

UCH-FC
DOC-EBE
G643b
C.1

**BIOGEOGRAFÍA HISTÓRICA Y RECIENTE
EN EL GÉNERO *Nacella* (Schumacher, 1817)
(PATELLOGASTROPODA: NACELLIDAE),
A LO LARGO DE SU DISTRIBUCIÓN EN
EL OCÉANO AUSTRAL**



Universidad de Chile

Tesis

Entregada a La Universidad de Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De



Doctor en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva
Facultad de Ciencias

Por

Claudio Alejandro González Wevar

Julio, 2010

Director de Tesis: Dr. Elie Poulin

Co-Director de Tesis: Juan Iván Cañete

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Doctorado presentada por el candidato

CLAUDIO ALEJANDRO GONZÁLEZ WEVAR

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito
para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Ecología y Biología
Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 1 de Julio de 2009

Director de Tesis:

Dr. Elie Poulin

Co-Director de Tesis:

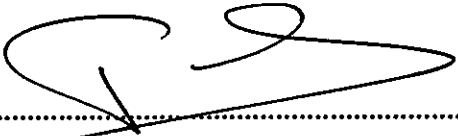
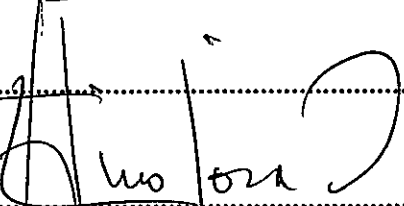

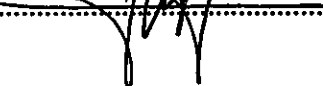

Juan Iván Cañete


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Luis Felipe Hinojos

Dr. Marco Méndez

Dr. Patricio Camus


.....

.....

.....

.....

.....





Mi nombre es Claudio González Wevar, nací en la tarde de un miércoles 30 de enero del año 1974 en la gloriosa y única ciudad de los ríos, Valdivia, XIV Región de los ríos. Desde mi infancia mostré un especial interés y fascinación por la Zoología, Biología y la Paleontología. Realicé mis estudios de enseñanza básica y media en el Instituto Alemán *Carlos Anwandter* de Valdivia e ingresé a la Carrera de Biología Marina de la Universidad Austral de Chile, en el año 1993. Realicé mi tesis de pregrado entre los años 1998-2000, bajo la tutela del Dr. Milton Gallardo (Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral de Chile), trabajando en genética de poblaciones de bivalvos pertenecientes a los géneros *Mulinia*, *Aulacomya* y *Eurhomalea*, a lo largo de la costa chilena. Es en estos momentos en los que corroboró mi interés por la Zoología, pero surgieron otros relacionados con Genética, Evolución y Citogenética. Entre los años 2003 - 2005 realicé mis estudios de Magíster en Ciencias con mención en Genética en la Universidad Austral de Chile. Nuevamente, mi profesor guía fue el Dr. Gallardo pero en esta ocasión los temas de estudio fueron la evolución y relaciones filogenéticas en Roedores Sudamericanos de la familia Octodontidae. Mi tema de tesis de Magíster fue Control Epigenético de los loci NOR en la especie alotetraploide *Tympanoctomys barrerae*. Finalizados mis estudios de Magíster ingresé de inmediato al Programa de Doctorado en Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile y bajo la tutela del Dr. Elie Poulin hice estudios filogenéticos y filogeográficos en el género *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae). Espero poder continuar mi formación como científico a través del desarrollo de un postdoctorado para así pronto comenzar una línea de investigación propia.

A mi familia y a ti mi amor



AGRADECIMIENTOS

A mi familia: Quiero agradecer de manera especial a mis padres, quienes siempre han tenido fe en mi y me han apoyado en todas mis decisiones.

A mi Vivi: Has sido un verdadero faro de luz en estos últimos meses tan complejos. No sé si hubiera sido capaz de sacar todo esto adelante en los plazos sino hubieras estado conmigo, apoyándome y animándome. Gracias por tu paciencia e infinito amor. Me has enseñado que *el sentido de amar es sentirse más vivo*, tal como dijo Gustavo Cerati. Te amo.

A mi tutor: Al Dr. Elie Poulin quiero agradecer todo el apoyo y confianza que has depositado en mi. Has generado en mi un profundo y verdadero interés por la evolución y adaptación en el Océano Austral. Este paseo por la ciencia ha sido una experiencia fantástica y espero que podamos seguir construyendo a través de nuevos estudios y aproximaciones.

A mi comisión de Tesis: A los doctores Luis Felipe Hinojosa, Marco Méndez y Patricio Camus agradezco su buena disposición, consejos y aportes para el desarrollo de este proyecto de tesis.

Al Laboratorio de Ecología Molecular: A todos mis compañeros del LEM que siempre han sido de mucha ayuda, en especial a Angie, David y Claudia M. A mis amigos, Nelson, Christian, María Cecilia, Marce, Jime, Karin, Joel, Sapito y Karem.

A todas las **Instituciones** que han apoyado la realización de mi doctorado, entre ellas, Comisión de Ciencia y Tecnología (Conicyt), Instituto Antártico Chileno a través de su beca de apoyo de tesis, al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Proyecto Fondo Basal PFB-23, Instituto Antártico Chileno (INACH), Museo Nacional de Historia Natural, Chile, Museo de Ciencia y Naturaleza, Tokio Japón, Museo de Sydney, DIMAR, Marsella, Francia, IDEAWILD, Instituto Antártico Francés.

A los siguientes **Investigadores** que han apoyado de manera directa e indirecta la realización de esta tesis, Tomoyuki Nakano, Hamish Spencer, Yves Frenot, Bruno David, Jean-Pierre Féral, Anne Chenuil, César Cárdenas, Ceridwen Fraser, Marc Lebouvier, Marine y Alexia.

Y finalmente quiero agradecer a la música, mi eterna compañera.

ÍNDICE DE CONTENIDOS



RESUMEN.....	xxi
ABSTRACT.....	xxiv
I. INTRODUCCIÓN.....	1 - 36
1.1. El Océano Austral	1 - 5
1.2. Biogeografía Histórica del Océano Austral.....	5 - 13
1.3. Origen de la fauna marina bentónica en el Océano Austral	13 - 17
1.4. Orden Patellogastropoda.....	18 - 20
1.5. Antecedentes generales de la Familia Nacellidae	21 - 23
1.6. <i>Nacella</i> en el Océano Austral	23 - 33
1.7. Marcadores moleculares	34
1.8. Objetivos	35 - 36
1.8. Hipótesis	36
II. MATERIALES Y MÉTODOS	37 - 66
Localidades de muestreos e identificación de especies	37 - 44
Preparación de ADNs, amplificación por PCR y Secuenciación	44 - 48
Edición de secuencias y Alineamiento	49

2.1. Biogeografía Histórica de Nacellidae, con especial énfasis en el género <i>Nacella</i>	51
2.1.1. Reconstrucciones Filogenéticas.....	51 - 53
2.1.2. Estimación de los tiempos de divergencia	53 - 55
2.2. Filogeografía e inferencia demográfica en especies de <i>Nacella</i> provenientes de distintas Provincias en el Océano Austral	56
2.2.1. Localidades de muestreo	56 - 59
2.2.2. Amplificación, secuenciación y edición de secuencias.....	60
2.2.3. Análisis genético poblacionales	60 - 61
2.2.4. Inferencia Demográfica	61 - 63
2.3. Análisis genético comparativo entre especies simpátricas de <i>Nacella</i> provenientes de Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes y Puerto Montt	64
2.3.1. Localidad de análisis	64
2.3.2. Análisis genético comparativos	65
2.3.3. Análisis de Morfometría Geométrica	66 - 67
III. RESULTADOS	68 - 112
3.1. Biogeografía Histórica del género <i>Nacella</i> en el Océano Austral ...	68
3.1.1. Variación a nivel de secuencias	68 - 69
3.1.2. Análisis filogenéticos	69 - 84



3.1.3. Estimación de los tiempos de divergencia	85 - 89
3.2. Análisis genético comparativo en las especies de <i>Nacella</i> de la Provincia de Magallanes	90
3.2.1. Comparaciones entre especies de Punta Santa Ana y Puerto Montt	90 - 98
3.2.2. Morfometría Geométrica en especies magallánicas de <i>Nacella</i>	99 - 100
3.3. Filogeografía e inferencia demográfica en especies de <i>Nacella</i> provenientes de distintas provincias en el Océano Austral	101
3.1.1. <i>Nacella concinna</i> (Provincia Antártica)	101 - 105
3.1.2. <i>Nacella magellanica</i> (Provincia de Magallanes)	105 - 109
3.1.3. <i>Nacella clypeater</i> (Provincia Peruana)	109 - 112
 IV DISCUSIÓN	 115 - 150
4.1. Biogeografía histórica de <i>Nacella</i>	115 - 125
4.2. Sistemática en el género <i>Nacella</i>	125 - 128
4.3. <i>Nacella</i> en la Provincia de Magallanes	128 - 137
4.4. Glaciaciones del Pleistoceno y su efecto sobre la diversidad genética en especies de <i>Nacella</i> en un gradiente latitudinal	137 - 140
4.5. Comparación de la diversidad genética en especies de <i>Nacella</i> de Antártica y Magallanes	140 - 148





4.6. *Nacella clypeater* (Provincia Peruana) 148 - 150

V CONCLUSIONES 151 - 154

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS 155 - 184

ANEXOS

Anexo I Artículo publicado en *Molecular Phylogenetics and Evolution*. **Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 115 - 124.**

Anexo II Artículo aceptado en *Deep Sea Research II*.

Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula.

ÍNDICE DE FIGURAS



I. INTRODUCCIÓN

- 1.1. Océano Austral (azul) y sus principales características batimétricas; profundidades > 3500 m están sombreadas (tomado y modificado de Orsi *et al.*, 1995) 2
- 1.2. Mapa esquemático de las mayores corrientes en el Océano Austral, al Sur de los 20°LS. Profundidades < 3500 m están sombreadas. Se indican los mayores núcleos de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), el Frente Polar y el Frente Subantártico. Abreviaciones: C = Corriente; G = Giro (tomado y modificado de Rintoul *et al.*, 2001) 4
- 1.3. Reconstrucción de Gondwana y la actual disposición de los bloques continentales. Las áreas sombreadas muestran la distribución sugerida para las aguas someras. Durante el Cretáceo (A; 120 Ma) el Océano Austral estaba dominado por grandes masas continentales rodeadas al norte por el Mar de Tetis y al Sur por el proto-Pacífico. Los océanos Atlántico e Índico comenzaba abrirse. Al comienzo del Cenozoico (B; 60 Ma) Gondwana se encuentra fragmentada, Sudamérica, África e India se han movido del bloque Antártica/Australia. A fines del Eoceno las mayores cuencas oceánicas (Atlántico, Pacífico e Índico) se encuentran establecidos aunque

1.4. Registros de isótopos de carbón y oxígeno de profundidad basados en datos compilados a partir de 40 programas (DSDP y ODP). Las curvas derivadas de isótopos de carbón después del Mioceno medio se muestran en azul (Atlántico) y rojo (Pacífico). Las barras verticales entregan representaciones cualitativas crudas del volumen de hielo en cada continente en relación al último máximo glacial. Se indican algunos eventos climáticos, tectónicos y oceanográficos (tomado y modificado de Zachos *et al.*, 2001) 10

1.5. Distribución de Nacellidae en los Océanos del Mundo. En ● distribución del género *Cellana* en el Indo Pacífico y Nueva Zelanda; y ● distribución de *Nacella* en el Océano Austral y en la Provincia Peruviana 22

1.6. Ejemplares de los subgéneros *Nacella* y *Patinigera* y las principales diferencias a nivel de la morfología externa de la concha, coloración, y posición del apex (Ap). A) *Nacella* (*Nacella*) *mytilina* sobre frondas de *Macrocystis piryfera*; B) *Nacella* (*Patinigera*) *magellanica* 24

1.7. Distribución de Nacellidae con especial interés en los linajes de *Nacella* (Powell, 1973; Valdovinos & Rüth, 2005). Los colores indican las distribuciones relativas en distintas Provincias Biogeográficas del Océano Austral descritas por Powell, (1950). Donde rojo = Magallanes; Celeste = Provincia Peruana; Azul = Antártica; Verde = Kerguelén; Morado = Provincia de las Antípodas, al sur de Nueva Zelanda. En color naranja se indica la distribución del género *Cellana* 27



1.7. Distribución de Nacellidae con especial interés en los linajes de *Nacella* (Powell, 1973; Valdovinos & R  th, 2005). Los colores indican las distribuciones relativas en distintas Provincias Biogeográficas del Oce  no Austral descritas por Powell, (1950). Donde rojo = Magallanes; Celeste = Provincia Peruana; Azul = Antártica; Verde = Kerguelén; Morado = Provincia de las Antípodas, al sur de Nueva Zelanda. En color naranja se indica la distribución del género *Cellana*

27

1.8. Distribución de las especies magallánicas de *Nacella* según Powell (1973) y Valdovinos & R  th (2005) donde: A) *N. magellanica*, *N. deaurata*, *N. delicatissima*; B) *N. flammea*, *N. fuegiensis*; C) *N. venosa*, *N. chiloensis*; D) *N. mytilina*

31

1.9. Algunas especies de *Nacella* en sus ambientes naturales. Donde: A) *Nacella magellanica* (I), B) *Nacella mytilina* sobre frondas de *M. pyrifera* (S), C) *Nacella flammea* (S), D) *Nacella deaurata* (I), E) *N. concinna* F) *Nacella chryseata* (S). I = Intermareal; S = Submareal. Fotografías A, B, C y D cortesía de César Cárdenas. (ccardenas.biosub@gmail.com; www.guiamarina.com)

33



II. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Especies de *Nacella* incluidas en las reconstrucciones filogenéticas. Los colores en el mapa muestran la Provincia a la cual pertenecen (Hedgpeth, 1969) y al borde de los recuadros la(s) especie(s) correspondiente(s). Verde = Kerguelén; Rojo = Magallanes; Celeste = Provincia Peruana; Azul = Antártica

..... 37

2.2. Principales caracteres relacionadas con la morfología externa de la concha y a la presencia de rasgos diagnósticos (coloración de los tentáculos del manto, coloración del músculos pedal), que permiten el reconocimiento de las especies de *Nacella* estudiadas (modificado de Valdovinos & Rütth, 2005)

42

2.3. A) Rango de distribución de *Nacella concinna* en el Océano Austral. B) Localidades de muestreo de *N. concinna* en el Oeste de la Península Antártica

57

2.4. Localidades de muestreo de las especies magallánicas de *Nacella* A) Rango de distribución abarcado para estas especies, desde Puerto Montt a Puerto Deseado. B) Localidades de muestreo de *N. magellanica* a lo largo del Estrecho de Magallanes y Tierra del Fuego

..... 57

2.5. . Localidades de muestreo para la especie *N. clypeater* a lo largo de la
costa Centro Sur de Chile 58

III. RESULTADOS

3.1. Análisis bayesiano (20×10^6 generaciones muestreados cada 1000
generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial
énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las
secuencias del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa Subunidad I. Los
valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se
indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con -)
..... 71

3.2. Análisis bayesiano (20×10^6 generaciones muestreados cada 1000
generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial
énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las
secuencias del gen mitocondrial Citocromo b. Los valores de bootstrap
(MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las
ramas (valores inferiores al 95% se señalan con -) 72

3.3. Análisis bayesiano (20×10^6 generaciones muestreados cada 1000
generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial
énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las
secuencias del gen mitocondrial 16S rADN. Los valores de bootstrap

(MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --) 73

3.4. Análisis bayesiano (20⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen nuclear 28S rADN. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --) 74

3.5. Análisis bayesiano (20⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen nuclear Actina. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --) 75

3.6. Análisis bayesiano (20⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del fragmento intrónico nuclear EPIC30. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --) 76

3.7. Análisis bayesiano (20 ⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir de las secuencias de los genes mitocondriales COI, Cytb y 16S rADN (Análisis de Evidencia Total). Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; p > 95%) se indican a nivel de las ramas (los valores inferiores al 95% se señalan con --)	77
3.8. Hipótesis esquemática que muestra los principales nodos detectados en Patellogastropoda (Tabla 3.2), construido a partir de las secuencias de los genes mtADN (COI) y nucADN (28S)	79
3.9. Árbol linearizado que muestra las estimación de los tiempos de divergencia en Patellogastropoda utilizando un método bayesiano relajado para datos multilocus (MULTIDIVTIME/MULTIDISTRIBUTE), construida a partir de las secuencias concatenadas de COI y Cytb. Se indican las principales fechas estimadas en la evolución del género <i>Nacella</i>	87
3.10. Relaciones filogenéticas dentro de Patellogastropoda. Hipótesis filogenético basada en inferencia bayesiana basado que incluye los tiempos de divergencia a partir de los análisis de reloj molecular estricto mediante el gen COI. Las barras azules indican los intervalos de confianza de las estimaciones de tiempo de divergencia	88

3.11. Relaciones filogenéticas dentro de Patellogastropoda. Hipótesis filogenético basada en inferencia bayesiana basado que incluye los tiempos de divergencia a partir de los análisis de reloj molecular estricto mediante el gen Cytb. Las barras azules indican los intervalos de confianza de las estimaciones de tiempo de divergencia 89

3.12. Red de haplotipos obtenida a partir de las secuencias de COI desde 158 ejemplares de *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes. Redes de haplotipos de las especies A) *N. deaurata*; B) *N. magellanica*; C) *N. fuegiensis*; D) *N. mytilina*; E) *N. flammea*. Los haplotipos se representan por un círculo de color especie-específico cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. En la figura F) los colores indican: Rojo = *N. deaurata*; Amarillo = *N. magellanica*; Verde = *N. fuegiensis*; Morado = *N. flammea*; Azul = *N. mytilina*. Los símbolos ● = mutaciones específicas y o = vectores medios (mv) 95

3.13. Red de haplotipos construida a partir de las secuencias de COI en 151 ejemplares de: A) *N. chilensis* (Pto. Montt), B) y *N. venosa* (Pto. Montt) y *N. magellanica* (no mostrado). La figura C muestra la genealogía de haplotipos entre las tres especies juntas. Cada haplotipo se representa por un círculo de color cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Los colores indican: Azul = *N. chilensis*; Rojo = *N. venosa*; Amarillo = *N. magellanica*. Los

símbolos ● = mutaciones específicas y o = vectores medios (mv)..... 97

3.14. Diferencias pareadas de la distribución de desajuste (*mismatch distribution*) para el gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) en siete especies magallánicas de *Nacella* 97

3.15. Ploteo de los componentes principales PC1 vs PC2 de la variación en la morfología de la concha en especies de *Nacella* magallánicas. Los colores indican las especies, donde: Rojo = *N. deaurata*; Verde = *N. fuegiensis*; Morado = *N. flammea*; Azul = *N. mytilina*; Amarillo = *N. magellanica*; Celeste = *N. chilensis*; Naranja = *N. venosa* 100

3.16. Red de haplotipos obtenida a partir de las secuencias de COI en 161 ejemplares de *N. concinna* y 1 de *N. delesserti*. Cada haplotipo esta representado por un círculo de color indica la localidad y sus tamaños son proporcionales a su frecuencia. Los círculos completos ● = mutaciones 104

3.17. Red de haplotipos contruida a partir de 198 secuencias de COI en *Nacella magellanica* provenientes de ocho localidades en el Estrecho de Magallanes, Tierra del Fuego y la costa Atlántico Argentina. Cada haplotipo esta representado por un círculo de color cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Los círculos completos ● corresponden a mutaciones específicas 108

3.18. Red de haplotipos construida a partir de 75 secuencias de COI en *Nacella clypeater* de tres localidades a lo largo de la costa Centro-Sur. Cada haplotipo esta representado por un círculo de color cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Los círculos completos • corresponden a mutaciones específicas 111

3.19. Distribución de diferencias pareadas en el gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) en tres especies de *Nacella* provenientes de distintas regiones biogeográficas, *N. concinna* de Antártica, *N. magellanica* de Magallanes y *N. clypeater* de Chile Centro-Sur..... 113

3.20. Tiempos de expansión demográfica en especies de *Nacella* provenientes de distintas Provincias biogeográficas (*N. concinna* = Antártica; *N. magellanica* = Magallanes; *N. clypeater* = Chile Centro-Norte) basadas en: A) modelo de crecimiento exponencial y B) modelo de crecimiento instantáneo 114

Figura 4.1. A) Distribución de los linajes de *Nacella* en el Océano Austral, los colores representan las distribuciones relativas de los linajes: Celeste = Provincia Peruviana; Rojo = Provincia Magallanes; Azul = Provincia Antártica; Amarillo = Provincia de Kerguelén. B) Patrón a gran escala de la distribución de gastrópodos en el Océano Austral (tomado de Griffiths et al., 2009) 118

Figura 4.2. Estimación de los eventos más importantes en la evolución de *Nacella*, desde sus separación de *Cellana* y tres las rondas de diversificación

..... 124

Figura 4.3. Unidades propuestas para el género *Nacella* detectadas en base al grado de diferenciación genética entre ellas 133

ÍNDICE DE TABLAS

II MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Especies utilizadas en las reconstrucciones filogenéticas, número de especímenes analizados, coordenadas geográficas (C.G), región biogeográfica (A = Antártica; P = Provincia Peruviana; M = Magallanes; K = Kerguelen) a la que pertenecen las especies de *Nacella*. Marcadores moleculares utilizados en los análisis donde: COI = Citocromo Oxidasa Subunidad I; Cytb = Citocromo b; 16S = 16S rARN; 28S = 28S rARN; Act. = Actina; EPIC30 = Intrón Epic 30. La identificación de especies de *Nacella* se hizo en base a Powell (1973) y Valdovinos & Rùth (2005). Los símbolos ● = secuencias obtenidas desde GenBank; ● = secuencias amplificadas y secuenciadas en esta investigación y ● secuencias no disponibles 40

2.2. Marcadores moleculares (M) utilizados en las reconstrucción filogenética en Patellogastropoda. Se detalla la secuencia de los partidores y referencias. Las posiciones degeneradas se representan por el siguiente código: N = A|C|G|T; R = A|G; S = C|G; W = A|T; Y = C|T 44

2.3. Condiciones de PCR para los distintos marcadores utilizados. Se indica el número de ciclos, el tamaño de los fragmentos (pb), las temperaturas de Anillamiento en grados Celsius (A); y los tiempos en segundos (⊙) de Desnaturalización (D), Anillamiento (A) y Extensión (E) 47

Anillamiento en grados Celsius (A); y los tiempos en segundos (⊙) de
Desnaturalización (D), Anillamiento (A) y Extensión (E)
..... 47

2.4. Especies utilizadas en los análisis genético poblacionales en Nacellidae,
Nº = número de ejemplares analizados, coordenadas geográficas, Prov. =
Provincia Biogeográfica (A = Antártica; P = Provincia Peruviana; M =
Magallanes) a la cual pertenecen las especies de *Nacella*. La identificación de
las especies magallánicas de *Nacella* se hizo en base a Powell (1973) y
Valdovinos & Rùth (2005) 58

III. RESULTADOS

3.1. Marcadores moleculares utilizados en las reconstrucciones
filogenéticas, los correspondientes modelos de sustitución (M.S.) para
Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Además se resume
la composición de nucleótidos A = Adenina, C = Citocina, G = Guanina, T =
Timina y la proporción de sitios invariantes PV 68

3.2. Descripción de los principales nodos y linajes indicados en las figuras
15-20. Los asteriscos (*) indican los nodos no soportados., n/a = asociación
no aplicable en todos los marcadores utilizados 77

3.3. Número de ejemplares por especie y los respectivos índices de
diversidad genética basados en secuencias de mtADN (COI). Donde n =
Número de especímenes analizados, K = número de haplotipos

encontrados; H = diversidad haplotípica; S = sitios polimórficos; II = número de diferencias de nucleótidos; π = diversidad nucleotídica. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. $T =$ Índice de Tajima D 90

3.4. Valores de G_{ST} (bajo la diagonal) y de N_{ST} (sobre la diagonal) entre especies de *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes. 20200 iteraciones, valores significativos ($p < 0.001$) en rojo 91

3.5. Valores de G_{ST} (bajo la diagonal) y de N_{ST} (sobre la diagonal) entre *N. chilensis* y *N. venosa* provenientes de Puerto Montt y *N. magellanica* (Magallanes). 20200 iteraciones, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas 91

3.6. Valores de p de las comparaciones pareadas Hotteling de los análisis de Componentes Principales obtenidos desde la morfología de las conchas en especies de *Nacella* de Magallanes. En rojo se indican las comparaciones que resultaron altamente significativas 99

3.7. Índices de diversidad genética en *Nacella concinna*. n : número de ejemplares; k : número de haplotipos; S : sitios polimórficos; H : diversidad haplotípica; II : número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $T. D$, prueba de Tajima 101

3.8. Comparaciones pareadas de G_{ST} (bajo la diagonal) y N_{ST} (sobre la diagonal) entre las localidades analizadas de *N. concinna*. 20200 iteraciones, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones 102

3.9. Índices convencionales de diversidad genética y pruebas de neutralidad en *N. magellanica* proveniente de distintos sitios en la Provincia de Magallanes. n : número de ejemplares analizados; k : número de haplotipos; S : sitios polimórficos; H : diversidad haplotípica; Π : número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. $T. D$ = índice de Tajima .. 105

3.10. Índices convencionales de G_{ST} (bajo la diagonal) y N_{ST} (sobre la diagonal) en *Nacella magellanica* a lo largo del Estrecho de Magallanes y del Sudeste de Patagonia argentina. 20200 iteraciones, valores significativos ($P < 0.05$) en rojo 106

3.11. Índices convencionales de diversidad genética y pruebas de neutralidad en *N. clypeater* proveniente de distintas localidades a lo largo de la costa Centro-Sur de Chile. n : número de ejemplares analizados; k : número de haplotipos; S : sitios polimórficos; H : diversidad haplotípica; Π : número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 109

3.12. Índices convencionales de G_{ST} (bajo la diagonal) y N_{ST} (sobre la diagonal) en *Nacella clypeater* a lo largo de la costa Centro-Sur de Chile. 20200 iteraciones, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones 110

MEDIDAS Y ABREVIACIONES

Cantidades y simbología de las unidades de medida utilizadas

Longitud	Kilometro	km,	m,	cm,	mm,	μm
Volumen	Litro	L,	ml,	μl ,		
Tiempo	Minuto	Min,	seg,	ms,	μs ,	etc
Masa	Gramo	G,	mg,	μg ,	ng	g
Concentración	Molaridad	M,	mM,	μM ,		
Tamaño molecular	Pares de bases	Kpb,	pb			
Temperatura	Grados Celsius	$^{\circ}\text{C}$				
Velocidad	Knot	Kt				
Densidad óptica	Absorbancia	A				

Abreviaciones Standard y convenciones

Π	Número promedio de diferencias pareadas
π	Diversidad nucleotídica
Φ_{ST}	Índice de diferenciación entre poblaciones
Φ_{CT}	Índice de diferenciación entre grupos
Φ_{CS}	Índice de diferenciación entre poblaciones dentro de los grupos.
16S	Gen mitocondrial que codifica para el fragmento ribosomal 16S
28S	Gen nuclear que codifica para el fragmento ribosomal 28S
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
AFLPs	Amplified Fragment Length Polymorphism
Bs	Soporte Bootstrap
CCA	Corriente Circumpolar Antártica
COI	Citocromo c Oxidasa Subunidad I
Cytb	Citocromo b
DNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfato
DSDP	Deep Sea Drilling Project
EFA	Análisis de Fourier Elíptico
EFDs	Descriptores elípticos de Fourier
ENSO	El Niño-Oscilación del Sur
EPIC	Exon Primed Intron Crossing
FP	Frente Polar
G_{ST}	Índice de diferenciación poblacional calculado en base a las frecuencias de los haplotipos
IB	Inferencia Bayesiana

INACH	Instituto Antártico Chileno
ILD	Prueba de Diferencia de Longitud por Incongruencia
<i>H</i>	Diversidad haplotípica
Indels	Inserciones - deleciones
ISSRs	Inter Simple Sequence Repeats
<i>k</i>	Número de haplotipos
Ka	Kilo años
LGM	Último Máximo Glacial
LS	Latitud Sur
Ma	Millones de Años
MCMC	Cadenas de Markov, método Monte Carlo
MgCl ²	Cloruro de Magnesio
ML	Máxima Verosimilitud
MMCT	Transición Climática del Mioceno Medio
MP	Máxima Parsimonia
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NMDS	
nucADN	Ácido desoxirribonucleico nuclear
<i>N_{ST}</i>	Índice de diferenciación poblacional basado en similitud de haplotipos
ODP	Ocean Drilling Programs
p.p.	Probabilidad posterior
RFLPs	Restricted Fragment Length Polymorphism
<i>S</i>	Número de sitios polimórficos
SNPs	Single Nucleotide Polymorphis
Sv	Sverdrup, medida de transporte de volumen
Taq	polimerasa de <i>Thermophyllus aquaticus</i>
TBR	Tree Bisection and Reconnection

RESUMEN

La evolución y la biogeografía histórica de la fauna marina bentónica del Océano Austral están estrechamente relacionadas a grandes cambios tectónicos y climáticos ocurridos en esta región durante los últimos 55 millones de años (Ma). Muchas familias, géneros, e incluso familias de organismos marinos son compartidos entre provincias biogeográficas distantes dentro de esta región. Este patrón de distribución en invertebrados bentónicos marinos ha sido comúnmente explicado por especiación vicariante por tectónica de placas. Sin embargo, estudios moleculares recientes sugieren que la dispersión a gran escala podría ser una posible explicación para los patrones biogeográficos en el Océano Austral.

Las lapas verdaderas del género *Nacella* se distribuyen actualmente en diferentes regiones biogeográficas del Océano Austral tales como Antártica, la Provincia de Kerguelén, la Provincia de las Antípodas al Sur de Nueva Zelanda y Sudamérica. Se presentan reconstrucciones filogenéticas usando tres marcadores mitocondriales (Citocromo c Oxidasa I, Citocromo b, 16S) y tres fragmentos nucleares (28S, Actina y EPIC30) para determinar las relaciones entre las especies de *Nacella* y estimar el origen y diversificación del género. Las reconstrucciones se hicieron utilizando tres métodos, Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB), mientras que los tiempos de divergencia entre las especies de *Nacella* se estimaron siguiendo dos aproximaciones una bayesiana relajada y el reloj molecular estricto. Con estos propósitos, se recolectaron

especies intermareales y submareales pertenecientes a cuatro provincias del Océano Austral: Antártica, Provincia de Kerguelén, Chile Central y la Provincia Magallanes.

Los resultados moleculares están de acuerdo a estudios morfológicos y moleculares previos apoyando la monofilia de *Nacella* y su relación de hermandad con *Cellana*. Se reconocen tres rondas de diversificación en la evolución de *Nacella*. La primera ocurrió a fines del Mioceno y originó a los principales linajes, actualmente distribuidos en Antártica, Sudamérica y Kerguelén. Se detectaron altos niveles de divergencia entre especies de *Nacella* pertenecientes a regiones biogeográficas distantes enfatizando el significado de discontinuidades oceánicas lo que sugiere que la dispersión a gran escala ha tenido poca importancia. La segunda ronda de diversificación incluye la diversificación de *Nacella* en Sudamérica entre 5 – 2.5 Ma. La última ronda de diversificación del género ocurrió durante el Pleistoceno e incluye una radiación reciente en la región magallánica. En esta provincia, las distintas especies morfológicas de *Nacella* muestran niveles extremadamente bajos de divergencia genética con ausencia de monofilia recíproca entre ellas.

En base a las estimaciones de tiempo, el origen y diversificación de *Nacella* en el Océano Austral es más reciente (< 10 Ma) que lo esperado bajo la hipótesis de especiación vicariante por tectónica de placas. La evolución de este género parece estar más relacionada a los cambios climáticos y oceanográficos en el Océano Austral después de la Transición Climática del Mioceno medio. A pesar del alto número de especies descrita para la provincia de Magallanes, los resultados moleculares indican que éstas

pertenecen al linaje más derivado del género. Por lo tanto, la región magallánica no corresponde al centro de origen de *Nacella*, como se había pensado previamente. La ausencia de divergencia genética entre estas especies apoya un proceso de radiación muy reciente acompañado de diversificación morfológica y ecológica.

Análisis comparativos genéticos y morfométricos entre las especies magallánicas del género detectaron diferencias significativas entre *N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica* y *N. mytilina*. Por el contrario, las unidades descritas *N. chilensis*, *N. venosa* y *N. fuegiensis* no mostraron niveles de diferenciación con sus especies parentales putativas.

En un gradiente latitudinal se detectaron menores niveles de diversidad genética en *N. concinna* de Antártica que en *N. magellanica* de la Provincia de Magallanes. En este sentido, el efecto perjudicial de los eventos glaciales e interglaciales pleistocénicos sobre los tamaños efectivos deberían ser mayores en la especie Antártica, como lo sugieren los resultados genéticos. No obstante, los análisis genéticos en *N. clypeator* de la Provincia Peruviense detectaron niveles de diversidad extremadamente bajos. Una posible explicación a este resultado es que la distribución actual de esta especie se encuentra fuera del rango del género y que *N. clypeator* constituye una especie relictiva de una diversificación pliocénica del género al sur del Perú. No obstante, tal grado de variación genética podría ser explicada a través de barrido selectivo, reducciones demográficas drásticas e incluso por bajas tasas de mutación para COI en la especie.

ABSTRACT

The evolution and the historical biogeography of the Southern Ocean marine benthic fauna are closely related to major tectonic and climatic changes that occurred in this region during the last 55 million years (Ma). Several families, genera and even species of marine organisms are shared between distant biogeographic provinces in this region. This pattern of distribution in marine benthic invertebrates has been commonly explained by vicariant speciation due to plate tectonics. However, recent molecular studies have provided new evidence for long-distance dispersion as a plausible explanation of biogeographical patterns in the Southern Ocean.

True limpets of the genus *Nacella* are currently distributed in different biogeographic regions of the Southern Ocean such as Antarctica, Kerguelen Province, southern New Zealand Antipodean Province, and South America. Here, we present phylogenetic reconstructions using three mitochondrial DNA markers (Cytochrome c Oxidase I, Cytochrome b, and 16S) and three nuclear fragments (28S, Actin and the intron EPIC30) to determine into the relationships among *Nacella* species and to estimate the origin and diversification of the genus. Reconstructions were made using three methods, Maximum Parsimony (MP), Maximum Likelihood (ML), and Bayesian Inference (BI), while divergence time among *Nacella* species was estimated following relaxed Bayesian approach and strict molecular clock approaches. For these purposes, we collected intertidal and subtidal species belonging to four biogeographic regions in the Southern Ocean: Antarctica, Kerguelen Province, Central Chile, and Magellanic Province.

Our molecular results agree with previous morphological and molecular studies supporting the monophyly of *Nacella* and its sister relationship with *Cellana*. Three rounds of diversification are recognized in the evolution of *Nacella*. The first one occurred at the end of the Miocene and gave rise to the main lineages, currently distributed in Antarctica, South America and Kerguelen Province. Large genetic divergence was detected among *Nacella* species from these distant biogeographic provinces emphasizing the significance of trans-oceanic discontinuities and suggesting long-distance dispersal was relatively unimportant. The second diversification round include the diversification of *Nacella* in South America between 5 – 2.5 Ma. The last round of diversification of the genus took place during the Pleistocene and include a recent radiation in the Magellanic region. In this province, different morphological species of *Nacella* exhibit extreme low levels of genetic divergence with absence of reciprocal monophyly among them. According to our time estimation, the origin and diversification of *Nacella* in the Southern Ocean is more recent (<10 Ma) than the expected under the hypothesis of vicariant speciation due to plate tectonics. The evolution of this genus seems to be closely related to drastic climatic and oceanographic changes in the Southern Ocean after the middle-Miocene climatic transition. In spite of the high number of species described for the Magellanic Province, molecular results indicate that they belong to the most derived lineage in the evolution of the genus. Therefore, the Magellanic region does not need to correspond to the origin center of *Nacella*, as previously thought. The absence of genetic divergence among these species supports a very recent radiation process accompanied by rapid

morphological and ecological diversification.

Comparative genetic and morphometric analyses between the magellanic species of the genus detected significant differences between *N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica* and *N. mytilina*. On the contrary, the described units *N. chilensis*, *N. venosa* and *N. fuegiensis* did not show any degree of differentiation with their putative parental species.

In a latitudinal gradient we detected lower levels of genetic variation in *N. concinna* from Antarctica than in *N. magellanica* from the Magellan Province. In this regard, the detrimental effects of glacial and interglacial pleistocenic events over the effective numbers should be higher in the Antarctic species, as suggested by our genetic results. Nevertheless, genetic analyses in *N. clypeater*, from the Peruvian Province, detected extremely low levels of diversity. A possible explication for this result is that the current distribution of the species is out of the genus range and *N. clypeater* constitute a relict species belonging to the pliocenic diversification of the genus in southern Peru. Such degrees of genetic variation could also be explain through selective sweep, drastic demographic reductions, or even low mutation rates for COI in the species.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 El Océano Austral

El Océano Austral (OA) es la cuarta de las cinco divisiones oceánicas que abarca un área de ~ 34,800,000 kms², de los cuales el 60% se encuentra cubierto por hielo durante el máximo de invierno (Zwally *et al.*, 2002; Aronson *et al.*, 2007). Esta división incluye distintas masas de agua como la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), los mares Antárticos de Amundsen, Bellinghausen, Ross, Cooperación, Cosmonauta, Escocia y Weddel; así como también parte del Paso de Drake (Knox, 2007; Fig. 1.1). En general, es definido como un cinturón oceánico circumpolar que incluye masas de aguas de los océanos Pacífico, Atlántico e Índico, al sur de los 60° S. En contraste a la clara demarcación que poseen otros océanos del planeta, los límites del OA no incluyen masas continentales sino que zonas de mezcla entre y dentro de los océanos anteriormente mencionados (Orsi *et al.*, 1995; Gille, 2002; Meredith *et al.*, 2004). Existe un claro gradiente meridional en las propiedades superficiales de las aguas que separan al Océano Austral de las aguas más templadas y salinas de la circulación subtropical, límite conocido como el Frente Subtropical. Sin embargo, no existe un límite claro y bien definido entre la CCA y el régimen Subantártico (Orsi *et al.*, 1995).

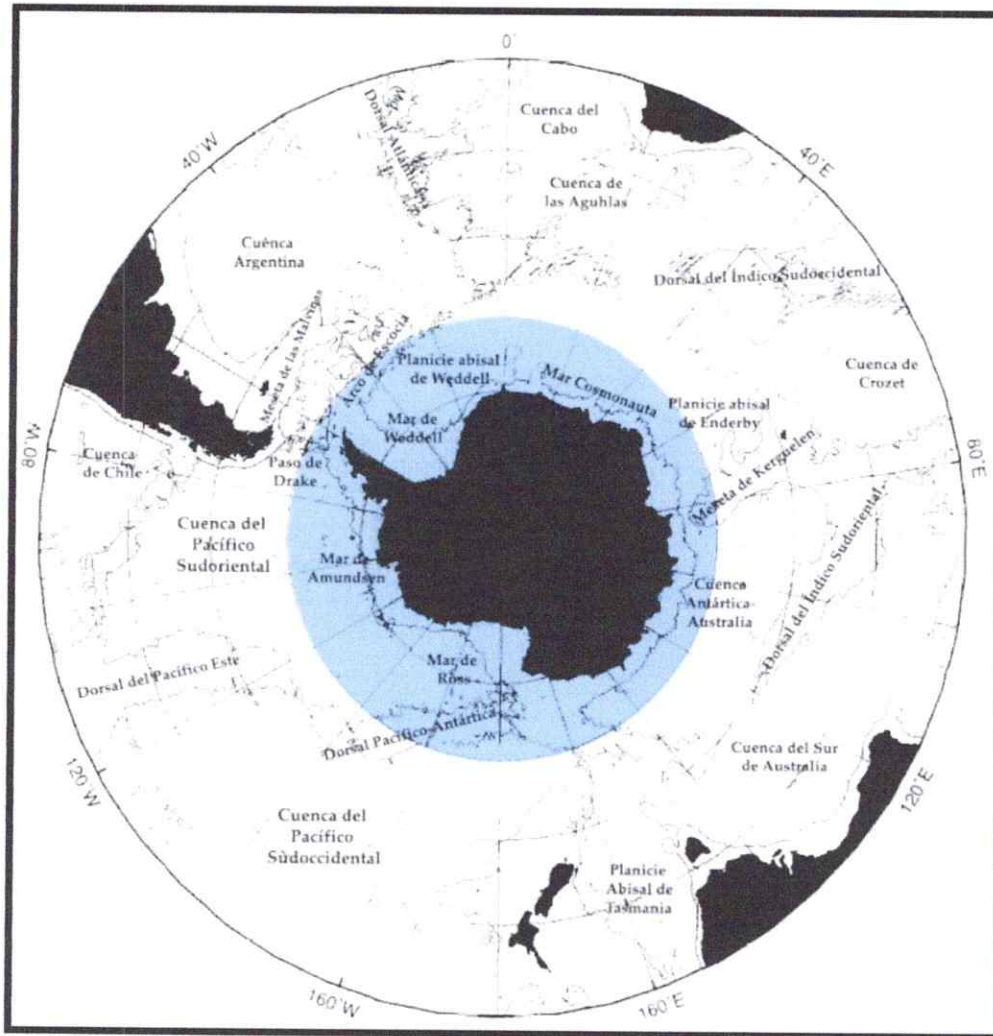


Figura 1.1. Océano Austral (azul) y sus principales características batimétricas; profundidades > 3500 m están sombreadas (tomado y modificado de Orsi *et al.*, 1995).

En general, los biólogos marinos definen al Océano Austral como las masas de agua al interior y al sur del Frente Polar (FP) mientras que los Oceanógrafos lo fijan como el límite más septentrional de la CCA (Barnes *et al.*, 2006). Otros autores sugieren que el límite del OA es la Convergencia Antártica, región que fluctúa estacionalmente donde las aguas frías de la CCA se mezclan con masas

de agua meridionales más templadas (Knox, 2007). El Océano Austral al conectar los océanos Atlántico, Pacífico e Índico influye sobre las características de las masas de agua de profundidad de todo el planeta (Rintoul *et al.*, 2001). Aguas del Atlántico Norte profundas se mueven hacia el Sur por el fondo del Océano Atlántico hasta encontrarse y mezclarse lateralmente con masas de agua de la CCA (Orsi *et al.*, 1995; Hassold *et al.*, 2009). De esta forma, el OA constituye un área de pérdida neta de calor desde el océano hacia la atmósfera generándose un gran intercambio de calor, sal, agua dulce y de otras propiedades (Cunningham *et al.*, 2003; Meredith *et al.*, 2004).

La Corriente Circumpolar Antártica esta delimitada por dos frentes, el Polar y el Subantártico y es la corriente más importante del planeta transportando hasta 134 ± 13 Sv ($1 \text{ Sv} = 10^6 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$), a través del Paso de Drake (Orsi *et al.*, 1995; Rintoul *et al.*, 2001; Barker *et al.*, 2004; Fig. 1.2). Fluye en dirección Oste-Eeste, posee altas velocidades a nivel de los extremos de sus frentes y se hace más lenta (<20 cm/seg.) hacia el interior (Orsi *et al.*, 1995; Pickard & Emery, 1995; Rintoul *et al.*, 2001). Ambos frentes son verticalmente coherentes, alcanzan grandes velocidades hasta el fondo del mar y sus respectivas posiciones tienen grandes implicancias para la ecología de la región ya que actúan como una barrera a la dispersión genética de algunas especies (Shaw *et al.*, 2004), mientras que para otras, constituyen una importante vía de transporte (Beu *et al.*, 1997; Thorpe *et al.*, 2004; Gérard *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2009).

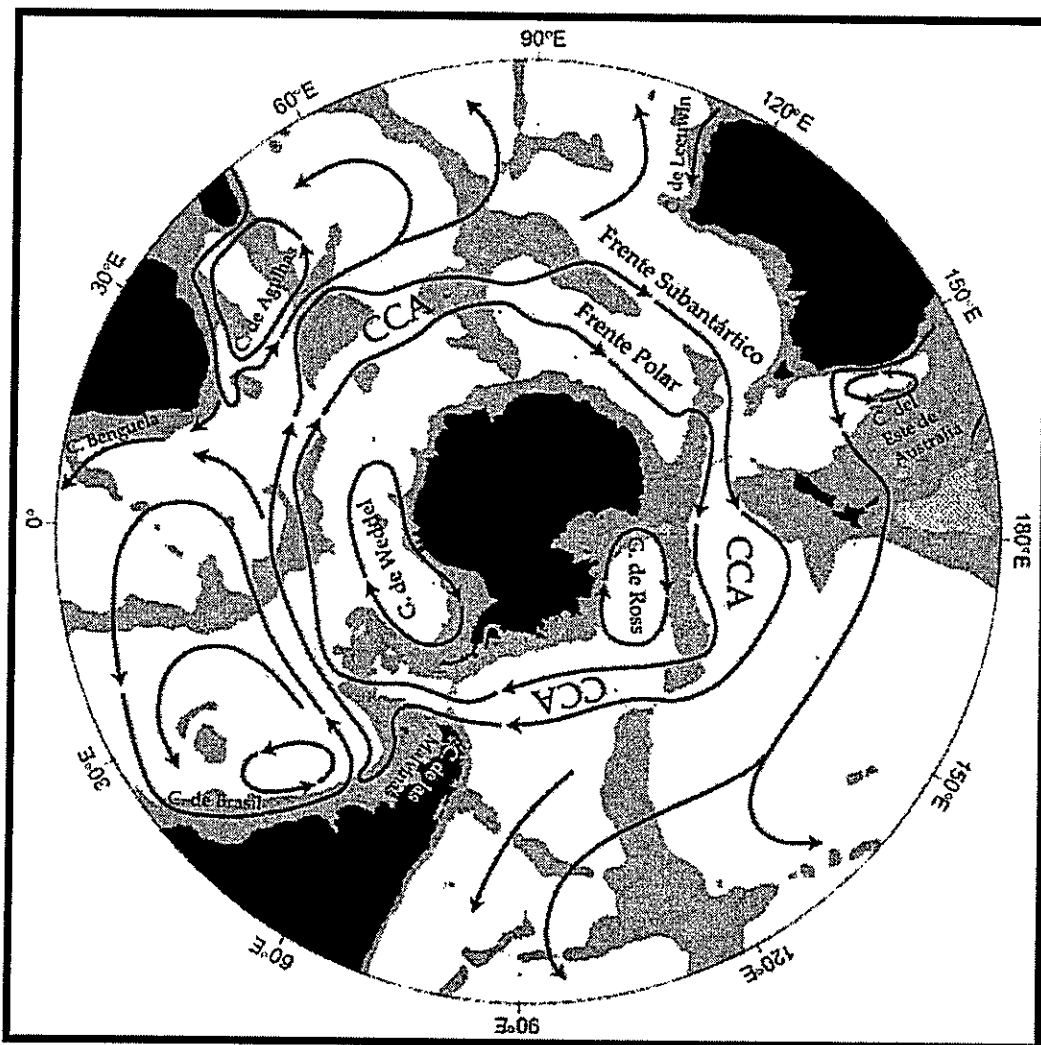


Figura 1.2. Mapa esquemático de las mayores corrientes en el Océano Austral, al Sur de los 20°LS. Profundidades < 3500 m están sombreadas. Se indican los mayores núcleos de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), el Frente Polar y el Frente Subantártico. Abreviaciones: C = Corriente; G = Giro (tomado y modificado de Rintoul *et al.*, 2001).

La dirección de la CCA esta dada principalmente por los Vientos de Deriva del Oeste (*West Wind Drift*) cuyas velocidades promedios varían entre 15 a 24 kts (1 knot = 1.852 km/h), dependiendo de la latitud (Meredith *et al.*, 2004). La temperatura promedio de la CCA varía entre -1 a 5°C según el periodo del año y latitud mientras que la salinidad superficial disminuye a medida que aumenta

la latitud (Orsi *et al.*, 1995; Knox, 2007). Este gradiente de temperatura-salinidad son producto de la combinación de masas de aguas las cuales son mezcladas y redistribuidas por dicha corriente (Smith *et al.*, 2008). La CCA se extiende desde la superficie hasta profundidades de 2000-4000 m y posee un ancho de hasta 2000 kms (Knox, 2007). El origen de la CCA esta estrechamente relacionado con los cambios tectónicos y climáticos ocurridos en la región durante los últimos 200 Ma (Coleman, 1980; Kennet, 1980; Crame, 1999; Lawver & Gahagan, 2003; Fitzgerald, 2002, Barker *et al.*, 2007; Knox, 2007).

1.2 Biogeografía Histórica del Océano Austral

Las características únicas del Océano Austral son el resultado de una larga historia evolutiva y paleo-climática estrechamente relacionada al origen de un sistema de circulación Circum-Antártico generado por grandes cambios en los procesos tectónicos en la región durante el Cenozoico (Knox, 1980; Kennett, 1977, 1980; Craddock, 1982; Fitzgerald, 2002). En el Jurásico temprano (208 - 158 Ma) se inicia la fragmentación del supercontinente Gondwana en dos grandes bloques; el del Este con Antártica, Australia, Madagascar e India, y el del Oeste compuesto por Sudamérica y África (Crame, 1999; Jokat *et al.*, 2003; Torsvik *et al.*, 2008). El centro del supercontinente era Antártica, siendo ésta la única porción que limita con todos los otros fragmentos de Gondwana (Jokat *et al.*, 2003). La información disponible apoya un escenario en el que el inicio de la fragmentación habría ocurrido en el Sur-Oeste del Mar de Weddel, propagándose, en sentido del reloj, alrededor de Antártica desde fines del Jurásico hasta el presente (Jokat *et al.*, 2003; Torsvik *et al.*, 2008). A fines del

Jurásico (157 Ma) comienza la separación de ambos bloques a través de la formación de las cuencas de Somalia y Mozambique, así como también de los mares de Weddell y de Riiser-Larsen (Lawver *et al.*, 1992; Torsvik *et al.*, 2008). Durante el Cretáceo (120 Ma: Fig. 1.3A), el bloque del Este aún se encontraba unido en las latitudes altas del Hemisferio Sur pero a mediados de este período (~ 100 Ma), se extiende la cuenca de Enderby en el Mar de Riiser-Larsen separando Antártica de India, la cual continua su deriva hasta su posición actual al sur de Asia (Jokat *et al.*, 2003). La separación de Antártica y Australia comenzó hace ~125 Ma y entre los 100-90 Ma habría existido separación oceánica incipiente entre ambos continentes (Stickley *et al.*, 2004; Pfühl & McCave, 2005). Hace ~ 105 Ma ocurren cambios tectónicos mayores en la región de Nueva Zelanda y recién a los 84 Ma las mesetas de Campbell y de Nueva Zelanda se separan definitivamente de Antártica (Knox, 2007; Torsvik *et al.*, 2008). Entre 90-70 Ma el golfo que separa Antártica y Australia se extiende pero los puentes de Tasmania y de Tasmania del Sur no permiten una circulación de masas de aguas de profundidad verdadera (Fitzgerald, 2002; Pfühl & McCave, 2005). Paralelamente, durante este periodo, la punta norte de la Península Antártica y el micro-continente de las Orcadas del Sur bloquean la región del Paso de Drake (Eagles & Livermore, 2002). De esta forma, a fines del Cretáceo (75-65 Ma) Antártica aún se encuentra unida de manera incipiente, tanto a Sudamérica como a Australia, no existiendo una circulación completa alrededor del Océano Austral (Crame, 1999; Eagles & Livermore, 2002; Lawver & Gahagan, 2003; Stickley *et al.*, 2004; Pfühl & McCave, 2005; Whittaker *et al.*, 2007; Torsvik *et al.*, 2008: Fig. 1.3B).

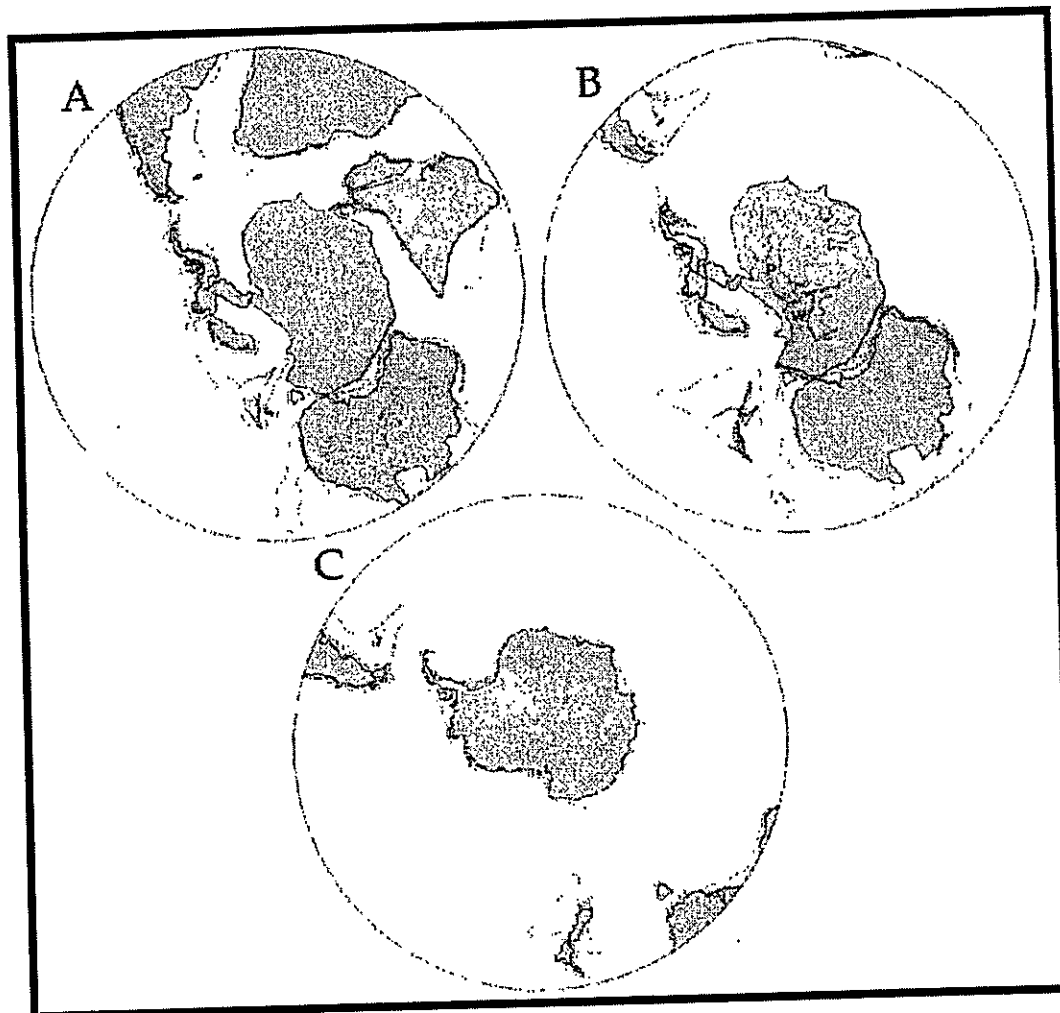


Figura 1.3. Reconstrucción de Gondwana y la actual disposición de los bloques continentales. Las áreas sombreadas muestran la distribución sugerida para las aguas someras. Durante el Cretáceo (A; 120 Ma) el Océano Austral estaba dominado por grandes masas continentales rodeadas al norte por el Mar de Tetis y al Sur por el proto-Pacífico. Los océanos Atlántico e Índico comenzaba abrirse. Al comienzo del Cenozoico (B; 60 Ma) Gondwana se encuentra fragmentada, Sudamérica, África e India se han movido del bloque Antártica/Australia. A fines del Eoceno las mayores cuencas oceánicas (Atlántico, Pacífico e Índico) se encuentran establecidos aunque la separación de Antártica y Australia es menor. C) Disposición actual del Océano Austral. W y P indican la posición de las cuencas de Wilkes y Pensacola (tomado y modificado de Clarke & Crame, 1989).

Durante el Cenozoico (65 - 2.6 Ma) ocurren grandes cambios tectónicos en el Océano Austral relacionados a la apertura de los pasos de Tasmania y Drake, alrededor de Antártica, que permiten las separaciones definitivas de los continentes en el Océano Austral (Crame, 1999; Lawver & Gahagan, 2003; Livermore *et al.*, 2005; Barker *et al.*, 2007). Paleo-reconstrucciones en la región de Australia-Antártica indican que entre 53-50 Ma habría ocurrido una reorganización mayor de ambas placas, responsables de la separación de ambos continentes (Whittaker *et al.*, 2007). La separación definitiva entre ambos continentes habría ocurrido a fines del Oligoceno (~33.5 Ma) a través de la profundización del Mar de Tasmania (Pfühl & McCave, 2005; Torsvik *et al.*, 2008), lo que habría generado grandes cambios en la circulación oceánica (Brown *et al.*, 2006). El paso de Tasmania se habría abierto a circulación somera y de profundidad (> 2000 m) al menos a los 35.5 Ma y 32 Ma, respectivamente (Barker *et al.*, 2007). El evento que completa el aislamiento geográfico de Antártica y de su fauna marina bentónica habría sido su separación definitiva de Sudamérica por la apertura del Paso de Drake y el establecimiento de la CCA (Clarke *et al.*, 2004a; Livermore *et al.*, 2005; Hassold *et al.*, 2009). La fecha exacta de ambos eventos es aun incierta debido a la presencia y al movimiento de pequeñas micro-placas en la región, pero se estima que habría ocurrido entre el Eoceno medio (~ 41 Ma; Livermore *et al.*, 2005) y el Oligoceno tardío (23.9 Ma; Beu *et al.*, 1997; Eagles & Livermore, 2002; Pfühl & McCave, 2005; Scher & Martin, 2006; Barker *et al.*, 2007; Lyle *et al.*, 2007). Barker (2001) y Eagles & Livermore (2002) sugieren una lenta expansión del piso marino en el Paso de Drake y el Arco de Escocia entre los 29,7 Ma y 21.8 Ma. La

apertura de dicho Paso habría permitido la circulación de profundidad hace $\sim 31 \pm 2$ Ma intensificando el proceso de disminución de las temperaturas superficiales del Océano Austral (Clarke & Crame, 1989; 1992; Lawver & Gahagan, 2003; Lyle *et al.*, 2007; Torsvik *et al.*, 2008). Barker *et al.* (2007) sugieren que los tiempos de la profundización del Paso al Sur de Sudamérica son inciertos ya que estimaciones establecidas por tectónica van desde los 34 - 16 Ma mientras que aquellas basadas en parámetros sedimentológicos varían entre los 41 - 6 Ma. Paleo-reconstrucciones basadas en isótopos estables de δO^{18} sugieren que acoplado al establecimiento de la CCA habría ocurrido una re-organización a macro escala de la circulación oceánica lo que habría generado la producción de aguas profundas en el margen del continente Antártico, responsables de la formación del Frente Polar. Paralelamente, al encontrarse gran parte del continente rodeado por aguas profundas se habrían intensificado los procesos de enfriamiento del continente, lo que coincide con el primer enfriamiento global significativo del Cenozoico (Zachos *et al.*, 2001).

Paralelo, y en muchos casos asociado a los cambios tectónicos de los últimos 100 Ma, ocurrieron en la región grandes cambios climáticos (Zachos *et al.*, 2001). De acuerdo a Frakes y Kemp (1972), durante el Eoceno (55.8 - 33.9 Ma) se habrían extendido grandes giros oceánicos desde el Ecuador hacía latitudes altas transportando aguas templadas hasta la costa Antártica. De esta forma, las condiciones oceanográficas y climáticas de la región habrían diferido considerablemente de lo que actualmente se observa. Durante el límite Eoceno-Oligoceno (39 Ma) ocurren cambios regionales mayores que transforman el

clima global cálido en un régimen más moderado, similar al que actualmente se observa en la región (Knox, 2007). La disminución de las temperaturas y el establecimiento de la capas de hielo permanente sobre Antártica habría sido paulatino cubriéndose primero el Este (~ 10 Ma) y posteriormente la totalidad del continente (~5.3 Ma; Zachos *et al.*, 2001; Fig. 1.4).

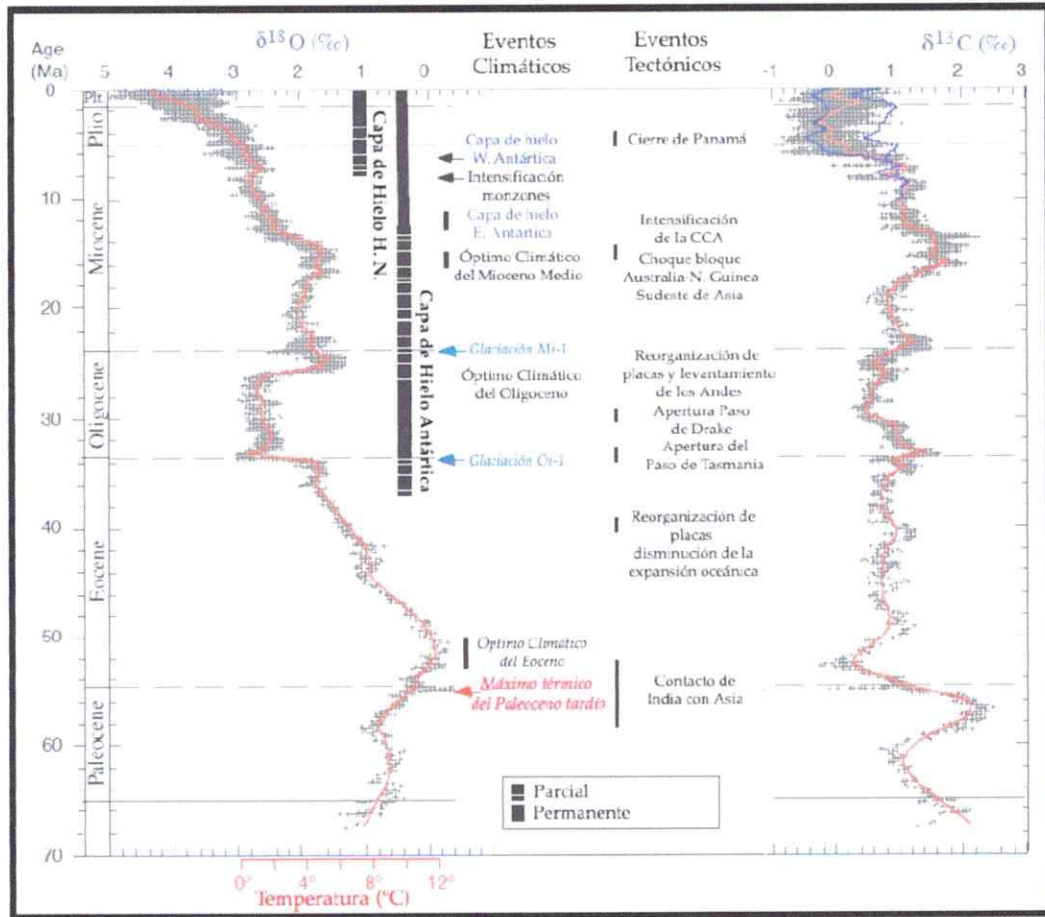


Figura 1.4. Registros de isótopos de carbono y oxígeno de profundidad basados en datos compilados de más de 40 DSDP y ODP. Las curvas derivadas de isótopos de carbono después del Mioceno medio se muestran en azul (Atlántico) y rojo (Pacífico). Las barras verticales entregan representaciones cualitativas crudas del volumen de hielo en cada continente en relación al último máximo glacial. Se indican algunos eventos climáticos, tectónicos y oceanográficos (tomado y modificado de Zachos *et al.*, 2001).

El mecanismo y los tiempos de origen de la Corriente Circumpolar Antártica se encuentran relativamente bien establecidos. No obstante, el momento preciso en qué dicha corriente pasa a constituir una barrera efectiva para el flujo genético entre la fauna marina bentónica Antártica y Subantártica es aún incierto. Se cree que grandes eventos tectónicos durante el Mioceno podrían haber influido sobre la dinámica e intensidad de las corrientes asociadas a la CCA. De acuerdo a Lee & Lawver (1995), la colisión entre el bloque Australia-Nueva Guinea con el Sudeste de Asia hace ~ 15 Ma habría generado una disminución considerable del transporte ecuatorial entre los océanos Pacífico e Índico. Dicho proceso habría generado un cambio de las corrientes en dirección Sur a lo largo del margen Este de Australia y hacía el Norte a lo largo del margen Este de Asia, lo que podría haber generado una intensificación en el transporte y fuerza de la CCA (Lee & Lawver, 1995; Torsvik *et al.*, 2008). Crame (1999) sugiere que durante el Mioceno tardío (12 - 10 Ma) habría ocurrido un intenso patrón de zonación térmica vertical y horizontal en los océanos que podría ser responsable de una intensificación de la CCA y de la diferenciación entre las faunas de las regiones en el Océano Austral. Durante este periodo, conocido como la Transición Climática del Mioceno Medio, MMCT (*Middle Miocene Climatic Transition*), hay una marcada intensificación en los valores de δO^{18} bentónico asociados a enfriamiento polar, crecimiento de la capa de hielo del Este de Antártica, disminución global del nivel del mar y mayores cambios climáticos a nivel de la circulación oceánica (Woodruff & Savin, 1989; Flower & Kennet, 1994; Lawver & Gahagan, 2003; Mackensen, 2004; Barker *et al.*, 2007). Lewis *et al.* (2008) basándose en análisis de depositación de cenizas,

modelamientos glaciológicos, e isótopos de $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ sugieren una marcada disminución de temperaturas en Antártica (al menos 8°C entre $14.07 \pm 0.05\text{ Ma}$ y $13.85 \pm 0.03\text{ Ma}$), apoyando la hipótesis de cambios climáticos mayores en el Océano Austral durante el Mioceno medio. Recientemente, Verducci *et al.* (2009), basándose en el registro de foraminíferos fósiles planctónicos de la meseta de Kerguelén sugieren la existencia de marcados cambios climáticos e hidrográficos en la región durante este período. Dichos cambios, identificados como períodos de drástica disminución de las temperaturas ($13.8 - 12.1\text{ Ma}$) habrían generado cambios en la abundancia, riqueza y composición de foraminíferos, los que muestran diferentes afinidades paleoclimáticas. De esta forma, la intensificación de la CCA durante la Transición de Mioceno Medio se ve apoyada por varios estudios utilizando distintas fuentes de datos como: i) un incremento en la fuerza de los vientos de deriva del Oeste que son el motor principal de la CCA, ii) aumento en el gradiente meridional de temperatura, iii) cambios en la circulación atmosférica, señales de $\delta^{18}\text{O}$ y de las temperaturas superficiales marinas y iv) cambios faunísticos e isotópicos detectados en la meseta de Kerguelén (Flower & Kennett, 1994; Shevenell *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2008; Verducci *et al.*, 2009).

A modo de resumen, Mackensen (2004) reconoce tres grandes periodos de cambios oceanográficos y climáticos en el Océano Austral que habrían tenido influencia sobre su fauna marina bentónica asociada: i) el límite Eoceno-Oligoceno ($\sim 34\text{ Ma}$) cuando la CCA modifica significativamente la circulación oceánica global y especialmente en la región; ii) el Mioceno medio $\sim 14\text{ Ma}$ cuando la reinstalación de una capa de hielo permanente sobre el Este de

Antártica habría afectado el nivel y modo de la formación de aguas profundas, generando una intensificación de la CCA; 3) el Pleistoceno tardío caracterizado por la alternancia entre periodos glaciales e interglaciales afectando la estacionalidad e intensidad de la formación de hielo oceánico.

1.3 Origen de la fauna marina bentónica en el Océano Austral

Los marcados cambios tectónicos y climáticos que permitieron la formación de una extensa circulación de profundidad en el Océano Austral jugaron un rol importante en los sucesivos ciclos de enfriamiento y glaciación de Antártica. Dichos eventos serían claves en la evolución de muchos taxa marinos en la región (Clarke & Crame, 1989; Brey *et al.*, 1994; Brandt *et al.*, 1999; 2005; Clarke & Johnston, 2003; Clarke *et al.*, 2004a, 2008; Gutt *et al.*, 2004; Barnes & Conlan, 2007; Convey & Stevens, 2007). Actualmente, el continente Antártico constituye uno de los ecosistemas más aislados del planeta producto de tres barreras (geográfica, batimétrica y oceanográfica), instaladas hace millones de años (Crame, 1999; Aronson & Blake, 2001; Clarke *et al.*, 2005; Thatje *et al.*, 2005; Aronson *et al.*, 2007). El origen y la diversificación de su actual fauna marina bentónica serían el resultado de fuerzas macro-evolutivas operantes en la región como los cambios tectónicos y climáticos desde el Mesozoico (Clarke & Crame, 1989; Brey & Clarke, 1993; Brey *et al.*, 1994; Crame, 1999; Brandt, 2005; Barnes & Conlan, 2007; Brandt *et al.*, 2007; Clarke, 2008). Dichos cambios tuvieron profundas repercusiones sobre la fauna del Océano Austral provocando la extinción de casi la totalidad de la macro fauna y flora sobre Antártica (Clarke & Crame, 1989; Crame, 1999; Aronson & Blake, 2001; Clarke & Johnston, 2003;

Gutt *et al.*, 2004). No obstante, estudios recientes basados en datos biológicos y geológicos sugieren una historia distinta sobre la superficie del continente Antártico en el que muchos elementos de la biota terrestre Antártica ha estado aislada *in situ* por escalas de tiempo de millones de años, e incluso previo a la fragmentación de Gondwana (Convey *et al.*, 2008). Tales descubrimientos sugieren una biogeografía terrestre altamente regionalizada y evolutivamente aislada sobre el continente antártico. Este escenario sobre la superficie del continente contrasta con la gran diversidad y abundancia de la fauna marina bentónica asociada a su estrecha plataforma continental (Brey & Clarke, 1993 Brey *et al.*, 1994; Crame, 1999; Clarke & Johnston, 2003; Gutt *et al.*, 2003, 2004; Clarke *et al.*, 2004 a, 2008; Brandt, 2005; Convey & Stevens, 2007; Aronson *et al.*, 2007). La plataforma Antártica es inusualmente profunda debido a la presión isostática impuesta por las grandes masas de hielo continental y por el desprendimiento de hielo durante las extensiones de las capa de hielo glaciales (Huybrechts, 2002). En otras partes del planeta, las plataformas continentales son extensas y poseen entre 100-200 m de profundidad. Los márgenes de la plataforma alrededor de Antártica son más angostos y tienen en promedio 450 m de profundidad (Aronson *et al.*, 2007).

Muchos taxa que en otros océanos son diversos y abundantes se encuentran escasamente representados o ausentes en el Océano Austral; ejemplos incluyen gastrópodos, bivalvos, crustáceos decápodos y teleósteos. Sin embargo, otros grupos de invertebrados como esponjas, briozoos, equinodermos, poliquetos, ascidias, pignogónidos, anfípodos e isópodos son abundantes y diversos por lo que los cambios en la región climáticos no han impedido su éxito evolutivo

(Clarke & Crame, 1989; Clarke & Johnston, 1996, 2003; Aronson & Blake, 2001; Gray, 2001; Clarke *et al.*, 2004 a). El número de especies descritas para el bentos del Océano Austral es de ~4100 especies (Clarke & Johnston, 2003). Sin embargo, Gutt *et al.* (2004) utilizando distintos métodos de extrapolación estimaron que la riqueza de la macrofauna en el Océano Austral podría alcanzar las 17,000 especies, lo que implica que la mayor parte de la fauna aún no ha sido descrita (Brandt *et al.*, 2007). La exploración de nuevas áreas del Océano Austral en las últimas décadas, acoplado a un énfasis en la taxonomía primaria y al uso de técnicas moleculares ha resultado en la descripción de muchos nuevos taxa, especialmente en moluscos, equinodermos, anfípodos, poliquetos, esponjas, entre otros (Clarke & Johnston, 2003; Linse *et al.*, 2006; Brandt *et al.*, 2007; Clarke *et al.*, 2007; Clarke, 2008). De esta forma, la diversidad total de la fauna marina bentónica en el Océano Austral, especialmente la de Antártica, es comparable a la de algunas regiones tropicales (Clarke & Johnston, 2003; Griffiths *et al.*, 2009).

A pesar de que la historia tectónica, climática y oceanográfica del Océano Austral debería haber obstaculizado el contacto entre la fauna marina bentónica antártica y la de los continentes aledaños, muchas familias, géneros e incluso especies son compartidos entre provincias, especialmente entre Antártica y Sudamérica (Arntz & Ríos, 1999; Brandt *et al.*, 1999; Gutt *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2004 a, 2007; Thatje *et al.*, 2005 a, b; Zelaya, 2005). Grupos como crustáceos (i.e. *Euphausia*, *Glyptonotus*; Patarnello *et al.*, 1996; Bargelloni *et al.*, 2000 a; isópodos de la familia Serolidae; Held *et al.*, 2000), equinodermos (i.e. *Sterechinus*, *Abatus*, *Odontaster*; Lee *et al.*, 2004; David *et al.*, 2005), peces (i.e. *Nothothenidae*, *Liparidae*; Clarke & Johnston, 1996; Eastman, 2000; Eastman & McCune, 2000; Bargelloni *et*

al., 2000 a, b), bivalvos (i.e. *Yoldia*, *Limatula*, *Thracia*; Brandt *et al.*, 1999; Page & Linse, 2002), y gastrópodos (i.e. *Omalogyra*, *Nacella*; Powell, 1973; Brandt *et al.*, 1999; Linse, 1999; Linse *et al.*, 2006), entre otros, se distribuyen en distintas provincias del Océano Austral. Brandt *et al.* (1999) en una comparación zoogeográfica de la fauna bentónica Antártica-Magallánica indica que los gastrópodos magallánicos muestran altas similitudes con grupos de las Islas Malvinas y de la Isla Georgia del Sur (31 – 37%), mientras que los bivalvos se asemejan más a las especies antárticas (29%). Al menos un 10% de las especies de isópodos antárticos son compartidos con la provincia Magallánica. En un estudio sobre la biodiversidad y biogeografía de distintas familias y géneros moluscos en el Océano Austral, Linse *et al.* (2006) reconocen tres provincias en función de sus patrones de distribución y centros de radiación. Estas serían: (1) la provincia continental de Antártica, que no incluye la Península Antártica, (2) la Provincia del Mar de Escocia y Península Antártica, (3) la provincia Subantártica que compromete las islas y las áreas aledañas a la Corriente Circumpolar Antártica.

Distribuciones de este tipo, disjuntas y trans-oceánicas, han sido explicadas principalmente a través de dos mecanismos: *i) especiación vicariante por eventos tectónicos* como es la separación de continentes o *ii) por dispersión a gran escala* mediada por larvas o por "rafting" (Clarke *et al.*, 1992; Helmuth *et al.*, 1994; Beu *et al.*, 1997; Waters *et al.*, 2007). La conexión Antártica-Subantártica se ha explicado históricamente mediante el mecanismo de especiación vicariante por tectónica de placas y representaría el último contacto entre ambos continentes durante el Oligoceno (Clarke & Crame, 1989; Brandt *et al.*, 1999; Crame, 1999;

Lee *et al.*, 2004; Arntz, 2005; Arntz *et al.*, 2005, 2006; Aronson *et al.*, 2007). Posteriormente, las faunas de Antártica y del Sur de Sudamérica se habrían adaptado a condiciones más frías generando linajes evolutivos endémicos (Johnston & Clarke, 1990; Clarke & Johnston, 1996; 2003; Chen *et al.*, 1997, 2008; Barnes & Conlan, 2007). Estudios filogenéticos en grupos ancestrales muestran que poseen una historia evolutiva que precede a la fragmentación de Gondwana (Brandt *et al.*, 1999). Así, grupos como *Euphausia* (Patarnello *et al.*, 1996), *Affrolittorina* y *Austrolittorina* (Williams *et al.*, 2003; Waters *et al.*, 2007) muestran altos niveles de divergencia genética entre provincias del Océano Austral, apoyando la hipótesis vicariante por tectónica de placas.

No obstante, estudios moleculares recientes en otros taxa sugieren tiempos de divergencia más reciente que lo esperado bajo la especiación vicariante y entregan evidencia a procesos más recientes mediados por dispersión a gran escala, seguidos de eventos de diversificación (O' Foighil *et al.*, 1999; Coyer *et al.*, 2001; Page & Linse, 2002; Donald *et al.*, 2005 a, b; Burridge *et al.*, 2006; Waters, 2007; Gérard *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2009). Estudios realizados en grupos marinos subantárticos como *Mytilus* (Gérard *et al.*, 2008), *Macrocystis* (Coyer *et al.*, 2001) y *Durvillea* (Fraser *et al.*, 2009) han demostrado una estrecha conexión entre las provincias Magallánica y Kerguelén. Por lo tanto, la biogeografía de muchos grupos marinos en el Océano Austral, especialmente en aquellos con alta capacidad de dispersión, sería el resultado de eventos recientes de expansión mediados por los Vientos de Deriva del Oeste y la Corriente Circumpolar Antártica (Waters, 2007).

1.4 Orden Patellogastropoda

Los miembros del orden Patellogastropoda, también conocidos como lapas verdaderas, son reconocidos a través de análisis cladísticos y moleculares como uno de los grupos basales en la evolución de los moluscos Gastrópodos (Golikov & Starobogatov, 1975; Haszprunar, 1988; Harasewych & McArthur, 2000; Ponder & Lindberg, 1997; Lindberg, 1998; Ridgway *et al.*, 1998; Sasaki, 1998; Koufopanou *et al.*, 1999; McArthur & Harasewych, 2003; Nakano & Ozawa, 2007; Lindberg, 2008). Los estudios sistemáticos en el grupo se han basado principalmente en características externas como la morfología de la concha y de la rádula, presencia-ausencia y variaciones de caracteres externos considerados como diagnósticos. Caracteres como la morfología de la rádula (Thiele, 1929; Powell, 1973; Katsuno & Sasaki, 2008), la coloración del músculo pedal y de los tentáculos paliales (Bowman, 1981; Espoz *et al.*, 2004; Valdovinos & Rüth, 2005), coloración de los huevos y la ultra-estructura espermática (Hodgson *et al.*, 1996), han demostrado ser buenos candidatos para la discriminación de géneros y especies dentro del orden. No obstante, el alto grado de variabilidad y de homoplasia en muchas de estas características han generado graves confusiones taxonómicas (Powell, 1973; Ridgway *et al.*, 1998; Sasaki, 1998; Lindberg, 2008). Paralelamente, la simplicidad morfológica y anatómica del grupo ha hecho que exista una tendencia a subestimar su diversidad (Lindberg, 2008). Thiele (1929) incluyó al orden dentro del suborden Archeogastropoda pero Golikov & Starobogatov (1975) los adjunta al orden Docoglossa en la subclase Cyclobranchia. Posteriormente, Lindberg (1998), en una revisión del grupo los incluye en el orden Patellogastropoda, clasificación

que se ha mantenido hasta el presente y que sido corroborada por diferentes estudios cladísticos y moleculares (Ponder & Lindberg, 1997, Ridgway *et al.*, 1998; Koufopanou *et al.*, 1999; Harasewych & McArthur, 2000; McArthur & Harasewych, 2003; Nakano & Ozawa, 2004, 2005, 2007; Lindberg, 2008). La monofilia de los patelogastrópodos es apoyada por sinapomorfias de la geometría y de la microestructura de la concha, las estructuras que conforman la rádula, el pericardio, las branquias; y a nivel de los sistemas digestivo y excretor (Lindberg, 1998; Ridgway *et al.*, 1998; Fuchigami & Sasaki, 2005; Lindberg, 2008). Lindberg (1998) en su revisión dentro de los patelogastrópodos propuso dos nuevos subórdenes, Patellina y Nacellina. La primera incluye a los miembros de la familia Patellidae mientras que Nacellina incluiría las familias Nacellidae, Lottidae, Acmaeidae y Lepetidae y su definición sería en base a caracteres cromosómicos y morfológicos. Estudios moleculares recientes dividen a Patellogastropoda en tres grandes grupos: Patellina, Acmaeina y Lottidae. Patellina incluye a las familias Patellidae (i.e. *Patella*, *Scutellastra*, *Helcion*) y Nacellidae (*Cellana* y *Nacella*). Acmaeina se encuentra representada por las familias Lepetidae (i.e. *Lepeta*, *Cryptobranchia*, *Iothia*), Pectinodontidae (i.e. *Pectinodonta*, *Serratodonta*) y Acmaeidae (*Acmaea*); mientras que Lottidae incluye a Patellodinae (*Patelloida*) y Lottinae (i.e. *Lottia*, *Scurria*). La aplicación de técnicas moleculares ha permitido una mejor capacidad de resolución a nivel de las relaciones evolutivas dentro del orden (Koufopanou *et al.*, 1999; McArthur & Harasewych, 2003; Nakano & Ozawa, 2004, 2007). En una reciente revisión de los patelogastrópodos utilizando distintos marcadores moleculares mitocondriales (mtDNA) y nucleares (nucDNA), Nakano & Ozawa (2007)

reconocen siete familias en el orden: Lottidae, Acmaeidae, Pectinodontidae, Patellidae, Lepetidae, Eoacmeidae y Nacellidae.

En general, los miembros del orden son invertebrados comunes y abundantes de los sistemas litorales marinos rocosos desde los trópicos hasta los polos (Powell, 1973; Picken, 1980; Branch *et al.*, 1985 a, b; Lindberg, 2008). Han sido objeto de variados estudios ya que poseen características que los hacen atractivos desde un punto de vista ecológico, reproductivo, fisiológico, conductual y evolutivo (Branch *et al.*, 1985 b). Sus tamaños y formas hacen fácil su reconocimiento y recolección, muestran alta especialización de nicho, plasticidad fenotípica, abundancia relativa y diversidad (Branch *et al.*, 1985 a; Lindberg, 1998, 2008). En Chile, son habitantes comunes y abundantes de los ecosistemas rocosos a lo largo de la costa (Espoz & Castilla, 2000; Espoz *et al.*, 2004; Valdovinos & Rùth, 2005). A pesar de esto, el grado de atención que se le ha dado al grupo es relativamente bajo y la mayoría de los estudios a nivel nacional se han centrado en aspectos ecológicos (Muñoz & Santelices, 1989; Espoz *et al.*, 1995; Ríos & Mutschke, 1999; Espoz & Castilla, 2000; Ríos *et al.*, 2003) y taxonómicos (Espoz *et al.*, 2004; Valdovinos & Rùth, 2005). Estudios moleculares recientes han considerado aspectos sobre la evolución y sistemática de algunos grupos (Espoz *et al.*, 2004; de Aranzamendi *et al.*, 2008, 2009).

1.5 Antecedentes generales de la Familia Nacellidae

Como se mencionó anteriormente, la familia Nacellidae junto a Patellidae conforman uno de los mayores grupos de patelogastrópodos, Patellina (Nakano & Ozawa, 2007). Las principales características que los diferencian de otras lapas es la ausencia de ctenidio, el cual es remplazado por un cordón branquial y la morfología y configuración de los dientes de la rádula (Powell, 1973; Lindberg, 1998). La principal diferencia entre Nacellidae y Patellidae está dada a nivel de la longitud de su rádula, la cual es corta y plegada en Patellidae, mientras que en Nacellidae es extremadamente larga y enrollada en espirales de varias vueltas (Powell, 1973).

La familia Nacellidae esta compuesta por los géneros *Nacella* y *Cellana* los cuales tienen distribuciones en distintas regiones del planeta (Powell, 1973; Fig. 1.5). Actualmente, *Cellana* esta restringido principalmente al Indo-Pacífico tropical-subtropical, aunque algunas especies extienden su distribución a regiones más australes como el sur de Australia e islas subantárticas en la Provincia Antipodeana, al Sur de Nueva Zelanda. Las especies del género *Nacella* se distribuyen principalmente en ecosistemas rocosos antártico y subantártico, a excepción de una especie que extiende su rango a la Provincia Peruana (Powell, 1973; Valdovinos & Rüth, 2005).

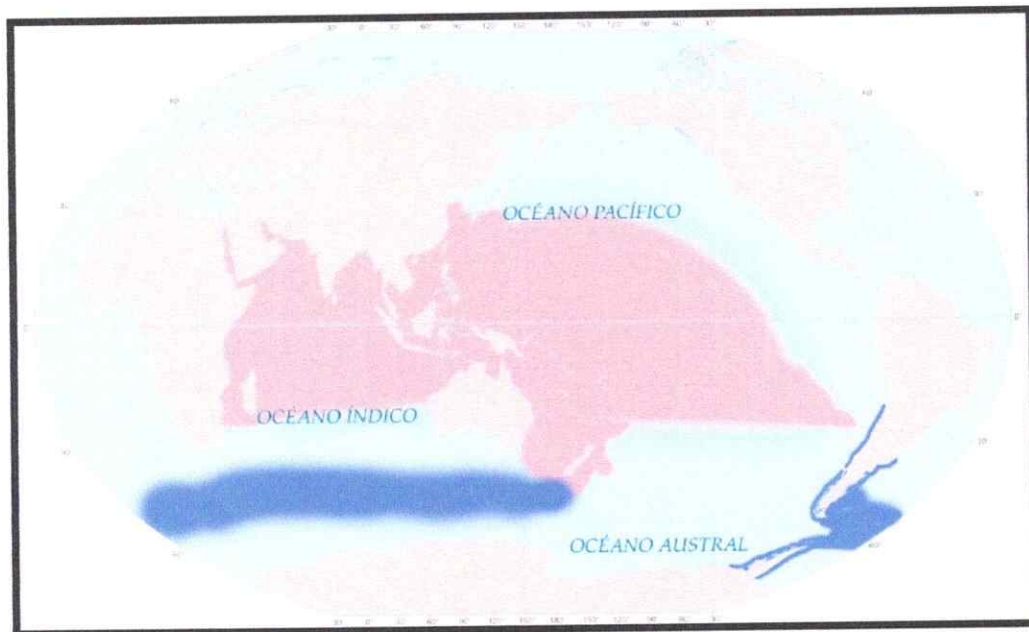


Figura 1.5. Distribución de Nacellidae en los Océanos del Mundo. En ● distribución del género *Cellana* en el Indo Pacífico y Nueva Zelanda; y ● distribución de *Nacella* en el Océano Austral y en la Provincia Peruana.

Actualmente, el género *Cellana* incluye más de 50 especies distribuidas principalmente en regiones tropicales y subtropicales (Powell, 1973; Lindberg, 1998; Goldstien *et al.*, 2006 a; Bird *et al.*, 2007). Su distribución abarca la Provincia de Natal Sudáfrica, el Golfo Pérsico y el Mar de Arabia desde donde se expande a lo largo de la costa asiática hasta el norte de Japón y al Sur de Australia y Nueva Zelanda (Powell, 1973). Otras especies del género se distribuyen en islas oceánicas del Pacífico como Hawaii, Kermadec, Marquesas, Fidji, Sociedad, hasta Juan Fernández, que representa el límite oriental de la distribución del género. Como se mencionó anteriormente, la distribución más austral del género corresponde a Isla Campbell (52°32' S; 169° 8' E) al sur de Nueva Zelanda, donde la especie *Cellana strigilis strigilis* coexiste en simpatría con la especie del género hermano *Nacella terroris* (Powell, 1973; Fig. 1.5). El género *Nacella* incluye

un número menor de especies, con sólo 15 unidades descritas que poseen distribución en distintas Provincias biogeográficas del Océano Austral (Hedpeth, 1969; Powell, 1973). Entre las especies del género, *N. clypeater* es la única que extiende su distribución hacía la Provincia Peruana, fuera del rango del género en regiones antárticas y subantárticas. Esta especie se distribuye en la costa Centro-Norte de Chile hasta el Sur del Perú probablemente mediada por la Corriente de Humboldt (Powell, 1973; Alamo & Valdivieso, 1997; Lancellotti & Vásquez, 2000).

Estudios moleculares sugieren que el origen de la familia se remontaría al Cretáceo en el Hemisferio Sur. A esto, le habría seguido una radiación de *Nacella* en el bloque Este de Gondwana (Antártica y Sudamérica) y de *Cellana* en Antártica, Sudamérica, Nueva Zelanda y el Indo-Pacífico (Nakano & Ozawa, 2007). El registro fósil en nacélidos es bastante escaso dado al ambiente de alta energía en el que habitan estos organismos, lo que dificulta su fosilización (Lindberg, 2008). El fósil más antiguo registrado para la familia es *Cellana ampla* proveniente de Eoceno superior (~ 38 Ma) de Oregón, USA (Lindberg & Hickman, 1986).

1.6. *Nacella* en el Océano Austral

En base a estudios cladísticos el género *Nacella* se divide en dos subgéneros, (i) *Nacella* (*Nacella*) con las especies *N. mytilina* y *N. kerguelenensis* como únicos representantes y ii) el subgénero *Nacella* (*Patinigera*) que incluye a las restantes 13 especies (Powell, 1973; Valdovinos & Rütth, 2005). Las principales diferencias entre ambos subgéneros están dadas a nivel de las características externas de la

concha. Los miembros del subgénero *Nacella* poseen conchas relativamente pequeñas, alargadas, típicamente elípticas y arqueadas. El apex se encuentra curvado hacia abajo, casi al extremo anterior del animal (Fig. 1.6A). La superficie de la concha es suave, débilmente radiada concéntricamente y su coloración varía de verde oliva a café, el apex es color cobre y el interior de la concha va de plateado a café iridiscente (Powell, 1973). Las especies viven sobre macroalgas y su rango va desde el Sur de Chile y Argentina hasta Isla Kerguelén al Sur del Océano Índico. Por otro lado los miembros del género *Patinigera* poseen conchas más sólidas y el apex se encuentra en posición subcentral. El interior de las conchas poseen un típico lustre bronce (Fig. 1.6B). Posee una distribución más extensa que la de su subgénero hermano abarcando distintas provincias del Océano Austral (Powell, 1973).

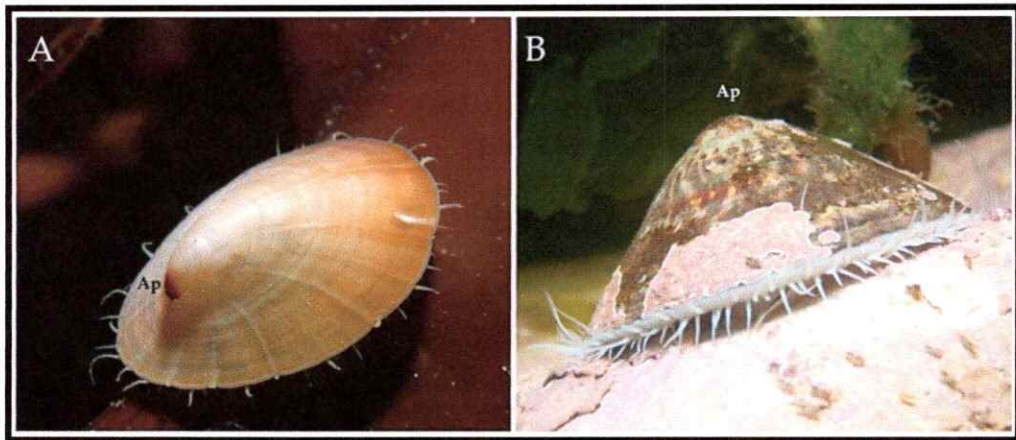


Figura 1.6. Ejemplares de los subgéneros *Nacella* y *Patinigera* y las principales diferencias a nivel de la morfología externa de la concha, coloración, y posición del apex (Ap). A) *Nacella* (*Nacella*) *mytilina* sobre frondas de *Macrocystis pyrifera*; B) *Nacella* (*Patinigera*) *magellanica*.

Los miembros del género *Nacella* se diferencian de los restantes patelogastrópodos por la presencia de un pliegue epipodial, un cordón branquial lamelado con bordes semicirculares interrumpido en la región cefálica (Powell, 1973). El registro fósil más antiguo de *Nacella* correspondería a *N. reichae* del Oligoceno tardío de Perú y *N. nielseni* del Mioceno temprano del Sur de Chile (DeVries, 2009). Existen registros pliocénicos de *N. concinna* provenientes de Isla Cockburn, Península Antártica (Jonkers & Kelley, 1998) y *Nacella aff. terroris* provenientes de Isla de Chiloé (Watters & Flemming, 1972). En Patagonia Argentina el registro fósil de *Nacella* incluye sólo especímenes pleistocénicos y holocénicos provenientes de distintas localidades e identificados como *N. deaurata*, *N. delicatissima* y *N. magellanica* (Gordillo, 1999, 2009; Aguirre, 2003; Gordillo *et al.*, 2005; Aguirre *et al.*, 2006, 2009; Cárdenas & Gordillo, 2009). Recientemente, DeVries (2009), describe cinco nuevas especies de *Nacella* de latitudes tropicales de Perú, las que se asocian morfológica y geográficamente a la actual especie *N. clypeater* de la Provincia Peruana. De acuerdo DeVries (2009), estos resultados demuestran que el rango ecológico de *Nacella* en algún momento se encontró sobrepuesto con el rango de su género hermano *Cellana*. Paralelamente, el descubrimiento de estos fósiles sugiere un origen de *Nacella* en latitudes menores que su actual rango de distribución (DeVries, 2009).

En base a las especies estudiadas, y al conocimiento que se tiene de otros patelogastrópodos, se asume que las especies de nacélidos poseen fertilización externa seguida de una fase larval de vida libre de tiempo variable. A modo de ejemplo, especies de *Cellana* de Nueva Zelanda, poseen periodos larvales cortos

entre 3 a 11 días. En esta región, los tiempos de desove son variables entre especies, *C. ornata* lo hace a fines del verano, *C. flava* durante el bloom fitoplanctónico de primavera y *C. radians* muestra múltiples eventos a lo largo del año (Goldstien *et al.*, 2007 b). Estudios en especies de *Cellana* de Hawai (*C. exarata*, *C. sandwichensis*, *C. talcosa*) sugieren que la fase larval de vida libre no excedería los cuatro días (Bird *et al.*, 2007). Este corto periodo de dispersión, junto con la escasa vagilidad de los adultos sugiere bajos niveles de intercambio continental y alto endemismo para la familia (Goldstien *et al.*, 2006 a). En general, los organismos antárticos y subantárticos poseen maduración retrasada, ciclos gametogénicos y embrionarios lentos, menor fecundidad y extensión de los periodos larvales (Pearse *et al.*, 1991), por lo que se esperaría que el desarrollo en *Nacella*, fuese más lento que en *Cellana* (Clarke, 1988; Bowden *et al.*, 2005, 2006, 2009; Peck *et al.*, 2006). La lapa antártica *Nacella concinna* posee un singular comportamiento reproductivo donde varios individuos (hasta 12) se apilan unos sobre otros entre 7 a 10-días durante el bloom fitoplanctónico entre los meses de noviembre y diciembre (Picken, 1980; Stanwell-Smith & Clarke, 1998). La fecundación es seguida por estadios larvales de trocófora y véliger, de tiempos desconocidos pero el reclutamiento de juveniles ocurre desde fines de enero hasta marzo por lo que el ciclo larval de la especie debería durar entre 1 – 2 meses (Bowden *et al.*, 2006, 2009). La especie subantártica *N. deaurata* muestra variación en su ciclo reproductivo con la existencia de un desoves graduales (enero-julio) y masivos (octubre; Morriconi, 1999). De acuerdo a los autores, estas variaciones podrían indicar plasticidad en la respuesta reproductiva en respuesta a factores ambientales.

La distribución actual de las especies de *Nacella* permite separarlas en distintas regiones dentro del Océano Austral (Hedgpeth, 1969). Así, *Nacella* puede ser dividido en linajes pertenecientes a Antártica, Chile Centro-Norte, Kerguelén, Provincia Antipodeana y la Provincia Magallánica (González-Wevar *et al.*, 2010; Figura 1.7).

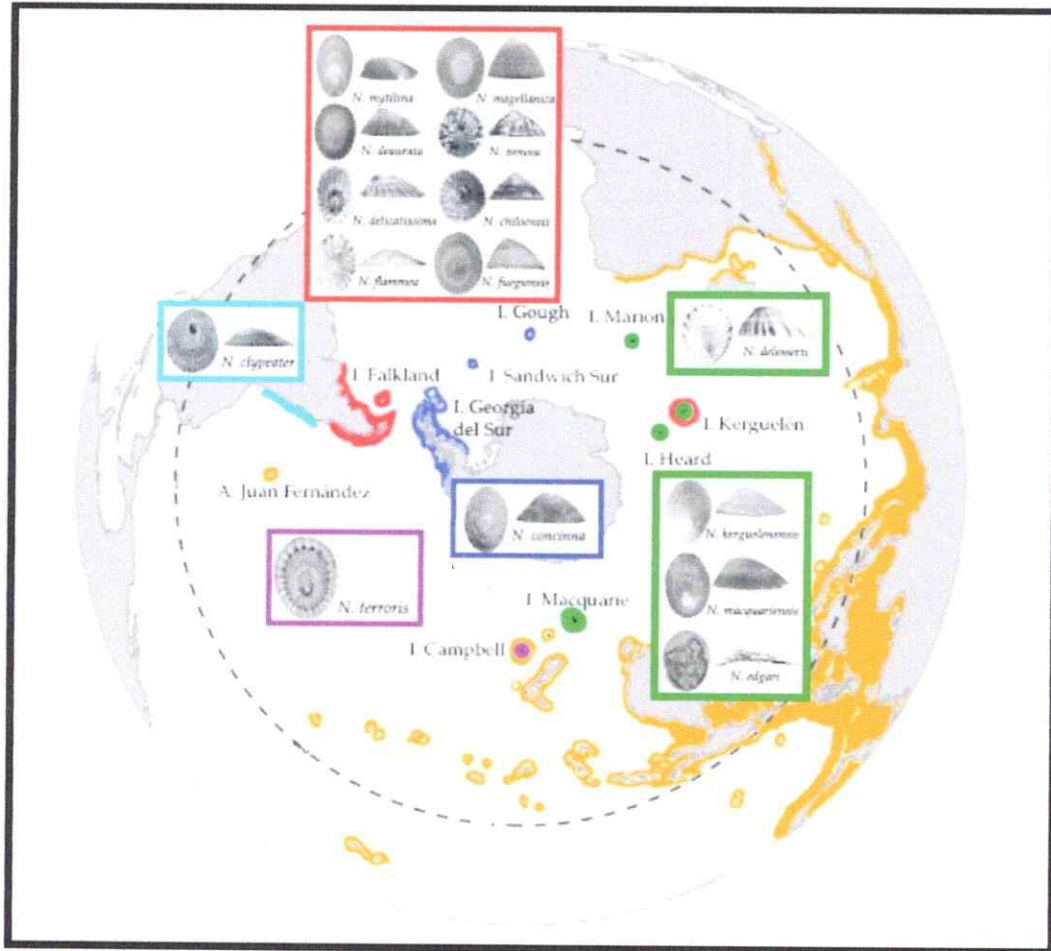


Figura 1.7 Distribución de Nacellidae con especial interés en los linajes de *Nacella* (Powell, 1973; Valdovinos & R  th, 2005). Los colores indican las distribuciones relativas en distintas Provincias Biogeográficas del O  ceno Austral descritas por Powell, (1950). Donde rojo = Magallanes; Celeste = Provincia Peruana; Azul = Antártica; Verde = Kerguelén; Morado = Provincia Antipodeana, al sur de Nueva Zelanda. En color naranja se indica la distribución del género *Cellana*.

La lapa antártica *Nacella concinna* se distribuye en la Provincia Antártica, en zonas libres de hielo a lo largo de la Península Antártica, el Arco de Escocia e islas aledañas como las Orcadas, Georgias del Sur, Sandwich del Sur y Bouvet (Powell, 1973; Picken, 1980, Beaumont & Wei, 1991). Esta especie es el macroinvertebrado más conspicuo y dominante de los ecosistemas rocosos de la Península Antártica (Walker, 1972; Powell, 1973; Picken, 1980; Fig. 1.7). Ha sido fuente de variados estudios sobre aspectos de su fisiología (Clarke, 1990; Peck *et al.*, 1993; Clarke *et al.*, 1994; Davenport, 2001; Fraser *et al.*, 2002 b), metabolismo y crecimiento (Picken, 1980; Peck, 1989; Peck & Veal, 2001; Fraser *et al.*, 2002 a, 2007; López Correa & Taviani, 2006), reparación de la concha (Cadeé, 1999), biología, ecología (Nolan, 1991; Davenport, 1988, 1997; Silva *et al.*, 1999; Kim, 2001), reproducción (Picken & Allan, 1983; Stanwell-Smith & Clarke, 1998; Brêthes *et al.*, 1994; Powell *et al.*, 2001), conducta (Mahon *et al.*, 2002; Markowska & Kidawa, 2007) y genético-poblacionales (Beaumont & Wei, 1991; de Aranzamendi *et al.*, 2009; Hoffman *et al.*, en prensa). Existen cuatro especies descritas para la Provincia de Kerguelén con patrones de distribución restringidos y en muchos casos exclusivos a algunas de las islas que conforman la región (Powell, 1973). Las especies *N. delesserti* y *N. edgari* habitan exclusivamente en las islas subantárticas Marión (46°53'S; 37°45'E), y Kerguelén (49°15'S; 69°35'E), respectivamente. *Nacella kerguelenensis* posee una distribución más extensa encontrándose en Isla Kerguelén e Isla Heard (53°06'S; 73°31'E), distantes a ~ 500 kms. Finalmente, la especie *N. macquariensis* posee la distribución más amplia en la Provincia, encontrándose en Isla Heard e Isla

Macquarie (54°37'S, 158°52'E), distantes a más 5000 kms (Fig. 1.7). Existe una sola especie descrita para la Provincia Antipodeana, al Sur de Nueva Zelanda, *N. terroris* que como se mencionó anteriormente vive en simpatría con *Cellana strigilis strigilis* (Powell, 1973; Fig. 1.5). La especie *N. clypeater* se distribuye a lo largo de la costa Centro-Norte de Chile, desde Puerto Montt hasta el sur del Perú (Alamo & Valdivieso, 1997; Lancellotti & Vasquez, 2000; Espoz *et al.*, 2004; Valdovinos & R  th, 2005; Fig. 1.7). En base a estudios morfológicos se han descrito al menos siete especies para la Provincia Magallánica pero la taxonomía del género en esta región es aún elusiva (Powell, 1973; de Aranzamendi *et al.*, 2009). Powell (1973) reconoce cinco unidades taxonómicas: *N. flammea*, *N. mytilina*, *N. magellanica*, *N. deaurata* y *N. fuegiensis*, y tres subespecies o eco-formas: *N. deaurata delicatissima*, *N. magellanica venosa* y *N. magellanica chiloensis*. En una reciente revisión de los Nacellidae sudamericanos, Valdovinos y R  th (2005), concluyen que las especies y eco-formas descritas por Powell (1973), a excepción de *N. fuegiensis* (sin  nimia de *N. magellanica*), son unidades taxonómicas verdaderas (Fig. 1.5). Los autores indican que las especies magallánicas del género muestran diferencias significativas a nivel de la morfología, grosor y coloración de la concha, la coloración de los tentáculos del manto, la coloración del pie y en la morfología de los dientes de la rádula, que permiten identificar a cada una de ellas como unidades taxonómicas distintas (Valdovinos & R  th, 2005). No obstante, la mayoría de dichos caracteres están descritos en Patellogastropoda como altamente variables, homopl  sicos y significativamente dependientes de la batimetría, ecología, depredación y dieta

(Morriconi & Calvo, 1993; Ridgway *et al.*, 1998; Lindberg, 2008). Esto sugiere que los resultados de Valdovinos & R uth (2005) más que representar una diversificación de especies en Magallanes, podría ser explicado a través de una alta plasticidad fenotípica del género para dicha región. de Aranzamendi *et al.* (2009) en un estudio utilizando marcadores moleculares en cuatro especies de *Nacella* de la costa Argentina, encuentran altos niveles de similitud genética entre las ellas con evidencia de diferenciación incipiente entre *N. magellanica*, *N. deaurata* y *N. mytilina*. Observaciones personales en distintas localidades del Estrecho de Magallanes han dado cuenta de la gran plasticidad fenotípica que muestra *Nacella* en Magallanes. Dicha plasticidad podría ser explicada por la presencia de híbridos o por un mecanismo de radiación adaptativa muy reciente del género en la región (de Aranzamendi *et al.*, 2009; González-Wevar *et al.*, 2010).

Junto con las diferencias morfológicas descritas para las especies de la Provincia Magallánica, éstas muestran claras diferencias ecológicas, batimétricas y de distribución (Powell, 1973; Guzmán, 1978; Valdovinos & R uth, 2005; de Aranzamendi *et al.*, 2009). Las especies intermareales *N. delicatissima*, *N. deaurata*, y *N. magellanica* poseen una distribución extensa que abarca desde Chiloé en el Oce no Pacífico hasta la Provincia de Buenos Aires en el Atlántico, encontrándose además en el Sur de Patagonia, Tierra del Fuego y las Islas Malvinas (Powell, 1973 ; Fig. 1.8A). Las especies *N. flammea* y *N. fuegiensis* exhiben una mucho más restringida que abarca desde Aysén (45 24'S; 72 40'O) hasta Tierra del Fuego, pasando por el Estrecho de Magallanes (Fig. 1.8B). Otras especies como *N. chiloensis* y *N. venosa* (Fig. 1.8C) muestran distribuciones

distribución más acotadas y restringidas a la región de Chiloé insular y continental (Powell, 1973; Valdovinos y R  th, 2005). Finalmente, la especie *N. mytilina* (Fig. 1.8D), posee la distribución más extensa de todas las especies magallánicas e incluye el Estrecho de Magallanes, Tierra del Fuego, Sur de Patagonia, Islas Falkland y la Isla Kerguelén, en la Provincia de Kerguelén, Oce  no Índico (Powell, 1973; Figura 8). En base a la distribución de las especies magallánicas, el Estrecho de Magallanes correspondería la zona de mayor riqueza de especies, donde al menos seis unidades coexisten en simpatría. De acuerdo a Powell (1973), esta región correspondería al centro de diversificación del género desde donde habría expandido hacia el Este a través de la Corriente de Deriva del Oeste.

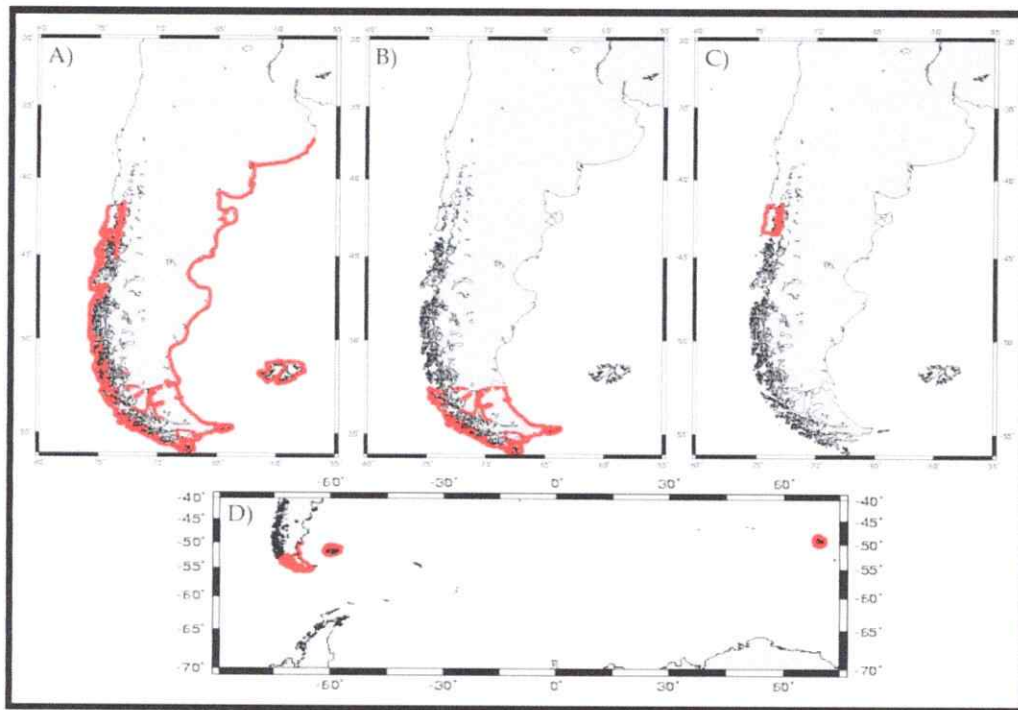


Figura 1.8. Distribución de las especies magallánicas de *Nacella* según Powell (1973) y Valdovinos & R  th (2005) donde: **A)** *N. magellanica*, *N. deaurata*, *N. delicatissima*; **B)** *N. flammea*, *N. fuegiensis*; **C)** *N. venosa*, *N. chiloensis*; **D)** *N. mytilina*.

Además de las diferencias en distribución, algunas especies magallánicas de *Nacella* poseen batimetrías disímiles. Todas las especies, con excepción de *N. flammea* y *N. mytilina*, habitan ambientes intermareales rocosos donde se alimentan principalmente de microalgas, diatomeas y películas bacterianas (Powell, 1973; Guzmán, 1978; Guzmán & Ríos, 1986). *Nacella magellanica* es un habitante del intermareal superior mientras que *N. deaurata* vive en la zona intermareal baja (Guzmán, 1978; Morriconi & Calvo, 1993; Ríos & Gerdes, 1997; Morriconi, 1999; Bazterrica *et al.*, 2007). Las especies *N. flammea* y *N. mytilina* habitan la zona submareal, la primera sobre sistemas rocoso ricos en algas crustosas mientras que la segunda exclusivamente sobre frondas de *Macrocystis pyrifera* (Valdovinos & Rüth, 2005; Fig. 1.9).

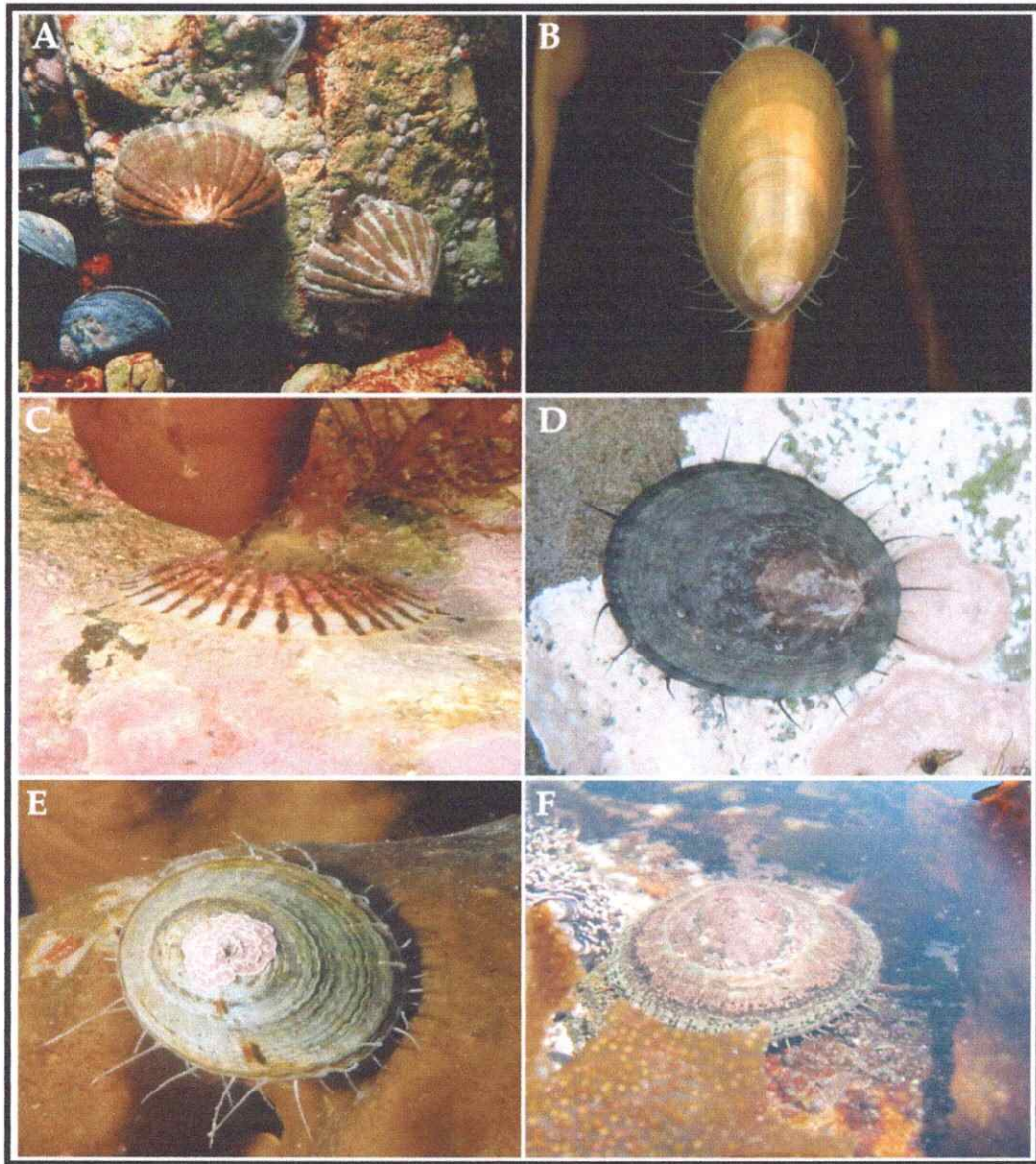


Figura 1.9. Algunas especies de *Nacella* en sus ambientes naturales. Donde: **A)** *Nacella magellanica* (I), **B)** *Nacella mytilina* sobre frondas de *M. pyrifera* (S), **C)** *Nacella flammea* (S), **D)** *Nacella deaurata* (I), **E)** *N. concinna* sobre frondas de *Ascoseria mirabilis*, **F)** *Nacella clypeator* (S). I = Intermareal; S = Submareal. Fotografías A, B, C y D cortesía de César Cárdenas. (ccardenas.biosub@gmail.com; www.guiamarina.com).

1.7. Marcadores moleculares

La filogeografía es un campo de estudio preocupado de los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes genealógicos, especialmente aquellos dentro y entre especies relacionadas (Avise, 2001). El uso de secuencias de DNA ha demostrado ser una eficiente herramienta para estimar eventos evolutivos como origen y tiempos de diversificación en taxa de moluscos (Collins *et al.*, 1996; Adamkewicz *et al.*, 1997; Hellberg & Vacquier, 1999; Colgan *et al.*, 2000; Marko *et al.*, 2004; Gérard *et al.*, 2008; Cárdenas *et al.*, 2009; Barco *et al.*, en prensa) y especialmente en patelogastrópodos (Koufapanou *et al.*, 1999; Wade & Mordan, 2000; Nakano & Ozawa, 2004, 2007; Goldstein *et al.*, 2006 a, b; ; Bird *et al.*, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2009; González-Wevar *et al.*, 2010).

Dada la distribución y la biología del género será posible estimar cuando se produjo el último contacto entre los grupos Antárticos y Subantárticos del género a través del grado de divergencia molecular en los marcadores utilizados. A pesar de la extensa información que existe de la historia geológica en el Océano Austral, escasos estudios han logrado establecer cronologías exactas de los tiempos de separación entre las distintas faunas bentónicas (Patarnello *et al.*, 1996; Page & Linse, 2002; Stankovic *et al.*, 2002; Waters *et al.*, 2007; Gérard *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2007, 2009). El objetivo principal de la ecología histórica es lograr determinar de manera exacta de que forma las interacciones comunitarias y biológicas se desarrollan y mantienen en el tiempo (Waters *et al.*, 2007).

1.8. Objetivos

En base a los antecedentes anteriormente expuestos la presente investigación busca examinar la biogeografía histórica y reciente del género *Nacella* en el Océano Austral. Para esto, se aprovecharán los avances en las técnicas moleculares y en los métodos de análisis asociados que permitirán estimar tiempos de origen y diversificación del género.

Desde esta perspectiva, el género *Nacella* constituye un buen modelo para el estudio de la divergencia entre Subantártica y Antártica ya que corresponde a un grupo monofilético de invertebrados dominantes en los ambientes someros bentónicos de distintas regiones biogeográficas en el Océano Austral. A partir de los resultados moleculares se buscará determinar si el actual patrón de distribución y de diversidad de especies en el género se asocian a procesos de vicarianza histórica o a procesos de diversificación más recientes.

Paralelamente, esta investigación buscará estimar el grado de diversidad genética intra e interpoblacional en especies de *Nacella* provenientes de distintas regiones biogeográficas. Para esto, se realizarán análisis filogeográficos en poblaciones de las especies *N. clypeater* (Provincia Peruana); *N. magellanica* (Provincia Magallánica) y *N. concinna* (Antártica). Con esto, se buscará establecer si existe algún grado de relación entre los cambios climáticos asociados a los procesos glaciales pleistocénicos y los niveles de diversidad genética de las especies en dichas regiones. Además, la diversidad de especies y/o eco-formas descritas para Magallanes es de gran interés desde una perspectiva ecológica-evolutiva por lo que esta investigación buscará determinar si existen diferencias

II. MATERIALES Y MÉTODOS

Localidades de muestreos e identificación de especies

En las reconstrucciones filogenéticas realizadas se incluyeron entre 15 a 35 especies, (44 - 94 ejemplares), dependiendo del marcador utilizado (ver tabla 1). Todas las especies incluidas en los análisis pertenecen a distintos grupos de patelogastrópodos provenientes de localidades que abarcan la mayor parte del rango de distribución de los géneros *Nacella* y *Cellana* (Nacellidae; Tabla 2.1). Las especies de *Nacella* analizadas fueron recolectadas desde tres Provincias biogeográficas del Océano Austral y desde la Provincia Peruana (Tabla 2.1; Fig. 2.1).

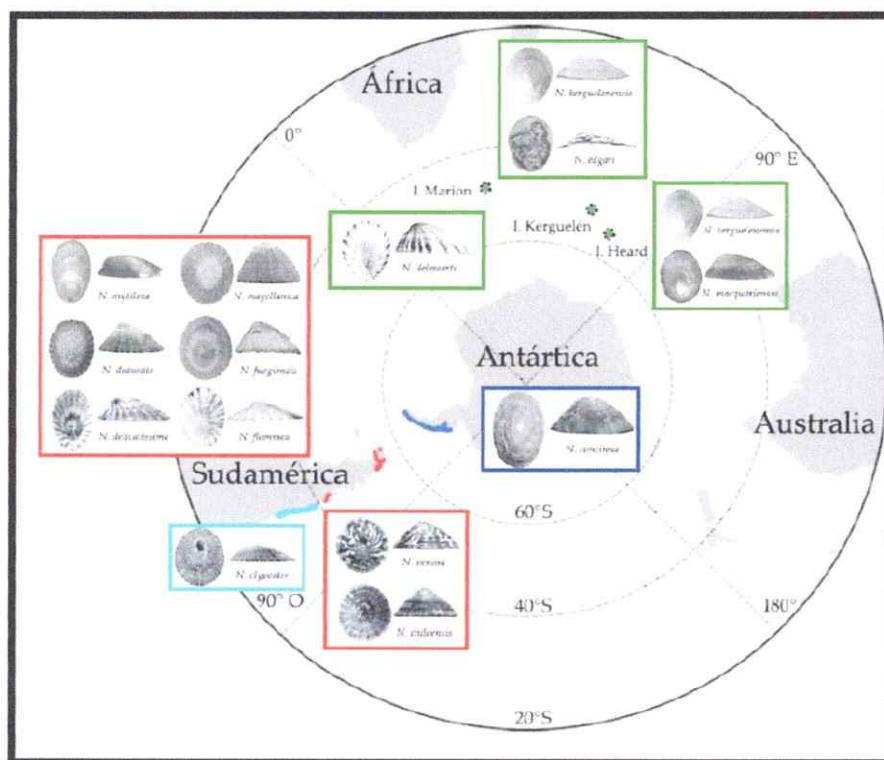


Figura 2.1. Especies de *Nacella* incluidas en las reconstrucciones filogenéticas. Los colores en el mapa muestran la Provincia a la cual pertenecen (Hedgpeth, 1969) y al borde de los recuadros la(s) especie(s) correspondiente(s). Verde = Kerguelén; Rojo = Magallanes; Celeste = Provincia Peruana; Azul = Antártica.

a nivel de las secuencias de DNA entre las unidades morfológicas definidas para el género en la región.

1.8 Hipótesis

Hipótesis 1: Los tiempos de divergencia entre las especies del género Nacella provenientes de Antártica y Subantártica están directamente relacionado con la separación de las Provincias del Océano Austral durante el Cenozoico.

Por lo tanto, se espera encontrar congruencia entre los tiempos de separación de los linajes de Nacella estimados a través de marcadores moleculares y los eventos geológicos más importantes ocurridos en el Océano Austral.

Hipótesis 2: La disminución de las temperaturas desde el Mioceno y los ciclos glaciales del Pleistoceno en el Océano Austral afectaron de manera negativa los tamaños poblacionales de Nacella a través de una disminución de sus tamaños efectivos. Tal disminución de los tamaños poblacionales se debería haber visto acompañada por efectos de cuellos de botella que habrían generado una disminución de la diversidad genética.

De esta forma, el efecto de los procesos glaciales recurrentes del Pleistoceno deberían haber sido más marcados en latitudes mayores. Se espera encontrar una disminución en la diversidad genética en las especies de Nacella a medida que aumenta la latitud.

Se obtuvieron muestras de DNA de distintas especies de *Cellana* a través de una colaboración con el experto en el género, Dr. Tomoyuki Nakano, del *Museo Nacional de Ciencia y Naturaleza de Tokio*, Japón (Tabla 2.1). Durante enero del 2009 se recolectaron ejemplares de *C. ardosidea* provenientes del intermareal rocoso de Isla Robinson Crusoe e Islote Santa Clara (Archipiélago de Juan Fernández), gracias al apoyo del Dr. Álvaro Palma de la *Pontificia Universidad Católica de Chile*. Entre 2007 - 2009 se realizaron muestreos en la zona intermareal y submareal de distintas localidades en el Estrecho de Magallanes, Tierra del Fuego y Canal Beagle. A partir de dichos muestreos se obtuvieron ejemplares de todas las especies del género descritas para la región (Tabla 2.2). Paralelamente, se obtuvieron muestras de *Nacella* desde la localidad Puerto Deseado, Provincia de Santa Cruz, Patagonia Argentina (Tabla 2.1 y 2.2). Paralelamente, se realizaron muestreos en Puerto Montt desde los que se recolectaron ejemplares de las especies *N. chilensis* y *N. venosa* (Tabla 2.1 y 2.2).

La identificación de las especies de *Nacella* se hizo en base a Powell (1973) y Valdovinos & R  th, (2005). De acuerdo a los últimos autores, las especies magallánicas de *Nacella* se distinguen por sus morfologías y por sus patrones de coloración externa. No obstante, en muchos de los ejemplares recolectados desde Isla Parlamento, Punta Santa Ana, Isla Carlos III, Puerto Williams e Islas Malvinas, tales rasgos no eran tan evidentes ni fáciles de discriminar, detectándose frecuentemente la presencia de formas intermedias y con mezcla de caracteres. Por esto, se confeccionó una tabla de reconocimiento para *Nacella* (modificada de Valdovinos & R  th, 2005), que incluye las características diagnóstico de las especies incluidas (Fig. 2.2). No se incluyeron en los análisis

filogenéticos y filogeográficos aquellos ejemplares que presentaron mezcla de caracteres o que representaban formas intermedias. Por lo tanto, sólo se analizaron aquellos individuos que en términos morfológicos eran claramente reconocibles como unidades distintas y congruentes a lo descrito para las especies del género (Powell, 1973; Valdovinos & R  th, 2005; Tabla 2.1; Figura 2.2).

Especies	Localidades	N	C.G.	P	COI	Cytb	16S	28S	Act	EPIC30
NACELLIDAE										
<i>Nacella concinna</i> (Strebel, 1908)	Bahía South, P. Antártica	1	62°40'S; 60°28'W	A	●	●	●	●	●	●
	Isla Elefante, P. Antártica	2	61°08'S; 59°07'W	A	●	●	●	●	●	●
	Bahía Covadonga, P. Antártica	2	63°10'S; 57°53'W	A	●	●	●	●	●	●
<i>N. clypeator</i> (Lesson, 1831)	La Misión, Valdivia, Chile	2	30°47'S; 73°23'W	P	●	●	●	●	●	●
	Lenga, VIII Región, Chile	2	36°45'S; 75°10'W	P	●	●	●	●	●	●
	Bahía de Coquimbo, Chile	1	29°58'S; 75°25'W	P	●	●	●	●	●	●
<i>N. venosa</i> (Reeve, 1854)	Pto Montt, Chile	5	41°28'S; 72°56'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. chilensis</i> (Reeve, 1854)	Pto Montt, Chile	5	41°28'S; 72°56'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. delicatissima</i>	P. Santa Ana, E. Magallanes	2	53°37'S; 70°54'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. donovata</i> (Gmelin, 1791)	Bahía Laredo, E. Magallanes	3	52°50'S; 70°50'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. magellanica</i> (Gmelin, 1791)	Bahía Laredo, E. Magallanes	3	52°50'S; 70°50'W	M	●	●	●	●	●	●
	Bahía Laredo, E. Magallanes	3	52°50'S; 70°50'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. mytilina</i> (Helbling, 1779)	Bahía Orange, I. del Fuego	2	55°23'S; 68°07'W	M	●	●	●	●	●	●
	P. Santa Ana, E. Magallanes	2	53°37'S; 70°54'W	M	●	●	●	●	●	●
	Isla Carlos III, E. Magallanes	2	53°36'S; 72°18'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. flavinea</i> (Gmelin, 1791)	P. Santa Ana, E. Magallanes	5	53°37'S; 70°54'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. fuscus</i> (Reeve, 1791)	P. Santa Ana, E. Magallanes	5	53°37'S; 70°54'W	M	●	●	●	●	●	●
<i>N. kerguelensis</i> (E. A. Smith, 1877)	Isla Heard	5	53°06'S; 73°31'E	K	●	●	●	●	●	●
	Isla Kerguelén	5	49°15'S; 69°35'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>N. macquarimensis</i> (Finlay, 1927)	Isla Heard	3	53°06'S; 73°31'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>N. delisseri</i> (Philippi, 1849)	Isla Manon	1	46°53'S; 57°45'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>N. edgari</i> (Powell, 1957)	Isla Kerguelén	5	49°15'S; 69°35'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>N. aff. mytilina</i>	Isla Kerguelén	2	49°15'S; 69°35'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. aridosidea</i> (H. & Jacquimo, 1841)	Isla Robinson Crusoe	3	33°38'S; 78°50'W	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. strigilis strigilis</i>	Isla Campbell	5	52°32'S; 169°8'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. encosmia</i> (Pilsbry, 1891)	Hurghada, Egipto	1	27°09'N; 33°40'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. flava</i> (Hutton, 1873)	Kaikoura, Nueva Zelanda	1	42°25'S; 173°41'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. radiata</i> (Gmelin, 1791)	Omaha, New Zealand	1	36°20'S; 174°46'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. radiata ornata</i> (Reeve, 1854)	Madagascar	1	20°00'S; 47°00'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. radiata orientalis</i> (Pilsbry, 1891)	Okinawa, Japón	1	26°20'N; 127°49'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. solida</i> (Brainville, 1825)	Orford, Australia	1	42°34'S; 147°51'E	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. fuscus</i> (Röding, 1798)	B. Taihoae, Islas Marquesas	1	08°54'S; 140°06'W	K	●	●	●	●	●	●
<i>C. tsutsudimeria</i> (Linnaeus, 1758)	Okinawa, Japón	1	26°20'N; 127°49'E	K	●	●	●	●	●	●

	Tentáculos del Manto	Coloración del músculo pedal	Escultura de la concha	Perfil lateral	Perfil Dorsal
<i>Nacella kerguelensis</i> (n > 30)					
<i>Nacella macquariensis</i> (n = 3)					
<i>Nacella edgari</i> (n > 30)					
<i>Nacella concinna</i> (n > 100)					
<i>Nacella delesserti</i> (n = 1)					
<i>Nacella clypeator</i> (n > 70)					
<i>Nacella magellanica</i> (n > 100)					
<i>Nacella venusta</i> (n > 30)					
<i>Nacella chiloensis</i> (n > 30)					
<i>Nacella deaurata</i> (n > 50)					
<i>Nacella fujiensis</i> (n > 40)					
<i>Nacella delicatissima</i> (n > 10)					
<i>Nacella flammea</i> (n > 40)					
<i>Nacella mytilina</i> (n > 60)					

Figura 2.2. Principales caracteres relacionadas con la morfología externa de la concha y a la presencia de rasgos diagnósticos (coloración de los tentáculos del manto, coloración del músculo pedal), que permiten el reconocimiento de las especies de *Nacella* estudiadas (modificado de Valdovinos & Rùth, 2005).

A través de contactos con el Dr. Hamish Spencer (*Jefe del Departamento de Zoología, Universidad de Otago, Nueva Zelanda*) se obtuvieron ejemplares de *N. kerguelenensis* y *N. macquariensis* de Isla Heard, Provincia de Kerguelén y un ejemplar de *N. delesserti* de Isla Marion, Sudáfrica. Además, mediante contactos con el Instituto Polar francés (*Institut polaire français Paul Émile Victor*) se obtuvieron ejemplares de las especies *N. kerguelenensis* y *N. edgari*, de Isla Kerguelén. Además, desde esta isla se recolectaron dos ejemplares que mostraron una morfología muy similar a la descritos por Powell (1973), como *N. mytilina* (Provincia Magallánica). Ambos ejemplares fueron incluidos en todas las reconstrucciones como *N. aff. mytilina* para determinar a cuál linaje de *Nacella* se asocian. Se recolectaron ejemplares de *N. concinna* de cinco localidades a lo largo de la costa Oeste de Península Antártica y de Isla Rey Jorge (Tablas 2.1 y 2.2). Los muestreos en Antártica se realizaron en zonas intermareales y submareales mediante buceo autónomo en el marco de los proyectos INACH 02-02, 13-05 y ECOS C06B02 del Dr. Élie Poulin. Entre enero – junio del 2008 se realizaron muestreos a lo largo de la costa Centro-Norte de Chile de la especie *N. chypeater* desde la zona submareal inferior (Tablas 2.1 y 2.2). Finalmente, se gestionó la obtención de ejemplares de la especie *N. terroris* de Isla Campbell (Provincia Antipodeana, Sur de Nueva Zelanda) con el Departamento de Conservación de Nueva Zelanda (<http://www.doc.govt.nz/>). Durante la expedición noviembre 2008 – febrero 2009 del investigador Jo Hiscock se recolectaron lapas desde el intermareal de dicha localidad, específicamente en los lugares donde la especie en cuestión ha sido descrita. Se obtuvieron dos

morfotipos muy disímiles, pero todos correspondieron a la especie *Cellana strigilis strigilis*, la cual fue incluida en los análisis.

Junto a las las especies de Nacellidae, se incluyeron como grupos externos siete géneros de Patellidae (*Cymbula*, *Helcion*, *Lottia*, *Nippoacmea*, *Scutellastra*, *Pectinodonta* y *Patella*) cuyos DNAs para la amplificación de fragmentos fueron facilitados por el Dr. Nakano (Cytb, Actina e intrón EPIC30) o sus respectivas secuencias fueron descargadas desde GenBank (COI, 16S, 28S), respectivamente (Tabla 2.1). Estos géneros fueron seleccionados por su estrecha relación con la familia Nacellidae reconocida en estudios moleculares previos (Koufopanou *et al.*, 1999; Nakano & Ozawa, 2004; 2007).

Preparación de DNAs, amplificación por PCR y Secuenciación

Todos los ejemplares de Nacellidae recolectados fueron fijados en etanol (95%) y la extracción de DNA total se hizo a partir de tejido del manto y del músculo pedal utilizando el método de *salting-out* (Aljanabi & Martínez, 1997) y de fenol cloroformo-alcohol isoamílico (Sambrook *et al.*, 1989). Ambas metodología han probado ser eficientes para la preparación de DNA en distintos taxa de invertebrados marinos y permiten la obtención de material genético de buena calidad para análisis moleculares. Se midió la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y el grado de pureza de los DNAs estimando las relaciones A230/260 y A260/280 con un espectrofotómetro NanoDrop modelo N-1000 (Thermo Scientific). Antes de realizar las amplificaciones por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), se prepararon soluciones de trabajo de todos los DNAs a un concentración de 50 ng/ μl . Se amplificaron por PCR fragmentos de los genes

mitocondriales *Citocromo c Oxidasa Subunidad I* (COI), *Citocromo b* (Cytb) y *16S rRNA* (16S), y fragmentos de las regiones nucleares codificantes *28S rRNA* (28S), *Actina* (Act), y un fragmento intrónico no codificante, *EPIC30* (EPIC = *Exon Primed Intron Crossing*). En la tabla 2.2 se resumen los marcadores utilizados en la presente investigación, la secuencia de los partidores, y sus referencias.

M	Partidores	Referencia
COI	LCO1490 (F) 5' GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG C 3'	Folmer <i>et al.</i> (1994)
	HCO2198 (R) 5' TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA 3'	González-Wevar <i>et al.</i> (2010)
	COLLEMF 5' CTC GGC TTC CTG GGA CTG GTT 3' COLLEMR 5' AAT AAA TGC TGA TAA AGA ATA 3'	
Cytb	CytbF 5' TGA GSN CAR ATG TGN TWY TC 3' CytbR 5' GCR AAN AGR AAR TAC CAY TC 3'	Merritt <i>et al.</i> (1999)
	16S	16ERN13398 (F) 5' CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT 3' 16SRH1B (R) 5' ACG CCG GTT TGA ACT CAG ATC 3'
28S	LSU5 (F) 5' TAG GTC GAC CCG CTG AAY TTA AGC A 3' BCD2 (R) 5' CTT GGT CCG TGT TTC AAG ACG G 3'	Littlewood <i>et al.</i> (2000) Olson <i>et al.</i> (2003)
	LSU900 (F) 5' CCG TCT TGA AAC ACG GAC CAA G 3' LSU1600 (R) 5' AGC GCC ATC GAT TTT CAG G 3'	Olson <i>et al.</i> (2003) Williams <i>et al.</i> (2003)
	Actina	Act1 (F) 5' TAT GTT GGT GAT CAG GCT CAG 3' Act1 (R) 5' TGG CAA CAT GGT GGA ACC 3'
Epic30	Epic30 (F) 5' AGA GGT GGT GCT TTC GAT CAG TTA AAR CAR 3' Epic30 (R) 5' CCG CTA CTA TCC AGA ATG ATG ATY TCA AAR 3'	Chenuil (pers. comm.)

Tabla 2.2. Marcadores moleculares (M) utilizados en las reconstrucción filogenética en Patellogastropoda. Se detalla la secuencia de los partidores y referencias. Las posiciones degeneradas se representan por el siguiente código: N = A|C|G|T; R = A|G; S = C|G; W = A|T; Y = C|T.

En esta investigación se utilizaron los genes COI y 16S para complementar con las secuencias de *Nacella*, la matriz de secuencias de ambos genes obtenidas en estudios previos en Patellogastropoda (Koufopanou *et al.*, 1999; Nakano & Ozawa, 2004, 2007; Tabla 2.1). Ambos genes han demostrado ser buenos marcadores para estudios filogenéticos en especies relacionadas de moluscos (Collins *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1996; Armbruster *et al.* 2000; Williams *et al.* 2003;

Williams & Reid 2004; Donald *et al.* 2005 b, Meyer *et al.* 2005; Barco *et al.*, en prensa) y especialmente en patelogastrópodos (Koufopanou *et al.*, 1999; Espoz *et al.*, 2004; Sá Pinto *et al.*, 2005, 2008; Goldstien *et al.*, 2006 a; Nakano & Ozawa, 2004, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2009; Nakano *et al.*, 2009). Para la amplificación de COI en la lapa antártica *Nacella concinna* fue necesario diseñar partidores internos específicos (González-Wevar *et al.*, 2010, ver tabla 2.3), los que además fueron utilizados en las especies *N. delesserti* y en algunos ejemplares de *N. mytilina*. Se seleccionó el gen Citocromo b ya que es un marcador que acumula cambios nucleotídicos a una tasa suficientemente alta por lo que también ha sido empleado para resolver relaciones filogenéticas entre especies estrechamente relacionadas de moluscos (Collins *et al.*, 1996; Reid *et al.*, 1996; Merrit *et al.*, 1999). De esta forma, Cytb fue amplificado en la mayoría de las especies incluidas en la presente investigación (ver Tabla 2.1). El gen COI forma parte de un complejo de proteínas en bacterias y mitocondrias que participa en la cadena transportadora de electrones, citocromo b es una proteína rica en hierro-protoporfirina IX que desempeña un rol importante en el transporte de energía química a través de los procesos de respiración aeróbica y de fotosíntesis (Lodish *et al.*, 2002). Los genes 16S y 28S cumplen una función estructural en la formación de los ribosomas (Lodish *et al.*, 2002). Se incluyeron en los análisis segmentos de los genes nucleares 28S rRNA y Actina en todas las especies de *Nacella* analizadas (Tabla 1). El gen 28S rRNA primero de estos genes ha sido ampliamente utilizado en reconstrucciones filogenéticas de gastrópodos (Wade & Mordan, 2000; Colgan *et al.*, 2000; McArthur & Harasewych, 2003; Barco *et al.*, en prensa) y también en patelogastrópodos

(Nakano & Ozawa, 2004, 2007, Nakano *et al.*, 2009). Actina es una familia de proteínas globulares que forman los microfilamentos que componen el citoesqueleto celular (Lodish *et al.*, 2002). Estudios filogenéticos recientes en moluscos han incorporado este gen con buenos resultados (Adema, 2002; Donald *et al.*, 2005 a, b). Finalmente, se incorporaron en los análisis secuencias del marcador intrónico EPIC 30. Los partidores para EPICs son diseñados en regiones exónicas conservadas para amplificar secuencias intrónicas más polimórficas, han sido utilizados para el desarrollo de marcadores SNPs y RFLPs y en estudios filogeográficos (Luikart *et al.*, 2003).

De esta forma, las reconstrucciones filogenéticas en la presente investigación consideraron secuencias codificantes y no codificantes de origen mitocondrial y nuclear. Con fines comparativos se incluyeron secuencias mitocondriales y nucleares, las cuales poseen tasas de sustituciones distintas y son heredadas de distinta forma. En general, la utilización de un solo tipo de marcador (mitocondrial o nuclear) entrega una visión sesgada de la historia evolutiva de un grupo, sobre todo cuando se trabaja con escenarios evolutivos complejos como introgresiones, hibridización y/o selección (Chan & Levin, 2005; Spinks & Schaffer, 2009). Por lo tanto, en estudios filogenéticos es importante considerar conjuntos de datos independientes y determinar el grado de congruencia entre las reconstrucciones obtenidas con cada uno de ellos para así obtener una visión más completa de la historia evolutiva del grupo.

Las amplificaciones de los genes COI, Cytb y 16S se realizaron en las instalaciones del Laboratorio de Ecología Molecular (LEM), Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile. Las

amplificaciones de los genes 28S y Actina se realizaron en el Museo de Ciencia y Naturaleza, Tokio Japón y el fragmento EPIC30 fue amplificado y secuenciado en DIMAR, (*Diversité, évolution et écologie fonctionnelle Marine* UMR 6540), Centro Oceanográfico de Marsella, Francia.

Las mezclas de amplificación se prepararon en 25 µl y consistieron en 2.5 µl de Buffer 10X (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 1.0 µl de 50 mM MgCl₂, 200 mM dNTP's, 0.5 µl de cada uno de los partidores (10 pg/µl), 1 U Taq (invitrogen), 50 ng de DNA y 17.5 µl de H₂O destilada desionizada. Las mezclas de PCR fueron desnaturalizado a 94°C por 5 min seguido de un número variable de ciclos con condiciones de temperatura, tiempos de: Desnaturalización (D), Anillamiento (A) y Extensión (E) específicos para cada marcador (Tabla 2.3).

M	Ciclos	T° A	Ⓞ D	Ⓞ A	Ⓞ E	Tamaño
COI	35	48°	60	60	60	657
Cytb	35	48	45	45	60	414
16S	40	52	45	45	60	561
28S	35	54	90	90	120	1570
Actina	40	50	60	60	60	652
Eplic30	35	Variable	60	60	60	487

Tabla 2.3. Condiciones de PCR para los distintos marcadores utilizados. Se indica el número de ciclos, el tamaño de los fragmentos (pb), las temperaturas de Anillamiento en grados Celsius (A); y los tiempos en segundos (Ⓞ) de Desnaturalización (D), Anillamiento (A) y Extensión (E).

Se verificaron los tamaños de los productos de amplificación mediante separaciones electroforéticas en gel de agarosa (1.5%), teñidos con Bromuro de Etidio (EtBr). Los productos de amplificación fueron purificados con el Kit *QIAquick Gel extraction* (QIAGEN) y secuenciados en ambas direcciones usando un secuenciador automático ABI3730XL en la empresa Macrogen, Corea (MACROGEN).

Edición de secuencias y Alineamiento

Todas las secuencias fueron editadas de manera independiente con el programa Proseq 2.91 (Filatov, 2002) y alineadas en grupos correspondientes a los fragmentos analizados con el programa Clustal W (Thompson *et al.*, 1992). Se comprobó la amplificación de los distintos fragmentos, comparando las secuencias obtenidas con la base de datos *BLASTn* (*Basic Local Alignment Search Tool*; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Paralelamente, las secuencias fueron traducidas a proteínas con un marco de lectura completo para descartar la presencia de inserciones-delecciones (indels), y/o codones de término que sugieren la amplificación de pseudogenes o de errores de secuenciación. Se estimaron los índices de saturación de las secuencias comparándolo con un índice esperado utilizando el programa DAMBE 4.5.27 (Xia & Xie, 2001). Paralelamente, desde las secuencias alineadas de cada gen se determinaron sus respectivas composiciones nucleotídicas (A, T, C, G), con el programa DAMBE. Los haplotipos de los genes COI y Cytb utilizados en la reconstrucciones filogenéticas fueron depositados en GenBank bajo los números de acceso: GU901219- GU901257 y GU901258- GU901313, respectivamente (González-Wevar *et al.*, 2010). Las secuencias de los otros marcadores serán depositados en GenBank previo a sus respectivas publicaciones.

En base a los objetivos de la presente investigación, se dividió la Sección Materiales y Métodos en tres partes:

2.1.) Biogeografía Histórica de Nacellidae, con especial énfasis en el género *Nacella*

2.2) Filogeografía e inferencia demográfica en especies de *Nacella* provenientes de distintas Provincias en el Océano Austral

2.3) Análisis genético comparativo entre especies simpátricas del género *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana y Puerto Montt.

2.1 Biogeografía Histórica de Nacellidae, con especial énfasis en el género *Nacella*

2.1.1 Reconstrucciones Filogenéticas

Las reconstrucciones filogenéticas se realizaron de manera independiente para cada marcador y también de manera concatenada para los genes mitocondriales utilizados (COI, Cytb y 16S). Para esto, se determinó la congruencia entre los fragmentos mitocondriales mediante una prueba de Diferencia de Longitud por Incongruencia (ILD; Farris *et al.*, 1995). Este análisis incorporado en el programa PAUP* versión 4.0b (Swofford, 2002), se basa Máxima Parsimonia. La hipótesis nula asume que los conjuntos de datos (marcadores) explican la misma historia evolutiva y comparten la misma distribución. Cuando la probabilidad asociada a la prueba es baja ($p \leq 0.05$) existe incongruencia evolutiva rechazándose la hipótesis nula de la prueba, lo que indica que los marcadores poseen distintas distribuciones de datos y no pueden ser concatenados en un análisis de Evidencia Total.

Se utilizaron tres métodos de reconstrucción, Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Los análisis de MP se realizaron con el programa PAUP* v. 4.0b asumiendo los siguientes supuestos: los caracteres fueron tratados como no ordenados y con igual peso. Se realizaron búsquedas heurísticas con el algoritmo barrido de ramas (*Branch Swapping*) por Bisección y Reconexión del Árbol (TBR: *Tree Bisection and Reconnection*), con adición aleatoria de taxa al árbol inicial (100 replicas). El soporte de los nodos

obtenidos fueron computados mediante el análisis de *bootstrap* no paramétrico de 1000 iteraciones (Felsenstein, 1985), considerando sólo los caracteres informativos. Los valores de *bootstrap* (0 – 100%) son considerados como un estimado relativo del soporte de los cladogramas. Para aceptar un nodo como respaldado desde un punto de vista de *bootstrap* se seguirá la sugerencia de valores > 95%.

Los análisis de ML se realizaron en TREEFINDER versión abril 2008 (Jobb, 2008). Previo a estos análisis se determinaron los modelos de sustitución que mejor se ajustan a cada fragmento analizado con el programa Modeltest versión 3.7. (Posada & Crandall, 1998). Los análisis de ML se hicieron mediante búsquedas heurísticas y se realizaron *bootstrap* no paramétrico de sólo 500 replicas para estimar la robustez de las reconstrucciones. Se utilizó un número menor de replicas en los análisis de ML debido a las limitaciones de tiempo computacional que impone este tipo de análisis.

Los análisis de IB se realizaron con el programa MrBayes versión 3.1.12 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Antes de los análisis de IB se determinó el modelo de sustitución que mejor se ajusta a cada uno de los fragmentos con MrModeltest versión 2.2. (Nylander, 2004), los que se resumen en la Tabla 2.5. Cada simulación de cadenas de Markov con el método de Montecarlo (MCMC) se realizó al menos dos veces para cada fragmento. Para esto, se corrieron 20×10^6 ciclos con cuatro cadenas (una fría y tres calientes), muestreadas cada 1000 generaciones. Este método depende de la convergencia de las Cadenas de Markov a una distribución estacionaria por lo que se determinó cuantas generaciones eran necesarias para llegar a dicha fase con el programa Tracer

v.1.4.1 (Rambaut & Drummond 2003). De esta forma, se eliminaron de los análisis un número variable de árboles (desde 1500 a 2000) dependiendo del marcador. Estabilizados los valores de probabilidad a posteriori de la Cadena de Markov se computaron los árboles de consenso de mayoría (50%), incluyendo componentes combinables, la información de los largos de rama y las estimaciones de las probabilidades posteriores (p.p.) de los distintos nodos. Se retuvieron y consideraron como bien apoyados, aquellos clados repetidos en el 95% de los análisis.

2.1.2 Estimación de los tiempos de divergencia

La estimación de los tiempos de divergencia entre los eventos cladogenéticos al interior de *Nacella* se hizo de dos formas: i) *asumiendo la hipótesis del Reloj Molecular* y ii) *utilizando un método bayesiano relajado para datos multilocus* (Thorne *et al.*, 1998; Thorne & Kishino, 2002). La hipótesis del Reloj Molecular es un método en evolución molecular que relaciona el tiempo de divergencia entre clados al número de diferencias entre ellos. Los eventos de divergencia fueron estimados usando tasas de sustitución determinadas para cada marcador (COI, Cytb) en Nacellidae. Dicha tasa se estimó tomando como información la aparición del Archipiélago de Juan Fernández y el número de diferencias entre *C. ardosidea* y la especie del género *Cellana* más estrechamente relacionada. Luego, el conjunto de datos fueron analizados mediante el método estricto implementado en el programa BEAST v.1.4.7 (Drummond & Rambaut, 2007). Siguiendo las recomendaciones del manual y de Drummond *et al.* (2006) se utilizó un modelo no correlacionado log-normal de variación de las tasas entre

ramas y un prior de Yule en las tasas de ramas. Se realizaron dos corridas independientes de 20,000,000 de repeticiones. Los archivos independientes .log y .trees se combinaron con el programa LogCombiner v.1.4.1 (Rambaut & Drummond, 2006) para tener un estimado de las distribuciones posteriores y de los tiempos de divergencia.

Paralelamente, la estimación de los tiempos de divergencia en Nacellidae (COI y Cytb) se determinó mediante una aproximación bayesiana relajada para datos multilocus implementada en el paquete MULTIDIVTIME/MULTIDISTRIBUTE (Thorne *et al.*, 1998; Kishino *et al.*, 2001; Thorne & Kishino, 2002). Este método se basa en un modelo estocástico de cambio en la tasa de evolución en el tiempo (Kishino *et al.*, 2001), con lo que se obtienen estimaciones de los tiempos de divergencia combinando la información contenida en las secuencias de DNA con datos externos como restricciones en nodos particulares desde el registro fósil o de información geológica (Wiegmann *et al.*, 2003). El método requiere una topología y el árbol de la figura 3.7 fue considerado como las hipótesis más completas en la evolución de Nacellidae. Se utilizó una distribución gamma discretizada con cinco categorías de heterogeneidad (Yang, 1994) y el modelo F84 de sustitución nucleotídica, para estimar la longitud de las ramas en la topología. Mediante el módulo PAML (Yang, 1997) se generaron estimaciones de Máxima Verosimilitud de distintos parámetros (tasas de transición/transversión, y la desigualdad en las frecuencias nucleotídicas). Con el módulo ESTBRANCHES se determinaron las longitudes de las ramas de los árboles enraizados y las matrices de varianza-covarianza. Para estimar los tiempos de divergencia, se

muestrearon cadenas de Markov 10,000 veces cada 100 ciclos, después de eliminar (*burn in*) los primeros 100,000 ciclos. Los "*prioris*" para el parámetro de tiempo de separación entre la raíz del ingroup (*Nacella*) y el presente (*rttm*), se fijo en 38. Ma como el tiempo máximo de separación entre *Nacella-Cellana*. La selección de esta fecha se basó en el fósil más antiguo de Nacellidae, *Cellana ampla* (Lindberg & Hickman, 1986). El *priori* *rtmsd* fue fijado a $\frac{1}{2}$ *rttm* siguiendo las recomendaciones del software y el valor de la tasa *rt* (*rtratesd*) se calculó en base al valor de la cantidad de evolución entre la raíz y la punta del árbol. Estimaciones de tiempo de divergencia usando este tipo de aproximaciones se ven optimizadas al incluir fuentes externas de calibración como registro fósil y/o eventos geológicos. En el caso de Nacellidae se utilizaron dos constricciones internas basadas en el registro fósil de *Nacella* y *Cellana*. La primera, la aparición en el registro fósil de *N. concinna* en Isla Cockburn, ~ 5.0 Ma (Jonkers & Kelley, 1998) y una segunda que corresponde a la presencia de formas afines a *N. clypeater* en el Sur de Perú ~ 5.0 Ma (DeVries, 2009). Un tercer punto de calibración lo constituyo el punto de divergencia de *Cellana ardosidea* fijado en 4.0 Ma como el origen del Archipiélago de Juan Fernández (Stuessy *et al.*, 1984; González-Ferrán, 1987).

2.2) Filogeografía e inferencia demográfica en especies de *Nacella* provenientes de distintas Provincias en el Océano Austral

2.2.1. Localidades de muestreo

Para la especie Antártica (*N. concinna*) se realizaron muestreos en cinco localidades a lo largo del Oeste de la Península Antártica (Tabla 2.2; Figura 2.3A). Para esta especie se han descrito dos morfologías diferentes, una de aguas someras *Patinella polaris* y otra de aguas profundas reconocida como *Patinella polaris* var. *concinna*. Estudios moleculares recientes (de Aranzamendi *et al.*, 2008; Hoffman *et al.*, en prensa) no llegan a acuerdo con respecto a la validez de estas morfologías como unidades distintas o simple plasticidad inducida por el ambiente. Tomando en consideración esto se incluyeron en los análisis especímenes intermareales y submareales de dos localidades en Isla Rey Jorge (Bahía Almirantazgo y Bahía Fildes; Figura 2.3B) a los cuales además, se les realizaron análisis de morfometría geométrica. Además, se incluyeron en los análisis un ejemplar de *N. concinna* de Isla Georgia del Sur y un espécimen de la especie *N. delesserti*, proveniente de Isla Marión, Sudáfrica (Fig. 2.3B).

Se obtuvieron ejemplares de *N. clypeater* desde tres localidades de la costa Centro Norte de Chile (Tabla 2.2; Fig. 2.5).

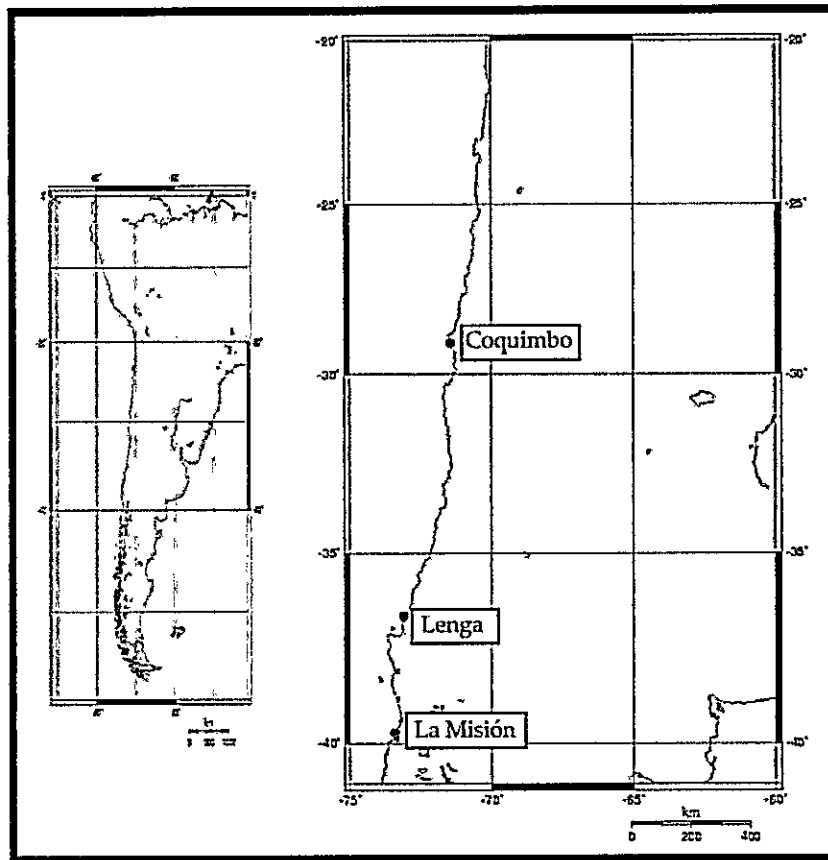


Figura 2.5. Localidades de muestreo para la especie *N. clypeater* a lo largo de la costa Centro Sur de Chile.

Se obtuvieron ejemplares de *N. clypeater* desde tres localidades de la costa Centro Norte de Chile (Tabla 2.2; Fig. 2.5).

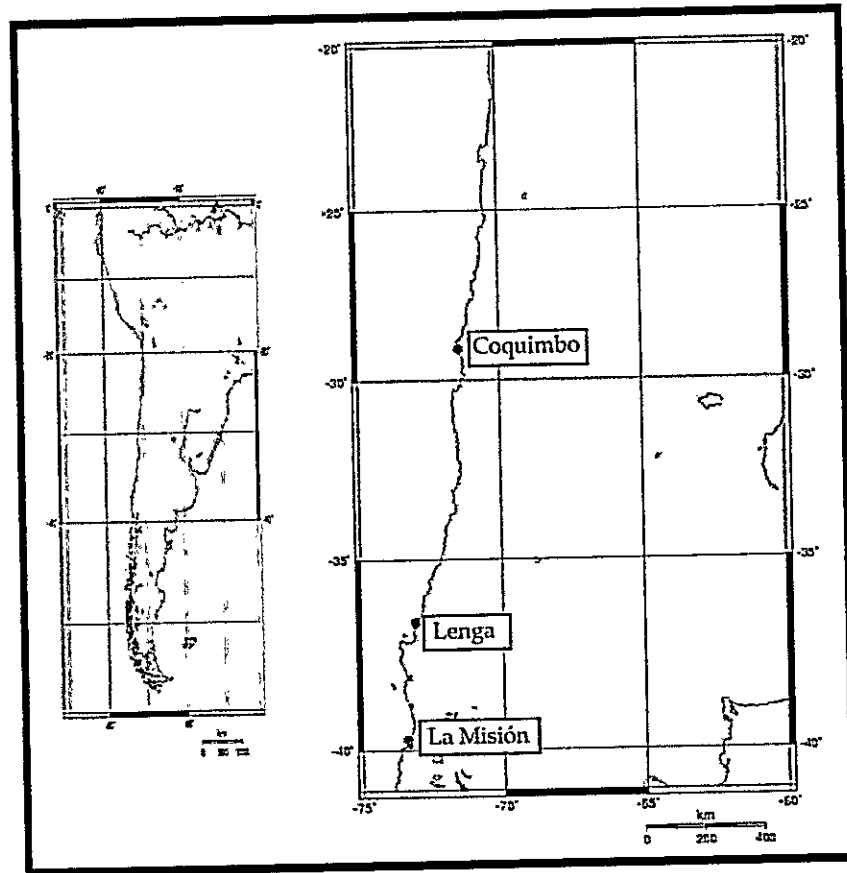


Figura 2.5. Localidades de muestreo para la especie *N. clypeater* a lo largo de la costa Centro Sur de Chile.

Especies	Localidades	N°	Coordenadas Geográficas	Prov.
<i>Nacella concinna</i> (Strebel, 1908)	Bahía South, Península Antártica, Chile Isla Elefante, Península Antártica, Chile Bahía Covadonga, Península Antártica Bahía Almirantazgo, Isla Rey Jorge Bahía Fildes, Isla Rey Jorge La Misión, Valdivia, Chile Lenga, VIII Región, Chile Bahía de Coquimbo, Chile Puerto Montt, Chile Puerto Montt, Chile	31 29 20 33 38 26 24 25 21 22	62°40'S; 60°28'W 61°08'S; 55°07'W 63°19'S; 57°53'W 62°09'S; 58°27'W 62°12'S; 58°57'W 39°47'S; 73°23'W 36°45'S; 73°10'W 29°58'S; 75°25'W 41°28'S; 72°56'W 41°28'S; 72°56'W	A A A A A P P P M M
<i>N. chypceator</i> (Lesson, 1831)	Puerto Deseado, Patagonia Argentina Bahía Orange, Tierra del Fuego Bahía Tekenika, Tierra del Fuego Buque Quemado, Estrecho de Magallanes Bahía Laredo, Estrecho de Magallanes Isla Parlamento	15 20 18 20 16 30	47°44'S; 65°54'W 55°23'S; 68°07'W 54°58'S; 68°22'W 52°11'S; 69°11'W 52°50'S; 70°50'W 52°45'S; 73°37'W	M M M M M M
<i>N. ventosa</i> (Reeve, 1854)	Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes	20	53°37'S; 70°54'W	M
<i>N. chilensis</i> (Reeve, 1854)	Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes	25	53°37'S; 70°54'W	M
<i>N. magellanica</i> (Gmelin, 1791)	Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes	54	53°37'S; 70°54'W	M
<i>N. denurata</i> (Gmelin, 1791)	Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes	31	53°37'S; 70°54'W	M
<i>N. mytilina</i> (Helbling, 1779)	Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes	28	53°37'S; 70°54'W	M
<i>N. flammula</i> (Gmelin, 1791)				
<i>N. fuagiritis</i> (Reeve, 1791)				

Tabla 2.4. Especies utilizadas en los análisis genético poblacionales de *Nacella*. N° = número de ejemplares analizados, coordenadas geográficas, Prov. = Provincia Biogeográfica (A = Antártica; P = Provincia Peruviana; M = Magallanes) a la cual pertenecen las especies de *Nacella*. La identificación de las especies magallánicas de *Nacella* se hizo en base a Powell (1973) y Valdovinos & Ruth (2006).

2.2.2 Amplificación, secuenciación y edición de secuencias

Para los análisis genético poblacionales en las especies de *Nacella* se amplificó un fragmento de 663 pb del gen mitocondrial *Citocromo c Oxidasa Subunidad I* (COI) utilizando partidores universales y específicos (Tabla 3). Este marcador ha sido eficientemente utilizado en estudios genético poblacionales y de inferencia demográfica en distintas especies de Patellogastropoda (Sá-Pinto *et al.*, 2005, 2008; Nakano & Ozawa, 2005; Nakano *et al.*, 2009) y en especies de nacélidos (Goldstien *et al.*, 2006 b; Bird *et al.*, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2009). Las condiciones de PCR para las especies de *Nacella* fueron idénticas a aquellas utilizadas en las reconstrucciones filogenéticas y los parámetros térmicos se resumen en la tabla 2.4. Los haplotipos registrados por especie serán depositados en GenBank.

Las secuencias fueron editadas de manera independiente con el programa Proseq 2.91 (Filatov, 2002) y alineadas con Clustal W. Posteriormente, fueron traducidas a amino ácidos para verificar errores de amplificación o la presencia de pseudogenes.

2.2.3. Análisis genético poblacionales

Se determinaron los niveles de polimorfismo en las especies analizadas a través de índices standards de diversidad genética como: número de haplotipos (k), número de sitios polimórficos (S) y diversidad haplotípica (H) por localidad con el programa DnaSP version 5.00.07 (Librado & Rozas, 2009). Además, se estimó el número promedio de diferencias pareadas (D) y la diversidad nucleotídica (π) de acuerdo a Nei (1987).

Se estimaron los niveles de diferenciación genética en cada especie (*N. concinna*, *N. magellanica* y *N. clypeater*) entre las localidades analizadas. Las estimaciones de diferenciación poblacional se hicieron a través de dos métodos, similitud entre haplotipos (N_{ST}) y analizando directamente las frecuencias de los haplotipos (G_{ST}) con el programa Arlequin version 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005).

Con el programa SAMOVA v.1 (SAMOVA: Spatial Analysis of Molecular VAriance, Dupanloup *et al.*, 2002) se definieron el número y composición de grupos poblacionales geográficamente homogéneos y mayormente diferenciados para cada especie de *Nacella*. Este método se basa en un procedimiento de alineamiento simulado que busca maximizar la proporción de varianza genética producto de diferencias entre grupos de poblaciones y minimizar la porción de la varianza entre las poblaciones dentro de los grupos. Se calcularon los índices de diferenciación Φ_{ST} (entre poblaciones), Φ_{SC} (entre poblaciones dentro de los grupos) y Φ_{CT} (entre grupos) a través de permutaciones haplotípicas (Excoffier *et al.*, 2005).

2.2.4. Inferencia Demográfica

Se reconstruyeron las relaciones genealógicas en las tres especies de *Nacella* usando redes de haplotipos de *Median-Joining* con el programa Network versión 4.5.1.0. (Röhl, 2002). Este método permite la reconstrucción de filogenias basadas en datos intra- e interespecíficos de secuencias moleculares como el DNA mitocondrial. Análisis de este tipo son complejos ya que en general incluyen grandes tamaños poblacionales y poca cantidad de divergencia genética entre individuos (Bandelt *et al.*, 1999; Posada & Crandall, 2001). Se determinaron

cambios demográficos en las tres especies mediante las pruebas de neutralidad D de Tajima y F_s de Fu con Arlequin. Ambas pruebas permiten evaluar el supuesto de la neutralidad selectiva del DNA mitocondrial, así como también el equilibrio poblacional de mutación-deriva. Valores significativamente negativos para ambas pruebas son evidencia de un exceso de polimorfismos raros, señal de eventos de expansión reciente o de selección positiva. Se construyó para cada especie la distribución de desajuste (*Mismatch Distribution*) para su comparación con la distribución de Poisson esperada para tamaños poblacionales a) constantes y b) variables (Slatkin & Hudson, 1991). El parámetro de expansión demográfica fue estimado usando la aproximación descrita por Schneider & Excoffier (1999) implementada en Arlequin. Los modelos de expansión poblacional (Rogers & Harpending, 1992) se basan en la estimación de los parámetros de la siguiente fórmula: $\tau = 2\mu t$; donde (τ) es la fecha de expansión/disminución, medida en unidades de tiempos mutacionales, μ = tasa de mutación por secuencia por año y t es el tiempo en años.

Con el programa Fluctuate v.1.44 (Kuhner *et al.*, 1998) se co-estimaron los parámetros Θ (donde Θ es análogo a τ) y g (tasa exponencial de crecimiento poblacional) en las especies analizadas mediante un muestreo Metropolis-Hastings. Este método permite analizar un conjunto de secuencias de DNA alineadas y las utiliza para hacer estimaciones de Máxima Verosimilitud de Θ y g . El parámetro Θ se define como cuatro veces (o dos) veces el tamaño efectivo poblacional (dependiendo si se analizan datos diploides o haploides, respectivamente) para la tasa mutacional mientras que g es la tasa de

crecimiento/disminución de la población donde valores positivos = crecimiento y valores negativos = disminución (Kuhner *et al.*, 1998). Además, se estimaron los parámetros Theta inicial $\Theta_i = 2N_{iu}$ y Theta final $\Theta_f = 2N_{fu}$ (antes y después de los eventos de expansión/decline, respectivamente; Kuhner *et al.*, 1998).

2.3. Análisis genético comparativo entre especies simpátricas de *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes y Puerto Montt

2.3.1 Localidad de análisis

Para análisis genético comparativos entre especies de *Nacella* de Magallanes se seleccionó la localidad Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes (53°37'S; 70°54'W, Fig. 13) ya que en este sitio coexisten seis especies del género en simpatria: *N. deaurata*, *N. magellanica*, *N. fuegiensis*, *N. flammea*, *N. mytilina*, y *N. delicatissima* (Tabla 2). Se compararon genéticamente distintas especies de *Nacella* de una misma localidad asumiendo que se tratan poblaciones distintas, para evitar el cualquier tipo de variación genética producto de la geografía. Por problemas de muestreos, la especie *N. delicatissima* no fue incluida en los análisis. En un estudio molecular reciente, de Aranzamendi *et al.* (2009) concluyen que *N. delicatissima* correspondería a un morfotipo poco común de *N. magellanica* y *N. deaurata*. Se recolectaron ejemplares de las especies *N. venosa* y *N. chilensis*, provenientes de Puerto Montt las cuales fueron comparadas entre ellas y con su supuesta especie putativa, *N. magellanica* (Powell, 1973).

2.3.2. Análisis genético comparativos

Se determinaron los niveles de polimorfismo en las distintas especies analizadas a través de índices estándares de diversidad genética (k , S , H ; Tabla 6) con el programa DnaSP y el número promedio de diferencias pareadas (Π) y la diversidad nucleotídica (π) de acuerdo a Nei (1987; Tabla 6).

Se estimaron los niveles de diferenciación genética entre las especies analizadas a través de la similitud entre haplotipos (N_{ST}) y por comparaciones de las frecuencia de los haplotipos (G_{ST}) en Arlequin. Se realizaron pruebas de permutaciones (20,000 iteraciones) de las identidades de haplotipos para confirmar la existencia de diferencias entre unidades. La comparación de estos índices permiten determinar si las especies de *Nacella* recolectadas desde Punta Santa Ana corresponden a unidades genéticas distintas o si se trata de una sola unidad poblacional altamente polimórfica y panmíctica. Paralelamente se realizaron las mismas comparaciones entre las especies *N. chilensis* y *N. venosa*, provenientes de Puerto Montt con *N. magellánica* del Estrecho de Magallanes.

Se determinaron cambios demográficos en las especies analizadas mediante los test de neutralidad D de Tajima y F_s de Fu con Arlequin. Se reconstruyeron las relaciones genealógicas en y entre las especies de *Nacella* usando redes de haplotipos de *Median-Joining* con el programa Network v.4.5.1.0 y se compararon las topologías de las distribuciones de desajuste entre las especies analizadas.

2.3.3. Análisis de Morfometría Geométrica

Se realizaron análisis de Morfometría Geométrica (MG) a nivel inter- e intraespecífico. A nivel interespecífico, se determinó el grado de variación en la morfología de la concha entre las especies de *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana y Puerto Montt mientras que a nivel intraespecífico se compararon las morfologías de los ejemplares de *N. concinna* intermareales y submareales de Bahía Almirantazgo y Bahía Fildes, Antártica. Se llevaron a cabo análisis de contornos basados en Análisis de Fourier Elíptico (EFA). Los contornos se obtuvieron desde fotografías digitales las que fueron proyecciones en dos dimensiones del perfil lateral de las conchas de las distintas especies de *Nacella*. Se realizaron transformaciones elípticas de Fourier con el programa SHAPE (Iwata & Ukai, 2002) ya que los descriptores elípticos de Fourier (EFDs) pueden ser usados para delinear cualquier tipo de forma y han sido eficientemente aplicados para la evaluación en animales y vegetales (Iwate & Ukai, 2002). Este método se basa en descomposiciones separadas de Fourier de los cambios en las coordenadas x e y , como una función de la longitud acumulada a lo largo del contorno (Renaud & Michaux, 2003, 2007). Con el módulo ChainCoder se obtuvieron los contornos de las conchas desde las imágenes digitales y mantiene la información relevante como códigos de cadena. Luego el módulo Chc2Nef entregó los EFDs normalizados del contorno y se calcularon sus coeficientes mediante transformación de Fourier discretas siguiendo a Kuhl & Giardina (1982). La normalización de los coeficientes se realizó para hacerlos invariantes con respecto a tamaño, rotación y punto de inicio con un procedimiento basado en la elipse del primer armónico. Con el módulo PrinComp se realizaron los

análisis de componentes principales de la matriz de varianza-covarianza de los coeficientes EFDs. Los análisis de Componentes Principales (CP) se estimaron con PAST v. 1.77 (Hammer *et al.*, 2001) y permitieron resumir la información con respecto a la variación contenida en los coeficientes EFDs (Rohlf & Archie, 1984). Finalmente, se realizaron análisis multivariados de varianza (MANOVA) con PAST para evaluar la importancia de diferenciación entre grupos relativa a la variación dentro de los grupos. Finalmente se hicieron comparaciones pareadas de Hotelling con PAST, entre la morfología de las conchas de las especies de *Nacella* incluidas.

III. RESULTADOS

3.1. *Biogeografía Histórica del género Nacella en el Océano Austral*

3.1.1. *Variación a nivel de secuencias*

Se obtuvieron secuencias de DNA de los genes mitocondriales COI, Cytb, 16S, y nucleares 28S, Actina, además del fragmento intrónico EPIC30 en especies de *Nacella* y de otros grupos de patelogastrópodos (*Cellana*, *Cymbula*, *Helcion*, *Lottia*, *Nippoacmea*, *Patella*, *Pectinodonta*, *Scutellastra*; Tabla 1.1). A nivel del grupo de interés (*Nacella*), ninguno de los marcadores seleccionados mostró ambigüedades en los alineamientos ni tampoco se detectó la presencia de inserciones o deleciones (indels). La traducción de las secuencias a sus respectivos amino ácidos no detectaron la presencia de codones de término o de la amplificación de pseudogenes.

Los tamaños de los fragmentos amplificados en cada uno de los marcadores se resumen en la Tabla 1.4. Las pruebas de saturación mostraron bajos niveles en todos los fragmentos amplificados, a excepción del intrón EPIC30. De esta forma, las secuencias de los genes codificantes seleccionados son adecuados para reconstrucciones filogenéticas. La prueba ILD no detectó incongruencias significativas entre los tres genes mitocondriales utilizados ($P = 0.24$) por lo que además de ser analizados de manera independiente fueron combinados en un análisis de evidencia total. El alineamiento final de los genes mitocondriales fue de 1632 pb, COI = 657 pb, Cytb = 414 pb y 16S = 561 pb. Los genes nucleares

fueron sólo analizados de manera independiente debido ya que incluían distintas especies a nivel de los grupos externos (Tabla 1.1).

3.1.2. Análisis filogenéticos

Los modelos de evolución de secuencias seleccionados como óptimos por el criterio de información *Akaike* para todos los fragmentos utilizados en este estudio se resumen en la Tabla 3.1. Además, en la misma tabla se incluye la composición de nucleótidos para cada marcador y la proporción de sitios invariantes en especies de *Nacella*.

M	M.S. ML	M.S. IB	F.A	F.C	F.G	F.T	PI
COI	TN+I+G	HKI+I+G	0.18	0.16	0.22	0.42	0.57
Cytb	TVM+I+G	GTR+I+G	0.28	0.21	0.14	0.35	0.46
16S	GTR+I+G	GTR+I+G	0.36	0.17	0.17	0.28	0.63
28S	TIM+I+G	GTR+I+G	0.20	0.27	0.33	0.18	0.86
Act	GTR+I+G	GTR+I+G	0.28	0.25	0.19	0.26	0.84
EPIC30	HKY+G	HKY+G	0.34	0.14	0.14	0.36	0.52

Tabla 3.1. Marcadores moleculares utilizados en las reconstrucciones filogenéticas, los correspondientes modelos de sustitución (M.S.) para Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB). Además se resume la composición de nucleótidos A = Adenina, C = Citocina, G = Guanina, T = Timina y la proporción de sitios invariantes PI.

Por una parte, todas las reconstrucciones filogenéticas lograron discriminar entre los grandes grupos de patelogastrópodos incluidos en los análisis, independiente del método utilizado (MP, ML e IB) o del fragmento amplificado. De esta forma, los marcador seleccionados, independiente de su origen (mtDNA o nucDNA) o su condición codificante o no codificante, discriminó entre las mayores agrupaciones taxonómicas de Patellogastropoda con altos valores soporte de *bootstrap* (MP y ML) y de probabilidad posterior (IB; Tabla 3.2 y Figuras 3.1-3.7). La monofilia de Patellidae (géneros *Cymbula*, *Helcion* y

Scutellastra), tuvo alto soporte de bootstrap y de probabilidad posterior. Similarmente, la monofilia, tanto de *Nacella* como de *Cellana*, además de su relación de hermandad (Nacellidae) fueron altamente apoyadas (p.p. = 1.00; bs = 100%) en todas mayoría de las reconstrucciones. Se detectaron marcadas diferencias genéticas entre las especies de *Nacella* provenientes de distintas provincias biogeográficas tales como Antártica, Kerguelén y Sudamérica. Además, los análisis filogenéticos aportan nueva información sobre las relaciones entre las especies de *Nacella* descritas en dichas provincias, sobre todo en los linajes de Kerguelén y Magallanes. Además, los resultados moleculares entregaron información sobre las relaciones en *Cellana*, y en especial en *C. ardosidea* de Isla Robinson Crusoe, Archipiélago de Juan Fernández.

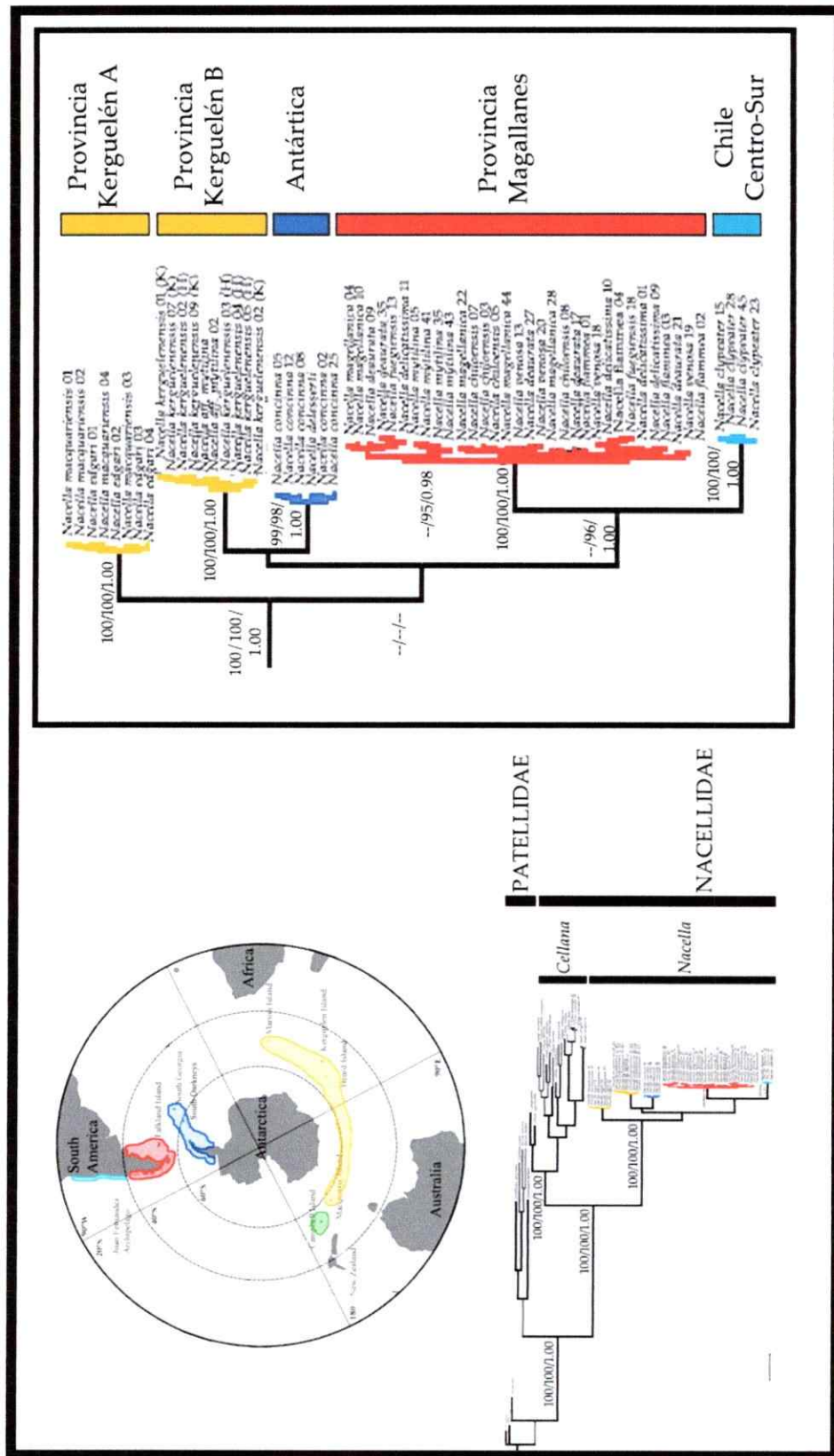


Figura 3.1. Análisis bayesiano (20x10⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen mitocondrial Citocromo c Oxidasa Subunidad I. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; p > 95%) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --).

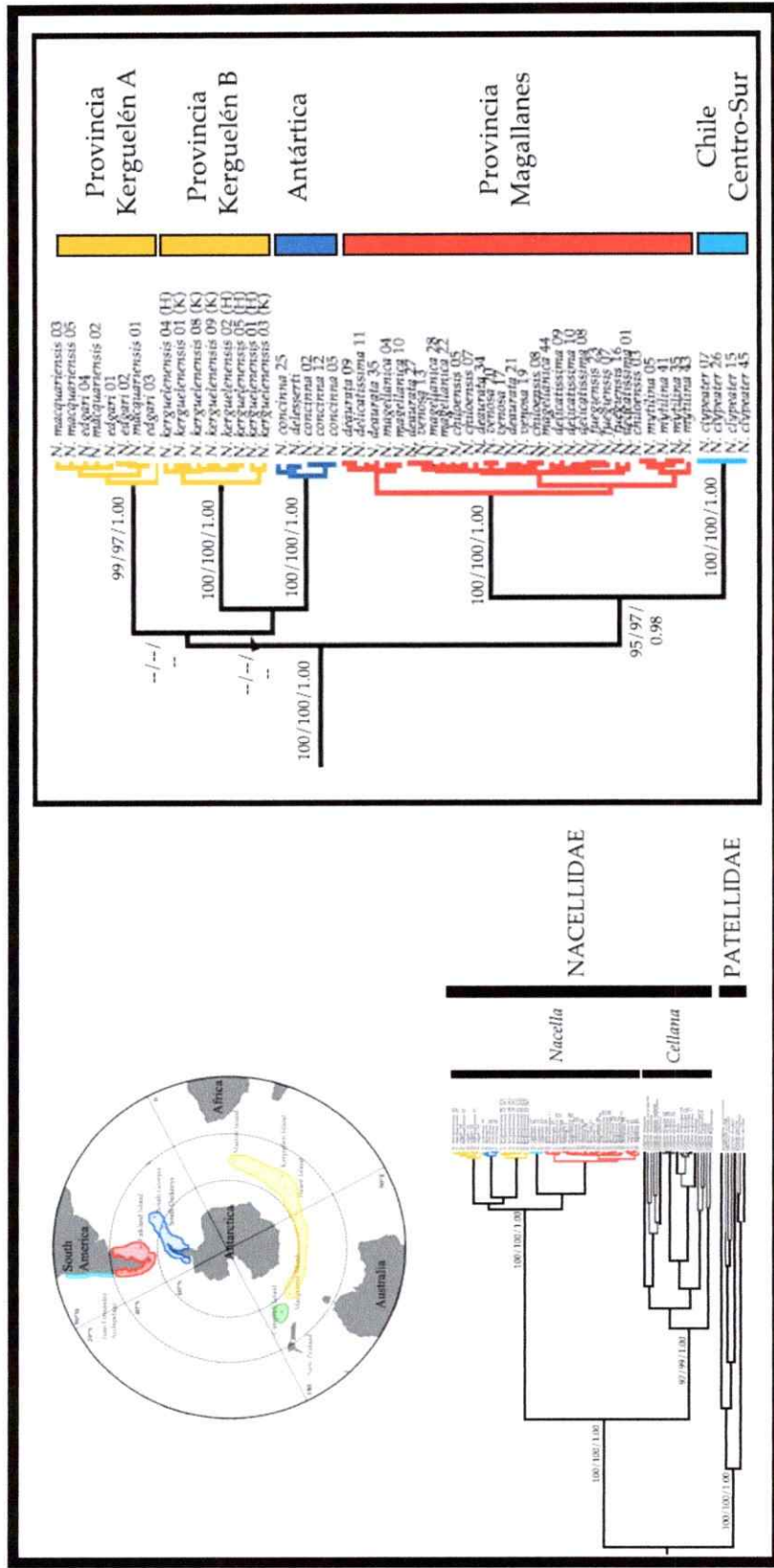


Figura 3.2. Análisis bayesiano (20×10^6 generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen mitocondrial Citocromo b. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --).

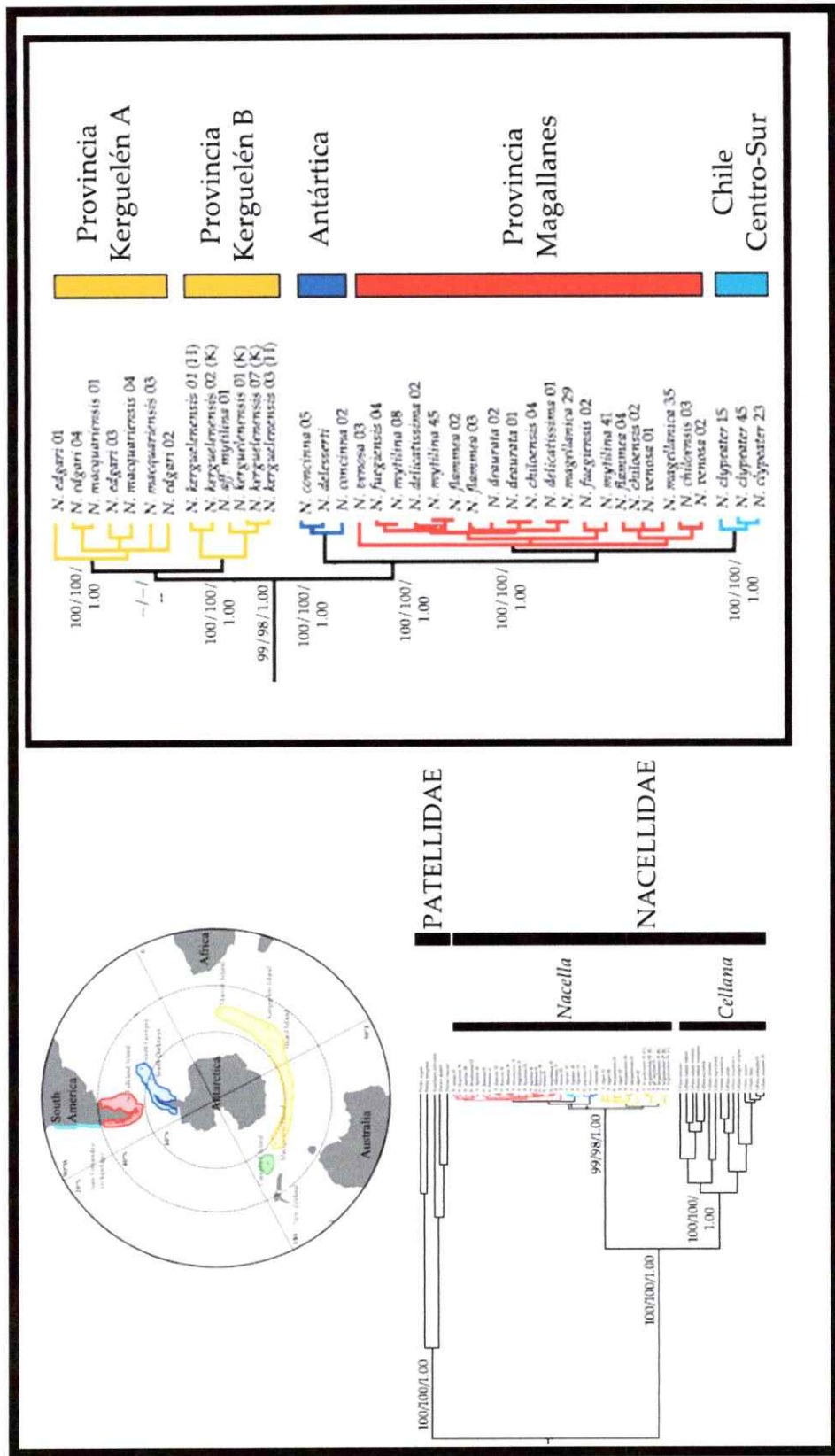


Figura 3.3. Análisis bayesiano (20x10⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellostropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen mitocondrial 16S rADN. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; p > 95%) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --).



Figura 3.4. Análisis bayesiano (20⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen nuclear 28S rDNA. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --).

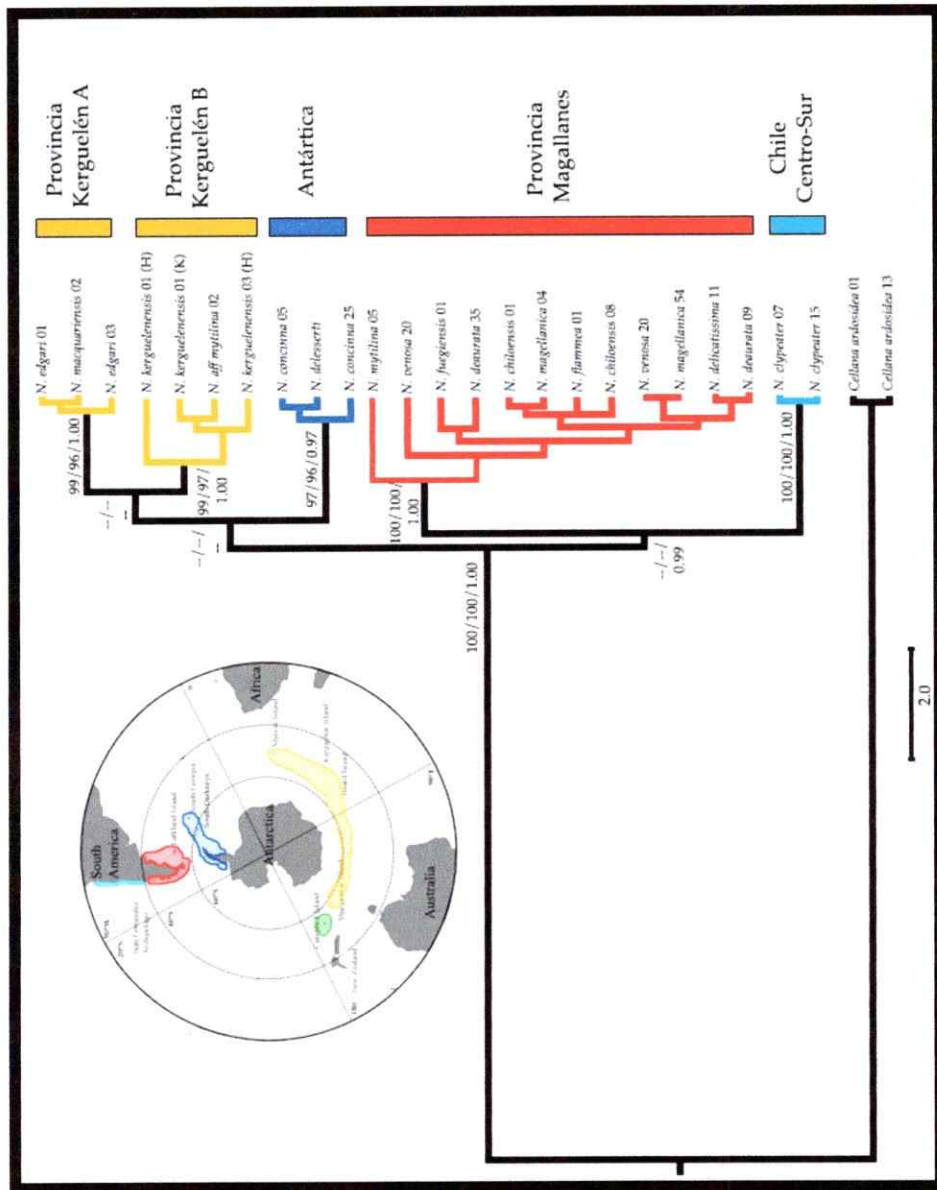


Figura 3.5. Análisis bayesiano (20⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellostropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del gen nuclear Actina. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --).

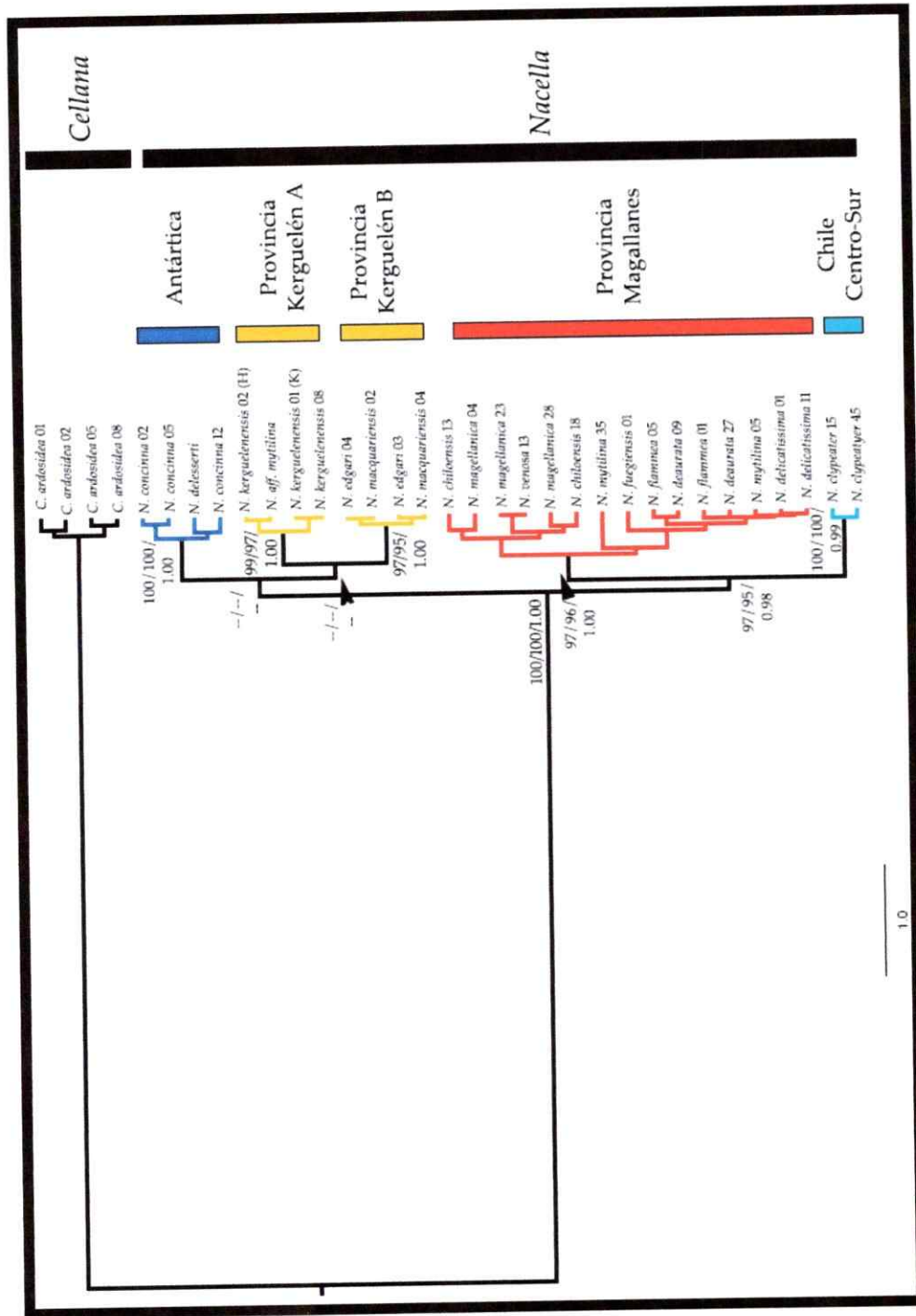


Figura 3.6. Análisis bayesiano (20⁶ generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellogastropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir desde las secuencias del fragmento intrónico nuclear EPIC30. Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (valores inferiores al 95% se señalan con --).

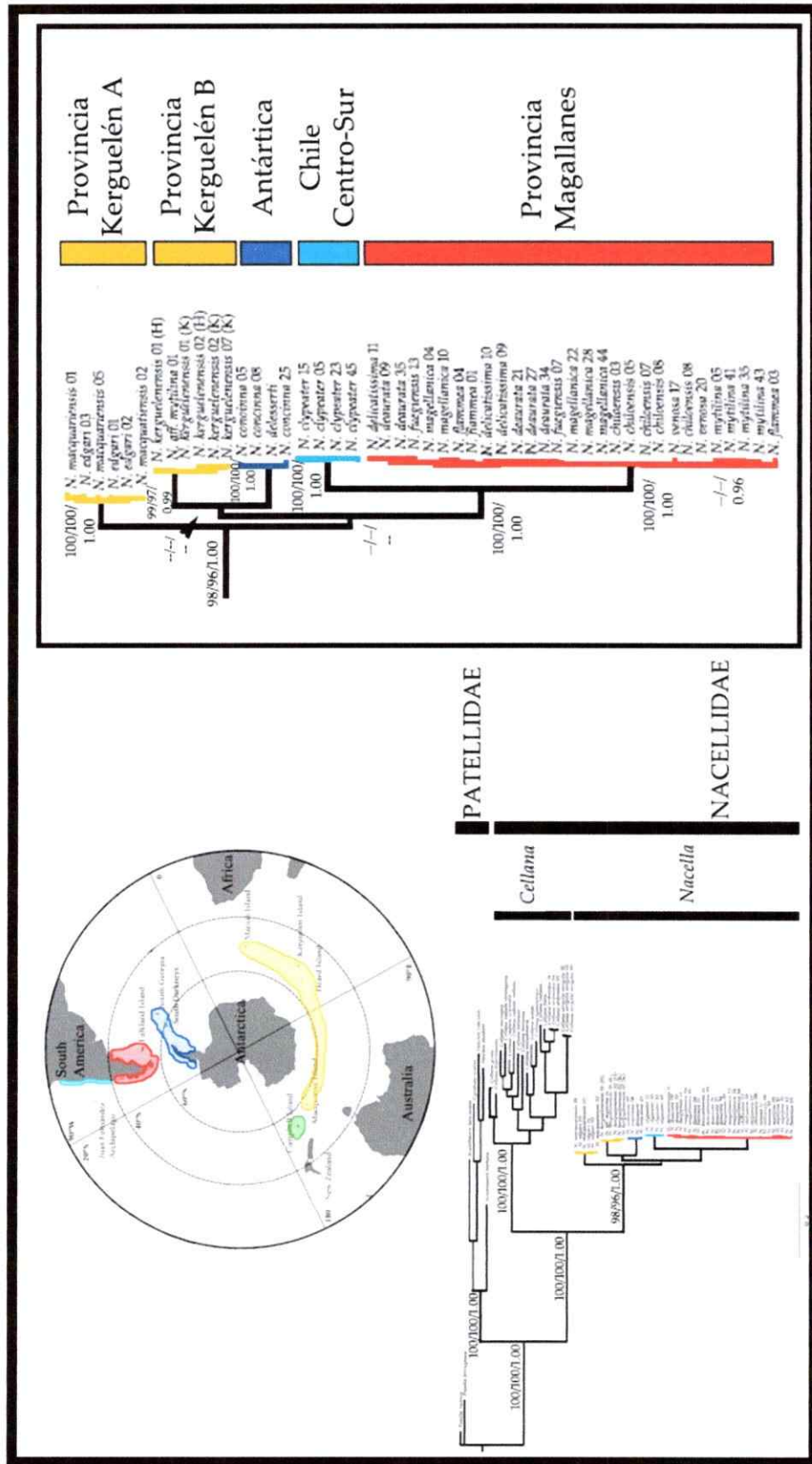


Figura 3.7. Análisis bayesiano (20^o generaciones muestreados cada 1000 generaciones) de las relaciones dentro de Patellostropoda con especial énfasis en Nacellidae. Hipótesis filogenética construida a partir de las secuencias de los genes mitocondriales COI, Cytb y 16S rDNA (Análisis de Evidencia Total). Los valores de bootstrap (MP/ML) y de probabilidad posterior (IB; $p > 95\%$) se indican a nivel de las ramas (los valores inferiores al 95% se señalan con --)

En cuanto a las relaciones dentro del grupo de interés (*Nacella*), tanto las reconstrucciones de Máxima Parsimonia como las de Máxima Verosimilitud (no mostrados) fueron congruentes con la topologías bayesianas para los principales nodos recuperados. En la tabla 3.2 se describen dichos clados y los valores promedios de los soportes bootstrap y de probabilidad posterior (Figura 3.8). La designación de dichos nodos se hizo en base a las especies incluidas en ellos y a la Provincia a la cual pertenecen.

Clado	Descripción	Análisis Filogenético					
		mtDNA Soporte			nucDNA Soporte		
		MP	ML	IB	MP	ML	IB
A	Patélidos, géneros <i>Cymbula</i> , <i>Helcion</i> , <i>Scutellastra</i> , <i>Nippoacmaea</i> , <i>Patelloidea</i> , <i>Patella</i>	100	100	1.00	n/a	n/a	n/a
B	Familia Nacellidae, géneros <i>Nacella</i> y <i>Cellana</i>	100	100	1.00	n/a	n/a	n/a
C	<i>Cellana</i> , distribución en el Indo Pacífico y Sur de Nueva Zelanda	99	100	1.00	n/a	n/a	n/a
D	<i>Nacella</i> , distribución antártica subantártica y Provincia Peruana	100	100	1.00	97	98	1.00
E	Los linajes sudamericanos, antártico y kergueleniano.	*	*	*	n/a	n/a	n/a
F	Ancastro común entre <i>N. concinna</i> - <i>N. delesserti</i> y <i>N. kerguelensis</i> .	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
G	Ancastro común entre <i>N. chypeater</i> y las especies Magallánicas de <i>Nacella</i> .	100	100	1.00	97	95	0.99
H	<i>Nacella macquariensis</i> - <i>N. edgari</i> , de Isla Heard e Isla Kerguelén, Provincia de Kerguelén	100	100	1.00	97	95	1.00
I	<i>Nacella kerguelensis</i> - <i>N. aff. mytilina</i> , proveniente de Isla Kerguelén e Isla Heard, Provincia de Kerguelén	100	100	1.00	96	97	1.00
J	<i>N. concinna</i> - <i>N. delesserti</i> , provenientes de Península Antártica e Isla Marión (Provincia Kerguelén).	100	100	1.00	98	97	1.00
K	<i>Nacella chypeater</i> , de Chile Centro-Sur.	99	98	1.00	99	100	1.00
L	<i>Nacella</i> Magallanes, incluye las especies descritas para la Provincia <i>N. chiloensis</i> , <i>N. deaurata</i> , <i>N. delicatissima</i> , <i>N. flammea</i> , <i>N. fuegiensis</i> , <i>N. magellanica</i> , <i>N. mytilina</i> , <i>N. venosa</i>	100	100	1.00	100	100	1.00

Tabla 3.2. Descripción de los principales nodos y linajes indicados en las figuras 15-20. Los asteriscos (*) indican los nodos no soportados., n/a = asociación no aplicable en todos los marcadores utilizados

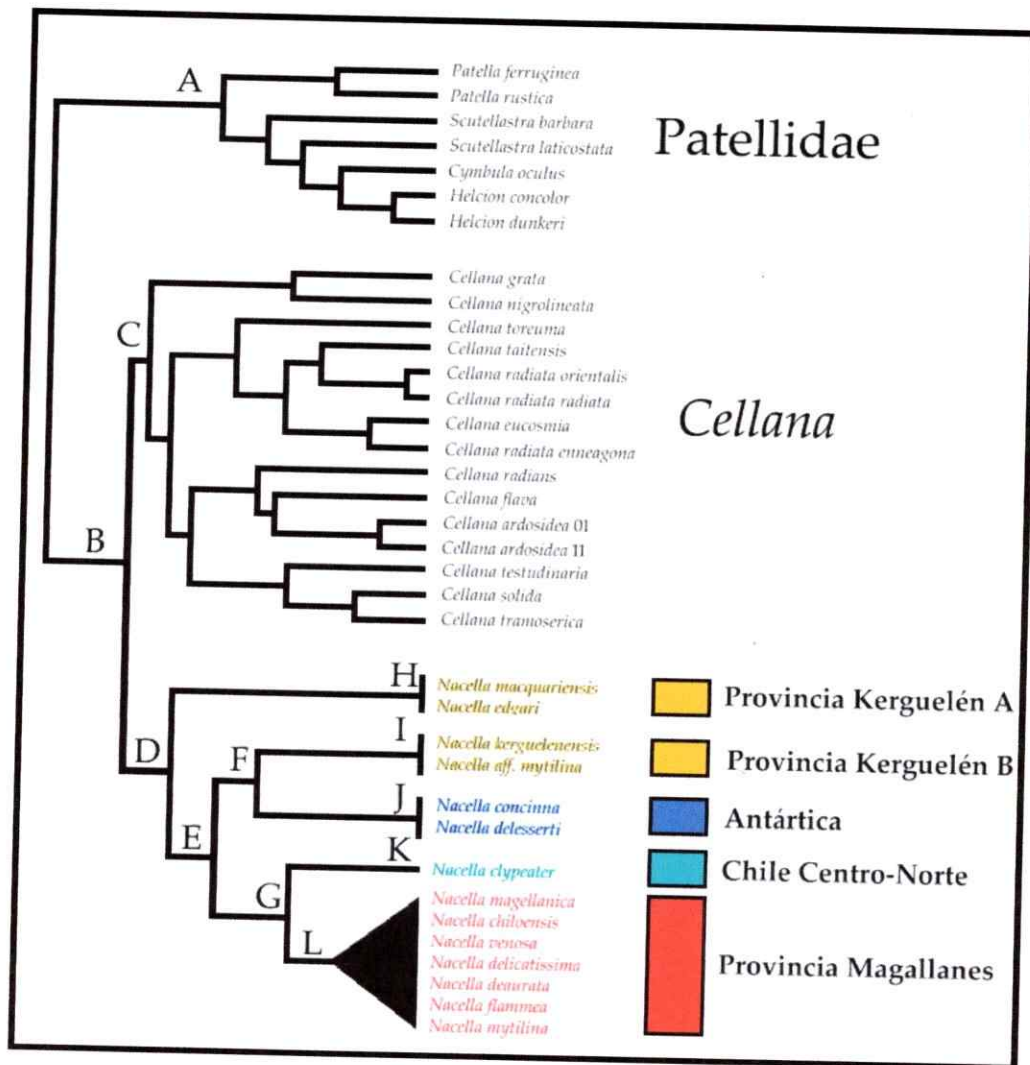


Figura 3.8. Hipótesis esquemática que muestra los principales nodos detectados en Patellostropoda (Tabla 3.2), construido a partir de las secuencias de los genes mtDNA (COI) y nucDNA (28S).

Todas las reconstrucciones confirmaron la posición de la escasamente estudiada, *Cellana ardosidea* proveniente del Archipiélago de Juan Fernández, al interior del género *Cellana* y estrechamente relacionada a las especies neocelandesas del género, específicamente a *C. flava*.

En *Nacella*, el nivel de resolución de las reconstrucciones varió según el marcador utilizado y el método de reconstrucción empleado. Los análisis de Máxima Parsimonia y Máxima Verosimilitud no entregaron valores altos de soporte a la diversificación temprana de las especies actuales del género *Nacella* incluidas en los análisis, específicamente entre los clados formados por a) *N. macquariensis*-*N. edgari*, b) *N. concinna*-*N. delesserti* y c) *N. kerguelenensis*-*N. aff. mytilina*. Las reconstrucciones bayesianas tampoco entregaron valores altos de soporte de probabilidad posterior para las relaciones entre dichos linajes. No obstante, los análisis bayesianos basados en las secuencias COI (Fig. 3.1) sugieren que el grupo más ancestral del género estaría formado por la asociación *N. macquariensis*-*N. edgari* (p.p. = 0.87), el cual se habría separado tempranamente de los restantes linajes del género. Los análisis basados en secuencias de Cytb (Fig. 3.2) sugieren que la evolución temprana de *Nacella* se caracterizaría por un evento cladogenético que habría generado la formación de dos grandes grupos, a) especies de *Nacella* de la Provincia de Kerguelén y Antártica y b) especies sudamericanas del género, incluidas *N. clypeater* de Chile Centro-Norte y las especies magallánicas. La reconstrucción filogenética obtenida a partir de las secuencias de los tres genes mitocondriales (Fig. 3.7) apoyan las relaciones obtenidas con COI (Fig. 3.1) donde el clado formado por *N. macquariensis*-*N. edgari* sería el más ancestral en la evolución de *Nacella*, pero

con un soporte de probabilidad posterior de sólo 0.90. En general, resultados obtenidos desde de las secuencias mitocondriales muestran que los linajes de *Nacella* provenientes de distintas provincias del Océano Austral (Kerguelén, Antártica y Sudamérica) muestran marcadas diferencias genéticas entre ellos. Las reconstrucciones obtenidas a partir de los genes menos variables, 16S y Actina generaron topologías distintas a las observadas con COI y Cytb. El gen 16S fue el que entregó la topología más disímil de todos los marcadores utilizados en la que se observa un clado más ancestral formado por las especies de Kerguelén el cual se separa del grupo formado por las especies sudamericanas y antártica (Fig. 3.3). La topología generada de la reconstrucción con secuencias de Actina mostró un clado formado por las especies provenientes de la provincia de Kerguelén (*N. macquariensis*-*N.edgari* y *N. kerguelenensis*-*N. aff. mytilina*) y de la Península Antártica (*N. concinna*), siendo ésta última la especie más ancestral. Posteriormente, aparece el clado que incluye a las especies sudamericanas de *Nacella* y finalmente la diversificación del género en Magallanes. No obstante, los soportes de *bootstrap* y de probabilidad posterior de tal asociación fueron bajos. El marcador intrónico EPIC30 (Fig. 21) mostró las mismas relaciones que los genes anteriormente descritos, pero los respectivos soportes también fueron bajos. Es importante señalar, que el número promedio de diferencias entre los linajes ancestrales del género (Provincia de Kerguelén A = *N. macquariensis*-*N.edgari*; Provincia Kerguelén B = *N. kerguelenensis*-*N. aff. mytilina*, y Antártica = *N. concinna*-*N. delesserti*) fueron muy similares entre si, lo que dificulta la resolución de las relaciones cladogenéticas entre ellas.

Las especies magallánicas de *Nacella* mostraron niveles extremadamente altos de similitud genética entre ellas. Esto generó diferencias a nivel de las posiciones y de las relaciones entre dichos taxa terminales en todas las reconstrucciones de *Nacella*. Entre las especies magallánicas, la única unidad que mostró un cierto grado de monofilia recíproca en la mayoría de los análisis fue *N. mytilina*. Más aún, los genes 16S (mtDNA; Fig. 3.3) y Actina (nucDNA; Fig. 3.5) mostraron ausencia total de variación entre las unidades magallánicas de *Nacella* consideradas en este estudio. El intrón EPIC30 es el único marcador que logró dar un cierto grado de resolución a las asociaciones entre las especies magallánicas reconociendo dos grupos, uno formado por las especies *N. chilensis*, *N. magellanica*, y *N. venosa* (p.p. = 0.97) y otro que contiene a las restantes especies (*N. deaurata*, *N. delicatissima*, *N. flammea*, *N. fuegiensis*, y *N. mytilina*). Independiente a la ausencia de resolución de las relaciones ancestrales en *Nacella*, todos los marcadores utilizados reconocen al grupo de especies magallánicas como el más derivado en la evolución del género, con altos soporte de *bootstrap* (MP y ML) y de probabilidad posterior (nodo L, tabla 3.2). Sin embargo, los resultados con este marcador deben ser considerados con precaución ya que este mostró altos niveles de saturación y el número de ejemplares analizados es aún muy bajo.

Los genes mitocondriales COI y Cytb analizados de manera independiente y concatenada (Figuras 3.1-3.2 y 3.7), sugieren que el grupo más ancestral de *Nacella* estaría formado por la asociación *N. macquariensis* y *N. edgari*. Posteriormente, se observa la formación de un clado formado por dos grupos, *N. concinna*-*N. delesserti* (Antártica - Isla Marión) y *N. kerguelensis* - *N. aff.*

mytilina (Isla Kerguelén e Isla Heard). Luego, se forma un clado que incluye a las especies sudamericanas de *Nacella*, *N. clypeater* (Provincia Peruana) y las especies magallánicas. Finalmente, el clado más derivado incluye a todas las especies descritas para la Provincia Magallánica (*N. chiloensis*, *N. deaurata*, *N. delicatissima*, *N. flammea*, *N. fuegiensis*, *N. magellanica*, *N. mytilina*, *N. venosa*).

Las especies *N. kerguelenensis* y *N. macquariensis*, recolectadas desde la misma localidad (Isla Heard), mostraron marcadas diferencias genéticas entre ellas (7.5 %), comparables a las obtenidas entre especies de *Nacella* provenientes de distintas regiones biogeográficas como Antártica y Sudamérica. Otras comparaciones mostraron que unidades definidas como especies distintas muestran niveles muy bajos de divergencia genética entre ellas. Las diferencias genéticas entre las especies *N. edgari* y *N. macquariensis* provenientes de Isla Kerguelén e Isla Heard, respectivamente, no permiten asignarlas como unidades distintas. Muchos de los marcadores seleccionados no detectaron diferencias entre ambas especies y ninguna de las reconstrucciones (MP, ML o IB) detectó monofilia recíproca entre ambos taxa (Figs. 3.1-3.7). Similarmente, todas las reconstrucciones detectaron una estrecha relación entre el morfotipo similar a *N. mytilina* de Magallanes (designada como *N. aff. mytilina*) proveniente de Isla Kerguelén con la especie *N. kerguelenensis* de la misma isla y de Isla Heard. Ninguno de los marcadores utilizados detectó monofilia recíproca entre ambas unidades (Figs 3.1 – 3,7) y la identidad genética entre ellas cae dentro del rango de variación intraespecífica en nacélidos. La similitud genética detectada entre *N. concinna* y *N. delesserti*, provenientes de regiones distantes como Antártica e Isla Marión (Provincia Kerguelén), también caen dentro del rango de variación

intraespecíficas en nacélidos (0.29 %). Sin embargo, este resultado debe ser interpretado con precaución ya que en los análisis se incluyó un sólo ejemplar de *N. delesserti* proveniente de Isla Marión. Finalmente y como se mencionó anteriormente, las ocho especies de *Nacella* provenientes de la Provincia Magallánica mostraron niveles extremadamente bajos de divergencia genética entre ellas. A excepción de *N. mytilina*, ninguna de las restantes especies mostró monofilia recíproca al nivel de resolución de los marcadores utilizados.

Los fragmentos nucleares utilizados entregaron topologías similares a las de los genes mitocondriales en términos de las relaciones entre las unidades descritas para el género *Nacella*. Cada uno de ellos discriminó los grandes grupos en la evolución de *Nacella* con alto soporte de *bootstrap* y de probabilidad posterior (Tabla 3.2, nodos H-L). Además, todos los fragmentos nucleares corroboraron las observaciones realizadas con los marcadores mitocondriales sobre las relaciones entre *N. macquariensis*-*N. edgari*, *N. kerguelensis*-*N. aff. mytilina*, y *N. concinna*-*N. delesserti*. Además, los tres fragmentos nucleares mostraron bajos niveles de variabilidad entre las especies magallánicas analizadas (Figs. 3.4 – 3,6).

3.1.3. Estimación de los tiempos de divergencia

Los resultados de las estimaciones de tiempo de divergencia obtenidos mediante las aproximaciones utilizadas (Método Bayesiano relajado y Reloj Molecular estricto) fueron congruentes y comparables entre si (Figs. 3.8 – 3.11).

Los tiempos de divergencia obtenidos a través del método Bayesiano Relajado (MULTIDIVTIME/MULTIDISTRIBUTE) para los genes mitocondriales COI y Cytb fijan la separación de *Nacella* y *Cellana* (Nacellidae) durante el Mioceno Medio (14.3 ± 3.4 Ma; Fig 3.8). En base a estos análisis el clado formado por *N. macquariensis*-*N. edgari* se habría separado luego de la separación de Nacellidae, a fines del Mioceno tardío (9.3 ± 1.8 Ma). Un segundo clado que contiene a *N. concinna*-*N. delesserti* (Antártica e Isla Marión), *N. kerguelenensis* y las especies sudamericanas habría aparecido 8.5 ± 1.3 Ma. Luego, aparece un tercer clado que incluye a las especies *N. kerguelenensis* y *N. concinna*-*N. delesserti* hace 7.8 ± 1.3 Ma. Hace 5.2 ± 1.1 Ma aparece un clado al origen de las especies sudamericanas, *N. clypeater* y todas las especies magallánicas. Finalmente, se observa una radiación pleistocénica de *Nacella* en la región Magallánica (entre 2.0 - 0.2 Ma; Fig. 3.8). Esta secuencia de eventos de especiación fue en general bien apoyada por altos valores de soporte de *bootstrap* y de probabilidad posterior, excepto en los linajes ancestrales del género como la separación de *N. macquariensis*-*N. edgari* de las restantes especies de género y *N. kerguelenensis* y *N. concinna*-*N. delesserti*.

Las estimaciones utilizando el método de Reloj Molecular estricto en los genes COI, Cytb y 28S mostraron un escenario evolutivo similar al obtenido mediante el método bayesiano (Figs. 3.10 – 3.11). Las relaciones principales de

los grupos de *Nacella* se mantienen utilizando esta aproximación pero los tiempos estimados varían en relación al otro método. Según esta aproximación, la separación de *Nacella-Cellana* (Nacellidae) habría ocurrido durante el Oligoceno-Mioceno, entre 32-18.5 (COI) y Cytb situó dicho evento entre 29-17 Ma (Oligoceno-Mioceno). De esta forma, la diversificación de las especies actuales de *Nacella* habría ocurrido después de la separación de las masas continentales en el Océanos Austral en tres etapas: una aparición entre 7.2-4.3 Ma (COI) y 6.0-4.8 Ma (Cytb) de los linajes ancestrales de *Nacella* (*N. concinna*-*N. delesserti*, *N. macquariensis*-*N. edgari*, y *N. kerguelenensis*). El origen de *Nacella edgari*-*N. macquariensis* sería hace 4.8 Ma (5.8 - 3.6 Ma), *N. kerguelenensis*-*N. concinna* hace 4.4 Ma. Luego, habría ocurrido una segunda diversificación del género en Sudamérica a partir del ancestro común entre *N. clypeater* y las especies Magallánicas hace 4.6 Ma (5.0-2.5 Ma COI; 4.8-2.5 Ma Cytb) y finalmente se tiene una diversificación muy reciente de las especies en Magallanes hace 0.8 Ma (1.2-0.2 Ma COI, 1.0-0.1 Ma). Por lo tanto, el origen de las especies actuales de *Nacella* incluidas en los análisis habría ocurrido a fines del Mioceno y principios del Plioceno y la diversificación del género en Magallanes sería un evento muchísimo más reciente, durante el Pleistoceno.

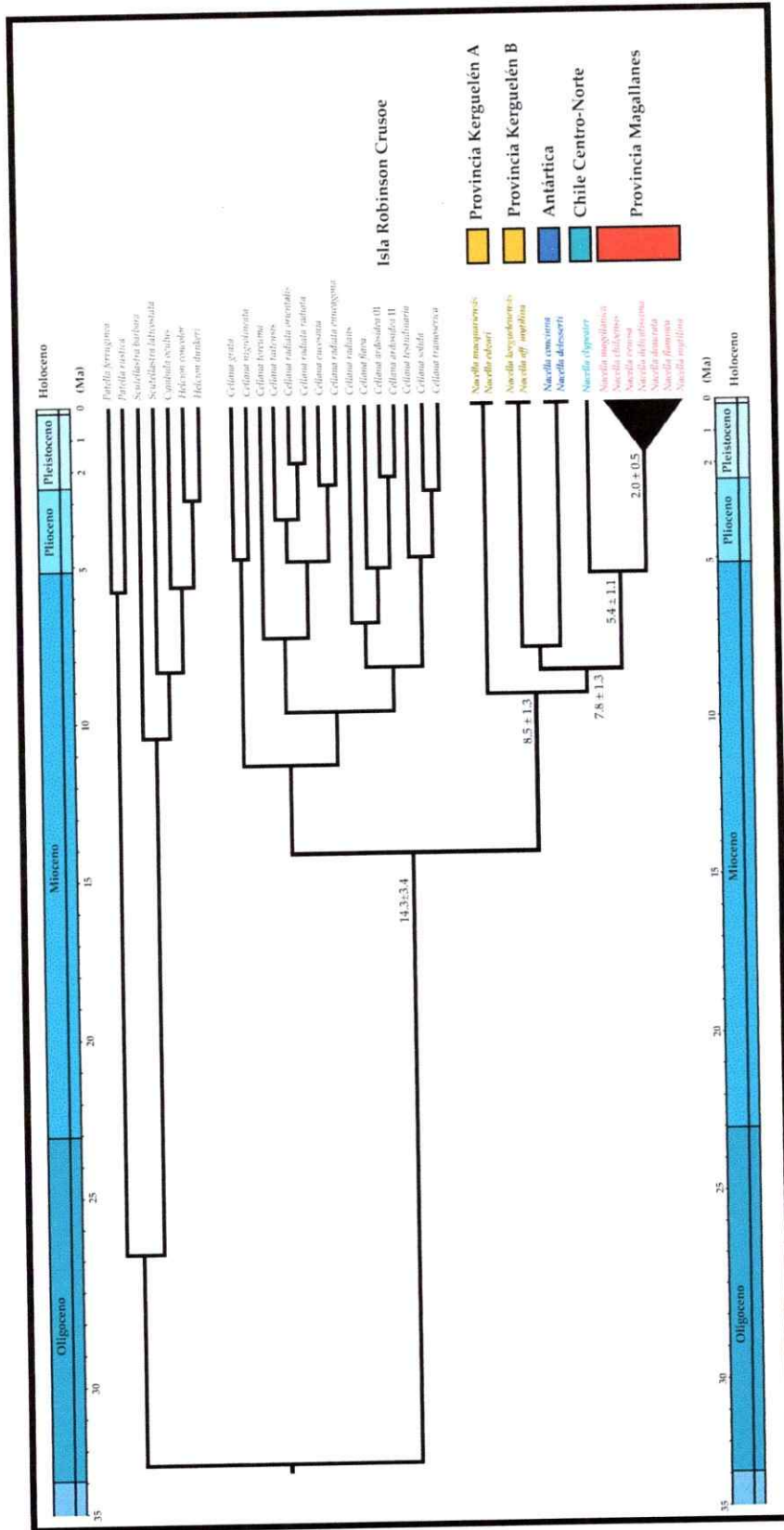


Figura 3.9. Árbol linealizado que muestra las estimación de los tiempos de divergencia en Patellogastropoda utilizando un método bayesiano relajado para datos multilocus (MULTIDIVTIME/MULTIDISTRIBUTE), construida a partir de las secuencias concatenadas de COI y Cytb. Se indican las principales fechas estimadas en la evolución del género *Nacella*.

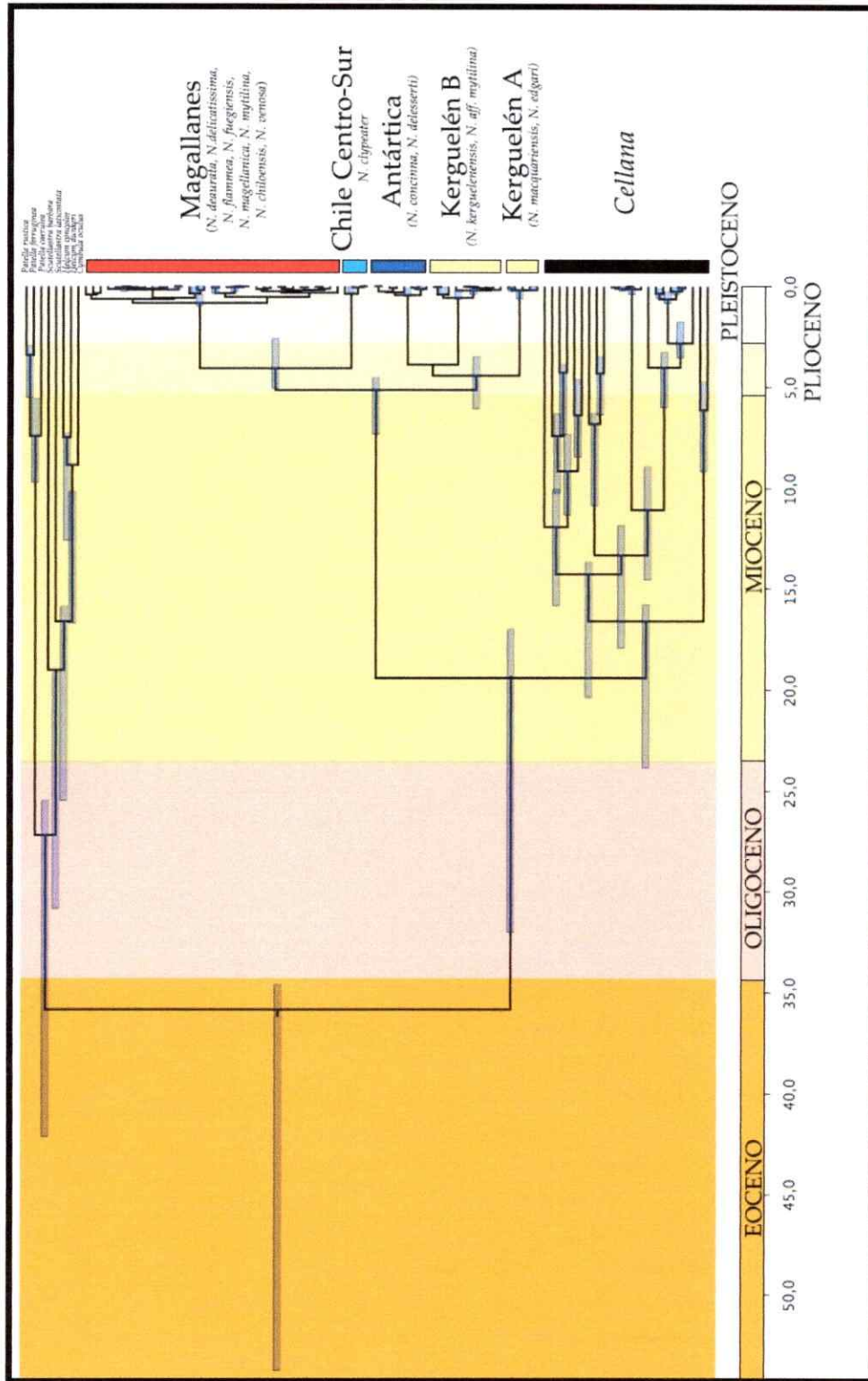


Figura 3.10. Relaciones filogenéticas dentro de Patellostomatopoda. Hipótesis filogenético basada en inferencia bayesiana basado que incluye los tiempos de divergencia a partir de los análisis de reloj molecular estricto mediante el gen COI. Las barras azules indican los intervalos de confianza de las estimaciones de tiempo de divergencia.

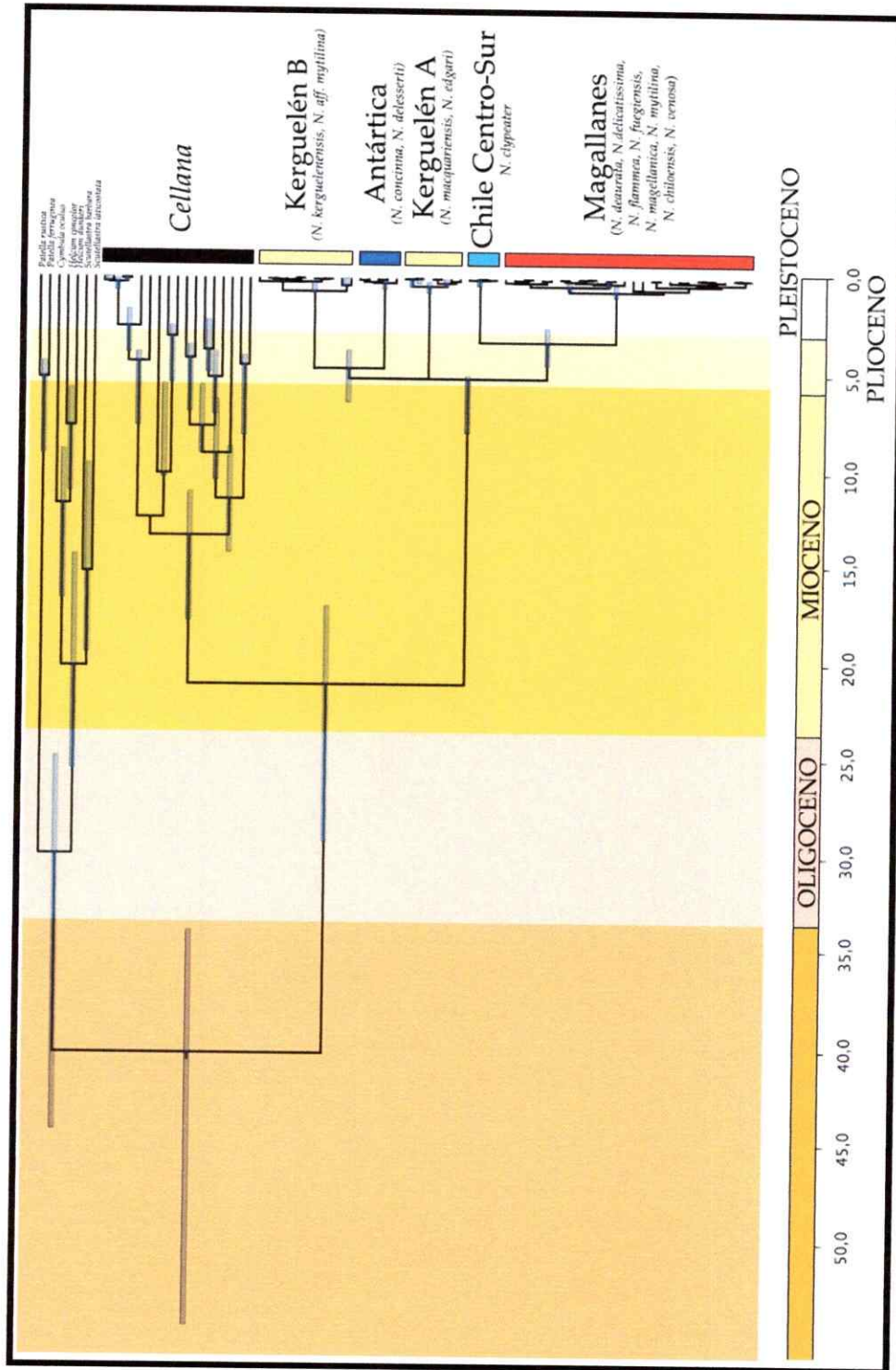


Figura 3.11. Relaciones filogenéticas dentro de Patellopsopoda. Hipótesis filogenético basada en inferencia bayesiana basado que incluye los tiempos de divergencia a partir de los análisis de reloj molecular estricto mediante el gen Cytb. Las barras azules indican los intervalos de confianza de las estimaciones de tiempo de divergencia.

3.2. Análisis genético comparativo en las especies de *Nacella* de la Provincia Magallánica

3.2.1 Comparaciones entre especies de Punta Santa Ana y Puerto Montt

Para la comparación entre especies de *Nacella* provenientes de la Provincia Magallánica, se amplificó un fragmento de 669 pb en 203 ejemplares de las especies *N. chilensis* ^(a), *N. deaurata* ^(b), *N. flammea* ^(b), *N. fuegiensis* ^(b), *N. magellanica* ^(b), *N. mytilina* ^(b), *N. venosa* ^(a); 45 ejemplares provenientes de ^(a) Puerto Montt y 158 de ^(b) Punta Santa Ana (Estrecho de Magallanes). El número de especímenes analizados por especie y sus correspondientes índices de diversidad genética, se resumen en la tabla 3.3. A nivel del conjunto total de secuencias no se detectó la presencia de indels, como es esperable al trabajar con regiones codificantes. A través de las respectivas pruebas, no se detectó saturación de las secuencias a nivel de la tercera letra del codón. De un total de 220 amino ácidos registrados se detectó un solo cambio aminoacídico, de Leucina (L) a Fenilalanina, ambos amino ácidos neutros no polares. Dicho cambio fue una transición (C – T) en la tercera letra del codón 185 (de 223 en total; Tamura *et al.*, 2007).

Especie	N	K	H	S	Π	π	T _D	Fu/F _s
<i>N. chilensis</i>	23	12	0.81	11	1.336	0.0019	-1.87*	-9.57***
<i>N. venosa</i>	22	11	0.82	11	1.459	0.0021	-1.78*	-7.53***
<i>N. magellanica</i>	20	12	0.87	17	2.374	0.0035	-1.88*	-6.64***
<i>N. dearrata</i>	25	10	0.78	12	2.980	0.0047	-1.64	-2.00
<i>N. fuegiensis</i>	28	7	0.61	10	2.794	0.0041	0.28	0.49
<i>N. flammea</i>	31	15	0.89	17	2.963	0.0044	-1.03	-6.59***
<i>N. mytilina</i>	54	8	0.39	8	0.559	0.0008	-1.80*	-5.58**

Tabla 3.3. Número de ejemplares por especie y los respectivos índices de diversidad genética basados en secuencias de mtDNA (COI). Donde n = Número de especímenes analizados, K = número de haplotipos encontrados; H = diversidad haplotípica; S = sitios polimórficos; Π = número de diferencias de nucleótidos; π = diversidad nucleotídica. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$. T = Índice de Tajima D .

Los resultados obtenidos a partir de las comparaciones entre especies magallánicas de *Nacella*, corroboran las observaciones realizadas en las reconstrucciones filogenéticas, es decir, se encontró un estrecho grado de similitud genética entre todas las unidades analizadas. A nivel global, las morfoespecies magallánicas muestran bajos niveles de diversidad genética; sólo 50 caracteres (7.4%) fueron variables y de éstos sólo 26 (3.8%) resultaron parsimoniosamente informativos. Las secuencias fueron ricas en Adenina-Timina (A-T; 60,5%) comparadas al contenido promedio de Guanina-Citosina (39.5%).

Los niveles de diversidad haplotípica fueron variables y dependientes de la especie, sus valores fluctuaron entre 0.392 (*N. mytilina*) y 0.892 (*N. flammea*). Similarmente, el número de haplotipos y de sitios polimórficos varió entre especies (ver tabla 3.3). En general, la especie que mostró la menor diversidad genética fue *N. mytilina*, a pesar de que se incluyeron más de 50 ejemplares en los análisis. Finalmente, el número de diferencias de nucleótidos (Π) y la

diversidad nucleotídica (π) fueron variables entre especies y los menores valores registrados fueron en la especie *N. mytilina* (0.559 y 0.0008, respectivamente).

Las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} entre las diferentes unidades analizadas de Punta Santa Ana mostraron valores significativos, a excepción de aquella entre las especies *N. deaurata* y *N. fuegiensis* ($p < 0.001$, Tabla 3.4). De esta forma, ambos índices mostraron la existencia de diferenciación genética entre los conjuntos de individuos asociados a las especies nominales de *N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica* y *N. mytilina*, provenientes de Punta Santa Ana en el Estrecho de Magallanes. Así, la mayoría de las unidades descritas para dicha localidad serían distintas en términos de las frecuencias de sus haplotipos.

Especie	N.de	N.fue	N.mag	N.myt	N.fue
<i>N. deaurata</i> (N.dea)	****	-0.003	0.124	0.449	0.145
<i>N. fuegiensis</i> (N.fue)	-0.022	****	0.239	0.518	0.231
<i>N. magellanica</i> (N.mag)	0.104	0.174	****	0.417	0.089
<i>N. mytilina</i> (N.myt)	0.681	0.694	0.716	****	0.378
<i>N. flammea</i> (N.fla)	0.174	0.177	0.228	0.577	****

Tabla 3.4. Valores de G_{ST} (bajo la diagonal) y de N_{ST} (sobre la diagonal) entre especies de *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes. 20200 iteraciones, valores significativos ($p < 0.001$) en rojo.

Las mismas comparaciones entre las especies *N. chilensis*, *N. venosa* (Puerto Montt) con su supuesta especie putativa *N. magellanica* (Magallanes) no mostraron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas (Tabla 3.5).

Especie	N _{mag}	N _{chi}	N _{ven}
<i>N. magellanica</i> (N _{mag})	***	0.0234	0.2198
<i>N. chilensis</i> (N _{chi})	-0.0018	***	-0.0323
<i>N. venosa</i> (N _{ven})	0.0024	0.0353	***

Tabla 3.5. Valores de G_{ST} (bajo la diagonal) y de N_{ST} (sobre la diagonal) entre *N. chilensis* y *N. venosa* provenientes de Puerto Montt y *N. magellanica* (Magallanes). 20200 iteraciones, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas.

La comparación entre las unidades *N. chilensis* y *N. venosa* (Puerto Montt) mostraron altos niveles de similitud genética entre ellas. Paralelamente, a pesar de la distancia geográfica que separa a los lugares de muestreo (Puerto Montt al Estrecho de Magallanes), tanto *N. chilensis* como *N. venosa*, no mostraron diferencias significativas con la especie *N. magellanica*.

A pesar de la alta similitud genética registrada entre las unidades magallánicas, las redes de haplotipos mostraron genealogías variables dependiendo de la especie (Fig 3.12 A-E). Las genealogías de *N. deaurata* (Fig. 3.12A) y *N. fuegiensis* (Fig. 3.12C) fueron similares entre si con la presencia de un haplotipo dominante (H1) compartido por ambas especies a partir del cual aparecen haplotipos de baja frecuencia relacionados. En ambas especies, se distingue un grupo de haplotipos separados por al menos cuatro pasos mutacionales, H8 y H5 en *N. deaurata* y H2, H4 y H7 en *N. fuegiensis* (Figs. 3.12A y C). Estos resultados corroboran la gran similitud genética encontrada entre ambas especies en las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} . La especie más variable en términos genéticos fue *N. flammea* con 15 haplotipos detectados (Fig. 3.12E), mientras que la que mostró menos variabilidad fue *N. mytilina* (Fig. 3.12D), tal como lo evidenciaron los respectivos índices de diversidad genética

(Tabla 3.3). La red de haplotipos de *N. mytilina* se caracterizó por la presencia de una genealogía corta en forma de estrella, con un haplotipo dominante (H1; Fig. 3.12D) presente en el 78% de los ejemplares analizados. A partir de este haplotipo surgen otros de baja frecuencia separados por no más de dos cambios mutacionales. Los haplotipos dominantes de *N. flammea* (H3), y de *N. mytilina* (H2) no fueron compartidos con otras especies del género mientras que el haplotipo dominante de *N. magellanica* (H3, Fig 3.12B) fue compartido con las especies *N. flammea* (H8, Fig. 3.12E) y *N. deurata* (H1, Fig 3.12A), corroborando una estrecha relación entre ellas (H1, Fig 3.12F). Al unir las genealogías de las cinco especies en un mismo análisis (Fig. 3.12F), sin considerar a H24 (específico de *N. mytilina* y cuya frecuencia fue de 26.5%), se observa que el haplotipo más frecuente H1 esta presente en el 19% de los ejemplares y es compartido por todas las especies, a excepción de *N. mytilina*. Como lo propusieron Posada & Crandall (2001), este haplotipo debería corresponder al más ancestral, mientras que los más derivados se unen a éste con una máxima longitud de ramas de 11 pasos mutacionales (H33). Se distinguen haplotipos de frecuencia media H2 (7.0%), H5 (6.3%), y H23 (5.7%), los que son compartidos por dos o tres especies y los restantes haplotipos son de baja frecuencia y especie-específicos en la mayoría de los casos (Fig 26F).

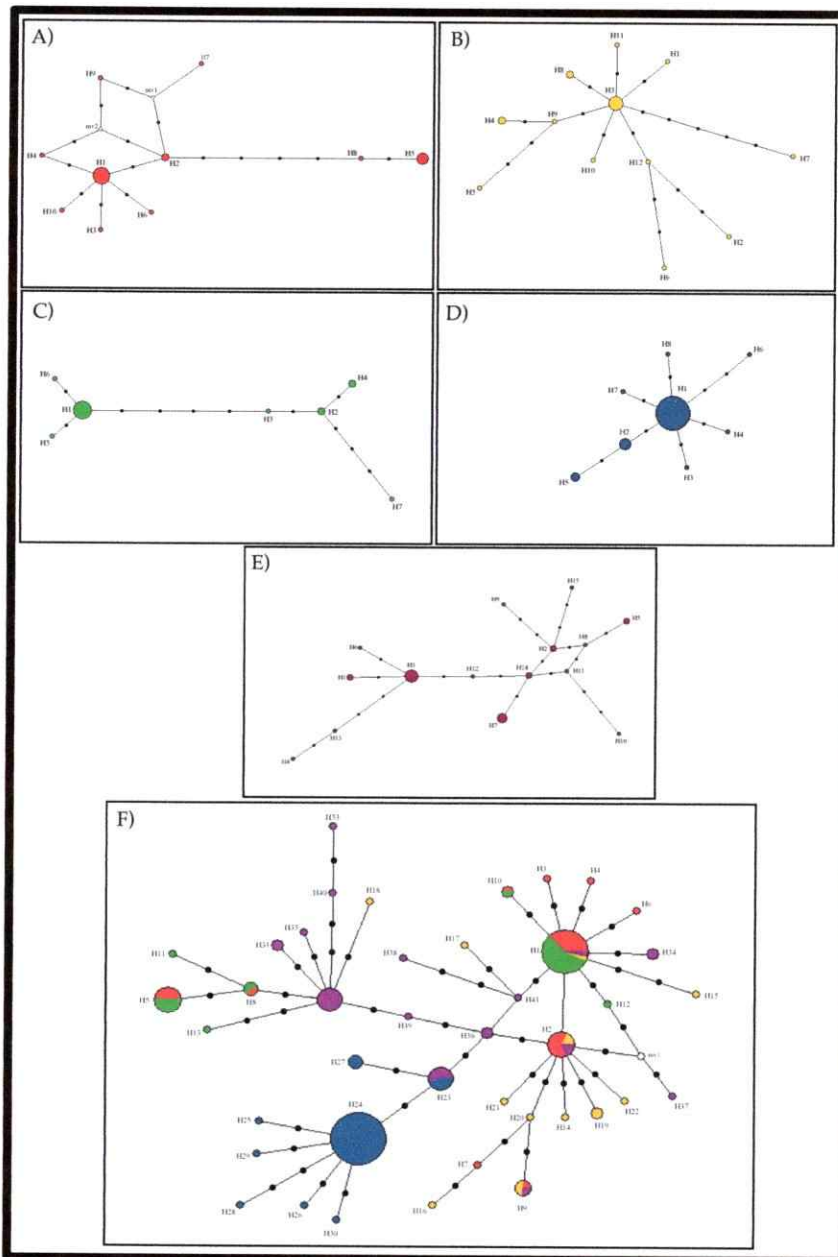


Figura 3.12. Red de haplotipos obtenida a partir de las secuencias de COI desde 158 ejemplares de *Nacella* provenientes de Punta Santa Ana, Estrecho de Magallanes. Redes de haplotipos de las especies A) *N. deaurata*; B) *N. magellanica*; C) *N. fuegiensis*; D) *N. mytilina*; E) *N. flammea*. Los haplotipos se representan por un círculo de color especie-específico cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. En la figura F) los colores indican: Rojo = *N. deaurata*; Amarillo = *N. magellanica*; Verde = *N. fuegiensis*; Morado = *N. flammea*; Azul = *N. mytilina*. Los símbolos ● = mutaciones específicas y ○ = vectores medios (mv).

La red de haplotipos de las especies *N. chilensis*, *N. venosa* y *N. magellanica* se muestran en la figura 3.13. Las genealogías de haplotipos de las especies *N. chilensis* (Fig 3.13A) y *N. venosa* (Fig 3.13B) resultaron muy similares entre ellas y se caracterizan por su forma de estrella con un haplotipo dominante (H1) presente en el 43% (*N. chilensis*) y 41% (*N. venosa*) de los ejemplares. En ambas especies se observa que a partir de H1 surgen haplotipos de baja frecuencia separados por no más de dos pasos mutacionales. Al ensamblar las genealogías de ambas especies con la obtenida para *N. magellanica* en el Estrecho de Magallanes (Fig. 3.13C), se observa que el haplotipo dominante presente en ambas especies corresponde al más frecuente de *N. magellanica* (H1). Haplotipos de frecuencia media H27 y H38 fueron también compartidos por las tres especies. Sólo cinco haplotipos únicos H42, H44, H47 H48 y H50 (3.3%) fueron encontrados en *N. chilensis* y *N. venosa*. Estos resultados corroboran las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} que detectaron ausencia de estructuración entre las tres supuestas unidades taxonómicas.

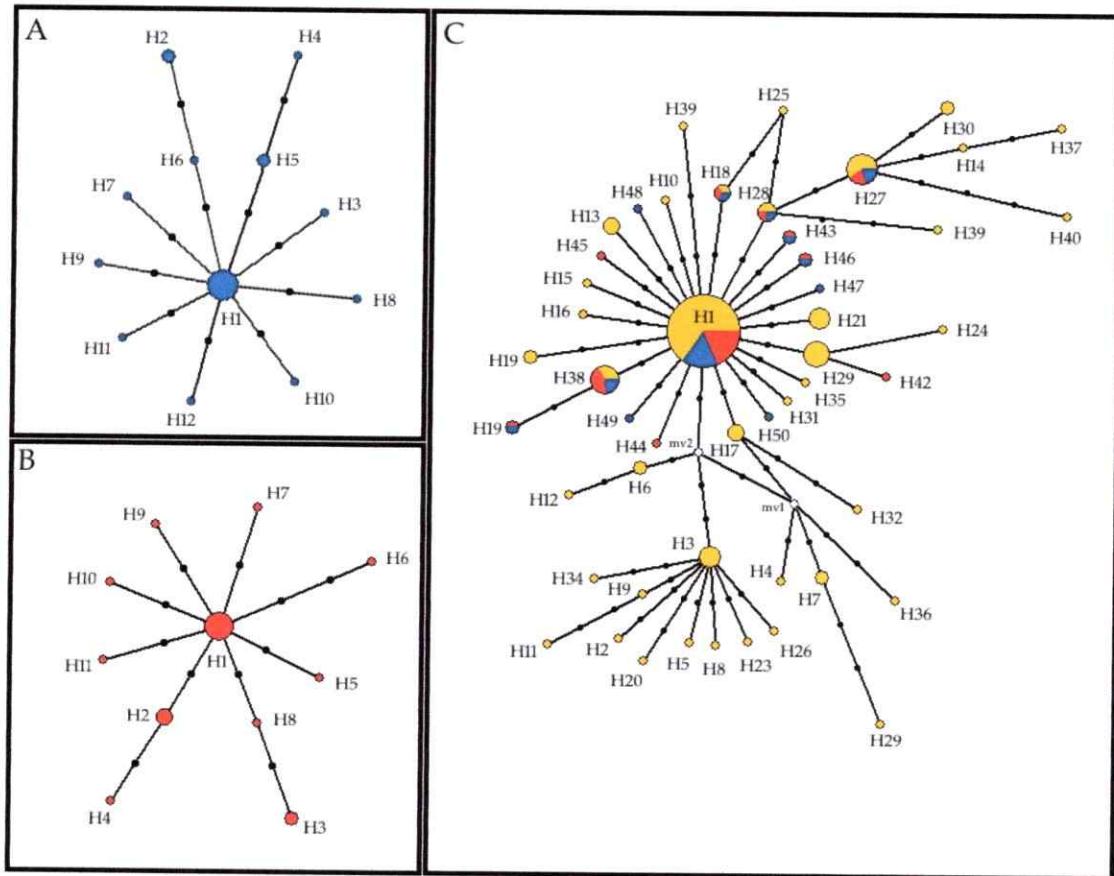


Figura 3.13. Red de haplotipos construida a partir de las secuencias de COI en 151 ejemplares de: A) *N. chilensis* (Pto. Montt), B) y *N. venosa* (Pto. Montt) y *N. magellanica* (no mostrado). La figura C muestra la genealogía de haplotipos entre las tres especies juntas. Cada haplotipo se representa por un círculo de color cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Los colores indican: Azul = *N. chilensis*; Rojo = *N. venosa*; Amarillo = *N. magellanica*. Los símbolos ● = mutaciones específicas y o = vectores medios (mv).

Como es de esperarse en genealogías en forma de estrella, las pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F_s) resultaron significativamente negativas en *N. mytilina*, *N. magellanica*, *N. chilensis* y *N. venosa* (ver Tabla 8). La especie *N. flammea* mostró valores negativos sólo para la prueba de neutralidad de Fu (F_s ; ver tabla 8). En las especies de *Nacella* magallánicas se observaron tres patrones de distribución de desajuste. Las especies *N. deaurata* y *N. fuegiensis* mostraron una distribución bimodal, muy similares entre si (Fig. 3.14 A y B). Las especies

N. flammea, *N. magellanica*, *N. chilensis*, *N. venosa* mostraron una distribución unimodal mientras que la de *N. mytilina* tuvo una marcada forma de L. (ver Figs. 3.14 C-E).

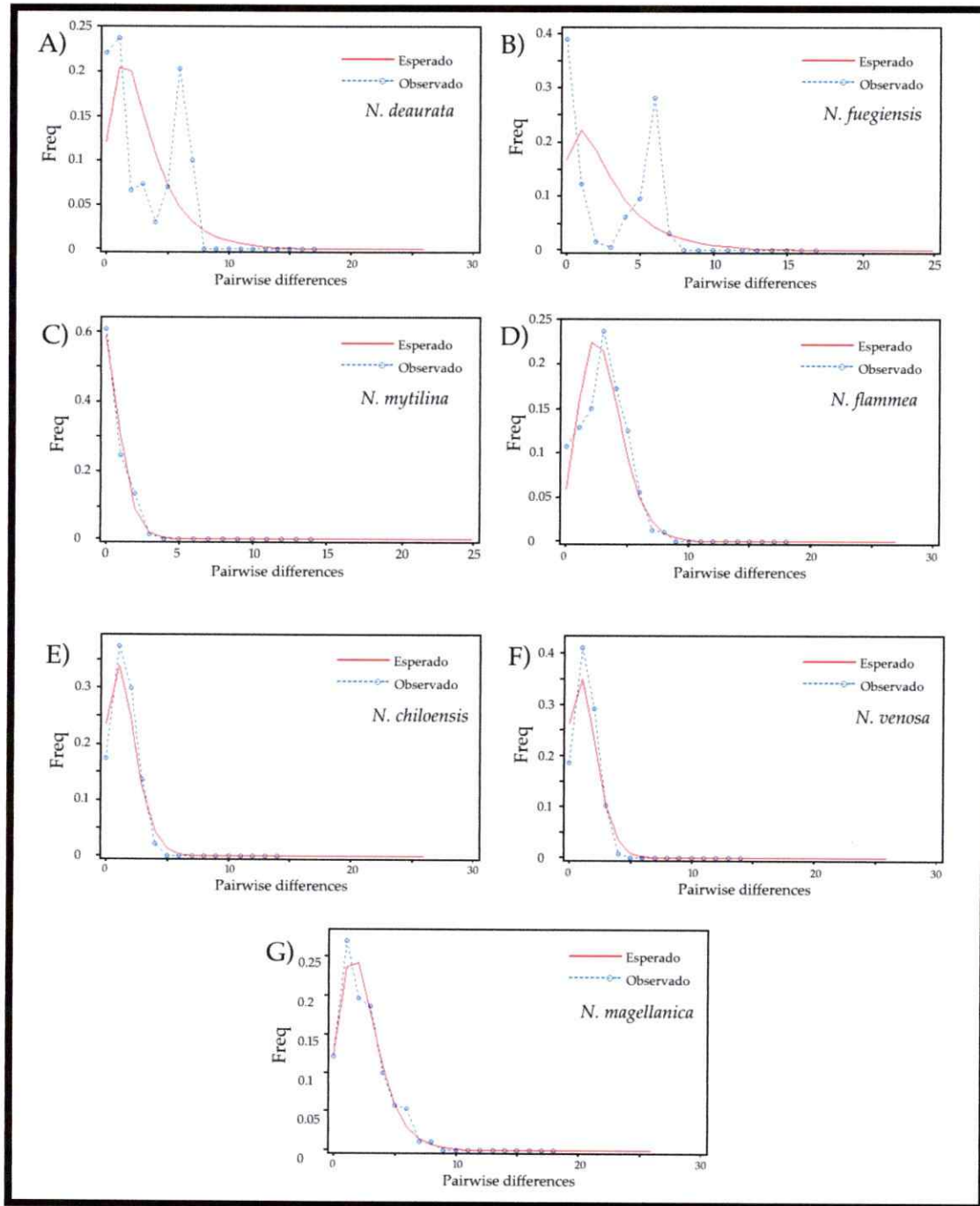


Figura 3.14. Diferencias pareadas de la distribución de desajuste (*mismatch distribution*) para el gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) en siete especies magallánicas de *Nacella*.

3.2.2. Morfometría Geométrica en especies magallánicas de *Nacella*

Los análisis de componentes principales de la morfología de las conchas mostraron marcadas diferencias entre las especies analizadas. A pesar de esto, se observó una sobreposición entre algunos morfos como entre *N. deaurata* y *N. fuegiensis* y entre *N. magellanica* con *N. chilensis* y *N. venosa*. Los análisis de Varianza Múltiple MANOVA detectaron diferencias significativas entre las unidades analizadas (Wilks λ 0.06693; $p < 0.0001$). Las comparaciones pareadas Hotteling no detectaron diferencias significativas en la morfología de la concha entre *N. fuegiensis* y *N. deaurata*, corroborando así los resultados genéticos obtenidos entre ambas unidades. Paralelamente, las especies *N. venosa* y *N. chilensis* no mostraron diferencias significativas entre ellas ni en sus respectivas comparaciones con *N. magellanica* (Tabla 3.6). Sin embargo, las mismas comparaciones detectaron diferencias significativas en la morfología de la concha de *N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica*, y *N. mytilina*. Estos resultados concuerdan con los resultados obtenidos a partir de las comparaciones genéticas entre dichas unidades. Los análisis de componentes principales indican que los componentes PC1 y PC2 explican un 91.37 % de la varianza. PC1 explicó un 80.45 % de ésta y consistió en diferencias de la altura de las conchas, mientras que PC2 (10.92 %) correspondieron a variaciones a nivel de los extremos laterales de éstas (Fig 3.15).

Species	N. de	N. fu	N. fl	N. my	N. ma	N. ch	N. ve
<i>N. deaurata</i> (N. de)	****						
<i>N. fuegiensis</i> (N. fu)	0.221	****					
<i>N. flammea</i> (N. fl)	<0.01	<0.01	****				
<i>N. mytilina</i> (N. my)	<0.01	<0.01	<0.01	****			
<i>N. magellanica</i> (N. ma)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	****		
<i>N. chilensis</i> (N. ch)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.967	****	
<i>N. venosa</i> (N. ve)	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	0.278	0.348	****

Tabla 3.6. Valores de p de las comparaciones pareadas Hotteling de los análisis de Componentes Principales obtenidos desde la morfología de las conchas en especies de *Nacella* de Magallanes. En rojo se indican las comparaciones que resultaron altamente significativas.



Figura 3.15. Resultados de los análisis de componentes principales PC1 vs PC2 de la variación en la morfología de la concha en especies de *Nacella* magallánicas. Los colores indican las especies, donde: Rojo = *N. deaurata*; Verde = *N. fuegiensis*; Morado = *N. flammea*; Azul = *N. mytilina*; Amarillo = *N. magellanica*; Celeste = *N. chilensis*; Naranja = *N. venosa*.

3.3. Filogeografía e inferencia demográfica en especies de Nacella provenientes de distintas provincias en el Océano Austral.

3.3.1. *Nacella concinna* (Provincia Antártica)

Las secuencias de COI amplificadas en *Nacella concinna* abarcaron 663 posiciones nucleotídicas obtenidas desde en 160 ejemplares provenientes de cinco localidades a lo largo de Península Antártica, un ejemplar de Isla Georgia del Sur y un ejemplar de la especie *N. delesserti* (Isla Marion). Como se espera para secuencias codificantes, no se detectaron indels o codones de término. Sólo se detectó una sustitución aminoacídica producida por una transversión en la tercera posición del codón 147 (T – G) que generó un cambio desde Isoleucina a Metionina (ambos amino ácidos tipo D con cadenas laterales hidrofóbicas). La lapa antártica mostró bajos niveles de diversidad genética a lo largo de la Península Antártica, sólo 15 caracteres (2.2%) fueron variables, de los cuales sólo 8 (1.2%) fueron parsimoniosamente informativos. Las secuencias fueron ricas en A-T (61.6%), comparado al promedio de G-C (34.9%). Los índices de diversidad genética como número de sitios polimórficos, diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica (Tabla 3.7), fueron bajos pero comparables a otros estudios moleculares en invertebrados marinos antárticos (Diaz, 2008; Hunter & Halanych, 2008; Mahon *et al.*, 2008; Thornhill *et al.*, 2008) y de resultados obtenidos en la misma especie con marcadores AFLPs (Hoffman *et al.*, en prensa).

Localidad	N	K	H	S	H	π	T. D	F _{ST} (F _{ST})
Bahía South	31	5	0.688	5	0.888	0.00149	-0.576	-0.64
Isla Elefante	29	8	0.729	7	0.985	0.00148	-1.34	-4.14*
B Almirantazgo	33	7	0.471	6	0.981	0.00089	-1.68	-4.68**
B Fildes	38	6	0.565	6	0.587	0.00104	-1.38	-2.48
B Covadonga	29	9	0.741	7	0.704	0.00163	-1.17	-5.08**
COI total	160	16	0.630	18	1.079	0.00128	-1.77*	-12.38***

Tabla 3.7. Índices de diversidad genética en *Nacella concinna*. n: número de ejemplares; k: número de haplotipos; S: sitios polimórficos; H: diversidad haplotípica; H: número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. T. D, prueba de Tajima.

Las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} entre muestras inter- y submareales de *N. concinna* provenientes de Bahía Almirantazgo y Bahía Fildes no mostraron diferencias ($p=0.99$ y $p=0.37$, respectivamente) a pesar de las grandes diferencias morfológicas detectadas entre ellas por análisis de morfometría geométrica (Anexo 2). Por lo tanto, desde ahora en adelante las muestras intermareales y submareales de ambas localidades fueron consideradas como una misma unidad poblacional, independiente de la batimetría. Las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} entre las cinco localidades analizadas a lo largo de las Islas Shetland del Sur y el Oeste de la Península Antártica no mostraron diferencias significativas (Tabla 3.8). Las comparaciones pareadas indican una ausencia de estructura genética para *N. concinna* a lo largo del área de estudio. El número promedio de diferencias entre poblaciones fue bajo y fluctuó entre 0.647 y 1.039. los análisis de SAMOVA corroboraron las estimaciones de G_{ST} pareadas y no detectaron evidencia de estructura espacial en la especie (Tabla 3.8).

Localidad	BS	IE	BA	BF	BC
Bahia South (BS)	****	-0.0958	0.0115	0.0017	0.0069
Isla Elefante (IE)	-0.0208	****	0.0170	-0.0077	-0.0033
B. Almirantazgo (BA)	0.0296	-0.0389	****	0.0143	0.0136
B. Fildes (BF)	0.0030	0.0027	0.0236	****	-0.0034
B. Covadonga (CB)	-0.0166	-0.0186	0.0355	0.0014	****

Tabla 3.8. Comparaciones pareadas de G_{ST} (bajo la diagonal) y N_{ST} (sobre la diagonal) entre las localidades analizadas de *N. concinna*. 20200 iteraciones, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

La red de haplotipos de la especie resulto en una típica forma de estrella con una genealogía muy corta (Fig. 3.16). Estos análisis recuperaron 18 haplotipos diferentes donde el central H3 fue el más frecuente (58%) y ampliamente distribuido en todas las localidades de Península Antártica. Dicho haplotipo sería el más ancestral (Posada & Crandall, 2001) del cuál derivan otros que se separan por un número máximo de dos pasos mutacionales (Fig 3.16). Tres haplotipos (H1, H2 y H5) , ubicados a un paso mutacional de H3 estuvieron presentes en todas las localidades analizadas y mostraron frecuencias intermedias (6.2% - 17.4%). Los restantes 12 haplotipos ocurrieron a baja frecuencia, con menos de 5 representantes en cada uno (Fig. 3.16). El haplotipo único de Isla Georgia del Sur (H17) se ubica a dos pasos mutacionales de H3 y sólo a un paso de H2 presente en cuatro localidades. Para *N. delesserti*, el único haplotipo (H18) obtenido desde la Isla Marión (Subantártica) se separa por sólo dos pasos mutacionales del haplotipo dominante de *N. concinna* (Fig. 3.16).

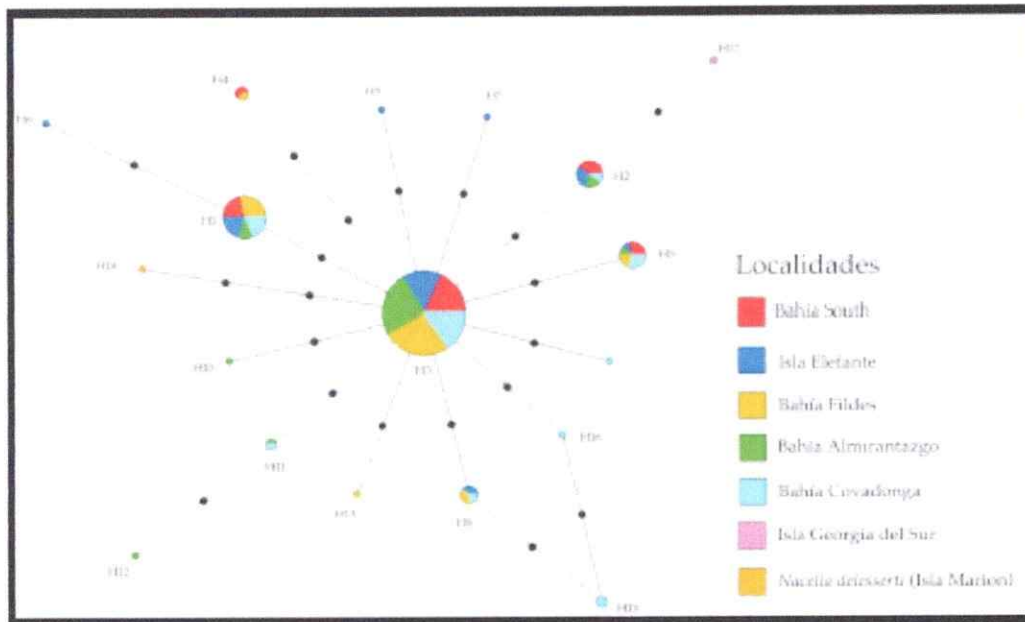


Figura 3.16. Red de haplotipos obtenida a partir de las secuencias de COI en 161 ejemplares de *N. concinna* y 1 de *N. delesserti*. Cada haplotipo esta representado por un círculo de color indica la localidad y sus tamaños son proporcionales a su frecuencia. Los círculos completos • = mutaciones.

Como era de esperarse de una genealogía en forma de estrella, las pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F_s) fueron negativos y significativos (ver Tabla 3.7) para el total de las secuencias analizadas lo que sugiere que la especie ha experimentado eventos demográficos de expansión reciente bajo un modelo neutral.

La distribución del número de diferencias pareadas entre secuencias tuvo forma típica de L , debido a que la mayoría de los ejemplares compartían el mismo haplotipo (H3) o haplotipos muy cercanos a éste (Fig. 3.19). La distribución de desajuste no se diferencia significativamente de lo esperado bajo un modelo de expansión stepwise ($P_{SSD} = 0.31$ Fig. 3.20). Considerando una tasa de divergencia estimada para *Cellana* (1.2% por millon de años, González-

Wevar, datos no publicados), el inicio de la expansión fue estimado en 64,000 a 220,000 años antes del presente, para los modelos de crecimiento continuo y exponencial, respectivamente (Fig. 3.20).

3.3.2. *Nacella magellanica* (Provincia Magallánica)

Se amplificaron 670 pb del gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I en 139 ejemplares de *Nacella magellanica* provenientes de siete localidades de la Provincia Magallánica que incluyeron cuatro sitios a lo largo del Estrecho de Magallanes, dos de Tierra del Fuego y uno de Puerto Deseado al sur de Argentina. Además, se incluyeron a la matriz de secuencias COI de la especie, las obtenidas por de Aranzamendi *et al.*, (2009) en ejemplares provenientes de costa Atlántica Argentina. Este conjunto de secuencias fue denominado en los análisis como "Argentina". No se detectaron codones de término, indels, o saturación a nivel de la tercera posición del codón. La traducción de las secuencias a sus correspondientes amino ácidos (223 en total) en un correcto marco de lectura detectó una sólo substitución. Ésta correspondió a una transición (G – A) en la tercera letra del codón número 107 que generó un cambio de Valina (V) a Isoleucina (I; Tamura *et al.*, 2007), ambos amino ácidos tipo D con cadena lateral hidrofóbica, no polares y neutros. *Nacella magellanica* mostró niveles de diversidad genética más altos que los observados en la especie Antártica *N. concinna* y comparables a los resultados descritos en la misma especie (de Aranzamendi *et al.*, 2009). De un total de 670 sitios, 57 resultaron variables (8.5%) de los cuales 28 fueron parsimoniosamente informativos (4.2%). Las secuencias tuvieron una composición similar a la

observada en la lapa antártica, ricas en Adenina y Timina (A-T: 60.5%) comparado al promedio de Guaninas y Citocinas (39.5%). Los índices de diversidad genética como el número de sitios polimórficos, la diversidad haplotípica y nucleotídica fueron mayores que en la especie antártica. Se detectaron 62 haplotipos, 57 sitios polimórficos y una diversidad haplotípica total de 0.868 (Tabla 3.9). El número de haplotipos varío entre 8 (Buque Quemado) y 22 (Argentina) entre localidades y la diversidad haplotípica fluctuó entre 0.678 (Isla Parlamento) y 0.958 (Bahía Laredo). El número promedio de diferencias entre secuencias y la diversidad nucleotídica varío entre 1.809 – 3.492 y 0.00520 y 0.00270, respectivamente (Tabla 3.9).

Localidad	N	K	H	S	Π	π	T. D	F _{ST}
I Parlamento	30	11	0.678	13	1.80	0.0027	-1.48	-4.18**
P. Santa Ana	20	12	0.879	17	2.37	0.0035	-1.88*	-6.63***
B. Laredo	16	12	0.958	16	3.49	0.0052	-1.08	-6.07**
B. Quemado	20	8	0.805	15	2.42	0.0036	-1.57	-1.53
B. Orange	20	10	0.832	14	2.28	0.0034	1.54	-3.94*
B. Tekemka	18	11	0.889	12	1.98	0.0029	-1.59	-6.78***
P. Deseado	15	10	0.857	13	2.59	0.0038	-1.38	-4.82**
Argentina	59	22	0.878	23	2.32	0.0034	-1.74	-14.95***

Tabla 3.9. Índices convencionales de diversidad genética y pruebas de neutralidad en *N. magellanica* proveniente de distintos sitios en la Provincia Magallánica. n: número de ejemplares analizados; k: número de haplotipos; S: sitios polimórficos; H: diversidad haplotípica; Π : número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. T. D = índice de Tajima.

Las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} entre los sitios analizados mostraron un grado importante de estructuración en la especie. Se detectaron diferencias significativas en el 46,4% de todas las comparaciones realizadas (Tabla 3.10). Las comparaciones pareadas de G_{ST} , sugieren que Puerto Deseado sería la localidad más disímil de todos los sitios analizados. Las comparaciones

de N_{ST} sugieren que las localidades más disímiles corresponden a Puerto Deseado, Argentina y Bahía Laredo, Estrecho de Magallanes.

Localidad	IP	PSA	BL	BQ	BO	BT	PD	A
I. Parlamento (IP)	****	-0.013	0.221	0.043	0.005	-0.002	0.094	0.025
P. Santa Ana (PSA)	0.021	****	0.203	0.018	0.017	-0.015	0.047	0.009
B. Laredo (BL)	0.088	0.014	****	0.265	0.122	0.263	0.251	0.270
B. Quemado (BQ)	0.042	0.003	0.048	****	0.078	0.013	0.075	0.016
B. Orange (BO)	0.013	0.002	0.013	0.025	****	0.036	0.099	0.054
B. Tekenika (BT)	0.022	-0.016	0.015	0.013	-0.011	****	0.065	0.010
P. Deseado (PD)	0.207	0.076	0.080	0.013	0.129	0.082	****	0.014
Argentina (A)	0.053	-0.016	0.028	0.022	0.016	-0.002	0.043	****

Tabla 3.10. Índices convencionales de G_{ST} (bajo la diagonal) y N_{ST} (sobre la diagonal) en *Nacella magellanica* a lo largo del Estrecho de Magallanes y del Sudeste de Patagonia argentina. 20200 iteraciones, valores significativos ($P < 0.05$) en rojo.

Los análisis de SAMOVA corroboraron las observaciones realizadas con G_{ST} y N_{ST} detectando estructura espacial en *N. magellanica* a lo largo de los sitios de muestreo. La mejor partición (4 grupos) separó los sitios de muestreo en las siguientes asociaciones: a) Bahía Laredo, b) Bahía Orange, c) Puerto Deseado, y d) Isla Parlamento, Punta Santa Ana, Bahía Tekenika, Buque Quemado, y Argentina. No obstante, estos resultados se deben interpretar con precaución ya que la diferencia entre grupos (F_{CT}) para dicha partición explico sólo una pequeña porción de la varianza (12.88%) mientras que las diferencias dentro de las localidades (F_{ST}) explicó un 86.17% de ésta.

Al igual que en *N. concinna* de Antártica, la red de haplotipos en la especie magallánica resulto en una topología en forma de estrella pero de genealogía más alargada y compleja que en la primera especie. Este análisis detectó un total de 62 haplotipos donde el más frecuente (H1, 34,34%) estuvo presente en todos los sitios de muestreo (Fig. 3.17). El haplotipo dominante (H1) correspondería al más ancestral, mientras que los más derivados se encuentran unidos a este por

un número máximo de nueve pasos mutacionales. Dos haplotipos (H14 y H20) de frecuencia intermedia (6.5% y 8.0%, respectivamente) se encontraron en distintos sitios de muestreo. De éstos, H20 fue casi exclusivo de la costa Atlántica argentina (Fig. 3.17). Los restantes 58 haplotipos tuvieron baja frecuencia (entre 3.0 y 0.5%) con no más de seis representantes mientras que un 72.5% de los haplotipos fueron únicos.

Las pruebas de neutralidad globales de Tajima (D) y Fu (F_s) fueron negativas y significativas para el conjunto completo de secuencias. La prueba de Tajima (D) dio sólo significativamente negativa para el sitio Punta Santa Ana mientras que Fu (F_s) fue negativa en la mayoría de los sitios de muestreo, a excepción de Buque Quemado (Tabla 3.9).

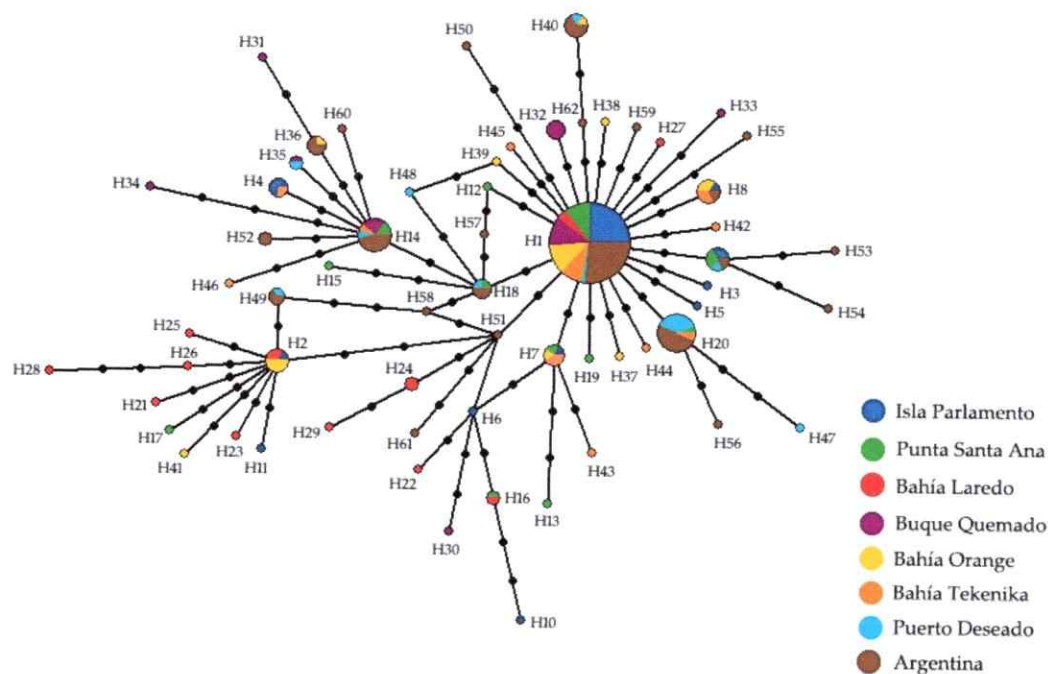


Figura 3.17. Red de haplotipos construida a partir de 198 secuencias de COI en *Nacella magellanica* provenientes de ocho localidades en el Estrecho de Magallanes, Tierra del Fuego y la costa Atlántico Argentina. Cada haplotipo está representado por un círculo de color cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Los círculos completos • corresponden a mutaciones específicas.

La distribución de diferencias pareada entre secuencias fue unimodal (Fig. 3.19) debido a que un gran porcentaje de los individuos comparten el mismo haplotipo (H1) o se diferencian muy poco de éste. La distribución de desajuste no difiere considerablemente del modelo esperado de expansión paso a paso ($P_{SSD} = 0.58$; Fig. 3.20). Tomando en cuenta la misma tasa utilizada en *N. concinna* (1.2% por millón de años, González-Wevar datos sin publicar), el comienzo de la expansión fue estimado en cerca de 123.000 y 425.000 años antes del presente, para los modelos de crecimiento continuo y exponencial, respectivamente (Fig. 3.20).

3.3.3. *Nacella clypeater* (Provincia Peruana)

A partir de 75 ejemplares de *Nacella clypeater* provenientes de tres localidades a lo largo de la costa Centro-Sur de Chile (ver Fig. 14) se amplificaron 686 pb del gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I. En el conjunto total de secuencias COI no se detectaron codones de término, indels, o saturación a nivel de la tercera posición del codón. La traducción de las secuencias a sus correspondientes amino ácidos (228 en total) en el marco de lectura correspondiente tampoco detectó substituciones aminoacídicas.

Nacella clypeater mostró niveles de diversidad genética extremadamente bajos en comparación a las otras especies de *Nacella* analizadas, provenientes de Magallanes y Antártica así como en comparación a los descritos en otras especies de nacélidos (Goldstien *et al.*, 2006 b; Bird *et al.*, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2009; González-Wevar *et al.*, en prensa). De un total de 686 sitios, sólo 4 resultaron variables (0.58%) y de éstos, ninguno fue parsimoniosamente

informativo. Las secuencias fueron ricas en Adenina y Timina (A-T: 63%) comparada al promedio de Guaninas y Citocinas (G-C: 37%). Los índices de diversidad genética (número de sitios polimórficos, diversidad haplotípica y nucleotídica) fueron muy bajos en relación a las otras especies del género analizadas. Se detectó un total de 5 haplotipos, 4 sitios polimórficos y una diversidad haplotípica de 0.105 (Tabla 16). El número de haplotipos varió entre 1 (La Misión) y 4 (Coquimbo) y la diversidad haplotípica fluctuó entre 0.000 (La Misión) y 0.230 (Coquimbo). El número promedio de diferencias y la diversidad nucleotídica varió entre 0.0000 – 0.230 y 0.000 y 0.00240, respectivamente (Tabla 3.11).

Localidad	N	K	H	S	Π	π	T.D	F _u sF _s
La Misión	26	1	0.000	0	0.000	0.000	n.a	n.a
Lebu	24	2	0.083	1	0.083	0.00012	-1.15	-1.028
Coquimbo	25	4	0.230	3	0.240	0.00035	-1.73	-3.084

Tabla 3.11. Índices convencionales de diversidad genética y pruebas de neutralidad en *N. clypeater* proveniente de distintas localidades a lo largo de la costa Centro-Sur de Chile. *n*: número de ejemplares analizados; *k*: número de haplotipos; *S*: sitios polimórficos; *H*: diversidad haplotípica; Π : número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica **p*<0.05, ***p*<0.01, ****p*<0.001

Las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} entre los sitios analizados no mostraron evidencia de estructuración en *N. clypeater* a lo largo de las localidades de muestreo. No se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones realizadas (Tabla 3.12) y los análisis de SAMOVA corroboraron las observaciones realizadas con G_{ST} y N_{ST} no detectando estructura espacial en la especie a lo largo de los sitios de muestreo.

Localidad	LM	Le	Co
La Misión (LM)	****	0.0034	0.0439
Lebu (Le)	0.0034	****	-0.0008
Coquimbo (Co)	0.0016	-0.0008	****

Tabla 3.12. Índices convencionales de G_{ST} (bajo la diagonal) y N_{ST} (sobre la diagonal) en *Nacella clypeater* a lo largo de la costa Centro-Sur de Chile. 20200 iteraciones, no se detectaron diferencias significativas en ninguna de las comparaciones.

La red de haplotipos construida a partir de las secuencias de COI en *N. clypeater* mostró una topología en forma de estrella de genealogía extremadamente corta. Se detectó un total de 5 haplotipos donde el más frecuente (H1, 94.6%) estuvo presente en todos los sitios de muestreo (Fig. 3.18). Dicho haplotipo sería el más ancestral, mientras que los restantes derivados (H2, H3, H4, H5) están unidos a éste por un solo paso mutacional. Los cuatro haplotipos derivados fueron únicos, de los cuales uno apareció en Lebu mientras que los restantes tres fueron encontrados en Coquimbo (Fig. 3.18).

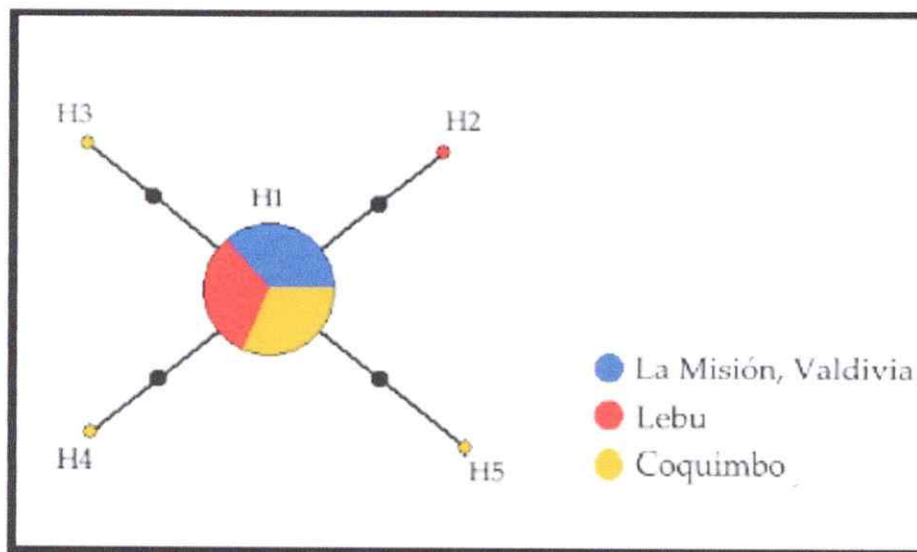


Figura 3.18. Red de haplotipos construida a partir de 75 secuencias de COI en *Nacella clypeater* de tres localidades a lo largo de la costa Centro-Sur. Cada haplotipo está representado por un círculo de color cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia. Los círculos completos • corresponden a mutaciones específicas.

Las pruebas de neutralidad globales de Tajima (D) y Fu (F_s) fueron negativas y significativas para el conjunto completo de secuencias. La distribución de diferencias pareada entre secuencias tuvo una marcada forma de L (Fig 3.19) debido al hecho de que la mayoría de los ejemplares compartieron el mismo haplotipo (H1). La distribución de desajuste fue muy similar al modelo esperado de expansión paso a paso ($P_{SSD} = 0.22$). Tomando en cuenta la misma tasa de mutación utilizada en las otras especies de *Nacella* (1.2% por millón de años, González-Wevar datos sin publicar), el comienzo de la expansión fue estimado en cerca de 8.000 y 46.000 años antes del presente, para los modelos de crecimiento continuo y exponencial, respectivamente (Fig. 3.20).

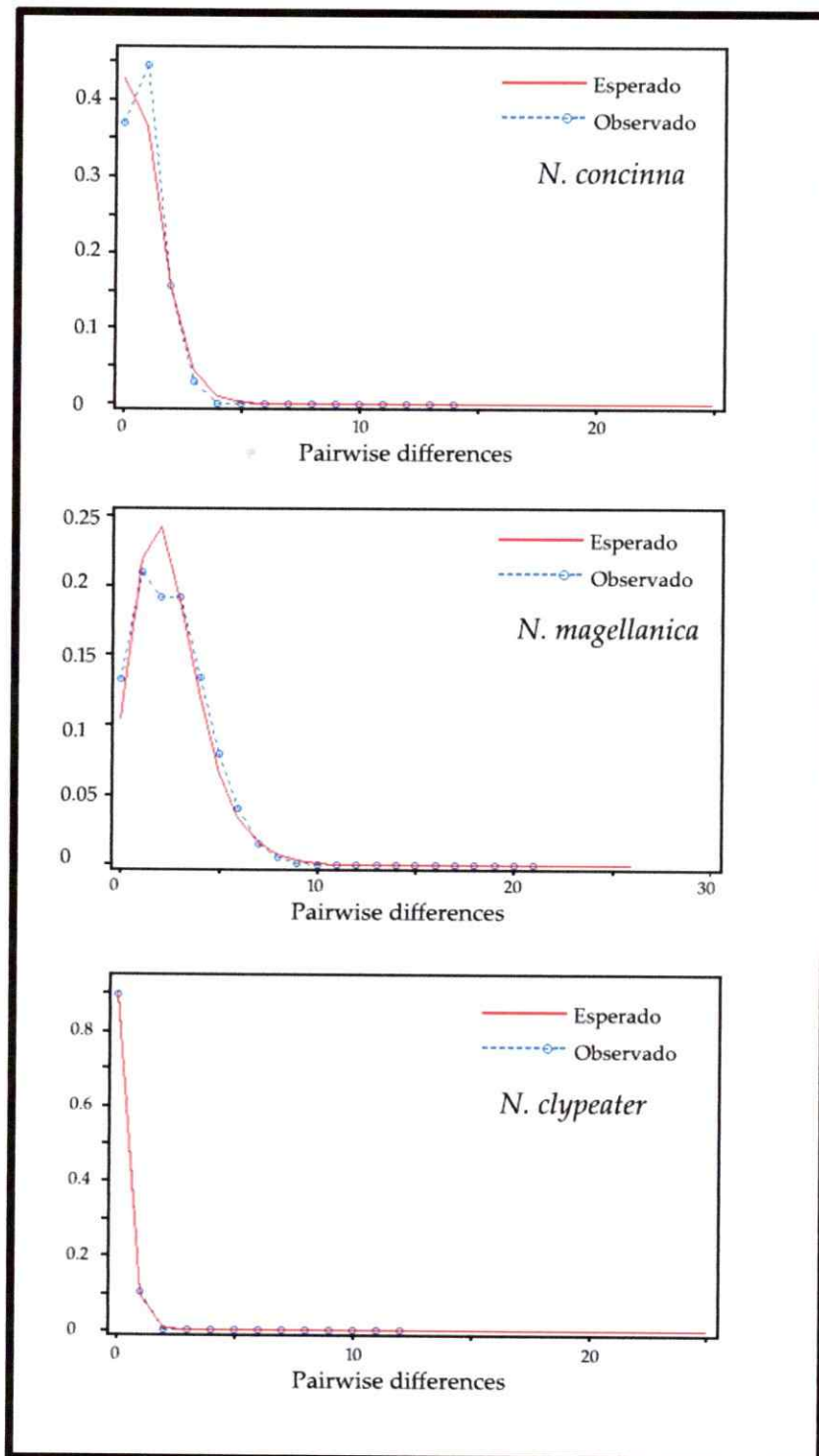


Figura 3.19 Distribución de diferencias pareadas en el gen Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) en tres especies de *Nacella* provenientes de distintas regiones biogeográficas, *N. concinna* de Antártica, *N. magellanica* de Magallanes y *N. clypeater* de Chile Centro-Sur.

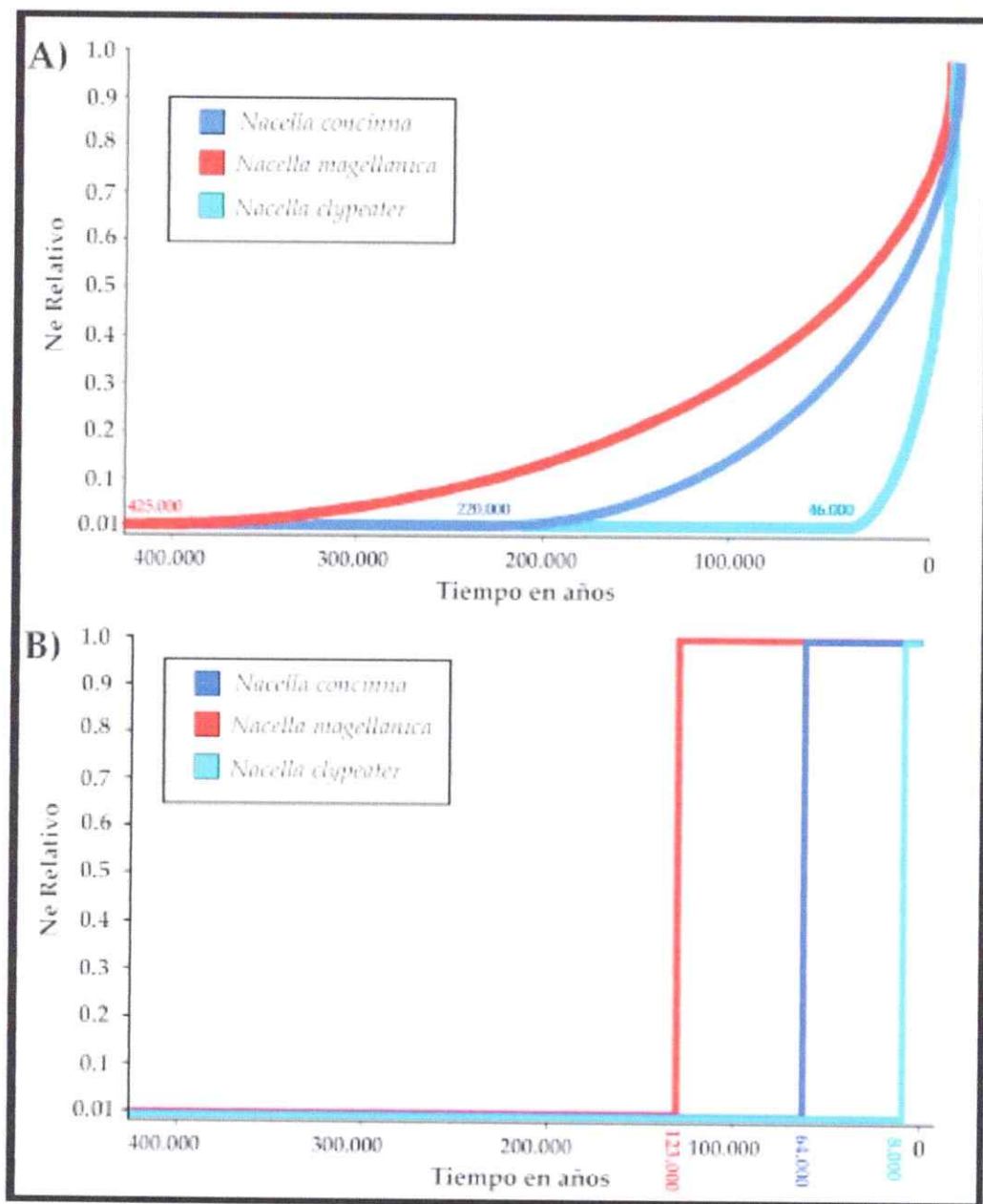


Figura 3.21. Tiempos de expansión demográfica (antes del presente) en especies de *Nacella* provenientes de distintas Provincias biogeográficas (*N. concinna* = Antártica; *N. magellanica* = Magallanes; *N. clypeator* = Chile Centro-Norte) basadas en: A) modelo de crecimiento exponencial y B) modelo de crecimiento instantáneo.

4. DISCUSIÓN

4.1. Biogeografía histórica de Nacella

La distribución de la fauna marina bentónica en el Océano Austral (OA) es el reflejo de complejas interacciones de elementos geológicos, oceanográficos y biológicos en el tiempo y en el espacio (Clarke & Crame, 1989; Crame, 1999; Clarke & Johnston, 2003; Thatje *et al.*, 2005 b; Linse *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2007; Aronson *et al.*, 2007). La interpretación de la distribución de la fauna marina bentónica del OA ha permitido tener una mejor comprensión sobre el efecto de este Océano sobre procesos ecológicos y evolutivos en el Hemisferio Sur (Griffith *et al.*, 2009). Desde mediados del siglo XX, distintos investigadores han tratado de dar una explicación a los patrones de distribución del bentos en el OA, Ekman (1935, 1951) propuso que la fauna Antártica era altamente independiente y separada en dos subregiones: Georgia del Sur que incluye al Mar de Weddell, Tierra de Graham e islas aledañas; y Antártica del Este (Griffiths *et al.*, 2009). Powell (1965), mantiene la división Antártica propuesta por Ekman pero divide la región subantártica en tres provincias: Magallanes, Kerguelén y Antipodeana, al Sur de Nueva Zelanda (Griffiths *et al.*, 2009). Posteriormente, Hedgpeth (1969), basándose en la distribución de distintos taxa de invertebrados marinos propone zonas biogeográficas claramente definidas para Antártica y Subantártica. En Antártica reconoce las Provincias de Georgia del Sur y una clara separación entre Antártica del Este y Oeste. Además, redefinió las provincias subantárticas en tres: a) Magallanes, b) Tristán de Cunha y c)

Kerguelén, que incluye las islas subantárticas de Nueva Zelanda. Los estudios biogeográficos posteriores en el OA se vieron limitados ya que en su mayoría más que tratar de encontrar patrones de distribuciones se dedicaron a validar las categorías descritas por Hedgpeth (Barnes & De Grave, 2000; Clarke & Johnston, 2003; Rodríguez *et al.*, 2007). Estudios recientes (Linse *et al.*, 2006; Clarke *et al.*, 2007) se han basado en la distribución de moluscos dentro del Frente Polar para reconocer patrones biogeográficos sin asumir supuestos previos. En general, sus resultados apoyan las observaciones de Hedgpeth (1969), pero reconocen divisiones más finas especialmente dentro de Antártica del Este y dividen a Antártica Oeste en los componentes Península Antártica y Mar de Weddell. Recientemente, Griffiths *et al.* (2009) analizó la distribución de cuatro grupos de invertebrados (bivalvos, gastrópodos y dos clases de briozoos) en 29 regiones del OA y estimaron distintos índices como riqueza de especies, tasas de endemismo, patrones de radiación, similitud de fauna entre regiones. Los resultados obtenidos encontraron patrones claros de distribución en el OA como una marcada asimetría en el número de especies, con muchos taxa en Nueva Zelanda, Tasmania y Sudáfrica y pocos en Sudamérica. No obstante, no se detectaron diferencias en este mismo parámetro entre Este y Oeste del Océano Austral. Además, reconocieron altos niveles de conexión entre las faunas de Antártica y Sudamérica y poca relación entre estas provincias con Nueva Zelanda y Tasmania. Asociado a esta poca relación entre provincias lejanas reconocen evidencias del marcado efecto vicariante a largo plazo que ha tenido la instalación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) sobre la distribución del bentos en el OA. Tres, de los cuatro grupos analizados

(bivalvos, y ambas clases de briozoos) muestran al OA como una unidad funcional única sin división entre Este y Oeste. Los moluscos gastrópodos son el único grupo que muestran un patrón similar de distribución al sugerido por Hedgpeth (1969) y exhiben marcadas diferencias entre provincias biogeográficas del OA. A partir de estos resultados concluyen que los patrones biogeográficos de la fauna marina bentónica en el OA son dependientes del grupo de organismos considerado. Junto con esto, detectan una sola provincia Antártica y una clara diferenciación entre islas subantárticas de Sudamérica y Nueva Zelanda.

Los resultados obtenidos en la presente investigación aporta nueva evidencia a las observaciones realizadas por Hedgpeth (1969) y corroboradas por Griffiths *et al.* (2009) sobre la distribución de los gastrópodos en el Océano Austral. En el género *Nacella* se detectaron altos niveles de divergencia molecular entre especies provenientes de distintas provincias biogeográficas como Antártica, Kerguelén y Sudamérica. Además, los linajes identificados en *Nacella* muestran patrones de distribución similares a los descritos por Griffiths *et al.* (2009) con grupos en estas tres provincias biogeográficas del Océano Austral (Fig. 4.1). Los niveles de diferenciación entre las especies provenientes de dichas provincias sugieren un aislamiento a largo plazo de estas regiones en el OA mediados por la CCA (Crame, 1999). Tipos de distribución como las observadas en *Nacella* han sido históricamente explicadas a través de dos mecanismos: especiación vicariante o dispersión a gran escala (Helmuth *et al.*, 1994; Lessios *et al.*, 1998; Donald *et al.*, 2005 a, b; Waters, 2007; Waters *et al.*, 2007). Ambas hipótesis son consideradas como excluyentes entre si y pueden ser puestas a prueba

determinando la concordancia entre filogenias/estimaciones de tiempos de divergencia con los patrones de distribución y el conocimiento de eventos geológicos en el área de estudio (Sanmartin & Ronquist, 2004).

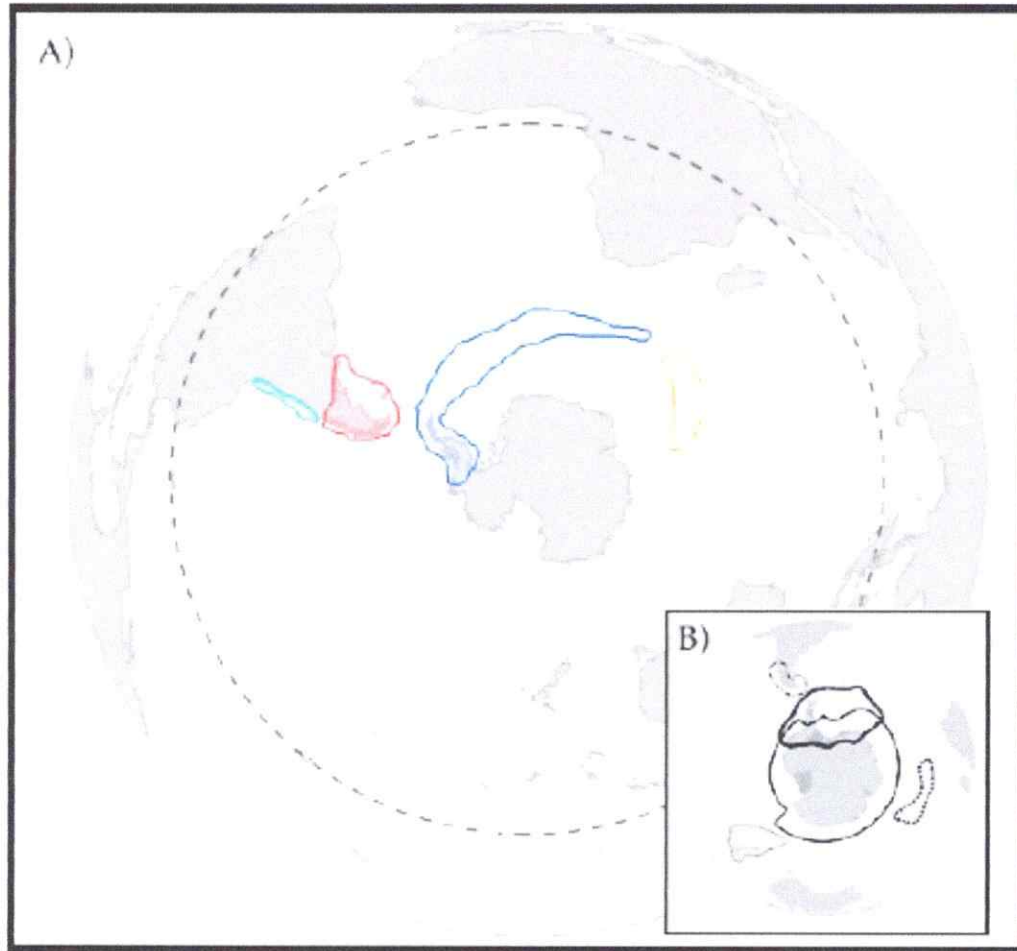


Figura 4.1 A) Distribución de los linajes de *Nacella* en el Océano Austral, los colores representan las distribuciones relativas de los linajes: Celeste = Provincia Peruana; Rojo = Provincia Magallanes; Azul = Provincia Antártica; Amarillo = Provincia de Kerguelén. B) Patrón a gran escala de la distribución de gastrópodos en el Océano Austral (tomado de Griffiths et al., 2009)

Los resultados en *Nacella* entregan nueva información sobre los tiempos y modos de origen y diversificación de la fauna marina bentónica en el OA. Se ha realizado un muestreo exhaustivo del género que abarca 14 de las 15 especies descritas para *Nacella* y corresponde al primer estudio en el que se consideran especies provenientes de distintas provincias biogeográficas. Estudios previos (Koufopanou *et al.*, 1998; Nakano & Ozawa, 2004, 2005, 2007; Goldstien *et al.*, 2006 a) incluyeron sólo una o dos especies del género por lo que dieron una visión sesgada de la evolución de Nacellidae y en especial de *Nacella*. Actualmente, los resultados obtenidos en esta investigación son las hipótesis más completas con las que se cuenta acerca de la evolución de Nacellidae y en especial de este importante género de patelogastrópodos del Océano Austral.

Las estimaciones de los tiempos de divergencia indican que la separación de los géneros *Nacella* y *Cellana* habría ocurrido durante el Oligoceno y el Mioceno medio (30 - 14 Ma). Estas fechas se relacionan estrechamente con marcados cambios tectónicos y climáticos descritos para la región entre el límite Eoceno/Mioceno y durante la Transición Climática del Mioceno Medio (Woodruff & Savin, 1989; Zachos *et al.*, 2001; Lawver & Gahagan, 1993; Mackensen, 2004; Lewis *et al.*, 2008). Este periodo representa un punto pivote en la evolución climática del Cenozoico ya que posterior al Óptimo climático del Mioceno (17 - 15 Ma) se registra un abrupta disminución de las temperaturas a latitudes medias y altas que culminna en el Mioceno tardío (Verducci *et al.*, 2009). El mayor enfriamiento definido como el cambio del Mioceno Medio habría ocurrido entre 14.2 y 13.8 Ma (Shevenell *et al.*, 2004; Lewis *et al.*, 2007) y divide al Neogeno en un intervalo inicial cálido y un intervalo tardío frío. Este

cambio fue marcado por un enfriamiento atmosférico y oceánico, variaciones en el ciclo de carbón y la formación de una capa de hielo en el Este de Antártica. Además, hace ~14 Ma habría ocurrido una expansión significativa de la crisofera (Shevenell et al., 2004) que habría causado un cambio de capas de hielo húmedas a capas secas, como las que se observa actualmente. Se propone como hipótesis evolutiva que el proceso cladogenético que separa a *Cellana*, de aguas templadas, de a su género hermano *Nacella*, de sistemas fríos, se relaciona a la marcada disminución de las temperaturas y de los cambios oceanográficos registrados en el OA durante este periodo (Flower & Kennet, 1994; Crame, 1999; Zachos et al., 2001; Mackensen, 2004; Aronson et al., 2007). Así, el ancestro común de *Nacella* podría haber adquirido innovaciones asociadas a la resistencia a las nuevas condiciones de frío imperantes en la región, adaptándose a la vida en regiones antárticas y subantárticas. Estudios en peces de la familia *Nothotheniidae* de las provincias antárticas y subantárticas han demostrado que el éxito del grupo en la región está directamente relacionado a innovaciones evolutivas como la aparición de una proteína anticongelante y otras adaptaciones relacionadas (Chen et al., 1997; 2008). Reconstrucciones filogenéticas utilizando método comparado sugieren que la radiación adaptativa observada en estos peces se relaciona directamente a la aparición de la proteína anticongelante (Clarke & Johnston, 1996; Bargelloni et al., 2000 a). Crame (1999) sugiere que a fines del Mioceno (12 – 10 Ma) habría ocurrido un marcado patrón de zonación vertical y horizontal en el OA. Dicho evento sería responsable de una intensificación de la CCA, promoviendo la diferenciación entre las faunas antárticas y subantárticas.

La estimación de los tiempos de divergencia en el grupo indican que la diversificación de los distintos linajes de *Nacella* no se relacionan a los tiempos estimados para los eventos tectónicos vicariantes en el OA como las aperturas de los pasos de Tasmania y Drake. Nuestras estimaciones de tiempos de divergencia sugieren un origen más reciente de las especies actuales de *Nacella* (Figs. 22, 23 y 24). Si las observaciones de Crame (1999) son correctas, la diversificación y diferenciación de *Nacella* en el OA podrían estar asociadas al posible efecto vicariante que habría tenido la intensificación de la CCA durante el Mioceno medio (Shevenell *et al.*, 2004). Al igual que en nototénidos, el origen y diversificación de *Nacella* habría ocurrido a fines del Mioceno e inicios del Plioceno. El calentamiento del Plioceno (Zachos *et al.*, 2001), podría haber estimulado la radiación en grupos previamente establecidos a través de una extensión de nuevos hábitats someros en las costas del OA (Clarke & Johnston, 1996). Stankovich *et al.* (2002), analizando dos genes mitocondriales estiman la divergencia de peces nototénidos subantárticos en 6.6 – 7.0 Ma. Similarmente, análisis de DNA en dos especies *Euphausia vallentini* y *E. frigida* provenientes ambos lados del frente polar indican que probablemente diversificaron hace 7 Ma (Bargelloni *et al.*, 2000 b). Page & Linse (2002) estiman tiempos de divergencia posteriores a la apertura del Paso de Drake en especies antárticas y subantárticas del bivalvo *Limatula*. Díaz (2008) estima la separación entre especies de equinodermos antárticos y subantárticos del género *Sterechinus* en 4.2 – 5.9 Ma.

El registro fósil en *Nacella* es relativamente escaso con algunos ejemplares pliocénicos (5.0 Ma) de *N. concinna* descritos para Isla Cockburn, Península

Antártica (Jonkers & Kelley, 1998) y *N. aff terroris* de Isla Chiloé, Sur de Chile (Watters & Flemming, 1972). A estos fósiles se suman una diversificación pliocénica del género descrita para el Sur del Perú (DeVries, 2009) entre 6.0 a 3.0 Ma, que incluye al menos cinco especies. El registro fósil del género en Magallanes sólo incluye ejemplares del Holoceno y de fines del Pleistoceno identificados como *N. deaurata* y *N. magellanica* de Patagonia Argentina (Gordillo, 1999, 2009; Aguirre, 2003; Gordillo *et al.*, 2005; Aguirre *et al.*, 2006, 2009; Cárdenas & Gordillo, 2009). Las edades estimadas para la mayoría de los fósiles de *Nacella* concuerdan con los tiempos de divergencia estimados a partir de secuencias de DNA. Así, las nuestras dataciones moleculares de los eventos evolutivos más importantes en la evolución de *Nacella* están de acuerdo con la mayoría de los fósiles de *Nacella*. La única excepción sería la descripción de especies de *Nacella* miocénicas y oligocénicas para Perú y Chiloé (DeVries, 2009). Si estos fósiles efectivamente corresponden a especies de *Nacella* podrían corresponder a ancestros de bajas latitudes de las especies modernas antárticas y subantárticas. No obstante, este escenario no es compatible con los resultados filogenéticos obtenidas que muestran al clado sudamericano como uno de los más derivados. Alternativamente, la morfología de la concha y la microestructura de ésta son caracteres altamente homoplásicos en patelogastrópodos (Lindberg, 2008), por lo que estos fósiles definidos en base a dichos caracteres podrían pertenecer a i) linajes extintos de nacélidos que preceden la separación de *Nacella* y *Cellana* o ii) a otros grupos de patelogastrópodos.

Los resultados obtenidos en la evolución de Patellogastropoda confirman estudios morfológicos y moleculares previos (Powell, 1973; Koufopanou *et al.*, 1998; Harasewych & McArthur, 2000; McArthur & Harasewych, 2003; Nakano & Ozawa, 2004, 2007), apoyando la monofilia de *Nacella* y *Cellana* y la relación de hermandad de ambos géneros (Nacellidae). La diversificación de las especies actuales de *Nacella* se puede dividir en tres etapas. La primera habría generado a los linajes actualmente distribuidos en Kerguelén, Antártica y Sudamérica a fines del Mioceno (Figs 22, 23 y 24). Evidencia de esto son los tiempos de divergencia estimados entre dichos grupos y el hecho de que ninguno de los marcadores o método de reconstrucción logró definir claramente las relaciones entre las especies *N. concinna*-*N. delesserti* (Antártica), *N. macquariensis*-*N. edgari* (Kerguelén A) y *N. kerguelenensis* (Kerguelén B). Es importante señalar que el número de diferencias promedios para COI entre *N. concinna* y las especies *N. kerguelenensis*, *N. macquariensis* y *N. clypeater* (Chile Central) fue de 40, 41 y 45 sitios, respectivamente. Al mismo tiempo, el número de diferencias promedios entre *N. kerguelenensis* y *N. macquariensis*-*N. edgari* de la provincia de Kerguelén fue de 50 sitios. Asumiendo la hipótesis del Reloj Molecular, la alta similitud entre el número de diferencias entre estos grupos implica que la separación de estos taxa habría ocurrido en un espacio de tiempo puntual (ver Figs. 22, 23 y 24). En base a estos resultados, se propone que los principales linajes de *Nacella* se podrían haber originado a través de eventos de colonización a gran escala, seguidos de especiación en cada una de estas zonas. La segunda diversificación de género incluye a las especies sudamericanas y habría ocurrido durante el Plioceno. En este periodo ocurre la separación de dos grupos sudamericanos de

Nacella, el ancestro de *N. clypeater* y el ancestro de las especies magallánicas, siguiendo líneas claramente diferenciadas. Como se mencionó anteriormente, DeVries (2009) describe una diversificación pliocénica de *Nacella* en el Sur del Perú que incluye la aparición de al menos cinco especies (*N. lacrima*, *N. oblea*, *N. chalaensis*, *N. intiforma*, y *N. ocoanensis*) entre los 6 - 3 Ma. Dichos fósiles corresponderían a una radiación desconocida de *Nacella* que se encuentran estrechamente relacionada en morfología y distribución a la especie *N. clypeater*. La tercera y última diversificación del género incluye a una radiación pleistocénica de la(s) especie(s) magallánica(s; Fig. 4.2).

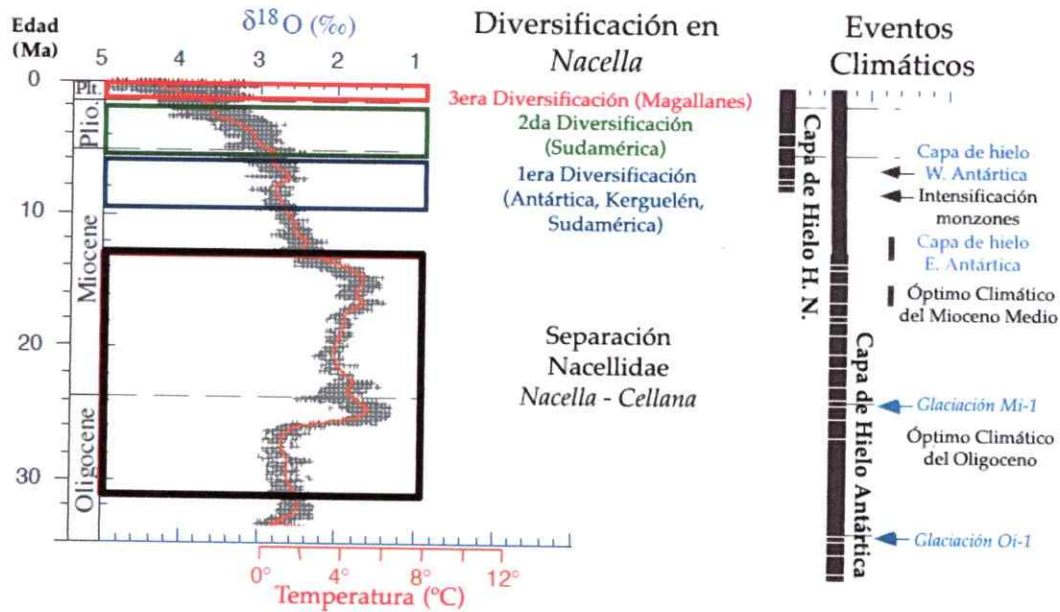


Figura 4.2. Estimación de los acontecimientos más importantes en la evolución del género *Nacella*, desde sus separación de *Cellana* y los tres eventos de diversificación detectados.

Los niveles de divergencia entre los linajes antártico, kerguelenianos y sudamericanos contrastan con resultados obtenidos en otros taxa marinos (O' Foighil *et al.*, 1999; Page & Linse, 2002; Donald *et al.*, 2005 a; BurrIDGE *et al.*

2006; Waters, 2007; Gérard *et al.*, 2008; Fraser *et al.*, 2009; Díaz, 2008). Los resultados en *Nacella* no detectan señales de flujo genético entre provincias subantárticas en el OA lo que sugiere que la distancia geográfica constituye una barrera efectiva para el flujo genético en el género sobre todo entre regiones biogeográficas distantes. Debido a que la mayoría de las especies de *Nacella* viven asociadas a fondos duros, la dispersión a gran escala por *rafting* sería poco probable para los miembros del género. Más aún, a pesar de que se ha propuesto que la fase larval planctónica de *Nacella* podría alcanzar 1 - 2 meses (Bowden *et al.*, 2009), las enormes distancias geográficas entre hábitats someros en el OA podrían prevenir la dispersión recurrente entre regiones. Desde un punto de vista biogeográfico, la distribución de *Nacella* es compleja e involucra una extensa área geográfica que incluye distintas islas subantárticas separadas por cientos y hasta miles de kilómetros (Chown *et al.*, 2008). Además, se detectó en *Nacella* un patrón de distribución que se relaciona directamente a las dos zonas biogeográficas descritas para la costa chilena, la provincia Peruana (*N. clypeater*) y la provincia magallánica. Los resultados obtenidos en *Nacella* indican una clara diferenciación entre las especies de ambas provincias. *Nacella clypeater* se distribuye desde el Sur de Perú hasta Puerto Montt (Alamo & Valdivieso, 1997), localidad en la que donde coexiste algunas especies magallánicas del género. De esta forma, en *Nacella* también se reconoce como uno de los quiebres biogeográficos reconocidos a lo largo de la costa chilena (Camus, 2001). Esta zona correspondería al límite norte de la Provincia Magallánica y ha contribuido al aislamiento relativo de la fauna marina de los fiordos patagónicos (Castilla *et al.*, 1993; Valdovinos *et al.*, 2003; Hernández *et al.*, 2005).

4.2. Sistemática en el género *Nacella*

Este estudio aporta nueva información en relación a la biogeografía histórica y reciente de *Nacella* en el OA que paralelamente puede ser integrada para análisis sistemáticos al interior de Nacellidae y especialmente del género en cuestión. Los resultados moleculares no recuperaron la monofilia recíproca de las subdivisiones descritas al interior del género *Nacella* (*Patinigera* y *Nacella*). Las especies *N. mytilina* y *N. kerguelenensis* (pertenecientes al subgénero *Nacella*), quedaron incluidas en clados diferenciados hace millones de años, Magallanes y Kerguelén B, respectivamente. De hecho, ambas especies se encuentran más estrechamente relacionadas a miembros del subgénero *Patinigera* que entre ellas. De esta forma, la subdivisión de *Nacella* en ambos subgéneros sería un artefacto producido por los altos niveles de homoplasia al interior del grupo, en especial en especies que viven asociadas a macrofitas, como es el caso de *N. mytilina* y algunos ejemplares de *N. kerguelenensis*. Estos resultados demuestran la necesidad de realizar una revisión profunda de los caracteres considerados para la taxonomía al interior del género.

Las secuencias de DNA en *Nacella* cuestionan la validez de algunas de las unidades taxonómicas descritas para género (Powell, 1973; Valdovinos & Rùth, 2005). Se detectaron claras diferencias genéticas entre algunas especies lo que sugiere que se tratan de unidades evolutivas discretas pero en otras comparaciones, las secuencias de DNA fallaron completamente en discriminar diferencias entre unidades claramente definidas en términos morfológicos. Por ejemplo, no se detectaron diferencias genéticas entre las especies *N. macquariensis* (Isla Heard) y *N. edgari* (Isla Kerguelén) y las reconstrucciones no

detectaron monofilia recíproca entre ambas, a pesar de las claras diferencias morfológicas existentes entre ellas. La especie *N. edgari* habita exclusivamente en Isla Kerguelén mientras que *N. macquariensis* se distribuye en Isla Heard e Isla Macquarie, ubicadas a ~5000 kms de distancia. Los ejemplares de ambas especies obtenidos desde Isla Kerguelén e Isla Heard son idénticos en términos genéticos por lo que ambas especies nominales serían una sola unidad genética. De esta forma, se tendría que extender el rango de distribución de *N. edgari* a ambas islas (Kerguelén y Heard) y redefinir el estatus de *N. macquariensis* en Isla Macquarie. Para esto, se obtendrán ejemplares de *N. macquariensis* de dicha isla y se incluirán en las reconstrucciones y con la información contenida en sus secuencias de DNA será posible compararla con otras especies, asignarla a algún linaje, y determinar su validez como unidad evolutiva distinta. Similarmente, no se detectó monofilia recíproca entre las especies *N. concinna* (Antártica) y *N. delesserti* (Isla Marion, Sudáfrica), a pesar de las marcadas diferencias morfológicas y de coloración detectadas entre ambas. El número de diferencias promedio entre ambas unidades es similar al detectado en comparaciones intraespecíficas de nacélidos (Goldstien *et al.*, 2006 b; Bird *et al.*, 2007) y en especies de *Nacella* (de Aranzamendi *et al.*, 2009; González-Wevar *et al.*, en prensa). Por lo tanto, en base a los resultados genéticos, *N. delesserti* de Isla Marion sería idéntica en términos genéticos a *N. concinna* de Antártica. Un explicación plausible a estos resultados es que *N. concinna* podría extender su rango de distribución hacía islas subantárticas durante los periodos glaciales, incluyendo Isla Marion como mecanismos de resistencia al avance de los hielos en Península Antártica (González-Wevar *et al.*, en prensa). No obstante, estas

conclusiones deben hacerse con cautela ya que solamente se incluyó en los análisis un ejemplar de *N. delesserti*. Estudios futuros buscan hacer comparaciones poblacionales entre localidades de Península Antártica e Isla Marión para corroborar u objetar estos resultados. En las reconstrucciones se incluyeron dos ejemplares provenientes de Isla Kerguelén cuyas morfologías eran idénticas a *N. mytilina* de Magallanes (definida en los análisis como *N. aff. mytilina*). La presencia de este morfotipo en Isla Kerguelén hizo a Powell (1973) ampliar el rango de distribución de la especie *N. mytilina* (Magallanes) a Isla Kerguelén. Los resultados moleculares indican que *N. mytilina* de Isla Kerguelén sería realmente un morfotipo poco común de *N. kerguelensis*. Así, la extensión del rango geográfico de *N. mytilina* a Isla Kerguelén sería un error de reconocimiento por lo que esta especie tendría distribución exclusiva en la Provincia Magallanes. Por lo tanto, además de la alta plasticidad fenotípica que muestra *Nacella* en el OA, también existiría evidencia de convergencia ecológica entre morfos que habitan sobre macroalgas (*N. mytilina* y *N. kerguelensis*). La ausencia de monofilia recíproca y los altos niveles de identidad genética entre las especies de Magallanes otorgan un grado mayor de complejidad a la relación entre especies congénéricas que serán discutidos a continuación.

4.3. *Nacella* en la Provincia Magallánica

Los análisis genético comparativos entre las especies magallánicas de *Nacella* entregan nueva información sobre las relaciones entre dichas unidades y del proceso de diversificación operante en esta provincia. Las comparaciones pareadas de G_{ST} y N_{ST} y los análisis de morfometría geométrica entre las especies

nominales descritas para la Provincia Magallánica sugieren que no existen diferencias genéticas entre *N. fuegiensis* y *N. deaurata* y entre las especies *N. chilensis*, *N. venosa* con *N. magellanica*. Ambas especies (*N. magellanica* y *N. deaurata*) mostraron diferencias significativas entre ellas y con las restantes unidades descritas para Magallanes, *N. flammea*, y *N. mytilina*. Además, estas cuatro unidades mostraron diferencias significativas a nivel la morfología lateral de sus conchas. Tanto, las comparaciones genéticas (Tabla 9 y 10) como las comparaciones de la morfometría geométrica del perfil lateral de sus conchas (tabla 11), no detectaron diferencias significativas entre las unidades *N. chilensis*, *N. fuegiensis* y *N. venosa* y sus respectivas especies putativas parentales. Al respecto, se ha planteado que los análisis de morfometría geométrica son altamente sensitivos a la variación morfológica y esta aproximación permitiría detectar patrones de estructura poblacional similar al de los marcadores moleculares (D'Anatro & Lessa, 2006), como lo observado en las especies magallánicas de *Nacella*. Estos resultados fueron corroborados en las comparaciones de las genealogías de network que evidenciaron una clara similitud en las topologías de *N. venosa*, *N. chilensis* y *N. fuegiensis* y sus supuestas especies parentales. Basándose en estos resultados, las observaciones realizadas de Powell (1973) no serían correctas ya que las unidades *N. chilensis*, *N. venosa* no corresponderían subespecies de *N. magellanica* sino que se tratarían simplemente de poblaciones de ésta última. Además, nuestros resultados indican que *N. fuegiensis* debería ser considerada como una población de *N. deaurata* y no sinonimia de *N. magellanica* como lo plantearon Valdovinos & R  th (2005). De esta forma se sugiere hacer una revisión de las conclusiones obtenidas

por Valdovinos & R  th (2005) en relación a la diversidad de especies de *Nacella* para Magallanes. Los resultados morfométricos de esta investigación son similares y comparables a los obtenidos por ambos investigadores utilizando análisis de Escalamiento Multidimensional No Métrico (NMDS) en los que detectaron altos niveles de similitud entre *N. magellanica*, *N. chilensis* y *N. venosa*. No obstante, de acuerdo a Valdovinos & R  th (2005), las diferencias en pigmentación de la concha y de otros caracteres diagnósticos permitirán un claro reconocimiento de dichas especies magallánicas. No obstante, existen registros de variación morfológica y de coloración de la concha en patelogastrópodos (Nakano & Ozawa, 2005; Nakano & Spencer, 2007) y en especial en *Nacella* (Morriconi & Calvo, 1993; de Aranzamendi *et al.*, 2008, 2009), debido a factores externos a la filogenia, como la presencia de depredadores (Lowell, 1986; Harley *et al.*, 2009), alimentación (Lindberg, 2008), hábitat (C  rte-Real *et al.*, 1996; de Aranzamendi *et al.*, 2009) y batimetría (Beaumont & Wei, 1991; Morriconi & Calvo, 1993; de Aranzamendi *et al.*, 2008). Paralelamente, la detección de formas intermedias en las especies magallánicas del género aporta evidencia hacía los problemas asociados a la discriminación de especies basándose sólo en caracteres morfológicos externos.

Los resultados genéticos obtenidos en la presente investigación corroboran las observaciones realizadas por de Aranzamendi *et al.* (2009) quiénes utilizando marcadores nucleares variables como los ISSRs, detectaron diferencias genéticas significativas entre las especies *N. deaurata*, *N. magellanica* y *N. mytilina* en Patagonia Argentina. Junto con esto, sus resultados genéticos sugieren que *N. delicatissima* sería una ecoforma poco frecuente de las especies *N. magellanica* y

N. deaurata. Los resultados obtenidos en la presente investigación son concordantes con los realizados en el grupo anteriormente (de Aranzamendi et al., 2009) y entregan nueva evidencia genética y morfológica sobre el número de especies para la Provincia Magallánica. En base a los antecedentes anteriormente expuestos sugerimos que las unidades válidas para Magallanes serían las especies *N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica* y *N. mytilina*, siendo las restantes unidades descritas (*N. chiloensis*, *N. delicatissima*, *N. fuegiensis*, y *N. venosa*) poblaciones, ecotipos o subespecies de las primeras. Por lo tanto, a partir de estos momentos se discutirán los resultados genético comparativos sólo entre las unidades válidas detectadas para *Nacella*.

Los índices de diversidad entre las unidades magallánicas fueron variables entre especies, detectándose niveles altos y moderados de diversidad en casi todas, con excepción de *N. mytilina* que mostró baja diversidad ($H = 0.392$). En general, los índices de diversidad genética detectados en *Nacella* son comparables a los obtenidos en otros estudios en patelogastrópodos (Sá-Pinto et al., 2007, 2008) y en nacélidos (Goldstien et al., 2006 b, Bird et al., 2007; de Aranzamendi et al., 2009). No obstante, los altos niveles de similitud entre las especies de *Nacella* de Magallanes contrastan con resultados obtenidos en otros estudios en otros grupos de lapas. Análisis en el total de especies de *Patella* mostraron niveles elevados de divergencia entre las unidades analizadas (Sá-Pinto et al., 2005). Similarmente, el conjunto de especies de *Patella* (*P. candei*, *P. lugubris*, *P. caerulea* y *P. depressa*) de las islas Macronesias muestran altos niveles de diferenciación genética entre ellas. Cada una de estas unidades exhiben niveles de diversidad genética interespecífica similar al observado en *Nacella* de

Magallanes pero las estimaciones de los tiempos de divergencia de los eventos cladogenéticos indican que un proceso más antiguo iniciado hace ~16 Ma (Sá-Pinto *et al.*, 2008).

Las pruebas de F_s fueron significativamente negativas todas las especies analizadas, con excepción de *N. deaurata*. Similarmente, las pruebas de neutralidad de Tajima D fueron significativas en *N. magellanica* y *N. mytilina*. Ambas pruebas de neutralidad sugieren que la mayoría de las especies de magallánicas han experimentado eventos demográficos de expansión muy reciente (Fig. 4.3). Estos resultados son esperables en regiones que se han visto sometidas a los eventos recurrentes de expansión y retracción de hielo glacial durante el Pleistoceno (McCulloch *et al.*, 2000; Hulton *et al.*, 2002). Las distribuciones de desajuste variaron en función de la especie, pero en general se encontró un patrón unimodal cuyas mayores frecuencias fueron de 4 sitios (*N. flammea*), 2.4 sitios en *N. magellanica*; y 0.6 sitios en *N. mytilina* (Fig. 27). La especie *N. deaurata* mostró un patrón distinto al anteriormente descrito con una distribución bimodal con haplotipos de alta frecuencia ubicados a 1 y 6 pasos mutacionales (Fig. 27). Este resultado podría ser evidencia de un proceso demográfico distinto al de las otras especies con la presencia de dos linajes mitocondriales. Estudios genético poblacionales en desarrollo en *N. deaurata* incluyendo ejemplares de Isla Malvinas sugieren la presencia de dos linajes mitocondriales claramente diferenciado por más de siete pasos mutacionales, uno específico de Isla Malvinas y otro compartidos entre ambas regiones. Las secuencias de COI en las especies de Magallanes sugieren una estrecha relación entre las especies analizadas lo que se vio corroborada con los resultados de los

análisis de redes de halotipos donde el más frecuente en Magallanes es compartido por tres especies (*N. deaurata*, *N. flammea*, *N. magellanica*) de las cuatro especies. Esto implicaría un proceso de diversificación desde dicho haplotipo ancestral (Posada & Crandall, 2001) hacía la diversidad que actualmente se observa en las distintas especies analizadas y en Magallanes.

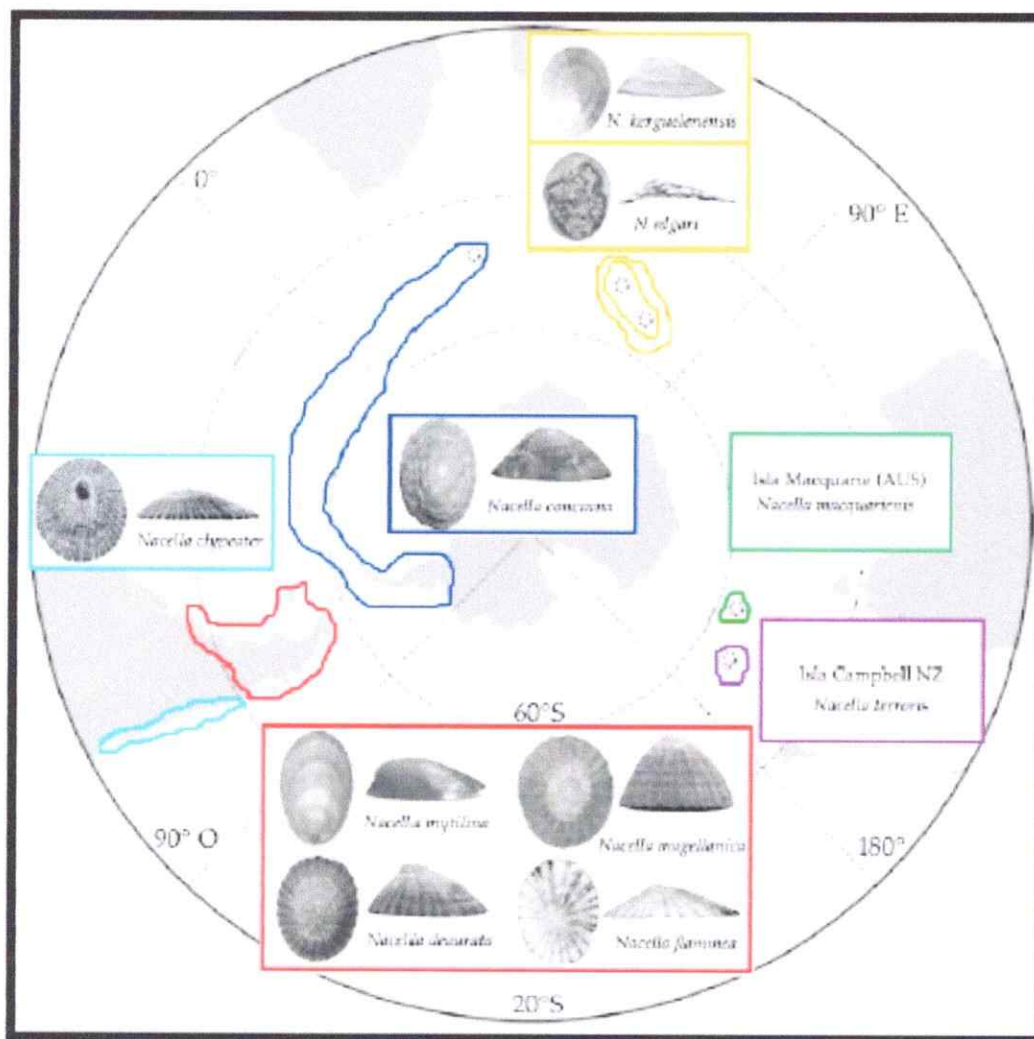


Figura 4.3. Unidades propuestas para el género *Nacella* detectadas en base a los análisis filogenéticos y al grado de diferenciación genética entre ellas.

La ausencia de monofilia recíproca y los tiempos de divergencia estimados entre las especies descritas para Magallanes pueden ser interpretados de dos formas. Primero, las unidades taxonómicas descritas para la región podrían corresponder a una especie única unidad altamente variable en términos morfológicos. Es más, en base a las diferencias ecológicas en términos de preferencias de substratos y batimétricas las morfo-especies definidas para Magallanes podrían ser interpretadas como ecotipos, considerando que se encuentran en simpatría a lo largo del Estrecho de Magallanes (Powell, 1973). En este sentido, estudios moleculares recientes en patelogastrópodos han detectado ausencia de aislamiento genético en especies descritas en base a caracteres morfológicos (Nakano & Spencer, 2007; Lindberg, 2008). Sin embargo, los resultados obtenidos en las comparaciones entre especies magallánicas indican que entre ellas habría un grado de diferenciación genética a pesar de que fueron recolectadas desde el mismo sitio de muestreo.

Una segunda posibilidad para explicar estos resultados sería la presencia de una diversificación muy reciente del género en Magallanes, seguida de una rápida radiación morfológica. La morfología la concha en patelogastrópodos, en especial forma, grosor y coloración varían entre y dentro de especies que ocupan distintos hábitats (Nakano & Ozawa, 2005; Nakano & Spencer, 2007). A modo de ejemplo, especies que habitan sobre macroalgas, como *N. mytilina*, muestran marcadas diferencias en grosor y coloración de la concha, en comparación a aquellas que viven sobre substratos duros. Tasas de evolución molecular neutra y de cambio morfológico desacoplados es un fenómeno comúnmente observado en distintos grupos de patelogastrópodos como en *Helcion*, *Patelloida* y

Notoacmea (Nakano & Ozawa, 2005; Nakano & Spencer, 2007; Lindberg, 2008) e incluso en *Nacella* (*N. kerguelenensis*-*N. aff. mytilina*; *N. concinna*-*N. delesserti*). Si estamos observando una diversificación muy reciente en Magallanes, es posible que el nivel de resolución de los marcadores utilizados no sea el adecuado para detectar diferencias entre las unidades. de Aranzamendi *et al.* (2009) analizando marcadores nucleares más variables (ISSRs) distinguió marcadas diferencias entre *N. magellanica*, *N. deaurata* y *N. mytilina* de la costa Atlántica Argentina. Alta diversidad de especies endémicas ha sido descrita en otros grupos de moluscos a lo largo de los fiordos de la región magallánica (Valdovinos *et al.*, 2003). De acuerdo a estos autores, la presencia de refugios múltiples a lo largo de esta Provincia durante los últimos ciclos glaciales podría haber permitido a estos grupos a sobrevivir los repetidos avances y retrocesos de hielos. Al mismo tiempo, la fragmentación y aislamiento de dichas áreas podría haber favorecido y acelerado los procesos de especiación en la región.

La radiación adaptativa es *la evolución de diversidad ecológica y fenotípica al interior de un linaje de rápida multiplicación* (Schluter, 2000; Losos & Miles, 2002). No obstante esta definición es incompleta si no indica que *involucra la diferenciación a partir de un único ancestro común de un arreglo de especies que habitan una variedad de ambientes y difieren en rasgos morfológicos o fisiológicos* (Schluter, 2000 a, b). Paralelamente la Radiación No Adaptativa es la rápida diversificación de especies sin cambio en diversidad ecológica y/o fenotípica. (Losos *et al.*, 2000; Kozak *et al.*, 2006). No existe un criterio cuantitativo (número de especies) que permita reconocer los clados que constituyen radiaciones adaptativas (Schluter, 1993). Al respecto, es necesario plantear criterios objetivos para probar la

hipótesis de que la diversidad morfológica observada tiene una base genética o si se trata de otros fenómenos como plasticidad fenotípica. La competencia por recursos ha sido la causa más citada como fuente de diferenciación fenotípica (Schluter, 2000 a; Losos & Miles, 2002). Se han planteado criterios que permiten reconocer eventos de radiación adaptativa los cuales se pondrán a prueba (cuando sea posible) en base al conocimiento que se tiene sobre *Nacella* en Magallanes. 1) *Ancestría común*: es importante determinar si el linaje o grupo comparte un ancestro común. Las reconstrucciones en *Nacella* basadas en marcadores mitocondriales y nucleares confirmaron la diversificación de *Nacella* en Magallanes a partir de un ancestro común. 2) *Correlación positiva entre fenotipo y ambiente*: se asume que debe existir un ajuste entre los diferentes fenotipos de los descendientes que permiten explicar el criterio adaptativo. Para esto, se debe tener una base genética de las diferencias y no provenir de respuestas plásticas a ambientes divergentes (Schluter, 1993; Losos *et al.*, 2000; Losos & Miles, 2002). Los resultados morfológicos y genéticos en las unidades magallánicas del género sugieren un cierto grado de diferenciación genética entre ellas, los cuales se ven acompañados por variación morfológica. Junto con esto, las mayores diferencias morfológicas se detectan en aquellas especies que habitan ambientes contrastantes como en *N. mytilina* que habita frondas de *Macrocystis pyrifera*, la especie submareal *N. flammea*. 3) *Utilidad del rasgo*: debe existir evidencia de que el rasgo fisiológico o morfológico son útiles en los ambientes en que son utilizados. Lamentablemente no existen estudios fisiológicos comparativos en especies de *Nacella* de Magallanes y la morfología de la concha en patelogastrópodos (que podría ser un rasgo a considerar) es

altamente variable sin necesidad de que vaya acompañado de un componente genético subyacente. 4) *Especiación acelerada*: evolución acelerada de aislamiento reproductivo, definida como ausencia total de hibridación entre individuos o por marcada restricción al flujo génico (Schluter, 1993). Los tiempos de divergencia estimados en las especies magallánicas de *Nacella* sugieren un proceso acelerado de diversificación en esta región. Sin embargo, no existen estudios reproductivos en estas especies que permitan asegurar la ausencia de hibridación en las unidades magallánicas. En base a los antecedentes expuestos, no es posible asegurar que el fenómeno de Radiación Adaptativa haya operado sobre las especies de *Nacella* de la Provincia Magallánica pero abre la oportunidad de generar nuevas líneas de investigación relacionadas a ecología, fisiología y reproducción en el grupo. Futuros estudios morfológicos, fisiológicos, ecológicos y reproductivos buscarán obtener nueva información para que sea incorporada a la filogenia de *Nacella* mediante análisis de método comparado y así poner a prueba el fenómeno de Radiación Adaptativa en Magallanes.

4.4. Glaciaciones del Pleistoceno y su efecto sobre la diversidad genética en especies de Nacella a lo largo de un gradiente latitudinal

Una de las mayores fuerzas que modela la distribución de los taxa lo constituye el cambio climático el que en casos extremos puede generar extinciones, especialmente en zonas cercanas a los límites de los rangos de tolerancia de una especie (Hewitt, 1996). Desde inicios del Cuaternario (2.6 Ma) hasta los 0.9 Ma se registran eventos glaciales recurrentes caracterizados por el

avance y retroceso de las capas de hielo en ciclos de 41.000 años (41 Ka). Posterior a los 0.9 Ma se extiende el periodo de los ciclos glaciales a 100 Ka y los procesos se vuelven más intensos (Hewitt, 2000). Tal periodicidad en los procesos glaciales sugiere que existiría un mecanismo de control y la teoría Croll-Milankovitch propone que las variaciones regulares de la órbita terrestre alrededor del sol serían las responsables modificando el grado, los niveles de insolación de la tierra y la energía que ésta recibe (Hewitt, 2000). La mayor parte de la energía es transportada por el sistema de circulación oceánica cuya interacción con las variaciones orbitales generan cambios climáticos significativos (Webb *et al.*, 1997). Los eventos glaciales del pleistoceno pueden producir grandes cambios en la distribución de algunos taxa, algunas especies desaparecieron en gran parte de sus rango de distribución mientras que otras dispersaron hacia nuevas zonas menos impactados, sobreviviendo en refugios desde los cuales posteriormente recolonizaron nuevas áreas libres de hielo (Hewitt, 2000). De esta forma, las dinámicas poblacionales son dependientes de la geografía, altitud, latitud e historia de vida y la constitución genética actual de las especies y poblaciones llevan señales atenuadas de procesos pasados (Hewitt, 2004; Marko, 2004; Fraser *et al.*, 2009). Estudios filogeográficos basados en secuencias de DNA han mostrado claros patrones de diversidad en distintos grupos de organismos, estrechamente relacionados a regiones biogeográficas. En general, las especies árticas muestran clados genéticos poco diferenciados con límites geográficos comunes. Zonas que fueron refugios glaciales de Europa y Norte America se caracterizan por presentar divergencias más profundas entre taxa, lo que sugiere que resistieron varias edades de hielo (Hewitt, 2004).

Especies de regiones europeas templadas muestran patrones disímiles de colonización postglacial en una misma área y las regiones montañosas tropicales contienen linajes separados ancestralmente y en áreas geográficas pequeñas, lo que sugiere su supervivencia desde el Plioceno.

Durante el último máximo glacial (LGM; ~20.000 años), muchos taxa se retiraron de los polos hacia refugios en latitudes menores y durante los periodos interglaciales recolonizaron latitudes mayores muy rápidamente, sobre todo en aquellas especies con alta capacidad de dispersión. Evidencia de esto, sería los patrones de diversidad genética en poblaciones recolonizadas muestran mayores niveles de homogeneidad (Hewitt, 1996, 2000, 2004). La mayoría de los estudios que asocian diversidad genética y cambio climático reciente se han realizado en especies del Hemisferio Norte (Edmands, 2001; Marko, 2004), y existen muy pocos estudios sobre los efectos bióticos de las glaciaciones pleistocénicas en regiones oceánicas del Hemisferio Sur (Fraser *et al.*, 2009). La biota marina subantártica sensible al hielo debería haber sufrido patrones de extinción y recolonización comparables, pero a macro-escala, a lo que actualmente ocurre por el avance de los hielos durante de invierno en el Océano Austral. El hielo en Antártica tiene un gran efecto pulidor eliminando la mayor parte del bentos en los rangos actuales de expansión (Gutt, 2001; Barnes & Conlan, 2007) y durante el LGM, dichos efectos deberían haberse visto intensificados (Fraser *et al.*, 2009). El hielo marino afecta los sistemas oceánicos costeros ya que influye sobre los patrones de circulación, altera considerablemente el nivel del mar, el grado de radiación reflejada y las tasas de cambio climático (Keeling & Stephens, 2001). La comprensión de las condiciones

de hielo durante el LGM en el Sur aún es incompleta siendo la revisión más completa aquella realizada por Gersonde *et al.* (2005). Dicho estudio muestra un claro desconocimiento de lo ocurrido durante el último LGM en las regiones subantárticas. Las estimaciones de la cobertura de hielo marino sobre el LGM se han derivado a partir de datos fósiles de diatomeas y foraminíferos (Gersonde *et al.*, 2005). El advenimiento de nuevas técnicas moleculares proveen de formas alternativas para estudiar la historia de los organismos y los efectos de los cambios climáticos sobre la diversidad genética. En este contexto, la presente investigación entrega valiosa información sobre el efecto del LGM sobre diversidad genética en un género dominante de invertebrados marinos bentónicos en el Océano Austral, que además es sensible al hielo. A través de análisis filogeográficos comparativos basados en secuencias de DNA mitocondrial se busca determinar el efecto de los ciclos glaciales recurrentes del pleistoceno sobre la diversidad genética de *Nacella* en un gradiente latitudinal. Los resultados obtenidos en *Nacella* de Antártica y Magallanes muestran un patrón claro de disminución de la diversidad genética con la latitud y serán discutidos de manera conjunta. Los resultados obtenidos en *N. clypeater* no se ajustan al patrón esperado y serán discutidos de manera independiente.

4.5. Comparación de la diversidad genética en especies de *Nacella* de Antártica y Magallanes

Los análisis de morfometría geométrica en ejemplares submareales e intermareales de *Nacella concinna* (Bahía Fildes y Bahía Almirantazgo) detectaron diferencias significativas entre ellas (González-Wevar, en prensa). Estos resultados apoyan observaciones previas realizadas por Picken (1980), Beaumont & Wei (1991), Nolan (1991), Brêthes *et al.* (1994) y de Aranzamendi *et al.* (2008) en la misma especie. Las comparaciones genéticas entre ambas morfologías no detectaron diferencias significativas entre ellas. Así, los resultados moleculares apoyan la hipótesis de una sola unidad poblacional en *N. concinna* en Antártica. Beaumont & Wei (1991) sugieren que las formas en la lapa antártica reflejan una gran plasticidad fenotípica inducida por el ambiente. Sin embargo, de Aranzamendi *et al.* (2008) utilizando marcadores nucleares ISSRs detectaron diferencias genéticas significativas entre ambas morfologías. Recientemente, Hoffman *et al.* (en prensa) utilizando AFLPs no encuentran diferencias entre formas intermareales y submareales de *N. concinna*, corroborando los resultados obtenidos a partir de secuencias de COI en la presente investigación.

Se detectaron bajos niveles de diversidad genética para COI en la especie antártica de *Nacella*. Como lo mostraron los resultados, la especie antártica representa una unidad genética homogénea con niveles moderados de diversidad haplotípica ($H = 0.630$) y nucleotídica ($\pi = 0.00128$; Tabla 3.7). En 161 ejemplares analizados se detectaron sólo 16 haplotipos de los cuales el más frecuente fue compartido por el 58% de los individuos y estuvo presente en

todos los sitios de muestreo. Tales niveles de diversidad son comparables a los obtenidos en otras especies de nacélidos (Goldstien *et al.*, 2006 b; Bird *et al.*, 2007).

En teoría, tamaños poblacionales grandes deberían sostener altos niveles de diversidad genética ya que el efecto de la deriva se haría despreciable y aumentaría la tasa de acumulación de mutaciones. Los índices de diversidad estimados en *N. concinna* deberían ser generados por tamaños efectivos entre 66.500 y 376.500 individuos, menor que los tamaños poblacionales esperados para la especie en base a las densidades poblacionales reportadas (Picken, 1980; Brêthes *et al.* 1994). Además de la baja diversidad genética registrada, *N. concinna* mostró genealogías en forma de estrella caracterizadas por ramas muy cortas y una distribución de desajuste en forma de L. Los valores negativos globales de los índices de Tajima D y Fu F_s evidencian un exceso de haplotipos de baja frecuencia. Todos estos resultados apoyan la existencia de una expansión demográfica reciente en la especie. Bajo este escenario, las estimaciones de dicho proceso histórico varían entre 64.000 y 220.000 años atrás, dependiendo del modelo de crecimiento utilizado. Dichos rangos de tiempo no se ajustan a la drástica disminución de los tamaños efectivos en la especie como consecuencia de los ciclos glaciales recurrentes del pleistoceno. En este sentido, cuesta imaginar un escenario evolutivo de expansión demográfica tan ancestral sin evidencia del efecto del LGM sobre la diversidad de la especie. Recientemente se ha descrito un efecto de dependencia de tiempo en las tasas de evolución molecular (Ho *et al.*, 2005), donde análisis moleculares poblacionales han estimado tasas de mutación muchísimo más altas que las inferidas por

análisis filogenéticos. A partir de datos de variación de DNA mitocondrial de aves y primates se ha demostrado que las tasas de mutación a escala de tiempos recientes (menor a 2 Ma) son un orden de magnitud mayores que las tasas de evolución medidas en análisis filogenéticos (Ho *et al.*, 2005; 2007). En el presente análisis se utilizó una tasa de mutación estimada para el género *Cellana* (datos no publicados), por lo que las estimaciones de tiempo de expansión en la especie podrían estar sesgadas por el uso de una aproximación errada. Bajo esta perspectiva, incorporando la corrección (un orden de magnitud menor), las nuevas estimaciones fluctúan entre los 7.500 – 22.000 años atrás, fechas que se ajustan mejor al esperado de una expansión posterior al LGM. Si consideramos que la lapa antártica posee un rango batimétrico estrecho (0 – 100 mts), en comparación a otros grupos de invertebrados antárticos, el efecto de la expansión de los hielos sobre la plataforma continental antártica durante los periodos glaciales debería haber generado una drástica reducción de sus hábitats, limitándola sólo a refugios en áreas libres de hielo (Poulin *et al.*, 2002; Thatje *et al.*, 2005 a). De esta forma, *N. concinna* podría haber sobrevivido los periodos glaciales en islas subantárticas como Georgias del Sur, Gough, Sandwich, donde actualmente se distribuye. Durante los periodos interglaciales la especie podría recolonizar la Península Antártica desde los refugios. El alto grado de similitud genética entre los ejemplares de Península Antártica y los ejemplares de Georgia del Sur e Isla Marión, respectivamente, apoyan esta hipótesis demográfica glacial – interglacial en la lapa antártica. De acuerdo a Beaumont & Wei (1991), la *N. concinna* puede ser transportada por rafting entre islas del Arco de Escocia,

lo que permitiría dar una explicación al mecanismo de dispersión a gran escala entre Antártica e Isla Marión.

Los bajos niveles de diversidad genética y la alta homogeneidad en secuencias de DNA detectadas en *N. concinna* contrastan con otros estudios en invertebrados marinos bentónicos antárticos que exhiben mayores niveles de diversidad (Mahon *et al.*, 2008; Thornhill *et al.*, 2008; Krabbe *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009). La mayoría de dichos grupos poseen rangos batimétricos amplios en comparación a *N. concinna*. En general se considera que especies con mayores rangos batimétricos podrían haber utilizado dicha adaptación para prevenir el impacto demográfico durante el avance de los hielos, a través de migraciones verticales (Brey *et al.*, 1996). Así, los resultados en *Nacella* y en otros invertebrados antárticos sugieren que el grado de diversidad genética podría estar relacionado a la batimetría de la especie en estudio.

Las secuencias de COI en la especie magallánica (*N. magellanica*) mostraron niveles moderados de variación, los cuales son superiores a los detectados en la misma especie en Patagonia Argentina (de Aranzamendi *et al.*, 2009) y a su especie congénica Antártica (González-Wevar *et al.*, en prensa). Los niveles de diversidad en la especie son menores que los observados para el mismo marcador en especies estrechamente relacionadas de moluscos. Kirkendale & Meyer (2004) y Nakano & Ozawa (2005) detectaron niveles un orden de magnitud más altos para el mismo marcador en *Patelloida* mientras que Sá-Pinto *et al.* (2008) analizando cuatro especies de *Patella* detectaron niveles de diversidad intraespecífica más altos que los registrados en *N. magellanica*. No obstante, los niveles de diversidad detectados en especies de *Nacella* son

comparables a los obtenidos en especies de *Cellana* de Nueva Zelanda (Goldstien *et al.*, 2006 b) y de Hawai (Bird *et al.*, 2007).

Al igual que a lo planteado para la especie antártica, los niveles de diversidad genética estimados en *N. magellanica* deberían ser sostenidos por tamaños poblacionales entre 245.000 y 775.000, lo que es más bajo que lo esperado en base a las densidades poblacionales estimadas para la especie (Guzmán, 1978; Guzmán & Ríos, 1986; Ríos & Gerdes, 1997; Ríos & Mutschke, 1999, Ríos *et al.*, 2003; Bazterrica *et al.*, 2007). La genealogía en *N. magellanica* se caracterizó por una forma de estrella de ramas relativamente cortas y por además presentó una distribución de desajuste unimodal donde la mayoría de los haplotipos no se diferencian en más de dos pasos mutacionales entre ellos. Paralelamente, los valores negativos globales en los índices de Tajima y Fu sugieren una expansión demográfica reciente en la especie. A pesar de la baja diversidad genética que mostró la especie los análisis de estructuración detectaron niveles de diferenciación significativa entre sus poblaciones. Esta diferenciación no mostró un patrón claro atribuible a distancia geográfica o a barreras al flujo genético ya que localidades cercanas geográficamente (i.e. Punta Santa Ana – Bahía Laredo; Bahía Laredo – Buque Quemado) mostraron niveles de estructuración entre ellas mientras que localidades muy lejanas (i.e. Puerto Deseado – Punta Santa Ana) fueron similares a nivel poblacional. Al respecto, las localidades Puerto Deseado y Bahía Laredo fueron las que mostraron mayores niveles de diferenciación con los otros sitios de muestreo. Sin embargo, los análisis de SAMOVA mostraron que sólo una pequeña fracción de la varianza genética (12.88%) era explicada por diferencias entre los grupos estimados en la mejor partición. Estudios

futuros utilizando marcadores moleculares más variables (AFLP) buscarán dar una explicación a los patrones de estructuración entre localidades detectados en la especie.

Las estimaciones del proceso de expansión poblacional bajo los modelos de crecimiento instantáneo y exponencial (123.000 – 425.000 años) no se ajustan a la hipótesis de disminución de los tamaños efectivos en la especie como consecuencia de los ciclos recurrentes glaciales interglaciales del Pleistoceno. Incorporando la corrección planteada por Ho *et al.* (2005, 2007) para estimaciones de tiempos de divergencia recientes obtenemos una expansión entre 12.300 y 42.500 años dataciones que se ajustan a lo esperado para las últimas transiciones glaciales-interglaciales y al registro fósil holocénico y pleistocénico tardío de la especie en la región (Gordillo, 1999; Aguirre *et al.*, 2006, 2009; Cárdenas & Gordillo, 2009; de Aranzamendi *et al.*, 2009). Considerando que la distribución de la especie abarca desde Chiloé hasta la Provincia de Buenos Aires en el Atlántico, es posible que los extremos de la distribución actual correspondan a refugios utilizados por ella para resistir el avance de los hielos en Magallanes. De ser así, se esperaría encontrar un aumento de la diversidad genética en la especie a medida que disminuye la latitud, en ambas costas de Sudamérica. Estudios genético poblacionales y morfológicos buscarán determinar si los niveles de diversidad genética en los extremos y en la zonas intermedias de la distribución de la especie difieren de los observados en Magallanes.

La comparación de la diversidad genética en *Nacella* apoyan la hipótesis de que las especies del género han recolonizado recientemente la región antártica.

Nacella concinna muestra niveles muy altos de homogeneidad genética en esta región en comparación a la especie magallánica. El patrón de diversidad genética detectado en la lapa antártica es típico en especies de rápida expansión y recolonización postglacial (Hewitt, 2000, 2004). La recolonización de Antártica podría haber ocurrido recientemente, desde islas subantárticas cercanas a través del Arco de Escocia como lo evidencian la similitud genética entre los ejemplares de Isla Georgia del Sur con los de Península. Esta interpretación se ve apoyada por reconstrucciones oceanográficas recientes que sugieren que durante el LGM, la capa de hielo no habría alcanzado a cubrir muchas islas subantárticas (Gersonde *et al.* 2005). Estos resultados sugieren que los tamaños efectivos de la especie antártica se podrían haber visto dramáticamente disminuidos durante el LGM en Península Antártica producto de la abrasión por hielo. La mayor parte de la variación detectada en *Nacella* en un gradiente latitudinal se restringe a la región magallánica. *Nacella magellanica* mostró mayor diversidad y niveles de diferenciación entre poblaciones separadas por cortas distancias geográficas. Por el contrario, en Península Antártica se detecto homogeneidad genética a lo largo de los sitios de muestreo (800 kms). Este contraste latitudinal en diversidad genética sugiere eventos de colonización reciente de Antártica, similar a los patrones de recolonización postglacial observado en taxa del Hemisferio Norte (Hewitt, 2004). Aunque no es posible estimar de manera exacta los tiempos de recolonización debido a la ausencia de estimaciones robustas de las tasas de mutaciones, la homogeneidad genética observada en Península Antártica es consistente con una recolonización postglacial. La especie congénérica *N. magellanica* muestra una mayor

diversidad de haplotipos más ancestrales, observándose evidencia de subdivisión a lo largo de los sitios de muestreo. Estimaciones de los tamaños efectivos muestran una menor reducción en la especie magallánica que en la especie antártica. Estos resultados son consistentes con la hipótesis de que *N. magellanica* podría haber sobrevivido el LGM expandiendo su distribución hacia zonas de refugio más al norte, las que actualmente representan los límites de su distribución, Pto. Montt y Chiloé en el Océano Pacífico y la Provincia de Buenos Aires en el Atlántico. Otra posible explicación a los resultados observados podría deberse a que los ritmos de retroceso de los hielos durante el interglacial fueron distintos en las Provincias de Magallanes y Antártica. La región magallánica podría haberse liberado de los efectos de hielo permanente antes que Antártica y eso permitiría una recuperación previa de las poblaciones que ahí habitan. Al respecto, los procesos y efectos glaciales son los mismos en Antártica y Magallanes y las diferencias de diversidad genética entre ambas regiones podrían ser producto de diferencias en los ritmos de retroceso de los hielos.

4.6. *Nacella clypeater* (Provincia Peruana)

Se detectaron niveles extremadamente bajos de diversidad genética en *N. clypeater*, comparado con otros estudios en patelogastrópodos (Kirkendale & Meyer, 2004; Nakano & Ozawa, 2005; Sá-Pinto *et al.*, 2005, 2008; Nakano & Spencer, 2007) y en nacélidos (Goldstien *et al.*, 2006 b; Bird *et al.*, 2007; de Aranzamendi *et al.*, 2009; González-Wevar *et al.*, en prensa). La especie de la Provincia Peruana representa una única unidad genética a lo largo de ~ 1200 km

de muestreo con niveles extremadamente bajos de diversidad haplotípica ($H = 0.105$) y nucleotídica ($\pi = 0.00016$). Niveles de diversidad genética tan bajos como los registrados en *N. clypeater* han sido reportados en otras especies de invertebrados como en esponjas de los géneros *Astroclera* (Wörheide, 2006) y *Rhopaloides* (Whalan *et al.*, 2008), en el calamar *Sepioteuthis lessoniana* (Misuzu *et al.*, 2005) y en el coléoptero *Bombus ardens* (Kim *et al.*, 2009).

Junto a los bajos índices de diversidad registrados, la genealogía de *N. clypeater* se caracterizó por presentar una forma de estrella extremadamente corta, el haplotipo más frecuente se encontró en el 94.6% de los individuos analizados. Considerando la distancia geográfica abarcada en esta investigación, la variación de las secuencias de DNA mitocondrial es de las más bajas reportadas en Patellogastropoda y en invertebrados. Estos resultados sugieren una expansión demográfica muy reciente entre 800 – 4.600 años atrás a partir de una disminución poblacional dramática (posterior a la corrección de Ho *et al.*, 2005, 2007). Es importante señalar que *N. clypeater*, a diferencia de los otros miembros del género se distribuye a lo largo de la Provincia Peruana fuera del rango de distribución general del género. Observaciones en terreno indican que su distribución dentro de esta provincia es irregular en comparación a otros invertebrados marinos que muestran distribución continua a lo largo de la costa chilena. De esta forma, es posible que *N. clypeater* se trate de una especie relictica proveniente de la diversificación pliocénica descrita en el Sur del Perú (DeVries, 2009). Estudios genéticos en especies relicticas de invertebrados marinos (Wörheide, 2006; Durán *et al.*, 2004) han mostrado en ellas niveles de diversidad genética similares al registrado en *N. clypeater*. Si a esta condición relictica, se le

suma el efecto adverso que podría tener el aumento de las temperaturas superficiales durante los eventos El Niño-Oscilación del Sur (ENSO), podríamos tener una explicación a los bajos niveles de diversidad observados en la especie.

Otros grupos de invertebrados que muestran niveles de diversidad tan bajos como los detectados en *N. clypeater* poseen tiempos generacionales extensos y tasas metabólicas muy bajas (Wörheide, 2006), información que actualmente no está disponible para esta especie. Otra posible explicación sería la existencia de una baja tasa de evolución para COI en la especie a la presencia de un evento selectivo muy reciente sobre el gen COI o en cualquier gen mitocondrial (*hitchhiking*). Estudios en proceso, basados en marcadores nucleares más variables (AFLPs y EPIC30), buscarán determinar si los resultados obtenidos a partir de secuencias mitocondriales se relacionan a procesos selectivos o demográficos ocurridos en la especie.

5. CONCLUSIONES

Las conclusiones de la presente investigación se formularon en relación a las hipótesis planteadas en la Introducción.

H1: Los tiempos tiempo de divergencia entre las especies del género Nacella provenientes de Antártica y Subantártica están directamente relacionado con la separación de las Provincias del Océano Austral durante el Cenozoico. Por lo tanto, se espera encontrar congruencia entre los tiempos de separación de los linajes de Nacella estimados a través de marcadores moleculares y los eventos geológicos más importantes ocurridos en el Océano Austral.

Las estimaciones de los tiempos de divergencia en la evolución de los linajes *Nacella* no se ajustan a lo esperado bajo la hipótesis de Especiación Vicariante por tectónica de placas en el Océano Austral. A pesar de que el patrón de distribución y las diferencias genéticas detectadas entre los linajes de *Nacella* se ajustan a los patrones de distribución en gastrópodos en el Océano Austral, no hay relación entre los tiempos de separación estimados y los mayores eventos tectónicos en el Océano Austral durante el Eoceno y Mioceno como la apertura de los Pasos de Tasmania y Drake. Las estimaciones de tiempos de divergencia sugieren que los procesos tectónicos y los marcados cambios climáticos-oceanográficos en el Océano Austral se relacionan a la separación de la familia Nacellidae en los géneros *Nacella* y *Cellana*. En base a los resultados con distintos marcadores, el origen y diversificación de las especies actuales de *Nacella* en

distintas provincias del Océano Austral sería un proceso más reciente, a fines del Mioceno y Plioceno. De esta forma, la evolución del género estaría más asociada a cambios climáticos y oceanográficos descritos en el Océano Austral como una intensificación de la CCA, después de la Transición Climática del Mioceno Medio, que a eventos geológicos. Se observa una clara diferenciación entre los grupos antárticos y subantárticos del género y al mismo tiempo entre los linajes subantárticos analizados (Magallanes y Kerguelén). Por lo tanto, la distancia geográfica, a diferencia de otros grupos de invertebrados en el OA, constituye una barrera efectiva al flujo genético entre especies de *Nacella* de ambas provincias. La evolución de *Nacella* se puede dividir en tres eventos de diversificación. La primera, más ancestral, cercana al origen habría ocurrido entre 9 - 6 Ma incluye los linajes antártico (1), kerguelenianos (2) y sudamericanos (2). Una segunda ronda incluye sólo a las especies sudamericanas del género aparecidas durante el plioceno desde el ancestro común de *N. clypeater* (Provincia Peruana) y las especies magallánicas. Finalmente, se distingue una tercera ronda que involucra una diversificación pleistocénica de especies en Magallanes.

Las reconstrucciones filogenéticas indican una alta similitud entre las morfoespecies descritas para Magallanes y ninguno de los marcadores seleccionados mostró monofilia recíproca entre ellas. En base a las comparaciones genéticas entre siete especies magallánicas, los resultados en *Nacella* sugieren la existencia de sólo cuatro unidades genéticas las cuales además muestran diferencias ecológicas, morfológicas y batimétricas. En base a estos resultados, se sugiere que las especies *N. magellanica*, *N. deaurata*, *N. mytilina* y *N. flammea* muestran un

grado de separación incipiente entre ellas. La alta plasticidad fenotípica detectada en *Nacella* permite explicar estas incongruencias en la taxonomía basada en caracteres morfológicos. De esta forma, los resultados obtenidos a partir de secuencias de DNA en *Nacella* revelan la necesidad de hacer una revisión exhaustiva de la sistemática del género considerando aspectos genéticos, morfológicos, reproductivos y ecológicos. En base a los resultados, el género *Nacella* en el Océano Austral estaría compuesto por diez especies, dos de las cuales, *N. terroris* y *N. macquariensis*, necesitan ser aún corroboradas incluyéndolas en futuras reconstrucciones.

H2: La disminución de las temperaturas desde el Mioceno y los ciclos glaciales del Pleistoceno en el Océano Austral afectaron de manera negativa los tamaños poblacionales de Nacella a través de una disminución de sus tamaños efectivos. Esta disminución debería visto acompañada por efectos de cuellos de botella que generarían una marcada disminución de la diversidad genética. De esta forma, el efecto de los procesos glaciales recurrentes del Pleistoceno deberían haber sido más marcados en latitudes mayores. Se espera encontrar una disminución en la diversidad genética en las especies de Nacella a medida que aumenta la latitud.

Los análisis de diversidad genética en *Nacella* a lo largo de un gradiente latitudinal no mostraron el patrón esperado de disminución de ésta con la latitud. Si bien se detectó una clara disminución en los índices de diversidad genética entre las especies de Magallanes (*N. magellanica*) y la especie antártica (*N. concinna*), el grado de diversidad genética detectada en *N. clypeater*

(Provincia Peruana) fue mucho menor que el detectado en las otras dos especies del género. A diferencia de lo esperado, la especie de la costa Central de Chile mostró los niveles de diversidad más bajos registrados en el género, incluso menores que en la especie Antártica. La comparación de la diversidad genética entre Magallanes y Antártica sugiere que los eventos glaciales del pleistoceno habrían tenido un efecto mayor sobre las poblaciones de *N. concinna* (Antártica) que sobre *N. magellanica* de Magallanes. En este sentido, la presencia de refugios glaciales o la capacidad de dispersión de la especie magallánica hacía zonas menos impactadas por los eventos glaciales (Puerto Montt en el Pacífico y Buenos Aires en el Atlántico) podrían explicar la mayor diversidad detectada en Magallanes. Otra opción podría ser que el retroceso de los hielos en Magallanes fue previo a lo ocurrido en Antártica, de esta forma, la mayor diversidad sea reflejo de una recolonización más antigua.

Finalmente, los niveles extremadamente bajos de diversidad genética detectados en *N. clypeater* de la Provincia Peruana son desconcertantes pero sugieren procesos demográficos o de selección distintos a los que ocurren en las antártica y magallánica. La distribución actual de *N. clypeater* se podría encontrar fuera del rango de tolerancia del género en aguas antárticas y subantárticas y la especie constituiría una unidad relictiva relacionada en términos morfológicos y distribución a la diversificación pliocénica en el Sur del Perú. Al encontrarse fuera del rango de tolerancia y sometida a recurrentes eventos ENSO, *N. clypeater* podría haberse visto sometida a drásticos efectos de cuello de botella que han disminuido su diversidad genética a los niveles que actualmente se observan.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adema, C.M., 2002. Comparative study of cytoplasmic actin DNA sequences from six species of Planorbidae (Gastropoda: Basommatophora). *J. Moll. Stud.* 68, 17-23.
- Aguirre, M., 2003. Late Pleistocene and Holocene palaeoenvironments in Golfo San Jorge, Patagonia: molluscan evidence. *Mar. Geol.* 194, 3-30.
- Aguirre, M., Richiano, S., Negro Sirch, Y., 2006. Palaeoenvironments and palaeoclimates of the Quaternary molluscan faunas from the coastal area of Bahía Vera-Camarones (Chubut, Patagonia). *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 229, 251-286.
- Aguirre, M.L., Richiano, S., Álvarez, M.F., Eastoe, C., 2009. Malacofauna Cuaternaria del litoral norte de Santa Cruz (Patagonia, Argentina). *GEOBIÓS.* 42, 411-434.
- Alamo, V., Valdivieso, V., 1997. Lista sistemática de moluscos marinos del Perú. Instituto del Mar del Perú: Callao, Perú. 183 pp.
- Aljanabi, S.M., Martinez, I., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nuc. Acids Res.* 25, 4692-4693.
- Armbruster, G.F.J., van Moorsel, C.H.M., Gittenberger, E., 2000. Conserved sequence patterns in the non-coding ribosomal ITS-1 of distantly related snail taxa. *J. Mollus. Stud.* 66, 570-573.
- Arntz, W.E., 2005. The Magellan-Antarctic connection: links and frontiers at southern high latitudes. *Sci. Mar.* 69, 359-365.
- Arntz, W.E., Ríos, C., 1999. Magellan-Antarctic: ecosystems that drifted apart. *Sci. Mar.* 63(S1), 1-518.
- Arntz, W.E., Thatje, S., Gerdes, D., Gili, J.-M., Gutt, J., Jacob, U., Montiel, A., Orejas, C., Teixidó, N., 2005. The Antarctic-Magellan connection: macrobenthos ecology on the shelf and upper slope, a progress report. *Sci. Mar.* 69, 237-269.

- Arntz, W.E., Thatje, S., Linse, K., Avila, C., Bellesteros, M., Barnes, D.K.A., Cope, T., Cristobo, F.J., De Broyer, C., Gutt, J., Isla, E., López-González, P., Montiel, A., Munilla, T., Ramos, A.A., Raupach, M., Rauschert, M., Rodríguez, E., Teixidó, N., 2006. Missing link in the Southern Ocean: sampling the marine benthic fauna of remote Bouvet Island. *Pol. Biol.* 29, 83-96.
- Aronson, R.B., Blake, D.B., 2001. Global climate change and the origin of modern benthic communities in Antarctica. *Amer. Zool.* 41, 27-39.
- Aronson, R.B., Thatje, S., Clarke, A., Peck, L.S., Blake, D., Wilga, C.D., Seibel, B.A., 2007. Climate change and invisibility of the Antarctic benthos. *Ann. Rev. Evol. Syst.* 38, 129-154.
- Avise, J.C., 2001. *Phylogeography: The history and formation of species.* Harvard University Press. 447pp.
- Bandelt, H-J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37-48.
- Barco, A., Claremont, M., Reid, D.G., Houart, R., Bouchet, P., Williams, S.T., Cruaud, C., Couloux, A., Oliveira, M., in press. A molecular phylogenetic framework for the Muricidae, a diverse family of carnivorous gastropods. *Mol. Phylogenet. Evol.*
- Bargelloni, L., Marcato, S., Zane, L., Patarnello, T., 2000 a. Mitochondrial phylogeny of Notothenioids: A molecular approach to Antarctic fish evolution and biogeography. *Syst. Biol.* 49, 114-129.
- Bargelloni, L., Zane, L., Derome, N., Lecointre, G., Patarnello, T., 2000 b. Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of genetic variation. *Ant. Sci.* 12, 259-268.
- Barker, P.T., 2001. Scotia Sea regional tectonic evolution: implications for mantle flow and palaeocirculation. *Earth Sci. Rev.* 55, 1-39.

- Barker, P.F., Thomas, E., 2004. Origin, signature and paleoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth-Science Rev.* 66, 143-162.
- Barker, P.F., Filipelli, G.M., Florindo, F., Martin, E.E., Scher, H.D., 2007. Onset and role of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Res. II.* 54, 2388-2398.
- Barnes, D.K.A., De Grave, S., 2000. Biogeography of southern polar bryozoans. *Vie et Milieu* 50, 261-273.
- Barnes, D.K.A., Fuentes, V. Clarke, A. Schloss, I.R., Wallace, M.I., 2006. Spatial and temporal variation in shallow seawater temperatures around Antarctica. *Deep Sea Res. II.* 53: 853-865.
- Barnes, D.K.A., Conlan, K.E., 2007. Disturbance, colonization and development of Antarctic benthic communities. *Philos. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 362, 11-38.
- Bazterrica, M.C., Silliman, B.R., Hidalgo, F.J., Crain, C.M., Bertness, M.D., 2007. Limpet grazing on a physically stressful Patagonian rocky shore. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 353, 22-34.
- Beaumont, A.R., Wei, J.H.C., 1991. Morphological and genetic variation in the antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *J. Molluscan Stud.* 57, 443-450.
- Beu, A.G., Griffin, M., Maxwell, R.A., 1997. Opening of Drake Passage gateway and late Miocene to Pleistocene cooling reflected in Southern Ocean molluscan dispersal: evidence from New Zealand and Argentina. *Tectonophysics.* 281, 83-97.
- Bird, C.E., Holland, B.S., Bowen, B.W., Toonen, R.J., 2007. Contrasting phylogeography in three endemic Hawaiian limpets (*Cellana spp.*) with similar life histories. *Mol. Ecol.* 3, 3173-3186.
- Bowden, D.A., 2005. Seasonality of recruitment in Antarctic sessile marine benthos. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297, 101-118.

- Bowden, D.A., Clarke, A., Peck, L.S., Barnes, D.K.A., 2006. Antarctic sessile marine benthos: colonization and growth on artificial substrata over three years. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 316, 1-16.
- Bowden, D.A., Clarke, A., Peck, L.S., 2009. Seasonal variation in the diversity and abundance of pelagic larvae of Antarctic marine invertebrates. *Mar. Biol.* 156, 2033-2047.
- Bowman, R.S., 1981. The morphology of *Patella* spp. juveniles in Britain, and some phylogenetic inferences. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 61: 647-666.
- Branch, G.M., 1985a. Limpets: evolution and adaptation. In: Trueman, E.R., Clarke, M.R. (Eds.), *The Mollusca* Vol. 10, Academic Press New York, pp 187-220.
- Branch, G.M., 1985b. Limpets: their role in littoral and sublittoral community dynamics. In: Moore P.G., Seeds, R. (Eds.), *The ecology of rocky coast* Hodder and Stoughton, London, pp 97-116.
- Brandt, A., 2005. Evolution of Antarctic biodiversity in the context of the past: the importance of the Southern Ocean deep sea. *Ant. Sci.* 17, 509-521.
- Brandt, A., Linse, K., Mühlenhardt-Siegel, U., 1999. Biogeography of Crustacea and Mollusca of the Subantarctic and Antarctic regions. *Sci. Mar.* 63, 383-389.
- Brandt, A., De Broyer, C., De Mesel, I., Ellingsen, E., Gooday, A.J., Hilbig, B., Linse, K., Tyler, P.A., 2007. The biodiversity of the deep Southern Ocean benthos. *Phylos. Trans. Royal Soc. B.* 362: 39-66.
- Brêthes, J.-C., Ferreyra, G., de la Vega, S., 1994. Distribution, growth and reproduction of the limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel 1908) in relation to potential food availability, in Esperanza Bay (Antarctic Peninsula). *Polar Biol.* 14, 161-170.

- Brey, T., Clarke, A., 1993. Population dynamics of marine benthic invertebrates in Antarctic and subantarctic environments: are there unique adaptations? *Ant. Sc.* 5, 253-266.
- Brey, T., Klages, M., Dahm, C., Gorny, M., Gutt, J., Kain, S., Stiller, M., Arntz, W.E., 1994. Antarctic benthic diversity. *Nature.* 368, 297.
- Brey, T., Dahm, C., Gorny, M., Klage, M., Stiller, M., Arntz, W.E., 1996. Do Antarctic marine benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarc. Sci.* 8, 3-6.
- Brown, B., Gaina, C., Müller R.D., 2006. Circum-Antarctic palaeobathymetry: Illustrated examples from Cenozoic to recent times. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 231, 158-168.
- Burridge, C. P., Meléndez, R., Dyer, B.S., 2006. Multiple origins of the Juan Fernández kelpfish fauna, and evidence for frequent and unidirectional dispersal of cirrhitoid fishes across the South Pacific. *Syst. Biol.* 55, 566-578.
- Cadée, G., 1999. Shell damage and shell repair in the Antarctic limpet *Nacella concinna* from King George Island. *J. Sea Res.* 41, 149-161.
- Camus, P., 2001. Biogeografía marina de Chile continental. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 74, 587-617.
- Cárdenas, J., Gordillo, S., 2009. Paleoenvironmental interpretation of late Quaternary molluscan assemblages from southern South America: A taphonomic comparison between the Strait of Magellan and the Beagle Channel. *Andean Geol.* 36, 81-93.
- Cárdenas, L., Castilla, J.C., Viard, F., 2009. A phylogeography analysis across three biogeographical provinces of the south-eastern Pacific: the case of the marine gastropod *Concholepas concholepas*. *J. Bioeogr.* 36, 969-981.
- Castilla, J.C., Navarrete, S.A., Lubchenco, J., 1993. Southeastern Pacific Coastal Environments: Main Features, Large-Scale Perturbations, and Global Climate

- Change. *Earth System Responses to Global Change*, (ed. by H. Mooney, E. Fuentes and B. Kronberg), pp. 167-188. Academic Press, USA.
- Chan, K.M.A., Levin, S.A., 2005. Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution*. 59, 720-729.
- Chen, L., DeVries, A.L., Cheng, C.-H.C., 1997. Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 3811-3816.
- Chen, Z., Cheng, C.-H.C., Zhang, J., Cao, L., Chen, L., Zhou, L., Jin, Y., Ye, H., Deng, Dau, Z., Xu, Q., Sun, S., Shen, Y., Chen, L. 2008. Transcriptomic and genomic evolution under constant cold in Antarctic notothenioid fish. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105, 12944-12949.
- Chown, S.L., Lee, J.E., Shaw, J.D., 2008. Conservation of Southern Ocean Islands: invertebrates as exemplars. *J. Insect Conserv.* 12, 277-291.
- Clarke, A., 1990. Faecal egestion and ammonia excretion in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 138, 227-246.
- Clarke, A., Crame, A., 1989. The origin of the Southern Ocean marine fauna. In: Crame, A. (ed). *Origins and evolution of the Antarctic Biota*. Geological Society Special Publication 47, 253-268pp.
- Clarke, A., Crame, A., 1992. The Southern Ocean benthic fauna and climate change: an historical perspective. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 308, 299-309.
- Clarke, A., Prothero-Thomas, E., Whitehouse, M.J., 1994. Nitrogen excretion in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *J. Moll. Stud.* 60, 141-147.
- Clarke, A., Johnston, I.A., 1996. Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. *Trends Ecol. Evol.* 11, 211-218.
- Clarke, A., Johnston, N.M., 2003. Antarctic marine benthic diversity. *Oceanograph Mar. Biol. Ann. Rev.* 41, 47-114.

- Clarke, A., Aronson, R.B., Crame, J.A., Gili, J.-M., Blake, D.B., 2004 a. Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Ant. Sci.* 16, 559-568.
- Clarke, A., Prothero-Thomas, E., Beaumont, J.C., Chapman, A.L., Brey, T., 2004 b. Growth in the limpet *Nacella concinna* from contrasting sites in Antarctica. *Polar Biol.* 28, 62-71.
- Clarke, A., Barnes, D.K.A., Hodgson, D.A., 2005. How isolated is Antarctica? *Trends Ecol. Evol.* 20, 1-3.
- Clarke, A., Griffiths, H.J., Linse, K., Barnes, D.K.A., Crame, A., 2007. How well do we know the Antarctic marine fauna? A preliminary study of macroecological and biogeographical patterns in the Southern Ocean gastropod and bivalve mollusks. *Diversity Distrib.* 13, 620-632.
- Clarke, A., 2008. Antarctic marine benthic diversity: patterns and processes. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 366, 48-55.
- Coleman, P.J., 1980. Plate tectonics background to biogeographic development in the Southwest Pacific over the last 100 million years. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 31, 105-121.
- Colgan, D.J., Ponder, W.F., Eggler, P.E., 2000. Gastropod evolutionary rates and phylogenetic relationships assessed using partial 28S rDNA and histone H3 sequences. *Zool. Scripta.* 29, 29-63.
- Collins, T.M., Frazer, K., Palmer, A.R., Vermeij, G.J., Brown, W.M., 1996. Evolutionary history of northern hemisphere *Nucella* (Gastropoda, Muricidae): a molecular, morphological, ecological, and paleontological evidence. *Evolution.* 50, 2287-2304.
- Convey, P., Stevens, M.I., 2007. Antarctic Biodiversity. *Science.* 317, 1877-1878.

- Convey, P., Gibson, J.A.E., Hillenbrand, C-D., Hodgson, D., Pugh, P.J.A., Smellie, J.L., Stevens, M.I., 2008. Antarctic terrestrial life – challenging the history of the frozen continent? *Biol. Rev.* 83, 103-117.
- Côrte-Real, H.B.S.M., Hawkins, S.J., Thorpe, J.P., 1996. Population differentiation and taxonomic status of the exploited limpet *Patella candei* in the Macaronesian islands (Azores, Madeira, Canaries). *Mar Biol.* 125, 141-52
- Coyer, J.A., Smith, G.J., Anderson, R.A., 2001. Evolution of *Macrocystis* spp. (Phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. *J. Phycol.* 37, 574-585.
- Craddock, C., 1982. Antarctica and Gondwanaland. In: Antarctic Geoscience, C. Craddock (Ed.). Univ. of Wisconsin Press, Madison Wisc. Pp 3-13.
- Crame, J.A., 1999. An evolutionary perspective on marine faunal connection between southernmost South America and Antarctica. *Sci. Mar.* 63, 1-14.
- Cunningham, S.A., Alderson, S.G., King, B.A., 2003. Transport and variability of the Antarctic Circumpolar Current in Drake Passage. *J. Geophys. Res.* 180, SOV11-1-SOV11-17.
- D'Anatro, A.D., Lessa, E.P., 2006. Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis*. *Mamm. Biol.* 71, 288-298.
- Davenport, J. 1988. Tenacity of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *J. Molluscan Stud.* 54, 355-356.
- Davenport, J., 1997. Comparisons of the biology of the intertidal subantarctic limpets *Nacella concinna* and *Kerguelenella lateralis*. *J. Moll. Stud.* 63, 39-48.
- Davenport, J., 2001. Meltwater effects on intertidal Antarctic limpets, *Nacella concinna*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 81, 643-649.
- David, B., Choné, T., Festeau, A., Mooi, R., de Ridder, C., 1999. Biodiversity of Antarctic echinoids: a comprehensive and interactive database. *Sci. Mar.* 39, 201-203.

- de Aranzamendi M.C., Sahade, R., Tatián M., Chiappero, B., 2008. Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Mar. Biol.* 154, 875-885
- de Aranzamendi, M.C., Gardenal, C., Martin, J.P., Bastidas, R., 2009. Limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) from the Southwestern Atlantic: species identification based on molecular data. *J. Molluscan. Stud.* 75, 241-251.
- DeVries, T.J., 2009. Cenozoic *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) from Peru and Chile: Filling in the gaps. *The Velliger.* 50, 274-291.
- Díaz, A.D., 2008. Origen y evolución de la fauna marina bentónica antártica: diversidad genética y divergencia molecular entre especies congénicas de Echinoidea de Antártica y Sudamérica. Tesis de Magíster. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 65 pp.
- Donald, K.M., Kennedy, M., Spencer, H.G., 2005 a. Cladogenesis as the result of long-distance rafting events in South Pacific topshells (Gastropoda, Trochidae). *Evolution.* 59, 1701-1711.
- Donald, K.M., Kennedy, M., Spencer, H.G., 2005 b. The phylogeny and taxonomy of austral monodontine topshells (Mollusca: Gastropoda: Trochidae), inferred from DNA sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 37, 474-483.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7, 214.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Rambaut, A., 2006. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. *PLoS Biol.* 4, e88.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11, 2571-2581.

- Durán, S., Pascual, M., Turon, X., 2004. Low levels of genetic variation in mtDNA sequences over the western Mediterranean and Atlantic range of the sponge *Crambe crambe* (Peocilosclerida). *Mar. Biol.* 144, 31-35.
- Eagles, G., Livermore, R.A., 2002. Opening history of Powell Basin, Antarctic Peninsula. *Mar. Geol.* 185, 195-205.
- Eastman, J.T., 2000. Antarctic notothenioid fishes as subjects for research in evolutionary biology. *Ant. Sci.* 12, 276-287.
- Eastman, J.T., McCune, A.R., 2000. Fishes on the Antarctic continental shelf: evolution of a marine species flock? *J. Fish Biol.* 57, 84-102.
- Edmands, S., 2001. Phylogeography of the intertidal copepod *Tigriopus californicus* reveals substantially reduced population differentiation at northern latitudes. *Mol. Ecol.* 10, 1743-1750.
- Espoz, C., Guzmán, G., Castilla, J.C., 1995. The lichen *Thelidium litorale* on shells of intertidal limpets: a case of lichen-mediated cryptic mimicry. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 119, 191-197.
- Espoz, C., Castilla, J.C., 2000. Escape response of four Chilean intertidal limpets to seastars. *Mar. Biol.* 137, 887-892.
- Espoz, C., 2002. Ecología y evolución de patelogastrópodos endémicos a la costa rocosa de Perú y Chile: distribución, abundancia y filogenia. Tesis doctoral, Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile. 252 pp.
- Espoz, C., Lindberg, D.R., Castilla, J.C., Simison, W.B., 2004. Los patelogastrópodos intermareales de Chile y Perú. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 77, 257-283.
- 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.

- Farris, J.S., Källersjö, M.K.A., Kluge, A.G., Bult, C., 1995. Constructing a significance test for incongruence. *Syst. Biol.* 44, 570-572.
- Felsenstein, J., 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*. 39, 783-791.
- Filatov, D.A., 2002. PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes*. 2, 621-624.
- Fitzgerald, P., 2002. Tectonics and landscape evolution of the Antarctic plate since the breakup of Gondwana, with emphasis on the West Antarctic Rift System and the Transantarctic mountains. *Royal Soc. New Zeal. Bull.* 35, 453-459.
- Flower, B.P., Kennett, J.P., 1994. The Middle Miocene Climatic Transition: East Antarctic ice sheet development, deep ocean circulation and global carbon cycling. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology*. 108, 537-555.
- Folmer, M., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294-299.
- Frakes, L.A., Kemp, E.M., 1972. Influence of continental positions on early tertiary climates. *Nature*. 240, 97-100.
- Fraser, K.P.P., Clarke, A., Peck, L.S., 2002 a. Low-temperature protein metabolism: seasonal changes in protein synthesis and RNA dynamics in the Antarctic limpet *Nacella concinna* Strebel, 1908. *J. Exp. Biol.* 205, 3077-3086.
- Fraser, K.P.P., Clarke, A., Peck, L.S., 2002 b. Feast and famine in Antarctica: seasonal physiology in the limpet *Nacella concinna*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 242, 169-177.
- Fraser, C.I., Nikula, R., Spencer, H., Waters, J.M., 2009. Kelp genes reveal effects of Subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 3249-3253.

- Fuchigami, T., Sasaki, T., 2005. The shell structure of the recent Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *Paleontological Res.* 9, 143-169.
- Gérard, K., Bierne, N., Borsa, P., Chenuil, A., Féral, J-P., 2008. Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus spp.* Mussels from northern and southern hemisphere and strong genetic differentiation among southern populations. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 84-91.
- Gersonde, R., Crosta, X., Abelman, 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. *Quat. Sci. Rev.* 24, 869–896.
- Gille, S.T., 2002. Warming of the Southern Ocean since the 1950s. *Science.* 295, 1275-1277.
- Goldstien, S.J., Gemmel, N.J., Schiel, D.R., 2006 a. Molecular phylogenetics and biogeography of the nacellid limpets of New Zealand (Mollusca: Patellogastropoda). *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 261-265.
- Goldstien, S.J., Schiel, D.R., Gemmel, N.J., 2006 b. Comparative phylogeography of coastal limpet across a marine disjunction in New Zealand. *Mol. Ecol.* 15, 3259-3268.
- Golikov, A.N., Starobogatov, Y.I., 1975. Systematics of prosobranch gastropods. *Malacologia.* 15, 185-232.
- González-Ferrán, O., 1987. Evolución geológica de las islas chilenas en el océano Pacífico. In: P. Arana (Ed.). *Investigaciones marinas en el Archipiélago de Juan Fernández.* Universidad Católica de Valparaíso, Valparaíso, pp. 81-91.
- González-Wevar C.A., Nakano, T., Cañete, J.I., Poulin, E., 2010. Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Mol. Phylogenet. Evol.* 56, 115-124.

- González-Wevar C.A., David, B., Poulin, E., in press b. Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. Deep Sea Res. II. doi: 10.1016/j.dsr2.2010.05.026.
- Gordillo, S., 1999. Holocene molluscan assemblages in the Magellan region. Sci. Mar. 63, 15-22.
- Gordillo, S., Coronato, A.M.J., Rabassa, J.O., 2005. Quaternary molluscan faunas from the island Tierra del Fuego after the Last Glacial Maximum. Sci. Mar. 69, 337-348.
- Gordillo, S., 2009. Quaternary marine mollusks in Tierra del Fuego: insights from integrated taphonomic and paleoecologic analysis of shell assemblages in raised deposits. Anales Instituto Patagonia. 2009, 5-16.
- Gray, J.S. (2001) Antarctic marine benthic biodiversity in a world-wide latitudinal context. Polar Biol. 24, 633-641.
- Griffiths, H.J., Barnes, D.K.A., Linse, K., 2009. Towards a generalizad biogeography of the Southern Ocean benthos. J Biogeogr. 36: 162-177.
- Gutt, J., 2001. On the direct impacto of ice on marine communities, a review. Pol. Biol. 24, 553-564.
- Gutt, J., Arntz, W.E., Balgueiras, E., Brandt, A., Gerdes, D., Gorny, M., Sirenko, B., 2003. Diverse approaches to questions of biodiversity: German contributions to studies of marine benthos around South America and Antarctica. Gayana. 67, 177-189.
- Gutt, J., Sirenko, B.I., Smirnov, I.S., Arntz, W.E., 2004. How many macrozoobenthic species might inhabit the Antarctic shelf? Ant. Sci. 16, 11-16.
- Guzman, L., 1978. Patrón de distribución espacial y densidad de *Nacella magellanica* (Gmelin, 1971) en el intermareal del sector oriental del Estrecho de Magallanes (Mollusca, Gastropoda). Anales Instituto de la Patagonia. 9, 205-219.

- Guzman, L., Ríos, C., 1986. Análisis de la estructura en comunidades intermareales del archipiélago del Cabo de Hornos: ambientes de bloques y cantos. *Estud. Oceanol.* 5, 67-105.
- Hammer Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleo. Electronica* 1, 1-9.
- Harasewych, M.G., McArthur, A.G., 2000. A molecular phylogeny of the Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *Mar. Biol.* 137, 183-194.
- Harley, C.D.G., Denny, M.W., Mach, K.J., Miller, L.P. 2009. Thermal stress and morphological adaptations in limpets. *Func. Ecol.* 23, 292-301.
- Haszprunar, G.H., 1988. On the origin and evolution of major gastropod groups, with special reference to the Streptoneura. *J. Moll. Stud.* 54, 367-441.
- Hassold, N.J.C., Rea, D.K., van der Pluijm, B.A., Parés, J.M., 2009. A physical record of the Antarctic Circumpolar Current: Late Miocene to recent slowing of abyssal circulation. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 275, 28-36.
- Hedgpeth, J.W., 1969. Distribution of selected groups of Marine Invertebrates in Waters South of 35°S Latitude. *Antarctic Map Folio Series – Folio 11.*
- Held, C., 2000. Phylogeny and biogeography of Serolid Isopods (Crustacea, Isopoda, Serolidae) and the use of ribosomal expansion segments in Molecular Systematics. *Mol. Phylogenet. Evol.* 15, 165-178.
- Hellberg, M.E., Vacquier, V.D., 1999. Rapid evolution of fertilization selectivity and lysin cDNA sequences in teguline gastropods. *Mol. Biol. Evol.* 16, 839-848.
- Helmuth, B., Veit, R.R., Holberton, R., 1994. Long-distance dispersal of a subantarctic brooding bivalve (*Gaimardia trapesina*) by kelp-rafting. *Mar. Biol.* 120, 421-426.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergent and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247-276.
- Hewitt, G.M., 2000. The genetic legacy of Quaternary ice ages. *Nature.* 405, 907-913.

- Hewitt, G.M., 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philos. Trans. R. Soc. London. B Biol. Sci.* 359, 183-195.
- Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J., 2005. Time dependency of molecular rate estimated and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol. Biol. Evol.* 22, 1561-1568.
- Ho, S.Y.W., Shapiro, B., Phillips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J., 2007. Evidence for time dependency of Molecular rate estimates. *Syst. Biol.* 56, 517-522.
- Hodgson, A.N., Ridgway, S., Branch, G.M., Hawkins, J., 1996. Spermatozoan morphology of 19 species of Prosobranch limpets (Patellogastropoda) with discussion of Patellid relationships. *Phil. Trans. R. Soc. London B. Biol. Sci.* 351, 339-347.
- Hoffman, J.I., Peck, L.S., Hillyard, G., Zieritz, A., Clark, M.S., in press. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. *Mar. Biol.* DOI 10.1007/s00227-009-1360-5.
- Hulton, N.R.J., Purves, R.S., McCulloch, R.D., Sugden, D.E., Bentley, M.J., 2002. The last glacial maximum and deglaciation in southern South America. *Quat. Sci. Rev.* 21, 233-241.
- Hunter, R.L., Halanych, K.M., 2008. Evaluating connectivity in the brooding brittle star *Astrofoma agassizzi* across the Drake Passage in the Southern Ocean. *J. Hered.* 99, 137-148.
- Huybrechts, P., 2002. Sea-level changes at the LGM from ice-dynamics reconstructions of the Greenland and Antarctic ice sheets during the last glacial cycles. *Quat. Sci. Rev.* 21, 203-231.
- Iwata, H., Ukai, Y., 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *J. Hered.* 93, 384-385.

- Jobb, G., 2008. TREEFINDER version of October 2008. 2008. Munich, Germany.
Distributed by the author at www.treefinder.de.
- Johnston, I.A., Clarke, A., 1990. Cold adaptation in marine organisms (and discussion).
Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 326, 655-667.
- Jokat, W., Bochel, T., König, M., Meyer, U., 2003. Timing and geometry of early
Gondwana breakup. *J. Geophys. Res.* 108, EPM4-1-EPM4-15.
- Jonkers, H.A., Kelley S.P., 1998. A reassessment of the age of Cockburn Island
Formation, northern Antarctic Peninsula and its palaeoclimatic implications. *J. Geol.
Soc. London.* 155, 737-740.
- Katsuno, S., Sasaki, T., 2008. Comparative histology of radula-supporting structure in
Gastropoda. *Malacologia.* 50: 13-56.
- Keeling, R.F., Stephens, B.B. 2001. Antarctic sea ice and the control of Pleistocene
climate instability. *Paleocenography.* 16, 121-131.
- Kennet, J.P., 1977. Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic
Ocean and their impact on global paleoceanography. *J. Geophys. Res.* 82, 3843-3860.
- Kennet, J.P., 1980. Paleoceanography and biogeographic evolution of the Southern
Ocean during the Cenozoic, and Cenozoic microfossil datums. *Palaeogeogr.
Palaeoclimatol. Palaeoecology* 31, 123-152.
- Kim, D., 2001. Seasonality of marine algae and grazers of an Antarctic rocky intertidal,
with emphasis on the role of the limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *Berichte zur
Polar un Meersforschung*, 397, 1-120.
- Kim, M.J., Yoon, H.J. Im, H.I., Jeong, H.U., Kim M.II., Kim, S.R., Kim, I., 2009
Mitochondrial DNA sequence variation of the bumblebee, *Bombus ardens*
(Hymenoptera: Apidae). *J. Asia Pacific Entomol.* 12, 133-139.

- Kirkendale L.A., Meyer, C., 2004. Phylogeography of the *Patelloida profunda* group (Gastropoda: Lottiidae): diversification in dispersal-driven marine system. *Mol. Ecol.* 13, 2749-2762.
- Kishino, H., Thorne, J.L., Bruno, W.J., 2001. Performance of a divergence time estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol. Biol. Evol.* 18, 352-361.
- Knox, G.A., 1980. Plate tectonics and the evolution of intertidal and shallow-water benthic biotic distribution patterns of the Southwest Pacific. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 31, 267-297.
- 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.
- Koufopanou, V., Reid, D., Ridgway, S.A., Thomas, R.H., 1999. A molecular phylogeny of the Patellid limpets (Gastropoda: Patellidae) and its implications for the origins of their antitropical distribution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11, 138-156.
- Kozak, K.H., Weisrock, D.W., Larson, A., 2006. Rapid lineage in a non-adaptive radiation: phylogenetic analysis of diversification rates in eastern North American woodland salamanders (Plethodontidae: *Plethodon*). *Proc. Royal Soc. Lond. B.* 3326, 1-8.
- Krabbe, K., Leese, F., Mayer, C., Tollrian, R, Held, C., 2009. Cryptic mitochondrial lineages in the widespread pycnogonid *Colossendeis megalonyx* Hoek, 1881 from Antarctic and Subantarctic waters. *Polar Biol.* Published online 14th august.
- Kuhl, F.P. Giardina, C.R., 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Comp. Graph. Image Process.* 18, 236-258.
- Kuhner, M.K., Yamato, J., Felsenstein, J., 1998. Maximum Likelihood estimation of population growth rates based on the Coalescent. *Genetics* 149, 429-434.

- Lancellotti D.A., Vasquez J.A., 2000. Zoogeografía de macroinvertebrados bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73, 99-129.
- Lawver, L.A., Gahagan, L.M., Coffin, M.F., 1992. The development of paleoseaways around Antarctica. *Antarct. Res. Book Ser.* 56, 7-30.
- Lawver, L.A., Gahagan, L.M., 2003. Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 198, 11-37.
- Lee, T-Y., Lawver, L.A., 1995. Cenozoic plate reconstruction of Southeast Asia. *Tectonophysics.* 251, 85-138.
- Lee, Y-H., Song, M., Lee, S., Leon, R., Godoy, S., Canete, I., 2004. Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the South American sea urchins. *Ant. Sci.* 16, 29-36.
- Lessios, H.A., Kessing, B.D., Robertson, D.R., 1998. Massive gene flow across the world's most potent marine biogeographic barrier. *Proc. R. Soc. Lond.* 265, 583-588.
- Lewis, A.R., Marchant, D.R., Ashworth, A.C., Hedena, L., Hemming, S., Johnson J.V., Leng, M-J., Machlus, M., Newton A.E., Raine, J.I., Willenbring, J.K., Williams, M., Wolfe, A.P., 2008. Mid-Miocene cooling and the extinction of tundra in continental Antarctica. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105: 10676-10680.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics.* 25, 1451-1452.
- Lindberg, D.R., Hickman, C.S., 1986. A new anomalous giant limpet from the Oregon Eocene (Mollusca: Patellidae). *J. Paleontol.* 60, 661-668.
- Lindberg, D.R., 1998. The Patellogastropoda. *Malacological Rev. Supp.* 4, 35-63.
- Lindberg, D.R., 2008. Patellogastropoda, Neritimorpha, and Cocculinoidea. In Ponder, W.F., Lindberg, D.R., (eds). *Phylogeny and Evolution of the Mollusca.* University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London. 271-296pp.

- Linse, K., 1999. Mollusca of the Magellan Region: A checklist of the species and their distributions. *Sci. Mar.* 63, 399-407.
- Linse, K., Griffiths, H.J., Barnes, D.K.A., Clarke, A. 2006. Biodiversity and biogeography of Antarctic and sub-Antarctic mollusca. *Deep-Sea Res. II.* 53, 985-1008.
- Littlewood, D.T.J., Curni-Galletti, M., Herniou, E.A., 2000. The interrelationships of Proseriata (Platyhelminthes: Seriata) tested with molecules and morphology. *Mol. Phylogenet. Evol.* 16, 449-466.
- Livermore, R., Nankivell, A., Eagles, G. Morris, P., 2005. Paleogene opening of Drake Passage. *Earth Planet. Sci. Lett.* 236, 459-470.
- Lodish, H., Berk, A., Zipurski, S.L., Matsudaira, P, Baltimore, D., Darnell, J., 2002. *Biología Celular y Molecular*, 4ta Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Marcelo T. de Alvear 2145, Buenos Aires, Argentina. Pp. 1084.
- López Correa, M., Taviani, M., 2006. Isotopic composition of the Antarctic and sub-Antarctic limpets, *Nacella concinna* (*Patinigera polaris*) from the Antarctic Peninsula and islands, and *Nacella magellanica* and *Nacella deaurata* from Patagonia and the Falklands.
- Losos, J.B., Creer, D.A., Glossip, D., Goellner, R., Hampton, A., Roberts, G., Haskell, N., Taylor, P., Ettling, J., 2000. Evolutionary implications of phenotypic plasticity in the hindlimb of the lizard *Anolis sagrei*. *Evolution.* 54, 301-305.
- Losos, J.B., Miles, D.B., 2002. Testing the hypothesis that a clade has adaptatively radiated: iguanid lizard clades as a case study. *Am. Nat.* 160, 147-157.
- Lowell, R.B., 1986. Crab predation on limpets: predator behavior and defense features of the shell morphology of the prey. *Biol. Bull.* 171, 577-596.
- Luikart, G., England, P.R., Tallmon, D., Jordan, S., Taberlet, P., 2003. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. *Nature Rev. Genet.* 4, 981-994.

- Lyle, M., Gibbs, S., Moore, T.C., Rea, D.K. 2007. Late Oligocene initiation of the Antarctic Circumpolar Current: Evidence from the South Pacific. *Geology*.
- Mackensen, A., 2004. Changing Southern Ocean palaeocirculation and effect on global climate. *Antarct. Sci.* 16: 369-384.
- Mahon, A.R., Amsler, C.D., McClintock, J.B., Baker, B.J., 2002. Chemo-tactile predator avoidance responses of the common Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Polar Biol.* 25, 469-473.
- Mahon, A.R., Arango, C.P., Halanych, K.M., 2008. Genetic diversity of *Nymphon* (Arthropoda: Pignogonida: Nymphonidae) along the Antarctic Peninsula with focus on *Nymphon australe* Hodgson 1902. *Mar. Biol.* 155, 315-323.
- Marko, P.B. 2004. 'What's larvae got to do with it?' Disparate patterns of post-glacial population structure in two benthic marine gastropods with identical dispersal potential. *Mol. Ecol.* 13, 597-611.
- Markowska, M., Kidawa, A., 2007. Encounters between Antarctic limpets, *Nacella concinna*, and predatory sea stars, *Lysasterias sp.*, in laboratory and field experiments. *Polar Biol.* 151, 1959-1966.
- McArthur, A.G., Harasewych, M.G., 2003. Molecular systematics of the major lineages of the Gastropoda. Pp. 140-160. In: Lydeard, C. and D. R. Lindberg (eds.) *Molecular Systematics and Phylogeography of Mollusks*. Smithsonian Books, Washington. 312 pp.
- McCulloch, R.D., Bentley, M.J., Purves, R.S., Hulton, N.R.J., Sugden, D.E. Clapperton, C.M., 2000. Climatic inferences from glacial and palaeocological evidence at the last glacial termination, southern South America. *J. Quat. Sci.* 15, 409-417.
- Meredith, M.P., Woodworth, P.L., Hughes, C.W., Stepanov, V., 2004. Changes in the ocean transport through Drake Passage during the 1980s and 1990s, forced by changes in the Southern Annular Mode. *Geophys. Res. Lett.* 31, L21305.

- Merritt, T.J.S., Shi, L., Chase, M.C., Rex, M.A., Etter, R.J., 1998. Universal Cytochrome b primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 7, 7-11.
- Meyer, C.P., Geller, J.B., Paulayi, G., 2005. Fine scale endemism on coral reefs: archipelagic differentiation in turbinid gastropods. *Evolution.* 59, 113-125.
- Misuzu, A., Imai H., Naruse T., Ikeda Y., 2005. Low genetic diversity of oval squid, *Sepioteuthis cf. lessoniana* (Cephalopoda: Loliginidae), in Japanese Waters inferred from mitochondrial DNA non-coding region. *Pacific Sci.* 62, 403-411
- Morriconi, E., Calvo, J., 1993. Influencia ambiental sobre el crecimiento alométrico de la valva en *Nacella (Patinigera) deaurata* (Gmelin, 1791) del Canal Beagle, Argentina. *Malacología.* 35, 135-140.
- Morriconi, E., 1999. Reproductive biology of the limpet *Nacella (P.) deaurata* (Gmelin, 1791) in Bahía Lapataia (Beagle Channel). *Sci. Mar.* 63, 417-426.
- Muñoz, M., Santelices, B., 1989. Determination of the distribution and abundance of the limpet *Scurria scurra* on the stipes of the kelp *Lessonia nigrescens* in Central Chile. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 54, 277-285.
- Nakano, T., Ozawa, T., 2004. Phylogeny and historical biogeography of limpets of the order Patellogastropoda based on mitochondrial DNA sequences. *J. Mollusc. Stud.* 70, 31-41.
- Nakano, T., Ozawa, T., 2005. Systematic revision of *Patelloida pygmaea* (Dunker, 1860) (Gastropoda: Lottiidae), with a description of a new species. *J. Molluscan Stud.* 71, 357-370.
- Nakano, T., Ozawa, T., 2007. Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: Molecular, morphological and palaeontological evidence. *J. Molluscan Stud.* 73, 79-99.

- Nakano, T., Spencer, H.G., 2007. Simultaneous polyphenism and cryptic species in an intertidal limpet from New Zealand. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 470-479.
- Nakano, T., Marshall, B., Kennedy, M., Spencer, H., 2009. The phylogeny and taxonomy of New Zealand *Notoacmea* and *Patelloida* species (Mollusca: Patellogastropoda: Lottiidae) inferred from DNA sequences. *Mollus. Res.* 29, 1-27.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nolan, C.P. 1991. Size, shape and shell morphology in the Antarctic limpet *Nacella concinna* at Signy Island, South Orkney Islands. *J. Moll. Stud.* 57, 225-238.
- Nylander, J., 2004. MrModeltest v. 2.2b. Department of Systematic Zoology. Uppsala University, Sweden.
- Ó Foighil, D., Marshall, B.A., Hilbish, T.J., Pino, M.A., 1999. Trans-Pacific range extension by rafting inferred for the flat oyster *Ostrea chilensis*. *Biol. Bull.* 196, 122-126.
- Olson, P.D., Cribb, T.H., Tkach, V.V., Bray, R.A., Littlewood, D.T.J., 2003. Phylogeny and classification of the Digenea (Platyhelminthes: Trematoda). *Int. J. Parasitol.* 33, 733-755.
- Orsi, A.H., Whitworth III T., Nowlin Jr., W.D., 1995. On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Res. I.* 42, 641-673.
- Page, T.J., Linse, K., 2002. More evidence of speciation and dispersal across the Antarctic Polar Front through molecular systematics of Southern Ocean *Limatula* (Bivalvia: Limidae). *Polar Biol.* 25, 818-826.
- Patarnello, T., Bargelloni, L., Varotto, V., Battaglia, B., 1996. Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Mar. Biol.* 126, 603-608.
- Pearse, S.E., McClintock, J.B., Bosch, I., 1991. Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempo, modes, and timing. *Am. Zool.* 31, 65-80.

- Peck, L.S., 1989. Temperature and basal metabolism in two Antarctic marine herbivores. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 127, 1-12.
- Peck, L.S., Prothero-Thomas, E., Hough, N. 1993. Pedal mucus production by the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 174, 177-192.
- Peck, L., Veal, R., 2001. Feeding, metabolism and growth in the Antarctic limpet, *Nacella concinna* (Strebel 1908). *Mar. Biol.* 138, 553-560.
- Peck, L.S., Clarke, A., Chapman, A.L., 2006. Metabolism and development of pelagic larvae of Antarctic gastropods with mixed reproductive strategies. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 318, 213-220.
- Pfühl, H.A., McCave, N.I., 2005. Evidence for late Oligocene establishment of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth and Planetary Sci. Lett.* 235, 715-728.
- Pickard, G.L., Emery, W.J., 1995. *Descriptive physical Oceanography, An Introduction.* Pergamon Press, 5th Edition. 320pp.
- Picken, G.B., 1980. The distribution, growth, and reproduction of the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 42, 71-85.
- Picken, G.B., Allan, D., 1983. Unique spawning behaviour by the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). *J. Exper. Mar. Biol. Ecol.* 71, 283-287.
- Ponder, W.F., Lindberg, D.R., 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an analysis using morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* 119, 83-265.
- Posada, D., Crandall, K.A., 1998. Modeltest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics.* 14, 817-818.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific phylogenetics: trees grafting into networks. *Trends Ecol. Evol.* 16, 37-45.
- Poulin, E., Palma, A., Féral, J-P., 2002. Evolutionary versus ecological success in Antarctic benthic invertebrates. *Trends Ecol. Evol.* 17, 218-222

- Powell, A.W.R., 1973. The Patellid limpets of the World (Patellidae), in: Abbot R.T (Ed.), Indo-Pacific-Mollusca. Vol. 3. The Department of Mollusks, Greenville, pp. 75-206.
- Powell, D.K., Tyler, P.A., Peck, L.S., 2001. Effect of sperm concentration and sperm ageing on fertilization success in the Antarctic soft-shelled clam *Laternula elliptica* and the Antarctic limpet *Nacella concinna*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 215, 191-200.
- Rambaut, A., Drummond, A.J., 2003. Tracer version 1.4.1 [computer program]. Available from: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>.
- Rambaut, A. Drummond, A.J., 2006. LogCombiner v1.4.1 [computer program]. Available from: <<http://beast.bio.ed.ac.uk/LogCombiner/>>.
- Reid, D.G., Rumbak, E., Thomas, R.H., 1996. DNA, morphology and fossils: phylogeny and evolutionary rates of the gastropod genus *Littorina*. Phil. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 351, 877-895.
- Renaud, S. and Michaux J.R., 2003. Adaptative latitudinal trends in the mandible shape of *Apodemus* wood mice. J. Biogeogr. 30, 1617-1628.
- Renaud, S. and Michaux, J.R., 2007. Mandibles and molars of the wood mouse *Apodemus sylvaticus* (L): integrated latitudinal pattern and mosaic insular evolution. J. Biogeogr. 34, 339-355.
- Ridgway, S.A., Reid, D.G., Taylor, J.D., Branch, G.M., Hodgson, A.N., 1998. A cladistic phylogeny of the family Patellidae (Mollusca: Gastropoda). Philos. Trans. R. Soc. Lond., B. 353, 1645-1671.
- Rintoul, S.R., Hughes, C., Olbers, D., 2001 The Antarctic Circumpolar Current System. In: Siedler, G., Church, J., Gould, J (Eds.), Ocean Circulation and climate. New York Academic Press. Pp 271-302.
- Ríos, C., Gerdes, D., 1997. Ensemble bentónico epifaunístico de un campo intermareal de bloques y cantos en Bahía Laredo, Estrecho de Magallanes. Anst. Inst. Pat., Ser. Cienc. Nat. 25, 47-55.

- Ríos, C., Mutschke, E. 1999. Community structure of intertidal boulder-cobble fields in the Straits of Magellan, Chile. *Sci Mar.* 63, 193-201.
- Ríos, C., Mutschke, E., Morrison, E., 2003. Biodiversidad bentónica sublitoral en el estrecho de Magallanes, Chile. *Rev. Biol. Mar. Oceanogr.* 38, 1-12.
- Rodríguez, E., López-González, P.J., Gili, J.M., 2007. Biogeography of Antarctic sea anemones (Anthozoa, Actiniaria): What do they tell us about the origin of Antarctic benthic fauna. *Deep-Sea Res. II.* 54, 1876-1904.
- Rogers, A.R., Harpending, H.C., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9, 552-569.
- Röhl, A., 2002. NETWORK, netw3111.exe downloaded from the web site: www.fluxus-engineering.com.
- Rohlf, F.J. and Archie, J.W., 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (*Ritiera culicidae*). *Syst. Zool.* 33, 302-317.
- Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572-1574.
- Sá-Pinto, A., Branco, M., Harris, D.J., Alexandrinho, P., 2005. Phylogeny and phylogeography of the genus *Patella*, based on mitochondrial DNA sequence data. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 325, 95-110.
- Sá-Pinto, A., Alexandrinho, P., Branco, M., 2007. High genetic differentiation with no evidence of hybridization between four limpets species (*Patella* spp.) revealed by allozyme loci. *Sci. Mar.* 71; 801-810.
- Sá-Pinto, A., Branco, M., Sayanda, D., Alexandrinho, P., 2008. Patterns of colonization, evolution and gene flow in species of the genus *Patella* in the Macaronesian Islands. *Mol. Ecol.* 17, 519-532.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. Cold Spring Harbor Press, New York.

- Sanmartín I., Ronquist, F., 2004. Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Syst. Biol.* 53, 216-243.
- Sasaki, T., 1998. Comparative anatomy and phylogeny of the recent Archaeogastropoda (Mollusca: Gastropoda). University Museum, University of Tokyo, Bulletin, 38, 1-223.
- Scher, H.D., Martin, E.E., 2006. Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science*. 312, 428-430.
- Schluter, D., 1993. Adaptive radiation in sticklebacks: size, shape and habitat use efficiency. *Ecology*. 74, 699-709.
- Schluter, D., 2000 a. The ecology of adaptive radiation. Oxford University Press, Oxford. 285pp.
- Schluter, D., 2000 b. Ecological character displacement in Adaptive Radiation. *Am. Nat.* 156, S04-S16.
- 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.
- Shaw, P.W., Arkhipkin, A.I., Al-Khairulla, H., 2004. Genetic structuring of Patagonia toothfish populations in the Southwest Atlantic Ocean: the effect on the Antarctic Polar Front and deep-water troughs as barriers to genetic distance. *Mol. Ecol.* 13, 3293-3303.
- Shevenell, A.E., Kennett, J.P., Lea, D.W., 2004. Middle Miocene Southern Ocean cooling and Antarctic cryosphere expansion. *Science* 305, 1766-1770.
- Silva, M.P., Favero, M., Martínez, M.M., 1999. Prey size selectivity by kelp gulls on Antarctic limpets at King George Island, Antarctica. *Polar Biol.* 21, 397-400.
- Slatkin, M. and Hudson, R.R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*. 129, 555-562.

- Smith, R., Desflots, M., White, S., Mariano, A.J., Ryan, E.W., 2008. The Antarctic CP Current. Ocean Surface Currents.
<http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/southern/antarctic-cp.html>.
- Spinks, P.Q., Shaffer, H.B., 2009. Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct *Emys* (Testudines: Emydidae) species complex, and what they tell us about biogeography and hybridization. *Syst. Biol.* 58, 1-20.
- Stankovic, A., Spalik, K., Kamler, E., Borsuk, P., Weglenski, P., 2002. Recent origin of sub-Antarctic notothenoids. *Pol. Biol.* 25, 203-205.
- Stanwell-Smith, D., Clarke A., 1998. The timing of reproduction in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908) (Patellidae) at Signy Island, in relation to environmental variables. *J. Molluscan Stud.* 64, 123-127.
- Stickley, C.E., Brinkhuis, H., Schellenberg, S.A., Sluijs, A., Röhl, U., Fuller, M., Grauert, M., Huber, M., Warnaar, J., Williams, G.L., 2004. Timing and nature of the deepening of the Tasmanian Gateway. *Paleoceanography.* 19, 1-18.
- Stuessy, T.F., Foland, K.A., Sutter, J.F., Sanders, R.W., Oliva, M.O., 1984. Botanical and geological significance of potassium-argon dates from the Juan Fernández Islands. *Science.* 225, 49-51.
- Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and other methods), version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S., 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24, 1596-1599.
- Thatje, W.E., Thatje, S., Gerder, D., Gili, J-M., Gutt, J., Jacob, U., Montiel, A., Orejas, C., Teixidó, N., 2005 a. The Antarctic-Magellan connection: macrobenthos ecology on the shelf and upper slope, a progress report. *Sci. Mar.* 69, 237-269.
- Thatje, S., Hillenbrand, C-D., Larter, R., 2005 b. On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends Ecol. Evol.* 20, 534-540.

- Thatje, S., Hillenbrand, C-D., Mackensen, A., Larter, R., 2007. Life hung by a thread: endurance of Antarctic fauna in glacial periods. *Ecology*. 89, 682-692.
- Thiele, J., 1929. *Handbuch der systematischen Weichtierkunde*. Vol 1. Gustav Fischer, Jena.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1992. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nuc. Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Thorne, J.L., Kishino, H., Painter, I.S., 1998. Estimating the rate of evolution of the rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1647-1657.
- Thorne, J.L., Kishino, H., 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation with multilocus data. *Syst. Biol.* 51, 689-702.
- Thornhill, D.J., Mahon, A.R., Norenburg, J.L., Halanych, K.M., 2008. Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parbolasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Mol. Ecol.* 17, 5104-5117.
- Thorpe, S.A., Heywood, K., Stevens, D., Brandon, M.A., 2004. Tracking passive drifters in a high resolution ocean model: implications for interannual variability of larval krill transport to South Georgia. *Deep Sea Res. I.* 51, 909-920.
- Torsvik, T.H., Gaina, C., Redfield, T.F., 2008. Antarctica and global paleogeography: From Rodinia, through Gondwanaland and Pangea, to the birth of the Southern Ocean and the opening of Gateways. In: Cooper A.K.P., Barret, J., Storey, H., Stump, E., Wise, W. (Eds.), *Antarctica: A keystone in a changing world*. Proceedings of the the 10th International Symposium on Antarctic Earth Science. The National Academic Press, Washington, DC.
- Valdovinos, C., Navarrete, S., Marquet, P.A., 2003. Mollusks species diversity in the Southeastern Pacific: why are there more species towards the pole? *Ecography*. 29, 139-144.

- Valdovinos, C., R uth, M., 2005. Nacellidae limpets of the southern end of South America: taxonomy and distribution. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 78, 497-517.
- Verducci, M., Foresti, L.M., Scott, G.H., Sprovieri, M., Lirer, F., Pelosi, N., 2009. The Middle Miocene climatic transition in the Southern Ocean: Evidence of paleoclimatic and hydrographic changes at Kerguelen plateau from planktonic foraminifers and stable isotopes. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology.* 280, 371-396.
- Wade, C.M., Mordan, P.B., 2000. Evolution within the gastropods groups; using the ribosomal gene-cluster as an indicator of relationships. *J. Mollus. Stud.* 66, 565-570.
- Walker, A.J.M., 1972. Introduction to the ecology of the Antarctic limpet *Patinigera polaris* (Hombron and Jaquinot) at Signy island, South Orkney island. *Brit. Antarct. Surv. B.* 28, 49-69.
- Waters, J.M., 2007. Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern temperate marine biogeography, with new directions for dispersalism. *J. Biogeogr.* 35, 1-11.
- Waters, J.M., McCulloch, G.A., Eason, J.A., 2007. Marine biogeographical structure in two highly dispersive gastropods: implications for trans-Tasman dispersal. *J. Biogeogr.* 34, 678-687.
- Watters, W.A., Flemming, C.A., 1972. Contributions to the Geology and Paleontology of Chiloe Island, Southern Chile. Parts I and II. *Phil Trans. R. Soc. Lond.* 263, 369-408.
- Whalan, S., Nys, R. de., Smith-Keune, C., Evans, B.S., Battershill, C., Jerry, D.R., 2008. Low genetic variability within and among populations of the brooding sponge *Rhopaloides odorabile* on the Central Great Barrier Reef. *Aquat. Biol.* 3, 111-119.
- Whittaker, J.M., M ller, R. D., Leitchenkov, G., Stagg, H., Sdrolias, M., Gaina, C., Goncharov, A., 2007. Major Australian-Antarctic Plate Reorganization at Hawaiian-Emperor Bend Time. *Science.* 318, 83-86.
- Wiegmann, B. M., D. K. Yeates, J. L. Thorne, and H. Kishino. 2003. Time flies: A new molecular time-scale for fly evolution without a clock. *Syst. Biol.* 52, 745-756.

- Williams, S.T., Reid, D.G., Littlewood, D.J.T., 2003. A molecular phylogeny of the Littorininae (Gastropoda: Littorinidae): unequal evolutionary rates, morphological parallelism, and biogeography of the Southern Ocean. *Mol. Phylogenet. Evol.* 28, 60-86.
- Williams, S.T., Reid, D.G., 2004. Speciation and diversity on tropical rocky shores: a global phylogeny of snails of the genus *Echinolittorina*. *Evolution* 58, 2227-2251.
- Wilson, N.G., Hunter, R.L., Lockhart, S.J., Halanych, K.M., 2007. Multiple lineages and absence of panmixia in the "circumpolar" crinoid *Promachocrinus kerguelenensis* from the Atlantic sector of Antarctica. *Mar. Biol.* 152, 895-904.
- Wilson, N.G., Schrödl, M., Halanych, K.M., 2009. Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelenensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Mol. Ecol.* 18, 965-984.
- Woodruff, F. Savin S.M., 1989. Miocene deepwater oceanography. *Palaeoceanography*. 4: 87-140.
- Wörheide, G., 2006. Low variation in partial cytochrome oxidase subunit I (COI) mitochondrial sequences in the coralline demosponge *Astrosclera willeyana* across the Indo-Pacific. *Mar. Biol.* 148, 907-912.
- Xia, X., Xie, Z., 2001. *DAMBE: Data análisis in molecular biology and evolution*. *J. Hered.*, 92, 371-373.
- Yang, Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences with variable rates over sites: approximate methods. *J. Mol. Evol.* 39, 306-314.
- Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *CABIOS*, 13:555-556.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations on global climate 65 Ma to present. *Science*. 292, 686-693.

Zelaya, D.G., 2005. The bivalves from the Scotia Arc islands: species richness and faunistic affinities. *Sci. Mar.* 69, 113-122.

Zwally, H.J., Comiso, J.C., Parkinson, C.L., Gloersen, P., 2002. Variability of Antarctic sea ice 1979-1998. *J. Geophysic. Res.* 107, 3041-3059.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Molecular Phylogenetics and Evolution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ympev



Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean

Claudio A. González-Wevar^a, Tomoyuki Nakano^b, Juan I. Cañete^c, Elie Poulin^{a,*}

^aInstituto de Ecología y Biodiversidad, Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Las Palmeras # 3425, Ñuñoa, Santiago, Chile

^bDepartment of Geology and Paleontology, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan

^cDepartamento de Recursos Naturales, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 September 2009

Revised 29 January 2010

Accepted 1 February 2010

Available online xxx

Keywords:

Antarctic Circumpolar Current

Cellana

Middle-Miocene climatic transition

Vicariance

Long-distance dispersal

Trans-oceanic discontinuities

True limpets

Cytochrome oxidase subunit I

Cytochrome *b*

ABSTRACT

The evolution and the historical biogeography of the Southern Ocean marine benthic fauna are closely related to major tectonic and climatic changes that occurred in this region during the last 55 million years (Ma). Several families, genera and even species of marine organisms are shared between distant biogeographic provinces in this region. This pattern of distribution in marine benthic invertebrates has been commonly explained by vicariant speciation due to plate tectonics. However, recent molecular studies have provided new evidence for long-distance dispersion as a plausible explanation of biogeographical patterns in the Southern Ocean. True limpets of the genus *Nacella* are currently distributed in different biogeographic regions of the Southern Ocean such as Antarctica, Kerguelen Province, southern New Zealand Antipodean Province, North-Central Chile and South American Magellanic Province. Here, we present phylogenetic reconstructions using two mitochondrial DNA markers (Cytochrome Oxidase I and Cytochrome *b*) to look into the relationships among *Nacella* species and to determine the origin and diversification of the genus. Phylogenies were reconstructed using two methods, Maximum Parsimony and Bayesian Inference, while divergence time among *Nacella* species was estimated following a relaxed Bayesian approach. For this purpose, we collected inter- and subtidal species belonging to four biogeographic regions in the Southern Ocean: Antarctica, Kerguelen Province, Central Chile, and Magellanic Province.

Our molecular results agree with previous morphological and molecular studies supporting the monophyly of *Nacella* and its sister relationship with *Cellana*. Two rounds of diversification are recognized in the evolution of *Nacella*. The first one occurred at the end of the Miocene and gave rise to the main lineages, currently distributed in Antarctica, South America or Kerguelen Province. Large genetic divergence was detected among *Nacella* species from these distant biogeographic provinces emphasizing the significance of trans-oceanic discontinuities and suggesting long-distance dispersal was relatively unimportant. The second diversification round consisted of a more recent Pleistocene radiation in the Magellanic region. In this province, different morphological species of *Nacella* exhibit extreme low levels of genetic divergence with absence of reciprocal monophyly among them.

According to our time estimation, the origin and diversification of *Nacella* in the Southern Ocean is more recent (<15 MY) than the expected under the hypothesis of vicariant speciation due to plate tectonics. The evolution of this genus seems to be closely related to drastic climatic and oceanographic changes in the Southern Ocean during the middle-Miocene climatic transition. In spite of the high number of species described for the Magellanic Province, molecular results indicate that these species are the most derived ones in the evolution of the genus and therefore that the Magellanic region does not need to correspond to the origin center of *Nacella*. The absence of genetic divergence among these species supports a very recent radiation process accompanied by rapid morphological and ecological diversification.

© 2010 Published by Elsevier Inc.

1. Introduction

The biogeography of the Southern Ocean is the result of major tectonic and extreme climatic changes since the Mesozoic (Lawver et al., 1992; Crame, 1999; Zachos et al., 2001; Clarke et al., 2004a). Reconstructions of paleocurrents of the past 55 Ma have shown that the opening of the Tasmanian gateway and the Drake Passage shaped the present oceanographic circulation in the Southern

* Corresponding author. Address: Instituto de Ecología y Biodiversidad, Departamento de Ciencias Ecológicas, Laboratorio de Ecología Molecular, Universidad de Chile, Santiago, Chile.

E-mail address: epoulin@uchile.cl (E. Poulin).

Ocean (Thomson, 2004; Clarke et al., 2005; Torsvik et al., 2008). With the opening of such gateways, the main current started to flow west-east around Antarctica, causing the thermal isolation of this continent, which experienced around 34 Ma a major continental glaciation associated with sea-ice formation (Kennet, 1977; Lawver and Gahagan, 2003; Mackensen, 2004). Mackensen (2004) recognized three periods in which the most dramatic changes occurred in the Southern Ocean: (1) the Eocene/Oligocene boundary ~34 Ma, when the Antarctic Circumpolar Current (ACC) significantly modified global oceanic circulation for the first time; (2) the Middle Miocene ~14 Ma, when the reformation of an East Antarctic ice sheet influenced mode and level of Antarctic bottom-water formation, generating the intensification of the ACC; (3) the late Pleistocene, characterized by alternation between glacial and interglacial periods that affected seasonality and intensity of sea-ice formation.

In spite of this oceanographic history which must have hindered contact between shallow benthic marine faunas of the southern continents, genera and even species are currently shared among them, especially among Antarctica and southern South America (Clarke et al., 2004a; Thatje et al., 2005; Zelaya, 2005). This Antarctic-Magellan connection is thought to represent the last contact between Antarctica and southern South America during the Oligocene (Brandt et al., 1999; Arntz, 2005), after which the Antarctic fauna adapted to colder conditions and evolved endemic evolutionary lineages (Clarke and Johnston, 1996, 2003; Barnes and Conlan, 2007). Several marine groups, such as *Euphausia* (Patarnello et al., 1996), *Afrolittorina* and *Austrolittorina* (Williams et al., 2003; Waters et al., 2007), show important levels of genetic differences between Southern Ocean provinces supporting the vicariant speciation hypothesis. However, recent molecular studies in other groups indicate more recent divergence time estimations than expected based on timing of the relevant continental drift events and therefore provide new evidence for long-distance dispersal underlying diversification events (Ó Foighil et al., 1999; Donald et al., 2005; Burridge et al., 2006; Waters, 2007). In this regard, several studies in Subantarctic marine groups like *Mytilus*, *Macrocystis* and *Durvillaea*, have shown a clear connection between the Magellanic biota and the Subantarctic islands of the Kerguelen Province (Coyer et al., 2001; Gérard et al., 2008; Fraser et al., 2009). These studies support the idea that the biogeography in several Southern Ocean marine groups, especially those with high dispersive capacity is influenced by recent events of long-distance dispersion mediated by the West Wind Drift and the ACC (Waters, 2007).

The true limpets belonging to the Order Patellogastropoda are common inhabitants of rocky shores from the tropics to the polar regions (Powell, 1973; Branch, 1985a,b; Ponder and Lindberg, 1997). They differ from other gastropods in fundamental features like shell geometry and microstructure, radular form, gill morphology, and other anatomical characters (Ridgway et al., 1998; Ponder and Lindberg, 2008). The systematics of the group has been relatively neglected and most of the works have concentrated on the description and discrimination of the species. Historically, Patellogastropods have been classified based on the external form of the shell, but in many species this is highly variable, leading to taxonomic confusion (Ridgway et al., 1998). Recent molecular studies recognized at least seven families (Lottiidae, Acmaeidae, Pectinodontidae, Patellidae, Lepetidae, Eoacmaeidae, and Nacellidae) in the order (Nakano and Ozawa, 2007).

The origin and diversification of Nacellidae are not well resolved but the monophyly and the sister relationship of the group members, *Nacella* and *Cellana*, are well supported by morphological and molecular data (Powell, 1973; Lindberg, 1988; Koufanopou et al., 1999; Nakano and Ozawa, 2007). High southern latitude *Nacella* is currently limited to Antarctic and Subantarctic waters, while *Cellana* is distributed around Australia, New Zealand, Japan,

Hawaii, and the Juan Fernández Islands. *Nacella* is currently composed of only 15 nominal species, while *Cellana* includes more than 50 (Powell, 1973). The members of Nacellidae are common inhabitants of the intertidal and subtidal rocky shores, where they graze on algae, diatoms and bacterial films (Picken, 1980; Valdovinos and Rüth, 2005). Nacellidae species, especially *Cellana*, are characterized by free spawning of gametes, followed by a non-feeding trochophore stage of 1–2 days, and a lecithotrophic period of 7–11 days (Bird et al., 2007). This short period of larval dispersion, together with the homing behavior of adults, suggest low levels of continental interchange and high endemism for the family (Branch, 1985a). For example, *Cellana* larvae belonging to species from New Zealand and Hawaii spend around 3–11 and 4 days in the water column before settlement, respectively (Goldstien et al., 2006; Bird et al., 2007). No direct information exists about larval life spans of *Nacella* species, but on the one hand, because of its sister relationships with *Cellana*, members of the genus may present a comparable short larval duration. On the other hand, based on *Nacella*'s current distribution, time to settlement could be significantly longer as described for other Antarctic and Subantarctic marine invertebrates (Pearse et al., 1991; Bowden, 2005; Peck et al., 2006). Along these lines, Picken (1980), studied the larval development of *N. concinna* under controlled laboratory conditions (0 °C), and concluded that this species achieved settlement in one month.

Morphological taxonomy divides *Nacella* into two subgenera – *Nacella* (*Nacella*) with *mytilina* and *kerquelenensis* as only representatives, while *Nacella* (*Patinigera*) includes the other 13 species (Powell, 1973; Valdovinos and Rüth, 2005). The subgenus *Nacella* Schumacher 1817 and *Patinigera* Dall 1905 were defined on the base of type species *Patella mytilina* Helbling 1779 and *P. magellanica* Gmelin 1791, respectively. Main differences between subgenus consist in apex position, thickness and interior coloration of the shell (Powell, 1973). Based on the current distributions of the species, *Nacella* can also be divided into five biogeographical groups from Antarctica, Central Chile, the Magellanic Province, the Kerguelen Province, and the Antipodean Province (Hedgpeth, 1969; Powell, 1973; Valdovinos and Rüth, 2005). *N. concinna* is distributed along the Antarctic Peninsula, the Scotia Arc, including several Subantarctic islands like South Orkney and South Georgia (Picken, 1980; Beaumont and Wei, 1993; Clarke et al., 2004b). Four species have been described in the Subantarctic islands of the Kerguelen Province: *N. delesserti* for Marion Island, South Africa; *N. kerquelenensis*; and *N. edgari* from Kerguelen and Heard islands; and *N. macquariensis* for Heard and Macquarie Islands. *Nacella terroris* is distributed exclusively in the Subantarctic Campbell Island in the Antipodean Province from southern New Zealand, where it coexists with *Cellana strigilis strigilis* (Powell, 1973). *Nacella clypeater* is distributed along the Central Chilean coast, from Puerto Montt to southern Peru (Alamo and Valdivieso, 1997; Lancellotti and Vasquez, 2000). Finally, at least eight nominal species have been described for the Magellanic Province. According to the recent revision of Nacellidae from southern South America (Valdovinos and Rüth, 2005), the species *N. magellanica*, *N. deaurata* and *N. delicatissima* are distributed from Chiloé Island through Cape Horn, Falkland Island, and Southern Patagonia. Other species have a narrower distribution, like *N. venosa* from Chiloé through Cape Horn, and *N. chiloensis* from the Chiloé Island (Valdovinos and Rüth, 2005). The species *N. flammea* and *N. fuegiensis* are distributed from Aysén (45°32' LS; 72°04' LW) to the Magellan Strait. Finally, *N. mytilina* exhibits the widest distribution including the Magellan Strait, Cape Horn, southern Patagonia, Falkland Island, and Kerguelen Island (Powell, 1973). As mentioned above, systematics of *Nacella* has been based on shell morphology and is still unclear, especially for the Magellanic Province species. For example, Powell (1973) considered *N. venosa* and *N. chiloensis* as subspecies of *N. magellanica*, and *N. delicatissima* as an ecotype of

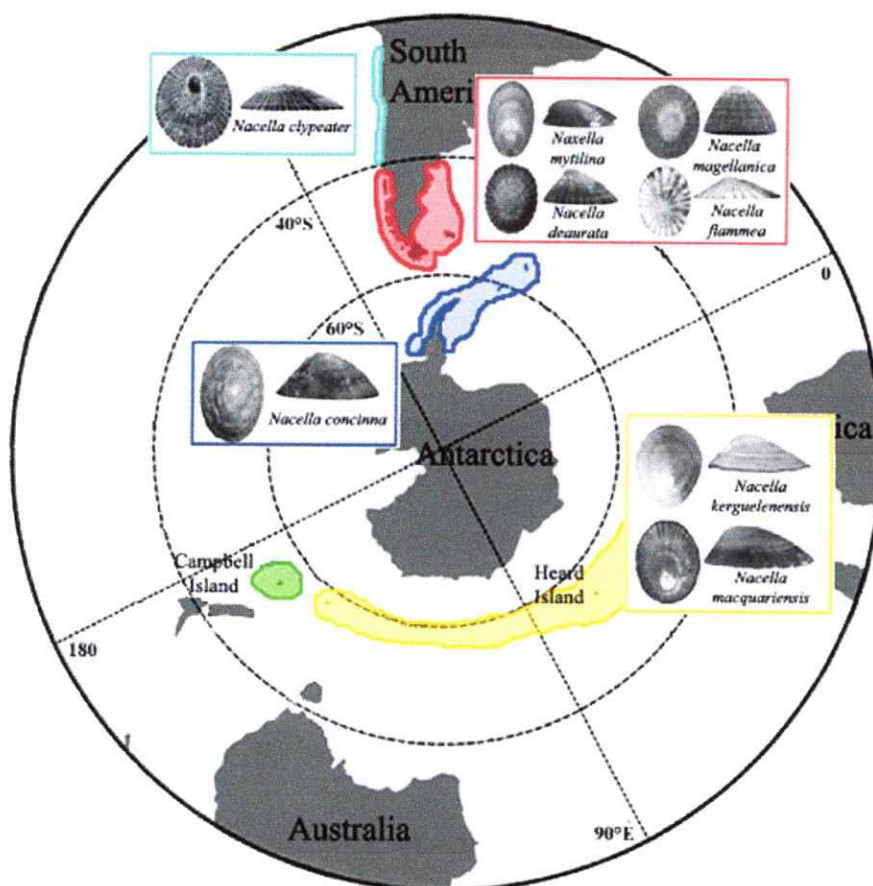


Fig. 2. *Nacella*'s groups distribution in different biogeographical regions along the Southern Temperate and Antarctic Regions (taken from Hedgpeth, 1969). Lateral and dorsal photographs correspond to the analyzed species in this study. Colors: Blue = Antarctica; Red = Magellanic Province; Yellow = Kerguelen Province; Green = Antipodean Province southern New Zealand; Light blue = Central Chile. (For interpretation of color mentioned in this figure the reader is referred to the web version of the article.)

246 For phylogenetic purposes we analyzed two mitochondrial
247 markers: Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) and Cytochrome *b*
248 (Cytb). COI sequences of *Cellana* and Patellidae species were ob-
249 tained from previous studies (Nakano and Ozawa, 2007), and we
250 amplified this marker in all *Nacella* species. Cytochrome *b* was
251 amplified in all the analyzed species (Table 1).

252 2.2. DNA extraction, PCR amplification and DNA sequencing

253 Animals were fixed in ethanol (95%), and total DNA was ex-
254 tracted from the mantle using the salting-out method described
255 by Aljanabi and Martinez (1997). Partial fragments of COI and Cytb
256 were amplified by PCR, using universal primers published by Fol-
257 mer et al. (1994) and Merritt et al. (1998), respectively. To amplify
258 COI gene *N. concinna* and *N. mytilina*, it was necessary to designed
259 specific internal primers, based on South American *Nacella* species
260 sequences: COI-LEMF (5'-CTG-GGC-TTG-CTG-GGA-CTG-GTT-3')
261 and COI-LEMR (5'-AAT-AAA-TGC-TGA-TAA-AGA-ATA-3').

262 Amplifications were done in a 25 µl reaction volume consisting
263 of 2.5 µl 10× buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8.0), 1.0 µl of
264 50 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0.5 µl of each primer (10 pg/µl), 1 U
265 Taq (Invitrogen), 17.5 µl of double-distilled water plus 20 ng of
266 DNA. Thermal cycling parameters included an initial denaturation
267 step at 94 °C for 3 min, followed by 35 cycles at 94 °C for 1 min,
268 48 °C (COI) and 51.5 °C (Cytb) for 45 s, and 72 °C for 1 min, which
269 ended with a final 6 min extension at 72 °C. Amplification products
270 were purified and sequenced in both directions. Finally, all

271 sequences were deposited in GenBank under Accession Nos.
272 XX000000–XX000000 (COI), and XX000000–XX000000 (Cytb). Q4 272

273 2.3. Phylogenetic analyses 273

274 Sequences were edited and aligned independently using Proseq 274
275 2.91 (Filatov, 2002), and reconstructions were performed using
276 Maximum Parsimony (MP) and Bayesian Inference (MCMC) meth-
277 ods. Phylogenetic reconstructions were conducted from a matrix
278 including the concatenated dataset (COI + Cytb). For this purpose,
279 we determined the congruence on the phylogenetic signal of the
280 genes with the ILD test (Farris et al., 1995), implemented in the
281 partition homogeneity test of PAUP* version 4.0b (Swofford,
282 2002). MP analyses were conducted using PAUP*, with the follow-
283 ing assumptions: characters were treated as equally-weighted
284 using a heuristic search and tree bisection reconnection (TBR), with
285 the branch-swapping option. The steepest descent option was set
286 off and MULTREES on with random-taxon addition sequences to
287 search for optimal trees. Node supports values were computed
288 using non-parametric bootstrapping with a full heuristic search
289 option and 1000 pseudo-replicates (Felsenstein, 1981).

290 Bayesian reconstructions were performed using MrBayes v.3.1.2
291 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003), with the GTR+I+G substitution
292 model as determined by MrModeltest 2.2 (Nylander, 2004). All
293 MCMC analyses were conducted twice, with random initial trees
294 and for 5 × 10⁶ generations. Trees were sampled every 100 gener-
295 ations and majority rule consensus phylograms, as well as poster-

202 *N. deaurata*. Recent morphological studies by Valdovinos and R uth
203 (2005) concluded that all the species described for the Magellanic
204 Region, with the exception of *N. fuegiensis* (considered as a syno-
205 nym of *N. magellanica*), are true taxonomic units with intraspecific
206 variation, especially in shell (shape, thickness and color) and radu-
207 lar teeth morphology.

208 The purpose of this study is to understand the phylogenetic rela-
209 tionships and the historical biogeography of the current *Nacella* spe-
210 cies in the Southern Ocean, by using mitochondrial sequence data.
211 On the one hand, based on the genetic differences between the spe-
212 cies from Antarctica and southern South America, it will be possible
213 to estimate the last contact time between *Nacella* from these conti-
214 nents. From these results, we will determine whether the general
215 distribution and diversity patterns of *Nacella* conform to the hypothe-
216 sis of plate tectonics vicariant processes in the Southern Ocean. On
217 other hand, the comparison among species from South America, Ant-
218 arctica and Kerguelen Province will give us a better insight into col-
219 onization and differentiation processes of the Subantarctic islands.
220 Therefore, our results should shed light on tempo and modes of spe-
221 ciation in the limpet *Nacella* along its current distributions. Finally,
222 this study will contribute to assessing the relative importance of
223 vicariant and dispersal processes in the origin and evolution of mar-
224 ine benthic invertebrates along the Southern Ocean.

2. Materials and methods

2.1. Sampling and identification

227 *Nacella* specimens used in this study were identified following
228 Powell (1973) and Valdovinos and R uth (2005). According to
229 Valdovinos and R uth (2005), Magellanic species of *Nacella* can be
230 clearly distinguished by different morphological features such as
231 shell shape, foot and mantle tentacle color pattern. However, field
232 observations indicate that these characteristics are not so clear and
233 easy to recognize in some specimens. In fact, intermediate shell
234 forms and mixture of diagnostic characters are frequently detected
235 in several specimens, suggesting the absence of reproductive isola-
236 tion and the presence of hybrids in this region. For these reasons,
237 we only considered in this study those Magellanic species that
238 clearly constitute different morphological units (*N. deaurata*,
239 *N. flammea*, *N. magellanica*, and *N. mytilina*, Fig. 1). Species from
240 other biogeographic regions such *N. concinna* from the Antarctic
241 Peninsula, *N. clypeater* from Central Chile, *N. kerguelenensis* and
242 *N. macquariensis* from the Kerguelen Province (Fig. 2) were also
243 included. Eleven species of *Cellana* from the Indo-West Pacific were
244 used as sister groups, and different Patellidae genera (*Cymbula*,
245 *Helcion*, *Scutellastra*, and *Patella*), were used as outgroups (Table 1).

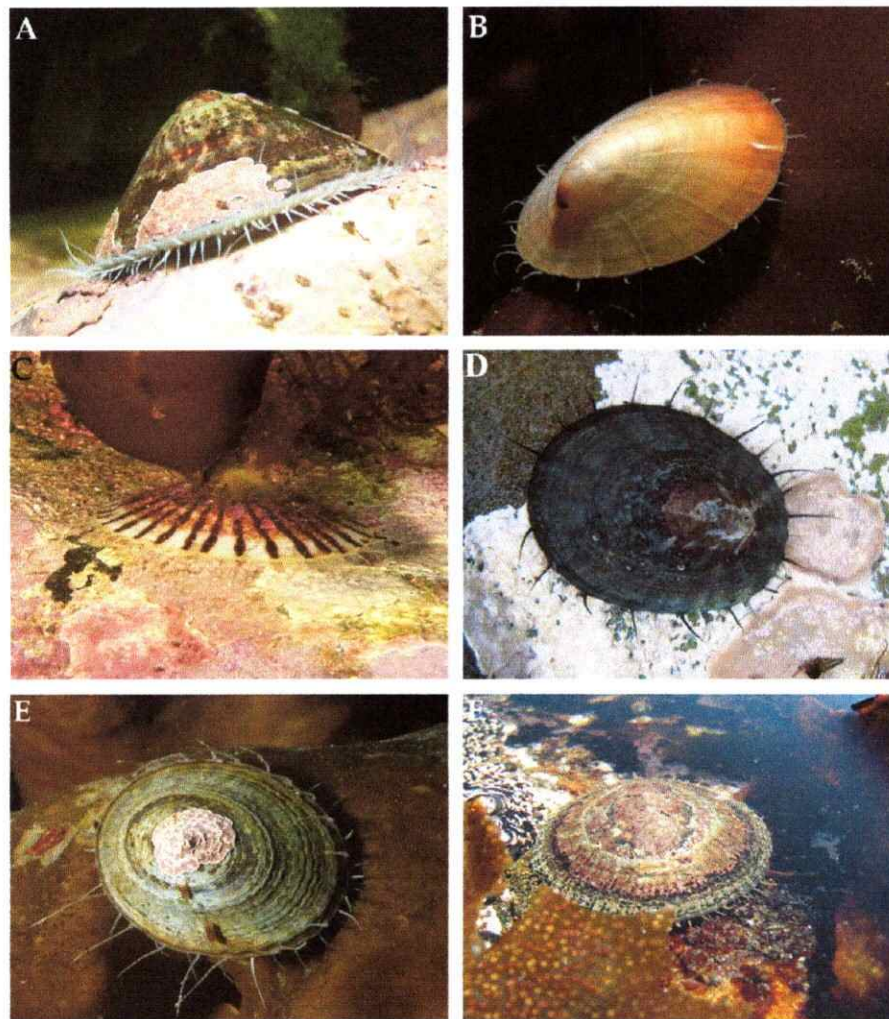


Fig. 1. *Nacella* species in their natural habitat emphasizing the morphological and habitat differences among them. (A–D) Magellanic Province species: (A) intertidal *N. magellanica*, (B) subtidal *N. mytilina* grazing over the macroalgae *Macrocystis pyrifera*, (C) subtidal *N. flammea*, (D) intertidal *N. deaurata*; (E) Antarctic limpet *N. concinna*; (F) Central Chile species *N. clypeater*. Photographs (A)–(C) and (E) courtesy of C sar Cárdenas (ccardenas.biosub@gmail.com; www.guimarina.com).

Table 1

Patellogastropod species, specimens and sampling localities included in this study. Specimens identification was based on Powell (1973), Valdovinos and RÜth (2005), Nakano and Ozawa (2004, 2007). DNA sequences (COI and Cytb) obtained in this study are marked with a * and GenBank Accession Nos. are still not available. * indicate additional sequences from Nakano and Ozawa (2007).

Species	Localities	No.	DNA ID	Cytb	COI
Nacellidae					
<i>Nacella concinna</i> (Strebel, 1908)	South Bay, Antarctic Peninsula, Chile	1	NCON-05	•	•
	Elephant Island, Antarctic Peninsula, Chile	2	NCON-44; NCON-46	•	•
	Covadonga Bay, Antarctic Peninsula, Chile	2	NCON-63; NCON-69	•	•
<i>Nacella clypeator</i> (Lesson, 1831)	La Misión, Valdivia, Chile	2	NCLY-15; NCLY-37	•	•
	Lenga, San Vicente Bay, Chile	2	NCLY-23; NCLY-26	•	•
	Coquimbo Bay, Chile	1	NCLY-45	•	•
<i>Nacella deaurata</i> (Gmelin, 1791)	Laredo Bay, Strait of Magellan, Chile	3	NDEA-09; NDEA-21; NDEA-27	•	•
	Aguila Bay, Strait of Magellan, Chile	2	NDEA-34; NDEA-35	•	•
<i>Nacella magellanica</i> (Gmelin, 1791)	Laredo Bay, Strait of Magellan, Chile	3	NMAG-04; NMAG-10; NMAG-22	•	•
	Orange Bay, Chile	2	NMAG-28; NMAG-44	•	•
<i>Nacella mytilina</i> (Helbling, 1779)	Punta Santa Ana, Strait of Magellan, Chile	2	NMYT-05; NMYT-24	•	•
	Isla Carlos III, Strait of Magellan, Chile	2	NMYT-35; NMYT-41	•	•
<i>Nacella flammea</i> (Gmelin, 1791)	Punta Santa Ana, Strait of Magellan, Chile	5	NFLA-01; NFLA-04; NFLA-06; NFLA-09; NFLA-15	•	•
<i>Nacella kerguelensis</i> (E. A. Smith, 1877)	Heard Island	5	NKER-01; NKER-02; NKER-03; NKER-04; NKER-05	•	•
<i>Nacella macquariensis</i> (Finlay, 1927)	Heard Island	3	NMAC-01; NMAC-02; NMAC-03; NMAC-04; NMAC-05	•	•
<i>Cellana eucosmia</i> (Pilsbry, 1891)	Hurghada, Egypt	1	NUGB-L396	•	AB238543*
<i>Cellana flava</i> (Hutton, 1873)	Kaikoura, South Island, New Zealand	1	NUGB-L576	•	AB238545*
<i>Cellana radans</i> (Gmelin, 1791)	Omaha Beach, North Island, New Zealand	1	NUGB-L580	•	AB238551*
<i>Cellana radiata enneagona</i> (Reeve, 1854)	Madagascar	1	NUGB-L490	•	AB238553*
<i>Cellana radiata orientalis</i> (Pilsbry, 1891)	Okinawa, Japan	1	NUGB-L27	•	AB238554*
<i>Cellana solida</i> (Brainville, 1825)	Orford, Tasmania, Australia	1	NUGB-L401	•	AB238561*
<i>Cellana taiitensis</i> (Röding, 1798)	Talhoae Bay, Nuku Hiva, Marquesas Islands	1	NUGB-L402	•	AB238562*
<i>Cellana tesutudinaria</i> (Linnaeus, 1758)	Okinawa, Japan	1	NUGB-L42	•	AB238563*
<i>Cellana toreuma</i> (Reeve, 1854)	Oga, Akita, Japan	1	NUGB-L3	•	AB238564*
<i>Cellana tramoserica</i> (Holten, 1802)	Botany Bay, NSW, Australia	1	NUGB-L647	•	AB238566*
Patellidae					
<i>Cymbula oculus</i> (Born, 1778)	West Bank, East London, South Africa	1	NHM	•	AB238572*
<i>Helcion concolor</i> (Krauss, 1848)	West Bank, East London, South Africa	1	NHM	•	AB238574*
<i>Helcion dunkeri</i> (Krauss, 1848)	Bloubergstrand, Cape Town, South Africa	1	NHM	•	AB238575*
<i>Patella caerulea</i> (Linnaeus, 1758)	Ceuta, Spain	1	NUGB-L653	•	AB238577*
<i>Patella ferruginea</i> (Gmelin, 1791)	Ceuta, Spain	1	NUGB-L655	•	AB238578*
<i>Patella rustica</i> (Linnaeus, 1758)	Ceuta, Spain	1	NUGB-L651	•	AB238579*
<i>Scutellastra barbara</i> (Linnaeus, 1758)	Kommetjie, Cape Town, South Africa	1	NHM	•	AB238581*
<i>Scutellastra laticostata</i> (Blainville, 1825)	Albany, WA, Australia	1	NUGB-L659	•	AB238584*

296 for probability for nodes, were assembled. MCMC scores were
 297 graphed against generations using Tracer v.1.5 (Rambaut and
 298 Drummond, 2005) to identify stationary, and thus to determine
 299 the number of generations that must be discarded as burn-in. Consensus
 300 phylograms with nodal posterior probability support were
 301 estimated per analysis.

302 2.4. Divergence time estimations

303 Divergence times in molecular evolution have been tradition-
 304 ally estimated under the Molecular Clock Hypothesis (MCH) that
 305 assumes a constancy of evolutionary rate among lineages in a
 306 genealogy or phylogeny. Nevertheless, before assuming the MCH
 307 it is necessary to determine whether the evolutionary rate is constant
 308 along the reconstructed genealogy. For this, we performed a
 309 likelihood ratio test (Felsenstein, 1981) using DAMBE (Xia and Xie,
 310 2001). Another possibility is to use another method that relaxes
 311 the assumption of the MCH.

312 In this study we used a relaxed Bayesian approach for multilo-
 313 cus data as implemented in MULTIDIVTIME package (Thorne et al.,
 314 1998; Kishino et al., 2001). This method for divergence time esti-
 315 mations relies on a stochastic model for changes in the evolution-
 316 ary rate over time (Kishino et al., 2001). It obtains time estimates
 317 by combining sequence data with external information like con-
 318 straints on particular nodes based in the fossil record (Wiegmann
 319 et al., 2003). This method requires an assumed topology and the

tree shown in Fig. 3 was considered as the best one because it cor-
 responds to the most complete hypothesis on the evolution of
 Nacellidae.

To estimate branch lengths on the topology, a discretized gam-
 ma distribution with five rate heterogeneity categories (Yang,
 1994), was used in conjunction with the F84 model of nucleotide
 change. The module PAML (Yang, 1997), generated a Maximum
 Likelihood estimates of different parameters like the transition/
 transversion ratios and unequal nucleotide frequencies. Once these
 parameters were obtained, we estimated the branch lengths for the
 rooted tree and the variance-covariance matrices with the module
 ESTBRANCHES. To estimate divergence times, Markov chain was
 sampled 200,000 times every five cycles, after a burning of
 1,000,000 cycles. The prior for the "separation time between the
 root of ingroup and the present" parameter (rttm), which is not a
 calibration point and do not have a major effect on the posteriors,
 was set to 38 Ma as the maximum time of separation between
Nacella and *Cellana*. The selection of this date was based on the old-
 est Nacellidae fossil (*Cellana ampla*) from the Upper Eocene of Ore-
 gon (Lindberg and Hickman, 1986). The prior rttmsd was set at
 one-half of rttm based on recommendations accompanying the
 software. The rt-rate (rt ratesd) value was set by calculating the
 median value of the amount of evolution from the root to the tip
 of the tree. For time estimations, we used two internal constraints,
 based on *Nacella* fossil record. The first constraint was the appear-
 ance in the fossil record of *N. concinna* from Cockburn Island

320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345

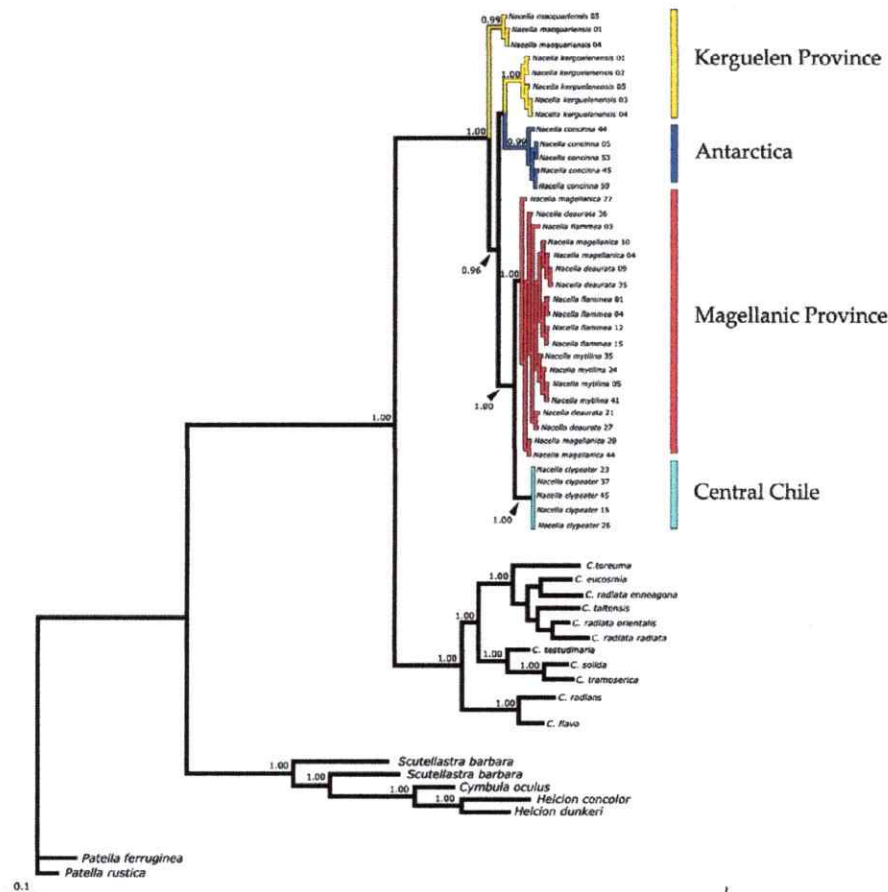


Fig. 3. Molecular phylogeny in *Nacella* produced by Bayesian analyses of the concatenated data set (COI + Cytb). Color of the nodes indicate the origin as indicated in Fig. 2. Support values are Bayesian posterior probabilities (above the diagonal) and parsimony bootstrap support (below the diagonal). The trees were rooted using members of the family Patellidae.

346 ~5.0 Ma (Jonkers and Kelley, 1999) and the second constraint was
347 a *N. clypeator*-like forms from southern Peru from ~5.0 Ma (DeV-
348 ries, 2008).

349 **3. Results**

350 Alignment lengths for COI and Cytb fragments were 648 bp and
351 410 bp, respectively. Partition homogeneity test did not show sig-
352 nificant differences between these molecular markers ($P = 0.65$),
353 and sequences were combined and analyzed as a single data set.
354 Concatenated genes included 1058 bp with 514 variable and 473
355 parsimonious informative sites. For individual and combined anal-
356 yses, MP and Bayesian methods recovered nearly identical topolo-
357 gies. Both markers clearly discriminated between major taxonomic
358 groupings of the Patellogastropoda included in the analyses, with
359 high bootstrap (bs) and posterior probability (pp) supports. The
360 sister relationship and the monophylies of *Nacella* and *Cellana* are
361 strongly supported (pp = 1.0; bs = 100%). Parsimony trees (data
362 not shown) were in basic agreement with the respective Bayesian
363 reconstructions (Fig. 3).

364 Our findings indicate that the ancestor of *N. macquariensis* from
365 Heard Island separated from the ancestor of all the other *Nacella*
366 species considered in this study, inhabiting Antarctica, Kerguelen
367 Province, Central Chile and Magellanic Region. Then, we observed
368 a clade containing the species *N. concinna* and *N. kerguelenensis*
369 from Antarctica and Heard Island, respectively. The next clade to
370 appear included the common ancestor of *N. clypeator* from Chile

and all the extant Magellanic species. Finally, the most derived
371 clade is composed by the four Magellanic species: *N. flammea*, *N.*
372 *magellanica*, *N. deaurata* and *N. mytilina*. COI and Cytb sequences
373 obtained from intermediate forms (data not shown), generally as-
374 signed to other morphospecies, were always clustered within the
375 Magellanic clade.

376 Our results show that *Nacella* species from different regions
377 have marked genetic differences. Although specimens of *N. kergue-*
378 *lenensis* and *N. macquariensis* were collected in the same locality,
379 the genetic differences between them (~7.5%) are comparable to
380 those observed between *Nacella* species from Antarctica and South
381 America. The four species of the Magellanic Province included in
382 the analyses have very low levels of genetic divergence among
383 them. In fact, Magellanic species of *Nacella*, with the exception of
384 *N. mytilina*, do not exhibit reciprocal monophyly at the resolution
385 level of the chosen markers.

387 **3.1. Time divergence estimations**

388 The absence of a molecular clock for both genes was confirmed
389 by the likelihood ratio test (COI twice the log likelihood differ-
390 ence = 3310, df = 57, $P = 0.000$; Cytb twice the log likelihood differ-
391 ence = 496, df = 57, $P = 0.000$). According to this result, the
392 Molecular Clock Hypothesis was rejected for further divergence
393 time estimation analyses. The divergence time estimations using
394 MULTIDIVTIME indicate that the separation between *Nacella* and
395 *Cellana* (Nacellidae) took place during the middle Miocene
396 (~14 ± 1.8 Ma). According to our phylogenetic reconstruction, the

397 ancestor of *N. macquariensis* branched off after the separation of
 398 both genera ($\sim 9.3 \pm 1.5$ Ma). A second clade formed by the ances-
 399 tors of the Antarctic *N. concinna*, the Kerguelen Province *N. kergue-*
 400 *lenensis* and the South American species appeared $\sim 8.7 \pm 1.4$ Ma.
 401 Then, a third clade formed by *N. kerguelenensis*–*N. concinna* was
 402 originated $\sim 8.1 \pm 1.4$ Ma, while the next clade containing *N. cly-*
 403 *peater* and the common ancestor of the Magellanic species ap-
 404 peared $\sim 5.4 \pm 1.1$ Ma. Finally, the radiation in the Magellanic
 405 Region occurred very recently (between 2.0 and 0.4 Ma) during
 406 the Plio-Pleistocene (Fig. 4). This sequence of speciation events is
 407 generally well supported by posterior probabilities along phyloge-
 408 netic tree, except for the *N. concinna*–*N. kerguelenensis* clade, where
 409 the order of divergence is poorly resolved (0.74 pp). These results
 410 indicate that the origin and the diversification of the current spe-
 411 cies of *Nacella* took place long after the separation of the continents
 412 and occurred in two main stages: first, the appearance between 9
 413 and 5 Ma of the most genetically distant species of *Nacella*, includ-
 414 ing *N. macquariensis*, *N. kerguelenensis*, *N. concinna*, *N. clypeater*;
 415 and then a second rapid and recent diversification of the Magel-
 416 lanic species.

417 4. Discussion

418 4.1. Molecular phylogeny of Nacellidae

419 Since the last revision of the Patellogastropoda (Lindberg,
 420 1998), several morphological and molecular studies have at-
 421 tempted to resolve evolutionary relationships in this order (e.g.
 422 Ridgway et al., 1997; Sasaki, 1998; Koufopanou et al., 1999;
 423 Harasewych and McArthur, 2000; Nakano and Ozawa, 2004;
 424 2007; Yoon and Kim, 2007). Most of them considered a limited
 425 number of *Nacella* species or included animals from one specific

426 region, such as the Magellanic Province (*N. magellanica*, *N. deaurata*
 427 and *N. mytilina*; Harasewych and McArthur, 2000; Nakano and
 428 Ozawa, 2007; Yoon and Kim, 2007) or Antarctica (*N. concinna*;
 429 Koufonapou et al., 1999). This restricted sampling in previous
 430 molecular studies has not allowed for good resolution of the evolu-
 431 tionary history of Nacellidae, especially inside the clade of *Nacella*.
 432 Here, we present new information about phylogenetic relation-
 433 ships among *Nacella* species from at least four biogeographic re-
 434 gions in the Southern Ocean.

435 Our results support the monophyly of both *Nacella* (pp = 1.00;
 436 bs = 100%) and *Cellana* (pp = 1.00; bs = 100%) and the sister rela-
 437 tionship of these genera, corroborating previous morphological
 438 and molecular studies (Powell, 1973; Lindberg, 1998; Koufonapou
 439 et al., 1999; Harasewych and McArthur, 2000; Nakano and Ozawa,
 440 2007). The existence of *Nacella* and *Patinigera* subgeneric division
 441 as evolutionary units is not supported, since our reconstruction
 442 did not recover their monophyly (Fig. 3). The species *N. mytilina*
 443 and *N. kerguelenensis* (belonging to the subgenus *Nacella*) are in-
 444 cluded in complete, different clades. In fact, both species are more
 445 closely related to members of the subgenus *Patinigera*. These find-
 446 ings put forward the need of a deep revision of the systematic and
 447 taxonomy of the genus.

448 Our molecular dating of Nacellidae suggests that the separation
 449 of the current genera (*Nacella* and *Cellana*) can be traced back to the
 450 middle Miocene (Fig. 4). An important increase in benthic $\delta^{18}\text{O}$ val-
 451 ues is described during this period, often referred to the middle-
 452 Miocene climatic transition (MMCT), associated with polar cooling,
 453 major growth of the East Antarctic ice sheet, a large drop in global
 454 sea level and major changes in ocean circulation (Woodruff and Sa-
 455 vin, 1989; Mackensen, 2004). Crame (1999) suggests that, during
 456 the late Miocene (12–10 Ma), an intense pattern of thermal zonation
 457 occurred in the oceans (horizontal and vertical). According
 458 to the author, this event might be responsible for an intensification

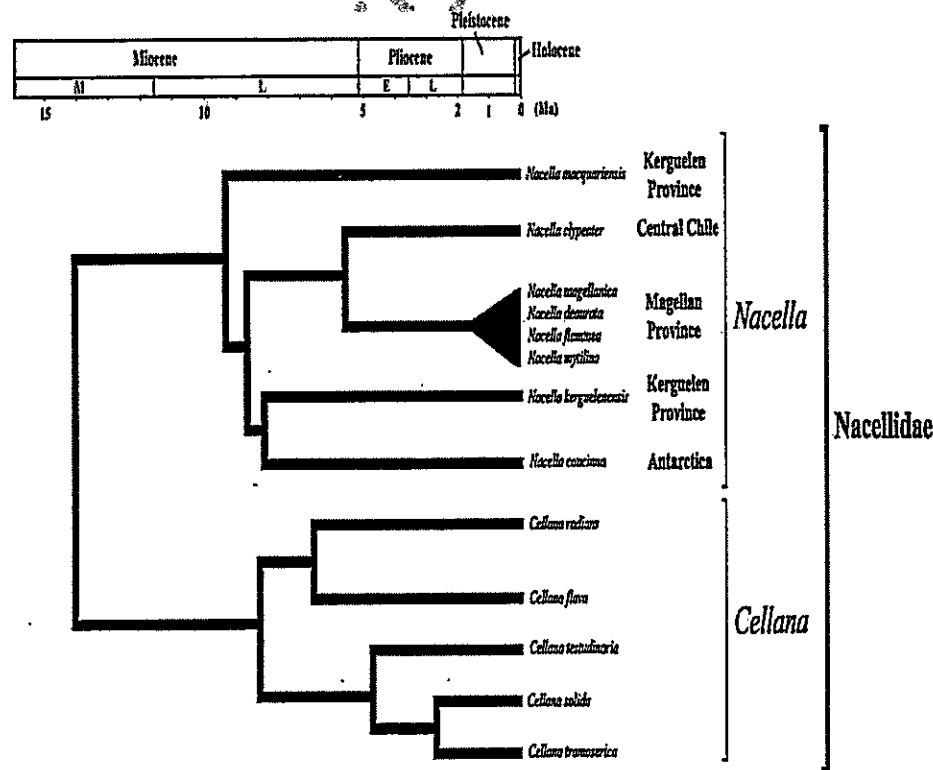


Fig. 4. Linearized tree showing the estimated divergence times of the Nacellidae with species emphasis in *Nacella* groups. Outgroups (Patellidae) and some species of *Cellana* were included in the computational analyses but are not shown.

of the ACC, resulting in the differentiation of Antarctic and Subantarctic fauna. Recently, Lewis et al. (2008), based on paleoecological $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ analyses of associated ash fall, and climate inference from glaciological modeling, suggested that mean summer temperatures in Antarctica cooled by at least 8°C between 14.07 ± 0.05 and 13.85 ± 0.03 Ma, supporting the idea of major climatic changes in the Southern Ocean during this period.

At the specific level, our analyses clearly distinguish five major groups of *Nacella*: (i) *N. concinna* from Antarctica; (ii) *N. macquariensis*; (iii) *N. kerguelensis*, both from Heard Island, Kerguelen Province; (iv) *N. clypeator* from Central Chile; and (v) the last one including all the Magellanic species. The large genetic distances among these groups supports the division of *Nacella* according to previous biogeographic regions described for the Southern Ocean (Hedgpeth, 1969; see Fig. 2). However, the two species *N. kerguelensis* and *N. macquariensis* from the Kerguelen Province, exhibited high level of genetic divergence, similar to those obtained among *Nacella* species from different biogeographic regions.

4.2. Biogeography of *Nacella*

Based on our results, we propose that the modes and tempo of speciation in *Nacella* can be separated in two different stages. The first one includes the appearance of *Nacella* lineages between 9.3 ± 1.5 and 5.4 ± 1.1 Ma in Antarctica, Central Chile, Magellanic and the Kerguelen Province. This first round of gradual speciation processes among different biogeographic regions took place long after the separation of the Southern Ocean continents or the formation of the Antarctic Polar Front. Our divergence time estimations among these lineages are in agreement with other molecular studies in Southern Ocean marine benthic organisms. For example, Stankovic et al. (2002) estimated a divergence time between Antarctic and Subantarctic notothenioid fishes of 6.6–7.0 Ma, Díaz (2008) working on different species of the echinoid *Sterechinus* from Antarctica and South America placed the separation time between *S. neumayeri* and *S. agassizi* at 4.2–5.9 Ma. According to our divergence time estimation, the beginning of divergence between Antarctic and South American *Nacella* does not coincide with plate tectonic dynamics, but with a latter processes, like the drastic middle Miocene oceanographic change in the Southern Ocean (Crame, 1999; Mackensen, 2004; Lewis et al., 2008). During this period, as suggested by Crame (1999), the ACC could have turned into an effective dispersive barrier between Antarctic and Subantarctic waters. In the case of Subantarctic Provinces, the lack of connection among *Nacella* species through the ACC, specifically between the Magellanic and the Kerguelen Provinces, contrasts with previous molecular studies in other marine benthic organisms that clearly show recurrent and modern gene flow among Subantarctic regions. For example, phylogeographic studies in *Ostrea chilensis* (Ó Foighil et al., 1999), *Macrocytis pyrifera* (Cover et al., 2001), *Mytilus* spp. (Gerard et al., 2008), and *Durvillaea antarctica* (Fraser et al., 2009) hypothesized long-distance dispersal, probably by rafting, as the main mechanism to explain the absence of genetic discontinuity in these species. Because most *Nacella* species live directly on rocks and boulders, dispersal by rafting might be restricted and uncommon in this group. In addition, and despite the proposal that planktonic stage could reach 3–4 weeks in *Nacella*, large geographic distances among shallow habitats in the Southern Ocean may prevent recurrent long-distance dispersal among these regions. From a biogeographical point of view, *Nacella* distribution encompasses a very wide geographic area including several Subantarctic islands, usually separated from each other by hundreds to thousands of kilometers (Chown et al., 2008). In this context, we propose that the main lineages of *Nacella* were originated early after the MMCT, through erratic and exceptional long distance colonization events, followed by speciation.

The absence of reciprocal monophyly and the presence of short branches among the Magellanic species of *Nacella* could suggest that described species in this area just correspond to a single morphologically variable species. Moreover, Magellanic morphospecies could be even interpreted as ecotypes when considering that they occur in sympatry together with ecological differences in terms of substrate preference and subtle differences in their distribution in the intertidal and shallow subtidal zone (Powell, 1973; Valdovinos and Rùth, 2005). Absence of genetic isolation in previous morphological described species have been reported in Patellogastropod like in the genera *Helcion* and *Notoacmea* (Nakano and Spencer, 2007; Ponder and Lindberg, 2008). An alternative explanation would correspond to a very recent diversification of the genus in this region followed by rapid morphological differentiation. High endemic species diversity has been described in other groups of molluscs in the fjords of the Magellanic Province (Valdovinos et al., 2003). According to these authors, the presence of multiple refugia along this Province during the last glacial cycles may have enabled these groups to survive repeated ice advances and retreats. At the same time, the fragmentation and isolation of these areas could have favored speciation in this region (Valdovinos et al., 2003). As regards of rapid morphological diversification, limpet shell shape and thickness are known to vary strongly between species that occupy different habitats (Nakano and Ozawa, 2005; Nakano and Spencer, 2007). For instance, species inhabiting seaweeds, such as *N. mytilina*, have marked shell differences (thickness, shape and color pattern), in comparison to those living on rocky substrates, such as *N. magellanica* or *N. deaurata*. Non-coupled rate of morphological and neutral molecular evolution is a common feature in several groups of Patellogastropods, such as *Notoacmea* and *Helcion* (Nakano and Spencer, 2007; Ponder and Lindberg, 2008). Further studies using fast evolving nuclear markers, like AFLPs and EPICs (Exon Priming Intron Crossing) should give us new and better insights into the contemporary evolutionary processes of *Nacella* in this region and determine whether Magellanic Province harbor a single morphologically variable species or several recently diversified ones.

The fossil record of the genus *Nacella* is relatively scarce with Pliocene *N. concinna* described for the Cockburn Island, Antarctic Peninsula (Jonkers and Kelley, 1998), and *N. aff. terroris* from the Chiloé Island in southern Chile (Watters and Flemming, 1972). Magellanic fossil of *Nacella*, includes only Holocene specimens identified as *N. deaurata* and *N. magellanica* from Patagonia, Argentina (Gordillo, 1999; Gordillo et al., 2005). These fossil records in southern South America, further support our divergence time estimation in the evolution of *Nacella* in this region. Recently, DeVries (2009) described at least five Pliocene species of *Nacella*: *N. (Nacella) lacrima*; *N. (Patinigera) oblea*; *N. (P.) chalaensis*; *N. (P.) intiforma*; and *N. (P.) oconaensis*, from tropical latitudes of southern Peru. These fossils could possibly correspond to an unknown *Nacella* diversification in southern Peru associated in morphology and geography to the extant *N. clypeator* from central and northern Chile. Nevertheless, DeVries (2009) also described other species like *Nacella reichedei* from the Late Oligocene of Peru as well as *N. nielsenii* from the late early Miocene of southern Chile (DeVries, 2009).

Finally, our datings of the evolutionary events in the evolution of the genus *Nacella* are in agreement with most of the fossil records of the living representatives, with the exception of the Oligocene an Early Miocene species from Peru and Chiloé (DeVries, 2009). If these fossils truly represent *Nacella* species, they could correspond to low latitude ancestors of the modern Subantarctic and Antarctic taxa. However, this scenario is not compatible with our phylogenetic reconstructions, where the South American clade of *Nacella* appears as the most derived one. Alternatively, considering that shell morphology and even microstructure are highly

589 homoplasious in Patellogastropods, these fossils could rather be-
590 long to an extinct Nacellid lineage that predates the split into
591 *Nacella* and *Cellana*.

592 In this respect, the inclusion of *N. terroris* (Antipodean Provin-
593 ce), *N. delesserti* and *N. edgari* (Kerguelen Province) will give us
594 more detailed information and a better understanding about the
595 complete phylogeny and biogeography of *Nacella* in the Southern
596 Ocean.

597 **5. Uncited references**

598 Q1 Clarke (1983) and Thorne and Kishino (2002).

599 **Acknowledgments**

600 We are grateful to the following people and museums for help
601 in field work, data analyses, and for contributing specimens to this
602 study: Hamish Spencer, Alison Miller, Janet Waterhouse, Sergio
603 Letelier, César Cárdenas, Christian Ibañez, Monica Saldarriaga, Alej-
604 andro Perez, Ceridwen Fraser, Jeff Thorne and Raisa Nikula. Museo
605 Nacional de Historia Natural Chile, Santiago, Chile, Australian Mu-
606 seum, Sydney, National Museum of Nature and Science, Tokyo.

607 This study was supported by the Grants INACH B_01_07, Conicyt
608 Ph.D. Grant Nos. D-21060218 and IDEAWILD to C.G., and by the Pro-
609 jects P05-002 ICM and PFB 023 (Institute of Ecology and Biodiver-
610 sity, Universidad de Chile) and INACH 02-02, 13-05 and ECOS
611 C06B02 to E.P. and C.G.; Grant-in-Aid for JSPS Fellows No. 207024
612 to T.N. from the Japan Society for Promotion of Science. Research
613 Program 0273, Universidad de Magallanes to J.I.C. Thanks is also
614 due to international program as CAML, EBA-SCAR and PROSUL-Braz-
615 zil for encouraging and supporting Antarctic research in Evolution.

616 **References**

617 Alamo, V., Valdivieso, V., 1997. Lista sistemática de moluscos marinos del Perú.
618 Instituto del Mar del Perú, Callao, Perú. 183 pp.
619 Aljanabi, S.M., Martinez, L., 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality
620 genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* 25, 4692–4693.
621 Arntz, W.E., 2005. The Magellan-Antarctic connection: links and frontiers at
622 southern high latitudes. *Sci. Mar.* 69, 359–365.
623 Barnes, D.K.A., Conlan, K.E., 2007. Disturbance, colonization and development of
624 Antarctic benthic communities. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B* 362, 11–38.
625 Beaumont, A.R., Wei, J.H.C., 1993. Morphological and genetic variation in the
626 antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *J. Molluscan Stud.* 57, 443–
627 450.
628 Bird, C.E., Holland, B.S., Bowen, B.W., Toonen, R.J., 2007. Contrasting phylogeography
629 in three endemic Hawaiian limpets (*Cellana* spp.) with similar life histories. *Mol.*
630 *Ecol.* 3, 3173–3186.
631 Bowden, D.A., 2005. Seasonality of recruitment in Antarctic sessile marine benthos.
632 *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 297, 101–118.
633 Branch, G.M., 1985a. Limpets: evolution and adaptation. In: Trueman, E.R., Clarke,
634 M.R. (Eds.), *The Mollusca*, vol. 10. Academic Press, New York, pp. 187–220.
635 Branch, G.M., 1985b. Limpets: their role in littoral and sublittoral community
636 dynamics. In: Moore, P.G., Seeds, R. (Eds.), *The Ecology of Rocky Coast*. Hodder
637 and Stoughton, London, pp. 97–116.
638 Brandt, A., Linse, K., Mühlenhardt-Siegel, U., 1999. Biogeography of Crustacea and
639 Mollusca of the Subantarctic and Antarctic regions. *Sci. Mar.* 63, 383–389.
640 Burridge, C.P., Meléndez, R., Dyer, B.S., 2006. Multiple origins of the Juan Fernández
641 kelpfish fauna, and evidence for frequent and unidirectional dispersal of
642 cirrhitoid fishes across the South Pacific. *Syst. Biol.* 55, 566–578.
643 Chown, S.L., Lee, J.E., Shaw, J.D., 2008. Conservation of Southern Ocean Islands:
644 invertebrates as exemplars. *J. Insect Conserv.* 12, 277–291.
645 Clarke, A., 1983. Life in cold water: the physiological ecology of polar marine
646 ectotherms. *Oceanogr. Mar. Biol. Annu. Rev.* 21, 341–453.
647 Clarke, A., Johnston, I.A., 1996. Evolution and adaptive radiation of Antarctic
648 fishes. *Trends Ecol. Evol.* 11, 211–218.
649 Clarke, A., Johnston, N.M., 2003. Antarctic marine benthic diversity. *Ocean. Mar.*
650 *Biol. Annu. Rev.* 41, 47–114.
651 Clarke, A., Aronson, R.B., Crame, J.A., Gilli, J.-M., Blake, D.B., 2004a. Evolution and
652 diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Antarct.*
653 *Sci.* 16, 559–568.
654 Clarke, A., Prothero-Thomas, E., Beaumont, J.C., Chapman, A.L., Brey, T., 2004b.
655 Growth in the limpet *Nacella concinna* from contrasting sites in Antarctica. *Polar*
656 *Biol.* 28, 62–71.

Clarke, A., Barnes, D.K.A., Hodgson, D.A., 2005. How isolated is Antarctica? *Trends*
657 *Ecol. Evol.* 20, 1–3.
658 Coyer, J.A., Smith, G.J., Anderson, R.A., 2001. Evolution of *Macrocystis* spp.
659 (Phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. *J. Phycol.* 37, 574–585.
660 Crame, J.A., 1999. An evolutionary perspective on marine faunal connection
661 between southernmost South America and Antarctica. *Sci. Mar.* 63, 1–14.
662 Diaz, A.D., 2008. Origen y evolución de la fauna marina bentónica antártica:
663 diversidad genética y divergencia molecular entre especies congénicas de
664 Echinoidea de Antártica y Sudamérica. Tesis de Magister. Universidad de Chile,
665 Santiago, Chile. 65 pp.
666 DeVries, T.J., 2008. Cenozoic *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) from Peru and
667 Chile: filling in the gaps. *Velliger* 50, 274–291.
668 Donald, K.M., Kennedy, M., Spencer, H.G., 2005. Cladogenesis as the result of long-
669 distance rafting events in South Pacific topshells (Gastropoda, Trochidae).
670 *Evolution* 59, 1701–1711.
671 Farris, J.S., Källersjö, M.K.A., Kluge, A.G., Bult, C., 1995. Constructing a
672 significance test for incongruence. *Syst. Biol.* 44, 570–572.
673 Felsenstein, J., 1981. Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum
674 likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368–376.
675 Filatov, D.A., 2002. PROSEQ: a software for preparation and evolutionary analysis of
676 DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes* 2, 621–624.
677 Folmer, M., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., Vrijenhoek, R., 1994. DNA primers for
678 amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse
679 metazoan invertebrates. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 3, 294–299.
680 Fraser, C.I., Nikula, R., Spencer, H., Waters, J.M., 2009. Kelp genes reveal effects of
681 Subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*
682 106, 3249–3253.
683 Gérard, K., Bierre, N., Borsa, P., Chenuil, A., Féral, J.-P., 2008. Pleistocene separation
684 of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. Mussels from northern and southern
685 hemisphere and strong genetic differentiation among southern populations.
686 *Mol. Phylogenet. Evol.* 49, 84–91.
687 Goldstien, S.J., Gemmel, N.J., Schiel, D.R., 2006. Molecular phylogenetics and
688 biogeography of the nacellid limpets of New Zealand (Mollusca:
689 Patellogastropoda). *Mol. Phylogenet. Evol.* 38, 261–265.
690 Gordillo, S., 1999. Holocene molluscan assemblages in the Magellan region. *Sci. Mar.*
691 63, 15–22.
692 Gordillo, S., Coronato, A.M.J., Rabassa, J.O., 2005. Quaternary molluscan faunas from
693 the island Tierra del Fuego after the Last Glacial Maximum. *Sci. Mar.* 69, 337–348.
694 Harasewych, M.G., McArthur, A.G., 2000. A molecular phylogeny of the
695 Patellogastropoda (Mollusca: Gastropoda). *Mar. Biol.* 137, 183–194.
696 Hedgpeth, J.W., 1969. Distribution of selected groups of marine invertebrates in
697 Waters South of 35°S latitude. *Antarctic Map Folio Series – Folio 11*.
698 Jonkers, H.A., Kelley, S.P., 1998. A reassessment of the age of Cockburn Island
699 Formation, northern Antarctic Peninsula and its palaeoclimatic implications. *J.*
700 *Geol. Soc. Lond.* 155, 737–740.
701 Kennet, J.P., 1977. Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic
702 Ocean and their impact on global paleoceanography. *J. Geophys. Res.* 82, 3843–
703 3860.
704 Kishino, H., Thorne, J.L., Bruno, W.J., 2001. Performance of a divergence time
705 estimation method under a probabilistic model of rate evolution. *Mol. Biol. Evol.*
706 18, 352–361.
707 Koufopanou, V., Reid, D., Ridgway, S.A., Thomas, R.H., 1999. A molecular phylogeny
708 of the Patelid limpets (Gastropoda: Patelidae) and its implications for the
709 origins of their antitropical distribution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 11, 138–156.
710 Lancellotti, D.A., Vasquez, J.A., 2000. Zoogeografía de macroinvertebrados
711 bentónicos de la costa de Chile: contribución para la conservación marina.
712 *Rev. Chil. Hist. Nat.* 73, 99–129.
713 Lawler, L.A., Gahagan, L.M., Coffin, M.F., 1992. The development of paleoseaways
714 around Antarctica. *Antarct. Res. Book Ser.* 56, 7–30.
715 Lawler, L.A., Gahagan, L.M., 2003. Evolution of Cenozoic seaways in the circum-
716 Antarctic region. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 198, 11–37.
717 Lewis, A.R., Marchant, D.R., Ashworth, A.C., Hedena, L., Hemming, S., Johnson, J.V.,
718 Leng, M.-J., Machlus, M., Newton, A.E., Raine, J.I., Willenbring, J.K., Williams, M.,
719 Wolfe, A.P., 2008. Mid-Miocene cooling and the extinction of tundra in
720 continental Antarctica. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105, 10676–10680.
721 Lindberg, D.R., Hickman, C.S., 1986. A new anomalous giant limpet from the Oregon
722 Eocene (Mollusca: Patelidae). *J. Paleontol.* 60, 661–668.
723 Lindberg, D.R., 1998. The Patellogastropoda. *Malacological Rev. Supp.* 4, 35–63.
724 Mackensen, A., 2004. Changing Southern Ocean palaeocirculation and effect on
725 global climate. *Antarct. Sci.* 16, 369–384.
726 Merritt, T.J.S., Shi, L., Chase, M.C., Rex, M.A., Etter, R.J., 1998. Universal cytochrome b
727 primers facilitate intraspecific studies in molluscan taxa. *Mol. Mar. Biol.*
728 *Biotechnol.* 7, 7–11.
729 Nakano, T., Ozawa, T., 2004. Phylogeny and historical biogeography of limpets of the
730 order Patellogastropoda based on mitochondrial DNA sequences. *J. Molluscan*
731 *Stud.* 70, 31–41.
732 Nakano, T., Ozawa, T., 2005. Systematic revision of *Patelloida pygmaea* (Dunker,
733 1860) (Gastropoda: Lottidae), with a description of a new species. *J. Molluscan*
734 *Stud.* 71, 357–370.
735 Nakano, T., Ozawa, T., 2007. Worldwide phylogeography of limpets of the order
736 Patellogastropoda: molecular, morphological and palaeontological evidence. *J.*
737 *Molluscan Stud.* 73, 79–99.
738 Nakano, T., Spencer, H.G., 2007. Simultaneous polyphenism and cryptic species in
739 an intertidal limpet from New Zealand. *Mol. Phylogenet. Evol.* 45, 470–479.
740 Nylander, J., 2004. MrModeltest v. 2.2b. Department of Systematic Zoology, Uppsala
741 University, Sweden.
742

- 743 Ó Foighil, D., Marshall, B.A., Hilbish, T.J., Pino, M.A., 1999. Trans-Pacific range
744 extension by rafting inferred for the flat oyster *Ostrea chilensis*. *Biol. Bull.* 196,
745 122–126.
- 746 Patarnello, T., Bargelloni, L., Varotto, V., Battaglia, B., 1996. Krill evolution and the
747 Antarctic Ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by
748 molecular data. *Mar. Biol.* 126, 603–608.
- 749 Pearse, S.E., McClintock, J.B., Bosch, I., 1991. Reproduction of Antarctic benthic
750 marine invertebrates: tempo, modes, and timing. *Am. Zool.* 31, 65–80.
- 751 Peck, L.S., Clarke, A., Chapman, A.L., 2006. Metabolism and development of pelagic
752 larvae of Antarctic gastropods with mixed reproductive strategies. *Mar. Ecol.*
753 *Prog. Ser.* 318, 213–220.
- 754 Picken, G.B., 1980. The distribution, growth, and reproduction of the Antarctic limpet
755 *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 42, 71–85.
- 756 Ponder, W.F., Lindberg, D.R., 1997. Towards a phylogeny of gastropod molluscs: an
757 analysis using morphological characters. *Zool. J. Linn. Soc.* 119, 83–265.
- 758 Ponder, W.F., Lindberg, D.R., 2008. *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*.
759 University of California Press, Berkeley, Los Angeles, London. 469 pp.
- 760 Powell, A.W.R., 1973. The Patellid limpets of the world (Patellidae). In: Abbot, R.T.
761 (Ed.), *Indo-Pacific-Mollusca*, vol. 3. The Department of Mollusks, Greenville, pp.
762 75–206.
- 763 Ridgway, S.A., Reid, D.G., Taylor, J.D., Branch, G.M., Hodgson, A.N., 1998. A cladistic
764 phylogeny of the family Patellidae (Mollusca: Gastropoda). *Philos. Trans. R. Soc.*
765 *London B* 353, 1645–1671.
- 766 Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference
767 under mixed models. *Bioinformatics* 19, 1572–1574.
- 768 Sasaki, T., 1998. Comparative anatomy and phylogeny of the recent
769 Archaeogastropoda (Mollusca: Gastropoda). University Museum, University of
770 Tokyo, Bulletin 38, pp. 1–223.
- 771 Stankovic, A., Spalik, K., Kamler, E., Borsuk, P., Weglenski, P., 2002. Recent origin of
772 sub-Antarctic notothenoids. *Pol. Biol.* 25, 203–205.
- 773 Swofford, D.L., 2002. PAUP*: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other
774 Methods), Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- 775 Thatje, W.E., Thatje, S., Gerder, D., Gili, J.-M., Gutt, J., Jacob, U., Montiel, A., Orejas, C.,
776 Teixidó, N., 2005. The Antarctic-Magellan connection: macrobenthos ecology on
777 the shelf and upper slope, a progress report. *Sci. Mar.* 69, 237–269.
- 778 Thomson, M.R.A., 2004. Geological and paleoenvironmental history of the Scotia Sea
779 region as a basis for biological interpretations. *Deep-Sea Res. II* 51, 1467–1487.
- 780 Thorne, J.L., Kishino, H., Painter, I.S., 1998. Estimating the rate of evolution of the
781 rate of molecular evolution. *Mol. Biol. Evol.* 15, 1647–1657.
- 782 Thorne, J.L., Kishino, H., 2002. Divergence time and evolutionary rate estimation
783 with multilocus data. *Syst. Biol.* 51, 689–702.
- Torsvik, T.H., Gåina, C., Redfield, T.F., 2008. Antarctica and global paleogeography:
784 from Rodinia, through Gondwanaland and Pangea, to the birth of the Southern
785 Ocean and the opening of Gateways. In: Cooper, A.K.P., Barret, J., Storey, H.,
786 Stump, E., Wise, W. (Eds.), *Antarctica: A Keystone in a Changing World*.
787 Proceedings of the 10th International Symposium on Antarctic Earth Science.
788 The National Academic Press, Washington, DC.
- 789 Valdovinos, C., Navarrete, S., Marquet, P.A., 2003. Mollusks species diversity in the
790 Southeastern Pacific: why are there more species towards the pole? *Ecography*
791 29, 139–144.
- 792 Valdovinos, C., Rütih, M., 2005. Nacellidae limpets of the southern end of South
793 America: taxonomy and distribution. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 78, 497–517.
- 794 Waters, J.M., 2007. Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern
795 temperate marine biogeography, with new directions for dispersalism. *J.*
796 *Biogeogr.* 35, 1–11.
- 797 Waters, J.M., McCulloch, G.A., Eason, J.A., 2007. Marine biogeographical structure in
798 two highly dispersive gastropods: implications for trans-Tasman dispersal. *J.*
799 *Biogeogr.* 34, 678–687.
- 800 Watters, W.A., Flemming, C.A., 1972. Contributions to the Geology and Paleontology
801 of Chiloe Island, Southern Chile. Parts I and II. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.* 263,
802 369–408.
- 803 Wiegmann, B.M., Yeates, D.K., Thorne, J.L., Kishino, H., 2003. Time flies: a new
804 molecular time-scale for fly evolution without a clock. *Syst. Biol.* 52, 745–756.
- 805 Williams, S.T., Reid, D.G., Littlewood, D.J.T., 2003. A molecular phylogeny of the
806 Littoriniinae (Gastropoda: Littorinidae): unequal evolutionary rates,
807 morphological parallelism, and biogeography of the Southern Ocean. *Mol.*
808 *Phylogenet. Evol.* 28, 50–86.
- 809 Woodruff, F., Savin, S.M., 1989. Miocene deepwater oceanography.
810 *Palaeoceanography* 4, 87–140.
- 811 Xia, X., Xie, Z., 2001. DAMBE: data analysis in molecular biology and evolution. *J.*
812 *Hered.* 92, 371–373.
- 813 Yang, Z., 1994. Maximum likelihood phylogenetic estimation from DNA sequences
814 with variable rates over sites: approximate methods. *J. Mol. Evol.* 39, 306–314.
- 815 Yang, Z., 1997. PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum
816 likelihood. *CABIOS* 13, 555–556.
- 817 Yoon, S.E., Kim, W., 2007. 18S ribosomal DNA sequences provide insight into the
818 phylogeny of patellogastropod limpets (Mollusca: Gastropoda). *Mol. Cells* 23,
819 64–71.
- 820 Zachos, J., Paganí, M., Sloan, L., Thomas, E., Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and
821 aberrations on global climate 65 Ma to present. *Science* 292, 686–693.
- 822 Zelaya, D.G., 2005. The bivalves from the Scotia Arc Islands: species richness and
823 faunistic affinities. *Sci. Mar.* 69, 113–122.
- 824
- 825

UNCORRECTED

Author's Accepted Manuscript

Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula

Claudio A. González-Wevar, Bruno David, Elie Poulin

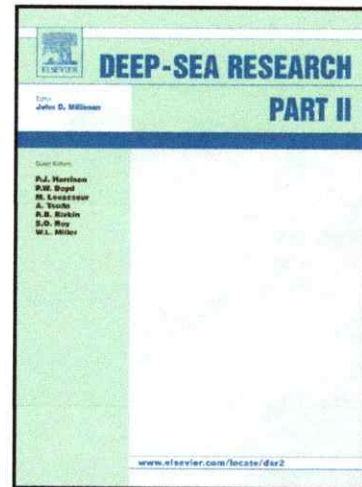
PII: S0967-0645(10)00190-6
DOI: doi:10.1016/j.dsr2.2010.05.026
Reference: DSR2 2820

To appear in: *Deep-Sea Research II*

Received date: 18 May 2010
Accepted date: 18 May 2010

Cite this article as: Claudio A. González-Wevar, Bruno David and Elie Poulin, Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula, *Deep-Sea Research II*, doi:10.1016/j.dsr2.2010.05.026

This is a PDF file of an unedited manuscript that has been accepted for publication. As a service to our customers we are providing this early version of the manuscript. The manuscript will undergo copyediting, typesetting, and review of the resulting galley proof before it is published in its final citable form. Please note that during the production process errors may be discovered which could affect the content, and all legal disclaimers that apply to the journal pertain.



www.elsevier.com/locate/dsr2

Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula.

Claudio A. González-Wevar^{a*}, Bruno David^b, Elie Poulin^a

^a Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB), Departamento de Ciencias Ecológicas, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago Chile.

^b Laboratoire Biogéosciences, CNRS, Centre des Sciences de la Terre, Université de Bourgogne, Dijon, France.

Keywords: Southern Ocean; Antarctica; *Nacella concinna*; COI; Genetic structure; Median-Joining Network; Elliptic Fourier analysis; bottleneck effect, founder effect.

Abstract

Endemic to Antarctic ecosystems, the limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) is an abundant and dominant marine benthic invertebrate of the intertidal and shallow subtidal zone. In order to examine the phylogeographic pattern and historical demography of the species along the western Antarctic Peninsula, we amplified 663 bp of the mitochondrial DNA Cytochrome Oxidase Subunit I of 161 *N. concinna* specimens from five localities, as well as two specimens from South Georgia and Subantarctic Marion Island. As two different morphotypes, one characterized by an elevated shell in the intertidal and the other by a flat one in the subtidal, have been recurrently reported for this species, we also compared intertidal and subtidal samples from two localities of King George Island (Admiralty and Fildes Bay) through geometric morphometric and genetic analyses. As a result, elliptic Fourier analyses on shell shape morphology detected highly significant differences between inter- and subtidal morphotypes. In contrast, mtDNA analyses between these morphotypes did not detect statistical differences between them and support the hypothesis that subtidal and intertidal *N. concinna* forms correspond to be the same population unit.

Genetic analyses depicted low levels of haplotypic and nucleotide diversity in *N. concinna* in all localities. Among populations, comparisons did not detect any genetic structure, supporting the existence of a single genetic unit along the western Antarctic Peninsula. A marked L-shaped distribution of pairwise differences and significant negative Tajima's D and Fu's F_S indices

suggest the existence of a recent demographic expansion of this species. Time estimations corrected by the “time dependency of molecular rate” hypothesis for this demographic event (7,500 – 22,000 years ago), fit well with the last glacial-interglacial transition period. Low levels of genetic diversity in *N. concinna* could reflect the dramatic effect of glacial periods on population sizes, especially in Antarctic species with narrow bathymetric ranges.

Genetic similarities between South Georgia and Antarctic samples, as well as between *N. delesserti* (Philippi, 1849) and *N. concinna* (Strebel, 1908) fell within the range of intraspecific variation. The genetic proximity between subantarctic *N. delesserti* and the Antarctic limpet could be explained through north-eastward long-distance dispersion events during the late Pleistocene.

1. Introduction

Antarctica is considered to be an island continent isolated from other regions of the Southern hemisphere by geographic distance, water currents and extreme environmental conditions such as low temperatures, the presence of ice, and exceptional seasonality (Crame, 1999; Clarke et al., 2004, 2005; Strugnell and Linse, 2005). The current biodiversity in Antarctica has resulted from different biogeographic and evolutionary processes operating over this continent since the Mesozoic (Zachos et al., 2001; Brandt, 2005; Brandt et al., 2007; Rogers, 2007). Marginal and extreme environments are thought to enhance the evolution of novel species through habitat fragmentation and strong selective pressure, thus driving the appearance and establishment of new taxa. In the particular case of Antarctica, this situation may have been favored by the elimination of competitors and predators, as well as by the stimulation of adaptation and speciation processes in survivors (Crame, 1999; Strugnell and Linse, 2005).

It is also interesting to note how the progressive isolation of this continent has led to a drastic extinction of plants and animals in the terrestrial realm (Clarke and Crame, 1989; Convey et al., 2008). In the Antarctic Ocean, similar changes are marked by the reduction of several key benthic groups, which are abundant and dominant in adjacent subantarctic regions, such as brachyuran crabs, lobsters, cartilaginous and non-notothenoid fishes. Nevertheless, other groups like sponges, bryozoans, sea spiders, echinoderms, amphipods and isopods are abounding and diverse, indicating that the continent’s isolation and climatic changes have not impeded their success (Crame, 1999; Arntz and Rios, 1999; Gray, 2001; Clarke et al., 2004). Nearshore benthic

assemblages in Antarctica are diverse and with high standing stocks (Clarke and Johnston, 2003; Bowden, 2005). In fact, the modern Antarctic benthic fauna includes more than 4000 species and comprise a significant part of Earth's biodiversity (Clarke et al., 2004; Gutt et al., 2004; Peck et al., 2005). Many of these species are found only in this continent and endemism may reach over 90% for some groups of Antarctic invertebrates (Clarke and Johnston, 2003). The marked changes in the diversity of invertebrate groups over the last 40 Myr indicate that Antarctica offers good insight into macro-evolutionary processes, especially the relationship between speciation and extinction (Strugnell and Linse, 2005). At the same time, this particular region presents opportunities for studying life-history adaptations in slow growing benthic species that persist in habitats with high seasonality and frequent natural disturbance (Bowden, 2005).

Members of the genus *Nacella* Schumacher, 1817 (Nacellidae: Patellogastropoda) are exclusive inhabitants of the Antarctic – Subantarctic ecosystems (Powell, 1973). Currently, the genus is composed of 15 nominal species distributed in several regions of the Southern Ocean, like the Antarctic Peninsula, the Magellan province, the Kerguelen province and the Antipodean province in Southern New Zealand (Powell, 1973; Valdovinos and R uth, 2005). Recent phylogenetic studies indicate that the origin of *Nacella* relates to the Middle Miocene Climatic Transition (~14 Ma), long after the separation of the Southern Ocean Continents, like Antarctica and South America (Gonz alez-Wevar, in press). Molecular analyses using two mitochondrial markers (COI and CytB) suggest that the diversification of the genus can be divided into two main phases: a first gradual appearance of *Nacella* in different biogeographic regions like Antarctica, South America and the Kerguelen Province, between 9.0-5.0 Ma; a second diversification stage characterized by a rapid morphological and ecological radiation of the genus in the Magellanic Province during the Pleistocene (~2.0-0.4 Ma; Gonz alez-Wevar, in press).

In Antarctica, the true limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908) is one of the most conspicuous and dominant marine benthic macro-invertebrates (Walker, 1972; Picken, 1980; Picken and Allan, 1983; Peck and Veal, 2001). The species is distributed along the Antarctic Peninsula and its adjacent island systems, like the Palmer Archipelago, Seymour and Paulet Island, along the islands of the Scotia Arc (South Georgia Island, South Orkney Islands, South Shetland Islands), and Bouvet Island (Powell, 1973). It is a very common species in the nearshore of the West Antarctic environment with a mean population density of $124 \pm 21 \text{ m}^{-2}$ on Signy Island (Picken, 1980). The species inhabits a bathymetric range from the intertidal zone down to 110 m, where it

mainly grazes on microphytobenthos and microalgae (Picken, 1980; Davenport, 1988; Brêthes et al., 1994). Like many Antarctic marine organisms, *N. concinna* is also described as a long-lived organism, reaching shell lengths of ~ 41mm in 21 years, and some specimens have even lived up to more than 70 years (Picken, 1980). *N. concinna* is a dioecious species with external fertilization and broadcast spawners with pelagic larvae. Unusually for a patellogastropod, *N. concinna* forms spawning clusters of 3 – 35 individuals for up to seven days during the spring bloom period (Picken and Allan, 1983; Stanwell-Smith and Clarke, 1998).

The species was originally described as *Patella polaris* during the XVII century and Strebel (1908) distinguished two different forms, namely, a shallow water morph named *Patinella polaris* and a deeper water one called *Patinella polaris* var. *concinna*. Later, Powell (1973) recognized no differences between these forms and re-named both *Nacella concinna*, within the subgenus *Patinigera*. Walker (1972) and Picken (1980) recorded different bathymetric migration patterns between these inter- and subtidal forms, with the first one migrating vertically on a seasonal mode as a response to decreasing temperatures and ice formation while the second one remains far below the low tide level all year. The elevated intertidal shape allows higher water volume retention offering an advantage towards avoiding desiccation, to extreme temperature ranges and hypoxia conditions. According to Nolan (1991) this form also favors colonizing the intertidal over the sublittoral form highly preferred by predators. Beaumont and Wei (1991) performed a morphological and genetic study on the species. In that study, morphological differences were corroborated and the subtidal group showed larger height/length ratios compared to the intertidal one. Morphological and genetic studies using five allozymic polymorphic loci (*Es-ii*, *Icd*, *Gpi*, *Pgm-1* and *Got-1*) in specimens of both sub-populations indicate that these forms are genetically identical, without evidence of structure between them. On other hand, morphology showed significant differences in shell shape, suggesting that morphological variation in this species results from environmentally induced phenotypic plasticity (Beaumont and Wei, 1991). Recent morphometric and molecular studies using ISSR-PCR markers in three localities along the Antarctic Peninsula confirmed the morphological differences between intertidal and subtidal forms. At the same time, the molecular markers also detected significant genetic differences between these forms indicating that they could correspond to different populations with low levels of gene flow (de Aranzamendi et al., 2008).

Despite the marked interest in the ecology, colonization, physiology, life history and evolution of Antarctic marine fauna, only a limited number of studies have examined genetic diversity patterns in these organisms. Molecular studies in euphausiids and nototheniidae fishes have showed that these groups exhibit high levels of genetic differences in the Southern Ocean (Bargelloni et al., 2000). Nucleotide sequence data from mitochondrial genes have revealed high levels of genetic structure and cryptic speciation in the crinoid *Promachocrinus kerguelenensis* (Wilson et al., 2007). A recent molecular study in nudibranch *Doris kerguelenensis* showed high levels of genetic diversity in this species, pointing toward recent explosive radiation (Wilson et al., 2009). In a study on the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*, Zane et al. (2006), identified high levels of polymorphism. In spite of the high levels of genetic diversity, the authors detected no association between localities and a weak population structure in the species.

In order to examine the evolutionary history of *Nacella concinna* in the Antarctic Peninsula, we reconstructed intraspecific phylogeographic relationships along the Antarctic Peninsula and analyzed patterns of haplotype frequencies in the species. For this, we used DNA sequences from the mitochondrial Cytochrome Oxidase Subunit I gene. Mitochondrial genetic markers, and especially COI, have been successfully used to obtain a first insight into populations demographic histories (Zane et al., 2006, Wilson et al., 2007, Mahon et al., 2008). The distribution of *N. concinna* in Antarctica restricted to ice-free zones, its narrow bathymetric range and its reproduction mode with free-living larvae makes this species a suitable model to study the effect of Pleistocene glaciations on the demography of Antarctic species. We included subtidal and intertidal specimens from two localities, so as to determine the degree of genetic divergence among these different morphologies. In these samples, we also conducted geometric morphometric analyses to determine the presence of morphological differences between these groups.

2. Material and Methods

2.1. Sampling, DNA extraction, PCR amplifications and alignment

Nacella concinna specimens from five different localities along the Antarctic Peninsula were collected by scuba diving during the years 2002 – 2008, namely, Elephant Island, Admiralty and Fildes Bays in King George Island, Covadonga and South Bays along the west Antarctic Peninsula (Table 1). We obtained sub- and intertidal specimens from two localities: Admiralty

Bay (AB) and Fildes Bay (FB). We also included one specimen from South Georgia Island and one specimen of *N. delesserti* (Philippi, 1849) from subantarctic Marion Island in the analyses (Fig. 1A and 1B). Animals were fixed in 95% ethanol and DNA was extracted from the mantle tissue, using the salting-out method described by Aljanabi and Martinez (1997). A partial fragment (663 bp) of the mtDNA gene *Cytochrome Oxidase Subunit I* (COI) was amplified using specific primers: COI-NacF (5'-CTG GGC TTG CTG GGA CTG GTT-3') and COI-NacR (5'-AAT AAA TGC TGA TAA AGA ATA -3'; González et al., in press). Amplifications were done in a 25µl reaction volume consisting of 17.5µl of double-distilled water, 200mM dNTP's, 0.5µl of each primer, 1U Taq (Promega), 2.5µl 10X buffer (50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH 8.0), 1.0µl 50mM MgCl₂, plus 50ng of DNA. Thermal cycling parameters included an initial denaturation step at 94°C for 3 min, followed by 40 cycles at 94°C for 1 min, 48°C for 45 sec, and 72°C for 1 min, which ended with a final 6 min extension at 72°C. Double stranded PCR products were purified using QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN). Purified products were sequenced in both directions using an Automatic Sequencer 3730xl (Macrogen). All *N. concinna* haplotypes sequences will be deposited in GenBank.

Sequences were edited using Proseq 2.91 (Filatov, 2002) and aligned with Clustal W (Thompson et al., 1992). After sequence editing, COI data were translated into amino acids to check for premature stop codons, which are evidence of sequencing errors, or the presence of nuclear pseudogenes. We performed a DNA saturation analysis following Roe and Sperling (2007) to examine how levels of saturation changes across the COI.

2.2. Population genetic structure

Levels of genetic polymorphism in *N. concinna* were determined by standard diversity indices, such as the number of haplotypes (k), segregating sites (S) and haplotype diversity (H), for each locality from the COI aligned sequences with DnaSP 5.00.07 (Librado and Rozas, 2009). We also estimated average pairwise sequence differences (D) and nucleotide diversity (π), according to Nei (1987).

Levels of genetic differentiation between localities of *N. concinna* were estimated by pairwise Φ_{ST} using Arlequin v.3.11 (Excoffier et al., 2005). This method simply counts the number of different alleles between two haplotypes using the following formulae: $\delta_{xy} = \sum \delta_{xy}(i)$, where δ_{xy} is the Kronecker function, equal to 1 if the alleles of the *i*-th locus are identical for both haplotypes,

and equal to 0 otherwise (Excoffier et al., 2005). This parameter is analogous to F_{ST} and is the correlation between alleles within individuals relative to the combine population (Holsinger and Weir, 2009).

First, we performed the comparisons between the inter- and subtidal forms from both Admiralty Bay (AB) and Fildes Bay (FB). The resulting comparisons are useful to determine whether these morphologies correspond to identical genetic units or if they should be considered in further analyses as separate sub-samples. Second, we performed pairwise Φ_{ST} comparisons among all sampled localities. In parallel to this analysis we determined the average number of nucleotide differences between localities using DnaSP.

We used the program SAMOVA v.1 (SAMOVA, Spatial Analysis of MOlecular Variance, Dupauiloup et al., 2002) to define the number and composition of geographically homogeneous, and maximally differentiated groups of populations. This method is based on a simulated annealing procedure that aims to maximize the proportion of total genetic variance due to differences among groups of populations and minimizing the variance portion among populations within groups. Differentiation indices Φ_{ST} (among populations), Φ_{SC} (among populations within groups) and Φ_{CT} (among groups) were tested through haplotype permutation (Excoffier et al., 2005).

2.3. Population historical inference

Genealogical relationships among *N. concinna* localities were determined using haplotype networks constructed with the median-joining algorithm in Network v.4.5.1.0 (Röhl, 2002). This method allows simple reconstruction of phylogenies, based on intraspecific molecular data like mitochondrial DNA variation, which often are complicated to analyze, especially when dealing with large sample sizes and with small genetic divergence among individuals (Bandelt et al., 1999; Posada and Crandall, 2001). To determine past demographic changes in *N. concinna*, Tajima's D and Fu's F_S tests were calculated using DnaSP to evaluate the assumption of selective neutrality of mtDNA sequences, as well as population mutation-drift equilibrium. Significant negative values for these tests are evidence of an excess of rare polymorphisms in a population, indicating either recent demographic expansion or positive selection. We constructed a mismatch distribution of the COI sequence data to compare it to the Poisson expectation for constant and varying population sizes (Slatkin and Hudson, 1991). The rapid population growth model

proposed by Rogers and Harpending (1992) rests on the estimation of three parameters: τ the date of growth/decline measured in units of mutational time ($\tau = 2\mu t$ where t = time in years and μ = mutation rate per sequence per year); initial theta $\theta_i = 2N_i\mu$ (before the population growth/decline); and final theta $\theta_f = 2N_f\mu$ (after population growth/decline). The demographic expansion parameters were estimated using the nonlinear least square approach, described by Schneider and Excoffier (1999) implemented in Arlequin. Finally, by using Fluctuate v.1.44 (Kuhner et al., 1998) we co-estimated the θ parameter and population growth rate g from *N. concinna* COI sequences through Metropolis-Hastings sampling. This method takes a set of aligned DNA sequences as input and uses them to make maximum likelihood estimates of θ and g . Theta is defined as 4 times the effective population size of the mutational rate in a diploid organism, or 2 times the effective population size of the mutational rate on a haploid at present time. Parameter g corresponds to the exponential growth or decline rate of the population. Positive values for this parameter indicate growth while negative ones imply decline (Kuhner et al., 1998).

2.4. Geometric Morphometrics Analyses

Shell shape variation between subtidal and intertidal *N. concinna* specimens from AB and FB was measured using outline analyses based on the Elliptic Fourier analysis (EFA). Outlines were drawn from digital photographs and corresponded to a two dimensional projection of the lateral shape of the shells. We included adult specimens (>4 cm) in all morphometric analyses. Elliptic Fourier transformations were done using the SHAPE software (Iwata and Ukai, 2002). Elliptic Fourier Descriptors (EFDs) can be used to delineate any kind of form and have been effectively applied to the evaluation of various biological shapes in plants and animals (Iwata and Ukai, 2002). This method is based on the separate Fourier decompositions of the incremental changes of the x- and y- coordinates, as a function of the cumulative length along the outline (Renaud and Michaux, 2003, 2007). The ChainCoder module extracted the contours of the objects from digital images and stores the relevant information as chain codes. Then, the module Chc2Nef provided the normalized EFD from the chain-coded contour, and coefficients of EFD were calculated by discrete Fourier transformation following Kuhl and Giardina (1982). These coefficients were subsequently normalized to be invariant with respect to size, rotation, and starting point, with a procedure based on the ellipse of the first harmonic. With the PrinComp module, we performed

the principal components analyses on the variance-covariance matrix of the EFDs coefficients. Principal components analysis is effective for summarizing the information regarding the variation contained in these coefficients (Rohlf and Archie, 1984), which were estimated using PAST v.1.77 (Hammer et al., 2001). Finally, Multivariate Analyses of Variance (MANOVA) were performed with PAST in order to evaluate the importance of between-group differentiation relative to within-group variation. A test for significance of morphology differences (Wilk's Lambda test) is also provided and Hotteling pairwise comparisons, Bonferroni corrected and uncorrected, were also performed using PAST to determine differences between morphologies and localities.

3. Results

3.1. Molecular genetics

The *Nacella concinna* COI sequence data set comprised 161 specimens and consisted of 663 nucleotide positions. A single specimen of *N. delesserti* from Marion Island was added to the dataset for comparisons. No indels or stop codons were detected, as expected for coding regions, and they also were not saturated in the third codon position. Only one amino acid substitution was detected, out of a possibility of 220, in the entire COI data set (translated using the invertebrate mitochondrial table; Kumar et al., 2004). A third position transversion (T to G) generated an amino acid change from Isoleucine to Methionine (both amino acids are type D with hydrophobic side chain). The Antarctic limpet exhibited low levels of genetic diversity along the Antarctic Peninsula; only 15 characters (2.2%) were variable and 8 of them (1.2%) were parsimonious informative. Sequences were adenine and thymine (A-T) rich (61.6%), compared to mean guanine and cytosine (G-C) content (39.4%). Genetic diversity indices, like the number of polymorphic sites, haplotype diversity, and nucleotide diversity (Table 1), were low but comparable to other molecular studies in Antarctic marine invertebrates (Diaz et al., 2008; Hunter and Halanych, 2008; Mahon et al., 2008; Thornhill et al., 2008).

Pairwise Φ_{ST} comparisons between inter- and subtidal *N. concinna* from the Admiralty and Fildes Bays (Table 2) showed no significant difference. From this point, for both Fildes and Admiralty, we considered inter and subtidal samples as similar and pooled these samples for further genetic analyses.

The new pairwise Φ_{ST} calculated among all five localities along South Shetland and the western Antarctic Peninsula showed no significant differences, except for the comparison between Elephant Island and Admiralty Bay ($P = 0.049$). In general, Admiralty Bay exhibited higher values for Φ_{ST} . General Φ_{ST} comparisons evidenced an absence of genetic structure among *N. concinna* along 800 km in the South Shetland region and Western Antarctic Peninsula.

The average number of nucleotide differences between populations was very low and ranged between 0.647 and 1.039. The highest value was recorded between the southernmost locality South Bay and Covadonga Bay in Continental Antarctic Peninsula. The average differences between the most distant localities (South Bay/Elephant Island) was 0.973, while the lowest value (0.581) was recorded between inter- and subtidal subsamples from Admiralty Bay (Table 2 and 3). SAMOVA analysis corroborated Φ_{ST} pairwise estimations and did not recover spatial structure in *N. concinna*. However, first partition separated Admiralty Bay from the rest of the localities, even though variances (Φ_{CT}) among groups explained a small amount of the variance (0.90%), while differences (Φ_{ST}) within the populations explained 99.11% of such.

The median-joining network resulted in a typical star-like haplotype network and a very short genealogy (Fig. 3). Network analysis recovered 18 different haplotypes, including the single specimens from South Georgia (*N. concinna*) and Marion Island (*N. delesserti*). The central haplotype (H3) is the most frequent (58%) and most broadly distributed one, occurring at all localities along the Antarctic Peninsula. As proposed by Posada and Crandall (2001), H3 should correspond to the most ancestral haplotype, whereas the most derived ones are linked to it with a maximum branch length of two mutational steps. Three haplotypes (H1, H2, and H5), each located at one mutational step away from H3, were present in most of the localities and exhibited intermediate frequency (6.2%-17.4%). The remaining 12 haplotypes occurred at low frequency, with no more than five representatives of each detected in the data set. The single haplotype from South Georgia stood two mutational steps away from H3 and only one step from H2 present in Covadonga, Fildes, Admiralty Bays and Elephant Island. In the case of *N. delesserti*, the unique haplotype from subantarctic Marion Island (H18) was separated by only two mutational steps from the dominant H3 haplotype in *N. concinna* (H3; Fig. 3).

As expected from a star-like network, Tajima's D and Fu's F_s neutrality tests were both significantly negative for the whole data set, indicating that this species may have experienced a recent demographic expansion event under a neutral model.

Distribution of pairwise differences among sequences was L-shaped (Fig. 4) due to the fact that the majority of the individuals shared the same haplotype (H3). The mismatch distribution did not differ significantly from the expected stepwise expansion model ($P_{SSD} = 0.31$). Considering the divergence rate estimated for *Cellana* (1.0% per million year, González-Wevar et al., unpublished data), the start of the expansion was estimated to be around 75,000 and 220,000 years before the present, for sudden and continuous exponential growth models, respectively (Fig. 5).

3.2. Morphometrics

Principal Components and Multivariate analyses of the morphology of the shells detected significant differences between subtidal and intertidal *N. concinna* morphotypes in both localities AB and FB. Principal Component analyses indicated that PC1 and PC2 together explained the 91.6% of the variance (Fig. 2). PC1 explained 85.6% of the variance and mainly consisted of height shell change, while PC2 (6.4%) corresponded to small changes in shell length (Fig. 2). Most of the variance (72%) in shell shape morphology was explained by bathymetric variation in *N. concinna* (subtidal and intertidal forms). Differences between the localities (AB and FB) explained only a 12% of the variance in the data set. Hotelling pairwise comparisons detected significant levels of differentiation between subtidal and intertidal shells in both localities (same Wilks lambda = 3.96×10^{-26} ; Table 4). In general, pairwise comparison results indicated that the levels of subtidal-intertidal differences were higher in several orders of magnitude than the subtidal-subtidal and intertidal-intertidal ones (Table 4).

4. Discussion

4.1. Absence of genetic differentiation between intertidal and subtidal forms of *Nacella concinna*, in spite of significant morphological differences.

Geometric morphometric analyses are sensitive to morphological variations and, according to some authors; this approach has proved to be sensitive enough to detect a similar pattern of population structure as molecular markers (D'Anatro and Lessa, 2006). Geometric morphometric analyses in *N. concinna* detected significant differences between subtidal and intertidal

morphologies from both Admiralty and Fildes Bays and are in total agreement with previous studies (Picken, 1980; Beaumont and Wei, 1991; Nolan, 1991; Brêthes et al., 1994; de Aranzamendi et al., 2008; Hoffman et al., 2010). At the same time, morphometric differences were also detected between AB/FB subtidal and between AB/FB intertidal morphotypes. Marked morphological differences between inter and subtidal specimens of *N. concinna* were also recorded in a recent study in the species in Adelaide Island, Antarctic Peninsula (Hoffman et al., 2010). These authors concluded that their morphological analyses not only revealed marked differences between these two morphotypes, but also a continuous cline in shell shape from the intertidal zone down to 25 m depth, suggesting that the distinction between morphotypes may be artificial.

Mitochondrial DNA genetic analyses between these morphotypes from AB and FB specimens of *N. concinna* did not detect statistical differences between these different morphological units. Our molecular results support the hypothesis that both subtidal and intertidal forms belong to a single *N. concinna* population unit. These results agree with Beaumont and Wei (1991), who concluded that these different morphotypes are genetically homogeneous and only represent environmentally induced phenotypic plasticity in the species. In general, shell shape, thickness and even coloration of patellogastropods is strongly affected by microhabitats and diet (Lindberg, 1998; Nakano and Osawa, 2005, 2007; Nakano and Spencer, 2007; Lindberg, 2008; de Aranzamendi et al., 2009). Phenotypic plasticity have been commonly described in several genera of the order such as *Patella* Linnaeus, 1758 (Côrte-Real et al., 1992; Pagarete et al., 2005), *Helcion* Montfort, 1810, and *Nacella* (Morriconi and Calvo, 1993; de Aranzamendi et al., 2008, 2009).

Taking into account the distribution of *N. concinna* in different bathymetric levels of the coast, it is possible that non-assortative mating between the morphotypes could be operating in this species. Nevertheless, the particular mode of reproduction of *N. concinna* through external fertilization, forming stacks of several individuals during the reproductive period, and its indirect development with free-living larvae (Picken, 1980) suggest that non-random mating is unlikely to occur in this species. In fact, reproductive studies indicate that intertidal morphotype migration to lower depths occur before fertilization and spawning, indicating the mixture of both morphologies at the same level of reproduction (Picken and Allan, 1983; Brêthes et al., 1994). How the segregation of this morphotypes is maintained in Antarctica is still unclear and further

reproductive mating choice experiments are needed. Moreover, low differences between intertidal and subtidal forms have been recently detected by de Aranzamendi et al. (2008) working with fast evolving markers (ISSR). The existence of such genetic differences suggest that *N. concinna* would not correspond to a panmictic population along a bathymetric gradient. However, a recent studies using AFLP in the species found no evidence for differentiation either between the two bathymetric morphotypes or by depths. Furthermore, a bayesian cluster analysis did not detect any evidence for cryptic genetic structure (Hoffman et al., 2010). These findings, along with the sequence homogeneity of mitochondrial markers support the idea that the Antarctic limpet would be just phenotypically plastic, although further studies are needed to estimate unequivocally if some degree of genetic difference do exist, besides the observed morphological variability. In any case, such differences would not challenge the existence of a single *Nacella* species in the shallow Antarctic realm.

4.2. Genetic homogeneity in *Nacella concinna* along the western Antarctic Peninsula

An interesting result of the present study is the extremely low level of genetic diversity of mtDNA COI in *N. concinna*. The Antarctic limpet represents a single genetic unit with very low levels of haplotypic and nucleotide diversity (Table 1) along the western coast of the Antarctic Peninsula. Only 16 haplotypes were found in 162 Antarctic limpets across ~800 km (Fig. 3). Levels of genetic diversity observed in *N. concinna* are low compared to the ones observed in *Nacella* species from the Magellan Province (de Aranzamendi et al., 2009; González-Wevar et al., in press). For 139 individuals of *N. magellanica*, belonging to seven localities along the Magellan Strait we found 49 haplotypes (unpublished data). The most common haplotype in the species (H3) was shared by more than the 58% of the individuals and distributed in all the analyzed localities along the Antarctic Peninsula and South Shetland Islands. Mitochondrial sequence diversity in *N. concinna* failed to recognize any statistically significant genetic structure in the species among the five localities examined in the Antarctic Peninsula. The only locality exhibiting a small degree of differentiation is Admiralty Bay with pairwise Φ_{ST} values one order of magnitude higher than what was observed by comparing between other localities (Table 3). Admiralty Bay is a well-sheltered bay with a maximum depth of 600m and a surface of about 120 km² (Jazdzweski et al., 1986). In fact, Arnaud et al. (1998) concluded that communities of the

South Shetlands appear to have distinctive features, as compared to those of continental Antarctica. The difference in pairwise comparisons between this locality and the rest of the studied sites may be a result of local oceanographic characteristics, or due to the comparatively sheltered situation of Admiralty Bay as a whole.

In theory, large population sizes should maintain high levels of genetic variability because genetic drift is low and the rate of mutation accumulation is high. Molecular diversity indices estimated in the Antarctic limpet ($\theta_k = 4.9$; $\theta_S = 1.34$; $\theta_H = 3.15$; $\theta_\pi = 0.88$), would be generated by small effective sizes (N_e) between 66,500 and 376,500 individuals. This is by far smaller than the expected population sizes found for this species, considering the high densities reported in several studies (Hedgpeth, 1969; Picken, 1980; Brêthes et al., 1994). In addition to low haplotype diversity, *N. concinna* exhibit a “star-like” genealogy, characterized by very short branches (Fig. 2) and a marked L-shaped distribution of pairwise differences (Fig. 3). Overall significant negative Tajima’s D and Fu’s F_S indices are also evidence of an excess of low frequency haplotypes relative to neutral mutation drift equilibrium. All of these results strongly support the existence of a recent demographic expansion of this species. Under this scenario, our time estimations for this historical process range between 75,000 and 220,000 years ago. These time ranges do not fit with our hypothesis that *N. concinna* were able to (re-)expand during the last Glacial-interglacial transition, after the Last Glacial Maximum (LGM; ~20,000 years). However, a time dependency of molecular evolution rates has been recently described (Ho et al., 2005). As suggested by these authors, molecular studies at population levels have estimated much higher mutation rates than the substitution rates inferred from phylogenetic (species-level) analyses. In three cases (mtDNA of avian and primate taxa) they showed that short term (1-2 Myr) mutation rates could be ten folds higher than long-term substitution rates (Ho et al., 2005, 2007). Here, we used a substitution rate estimated specifically for the limpet genus *Cellana* (data not published), and our estimations may be biased due to the time dependency of molecular evolution rates. Under this perspective, and incorporating a simple ten-fold correction, our time estimations (7,500 to 22,000 years ago), would fit to the last Glacial-interglacial transition period.

Low levels of genetic diversity detected in *N. concinna* could reflect a dramatic effect of glacial periods on population size and even on the persistence of the species along the Antarctic Peninsula. If we consider that *N. concinna* has a narrow bathymetric range (0-110 m), the extension of an ice sheet over the main part of the Antarctic continental shelf during glacial

periods should have drastically reduced its habitat to isolated refugia in ice-free areas (Poulin et al., 2002; Thatje et al., 2005). Another possibility could be that *N. concinna* migrated northward during glaciations and returned to a southern distribution during interglacial periods. This is suggested by genetic closeness among *Nacella* samples from the Antarctic Peninsula, South Georgia and Marion Island. In this case, bottleneck and further founder effects may be plausible explanations for low diversity and genetic homogeneity detected in the Antarctic limpet. Our results contrasts with other studies on Antarctic marine benthic invertebrates that shows high levels of genetic diversity (Mahon et al. 2008; Thornhill et al. 2008; Krabbe et al. 2009; Wilson et al. 2009). However, most of these species exhibit a large bathymetric range that could prevent such drastic demographic impact during the recurrent Pleistocene glacial and interglacial cycles (Brey et al., 1996). Within this scenario, we could expect that the degree of genetic diversity in Antarctic benthic invertebrates would be positively related to their bathymetric range.

4.3. Genetic cohesiveness between subantarctic *N. delesserti* and antarctic *N. concinna*

The low levels of genetic differences between *N. delesserti* and *N. concinna* do not agree with other phylogenetic studies in the genus. Genetic similarities detected between these different taxonomic units are very low and within the range of intraspecific variation of other nacellid species (Goldstien et al., 2006; Bird et al., 2007). Recently, González-Wevar et al. (in press) have analyzed different *Nacella* species from Antarctica, South America and Kerguelen Province and have recovered deep molecular divergences among Subantarctic and Antarctic species without evidence of recent long-distance gene flow events. For example, Antarctic *N. concinna* and the Magellanic species of the genus exhibited much higher levels of genetic divergence (8.5%) than that observed between the former and Marion Island's *N. delesserti* (0.32%). At the same time, the species *N. macquariensis* and *N. kerguelenensis*, collected from the Subantarctic Heard Island (Kerguelen Province), also showed similar levels of genetic divergence (7.70%) between them (González-Wevar, in press). As mentioned above, *N. delesserti* is a Subantarctic endemic species from Marion Island. Interestingly, the origin of this island, located ~5,500 kilometers away from the Antarctic Peninsula, is very recent (450,000 years; Chown et al., 2008). Therefore, the genetic proximity between *N. delesserti* and *N. concinna* could be explained through north-eastward

long-distance dispersal events during the late Pleistocene, through the Circumpolar Antarctic Current. According to Beaumont and Wei (1991), *N. concinna* could be transported by drifting masses of algae, which supports the hypothesis that poses long-distance dispersion between Antarctica and Marion Island hypothesis. Phenotypic plasticity, as described in this and other studies, on *N. concinna* and other *Nacella* species from the Magellan Strait (Powell, 1973; Morriconi and Calvo, 1993; Valdovinos and R uth, 2005; de Arazanmendi et al., 2008, 2009; Hoffman, 2010; Gonz alez-Wevar, in press) could have enhanced morphological differentiation of *N. delesserti* in Marion Island, and this could explain the described differences between this species and the Antarctic limpet (Powell, 1973). Because of the Late Pleistocene origin of Marion Island, COI sequences as well as other mitochondrial and nuclear DNA genes (data not published), could not provide adequate resolutions to distinguish whether these two morphotypes correspond to different species. More individuals and localities of Marion Island's *N. delesserti* as well as faster evolving molecular markers, are needed in order to offer a better explanation of this last finding.

Acknowledgments

We are grateful to the following people and museums for help in field work, data analyses, and for contributing specimens to this study: Tomoyuki Nakano, Hamish Spencer, C esar C ardenas, Christian Iba nez, C eridwen Fraser, Museo Nacional de Historia Natural Chile, Santiago, Chile, Australian Museum, Sydney, National Museum of Nature and Science, Tokyo. This study was supported by the Grants INACH B_01_07, Conicyt Ph.D. and thesis grants nos D-21060218 and 24090009 and IDEAWILD to C.G., and by the projects P05-002 ICM and PFB 023 (*Institute of Ecology and Biodiversity*, Universidad de Chile) and INACH 02-02, 13-05 and ECOS C06B02 to E.P.. Thank is also due to international programs CAML, EBA-SCAR and PROSUL-Brazil for encouraging and supporting Antarctic research in evolution. This is CAML contribution #XX.

References

- 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.

- Arnaud, P.M., López, C.M., Olaso, I., Ramil, F., Ramos-Esplá, A.A., Ramos, A., 1998. Semi-quantitative study of macrobenthic fauna in the region of the South Shetland Islands and the Antarctic Peninsula. *Polar Biology* 19, 160-166.
- Arntz, W.E., Ríos, C., 1999. Magellan-Antarctic: ecosystems that drifted apart. *Scientia Marina* 63(S1), 1-518.
- Bargelloni, L., Zane, L., Derome, N., Lecointre, G., Patarnello, T., 2000. Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of genetic variation. *Antarctic Science* 12, 259-268.
- Bandelt, H-J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16, 37-48.
- Beaumont, A.R., Wei, J.H.C., 1991. Morphological and genetic variation in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908). *Journal of Molluscan Studies* 57, 443-450.
- Bird, C.E., Holland, B.S., Bowen, B.W., Toonen, R.J., 2007. Contrasting phylogeography in three endemic Hawaiian limpets (*Cellana* spp.) with similar life histories. *Molecular Ecology* 16, 3173-3186.
- Bowden, D.A., 2005. Seasonality of recruitment in Antarctic sessile marine benthos. *Marine Ecology Progress Series* 297, 101-118.
- Brandt, A., 2005. Evolution of Antarctic biodiversity in the context of the past: the importance of the Southern Ocean deep sea. *Antarctic Science* 17, 509-521.
- Brandt, A., De Broyer, C., De Mesel, J., Ellingsen, E., Gooday, A.J., Hilbig, B., Linse, K., Tyler, P.A., 2007. The biodiversity of the deep Southern Ocean benthos. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Science* 362: 39-66.
- Brêthes, J.-C., Ferreyra, G., de la Vega, S., 1994. Distribution, growth and reproduction of the limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel 1908) in relation to potential food availability, in Esperanza Bay (Antarctic Peninsula). *Polar Biology*. 14, 161-170.
- Brey, T., Dahm, C., Gorny, M., Klage, M., Stiller, M., Arntz, W.E., 1996. Do Antarctic marine benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarctic Science* 8, 3-6.
- Chown, S.L., Lee, J.E., Shaw, J.D., 2008. Conservation of Southern Ocean Islands: invertebrates as exemplars. *Journal of Insect Conservation* 12, 277-291.

- Clarke, A., Crame, J., 1989. The origin of the Southern Ocean marine fauna. in: Crame, J.A. (Ed). Origins and evolution of the Antarctic biota. Geological Society special publication. 47, 253-268.
- Clarke, A., Johnston, N.M., 2003. Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography and Marine Biology: An Annual Review* 41, 47-114.
- Clarke, A., Aronson, R.B., Crame, J.A., Gili, J-M., Blake, D.B., 2004. Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern Ocean continental shelf. *Antarctic Science* 16, 559-568.
- Clarke, A., Barnes, D.K.A., Hodgson, D.A., 2005. How isolated is Antarctica? *Trends in Ecology & Evolution* 20, 1-3.
- Convey, P., Gibson, J.A.E., Hillenbrand, C-D., Hodgson, D.A., Pugh, P.I.A., Smellie, J.L., Stevens, M.I., 2008. Antarctic terrestrial life – challenging the history of the frozen continent. *Biological Review* 83, 103-117.
- Côrte-Real, H.B.S.M., Hawkins, S.J., Thorpe, J.P., 1992. Genetic confirmation that intertidal and subtidal morphs of *Patella ulyssiponensis aspera* Rodings (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) are conspecific. *Arquipélago*. 10,55-66.
- Crame, J.A., 1999. An evolutionary perspective on marine faunal connection between southernmost South America and Antarctica. *Scientia Marina* 63, 1-14.
- D'Anatro, A.D., Lessa, E.P., 2006. Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis*. *Mammalian Biology* 71, 288-298.
- Davenport, J. 1988. Tenacity of the Antarctic limpet *Nacella concinna*. *Journal of Molluscan Studies* 54, 355–356
- de Aranzamendi M.C., Sahade, R., Tatián M., Chiappero, B., 2008. Genetic differentiation between morphotypes in the Antarctic limpet *Nacella concinna* as revealed by inter-simple sequence repeat markers. *Marine Biology* 154, 875-885
- de Aranzamendi, M.C., Gardenal, C., Martin, J.P., Bastidas, R., 2009. Limpets of the genus *Nacella* (Patellologatropoda) from the Southwestern Atlantic: species identification based on molecular data. *Journal of Molluscan Studies* 75, 241-251.
- Díaz, A.D., 2008. Origen y evolución de la fauna marina bentónica antártica: diversidad genética y divergencia molecular entre especies congénicas de Echinoidea de Antártica y Sudamérica. Tesis de Magister. Universidad de Chile, Santiago, Chile. 65 pp, unpublished.

- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L., 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11, 2571-2581.
- 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.
- Filatov, D.A., 2002. PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2, 621-624.
- Goldstien, S.J., Schiel, D.R., Gemmel, N.J., 2006. Comparative phylogeography of coastal limpet across a marine disjunction in New Zealand. *Molecular Ecology* 15, 3259-3268.
- González-Wevar C.A., Nakano, T., Cañete, J.I., Poulin, E., in press. Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Mol. Phylogenet. Evol.* (2010), doi 10.1016/j.ympev.2010.02.001.
- Gray, J.S., 2001. Antarctic marine benthic biodiversity in a world-wide latitudinal context. *Polar Biology* 24, 633-641.
- Gutt, J., Sirenko, B., Smirnov, I.S., Arntz, W.E., 2004. How many macrozoobenthic species might inhabit the Antarctic shelf? *Antarctic Science* 16, 11-16.
- Hammer Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D., 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica* 1:1-9.
- Hedgpeth, J.W., 1969. Preliminary observations of life between tidemarks at Palmer Station, 64°45'S. *Antarctic Journal of the United States* 4, 106-107.
- Ho, S.Y.W., Phillips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J., 2005. Time dependency of molecular rate estimated and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular Biology and Evolution* 22, 1561-1568.
- Ho, S.Y.W., Shapiro, B., Phyllips, M.J., Cooper, A., Drummond, A.J., 2007. Evidence for time dependency of Molecular Rate Estimates. *Systematic Biology* 56: 517-522.
- Hoffman, J.L., Peck, L.S., Hillyard, G., Zieritz, A., Clark, M.S. 2010. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. *Marine Biology* 157, 10.1007/s00227-009-1360-5.
- Holsinger, K.E., Weir, B.S., 2009. Genetics in geographically structured populations: defining, estimating and interpreting F_{ST} . *Nature Reviews Genetics* 10, 639-650.

- Hunter, R.L., Halanych, K.M., 2008. Evaluating connectivity in the brooding brittle star *Astrotoma agassizzi* across the Drake Passage in the Southern Ocean. *Journal of Heredity* 99, 137-148.
- Iwata, H., Ukai, Y., 2002. SHAPE: A computer program package for quantitative evaluation of biological shapes based on elliptic Fourier descriptors. *Journal of Heredity* 93, 384-385.
- Jazdzweski, K., Jurasz, W., Presler, E., Sicinski, J., 1986. Abundance and biomass estimates of the benthic fauna in Admiralty Bay, King George Island, South Shetland Islands. *Polar Biology* 6, 5-16.
- Krabbe, K., Leese, F., Mayer, C., Tollrian, R., Held, C., 2009. Cryptic mitochondrial lineages in the widespread pycnogonid *Colossendeis megalonyx* Hoek, 1881 from Antarctic and Subantarctic waters. *Polar Biology* 33, 281-292.
- Kuhl, F.P. Giardina, C.R., 1982. Elliptic Fourier features of a closed contour. *Comparative Graphic Image Process.* 18, 236-258.
- Kuhner, M.K., Yamato, J., Felsenstein, J., 1998. Maximum Likelihood estimation of population growth rates based on the Coalescent. *Genetics* 149, 429-434.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5, 150-163.
- Librado, P., Rozas, J., 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lindberg, D.R., 1998. The Patellogastropoda. *Malacological Reviews Supplement* 4, 35-63.
- Lindberg, D.R., 2008. The Patellogastropoda. In Ponder, W.F., Lindberg, D.R. (Eds.). *Phylogeny and Evolution of the Mollusca*. University of California Press. pp. 271-296.
- Mahon, A.R., Arango, C.P., Halanych, K.M., 2008. Genetic diversity of *Nymphon* (Arthropoda: Pignogonida: Nymphonidae) along the Antarctic Peninsula with focus on *Nymphon australe* Hodgson 1902. *Marine Biology* 155, 315-323.
- Morriconi, E., Calvo, J., 1993. Influencia ambiental sobre el crecimiento alométrico de la valva en *Nacella (Patinigera) deaurata* (Gmelin, 1791) del Canal Beagle, Argentina. *Malacología*. 35, 135-140.
- Nakano, T., Ozawa, T., 2005. Systematic revision of *Patelloida pygmaea* (Dunker, 1860) (Gastropoda: Lottiidae), with a description of a new species. *Journal of Molluscan Studies* 71, 357-370.

- Nakano, T., Ozawa, T., 2007. Worldwide phylogeography of limpets of the order Patellogastropoda: molecular, morphological and palaeontological evidence. *Journal of Molluscan Studies* 73, 79–99.
- Nakano, T., Spencer, H.G., 2007. Simultaneous polyphenism and cryptic species in an intertidal limpet from New Zealand. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 45, 470–479.
- Nei, M., 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- Nolan, C.P. 1991. Size, shape and shell morphology in the Antarctic limpet *Nacella concinna* at Signy Island, South Orkney Islands. *Journal of Molluscan Studies* 57, 225–238
- Pagarete, A.J.P, Costa, M.J., Brito, C., 2005. Genetic conspecificity in two habitat morphs of the limpet *Patella candei gomesii* Drouët (Mollusca: Gastropoda: Patellidae) Reinforces Limpet Morphological Plasticity. *JYI*. Volume 12, Issue 5 on 02 May 2005
- Peck, L., Veal, R., 2001. Feeding, metabolism and growth in the Antarctic limpet, *Nacella concinna* (Strebel 1908). *Marine Biology* 138, 553–560.
- Peck, L., Clark, M.S., Clarke, A., Cockell, C.S., Convey, P., Detrich III H.W., Fraser, K.P.P., Johnston, I.A., Methe, B.A., Murray, A.E., Römisch, K., Rogers, A.D., 2005. Genomics: applications to Antarctic ecosystems. *Polar Biology* 28, 251–265.
- Picken, G.B., 1980. The distribution, growth, and reproduction of the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 42, 71–85.
- Picken, G.B., Allan, D., 1983. Unique spawning behaviour by the Antarctic limpet *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 71, 283–287.
- Posada, D., Crandall, K.A., 2001. Intraspecific phylogenetics: trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 37–45.
- Poulin, E., Palma, A., Féral, J-P., 2002. Evolutionary versus ecological success in Antarctic benthic invertebrates. *Trends in Ecology & Evolution* 17, 218–222
- Powell, A.W.R., 1973. The Patellid limpets of the World (Patellidae), in: Abbot R.T (Ed.), *Indo-Pacific-Mollusca*. Vol. 3. The Department of Mollusks, Greenville, pp. 75–206.
- Renaud, S., Michaux J.R., 2003. Adaptive latitudinal trends in the mandible shape of *Apodemus* wood mice. *Journal of Biogeography* 30, 1617–1628.

- Renaud, S., Michaux, J.R., 2007. Mandibles and molars of the wood mouse *Apodemus sylvaticus* (L): integrated latitudinal pattern and mosaic insular evolution. *Journal of Biogeography* 34, 339-355.
- Roe, A.D., Sperling, F.A.H., 2007. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 44, 325-345.
- Rohlf, F.J., Archie, J.W., 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (*Ritiera culicidae*). *Systematic Zoology* 33, 302-317.
- Rogers, A.R., 2007. Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Science* 362, 2191-2214.
- Rogers, A.R., Harpending, H.C., 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology* 9, 552-569.
- Röhl, A., 2002. Network, netw3111.exe downloaded from the web site: www.fluxus-engineering.com.
- Rohlf, F.J. and Archie, J.W., 1984. A comparison of Fourier methods for the description of wing shape in mosquitoes (*Ritiera culicidae*). *Systematic Zoology* 33, 302-317.
- 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.
- Slatkin, M., Hudson, R.R., 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129, 555-562.
- Stanwell-Smith, D., Clarke A., 1998. The timing of reproduction in the Antarctic limpet *Nacella concinna* (Strebél, 1908) (Patellidae) at Signy Island, in relation to environmental variables. *Journal of Molluscan Studies* 64, 123-127
- Strugnell, J.M., Linse, K., 2005. Evolution of the Antarctic marine fauna: what can DNA and fossil tell us?, in A.K. Cooper and C.R. Raymond et al. (Eds), *Antarctica: A keystone in a Changing World – Online Proceedings of the 10th ISAES*, USGS Open-File Report 2007-1047, Extended Abstracts 079, 4 pp.
- Thatje, S., Hillenbrand, C-D., Larter, R., 2005. On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends in Ecology & Evolution* 20, 534-540.

- Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T.J., 1992. Clustal W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties, and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22, 4673-4680.
- Thornhill, D.J.; Mahon, A.R., Norenburg, J.L., Halanych, K.M., 2008. Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parbolasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Molecular Ecology* 17, 5104-5117.
- Valdovinos, C., R uth, M., 2005. Nacellidae limpets of the southern end of South America: taxonomy and distribution. *Revista Chilena de Historia Natural* 78, 497-517.
- Walker, A.J.M., 1972. Introduction to the ecology of the Antarctic limpet *Patinigera polaris* (Hombron and Jaquinot) at Signy island, South Orkney island. *British Antarctic Survey Bulletin* 28, 49-69.
- Wilson, N.G., Hunter, R.L., Lockhart, S.J., Halanych, K.M., 2007. Multiple lineages and absence of panmixia in the "circumpolar" crinoid *Promachocrinus kerguelenensis* from the Atlantic sector of Antarctica. *Marine Biology* 152, 895-904.
- Wilson, N.G., Schr old, M., Halanych, K.M., 2009. Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelenensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Molecular Ecology* 18, 965-984.
- Zane, L., Marcato, S., Bargelloni, L., Bortolotto, E., Papetti, C., Simonato, M., Varotto, V., Patarnello, T., 2006. Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleurogramma antarcticum*. *Molecular Ecology* 15, 4499-4511.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, P., Thomas, E., Billups, K., 2001. Trends, rhythms, and aberrations on global climate 65 Ma to present. *Science* 292, 686-693.

Fig. 1. A) *Nacella concinna* distribution range in the Southern Ocean. B) Sampling localities of *N. concinna* in the western Antarctic Peninsula.

Fig. 2. Multivariate Principal Components Analysis of the shell shape variation of *N. concinna* in Admiralty and Fildes Bay. Where: Orange = Fildes Bay intertidal; Green = Fildes Bay subtidal; Red = Admiralty Bay intertidal; Blue = Admiralty Bay subtidal.

Fig. 3. Haplotype network of 162 *Nacella concinna* and one *N. delesserti* mtDNA sequences. Each haplotype is represented by a colored circle which size is proportional to its frequency in the whole sampling effort. ● correspond to a specific mutation.

Fig. 4. Pairwise difference distribution for the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) in *Nacella concinna* along the western Antarctic Peninsula.

Fig. 5. Demographic expansion time estimations in *Nacella concinna* based on instantaneous (A) and exponential (B) growth models. Estimations do not incorporate "time dependency of molecular rate" correction.

Table 1. Genetic diversity indices and neutrality test in *Nacella concinna*.

Locality	<i>N</i>	<i>k</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	Π	π	Tajima	Fu's F_S
							's D	
South Bay	31	5	0.688	5	0.888	0.00149	-0.576	-0.64
Elephant Island	29	8	0.729	7	0.985	0.00148	-1.34	-4.14*
Admiralty Bay	33	7	0.471	6	0.981	0.00089	-1.68	-4.68**
Fildes Bay	38	6	0.565	6	0.587	0.00104	-1.38	-2.48
Covadonga Bay	29	9	0.741	7	0.704	0.00163	-1.17	-5.08**
COI Total	160	16	0.630	18	1.079	0.00128	-1.77*	-12.38***

n: number of sampled specimens; *k*: number of haplotypes detected; *S*: polymorphic sites; *H*: haplotype diversity; Π : average number of nucleotide difference; π : nucleotide diversity * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

Accepted manuscript

Table 2. Pairwise Φ_{ST} values (below diagonal) and average number of nucleotide differences (above diagonal) in *Nacella concina* along western Antarctic Peninsula.

	ABs	ABi	Fbi	FBs
Admiralty Bay subtidal (Abs)	****	0.581	0.645	0.563
Admiralty Bay intertidal (Abi)	-0.04175	****	0.749	0.632
Fildes Bay intertidal (Fbi)	-0.02655	-0.02453	****	0.703
Fildes Bay subtidal (FBs)	0.02636	-0.00607	-0.00189	****

1023 permutations, no significant values ($P < 0.05$) were detected.

Table 3 Pairwise Φ_{ST} values (below diagonal) and average number of nucleotide differences between localities (above diagonal) in *Nacella concina*.

	SB	EI	AB	FB	CB
South Bay (SB)	****	0.973	0.795	0.837	1.039
Elephant island (EI)	-0.0208	****	0.796	0.827	1.026
Admiralty Bay (AB)	0.0296	0.0389	****	0.647	0.843
Fildes Bay (FB)	0.0030	0.0027	0.0236	****	0.879
Covadonga Bay (CB)	-0.0166	-0.0186	0.0355	0.0014	****

1023 permutations, significant values ($P < 0.05$) are in bold.

Table 4 P-values of hotelling pairwise comparisons between intertidal and subtidal morphotypes of Admiralty and Fildes Bays, Bonferroni corrected (above diagonal) and uncorrected (below diagonal).

	Abi	ABs	FBi	FBs
Admiralty Bay intertidal (ABs)	****	3.99×10^{-12}	4.73×10^{-5}	2.41×10^{-15}
Almirantazgo Bay subtidal (ABi)	2.40×10^{-11}	****	5.54×10^{-10}	0.00252
Fildes Bay intertidal (FBi)	0.000284	3.32×10^{-9}	****	2.78×10^{-14}
Fildes Bay subtidal (FBs)	1.45×10^{-14}	0.01512	1.66×10^{-13}	****

Accepted manuscript

Fig. 1. A) *Nacella concinna* distribution range in the Southern Ocean. B) Sampling localities of *N. concinna* in the western Antarctic Peninsula.

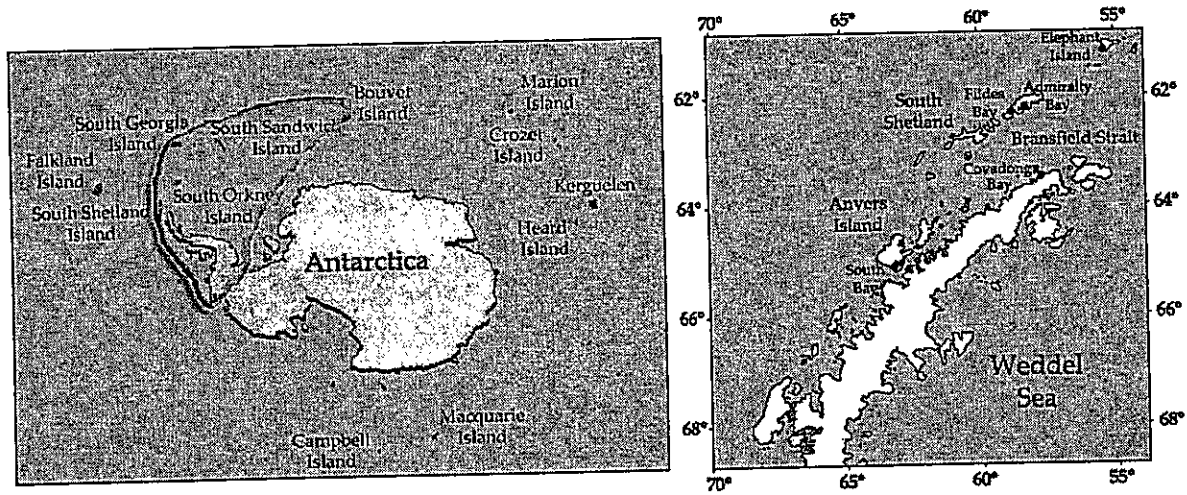


Fig. 2. Multivariate Principal Components Analysis of the shell shape variation of *N. concinna* in Admiralty and Fildes Bay. Where: Orange = Fildes Bay intertidal; Green = Fildes Bay subtidal; Red = Admiralty Bay intertidal; Blue = Admiralty Bay subtidal.

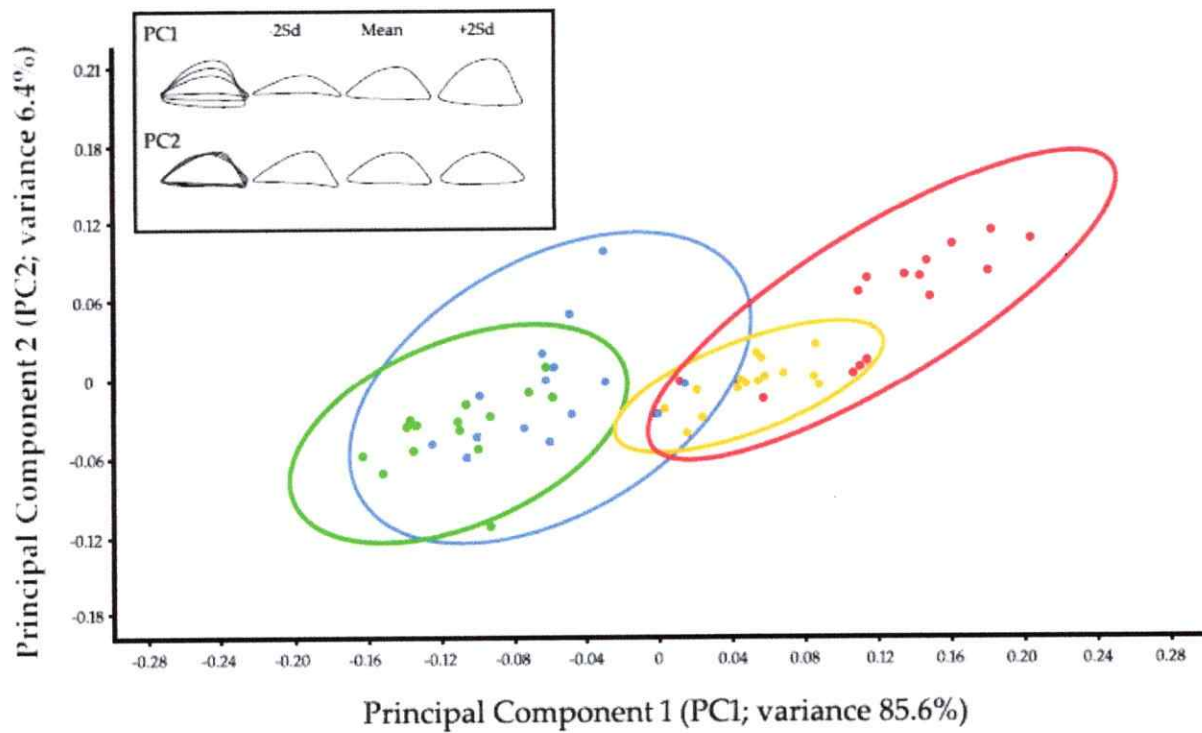


Fig. 3. Haplotype network of 162 *Nacella concinna* and one *N. delesserti* mtDNA sequences. Each haplotype is represented by a colored circle which size is proportional to its frequency in the whole sample. ● correspond to a specific mutation.

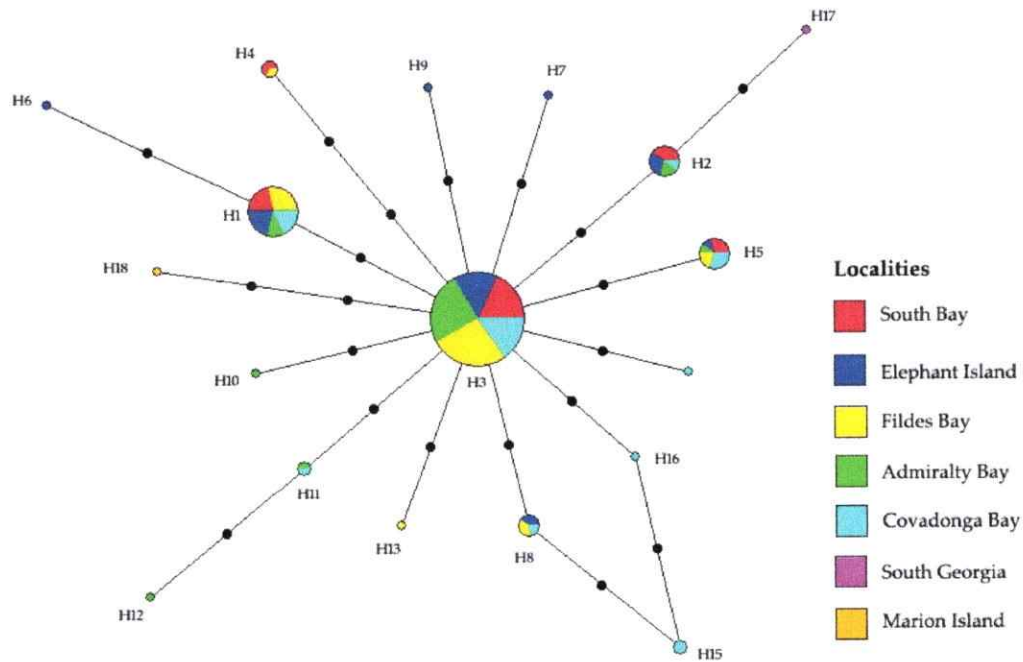


Fig. 4. Pairwise difference distribution for the Cytochrome Oxidase Subunit I (COI) in *Nacella concinna* along the western Antarctic Peninsula.

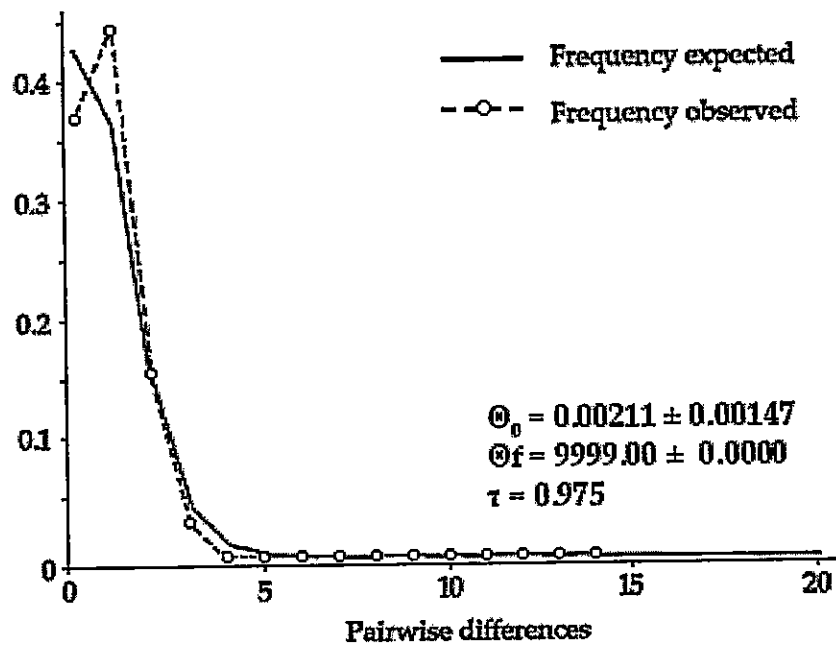


Fig. 5. Demographic expansion time estimations in *Nacella concinna* based on instantaneous (A) and exponential (B) growth models. Estimations do not incorporate “time dependency of molecular rate” correction.

