecular evolution*.
- Craig, R. K. (2023). Environmental Law (Lewis & Clark Law School). *Marine Biodiversity: Challenges, Trends, and a New Treaty*, 53(3), 343.
- Cumming, R. A., Nikula, R., Spencer, H. G., & Waters, J. M. (2014). Transoceanic genetic similarities of kelp-associated sea slug populations: Long-distance dispersal via rafting? *Journal of Biogeography*, 41(12), 2357–2370.
- Davey, N., & Whitfield, E. (2013). The Psolidae of New Zealand and some additions to the Macquarie Ridge fauna (Echinodermata: Holothuroidea: Psolidae). *Memoirs of Museum Victoria*, 70, 51–67.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society*, 85(3), 407–417.
- Deichmann, E. (1941). The Holothurioidea collected by the *Velero III* during the years 1932 to 1938. Part I Dendrochirota. *Allan Hancock Pacific Expedition*, 8, 61–194.
- Deichmann, E. (1947). Note sur une Holothurie abyssale. *Abyssocucumis ingolfi*. *Bulletin du Muséum national d'histoire naturelle*, 19(6), 459–463.



Universidad de Concepción

- Deichmann, E. (1958). The Holothurioidea collected by the Velero III and IV during the years 1932 to 1954. Part II. Aspidochirota. *Allan Hancock Pacific Expedition*, 11, 253–349.
- Drummond, A. J., Ho, S. Y. W., Phillips, M. J., & Rambaut, A. (2006). Relaxed Phylogenetics and Dating with Confidence. *PLOS Biology*, 4(5).
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: Multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792–1797.
- Ekman, S. (1925). *Holothurien*. (Vol. 1). Further Zoological Results of the Swedish Antarctic Expedition 1901-1903.
- Ekman, S. (1953). *Zoogeography of the Sea* (Sidgwick&Jackson).
- Ekman, V. (1923). *Über Horizontalzirkulation bei winderzeugten Meeresströmungen*. Almqvist & Wiksell.
- Fernández-Rodríguez, I., Arias, A.-, Borrell, Y. J., Anadón, N., Massin, C., & Acuña, J. L. (2018). *Psolus rufus*, a new species of sea cucumber (Holothuroidea: Psolidae) from northern Spain (Bay of Biscay). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 98(7), 1695–1702.
- Filatov, D. A. (2002). proseq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 621–624.
- Flouri, T., Huang, J., Jiao, X., Kapli, P., Rannala, B., & Yang, Z. (2022). Bayesian Phylogenetic Inference using Relaxed-clocks and the Multispecies Coalescent. *Molecular Biology and Evolution*, 39(8), msac161.
- Flouri, T., Jiao, X., Rannala, B., & Yang, Z. (2018). Species Tree Inference with BPP Using Genomic Sequences and the Multispecies Coalescent. *Molecular Biology and Evolution*, 35(10), 2585–2593.



Universidad de Concepción

- Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: A revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707–724.
- Giménez, J., & Penchaszadeh, P. E. (2010). Brooding in *Psolus patagonicus* (Echinodermata: Holothuroidea) from Argentina, SW Atlantic Ocean. *Helgoland Marine Research*, 64(1), 21–26.
- Godfray, H. C. J. (2002). Challenges for taxonomy. *Nature*, 417(6884), 17–19.
- Gómez Daglio, L., & Dawson, M. N. (2019). Integrative taxonomy: Ghosts of past, present and future. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 99(06), 1237–1246.
- González-Wevar, C. A., Segovia, N. I., Rosenfeld, S., Maturana, C. S., Jeldres, V., Pinochet, R., Saucède, T., Morley, S. A., Brickle, P., Wilson, N. G., Spencer, H. G., & Poulin, E. (2022). Seven snail species hidden in one: Biogeographic diversity in an apparently widespread periwinkle in the Southern Ocean. *Journal of Biogeography*, 49(8), 1521–1534.
- Häussermann, V., Ballyram, S. A., Försterra, G., Cornejo, C., Ibáñez, C. M., Sellanes, J., Thomasberger, A., Espinoza, J. P., & Beaujot, F. (2021). Species That Fly at a Higher Game: Patterns of Deep–Water Emergence Along the Chilean Coast, Including a Global Review of the Phenomenon. *Frontiers in Marine Science*, 8, 688316.
- Hennig, W. (1999). *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press.
- Hernández, D. A. (1985). *Holothuroidea del Mar Argentino* [Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales].



Universidad de Concepción

- Hillis, D. M., Chambers, E. A., & Devitt, T. J. (2021). Contemporary Methods and Evidence for Species Delimitation. *Ichthyology & Herpetology*, 109(3), 895–903.
- Hoareau, T. B., & Boissin, E. (2010). Design of phylum-specific hybrid primers for DNA barcoding: Addressing the need for efficient COI amplification in the Echinodermata. *Molecular Ecology Resources*, 10(6), 960–967.
- Jackson, N. D., Carstens, B. C., Morales, A. E., & O'Meara, B. C. (2017). Species Delimitation with Gene Flow. *Systematic Biology*, 66(5), 799–812.
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), 1630–1638.
- Korshunova, T., Picton, B., Furfaro, G., Mariottini, P., Pontes, M., Prkić, J., Fletcher, K., Malmberg, K., Lundin, K., & Martynov, A. (2019). Multilevel fine-scale diversity challenges the 'cryptic species' concept. *Scientific Reports*, 9(1), 6732.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1547.
- Lambert, D. M., & Spencer, H. G. (1995). Speciation and the recognition concept: Theory and application. *Johns Hopkins University Press*.
- Lanfear, R., Frandsen, P. B., Wright, A. M., Senfeld, T., & Calcott, B. (2017). PartitionFinder 2: New Methods for Selecting Partitioned Models of



Universidad de Concepción

Evolution for Molecular and Morphological Phylogenetic Analyses.

Molecular Biology and Evolution, 34(3), 772–773.

- Larraín, A. P. (1975). Los equinodermos fósiles y recientes de Chile. *Gayana Zoología (Chile)*, 35, 3–189.
- Layeghi, Y., Momtazi, F., Yazdi, A. B., Zarei, R., & Salahi, M. (2022). An integrated taxonomic approach, using geometric morphometric methods, reveals the cryptic diversity of *Parhyale darvishi* Momtazi & Maghsoudlou, 2016 (Crustacea: Amphipoda: Hyalidae). *Zoologischer Anzeiger*, 299, 96–105.
- Leigh, J. W., & Bryant, D. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9), 1110–1116.
- Lizano, A. M. D., Kim, K. M., Juinio-Meñez, M. A., & Ravago-Gotanco, R. (2024). Pseudocryptic diversity and species boundaries in the sea cucumber *Stichopus cf. horrens* (Echinodermata: Stichopodidae) revealed by mitochondrial and microsatellite markers. *Scientific Reports*, 14(1), 4886.
- Luo, A., Ling, C., Ho, S. Y. W., & Zhu, C.-D. (2018). Comparison of Methods for Molecular Species Delimitation Across a Range of Speciation Scenarios. *Systematic Biology*, 67(5), 830–846.
- Macaya, E. C., Tala, F., Hinojosa, I. A., & Rothäusler, E. (2020). Detached Seaweeds as Important Dispersal Agents Across the Southern Ocean. En I. Gómez & P. Huovinen (Eds.), *Antarctic Seaweeds: Diversity, Adaptation and Ecosystem Services* (pp. 59–81). Springer International Publishing.
- Mace, G. M. (2004). The role of taxonomy in species conservation. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 359(1444), 711–719.



Universidad de Concepción

- Mallet, J. (1995). A species definition for the modern synthesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 10(7), 294–299.
- Martens, K., & Segers, H. (2005). Taxonomy and systematics in biodiversity research. *Hydrobiologia*, 542(1), 27–31.
- Martínez, A., Merino-Yunnissi, C., & Mutschke, E. (2018). A new catalogue for the echinoderms housed in the collection of invertebrate zoology department at the national museum of natural history, Chile. *Museo Nacional De Historia Natural, Chile*, 68, 95.
- Martínez, M. I. (2014). Diversidad de Dendrochirotida en el Mar Argentino (Echinodermata: Holothuroidea); aspectos taxonómicos, filogenéticos, ecológicos y biogeográficos.
- Martinez, M. I., Martínez-Salinas, A. P., & Moura, R. B. (2024). Chapter 14— Knowledge of biodiversity and reproduction in sea cucumbers from southern South America to the Antarctic Peninsula. En A. Mercier, J.-F. Hamel, A. D. Suhrbier, & C. M. Pearce (Eds.), *The World of Sea Cucumbers* (pp. 201–220). Academic Press.
- Martins, L., & Tavares, M. (2019). Two new species of *Psolus* Oken from Brazil (Holothuroidea: Psolidae), with neotype designation and redescription of *Psolus vitoriae* Tommasi, 1971, and a key to the southwestern Atlantic and Magellanic species. *Zootaxa*, 4563(3), 531.
- Massin, C., & Hendrickx, M. E. (2011). Deep-water Holothuroidea (Echinodermata) collected during the TALUD cruises off the Pacific coast of Mexico, with the description of two new species. *Revista mexicana de biodiversidad*, 82(2), 413–443.



Universidad de Concepción

Mayr, E. (1942). Systematics and the origin of species. *Columbia Univ. Press, New York*.

Michonneau, F. (2017, agosto 2). *Using GMYC for species delineation*.

Miller, A. K., Kerr, A. M., Paulay, G., Reich, M., Wilson, N. G., Carvajal, J. I., & Rouse, G. W. (2017). Molecular phylogeny of extant Holothuroidea (Echinodermata). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 111, 110–131.

Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, 1–8.

Mishler, B. D. (1985). The Morphological, Developmental, and Phylogenetic Basis of Species Concepts in Bryophytes. *The Bryologist*, 88(3), 207–214.

Mutschke, E., & Ríos, C. (2006). DISTRIBUCIÓN ESPACIAL Y ABUNDANCIA RELATIVA DE EQUINODERMOS EN EL ESTRECHO DE MAGALLANES, CHILE. *Revista Ciencia y Tecnología del Mar*, 29(1), 13.

Nixon, K. C., & Wheeler, Q. D. (1990). An Amplification of the Phylogenetic Species Concept. *Cladistics*, 6(3), 211–223.

O'Loughlin, P. M., Paulay, G., Davey, N., & Michonneau, F. (2011). The Antarctic region as a marine biodiversity hotspot for echinoderms: Diversity and diversification of sea cucumbers. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1–2), 264–275.

O'Loughlin, P. M., & Whitfield, E. (2010). New species of Psolus Oken from Antarctica (Echinodermata: Holothuroidea: Psolidae). *Zootaxa*, 2528(1), 61.



Universidad de Concepción

- O'Loughlin, P., Tavancheh, E., & Harding, C. (2016). The Discovery Expedition
Sea cucumbers (Echinodermata: Holothuroidea). *Memoirs of Museum
Victoria*, 75, 53–70.
- Pagel, M., & Meade, A. (2004). A Phylogenetic Mixture Model for Detecting
Pattern-Heterogeneity in Gene Sequence or Character-State Data.
Systematic Biology, 53(4), 571–581.
- Pawson, D. L. (1969). Holothuroidea from Chile report no. 46 of the Lund
University Chile Expedition 1948–1949. *Sarsia*, 38(1), 121–146.
- Pawson, D. L. (1980). Holothuroidea. *Notes for a Short Course: Studies in
Geology*, 3, 175–189.
- Pawson, D. L., Pawson, D. J., & King, R. A. (2010). A taxonomic guide to the
Echinodermata of the South Atlantic Bight, USA: 1. Sea cucumbers
(Echinodermata: Holothuroidea). *Zootaxa*, 2449(1), 1.
- Prata, J., De Castro Manso, C., & Christoffersen, M. (2020). Dendrochirotida
(Echinodermata: Holothuroidea) from the northeastern coast of Brazil.
Zootaxa, 4755(3), 401–453.
- Prieto Ríos, E. (2010). Taxonomía de Holothuroidea (Echinodermata) del mar del
Perú. *Universidad Nacional Mayor de San Marcos*.
- Rambaut, A., Drummond, A. J., Xie, D., Baele, G., & Suchard, M. A. (2018).
Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7.
Systematic Biology, 67(5), 901–904.
- Randsø, P. V., Yamasaki, H., Bownes, S. J., Herranz, M., Domenico, M. D., Qii, G.
B., & Sørensen, M. V. (2019). Phylogeny of the Echinoderes coulli-group



Universidad de Concepción

- (Kinorhyncha: Cyclorhagida: Echinoderidae) – a cosmopolitan species group trapped in the intertidal. *Invertebrate Systematics*, 33(3), 501–517.
- Regan, C. T. (1914). II.—Diagnoses of new marine fishes collected by the British Antarctic ('Terra Nova') Expedition. *Annals and Magazine of Natural History*, 13(73), 11–17.
- Ribani, A., Taurisano, V., Rakaj, A., Fianchini, A., Grosso, L., Pensa, D., Pulcini, D., Buttazzoni, L., Schiavo, G., Bovo, S., Bertolini, F., Utzeri, V. J., Tinti, F., Capoccioni, F., & Fontanesi, L. (2024). Monitoring the genetic diversity in holothurian populations from the Italian coasts with mitochondrial DNA sequences. *Scientific Reports*, 14(1), 24592.
- Ríos, C., Arntz, W. E., Gerdes, D., Mutschke, E., & Montiel, A. (2007). Spatial and temporal variability of the benthic assemblages associated to the holdfasts of the kelp *Macrocystis pyrifera* in the Straits of Magellan, Chile. *Polar Biology*, 31(1), 89–100.
- Ríos, C., Mutschke, E., Montiel, A., Gerdes, D., & Arntz, W. E. (2005). Soft-bottom macrobenthic faunal associations in the southern Chilean glacial fjord complex. *Scientia Marina*, 69(S2), Article S2.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J., & Teslenko, M. (2011). Draft MrBayes version 3.2 Manual: Tutorials and Model Summaries. *Distributed with the Software from [Http://Brahms. Biology. Rochester. Edu/Software. Html](http://brahms.biology.rochester.edu/software.html)*.
- Rull, V. (2022). Biodiversity crisis or sixth mass extinction? *EMBO reports*, 23(1).
- Sala, E., & Knowlton, N. (2006). Global Marine Biodiversity Trends. *Annual Review of Environment and Resources*, 31(1), 93–122.
- Sattler, R. (2022). *Methodological Problems in Taxonomy*. 10.



Universidad de Concepción

Saucède, T., Díaz, A., Pierrat, B., Sellanes, J., David, B., Féral, J.-P., & Poulin, E.

(2015). The phylogenetic position and taxonomic status of *Sterechinus bernasconiae* Larrain, 1975 (Echinodermata, Echinoidea), an enigmatic Chilean sea urchin. *Polar Biology*, 38(8), 1223–1237.

Silvestro, D., & Michalak, I. (2012). *raxmlGUI: a graphical front-end for RAxML* | *SpringerLink*. 12, 335–337.

Simpson, G. G. (1951). The Species Concept. *Evolution*, 5(4), 285–298.

Smirnov, A. V. (2012). System of the class Holothuroidea. *Paleontological Journal*, 46(8), 793–832.

Solís-Marín, F. A., Laguarda-Figueras, A., Durán-González, A., Ahearn, C. G., & Vega, J. T. (2005). Equinodermos (Echinodermata) del Golfo de California, México. *Rev. Biol. Trop.*, 53, 17.

Solís-Marín, F. A., Laguarda-Figueras, A., & Honey-Escandón, M. (2014). Biodiversidad de equinodermos (Echinodermata) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85, 441–449.

Sonet, G., Smitz, N., Vangestel, C., & Samyn, Y. (2022). DNA barcoding echinoderms from the East Coast of South Africa. The challenge to maintain DNA data connected with taxonomy. *PLOS ONE*, 17(10).

Spalding, M. D., Fox, H. E., Allen, G. R., Davidson, N., Ferdaña, Z. A., Finlayson, M., Halpern, B. S., Jorge, M. A., Lombana, A., Lourie, S. A., Martin, K. D., McManus, E., Molnar, J., Recchia, C. A., & Robertson, J. (2007). Marine Ecoregions of the World: A Bioregionalization of Coastal and Shelf Areas. *BioScience*, 57(7), 573–583.



Universidad de Concepción

- Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: A tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. *Bioinformatics*, 30(9), 1312–1313.
- Struck, T. H., Feder, J. L., Bendiksbj, M., Birkeland, S., Cerca, J., Gusarov, V. I., Kistenich, S., Larsson, K.-H., Liow, L. H., Nowak, M. D., Stedje, B., Bachmann, L., & Dimitrov, D. (2018). Finding Evolutionary Processes Hidden in Cryptic Species. *Trends in Ecology & Evolution*, 33(3), 153–163.
- Suzuki, Y., Glazko, G. V., & Nei, M. (2002). Overcredibility of molecular phylogenies obtained by Bayesian phylogenetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(25), 16138–16143.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38(7), 3022–3027.
- Templeton, A. R. (1998). Human Races: A Genetic and Evolutionary Perspective. *American Anthropologist*, 100(3), 632–650.
- Toral-Granda, V., & Islands, G. (2006). *La situación biológica y comercial de cohombros de mar de las familias holothuriidae y stichopodidae*.
- Vaney, C. (1906). *Expédition antarctique française (1903-1905) : Commandée par le dr. Jean Charcot. Holothuries*. (pp. 1–104). Masson.
- Ward, R. D., Holmes, B. H., & O'Hara, T. D. (2008). DNA barcoding discriminates echinoderm species. *Molecular Ecology Resources*, 8(6), 1202–1211.
- Waters, J. M., King, T. M., Fraser, C. I., & Garden, C. (2018). Rafting dispersal in a brooding southern sea star (Asteroidea: Anasterias). *Invertebrate Systematics*, 32(2), 253.



Universidad de Concepción

- Will, K. W., Mishler, B. D., & Wheeler, Q. D. (2005). Perils of DNA Barcoding and the Need for Integrative Taxonomy | *Systematic Biology* | Oxford Academic. *Systematic Biology*, 54(5), 844–851.
- Wright, S. (1940). The statistical consequences of Mendelian heredity in relation to speciation. In *The new systematics*, 161–183.
- Wu, S., Xiong, J., & Yu, Y. (2015). Taxonomic Resolutions Based on 18S rRNA Genes: A Case Study of Subclass Copepoda. *PLOS ONE*, 10(6).
- Xia, X. (2001). DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Journal of Heredity*, 92(4), 371–373.
- Xia, X. (2018). DAMBE7: New and Improved Tools for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1550–1552.
- Xia, X., Xie, Z., Salemi, M., Chen, L., & Wang, Y. (2002). An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 26(1), 1–7.
- Yamasaki, H., & Fujimoto, S. (2014). Two new species in the *Echinoderes coulli* group (Echinoderidae, Cyclorhagida, Kinorhyncha) from the Ryukyu Islands, Japan. *ZooKeys*, 382, 27–52.
- Yang, Z. (2015a). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology*, 61(5), 854–865.
- Yang, Z. (2015b). The BPP program for species tree estimation and species delimitation. *Current Zoology*, 61(5), 854–865.
- Zhang, C., Rannala, B., & Yang, Z. (2014). Bayesian Species Delimitation Can Be Robust to Guide-Tree Inference Errors. *Systematic Biology*, 63(6), 993–1004.



Universidad de Concepción

Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements.

Bioinformatics, 29(22), 2869–2876.