

UCH-FC  
MAG-EDD  
P 349e  
C.1



**EFFECTOS DEL CAMBIO CLIMÁTICO SOBRE LA DEMOGRAFÍA HISTÓRICA  
DE PINGÜINOS DEL GÉNERO PYGOSCELIS: UNA APROXIMACIÓN  
MOLECULAR.**

**Tesis**

**Entregada A La**

**Universidad De Chile**

**En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos**

**Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas con mención en ecología y biología  
evolutiva.**

**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Fabiola Andrea Peña Morcom**

**Abril, 2013**

**Director de Tesis Dr. Elie Poulin.**

**Co-Directora de tesis: Dra. Juliana A. Vianna.**



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACION  
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por la candidata.

FABIOLA ANDREA PEÑA MORCOM

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 5 de Abril de 2013.

Director de Tesis:

Dr. Elie Poulin

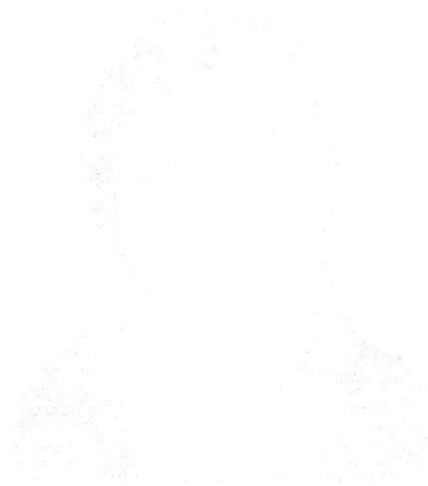
Co-Directora de Tesis:

Dra. Juliana A. Vianna

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Alejandro Simeone

Dr. David Véliz



*A mis padres, hermanos y sobre todo a Isaac, recuerda nunca dejar de caminar.*

Agradecimientos,

Quisiera en primera lugar agradecer a mis padres, Carlos Peña y Erika Morcom por su apoyo y ayuda constante. A mis hermanos David Peña e Ingrid Peña, a la Cote y el Diego, y a mi sobrino Isaac por ser el niño maravilloso y alegre que es.

Agradezco también a mis tutores, Dr. Elie Poulin y Dra. Juliana. A. Vianna (al fin lo escribí bien Ju!), quienes confiaron en mí y siempre estuvieron disponibles para ayudarme a resolver mis dudas. A mis revisores, Dr. David Véliz y Dr. Alejandro Simeone, por su tiempo y buena disposición.

A mis compañeros del LEM quienes me acompañaron tanto en terreno como día a día. Agradecer especialmente a la Ceci y a Christian, por su eterna paciencia para enseñarme y explicarme una y otra vez lo mismo. A la Clau por ayudarme a perseguir pingüinos y hacer más amenas las tardes en el LEM.

Agradezco a Pablo Negrete, Dr. Daniel González y equipo, Gisele Dantas por su colaboración en terreno y con muestras.

A mis amigas y amigos, por el gran apoyo que han sido a lo largo del tiempo. Inelia, Andrea, Patty, han sido grandes amigas, mentoras, compañeras y por sobre todo, lograron sorprenderme!. A Felipe, Pablo, Diego por ser buenos amigos sobre todo en los tiempos difíciles.

Agradecer al Instituto Antártico Chileno (INACH) por confiar en mí y otorgarme la beca de Apoyo a Tesis de Magíster que permitió obtener los recursos y el apoyo logístico necesario para el desarrollo de esta tesis



Agradezco a la Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT) por el apoyo financiero para el desarrollo de mis estudios de magíster.

Finalmente quisiera agradecer al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), junto a la Association of Polar Early Career Scientists (APECS), por el apoyo financiero brindado para la asistencia a congresos.

Gracias



# INDICE

Resumen	xii
Abstract	xiv
1. Introducción	1
1.1 Concepto del calentamiento global	1
1.2 Evolución del clima en Antártica y sus efectos sobre la biota	7
1.2.1 El continente antártico	7
1.2.2 Efectos del último periodo glacial sobre la biota antártica	10
1.3 Pingüinos Antárticos	12
2. Hipótesis y objetivos	15
2.1 Hipótesis	15
2.1.1 Hipótesis General	15
2.1.2 Predicción	15
2.2 Objetivos	16
2.2.1 Objetivo General	16
2.2.2 Objetivos específicos	16
3 Metodología	17
3.1 Área de estudio y muestreo	17
3.2 Extracción de ADN y PCR	19
3.3 Diversidad genética	20
3.4 Estructuración genética poblacional	21
3.5 Inferencia demográfica.	22

4 Resultados	25
4.1 Diversidad Genética	25
4.2 Estructuración genética	29
4.3 Inferencia demográfica	35
4.3.1 Región hipervariable I mtDNA	35
4.3.2 Intron 7 del gen de $\beta$ -fibrinogeno	40
5. Discusión	43
5.1 Conclusión	50
6. Bibliografía	52

# INDICE DE FIGURAS

## 1. Introducción

Figura 1.- Variaciones en las temperaturas del océano antártico en verano durante el período 1955-1998, para cuatro niveles de profundidad (superficie, 20 m, 50 m y 100 m) (modificado de Meredith & King, 2005).....3

Figura 2.- Variaciones en los tamaños poblacionales de tres especies de pingüinos entre 1970-2005. En morado se observa *Pygoscelis adeliae*, en naranja *Pygoscelis papua*, y en verde *Pygoscelis antarctica*. (Modificado de McClintock et al, 2008).....6

Figura 3.- Registros de isótopos de carbono y oxígeno de profundidad. Las barras verticales entregan representaciones cualitativas crudas del volumen de hielo en cada continente en relación al último máximo glacial (Modificado de Zachos et al, 2001).....9

Figura 4.- Representación estereográfica polar de la región Antártica hace 40, 25, 15 y 5 Ma. La Antártica se observa parcialmente cubierta de hielo (b y c) y completamente cubierta (d, e y f). En colores se muestran los géneros de pingüinos actuales mientras que enumerados del 1 al 6 los géneros fósiles. En b

las flechas indican el curso de la corriente circumpolar Antártica (modificado de Baker et al, 2006).....13

### 3. Metodología

Figura 5.- Puntos de muestreo en la Península Antártica para las especies de pingüinos *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis papua*.....18

### 4. Resultados

Figura 6.- Red de haplotipos para *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) empleando el marcador mitocondrial HVR-I.....28

Figura 7.- Red de haplotipos para *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) empleando el marcador nuclear  $\beta$ fibint7.....29

Figura 8.- Distribución de probabilidad a posteriori del número de cluster o poblaciones de *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) para el marcador HVR-I.....36

Figura 9.- Mapa de la probabilidad *a posteriori* de los miembros de cada población para las poblaciones de *P. adeliae*, empleando el marcador HVR-I.....34

Figura 10.- Distribución *mismatch* para el marcador mitocondria HVR-I en *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B). Bajo el modelo de expansión instantánea.....36

Figura 11- Variación del tamaño efectivo ( $N_e = \Theta/2u$ ) para *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) empleando el marcador HVR-I. La flecha roja indica el tiempo estimado de la expansión (1% Tamaño relativo).....37

Figura 12.- Bayesian Skyride para *P. adeliae*. La flecha roja demarca el ancestro común más reciente (ACMR). La línea negra indica la media para el valor a posteriori del tamaño efectivo  $N_e$  a través del tiempo. El área celeste indica el intervalo de confianza de 95%.....39

Figura 13.- Skyline Plot para *P. papua*. La flecha roja demarca el ancestro común más reciente (ACMR). La línea negra indica la media para el valor a posteriori del tamaño efectivo  $N_e$  a través del tiempo. El área celeste indica el intervalo de confianza de 95%.....40

Figura 14.- Distribución *mismatch* para el marcador  $\beta$ fibint7 en *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B). Bajo el modelo de expansión instantánea.....42

## INDICE DE TABLAS

### Resultados

Tabla 1.- Índices de diversidad HVR-I. Largo de secuencia (Bp); Numero de secuencias (N), Numero de haplotipos (K), Número de sitios polimórficos (S), Diversidad genética Observada (Hd), Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), Número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Gamma$ ).....26

Tabla 2.- Índices diversidad del intron 7 del gen  $\beta$ -fibrinógeno. Largo de secuencia (Bp); Numero de secuencias (N), Numero de haplotipos (K), Número de sitios polimórficos (S), Diversidad genética Observada (Hd), Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), Número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Gamma$ ).....26

Tabla 3.- Índices de estructuración genética para las localidades de *P. papua* empleando el marcador mitocondrial HVR-I. Valores de  $\Phi_{st}$  y  $F_{st}$  bajo la diagonal, con sus valores de significancia sobre la diagonal. (En negrita se muestran los valores no significativos).....30

Tabla 4.- Índices de estructuración genética para las localidades de *P. papua* empleando el marcador nuclear  $\beta$ fibint7. Valores de  $\Phi_{st}$  y  $F_{st}$  bajo la diagonal, con



sus valores de significancia sobre la diagonal. (En negrita se muestran los valores no significativos).....31

Tabla 5.- Test de Neutralidad para *P. adeliae* y *P. papua* para el marcador mitocondria HVR-I. En negrita se destacan los valores no significativos.....35

Tabla 6.-Test de Neutralidad para *P. adeliae* y *P. papua* para el intron 7 del gen de  $\beta$ -fibrinogeno. En negrita se destacan los valores no significativos.....40

## RESUMEN



El ecosistema de la región Oeste de la Península Antártica (WAP), se encuentra regulado principalmente por la periodicidad en la extensión y duración del hielo. Actualmente, los incrementos en temperaturas medias registrados en esta región, con alzas promedio de unos 5°C- 6°C durante el invierno en los últimos 50 años, han tenido repercusiones sobre las comunidades biológicas y cadenas tróficas. El clima se ha descrito como uno de los principales factores que ha afectado los patrones de evolución en especies de pingüinos tanto vivos como extintos. La distribución de las diferentes taxa de pingüinos antárticos, está estrechamente relacionada con la presencia de la capa de hielo, por lo que estas especies podrían no ser capaces de responder rápidamente frente a los cambios climáticos actuales, afectando su distribución y fenología. En las últimas tres décadas se han observado cambios en la dinámica poblacional de los pingüinos del género *Pygoscelis*, encontrando que las parejas reproductivas del pingüino Adelia (*Pygoscelis adeliae*), una especie con historia de vida asociada al hielo, han disminuido en la zona de la WAP, mientras que el pingüino Papua (*Pygoscelis papua*), una especie de distribución subantártica, ha aumentado en esta región.

Este estudio propone, mediante el estudio de la diversidad genética de un marcador mitocondrial (HVR-I) y uno nuclear ( $\beta$ fibint7), detectar la existencia de cambios demográficos en poblaciones de *P. adeliae* y *P. papua* en la WAP, asociados a los eventos de cambio climático pasados y de esta manera poder

proponer un escenario frente al cambio actual. Se analizaron las relaciones genealógicas entre haplotipos y se realizaron análisis de inferencia demográfica en base al modelo de crecimiento instantáneo y exponencial, así como bajo inferencia Bayesiana, estimando además los tamaños efectivos de la población ( $N_e$ ). Nuestros resultados sugieren que las poblaciones de *P. adeliae* habrían experimentado un cuello de botella seguido de un proceso de expansión poblacional durante el último máximo glacial, asociado a un posterior evento de recolonización postglacial en la región Antártica. En el caso de *P. papua*, los resultados señalan una historia de recolonización postglacial, que se habría producido por la migración de un gran número de individuos provenientes de refugios peri-antárticos.

En base a nuestros resultados, y los antecedentes demográficos para las poblaciones de pingüinos del género *Pygoscelis* en la WAP, se plantea que si los cambios en las temperaturas se mantienen como se ha proyectado, las poblaciones del pingüino Adelia podrían no ser capaces de responder ante estos cambios, mientras que al ir modificándose las condiciones climáticas en la WAP y continente, se observaría una colonización de Papua hacia latitudes mayores.

## ABSTRACT

The West Antarctic Peninsula (WAP) ecosystem is mainly regulated by the periodicity in the ice extension and duration. Currently, the increase in mean winter temperatures recorded for the region, around 5°C – 6° in the last 50 years, have had an impact over biological communities and food chains. Climate has been described as one of the main factors affecting the evolutionary patterns of extinct and extant penguins. Distribution of Antarctic penguin taxa, is closely related to the ice sheet presence, so that these species may not be capable to confront the current climate changes, affecting their distribution and phenology. In the last three decades, changes in the population dynamics of *Pygoscelis* penguins has been reported, finding that breeding pairs of Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*), an ice-obligated specie has decreased in the WAP, while Gentoo penguin (*Pygoscelis papua*), a specie with subantarctic distribution has increased in the region.

This study aims, by determining the genetic diversity of a mitochondrial (HVR-I) and nuclear ( $\beta$ fibint7) markers, to detect the existence of demographic changes on WAP's *P. adeliae* and *P. papua* populations, associated to past climate change and to propose a scenario for populations in the current scenario of climate change. Genealogical relations between haplotypes were analyzed and we performed demographic inference analysis based on instantaneous growth and exponential growth, as well as Bayesian inference, estimating the effective population sizes ( $N_e$ ). Our results suggest that *P. adeliae* population have



# 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

## 1.1 Concepto de calentamiento global

Durante los últimos 50 años se han observado importantes incrementos en la temperatura de la superficie terrestre, con un alza promedio por decenio de  $0,13^{\circ}\text{C} \pm 0,03^{\circ}\text{C}$  (Solomon et al. 2007), lo que se ha evidenciado con el aumento de la temperatura atmosférica y del nivel oceánico (Bindoff et al. 2007; Clarke et al. 2007a). Esta alza en la temperatura de las aguas oceánicas ha contribuido al retroceso de glaciares y derretimiento de las capas de hielo, provocando un aumento en el nivel del mar (Clarke et al. 2007a).

Diversos efectos han sido asociados a este proceso de calentamiento acelerado, destacando el derretimiento de casquetes polares, pérdida de hielos milenarios, pérdida de hábitat y cambio en la distribución de las especies, por mencionar algunos ejemplos. Un número creciente de estudios analizan el efecto del cambio climático sobre diversos organismos, encontrando alteraciones en su fenología y fisiología, abundancia y rango de distribución, cambios en la composición e interacción a nivel de comunidades, así como en la dinámica y estructura de los ecosistemas (McCarty, 2001; Walther et al. 2002). Estudios que evalúen la respuesta de especies durante períodos de cambios climáticos pasados, permitirían analizar los posibles impactos del cambio actual sobre el comportamiento y distribución de las especies (Overpeck

et al. 1992; Root et al. 2003). El Panel Intergubernamental Para Cambio Climático (IPCC) ha descrito a las regiones polares como una de las zonas más sensibles frente a los cambios venideros. En el Continente Antártico, la zona Oeste de la Península Antártica (WAP) ha sido descrita como una de las tres zonas que se ha visto más afectadas, debido al rápido calentamiento atmosférico (Nicholls et al. 1995), experimentando un incremento de su temperatura media en invierno, entre los 5°C- 6°C en los últimos 50 años (Vaughan et al. 2003; Meredith & King 2005; Turner et al. 2005). Este particular ecosistema se encuentra regulado principalmente por la periodicidad en la extensión y retroceso del hielo y sus variaciones interanuales (Vaughan et al. 2003). Debido a los cambios en la circulación atmosférica y al aumento del flujo de calor oceánico durante los períodos estivales (Figura 1), la existencia de la capa de hielo, así como su concentración y espesor, se han visto significativamente disminuidos (Meredith & King 2005).

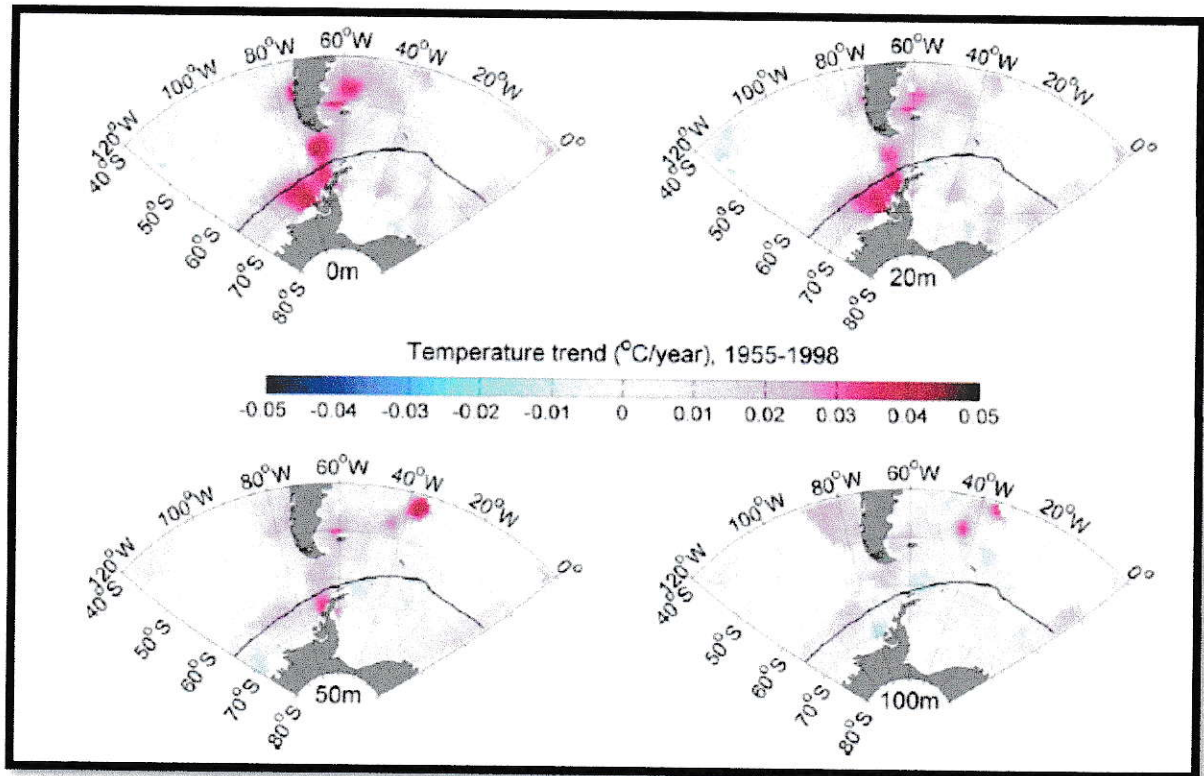


Figura 1.- Variaciones en las temperaturas del océano antártico en verano durante el período 1955-1998, para cuatro niveles de profundidad (superficie, 20 m, 50 m y 100 m) (modificado de Meredith & King, 2005).

La zona Oeste de la Península Antártica (West Antarctic Peninsula, WAP) se ha definido como uno de los sistemas más productivos del territorio Antártico, soportando una gran cantidad de diversidad de mamíferos y aves marinas, así como de Krill (*Euphausia superba*) y otros vertebrados e invertebrados marinos (Smith et al. 1999; Ducklow et al. 2007). El rápido aumento en la temperatura atmosférica y oceánica en la WAP ha afectado no sólo el clima regional junto a los niveles de nieve y hielo, sino también las interacciones biológicas y cadenas



tróficas. Clarke et al (2007a), señalan el efecto del calentamiento de la región sobre depredadores topos, Krill, fitoplancton y bacterias.

Dentro de los pinnípedos y cetáceos se observan historias diferenciales ligadas a la dependencia del hielo: La foca cangrejera (*Lobodon carcinophagus*), la foca de Weddell (*Leptonychotes weddellii*), el leopardo marino (*Hydrurga leptonyx*) y la foca de Ross (*Ommatophoca rossii*) son especies dependientes del hielo, por lo que su abundancia, reproducción y dieta se han visto afectadas debido a los cambios en los niveles de éste, mientras que el elefante marino del Sur (*Mirounga leonina*) y el lobo fino antártico (*Arctocephalus gazella*), al ser especies independientes del hielo, debido a que se reproducen en las costas y forrajean en aguas abiertas, no se han visto afectadas por los efectos del cambio climático (Costa & Crocker 1996; Burns et al. 2004).

Diversas especies de aves y mamíferos marinos han sufrido reducciones en sus tamaños poblacionales (Ducklow et al. 2007). La distribución de los diferentes taxa de pingüinos antárticos está estrechamente relacionada con la presencia o ausencia de la capa de hielo, por lo que estas especies podrían no ser capaces de responder rápidamente a los cambios climáticos, afectando su distribución y fenología (Smith et al. 1999; McCarty 2001). El Continente Antártico contiene poblaciones de 5 de las 18 especies de pingüinos en el mundo. Dentro de estas especies, los pingüinos Emperador (*Apdenodytes forsteri*) y Adelia (*Pygoscelis*

*adeliae*) son considerados como verdaderas especies antárticas debido a que presentan historias de vida asociadas a la presencia de hielo (Fraser et al. 1992; Barbraud & Weimerskirch 2001; Ainley et al. 2010), mientras que el pingüino Papúa (*Pygoscelis papua*), el pingüino Barbijo (*Pygoscelis antarctica*) y el pingüino Macaroni (*Eudyptes chrysolophus*), se definen como especies sub antárticas, presentando historias de vida independiente del hielo (Fraser et al. 1992; Ainley et al. 2010).

En la WAP, los pingüinos son importantes consumidores topos de los recursos marinos, distribuyéndose a lo largo de todos los sectores de la Antártica con ligera abundancia y una clara dominancia de la biomasa local de aves (Ducklow et al. 2007). Estudios desarrollados en pingüinos, cuyas historias de vida presentan diferencias en su afinidad al hielo, muestran importantes evidencias de como estos cambios afectarían las cadenas tróficas y la respuesta de depredadores topos (Fraser et al. 1992).

Particularmente, en la WAP, se han observado cambios en la composición de las comunidades, encontrando que en las últimas tres décadas, las poblaciones de pingüinos dependientes del hielo (*Pygoscelis adeliae*) han disminuido, sufriendo un aumento en la mortalidad de sus huevos debido a la nieve y la pérdida de plataforma de hielo que permite la migración a zonas ricas en Krill

(Wilson et al. 2001; Ducklow et al. 2007, McClintock et al. 2008), mientras que aquellas cuya historia de vida no es sincrónica con el hielo habrían aumentado (*Pygoscelis papua* y *Pygoscelis antarctica*) (Ainley et al. 2010, Carlini et al. 2009) (Figura 2).

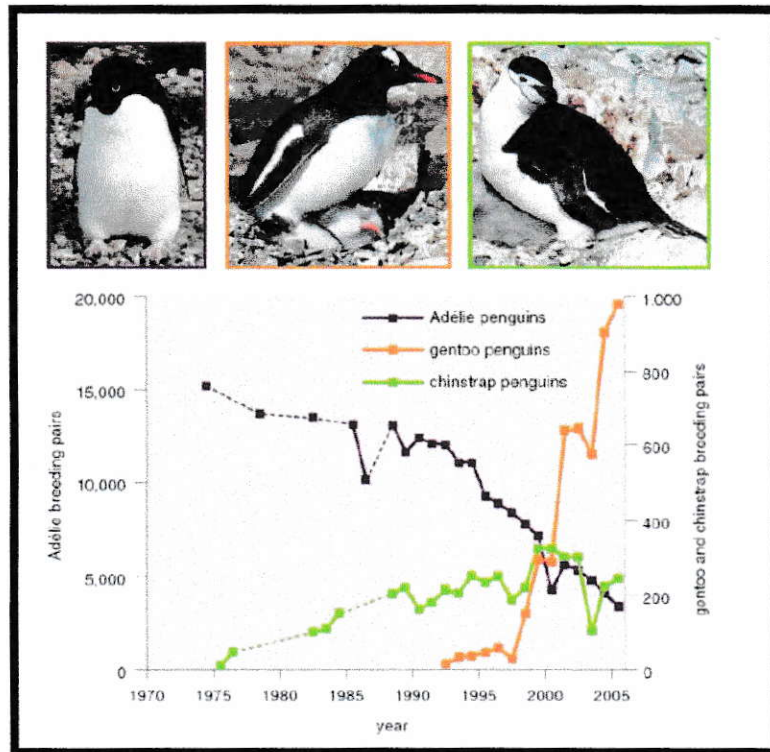


Figura 2.- Variaciones en los tamaños poblacionales de tres especies de pingüinos entre 1970-2005. En morado se observa el pingüino Adelia o Adélie (*Pygoscelis adeliae*), en naranja el pingüino Papua o Gentoo (*Pygoscelis papua*), y en verde el pingüino Barbijo o Chinstrap (*Pygoscelis antarctica*). (Modificado de McClintock et al. 2008)

## **1.2 Evolución del clima en Antártica y sus efectos sobre la biota**

### *1.2.1 El continente antártico*

La formación del Continente Antártico se debe a una serie de eventos geológicos y climáticos que permitieron el aislamiento, tanto geográfico, como batimétrico del continente. Durante el Jurásico la existencia de un gran bloque continental denominado Gondwana, soportaba lo que hoy en día se conoce como Australia, India, África y Antártica. Alrededor de unos 180Ma atrás, la fragmentación de Gondwana, sumado a los procesos de tectónica de placas, habrían generado la deriva y dispersión de masas continentales, dando posteriormente origen a las disposición actual de los continentes (Siegert & Florindo 2009). La transición del Eoceno al Oligoceno temprano (~39Ma) se caracterizó por un período de enfriamiento, asociado a una reorganización global de los patrones de circulación oceánica marcando el inicio de un período glacial (Knox 2007). Aproximadamente hace unos 34Ma surgen las primeras capas de hielo en Antártica, (Zachos et al. 1996, 2001; Coxall et al. 2005).

Hace alrededor de 30-20 millones de años atrás, Antártica queda aislada geográficamente, separándose la península Antártica del continente Sudamericano. Esta separación habría dado origen al pasaje de Drake y al mar de Escocia, permitiendo la formación de la corriente Circumpolar Antártica. En base a estos antecedentes el proceso de aislamiento de Antártica habría tenido



Durante el Mioceno temprano (~22Ma) surge el frente polar, permitiendo la formación grandes masas de hielo en la zona Este del continente (Knox 2007). Hace aproximadamente unos 5,3Ma, el continente se encontraba cubierto en su totalidad por capas de hielo (Zachos et al. 2001; Figura 3). Evidencia sugiere que hace 2,5 a 3Ma las capas de hielo en WAP y EAP se expandieron a su estado actual (Naish et al. 2009).

una gran relevancia en la definición de las corrientes oceánicas y los patrones climáticos que actualmente se conocen (Talarico & Kleinschmidt 2009; Barret 1999).

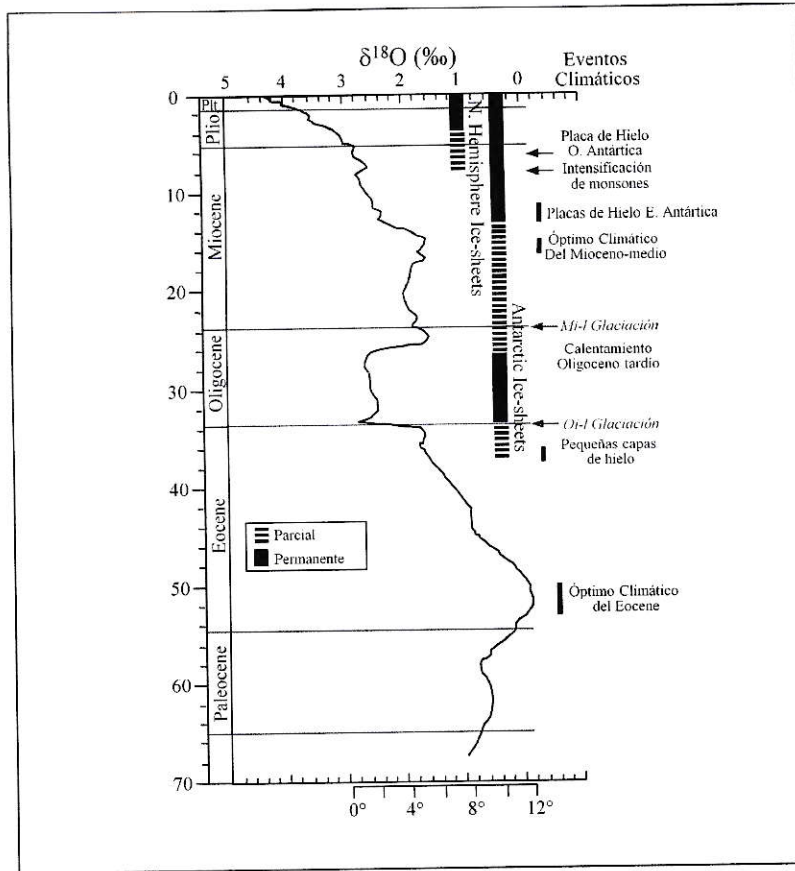


Figura 3.- Registros de isótopos de carbono y oxígeno de profundidad. Las barras verticales entregan representaciones cualitativas crudas del volumen de hielo en cada continente en relación al último máximo glacial (Modificado de Zachos et al. 2001).

Durante el Pleistoceno la alternancia entre períodos glaciares e interglaciares habría tenido un impacto sobre la extensión y colapso de las masas de hielo, desplazando periódica o completamente hábitat terrestres y de agua dulce (Convey et al. 2008). Durante el último máximo glacial (~21.000 años), la expansión de la capa de hielo en Península Antártica habría alcanzado su máxima extensión en la WAP. Posterior al máximo glacial una fase de

deglaciación, que se extendió hasta el Holoceno, habría provocado el retroceso de los glaciares dejando libre de hielo la línea de costa, y permitiendo la recolonización de estas, hace aproximadamente unos 18000-8000 años (Hall & Denton 1999; Domack et al. 2001; Anderson et al. 2002; Hall et al. 2010)

### 1.2.2 *Efectos del último período glacial sobre la biota antártica.*

Durante el Cuaternario la expansión de las capas de hielo y la disminución de las temperaturas, asociadas a los ciclos glaciares, habrían sido las mayores limitaciones para la permanencia de las comunidades biológicas (Convey et al. 2008). Durante el último máximo glacial (UMG), el espesor de la capa de hielo a lo largo de la WAP (1,5 -2,5 Km, Denton & Hughes 2002), junto a la vasta extensión de la plataforma de hielo habrían provocado la ausencia de ecosistemas terrestres (Convey et al. 2008). Estos procesos habrían culminado en la drástica reducción poblacional y extinción local de la flora y fauna Antártica (Hodgson et al. 2003; Thatje et al. 2008; Convey & Stevens 2007), así como la migración de especies hacia latitudes inferiores (Hewitt 2000).

Pese a la vasta extensión del hielo durante el UMG, existen nuevas evidencias que soportan la existencia de diversos linajes únicos que habrían permanecido en hábitats fragmentados, expandiéndose posterior a la glaciación (Wilson et al. 2009; González-Wevar et al. 2010; Díaz et al. 2011). Si bien, sólo se cuenta con



registros de recolonización postglacial de especies terrestres altamente dispersivas como mamíferos y aves marinas (Thatje et al. 2008; de Bruyn et al. 2009), la existencia de algunos grupos de copépodos endémicos, cladóceros y linajes antiguos de ácaros antárticos, sugieren la idea de que estas taxa habrían permanecido en antártica durante el último período glacial (Convey et al. 2008; Convey et al. 2009; De Wever et al. 2009).

Es de esperar que especies con historias de vida asociadas al hielo no hayan sufrido mayores problemas durante el período de glaciación a diferencia de aquellas que requieren de zonas libres para anidar o alimentarse, las cuales posiblemente se retiraron a latitudes menores, como islas Subantárticas. Registros fósiles de diatomeas y sedimento señalan que la expansión del hielo habría abarcado islas subantárticas (Macquarie, Kerguelen, Crozet y Marion) (Gersonde et al. 2005), sin embargo hay registros de algunas islas que habrían permanecido libres de hielo durante el período y podrían haber servido de refugio para diversas especies como las Islas Malvinas y Gough (Nikula et al. 2010). Estudios moleculares en poblaciones tanto actuales como extintas de elefante marino del sur, una especie con historia de vida independiente del hielo, señala que la población de Tierra de Victoria habría colonizado esta área posterior al UMG, hace alrededor de unos 7500-8000 años (de Bruyn et al. 2009).

### **1.3 Pingüinos Antárticos**

Diversos autores han planteado al clima como el principal factor que ha afectado los patrones de evolución en especies de pingüinos, tanto vivos como extintos (Baker et al. 2006; Croxall et al. 2002; Forcada et al. 2006; Forcada & Trathan 2009). Se estima que los primeros ancestros de los taxa modernos de pingüinos habrían aparecido hace alrededor de unos 50 a 70Ma, a fines del Cretácico, comienzo del Eoceno, durante el proceso de separación de Gondwana (Kooyman 2002). Estos ancestros, se habrían expandido posteriormente hacia el océano a través de la corriente circumpolar (Baker et al. 2006) asociados al proceso de enfriamiento observado durante el Eoceno-Oligoceno. Dos episodios subsecuentes de enfriamiento habrían generado la formación de plataformas de hielo en la región Antártica permitiendo la diversificación de pingüinos; un primer evento ocurrido alrededor de 35Ma y un evento posterior durante el Mioceno medio (aproximadamente 14Ma), dando origen a los grupos más recientes (Baker et al. 2006) (Figura 4).

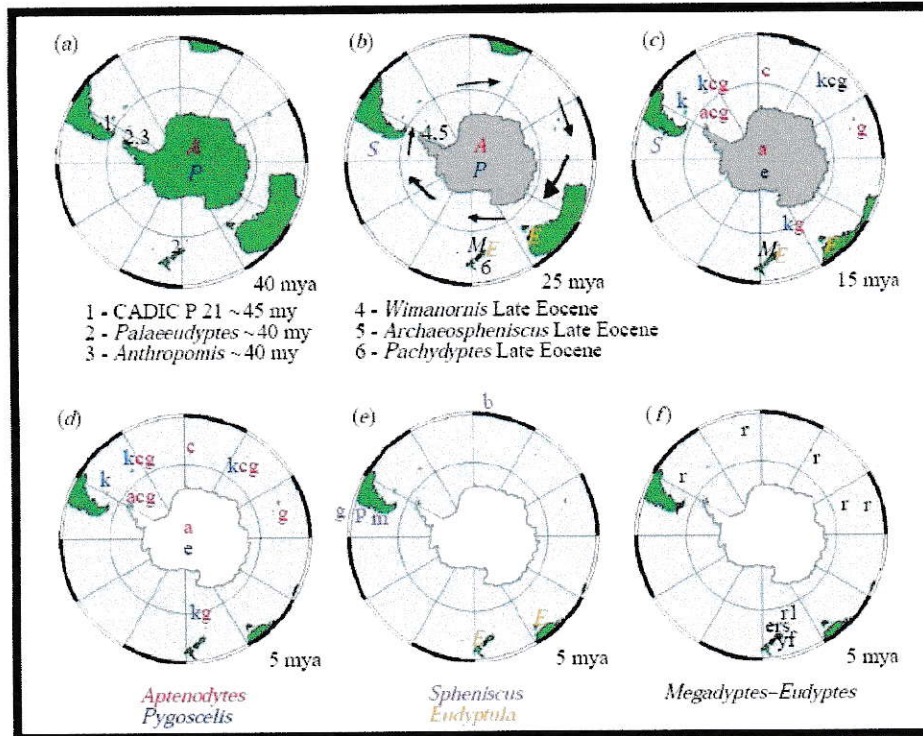


Figura 4.- Representación estereográfica polar de la región Antártica hace 40, 25, 15 y 5 Ma. La Antártica se observa parcialmente cubierta de hielo (b y c) y completamente cubierta (d, e y f). En colores se muestran los géneros de pingüinos actuales mientras que enumerados del 1 al 6 los géneros fósiles. En b las flechas indican el curso de la corriente circumpolar Antártica (modificado de Baker et al. 2006).

Registros paleoecológicos señalan que frente a episodios pasados de cambio climático, que habrían tenido consecuencias sobre la extensión y duración del hielo, las colonias de pingüinos (principalmente se cuenta con registros de *Pygoscelis adeliae*), han respondido abandonando sus colonias de crianza dispersándose, hacia hábitats con condiciones más provechosas (Baroni & Orombelli 1994; Emslie & McDaniel 2002). Hace aproximadamente 4.500 años

comienza el período denominado como “óptimo de los pingüinos”. Durante este tiempo, las condiciones climáticas, y probablemente la extensión del hielo, resultaron favorables para la expansión y recolonización de colonias de pingüinos (Baroni & Orombelli 1994). Posterior a este óptimo, las condiciones se volvieron desfavorables para las colonias de *P. adeliae*, inhibiendo el asentamiento de colonias en las costas de Tierra de Victoria y Mar de Ross, hace aproximadamente unos 2300-1100 años atrás (Lambert et al. 2010).

Comprender como han respondido las poblaciones de pingüinos en la región Antártica, y en particular la WAP, frente a cambios en el pasado, permitiría determinar de qué manera estos cambios afectarían la dinámica de las poblaciones actuales en el futuro. En base en estos antecedentes, este estudio propone analizar, mediante marcadores moleculares, de qué manera los eventos de cambio climático sufridos en el pasado, afectaron la historia demográfica de *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis papua* y extrapolar, de esta forma los posibles efectos que generaría el calentamiento global actual, sobre estas especies.



## 2 HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

#### 2.1.1 Hipótesis General

Durante la última fase glacial, las condiciones climáticas en la Península Antártica habrían permitido la presencia de grandes poblaciones de *Pygoscelis adeliae* mientras *Pygoscelis papua* subsistiría en refugios reducidos.

#### 2.1.2 Predicción

*Pygoscelis adeliae*, al presentar tamaños poblacionales mayores durante los períodos de glaciación mostrará una diversidad genética más alta que *Pygoscelis papua*.

## 2.2 Objetivos

### 2.2.1 Objetivo General

Comparar la historia demográfica que presentaron *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis papua* durante el último máximo glacial.

### 2.2.2 Objetivos específicos

Estimar la diversidad genética de las poblaciones actuales de *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis papua* en la región de la WAP.

Evaluar la estructura genética poblacional en *P.papua* a diferentes latitudes.

Inferir la historia demográfica y calcular los tamaños efectivos para las poblaciones de *P. adeliae* y *P. papua* en la región de la WAP.

## 3 METODOLOGÍA

### 3.1 Área de estudio y muestreo

Para el desarrollo de este estudio se muestrearon 5 áreas de nidificación de *Pygoscelis papua*, correspondientes a: Isla Ardley (62°13'S, 58°54'W), Base Gabriel González Videla (64°49'S, 62°52'W), Base Libertador Bernardo O'higgins (63°19'S, 57°54'W), Bahía Almirantazgo (62°23'S, 58°67'W) e Isla Elefante (61°07'S 55°67'W), (estos dos últimos sitios fueron muestreados y secuenciados por una investigadora brasilera, Dra. Gisele Dantas, Universidad Federal Minas Gerais) (Figura 5). Mientras que para *Pygoscelis adeliae* se muestrearon 2, Isla Ardley y Bahía Almirantazgo. Para evitar estresar a la colonia y a las parejas reproductivas, las muestras fueron tomadas de individuos que estuvieran entrando o saliendo del agua, o bien se encontrasen en la línea costera. Se tomaron 30 muestras de sangre (~0.05 mL por individuo) por sitio para cada especie de pingüino muestreada. Estas muestras fueron tomadas desde la vena braquial usando jeringas y agujas esterilizadas, posteriormente fueron almacenadas en 1mL de etanol 70% y un duplicado almacenado en buffer de lisis. Las muestras fueron enviadas a Santiago donde fueron procesadas en el Laboratorio de Ecología Molecular, Facultad de Ciencias Universidad de Chile y en el Laboratorio de Genética Molecular, Pontificia Universidad Católica de Chile.



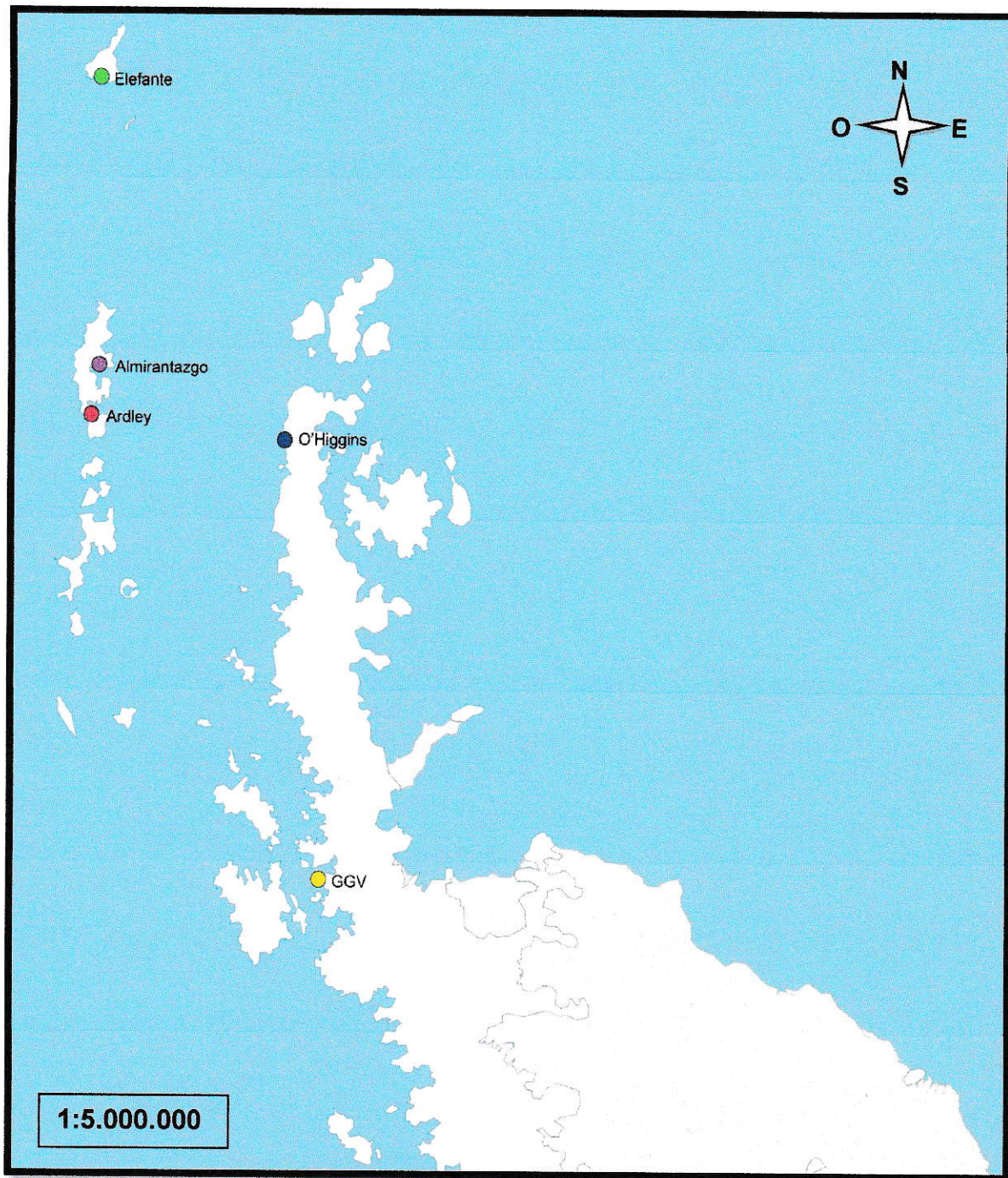


Figura 5.- Puntos de muestreo en la Península Antártica para las especies de pingüinos *Pygoscelis adeliae* y *Pygoscelis papua*.

### 3.2 Extracción de ADN y PCR.

El ADN fue extraído usando 2 métodos de extracción salina. Para las muestras almacenadas en alcohol 70% se empleo el método de extracción de Alhjanabi & Martinez (1997), mientras que las muestras almacenadas en buffer de lisis fueron extraídas con el método salino de Sambrook et al. (1989).

La Región Hipervariable I del ADN mitocondrial (HVR-I) fue amplificada para todas las localidades antes mencionadas, usando partidores específicos para pingüinos Adelia: tRNAGlu 5'-CCCGCTTGGCTTYTCTCCAAGGTC-3' and AH530 (5'-CTGATTTACGTGAGGAGACCG-3' (Roeder et al. 2002). Cada reacción de PCR consistió 0,4  $\mu$ m de cada partidor, 200  $\mu$ m de cada dNTP, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X Buffer de reacción 10X, y una unidad de *Taq Platinum* DNA polymerase (Invitrogen). La reacción se llevó a cabo bajo las siguientes condiciones: una fase inicial de denaturación por 5 minutos a 95°C, seguido por 38 ciclos de 30s a 95 °C, 45 s a 55°C, 15 min a 72 °C y una fase final por 7 min a 72 °C.

Se amplificó el intron 7 del gen  $\beta$ -fibrinogeno ( *$\beta$ fibint7*), el cual ha mostrado una señal filogenética similar a la de Citocromo b (Cyt b) en la subfamilia *Picinae* (familia *Picidae*: Orden *Piciformes*). Este gen se amplificó exceptuando las localidades de Bahía de Almirantazgo e Isla Elefantes, ya que no fue posible obtener las secuencias de  *$\beta$ fibint7* para estos sitios. Los partidores empleados corresponden a: Fib7U (5'-CAGGACAATGACAATTAC-3') and Fib7L (5'-GTAGTATCTGCCATTAGG-3') (Prychitko & Moore 2000). Cada reacción consistió



en: 0,4  $\mu\text{m}$  de cada partidor, 200  $\mu\text{m}$  de cada dNTP, 1,5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1X Buffer de reacción 10X, y una unidad de *Taq Platinum* DNA polymerase (Invitrogen). Las condiciones para la reacción de PCR corresponden a una fase inicial de 95°C por 10 min seguido de Touchdown de 95°C por 15 seg, 60-50°C por 30"S y 72°C por 45seg por 10 ciclos, luego se prosiguió a 95°C por 15 seg, 50°C por 30 seg y 72°C por 45 seg durante 35 ciclos y una última fase de extensión por 30 min a 72°C. Los productos de PCR se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 2% y posteriormente se enviaron a purificar y secuenciar a la empresa Macrogen S.A en Korea del Sur. Las secuencias obtenidas se alinearon en el programa Proseq v 2.0 obteniéndose secuencias de 499 y 371 pares de bases (bp) (*P. adeliae* y *P. papua* respectivamente) para HVR-I y de 978 y 1014 bp (*P. adeliae* y *P. papua* respectivamente) para  $\beta\text{fibint7}$ .

### **3.3 Diversidad genética**

Para el caso de las secuencias de  $\beta\text{fibint7}$ , los haplotipos de los individuos heterocigotos fueron reconstruidos empleando el módulo de Phase presente en DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas 2009). La reconstrucción de estos genotipos se basa en los algoritmos planteados en PHASE v. 2.1 (Stephens et al. 2001; Stephens & Donnelly 2003) el cual usa una metodología bayesiana basada en coalescencia para inferir los haplotipos. A partir de las secuencias de HVR-I y  $\beta\text{fibint7}$  se calcularon los índices estándar de diversidad genética (número de haplotipos (K), número de sitios polimórficos (S), diversidad de haplotipos (Hd), número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ) y la diversidad

nucleotídica ( $\pi$ ). Estos fueron estimados para cada especie por localidad y en total, empleando el programa DnaSP v. 5.0 (Librado & Rozas 2009).

Las relaciones genealógicas entre los haplotipos se reconstruyeron empleando el algoritmo median-joining implementado en el programa Network v. 4.611 (Bandelt et al. 1999). Se mantuvo el parámetro  $\epsilon=0$ , así como la razón de transición/transversión=1, el valor de peso asignado a cada carácter por default se establece en 10. Sin embargo, en el caso de aquellas mutaciones que se repitan en el *network*, generando la formación de loops (se seleccionaron aquellos cambios que se presentaran más de 6 veces), sus pesos fueron modificados a un valor de 5 con el fin de simplificar el árbol. De esta forma se mantiene el número de haplotipos detectados, eliminándose solo algunos pasos que sugieren homoplasia.

### **3.4 Estructuración genética poblacional**

Para evaluar la existencia de estructuración genética entre las localidades, se calculó tanto el índice  $F_{st}$ , basado en frecuencia de los haplotipos, como el índice  $\Phi_{st}$ , basado en el número de diferencias entre pares de secuencias entre las muestras por locación empleando el programa Arlequín v.3.5.1.3 (Excoffier et al. 2005).

Para el caso del marcador HVR-I en *P. papua* se realizó además la comparación entre ambos índices con el fin de determinar si existe una estructura filogeográfica, entre las localidades para los posteriores análisis de inferencia demográfica

empleando el programa Permut (Pons & Petit 1995, 1996). Este test se realizó con 10.000 permutaciones de los valores de  $\Phi_{st}$ . Con el fin de determinar si existe diferenciación genética producto de aislamiento por distancia, se realizó un test de Mantel, implementado en el programa Arlequín v.3.5.1.3 (Excoffier et al. 2005), para esto se calculó el coeficiente de correlación y su nivel de significancia con 10.000 permutaciones. Para establecer la existencia de estructuración espacial se empleó el programa Geneland 4.0.2 (Guillot et al. 2008 Guillot & Santos 2009). El programa emplea datos genéticos georeferenciados y le asigna a estos la probabilidad de pertenecer a un número de población(es) (cluster(s)) determinado(s). Para esto se realizaron 1.000.000 iteraciones, muestreando cada 1.000 parámetros bajo un modelo de análisis correlacionado seleccionado posterior a su comparación en Bayes Factor (Newton & Raftery 1994; Suchard et al. 2001).

### **3.5 Inferencia demográfica.**

Para evaluar posibles desviaciones del equilibrio de Wright-Fisher (mutación-deriva) se calcularon los índices de Tajima,  $D$  y el de Fu,  $F_s$  (Tajima 1989; Fu 1997) empleando Arlequín v.3.5.1.3 (Excoffier et al. 2005). Con el fin de evaluar cambios demográficos en el pasado se construyó la *Mismatch distribution* y se estimaron los parámetros de expansión demográfica y expansión espacial, bajo el modelo de crecimiento poblacional instantáneo (Schneider & Excoffier 1999). A partir del parámetro  $\tau = 2ut$ , donde  $u$  corresponde a la tasa mutacional en sustituciones/sitio/año, se pudo estimar el tiempo en el cual ocurrió la expansión



poblacional. Para esto se uso una tasa de 55% en el caso del marcador HVR-I (Millar et al. 2008), y una tasa de 3.6% para el caso del marcador nuclear  $\beta$ fibint7 (Prichytko & Moore, 2000; Bowie et al. 2009)

Para el caso del marcador HVR-I se realizó la inferencia demográfica basada en el modelo de crecimiento exponencial (Kuhner et al. 1998) empleado en el programa Lamarc v.2.1.6 (Kuhner 2006). Para la búsqueda se utilizó el criterio bayesiano, con 10 cadenas iniciales cada 1000 iteraciones y 1 cadena final cada 10000 iteraciones. Este análisis no fue posible realizarlo para el marcador  $\beta$ fibint7, debido a la baja diversidad genética que este presenta, lo que provoca una sobreestimación de los parámetros determinados en el programa.

La estimación de los tamaños efectivos  $N_e$  y la historia demográfica de las poblaciones de pingüinos se estimó además, bajo inferencia bayesiana implementada en el programa BEAST v.1.7.4 (Drummond et al. 2012). La selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica se realizó empleando el programa JModelTest bajo el criterio de decisión bayesiana (BIC) (Posada 2008). Para el marcador HVR-I se seleccionó el modelo HKY+I+G, en las dos especies. La selección del mejor método de inferencia se determinó empleando Bayes Factor (Newton & Raftery 1994; Suchard et al. 2001) obteniendo que el mejor modelo para *P. papua* fue *Bayesian skylineplot*, mientras que para *P. adeliae* fue *Bayesian skyride*. Los supuestos asumidos para ambos casos fueron: Modelo de evolución molecular reloj relajado con distribución exponencial, con 12 grupos de coalescencia (sólo *Bayesian skyride*), empleando una tasa de 0.55

substituciones/sitios/millón de año. Se emplearon cadenas de MCMC de 50000000 de iteraciones, muestreando parámetros cada 1000 generaciones. La lectura y gráfica de los resultados se realizó empleando el programa Tracer version 1.5 (Rambaut & Drummond 2009).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Diversidad Genética

Se observa que para el marcador mitocondrial (HVR-I), en ambas especies, los valores de diversidad genética observada encontrados fueron altos, cercanos a 1, lo que refleja la gran cantidad de haplotipos. Se destaca que, en relación al tamaño muestral, *P. adeliae* es la especie que presenta los mayores índices de diversidad genética encontrando que el porcentaje de sitios polimórficos. El número promedio de diferencias entre pares de secuencias resultaron ser superiores a los de *P. papua* en la mayoría de las localidades (Tabla 1).

En contraste con el marcador mitocondrial, el marcador nuclear  $\beta$ fibint7 muestra una baja diversidad para ambas especies, encontrándose pocos haplotipos, bajos valores de diversidad genética, número promedio de diferencias entre pares de secuencia y diversidad nucleotídica. Sin embargo, al igual que para el marcador mitocondrial, la población de *P. adeliae* mostró los valores más altos para todos los índices de diversidad (Tabla 2).



Tabla 1.- Índices de diversidad HVR-I. Largo de secuencia (Bp); Numero de secuencias (N), Numero de haplotipos (K), Número de sitios polimórficos (S), Diversidad genética Observada (Hd), Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), Número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ).

		Bp	N	K	S	Hd	$\pi$	$\Pi$
<i>P. adeliae</i>	Total	499	84	71	92	0,99	0,0142	7,087
	Isla Elefante	499	51	41	50	0,976	0,01009	5,037
	Isla Ardley	499	33	30	72	0,994	0,01927	9,616
<b> </b>								
<i>P. papua</i>	Total	371	150	75	72	0,982	0,01288	4,779
	Isla Elefante	371	16	12	26	0,958	0,01599	5,933
	Almirantazgo	371	26	17	24	0,966	0,01277	4,738
	Isla Ardley	371	35	17	23	0,955	0,0126	4,676
	O'Higgins	371	40	17	24	0,924	0,01009	3,745
	GGV	371	33	24	31	0,975	0,01211	4,492

Tabla 2.- Índices diversidad del intron 7 del gen  $\beta$ -fibrinógeno. Largo de secuencia (Bp); Numero de secuencias (N), Numero de haplotipos (K), Número de sitios polimórficos (S), Diversidad genética Observada (Hd), Diversidad nucleotídica ( $\pi$ ), Número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ).

		Bp	N	K	S	Hd	$\pi$	$\Pi$
<i>P. adeliae</i>	Isla Ardley	978	48	9	8	0,672	0,00094	0,919
<b> </b>								
<i>P. papua</i>	Total	1014	176	5	3	0,492	0,00091	0,919
	Isla Ardley	1014	80	4	3	0,45	0,00086	0,876
	O'Higgins	1014	44	4	3	0,53	0,001	1,016
	GGV	1014	52	3	2	0,531	0,0009	0,917

Las relaciones genealógicas entre las localidades de *P. adeliae* para el marcador HVR-I, reflejan la alta diversidad encontrada en los índices de diversidad genética (Tabla 1). Para *P. adeliae* se observa la presencia de un haplotipo central, con 8 individuos correspondientes a la localidad de Ardley (Figura 6A). Se observa la presencia de una haplotipo distante, separado por 16 pasos mutacionales proveniente de la localidad de Ardley. Finalmente no se encontraron haplotipos compartidos entre las localidades de Ardley y Almirantazgo.

Para el caso de la red de haplotipos para HVR-I en *P. papua* (Figura 6B), se observa una alta diversidad, encontrando haplotipos compartidos, principalmente entre las localidades de Elefante, Almirantazgo, Ardley y O'Higgins; sólo se encontró un haplotipo compartido con la localidad de GGV. La localidad de GGV presentó la mayor cantidad de haplotipos, correspondiendo al 34% del total.

Para el caso de la Figura 7A, correspondiente a la genealogía construida para el marcador  $\beta$ fibint7 en *P. adeliae*, se aprecia una baja diversidad de haplotipos separados por 1 paso mutacional. En la Figura 7B, se observa la red de haplotipos de *P. papua* construida para el gen nuclear, se encontraron 5 haplotipos separados por un paso mutacional, se encontraron 2 haplotipos compartidos entre las 3 localidades (Ardley, GGV y O'Higgins) y 2 compartidos entre las localidades de Ardley y O'Higgins. La localidad de GGV fue la que presentó menor diversidad haplotípica.



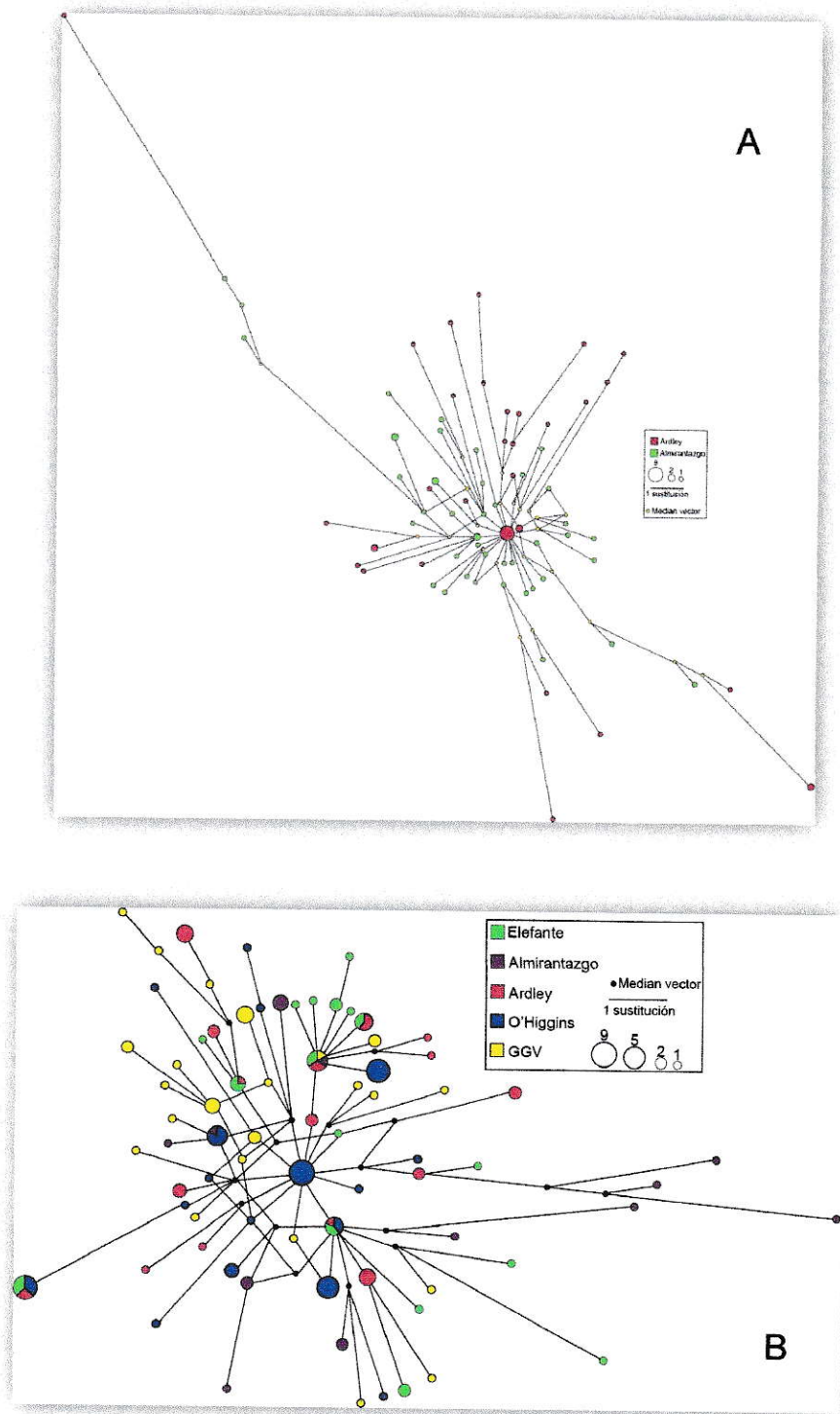


Figura 6.- Red de haplotipos para *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) empleando el marcador mitocondrial HVR-I

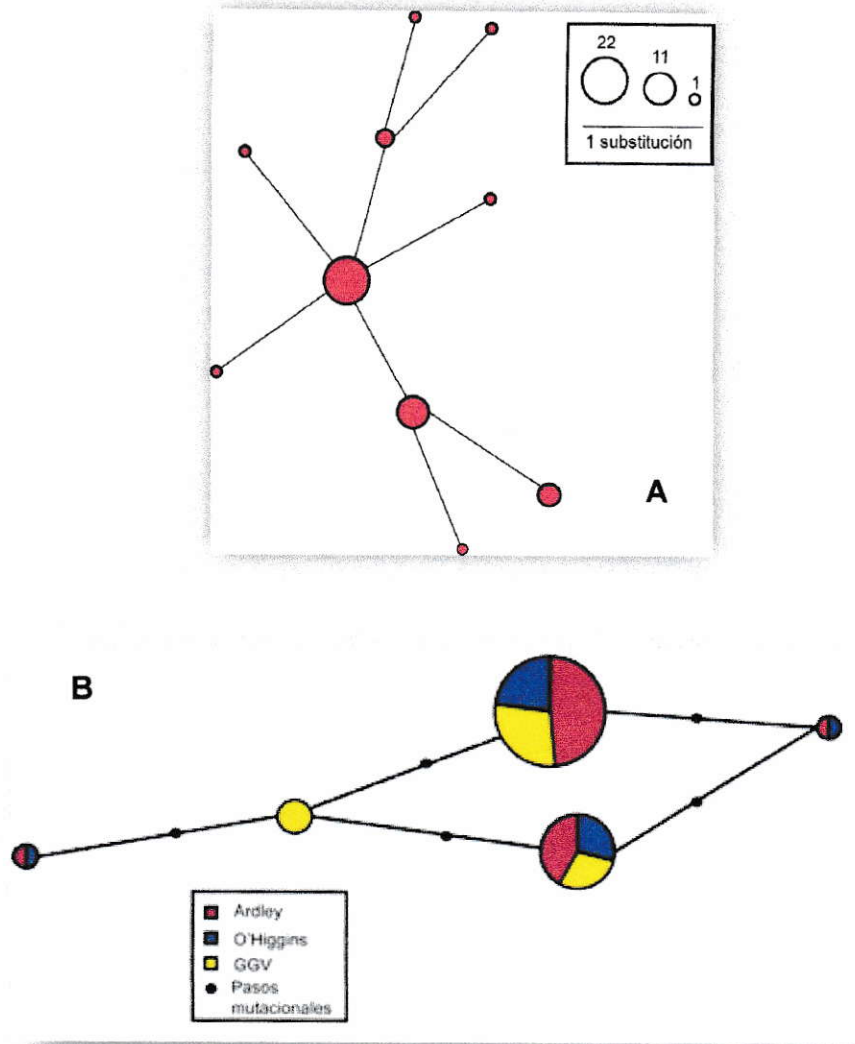


Figura 7.- Red de haplotipos para *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) empleando el marcador nuclear  $\beta$ fibint7.

## 4.2 Estructuración Genética

El análisis de estructuración genética para *P. adeliae* (Isla Ardley y Bahía Almirantazgo), mostró valores significativos de estructuración genética para  $\Phi_{st}$  (0.07392,  $p < 0.005$ ) y  $F_{st}$  (0.01513,  $p = 0.009$ ). Para el marcador nuclear, debido a

que sólo se contó con información de una localidad no fue posible realizar este análisis.

Los índices de estructuración genética para HVR-I en *P. papua*, se presentan en la Tabla 3, encontrando que existe baja estructuración entre las localidades; sólo los valores de  $\Phi_{st}$  y  $F_{st}$  entre las localidades de Ardley y Almirantazgo fueron no significativos. Para el caso del marcador nuclear  $\beta fibint7$  (Tabla 4), los valores para ambos índices arrojaron valores negativos y no significativos lo que sugiere ausencia de estructuración genética, y por ende las distintas localidades pueden ser tratadas como una sola población.

Tabla 3.- Índices de estructuración genética para las localidades de *P. papua* empleando el marcador mitocondrial HVR-I. Valores de  $\Phi_{st}$  y  $F_{st}$  bajo la diagonal, con sus valores de significancia sobre la diagonal. (En negrita se muestran los valores no significativos)

$\Phi_{st}$ basado en método por distancia	Elefante	Almirantazgo	Ardley	O'Higgins	GGV
Elefante	***	0,00000	0,00901	0,00901	0,00000
Almirantazgo	0,09572	***	<b>0,18919</b>	0,01802	0,00000
Ardley	0,06889	<b>0,1221</b>	***	0,00901	0,00000
O'Higgins	0,06187	0,04078	0,04832	***	0,00000
GGV	0,09048	0,1021	0,08264	0,0829	***
$F_{st}$ basado en frecuencia haplotípica	Elefante	Almirantazgo	Ardley	O'Higgins	GGV
Elefante	***	0,00000	0,00000	0,00000	0,00901
Almirantazgo	0,03298	***	<b>0,07207</b>	0,00000	0,00000
Ardley	0,04019	<b>0,017</b>	***	0,00000	0,00000
O'Higgins	0,05226	0,04326	0,047	***	0,00000
GGV	0,03094	0,02691	0,0283	0,04458	***



Tabla 4.- Índices de estructuración genética para las localidades de *P. papua* empleando el marcador nuclear  $\beta$ fibint7. Valores de  $\Phi_{st}$  y  $F_{st}$  bajo la diagonal, con sus valores de significancia sobre la diagonal. (En negita se muestran los valores no significativos).

$\Phi_{st}$ basado en método por distancia	Ardley	O'Higgins	GGV
Ardley	***	<b>0,65766</b>	<b>0,54955</b>
O'Higgins	<b>-0,00135</b>	***	<b>0,38739</b>
GGV	<b>-0,00765</b>	<b>-0,01421</b>	***
$F_{st}$ basado en frecuencia haplotípica	Ardley	O'Higgins	GGV
Ardley	***	<b>0,3964</b>	<b>0,38739</b>
O'Higgins	<b>-0,00158</b>	***	<b>0,53153</b>
GGV	<b>-0,00359</b>	<b>-0,01103</b>	***

El análisis para evaluar estructuración filogeográfica mostró que el valor de  $\Phi_{st}$  (0.002) fue mayor que el de  $F_{st}$  (-0.007), aunque no significativo,  $p=0.26$ . A partir de esta información se encontró que el valor observado de  $N_{st}$ , en el percentil 95 de la distribución (0.020) fue menor que el valor de  $N_{st}$  observado (0.027), por lo que el valor observado de  $N_{st}$  cayó fuera de la zona de rechazo de la distribución (95%). Esto indica la ausencia de un patrón de estructuración filogeográfica.

El Test de Mantel, realizado para evaluar posible aislamiento por distancia entre las localidades muestreadas para *P. papua*, señalan la ausencia de una estructuración genética producto del aislamiento geográfico (coeficiente de correlación de Mantel  $r= -0.046770$ ,  $p= 0.5015$ ).

Por último, los análisis realizados, empleando el marcador HVR-I, para determinar la asignación de los datos genéticos a uno o mas clusters mostró, que la distribución a posteriori de los datos para el caso de *P. adeliae* corresponde a  $K=2$  clusters (Figura 8A y 9), mientras que para *P. papua*  $K=1$  (Figura 8B). Esto sugiere

que para los datos genéticos de *P. adeliae* pueden asignarse a dos clusters diferentes, mientras que para el caso de *P. papua* estos se agruparían solo en un cluster.

En base a los análisis de estructuración realizados se consideró, para ambas especies, que todas las localidades muestreadas conformarían una sola unidad genética, y por lo tanto se trataron para posteriores análisis, como una población.



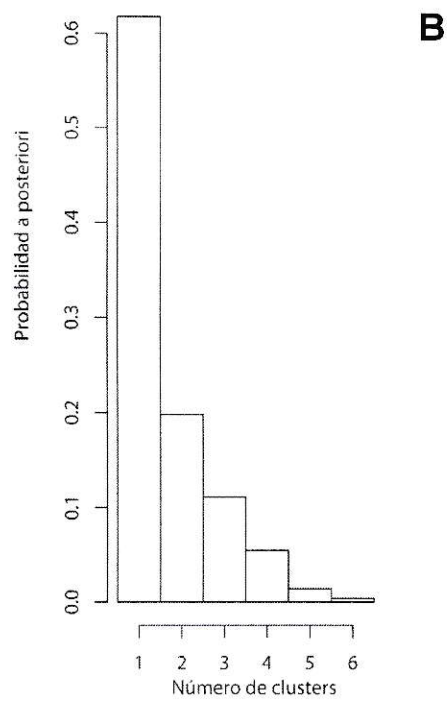
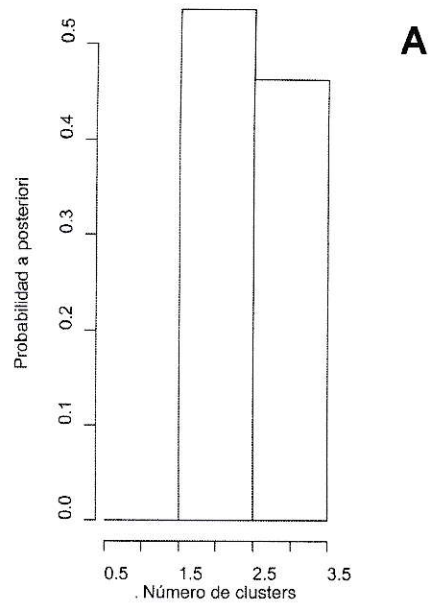


Figura 8.- Distribución de probabilidad a posteriori del número de cluster o poblaciones de *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) para el marcador HVR-I.

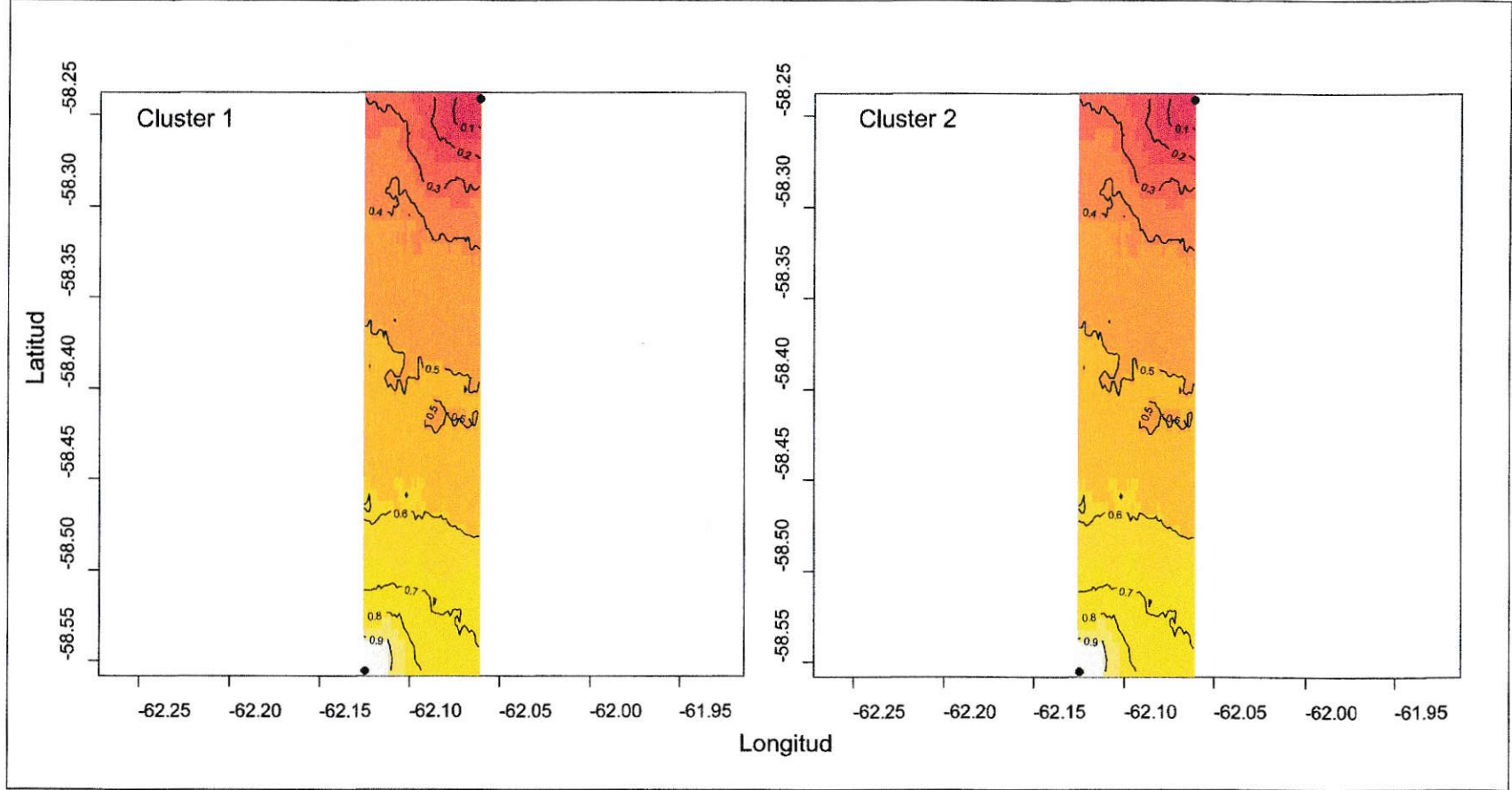


Figura 9.- Mapa de la probabilidad *a posteriori* de los miembros de cada población para las poblaciones de *P. adeliae*, empleando el marcador HVR-I.

### 4.3 Inferencia demográfica

#### 4.3.1. Región hipervariable I mtDNA

Los resultados de los test de neutralidad de Tajima ( $D$ ) y  $F_u$  ( $F_s$ ) se presentan en la Tabla 5. Se observa que para *P. adeliae* ambas pruebas resultaron negativas y significativas, mientras que para *P. papua*, ambos test resultaron negativos, sin embargo para el caso del test de Tajima los resultados no fueron significativos.

Tabla 5.- Test de Neutralidad para *P. adeliae* y *P. papua* para el marcador mitocondria

HVR-I. En negrita se destacan los valores no significativos.

Especie	Tajima ( $D$ )		Fu ( $F_s$ )	
	Test	p	Test	P
<i>P. adeliae</i>	-1,7945	0,02	-22,5313	*<0,05
<i>P. papua</i>	<b>-1,01107</b>	<b>0,1644</b>	-7,59286	0,0206

La distribución *Mismatch* observada para *P. adeliae* (Figura 10A), no se diferenció del modelo simulado (SSD=0.00049820,  $p=0.845$ ;  $rg=0.00574267$ ,  $p=0.734$ ). Se encontró un valor de  $\tau=3.996$ , estimándose que el tiempo a la expansión habría ocurrido hace aproximadamente 7.280 años. Para *P. papua* (Figura 10B), la distribución observada resultó significativamente distinta (SSD= 0.00256649,  $p=0,045$ ;  $rg=0.01950094$ ,  $p=0.055$ ). Pese a que marginalmente la distribución no se ajusta, se estimó, a modo referencial el tiempo a la expansión a partir del valor obtenido para  $\tau=4.924$ , el cual sugiere que la expansión habría ocurrido alrededor de 12000 años atrás.

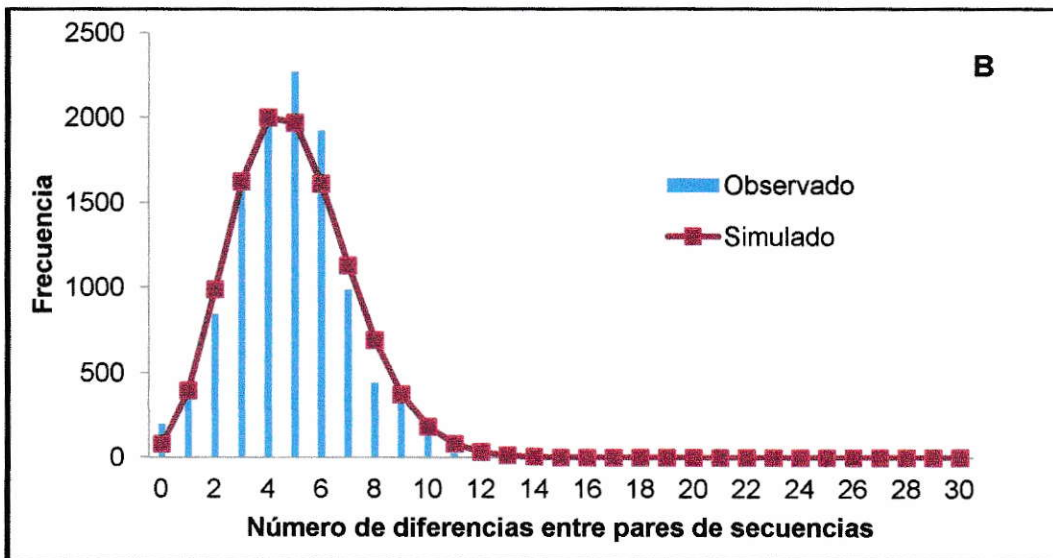
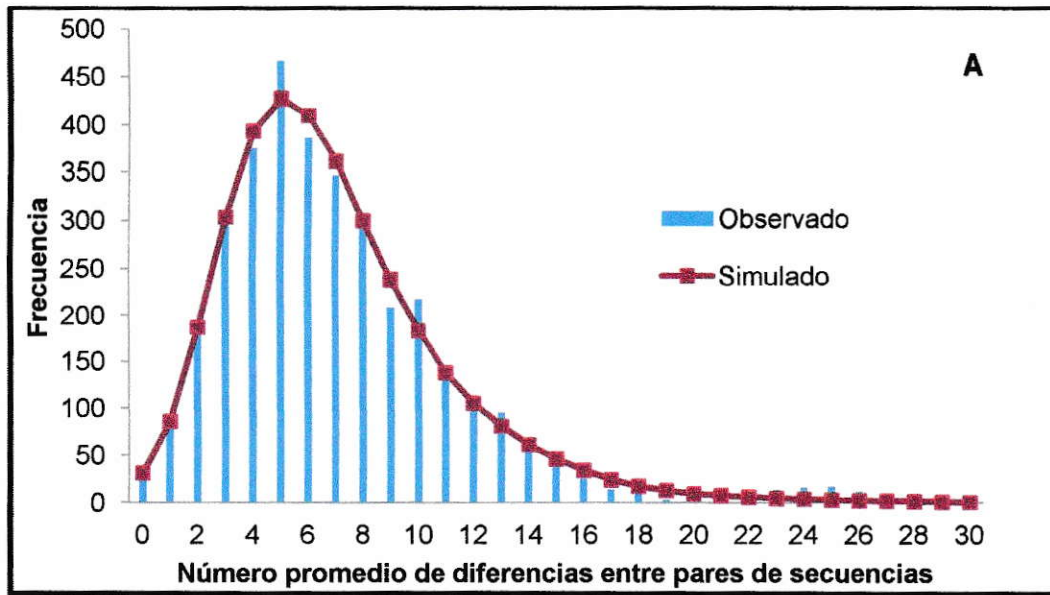


Figura 10.- Distribución *mismatch* para el marcador mitocondria HVR-I en *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B). Bajo el modelo de expansión instantánea.

Los resultados obtenidos en el análisis bajo crecimiento exponencial (Figura 11A y 11B), muestran que la expansión poblacional, habría ocurrido hace aproximadamente 13.200 años para *P. adeliae* y 15.600 años atrás *P. papua*.

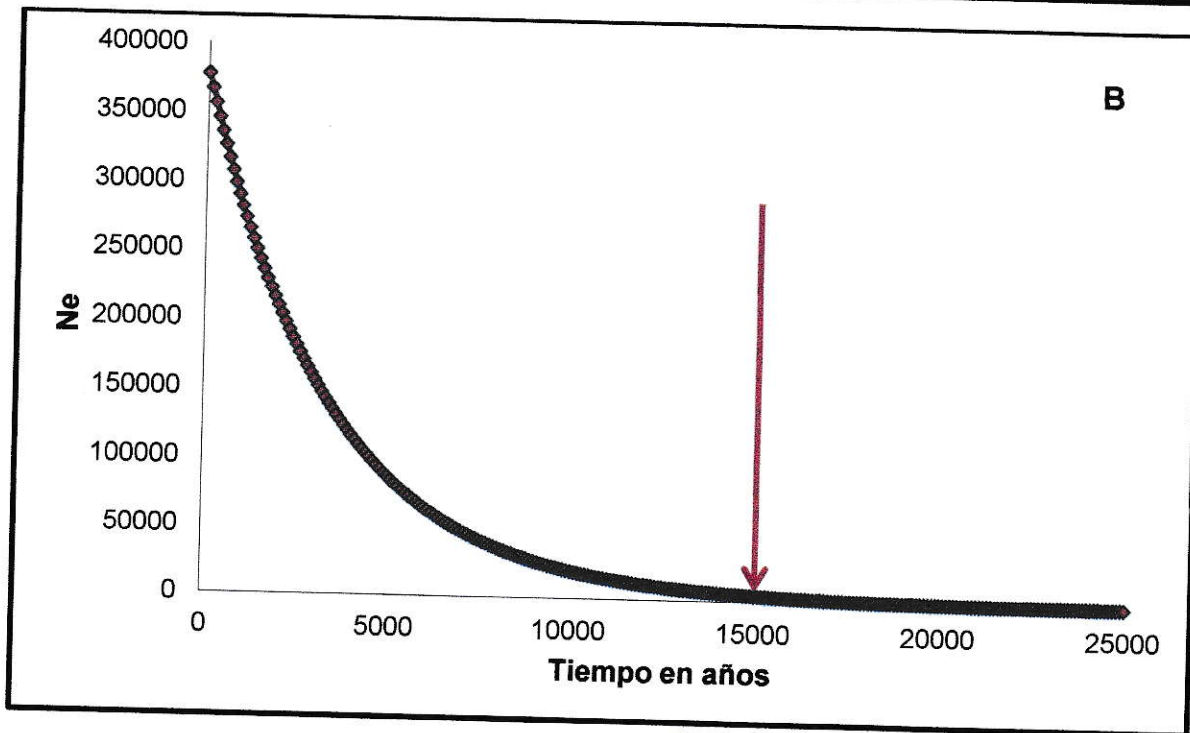
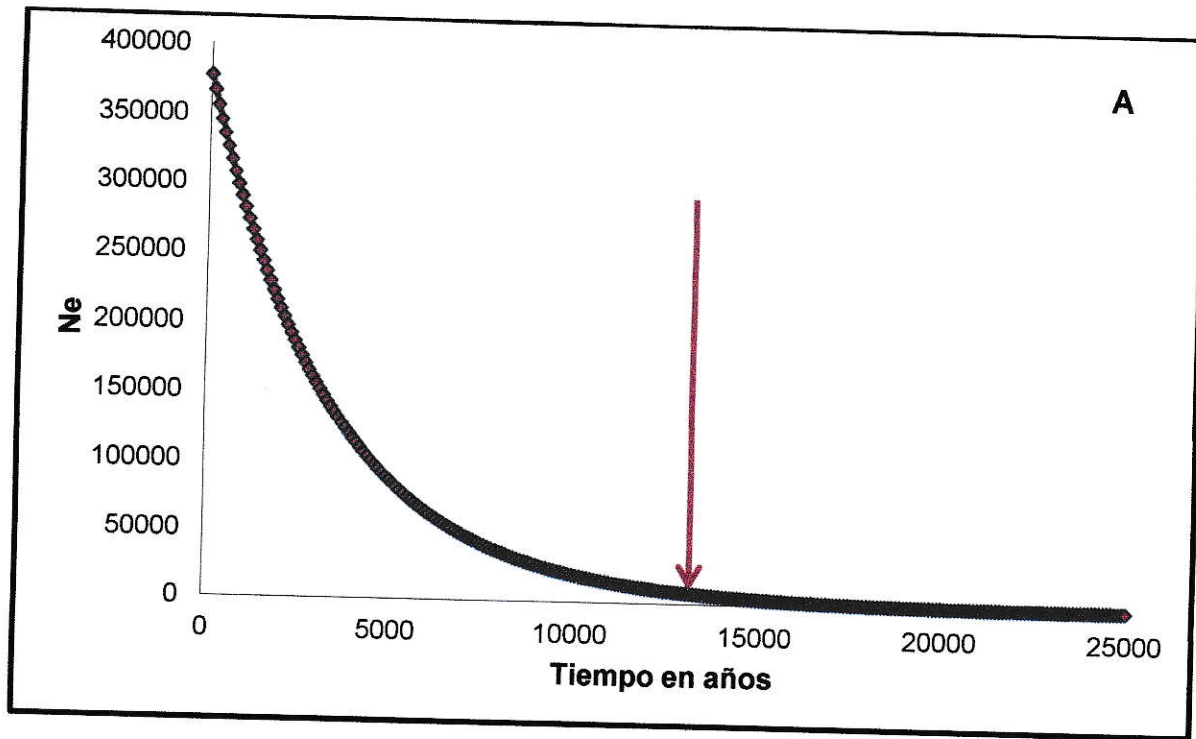


Figura 11- Variación del tamaño efectivo ( $N_e = \Theta / 2u$ ) para *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B) empleando el marcador HVR-I. La flecha roja indica el tiempo estimado de la expansión (1% Tamaño relativo).



El análisis de *Bayesian skyline* realizado para la *P. adeliae* sugiere que el tiempo a la expansión habría sido aproximadamente hace unos 17.000 años, encontrando que el tiempo al ancestro común más reciente (ACMR) habría sido de alrededor de unos 23.000 años (Figura 12) Para *P. papua*, el *Bayesian skyline* (Figura 13), da señales de una expansión más reciente hace alrededor de 13.000 años, mientras que fija al ACMR en ~21.500 años. Se observa además que Adelia mantendría tamaños efectivos superiores a los de *P. papua*. Papua muestra un aumento de sus tamaños efectivos en alrededor de un orden de magnitud.

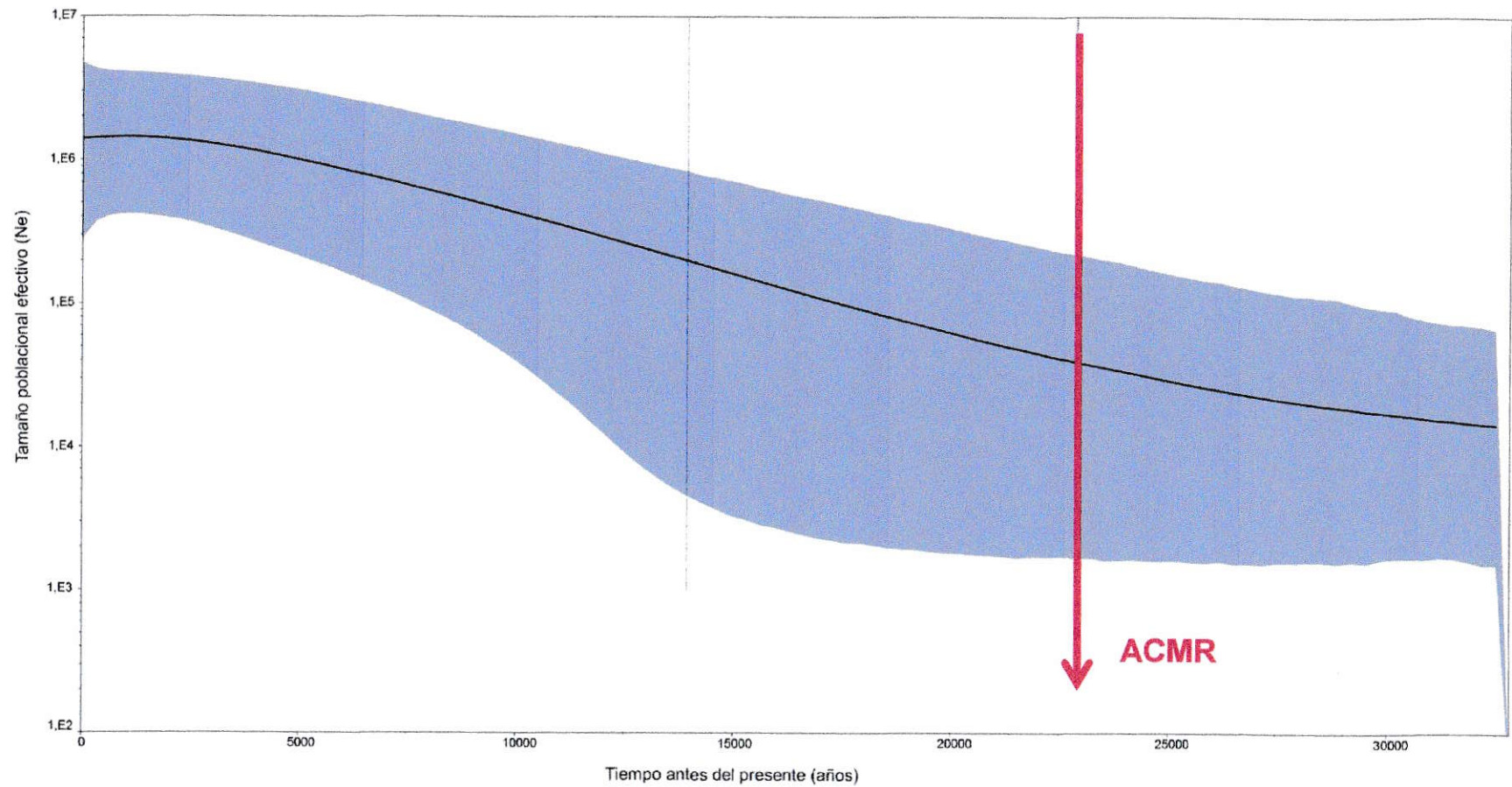


Figura 12.- Bayesian Skyride para *P. adeliae*. La flecha roja demarca el ancestro común más reciente (ACMR). La línea negra indica la media para el valor a posteriori del tamaño efectivo  $N_e$  a través del tiempo. El área celeste indica el intervalo de confianza de 95%

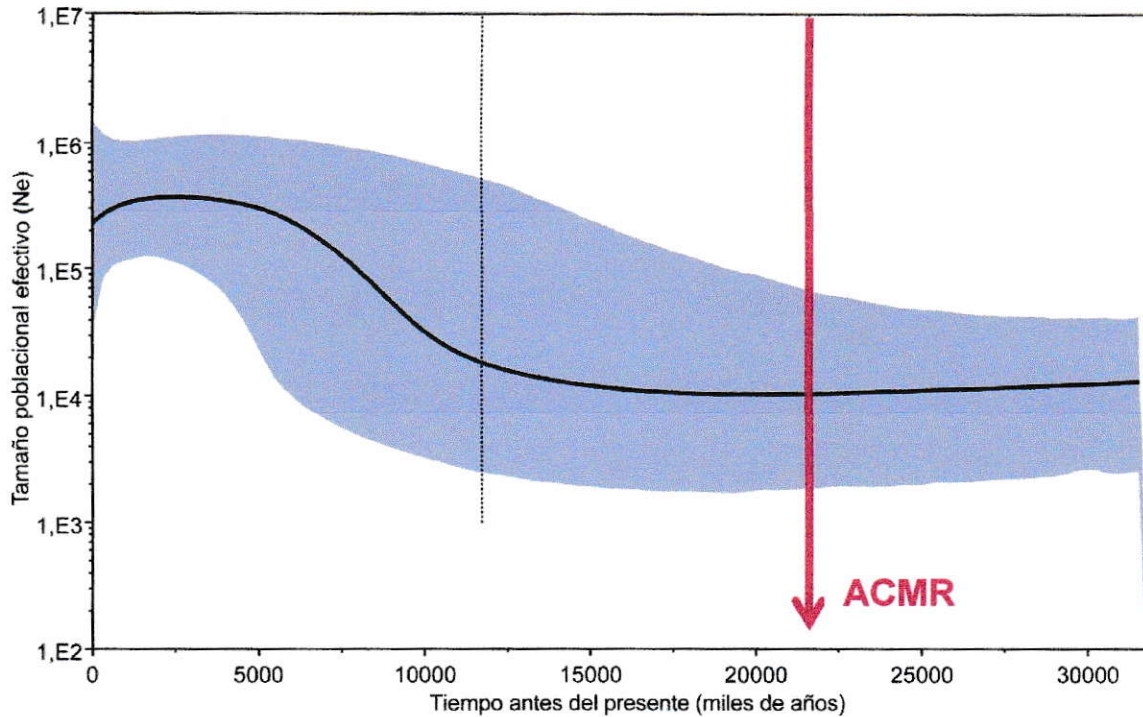


Figura 13.- Skyline Plot para *P. papua*. La flecha roja demarca el ancestro común más reciente (ACMR). La línea negra indica la media para el valor a posteriori del tamaño efectivo  $N_e$  a través del tiempo. El área celeste indica el intervalo de confianza de 95%

#### 4.3.2 Intron 7 del gen de $\beta$ -fibrinogeno.

En la Tabla 6, se presentan los resultados del test de neutralidad de Tajima (D), no significativo para ambas especies, mientras que el Test de Fu (Fs), resultó ser negativo y significativo para *P. adeliae*.

Tabla 6.-Test de Neutralidad para *P. adeliae* y *P. papua* para el intron 7 del gen de  $\beta$ -fibrinogeno. En negrita se destacan los valores no significativos.

Especie	Tajima (D)		Fu (Fs)	
	Test	p	Test	p
<i>P. adelia</i>	<b>-1,34761</b>	<b>0,071</b>	-4,75583	0,011
<i>P. papua</i>	<b>1,19185</b>	<b>0,87133</b>	<b>-1,18592</b>	<b>0,291</b>

El análisis de la distribución *Mismatch* observado, no se diferenció del modelo simulado, en *P. adeliae* (SSD=0.00448487, p=0.31; rg=0.08046785, p=0.204). A partir de esto se infirió el tiempo a la expansión a partir del valor de parámetro  $\tau=1.250$ , obteniéndose un tiempo estimado de 22800 años. Para el caso de *P. papua* (SSD=0.12412330, p=0.126; rg=0.50599138, p=0.093), si bien los estadígrafos muestran un ajuste de la distribución observada respecto a la simulada, la gráfica da señales de que estos parámetros podrían estar siendo sobreinterpretados, ya que no hay un ajuste efectivo (Figura 14B).



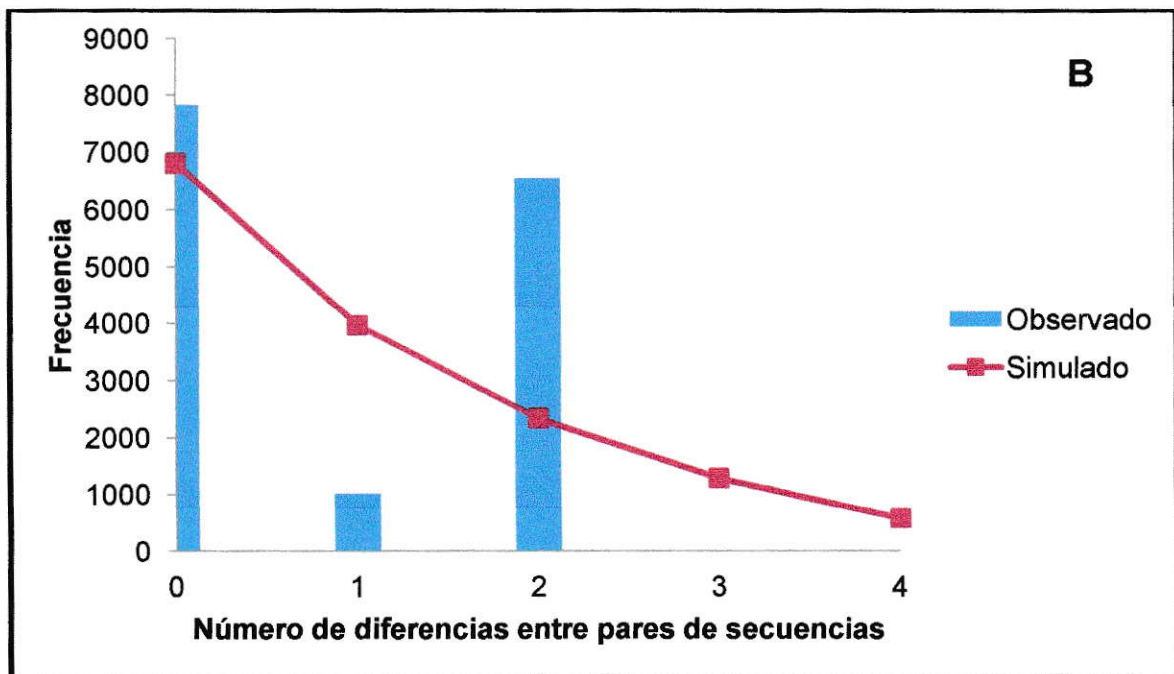
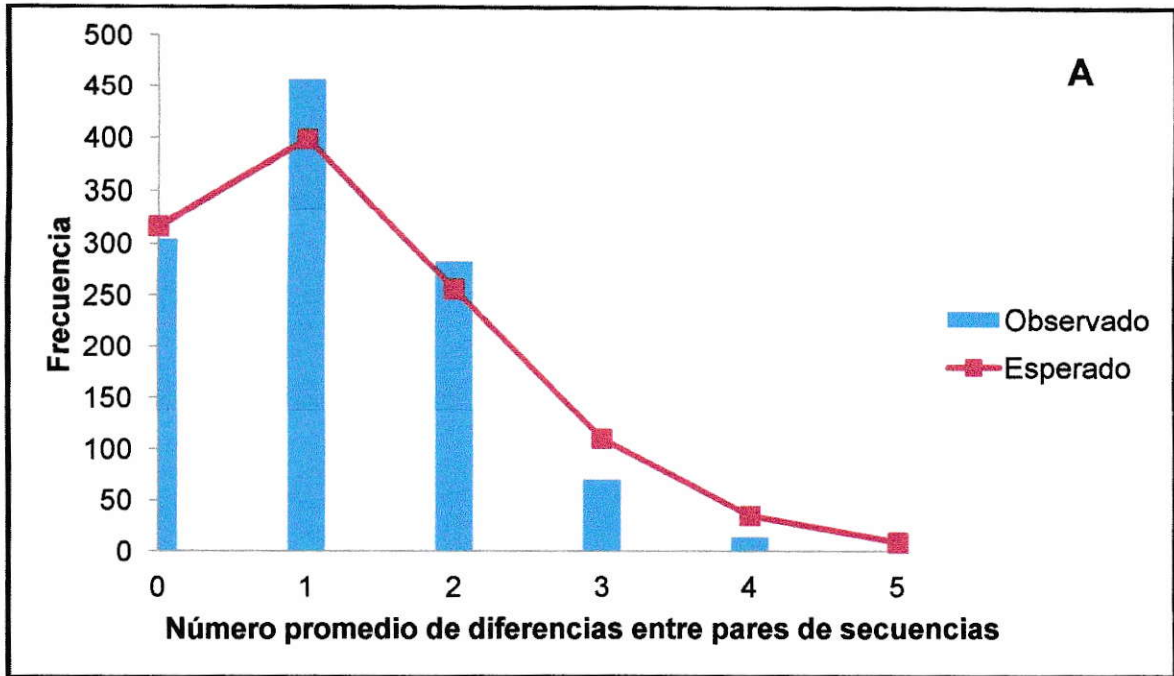


Figura 14.- Distribución *mismatch* para el marcador  $\beta$ fibint7 en *P. adeliae* (A) y *P. papua* (B). Bajo el modelo de expansión instantánea.

## 5. Discusión

Ambas especies muestran patrones de diversidad elevados para el marcador mitocondrial HVR-I, y baja diversidad para el marcador nuclear  $\beta$ fibint7. Esto se explica por la tasas de substitución de cada marcador. El marcador mitocondrial HVR-I, se ha descrito en aves como una de las regiones más variables de la d-loop, con una tasa descrita en pingüinos que oscila entre el 40%-80% (Ruokonen & Kvist, Subramanian et al. 2009, Millar et al 2008), mientras que el marcador nuclear  $\beta$ fibint7 presentaría una tasa de entre 1,9-3,6% (Prichytko & Moore, 2000; Bowie et al. 2009).

Los niveles de estructuración (significativos aunque bajos) encontrados para ambas especies con el marcador HVR-I se podrían explicar por su tendencia filopátrica que caracteriza a los pingüinos. Sin embargo, Ainley et al (2010) proponen que debido a los eventos de deglaciación iniciados hace aproximadamente 18.000 años, esta conducta pudo haberse visto relajada con el fin de recolonizar costas que recientemente se vieron libres de hielo. Considerando que el linaje mitocondrial es de herencia maternal y que las hembras tanto en Adelia como en Papua, presenten un mayor grado de fidelidad al sitio que el macho (Williams 1995, Ainley 2002), la estructuración observada para HVR-I en ambas especies, no necesariamente refleja poblaciones diferenciadas, sino más bien la filopatría de las hembras. De

hecho, el marcador nuclear  $\beta$ fibint7, de herencia bi-parental, no detecta estructuración entre las muestras de *P. papua*, lo que podría indicar el mayor flujo genético a través de los machos. Sin embargo, la baja variabilidad del marcador podría también limitar la posibilidad de detectar tal estructuración. En el caso de *P. adeliae*, no se puede evaluar la existencia de estructuración genética para el marcador nuclear, ya que no se cuenta con la secuencia de la localidad de Bahía Almirantazgo. Sin embargo, Roeder et al (2001), empleando microsatélites en colonias de pingüinos Adelia alrededor de Antártica, no detectan estructuración genética a pesar de la escala geográfica del estudio. Los autores plantean que la historia glacial asociada a la existencia de refugios serían los principales factores que regularían la diversidad genética en esta especie.

Para ambos marcadores, se observa que si bien las dos especies mantienen niveles similares de diversidad, *P. adeliae* presenta los mayores índices de diversidad genética en comparación con *P. papua* (Tabla 1). Esta congruencia entre ambos marcadores sugiere que la señal observada para el marcador mitocondrial no correspondería a un efecto de la selección natural, pero más bien al resultado de procesos demográficos. En base al escenario planteado inicialmente para este trabajo, la gran diversidad mitocondrial encontrada para Adelia, tiene sentido en el marco de una población antigua que se habría mantenido durante el UMG. Sin embargo, para el caso de Papua los resultados no coinciden con lo esperado: baja diversidad producto del proceso reciente de

recolonización post-glacial, posiblemente asociado a efectos fundadores. Por el contrario, se observa elevados índices de diversidad mitocondrial que sugieren un proceso demográfico diferente.

A pesar que ambas especies muestran niveles similares de diversidad, los patrones observados en la red de haplotipos (Figura 6 y 7) sugieren dos historias demográficas diferentes entre Adelia y Papua. En *P. papua* no se encontró un patrón en forma de estrella, como era de esperar, asociado a patrones de expansión post UMG debido a eventos de recolonización y efecto fundador, como ha sido descrito para diversas especies de organismos marinos en Antártica (Allcock & Strugnell 2012). En contraste, *P. adeliae* presenta una red de haplotipos en forma de estrella, con un haplotipo central predominante rodeado de haplotipos raros y de baja frecuencia. Este patrón se visualiza en ambos marcadores (Figuras 6A y 7A), lo que sugiere un proceso de expansión temprana posterior a un cuello de botella. Finalmente, los patrones de diversidad genética observados para ambas especies difieren de los esperados bajo nuestra hipótesis general.

Excavaciones arqueológicas en Tierra de Victoria presentan evidencia de dos eventos importantes de ocupación por parte de Adelia en el Continente Blanco. Uno ocurrido hace ~45.000-25.000 años y otro posterior al UMG, durante el Holoceno tardío (Lambert et al. 2010). Alrededor de unos 4.500-2.500 años las condiciones climáticas eran favorables para el asentamiento de las colonias de



pingüinos a lo largo de la costa de Tierra de Victoria. Huang et al (2010) establecen a través de dataciones de sedimento ornitológico que la recolonización en los cerros Vestfold, al este de Antártica habría comenzado ~ 8500 años atrás, sin embargo episodios locales de enfriamiento y calentamiento habrían provocado la continua llegada y retirada de las colonias de pingüinos en esta área, panorama que se observa a lo largo de varios sectores de Antártica. (Baroni and Orombelli 1994; Emslie 2001; Emslie et al. 2003; Emslie & Woehler 2005; Huang et al. 2009 & 2010). Durante el UMG la extensión de los glaciares habría dejado las costas de Antártica cubiertas de hielo, inhabilitando los sitios de nidificación de pingüinos (Baroni & Orombelli 1994), provocando posiblemente, el retiro de las colonias de estos hacia costas libres de hielo, aledañas al Continente Antártico. Ritchie et al (2004) plantean la existencia de dos linajes de mtDNA para Adelia: uno distribuido alrededor del continente antártico y otro restringido al mar de Ross. Ambos se asociarían a historias de refugio ancestrales que habrían sufrido un cuello de botella, encontrando que el ancestro común de cada linaje dataría de alrededor de 30.000 años atrás.

Nuestros análisis de inferencia soportan el escenario previamente planteado por los datos históricos (sedimento ornitológico, glaciología), ya que sugieren que Adelia habría experimentado un proceso de expansión, posterior a un cuello de botella. La *mismatch distribution* se ajusta al modelo esperado bajo los supuestos del modelo de crecimiento instantáneo, sugiriendo que habría ocurrido un proceso de expansión poblacional hace alrededor de 7.000 años,

mientras que bajo el modelo de crecimiento exponencial esta expansión se habría dado hace ~13.000 años. La estimación basada en inferencia Bayesiana, con el método Skyride, sugiere que el crecimiento poblacional habría ocurrido hace ~ 17.000 años. La estimación de tiempo al ancestro común más reciente fue de ~23.000 años, tiempo que se ajusta al propuesto por Ritchie et al (2004), donde la existencia de dos linajes se asocia a historia de refugio diferentes, y el tiempo al ACMR (~30.000 años) a una patrón de expansión posterior a un cuello de botella. Finalmente, integrando las nuevas evidencias aportadas por nuestro estudio con los datos fósiles y genéticos previamente publicados, podemos proponer un escenario histórico acerca de las poblaciones de *P. adeliae* en Antártica durante el Pleistoceno. A pesar de ser considerado como una especie asociada al hielo, capaz de permanecer en el continente Antártico durante los periodos glaciales, las poblaciones de *P. adeliae* habrían sufrido reducciones drásticas de sus tamaños durante los periodos más fríos, tal como el UMG. Durante estos episodios, pequeñas poblaciones habrían permanecido en varios refugios glaciales que no han sido identificados aún. Al salir de estos eventos glaciales, estas poblaciones habrían experimentado crecimientos rápidos, asociados a la recolonización de las aéreas previamente abandonadas.

Actualmente la mayor distribución de colonias de pingüinos Papua se encuentra en zonas subantárticas tales como las Islas Malvinas, Kerguelen y en general todas las islas subantárticas. Dentro de la provincia biogeográfica de Antártica,

las colonias más importantes se encuentran en Georgia del Sur pero también, aunque en menor medida, en las islas Sandwich, Orcadas y Shetland del Sur. A diferencia de *P. adeliae* que se encuentra alrededor de todo el continente Antártico, colonias reproductivas de *P. papua* sólo han sido reportadas en la Península Antártica. Dinechin et al (2012) muestran la existencia de tres clados de *P. papua*, uno asociado a islas subantárticas en el Océano Índico, otro a la Patagonia y las islas Malvinas y el tercero a la zona de Península Antártica e islas del arco de Escocia. La existencia de estos tres grupos genéticamente diferenciados se puede explicar tanto por factores conductuales como la filopatría, cómo por la historia biogeográfica de la zonas antárticas y subantárticas. A diferencia de otros organismos altamente dispersivos, con similar distribución como el elefante marino *Mirounga leonina* (de Bruyn et al. 2009), la existencia de clados diferenciados entre las zonas subantárticas y antárticas sugieren que la recolonización de la Península se habría originada a partir de las islas peri-antárticas como Georgia del Sur y/o de las Islas Sandwich. Datación con carbono radioactivo de colonias abandonadas de pingüinos, señalan que la colonización por parte de Papua habría sido posterior a la de Adelia. Evidencia geológica plantea que la zona de Península Byers, en isla Livingston (Islas Shetlands del Sur) habría quedado expuesta y libre de hielo hace alrededor de 3000 años, mientras que, en base a registros fósiles, Emslie et al (2011) estiman que la llegada de *P. papua* a Byers no habría ocurrido sino hasta ~1.100 años atrás. Esta colonización tardía de Papua se



podría explicar por los procesos de enfriamiento local que ocurrieron en Antártica hace ~2.000-1.000 años, conocido como “la pequeña era glacial”.

Estos antecedentes, los altos niveles de diversidad y la existencia de haplotipos compartidos entre las localidades muestreadas, nos permiten establecer que la recolonización de la WAP por parte de Papua no se asociaría a un efecto fundador, sino más bien a un importante número de individuos provenientes de refugios peri-antárticos, que se habrían desplazado hacia esta zona en etapas tardías de la deglaciación. El período de máximo crecimiento poblacional (Skyline plot, Figura 13) se sitúa entre los 5.000-10.000 años atrás, con un ACMRt de ~21.500 años. Estas estimaciones difieren de las fechas de recolonización obtenidas a través de excavaciones y suelos ornitológicos, lo que se explicaría considerando que durante el UMG Papua no estuvo presente en Antártica por lo que el tiempo detectado de la expansión reflejaría un patrón de expansión post UMG, presumiblemente en zonas peri-antárticas, dónde actualmente se encuentran las colonias con mayor abundancia de parejas reproductivas. En base a nuestros resultados y los antecedentes sobre la biogeografía de *P. papua* en la región Antártica y subantártica, junto a los registros fósiles sobre recolonización posglacial, podemos plantear que Papua habría permanecido en refugios durante el UMG, presumiblemente peri-antárticos, desde los cuales se habría dispersado hacia la Península e islas Shetland del Sur, encontrando que la recolonización no presentaría un patrón asociado a un efecto fundador, como se ha observado para otros grupos de



fauna Antártica luego del UMG, sino más bien se explicaría por la llegada de un importante número de individuos provenientes de distintos refugios

## 5.2 Conclusión

El alza en las temperaturas en la WAP, se ha evidenciado no sólo por factores físicos, como la disminución en la extensión de los hielos y retroceso de glaciares, sino también por la alteración en la composición de las comunidades ecológicas, principalmente a través de la llegada de especies provenientes de regiones subantárticas o islas peri-antárticas, como ha sido mostrado en otras especies marinas (Thatje et al. 2005; González et al. 2011; Smith et al. 2011; Díaz et al, 2012) y terrestres (Hughes et al 2005; Convey & Smith 2006). Por otro lado, estas alzas en las temperaturas también han mostrado tener un impacto sobre organismos distribuidos estrictamente en zonas más australes del continente, como es el caso del pingüino emperador, *Aptenodytes forsteri*, una especie restringida al hielo. Trathan et al. 2011 registra, por primera vez la pérdida de una colonia de pingüino emperador, la cual se asociaría al incremento de las temperaturas y la disminución en la estacionalidad del hielo. Estos cambios estarían asociados a diversos factores tanto fisicoquímicos como ecológicos que podrían estar regulando la estabilidad de las poblaciones en el tiempo.

Los resultados obtenidos en este trabajo entregan evidencia de la dinámica de las poblaciones de *P. adeliae* y *P. papua* durante la transición de períodos

glaciar-interglaciar ocurridos en el Pleistoceno. La señal de recolonización detectada para *P. papua*, junto a la información en los cambios demográficos de las poblaciones de pingüinos en Antártica, sugieren que si las tendencias en los patrones climáticos continúan como se prevé, las temperaturas en la WAP aumentarían cada vez más, generando el desplazamiento de *P. adeliae* hacia zonas más frías, mientras que se esperaría encontrar una dispersión hacia latitudes superiores por parte de Papua.

## 6. BIBLIOGRAFIA

Ainley DG (2002) *The Adélie Penguin. Bellwether of Climate Change*. Columbia University Press, New York. 310 pp.

Ainley D., Russell J., Jenouvrier S., Woehler E., Lyver P., Fraser W. & Kooyman G. (2010). Antarctic penguin response to habitat change as Earth's troposphere reaches 2°C above preindustrial levels. *Ecological Monographs*, 80:49-66.

Aljanabi S.M. & Martinez I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25:4692-4693.

Allcock A.L. & Strugnell J.A (2012). Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, 27:520-528.

Anderson J., Shipp S., Lowe A., Smith-Wellner J. & Mosola A. (2002). The Antarctic Ice Sheet during the Last Glacial Maximum and its subsequent retreat history: a review. *Quaternary Science Reviews*, 21:49-70.

Baker A., Pereira S., Haddrath O. & Edge K. (2006). Multiple gene evidence for expansion of extant penguins out of Antarctica due to global cooling. *Proceedings of The Royal Society*, 273:11- 17.

Bandelt H-J., Forster P. & Röhl A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16:37-48.

Barbraud C. & Weimerskirch H. (2001). Emperor penguins and climate change. *Nature*, 411:183-186.

Baroni C. & Orombelli G. (1994). Abandoned penguin rookeries as Holocene paleoclimatic indicators in Antarctica. *Geology*, 22:23-26.

Barrett P.J. (1999). Antarctic climate history over the last 100 million years. *Terra Antarctica*, 3: 53–72.

Bindoff N.L., Willebrand J., Artale V., Cazenave A., Gregory J., Gulev S., Hanawa K., LeQuéré C., Levitus S., Nojiri Y., Shum C., Talley D. & Unnikrishnan A. (2007). Observations: Oceanic Climate Change and Sea Level. In: *Climate Change 2007: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* [Solomon S., D. Qin M. Manning Z. Chen M. Marquis K.B. Averyt M. Tignor & H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom and New York, NY, USA.

Bowie R., Fjeldsa J & Kiure J. (2009). Multilocus molecular DNA variation in Winifred's Warbler *Scepomycter winifredae* suggests cryptic speciation and the existence of a threatened species in the Rubeho–Ukaguru Mountains of Tanzania. *Ibis*, 151:709-719.

Burns J., Costa D., Fedak M., Hindell M., Bradshaw C., Gales N., McDonald B., Trumble, S. & Crocker, D. (2004). Winter habitat use and foraging behavior of crabeater seals along the Western Antarctic Peninsula. *Deep Sea Research II*, 51:2279–2303.



Carlini A., Coria N., Santos M., Negrete J., Juarez M. & Daneri G. (2009). Responses of *Pygoscelis adeliae* and *P. papua* populations to environmental changes at Isla 25 de Mayo (King George Island). *Polar Biology*, 32:1427-1433.

Clarke A., Murphy E., Meredith M., King J., Peck L., Barnes D. & Smith R. (2007a). Climate and the marine ecosystem of the western Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of The Royal Society*, 362:149- 166.

Clarke J., Ksepka D., Stucchi M., Urbina M., Giannini N., Bertelli S., Narváez Y. & Boyd C. (2007b). Paleogene equatorial penguins challenge the proposed relationship between biogeography, diversity, and Cenozoic climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104:11545-11550.

Convey P. & Smith R. (2006). Responses of terrestrial Antarctic ecosystems to climate change. *Plant Ecology*, 182:1-10.

Convey P. & Stevens M.I. (2007). Antarctic Biodiversity. *Science*, 317: 1877-1878.

Convey P., Gibson J.A., Hillenbrand C.D., Hodgson D.A., Pugh P.J., Smellie J.L. & Stevens M.I., (2008). Antarctic terrestrial life—challenging the history of the frozen continent? *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society*. 83:103-117.

Convey P., Stevens M.I., Hodgson D.A., Smellie J.L., Hillenbrand C.D., Barnes D., Clarke, A., Pugh P.J., Linse K. & Cary C. (2009). Exploring biological constraints on the glacial history of Antarctica. *Quaternary Science Review*, 28:3035–3048.

Costa D. & Crocker D. (1996). Marine mammals of the Southern Ocean. In *Foundations for ecological research west the Antarctic Peninsula* [Ross, M., E. E. Hofmann & L. B. Quetin (eds)], pp.287–301. Washington, DC: American Geophysical Union.

Croxall J., Trathan P. & Murphy E. (2002). Environmental Change and Antarctic Seabirds populations. *Science*, 297:1510-1514.

Coxall H.K., Wilson P.A., Palike H., Lear C.H., & Backman J. (2005). Rapid stepwise onset of Antarctic glaciation and deeper calcite compensation in the Pacific Ocean. *Nature*, 433:53–57.

Denton G.H. & Hughes T.J. (2002). Reconstructing the Antarctic Ice Sheet at the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews* 21, 193–202.

de Bruyn M., Hall B., Chauke L., Baroni C., Koch P. & Hoelzel A.R.(2009). Rapid response of a marine mammal species to Holocene climate and habitat change. *PLoS Genetics*. 5: e1000554. doi:10.1371/journal.pgen.1000554.

De Wever A., Leliaert F., Verleyen E., Vanormelingen P., Van der Gucht K., Hodgson D., Sabbe K. & Vyverman W. (2009) Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Science*, 276:3591–3599.

Díaz A., Féral J.P., David B., Saucède T. & Poulin E. (2011) Evolutionary pathways among shallow and deepsea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. *Deep Sea Research. Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58: 205–211.

Díaz A., González-Weber C., Maturana C., Palma A., Poulin E. & Gerard K. (2012). Distribución geográfica restringida y baja diversidad genética en el erizo incubante *Abatus agassizii* (Spatangoidea: *Schizasteridae*) en las Islas Shetland del Sur: ¿Una población de avanzada antes de su expansión hacia el norte de la Península antártica?. *Revista Chilena de historia Natural*, 85:457-468.

Dinechin M., Dobson S., Zehtindjiev P., Metcheva R., Couchoux C., Martin A., Quillfeldt P. & Jouventin P.(2012). The biogeography of Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *Canadian Journal of Zoology*, 90:352-360.

Domack E., Leventer A., Dunbar R., Taylor F., Brachfeld S. & Sjunneskog C. (2001). Chronology of the Palmer Deep site, Antarctic Peninsula: a Holocene palaeoenvironmental reference for the circum-Antarctic. *The Holocene*, 11:1-9.

Drummond A.J., Suchard M.A., Xie D. & Rambaut A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29:1969-1973

Ducklow H., Baker K., Martinson D., Quetin B., Ross R., Smith R., Stammerjohn S., Vernet M. & Fraser W. (2007). Marine pelagic ecosystems: the West Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society*, 362:67-94.

Emslie S.D. (2001). Radiocarbon dates from abandoned penguin colonies in the Antarctic Peninsula region. *Antarctic Science*, 13:289– 295.

Emslie S. & McDaniel J. (2002). Adelie penguin diet and climate change during the middle to late Holocene in northern Marguerite Bay, Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 25:222-229.

Emslie S.D., Berkman P.A., Ainley D.G., Coats L. & Polito M. (2003). Late- Holocene initiation of ice-free ecosystems in the southern Ross Sea, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 262:19–25

Emslie S.D. & Woehler E.J. (2005) A 9000-year record of Adelie penguin occupation and diet in the Windmill Islands, East Antarctica. *Antarct Science*, 17:57–66

Emslie S., Baumann K. & Tuinen M. (2011). Late Holocene occupation of Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*) on Byers Peninsula, Livingston Island, Antarctica. *Polar Biology*, 34:283-290.

Excoffier L., Laval G. & Schneider S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolution Bioinformatics Online*, 1:47-50.

Forcada J., Trathan P., Reid K., Murphy E. & Croxall P. (2006). Contrasting population changes in sympatric penguin species in association with climate warming. *Global Change Biology*, 12:411-423.

Forcada J. & Trathan P. (2009). Penguin responses to climate change in the Southern Ocean. *Global Change Biology*, 15:1618-1630.

Fraser W., Trivelpiece W., Ainley D. & Trivelpiece S. (1992). Increases in Antarctic penguin populations: reduced competition with whales or a loss of sea ice due to environmental warming?. *Polar Biology*, 11:525-531.

Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147:915-925.

Gersonde R., Crosta X., Abelmann A. & Armand L. (2005). Sea-surface temperature and sea ice distribution of the Southern Ocean at the EPILOG Last Glacial Maximum – a circum-Antarctic view based on siliceous microfossil records. *Quaternary Science Review*, 24:869-896.



González-Wevar C.A., Nakano T., Cañete J. & Poulin E. (2010) Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: *Nacellidae*) in the Southern Ocean. *Molecular. Phylogenetics and Evolution*, 56: 115–124.

González-Wevar C., David B. & Poulin E. (2011). Phylogeography and demographic inference in *Nacella concinna* (Patinigera) (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. *Deep Sea Research II*, 58:220-229.

Guillot G., Santos F. & Estoup A.(2008). Analysing gerefenced populations genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, 24: 1406-1407.

Guillot G. & Santos F. (2009) A computer program to simulate multilocus genotype data with spatially auto-correlated allele frequencies. *Molecular Ecology Resources*, 9:112-1120.

Hall B. & Denton G. (1999). New relative sea-level curves for the southern Scott Coast, Antarctica: evidence for Holocene deglaciation of the western Ross Sea. *Journal of Quaternary Science*, 14: 641-650.

Hall B.; Koffman T. & Denton G. (2010). Reduced ice extent on the western Antarctic Peninsula at 700–970 cal. yr B.P. *Geology*, 38: 635-638.

Harris A. (1993). Wisconsinan Pre-pleniglacial biotic change in Southeastern New Mexico. *Quaternary Research*, 40:127-133.

Hewitt G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–913.

Hewitt G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 359: 183–195

Hodgson D., McMinn A., Kirkup H., Cremer H., Gore D., Melles M., Roberts D. & Montiel P.(2003). Colonization, succession, and extinction of marine floras during a glacial cycle: A case study from the Windmill Islands (east Antarctica) using biomarkers, *Paleoceanography*, 18:1067,doi:10.1029/2002PA000775

Huang T., Sun L.G., Wang Y.H. & Zhu R.B. (2009) Penguin occupation in the Vestfold Hills. *Antarctic Science*, 21:131–134.

Huang J., Sun L., Huang W., Wang X. & Wang Y. (2010). The ecosystem evolution of penguin colonie in the past 8,500 years on Vestfold Hills, East Antarctica. *Polar Biology*, 33:1399-1406.

Hughes L. (2000). Biological consequences of global warming: is the signal alreedy. *Trends in Ecology and Evolution*, 15:56-61.

Hughes K., Walsh S., Convey P., Richards S. & Berstrom D. (2005). Alien fly populations established at two Antarctic research station. *Polar Biology*, 28:568-570.

Kooyman G. (2002). Evolutionary and ecological aspects of some Antarctic and sub-Antarctic penguin distributions. *Oecologia*, 130:485-495.

Knox G.A. (2007). *Biology of the Southern Ocean* 2nd edition. CRC Press, Taylor & Francis Group. 6000 Broken Sound Parkway NW, Suite 300 Boca Raton, FL 33487-2742. 622 pp.

Khuner M., Yamato J. & Felsenstein J. (1998). Maximum likelihood estimation of population growth rates based on the coalescent. *Genetics*, 149: 429-434.

Khuner M. (2006). LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, 22:768-770.

Lambert D., Millar C., Swaminathan S. & Baroni C. (2010). Evolution on a Frozen Continent. *American Scientist*, 98:386-393.

Librado P. & Rozas J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA Polymorphism data. *Bioinformatics*, 25:1451-1452.

McCarty J. (2001). Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, 15:320-331.

McClintock J., Ducklow H. & Fraser W. (2008). Ecological responses to climate change on the Antarctic Peninsula. *American Scientist*, 96:302–310.

McClintock J., Silva P. & Fraser W. (2010). Southerly breeding in gentoo penguins for the eastern Antarctic Peninsula: further evidence for unprecedented climate-change. *Antarctic Science*, 22:285- 286.

Meredith M. & King J. (2005). Rapid climate change in the ocean west of the Antarctic Peninsula during the second half of the 20th century. *Geophysical Research Letters*, 32:1-5.

Millar C., Dodd A., Anderson J., Gibb G., Ritchie P., Baroni C., Woodhams M., Hendy M. & Lambert D. (2008). Mutational and evolutionary rates in Adélie penguins from the Antarctic. *PLoS Genetics*, 4:e1000209. doi:10.1371/journal.pgen.1000209.

Naish T., Carter L., Wolff E., Pollard D. & Powell R. (2009). Late Pliocene–Pleistocene Antarctic Climate Variability at Orbital and Suborbital Scale: Ice Sheet, Ocean and Atmospheric Interactions. *Developments in Earth & Environmental Sciences*, 8. Editores Florindo F, Siebert M. Editorial Elsevier. Amsterdam Holanda. 576 pp.

Newton M.A. & Raftery A.E. (1994). Approximate Bayesian-inference with the weighted likelihood bootstrap. *Journal of the Royal Statistical Society Series B- Methodological*, 56:3-48.

Nicholls N., Gruza G., Jouzel J., Karl T., Ogallo L. & Parker D. (1995). Observed climate variability and change. In: *Climate Change 1995. The Science of Climate Change. Contributions of Working Group I to the Second Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. [Houghton, J.T., L.G. Meira Filho, B.A. Callander, N. Harris, A. Kattenberg & K. Maskell (eds)]. Cambridge University Press, Cambridge, U.K, and New York, USA.

Nikula R., Fraser C., Spencer H.G. & Waters J.M. (2010) Circumpolar dispersal by rafting in two subantarctic kelp-dwelling crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*, 405: 221–230

Overpeck J., Webb R. & Webb T. (1992). Mapping eastern North American vegetation change of the past 18 ka: No-analogs and the future. *Geology*, 20:1071- 1074.

Pons O. & Petit R.J. (1995). Estimation, variance and optimal sampling of genetic diversity. I Haploid locus. *Theoretical Applied Genetics*, 90:462-470.



Pons O. & Petit R.J. (1996). Measuring and testing genetics differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144: 1237-1245.

Posada D. (2008). jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and evolution*, 25:1253-1256.

Prychitko T.M & Moore W.S. (2000) Comparative Evolution of the mitochondrial Cytochrome b Gene and Nuclear b-Fibrinogen Intron 7 in Woodpeckers. *Molecular Biology and Evolution*, 17:1101-1111.

Rambaut A. & Drummond A.J. (2009). Tracer v.1.5 Available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer>.

Roeder A., Marshall R., Mitchelson A., Visagathilagar T., Ritchie P., Love D., Pakai T., Mcpartlan S., Murray D., Robinson N., Kerry K & Lambert D.(2001) Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10:1645-1656.

Roeder A., Ritchie P. & Lambert D. (2002). New DNA markers for penguins. *Conservation Genetics*, 3:341-344.

Rogers A. & Harpending H. (1992). Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9:552-569.

Röhl A. (2002). Network, netw3111.exe downloaded in the web site: [www.fluxusengineering.com](http://www.fluxusengineering.com).

Root T., Price J., Hall K., Schneider S., Rosenzweig C. & Pounds A. (2003). Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421:57-60.

Rozas J., Librado P., Sánchez-Del Barrio J., Messeguer X. & Rozas R. (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, 19:2496-2497.

Ruokonen M. & Kvist L. (2002). Structure and evolution of the avian mitochondrial control region. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 23:422-432.

Sambrook J., Fritsch E. & Maniatus T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 253pp.

Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000). ARLEQUIN, Version 2000: A software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.

Schneider S. & Excoffier L. (1999). Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, 152:1079-1089.

Siegert M. & Florindo F. (2009). Antarctic climate Evolution. *Developments in Earth & Environmental Sciences*, 8. Editores Florindo F, Siegert M. Editorial Elsevier. Amsterdam Holanda. 576 pp.

Solomon S., Qin D., Manning M., Alley R., Berntsen T., Bindoff N., Chen Z., Chidthaisong A., Gregory J., Hegerl G., Heimann M., Hewitson B., Hoskins B., Joos F., Jouzel J., Kattsov V., Lohmann U., Matsuno T., Molina M., Nicholls N., Overpeck J., Raga G., Ramaswamy V., Ren J., Rusticucci M., Somerville R., Stocker T., Whetton P., Wood R. & Wratt D. (2007). Resumen Técnico. En: Cambios Climáticos. 2007: Base Física de la Ciencia. Aportes del Grupo de Trabajo I al Cuarto Informe de Evaluación del Panel Intergubernamental sobre Cambios Climáticos [Solomon, S., D. Qin, M. Manning, Z. Chen, M. Marquis, K.B. Averyt, M. Tignor & H.L. Miller (eds.)]. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido y Nueva York, NY, Estados Unidos.

Smith R., Ainley D., Baker K., Domack E., Emslie S., Fraser B., Kennett J., Leventer A., Mosley E., Stammerjohn S. & Vernet M. (1999). Marine Ecosystem Sensitivity to Climate Change. *BioScience*, 49:393-404.

Smith, C., Grange L., Hoing D., Naudts L., Huber., Guidi. & Domack E. (2011). A large population of king crabs in the Palmer Deep on the West Antarctic Peninsula shelf and potential invasive impacts. *Proceedings of The Royal Society B*, 279:1017-1026.

Stephens M. & Donnelly P. (2003). A comparison of bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *American Journal of Human Genetics*, 73:1162-1169.

Stephens M., Smith N. & Donnelly, P. (2001). A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American Journal of Human Genetics*, 68:978-989.

Subramanian S., Denver D.R., Millar C., Heupink T., Aschrafi A., Emslie S., Baroni C. & Lambert D.(2009). High mitogenomic evolutionary rates and time dependency. *Trends in Genetics*, 25:482-486.

Suchard M.A., Weiss R.E. & Sinsheimer. (2001). Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 18:1001-1013.

Tajima F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.

Talarico F.M. & Kleinschmidt. (2009). The Antarctic Continent in Gondwanaland: A Tectonic Review and Potential Research Targets for Future Investigations. *Developments in Earth & Environmental Sciences*, 8. Editores Florindo F, Siebert M. Editorial Elsevier. Amsterdam Holanda. 576 pp.

Thatje S., Klaus A., Calcagno J., Lovrich J., Pörtner H-O. and Arntz W. (2005). Challenging the cold: crabs reconquer the Antarctic. *Ecology*, 86:619–625.

Thatje S., Hillenbrand C.D., Mackensen A. & Larter R. (2008) Life hung by a thread: endurance of Antarctic fauna in glacial periods. *Ecology*, 89:682–692

Trathan P.N., Fretwell P.T. & Stonehouse B. (2011). First Recorded Loss of an Emperor Penguin Colony in the Recent Period of Antarctic Regional Warming: Implications for Other Colonies. *PlosOne*, 6: e14738.

Turner J., Colwell S., Marshall G., Lachlan T., Carleton A., Jones P., Lagun V., Reid P. & Iagovkina S. (2005). Antarctic climate change during the last 50 years. *International Journal of Climatology*, 25:279-294.



Vaughan D., Marshall G., Connolley W., Parkinson C., Mulvaney R., Hodgson D., King J., Pudsey C. & Turner J. (2003). Recent rapid regional climate warming on the Antarctic Peninsula. *Climate Change*, 60:243-274.

Walther G., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Beebee T., Fromentin J., Guldberg O. & Bairlein F. (2002). Ecological responses to recent climate change. *Nature*, 416:389-395.

Williams T. (1995). The penguins: Spheniscidae. *Bird Families of the World*, 2. Oxford University Press: Oxford. ISBN 0-19-854667-X. XIII, 295 pp.

Wilson P., Ainley D., Nur N., Jacobs S., Barton G., Ballard G. & Comiso J. (2001). Adélie penguin population change in the pacific sector of Antarctica: relation to sea-ice extent and the Antarctic Circumpolar Current. *Marine Ecology progress series*, 213:301-309.

Wilson N.G., Schörd M. & Halanych K.M. (2009) Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Molecular Ecology*, 18:965– 984.

Zachos J. C., Quinn T. M. & Salamy K. A. (1996). High-resolution (104 years) deep-sea foraminiferal stable isotope records of the Eocene–Oligocene climate transition. *Paleoceanography*, 11:251–266.

Zachos J., Pagani M., Sloan L., Thomas E. & Billups K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65Ma to present. *Science*, 292,686–693.