

UCH-FC
DOC-EBE
D 542
C.1



FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

**RELACIONES EVOLUTIVAS Y PROCESOS DE
DIVERSIFICACIÓN DEL GÉNERO *STERECHINUS*
(ECHINODERMATA: ECHINOIDA) EN LAS ZONAS
PROFUNDAS Y SOMERAS DEL OCÉANO AUSTRAL.**

Tesis entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al grado académico de:

Doctor en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile.

Por

ANGIE DOMINIQUE DÍAZ LORCA

Santiago, Chile

Octubre 2012

Director de tesis:

Dr. Elie Poulin

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE**

**INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE DOCTORADO**

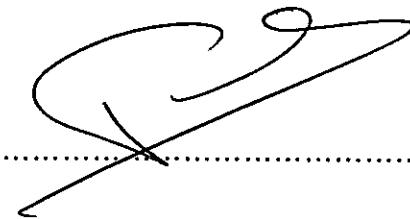
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Doctorado presentada por la candidata

ANGIE DOMINIQUE DÍAZ LORCA

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 Privada de Tesis rendido el día 24 de Septiembre de 2012.

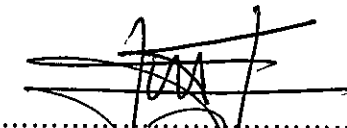
Director de Tesis

Dr. Elie Poulin

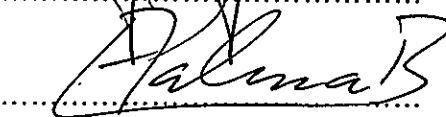


Comisión de Evaluación de la Tesis

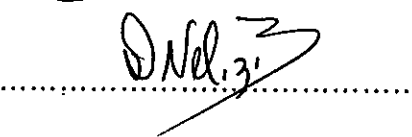
Dr. Marco Méndez



Dr. Álvaro Palma



Dr. David Véliz





Al mar al sur de los 60° de Latitud Sur.

RESEÑA



Angie Dominique Díaz Lorca
(1 de Febrero de 1979)

Bióloga Marina y licenciada en Ciencias, mención en Biología Marina, de la Universidad Católica de la Santísima Concepción (1998). Magister en Ciencias Biológicas, mención Ecología y Biología Evolutiva, de la Universidad de Chile (2006). Durante su formación de pregrado reconoce su interés por el área académica y desde su Magister centra su interés en Antártica. Desde entonces ha desarrollado una investigación que ha implicado bucear en las frías aguas del continente Antártico y formar parte de un equipo de colaboración internacional. Dentro de la investigación que ha desarrollado se destaca su interés por la historia evolutiva de la fauna marina Antártica y de cómo han influenciado procesos históricos, geológicos y climatológicos, en dicha historia.

AGRADECIMIENTOS



Agradezco a todas las personas que colaboraron de una u otra manera en el desarrollo y término de este trabajo. Desde el comienzo de esta tesis, y de mi formación académica, mi tutor y amigo Elie Poulin ha sido una fuente inagotable de conocimientos, motivación y agudeza mental para afinar detalles e ideas. Al final de este proceso la confianza, amistad y apoyo han sido invaluable y muchas gracias.

Agradezco a los miembros de mi Comisión Evaluadora de Tesis, a los Drs. Álvaro Palma, Marco Méndez y David Véliz, por su gran colaboración y apoyo. Sus correcciones, observaciones y comentarios sin duda ayudaron a mejorar y enriquecer este trabajo.

A todos los investigadores que ayudaron a la realización de esta tesis mediante los aportes de material biológico e intercambio de ideas. Al Dr. Jean-Pierre Ferál (Centre d'Océanologie de Marseille, CNRS UMR7628) y los Drs. Bruno David y el Dr. Thomas Saucède de la Université de Dijon (Francia), quienes aportaron muestras de la Isla Kerguelen, base Antártica de Tierra Adelia (región Este del continente), Arco de Escocia, Mar de Bellinghausen y Mar de Weddell, gracias a la ayuda de sus proyectos ANR AntFlock y los programas 195 (Kerguelen) y 345 (Terre Adélie) del Instituto Paul Emile Victor (IPEV). Agradezco también la colaboración de la Dra. Claudia Bremec del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP Argentina), quien colaboró con las muestras provenientes de Argentina.

Al apoyo logístico y financiero de la beca de apoyo de tesis doctoral del Instituto Antártico Chileno (INACH) INACH B05-09, beca CONICYT AT 24110013 y beca de pasantía MECESUP. Los proyectos INACH 02-02 y 13-05, ECOS/CONICYT C06-B02 y al Instituto de Ecología y Biodiversidad proyecto ICM cod P05-002.

A mis amigos y compañeros de mi querido Laboratorio de Ecología Molecular (LEM), gracias por la buena convivencia, risas y conversaciones varias. A Ma. Cecilia, Jimena, Christian y Claudio muchas gracias por la siempre buena disposición a acoger mis dudas/consultas. A Karin, Constanza, Claudia, Andrea, Ma. José y Fabiola gracias por

el cariño y preocupación que me han entregado, su energía. Agradezco las eternas conversaciones, arreglos y desarreglos de mundo.

A Pablo Guerrero por su constante cariño y apoyo, tu energía y ayuda para clarificar ideas fueron muy importantes para dar fin a este trabajo. A mi familia, en especial a mi madre, mi Chabelita, quizás sin saberlo fuiste un motor vital en este proceso, así como mis sobrinos agregaron risas y motivación.



ÍNDICE DE CONTENIDOS



RESUMEN
ABSTRACT

CAPITULO I: **Introducción General**

I.1 Antecedentes.....	1
II.2 Hipótesis y Objetivos.....	7

CAPITULO II: **Filogenia Molecular y Tiempos de Divergencia en Erizos Regulares del género *Sterechinus* (Echinidae, Echinoida).**

II.1 Introducción.....	9
II.2 Materiales y Métodos.....	13
II.3 Resultados.....	18
II.4 Discusión.....	25

CAPITULO III: **Dispersión a gran escala en el Océano Austral: Anillos de conectividad en las regiones Antártica y Subantártica y vías evolutivas entre ambas regiones a través de las grandes profundidades.**

III.1.1 Introducción.....	31
III.2 Materiales y Métodos.....	38
III.3 Resultados.....	44
III.4 Discusión.....	59

Capitulo IV: **Discusión General**

IV.1: Relaciones Filogenéticas y probable escenario evolutivo.....	65
IV.2: Anillos de Conectividad.....	69
IV.3: Implicancias taxoomicas.....	70
IV.4: Comentarios Finales.....	72

REFERENCIAS.....	74
------------------	----

LISTA DE TABLAS



CAPITULO II

- Tabla II-1: Resumen con la codificación otorgada a las muestras analizadas de cada especie del género *Stereochinus*. ____ (14)
- Tabla II-2: Resumen de las condiciones de amplificación para los distintos marcadores. Se detalla la secuencia de los partidores y referencias. Las posiciones degeneradas se representan por el siguiente código: R = A|G; Y = C|T. ____ (16)
- Tabla II-3: Resumen de los outgroup utilizados para cada análisis filogenético, códigos de accesos Genbank respectivos y el tamaño de fragmento aproximado obtenido luego del alineamiento. ____ (17)
- Tabla II-4: Resumen de valores de soporte de bootstrap (RaxML), probabilidades a posteriori (Beast) y edad estimada (Beast) de aquellos nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el género *Stereochinus*. La ausencia de un valor indica que ese nodo no fue apoyado por el análisis. * En paréntesis los valores bayesianos de probabilidad a posteriori obtenidos en Mr. Bayes (ver materiales y métodos). ____ (24)

CAPITULO III

- Tabla III-1: Lista con las poblaciones de las especies del género *Stereochinus* bajo estudio, se indica el número de individuos analizados para el marcador mitocondrial y microsatélites. ____ (40)
- Tabla III-2: Índices de diversidad genética por población y total de individuos de *S. neumayeri*. Pruebas de neutralidad para la especie alrededor del continente. (N) número de individuos analizados; (k) número de haplotipos; (H) Diversidad haplotípica; (S) Sitios polimórficos; (II) número promedio de diferencias entre par de secuencias. Para las pruebas de neutralidad, ** P < 0.01 y * P < 0.05. ____ (45)
- Tabla III-3: Resumen de los 5 loci utilizados en el presente estudio. SSR: (Short Sequence Repeat) motivo de repetición; pb: pares de bases. ____ (50)

- Tabla III-4: Resumen de la diversidad genética encontrada en cada loci. NA: Número promedio de alelos; PIC: Contenido de información polimórfica; Ho: Heterocigocidad observada; He: Heterocigocidad esperada. ____ (51)
- Tabla III-5: Medida de diferenciación genética (F_{ST}) entre distintos grupos geográficos basados en la información de 5 loci. ____ (51)
- Tabla III-6: Asignación independiente para cada individuo a las distintas localidades muestreadas de *S. neumayeri*. ____ (52)
- Tabla III-7: Índices de diversidad genética por especie y total para el complejo *Sterechinus*. Pruebas de neutralidad para el complejo. (N) número de individuos analizados; (k) número de haplotipos; (H) Diversidad haplotípica; (S) Sitios polimórficos; (D) número promedio de diferencias entre par de secuencias. Para las pruebas de neutralidad, ** $P < 0.01$ y * $P < 0.05$. ____ (53)
- Tabla III-8: Resumen de los 8 loci utilizados en el presente estudio. SSR: (Short Sequence Repeat) motivo de repetición; pb: pares de bases. ____ (55)
- Tabla III-9: Resumen de la diversidad genética encontrada en cada loci. NA: Número promedio de alelos; PIC: Contenido de información polimórfica; Ho: Heterocigocidad observada; He: Heterocigocidad esperada. ____ (56)
- Tabla III-10: Medida de diferenciación genética (F_{ST}) entre distintos grupos geográficos basados en la información de 8 loci. ____ (56)
- Tabla III-11: Asignación independiente para cada individuo a las distintas especies del complejo *Sterechinus*. ____ (58)

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO I

Figura I-1: Mapa con la distribución Geográfica y batimétrica de las especies descritas para el género *Sterechinus*. ____ (4)

Figura I-2: a) Esquema con los caracteres básicos para la descripción de especies de erizos regulares, b) Ejemplar de *Sterechinus neumayeri*. ____ (4)

CAPITULO II

Figura II-1: Esquema que muestra la distribución geográfica de las seis especies descritas para el género *Sterechinus* ____ (10)

Figura II-2: Reconstrucción filogenética por Máxima verosimilitud en base a los genes 12S rDNA-tRNA (gln), que muestra el tiempo estimado para la separación de la especie *S. neumayeri* del clado hermano conformado por *P. lividus* y *L. albus*. (Extraído de Lee et al. 2004). ____ (11)

Figura II-3: Árbol de reconstrucción filogenética por inferencia Bayesiana en base al gen COI para el género *Sterechinus*, el soporte de las ramas son: Máxima verosimilitud (MV) y máxima parsimonia (MP) bootstrap con 1000 replicas e inferencia Bayesiana (IB). ____ (12)

Figura II-4: Filograma del género *Sterechinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el gen 16S. El subclado color verde corresponde al complejo *Sterechinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Sterechinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4. ____ (19)

Figura II-5: Filograma del género *Sterechinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el gen COI. El subclado color verde corresponde al complejo *Sterechinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las

distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Sterechinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4. ____ (20)

Figura II-6: Filograma del género *Sterechinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el gen ITS. El subclado color verde corresponde al complejo *Sterechinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Sterechinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4. ____ (21)

Figura II-7: Filograma del género *Sterechinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el análisis con genes concatenados. El subclado color verde corresponde al complejo *Sterechinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Sterechinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4. ____ (22)

Figura II-8: Esquema que muestra las relaciones genealógicas de las especies del género *Sterechinus* con las muestras identificadas como *S. bernasconiae* y *Gracilechinus multidentatus* obtenidas desde GENBANK. ____ (27)

Figura II-9: Paleorreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 70 Ma, (Extracto de Zachos et al. 2001). ____ (28)

Figura II-10. Esquema que resume los principales resultados de la investigación.
a) Relaciones filogenéticas basadas en el análisis de genes concatenados;
b) El número de especies que grupos que existen para el género *Sterechinus*; y c) Distribución geográfica de las especies o grupos taxonómicos definidos por los análisis. ____ (30)

CAPITULO III

Figura III-1: Elementos del Océano Austral: Corriente Circumpolar Antártica (CCA); Frente Polar Antártico (SAF); Giros del Mar de Weddell y Ross. ____ (32)

Figura III-2: Paleorreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 70 Ma, (Extracto de Zachos et al. 2001). ____ (34)

Figura III-3: Red de haplotipos construida a partir de 174 secuencias de COI en *S. neumayeri*, provenientes de siete poblaciones ubicadas alrededor del continente. Cada círculo representa a un haplotipo (tipo único de secuencia) y su tamaño es proporcional a su frecuencia en la muestra. O' Higgins (azul); Bahía Fildes (amarillo); Bahía Paraíso (celeste); Rothera (verde); Tierra Adelia (rojo); Mar de Weddell (blanco); Isla Rose (negro). ____ (46)

Figura III-4: Mapa de la probabilidad de pertenencia a una población. ____ (47)

Figura III-5: Distribución de diferencias pareadas en el gen Citocromo Oxidasa subunidad I en la especie *S. neumayeri*. ____ (47)

Figura III-6: Tendencia demográfica histórica del tamaño poblacional efectivo (N_e) construido con la aproximación bayesiana Skyline plot basado en haplotipos del citocromo Oxidasa subunidad I (COI) de *S. neumayeri* con dos tasas de mutación para el gen: a) 5.1 % y b) 7.2 %. El eje x es el tiempo en unidades de años y el eje y es igual a Net , el producto del tamaño poblacional efectivo (N_e) y la extensión de la generación en una escala logarítmica. Se muestran la estimación media (línea negra) y el 95% de los límites más altos de densidad de probabilidad (HPD) (área gris). La línea discontinua gruesa representará el tiempo del ancestro común más reciente (tacmr) y la línea discontinua delgada representa el tiempo de la expansión en la especie. ____ (49)

Figura III-7: Red de haplotipos construida a partir de 86 secuencias de COI de las cuatro especies del complejo *Stereochinus*, provenientes de la región Antártica y Subantártica. Cada círculo representa a un haplotipo (tipo único de secuencia) y su tamaño es proporcional a su frecuencia en la

muestra. *S. agassizii* (rojo); *S. diadema* (amarillo); *S. antarcticus*: Tierra Adelia (calipso), Mar de Weddell (azul) y Rothera (azul claro); *S. dentifer*: Mar de Bellingshausen (verde oscuro) y Arco de Escocia (verde claro). ____ (54)

Figura III-8: Análisis de correspondencia factorial para las distintas especies estudiadas. ____ (57)

Figura III-9: Estructuración genética y asignación de clusters del programa Structure. Cada línea vertical representa un individuo, quienes están agrupados de acuerdo a su localidad de origen. Los clusters están codificados con 3 colores y la fracción de color para cada individuo representa la probabilidad de asignación al cluster de ese color. ____ (58)

Figura III-10: Mapa con la circulación superficial del Océano Austral. AAC: Corriente Circumpolar Antártica, ACoC: Corriente Antártica Costera. las líneas punteadas representan a los distintos frentes: STC: Zona de convergencia subtropical; AC: Convergencia antártica; AD: Divergencia Antártica. Siglas en Inglés (<http://dino-atlas.pangaea.de/Oceanographic.html>). ____ (60)

Figura III-11: Mapa que muestra la vía de la Corriente Costera de la Península Antártica en la sección Oeste de la península (Moffat et al. 2008). La línea continua muestra la sección para la cual fue evaluada la velocidad de la corriente, mientras que la línea discontinua muestra las vías sugeridas en dicha zona. ____ (60)

Figura III-12: Esquema que muestra una generalización de la dirección (flecha roja), que debió haber tomado la fauna Antártica durante el periodo glacial a) al expandirse la capa de hielo y b) probables refugios que sustentarían una recolonización durante el último máximo glacial. (Extraído de Frasser et al. 2012). ____ (62)

CAPITULO IV

Figura IV-1: Paleorreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 20 Ma, (Extracto de Zachos et al. 2001). ____ (67)

Figura IV-2: Esquema que muestra los distintos escenarios planteados para los principales clados obtenidos en los análisis filogenéticos y posible escenario evolutivo. ____ (68)

Figura IV-3: Esquema que muestra los anillos de conectividad detectados por la presente investigación. La flecha de línea continúa negra señala a la corriente Antártica Costera (CACo) y la flecha gruesa de línea discontinua señala a la Corriente Circumpolar. ____ (70)

Figura IV-4: Esquema de los caracteres diagnósticos que permiten la clasificación de las especies de *Sterechinus*. Desde arriba de describen distintas formas para el número de dientes en valvas de pedicelarios; placa ocular; forma de los hombros de las valvas y; forma de la testa. ____ (71)

RESUMEN

El Océano Austral (OA) que rodea el continente Antártico es considerado como uno de los ecosistemas marinos más grande y bien delimitado de la tierra. Se encuentra delimitado al sur por la Antártica y al norte por la zona del frente polar (ZFP o convergencia Antártica). Antártica alberga, sobre una plataforma continental angosta e inusualmente profunda, uno de los ecosistemas más particulares de nuestro planeta. A pesar de esto, la macrofauna bentónica que habita esta zona se caracteriza por su alta diversidad la que excede las 15000.

El origen de las especies que habitan esta plataforma se establece desde el aislamiento que experimentó Antártica hace aproximadamente 30 Ma. En cuanto a la fauna que ocupa la plataforma continental y la zona profunda del continente, diversos investigadores reconocen sus similitudes, sin embargo, las relaciones evolutivas entre ambas no son claras. Hasta la fecha existen dos hipótesis que han tratado de explicar la relación evolutiva entre ambas faunas: (1) los taxa de la zona costera habrían colonizado la zona profunda (Submergencia) y (2) la colonización habría ocurrido desde grandes profundidades (Emergencia) hacia zonas someras. Las seis morfo-especies que presenta el género de erizos regulares *Sterechinus*, representan un buen modelo de estudio para poner a prueba las hipótesis establecidas en la literatura debido a que poseen una distribución tanto Antártica como Subantártica, y una amplia distribución batimétrica en el Océano Austral.

Gracias a un estudio previo que consideró a cinco especies de *Sterechinus*, se establecieron novedosos resultados, además de nuevas y relevantes interrogantes, acerca de la relación evolutiva entre las faunas profunda y somera del continente Antártico. Con la amplificación parcial del gen mitocondrial COI, se planteó la existencia de sólo dos grupos genéticamente diferenciados para el género. El primero corresponde exclusivamente a la especie antártica somera *S. neumayeri*, mientras que el segundo grupo (complejo *Sterechinus*), reúne a las cuatro especies restantes (de distribución Antártica profunda: *S. antarcticus* y *S. dentifer* y, de distribución Subantártica somera: *S. agassizii* y *S. diadema*), del cual sólo se puede diferenciar levemente a la especie Antártica profunda *S. dentifer*. Por otra parte, las especies que habitan la zona somera Subantártica y la especie somera Antártica presentan una importante dispersión dentro

de cada región, lo que hace suponer la existencia de anillos de conectividad para cada zona, probablemente determinados por diferentes corrientes oceánicas. El objetivo general fue evaluar las relaciones filogenéticas entre las seis especies de *Sterechinus* y estudiar las relaciones evolutivas entre la fauna bentónica de Antártica y de la región Subantártica, somera y profunda, junto con determinar la estructura genética y los patrones de conectividad dentro de cada región a través de distintos marcadores moleculares mitocondriales y nucleares

Se realizaron reconstrucciones filogenéticas con marcadores mitocondriales (Citocromo c Oxidasa I y 16S) y dos fragmentos nucleares (ITS 1 y 2) para determinar las relaciones de ancestría entre las seis especies descritas para el género *Sterechinus* (*S. neumayeri*, *S. antarcticus*, *S. dentifer*, *S. agassizii*, *S. diadema* y *S. bernasconiae*). Se estimaron los tiempos de origen y diversificación del género. Las reconstrucciones se hicieron utilizando Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (IB), mientras que los tiempos de divergencia se estimaron siguiendo una aproximación bayesiana. Además, se utilizó el marcador mitocondrial COI y marcadores genéticos hipervariables (microsatélites) para estudiar la diversidad, estructura genética y los patrones de conectividad dentro y entre las regiones Antártica y Subantártica. Con estos propósitos, se recolectaron especies presentes en distintas regiones del Océano Austral: Antártica, Islas Kerguelén y costa del sur de Argentina.

Las especies del género *Sterechinus* (con la excepción de "*S. bernasconiae*") fueron incluidas en un grupo que comparte un ancestro común. Este grupo monofilético se divide en dos linajes que pueden haberse separado por un evento de vicariancia. La edad de este proceso coincide con una intensificación de la Corriente Circumpolar hace aproximadamente 5 Ma. Como era de esperar, un grupo está representado por *S. neumayeri* y el otro por las especies del complejo *Sterechinus* dentro del cual la especie *S. dentifer* aparece como un clado reciente. Los resultados corroboran una dispersión a larga distancia que establece la existencia de dos importantes anillos de conectividad para la zona somera del Océano Austral. Además, se determinó una estrecha relación evolutiva entre las regiones Antártica y Subantártica, entre las especies que habitan la zona Subantártica somera "SS" (Argentina y Kerguelen) con las que habitan la zona Antártica profunda "AP" (*S. antarcticus* y *S. dentifer*).

A partir de los resultados de la presente tesis se propone la existencia de dos anillos de conectividad en el Océano Austral: (1) En Antártica, representado por la Corriente Antártica Costera (CACo), que permite un importante flujo génico alrededor del continente para la especie *S. neumayeri*; y (2) En la zona Subantártica somera, la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), que permite un importante flujo entre las poblaciones (y especies) de Argentina (*S. agassizii*) y Kerguelen (*S. diadema*). Además, se propone un nuevo escenario evolutivo para la relación entre la fauna somera y profunda del Océano Austral. Una separación efectiva sólo entre las faunas someras de Antártica y Subantártica (hace aproximadamente 5 Ma.), y más recientemente, una colonización de las zonas profundas a través de un proceso de diversificación hacia las grandes profundidades desde la zona Subantártica somera.

ABSTRACT

The Southern Ocean around Antarctica is considered one of the largest marine ecosystems, located between the Antarctic continent and the Polar Front Zone (PFZ or Antarctic convergence). Antarctica has one of the most particular marine ecosystems of our planet, because it is contained in a very narrow and deep continental shelf that sustains a remarkable number of benthic species. In spite of this, the benthic macrofauna is characterized by a high diversity, arising approximately 15,000 species.

The origin of lineages that inhabit the Antarctic platform has been dated at 30 Myr, when the Antarctic continent becomes isolated. Many researchers have reported similarities between the fauna present within the Antarctic platform and the fauna that inhabit the deep-sea area; however the evolutionary relationships between both faunas are not clear. For instance, two main hypotheses have been invoked to explain the evolutionary connection between both faunas: (1) the first one establishes that shallow taxa colonized the deep-sea area ('Submergence hypothesis'), whereas (2) the second hypothesis indicated that some taxa colonized the continental shelf ('Emergence hypothesis') from deep-sea. The regular sea urchin genus *Sterechinus*, comprising six morphological species, is a good model to test these hypotheses because is distributed in Antarctic and Subantarctic areas, covering an ample bathymetric range along the Southern Ocean.

Previous analyses, showed innovative results and new and relevant new questions about the evolutionary relationship between the deep and shallow faunas of Antarctica. Based on mtDNA COI gen suggested the existence of only two groups genetically differentiated within *Sterechinus*. The first corresponds exclusively to the Antarctic species *S. neumayeri*, while the second one ('*Sterechinus* complex'), corresponds to the other four species (distributed in deep Antarctica and shallow Subantarctic zone). Within the *Sterechinus* complex, *S. dentifer* (deep Antarctic) have slight genetic singularities. Also, the species that inhabit the shallow zone of Subantarctic and Antarctic regions (*S. neumayeri*) have an important dispersion within each region, which suggests the existence of 'rings of connectivity' driven by different oceanic currents. The general objective was to assess the phylogenetic relationships among the six species of *Sterechinus* and study the evolutionary relationships between benthic

fauna of Antarctic and Subantarctic regions, shallow and deep, together with determine the genetic structure and patterns of connectivity within each region through different mitochondrial and nuclear markers.

Phylogenetic reconstructions based on two mitochondrial (Cytochrome c Oxidase I and 16S) and two nuclear (ITS 1 and 2) DNA markers were performed to determine the evolutionary relationships among the six species of *Sterechinus* genus (*S. neumayeri*, *S. antarcticus*, *S. dentifer*, *S. agassizii*, *S. diadema* y *S. bernasconiae*). It estimated the origin and diversification times of the genus. Phylogenetic analyses were made using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian Inference (BI) approaches, while this last was utilized to estimate the time of origin and divergence as well. Also the analyses of diversity, genetic structure and connectivity patterns between the Antarctic and Subantarctic regions were complemented with the mitochondrial marker COI and hypervariable nuclear markers (microsatellite). For these purposes were sampled specimens from different regions of the Southern Ocean (i.e. Antarctica, Kerguelen and Southern coast of Argentina).

The species of the genus (except *S. bernasconiae*) were grouped within a single group that shares a common ancestor. This monophyletic group is divided into two lineages that might be separated by a vicariant event. The age of this process matches with the intensification of the circumpolar current approximately at 5 Ma. As expected, a group is represented by *S. neumayeri* species and the other one by the species of the *Sterechinus* complex, within which the species *S. dentifer* appears as a recently evolved subclade. These results support long distance dispersion along two major rings of connectivity for the shallow zone of the Southern Ocean. In addition, suggest a close evolutionary relationship between Antarctic and Subantarctic regions linking the species that inhabit the shallow Subantarctic zone "SS" (Argentina and Kerguelen) with that inhabit the Antarctic deep zone "AP" (*S. antarcticus* and *S. dentifer*).

Based on these analyses, this dissertation propose two rings of connectivity for the Southern Ocean: (1) in Antarctica, the Antarctic Coastal Current (CACo) promote an important gene flow between *S. neumayeri* populations around the continent; and (2) in the Subantarctic shallow zone, the Antarctic Circumpolar Current (ACC), drive the gene flow between populations (and species) in Argentina (*S. agassizii*) and Kerguelen (*S.*

diadema). In addition, a novel evolutionary scenario for the relationship between shallow and deep fauna of the Southern Ocean is proposed. An initial effective separation occurred between shallow Antarctic and Subantarctic faunas (approximately 5 Mya), and more recently, a colonization of the deep zone through a process of diversification into great depths from the Subantarctic shallow zone.

CAPITULO I: INTRODUCCION GENERAL

I.1 ANTECEDENTES

La fauna marina del Océano Austral difiere substancialmente de otras regiones, y se reconoce como una de las más particulares de nuestro planeta, debido a la historia geológica del continente antártico y a las condiciones medioambientales extremas a las cuales están sometidas las distintas especies (Clarke 1983, Aronson y Blake 2001, Peck 2002). A pesar de que la plataforma continental de Antártica es muy estrecha e inusualmente profunda (aprox. 450 m. y que en ciertos lugares alcanza los 1000 m.), la fauna que habita esta zona se caracteriza por una diversidad que puede exceder las 15000 especies, con una generalizada e importante Euribatía, en comparación a la fauna que habita la plataforma continental de otros continentes (Brey *et al.* 1996).

El paulatino aislamiento de la fauna comenzó con la fragmentación y dispersión de los bloques que conformaban el supercontinente Gondwana y culminó con la apertura del paso de Drake hace aproximadamente 28 Ma (Barker y Burrell 1982, Ludwig 1983). Posterior a esta separación oceánica entre Sudamérica y la península Antártica, se instalan progresivamente tres barreras alrededor de Antártica: geográfica, oceanográfica y batimétrica (Lawver *et al.* 1992, Crame 1999, Pfuhl y McCave 2005, Tripathi *et al.* 2005). Estas barreras, en su conjunto, serían las responsables de la evolución y diversificación de una fauna endémica a lo largo de la plataforma continental y del talud que rodean al continente antártico (Clarke y Johnston 2003, Clarke *et al.* 2005, Thatje *et al.* 2005). Se reconoce así que la fauna antártica ha seguido con posterioridad una historia evolutiva propia y completamente aislada.

A pesar del aislamiento establecido hace millones de años, Arntz *et al.* (2005) plantean una fuerte conexión biogeográfica entre las faunas marinas bentónicas de la Península Antártica y la región de Magallanes en América del Sur, que estaría explicada por la historia geológica de ambos continentes. En este sentido, el trabajo de Dell (1972) reconoce la posibilidad de intercambio de faunas posterior a la separación de los continentes, mientras que otros trabajos sugieren que ni la corriente circumpolar ni el frente polar serían barreras físicas (oceanográficas) absolutas para impedir el tránsito de especies. Por otra parte, diversos autores proponen la posible existencia de una continuidad de la fauna bentónica a través de las grandes profundidades que rodean al continente, lo que permitiría una conexión con la zona Magallánica y Subantártica

(Clarke y Crame 1997, Clarke *et al.* 2005). En cuanto a las similitudes entre la fauna marina bentónica de la plataforma continental y la que habita las grandes profundidades que rodean al continente antártico, estas han sido interpretadas como resultado de diversificaciones sucesivas en el Océano Austral, considerado como centro de origen de parte de la fauna antártica actual (Held 2000, Rogers 2000, Gage 2004, Brandt *et al.* 2007, Strugnell *et al.* 2008). En la década de los 70' se comenzó a discutir acerca de las relaciones evolutivas entre las faunas someras y profundas del Océano Austral (Menzies *et al.* 1973), planteándose dos hipótesis: (1) Hipótesis de la Submergencia evolutiva polar y (2) Hipótesis de la Emergencia evolutiva polar (Menzies *et al.* 1973, Zinsmeister y Feldmann 1984, Clarke y Crame 1999, Crame 1999, Brandt 1991- 1992, Brandt *et al.* 2007, Aronson *et al.* 2008).

La filogenia y filogeografía son herramientas útiles para el análisis espacial de linajes génicos que permiten reconstruir la historia evolutiva de una especie o un grupo de especies, estudiar su historia demográfica y a través de esto dilucidar cómo los procesos climáticos y geográficos históricos han afectado y determinado la fauna que observamos hoy en día. Estudios de este tipo han sido escasos en la Antártica, debido, en parte, a la dificultad logística para obtener muestras representativas de las poblaciones y especies que conforman su fauna (principalmente de la zona profunda). En este sentido, iniciativas como el programa "Evolución y biodiversidad en Antártica: la respuesta de la vida al cambio" (EBA), el proyecto de Censo de Vida Marina Antártica (CAML) y el desarrollo del Año Polar Internacional (API, 2007-2009), han contribuido de manera muy significativa al estudio de la biodiversidad y la biogeografía en el Océano Austral. Estas iniciativas, amén del compromiso de cooperación internacional entre investigadores, han permitido integrar el conocimiento entre regiones, biomas, hábitats y campos de estudio para fortalecer el entendimiento de la dinámica del ecosistema oceánico Antártico, a través del estudio a múltiples escalas. Estos esfuerzos también han permitido generar muestreos integrados entre diferentes regiones subantárticas y antárticas, favoreciendo así la investigación en temáticas filogenéticas durante los últimos años.

El género de erizos regulares *Sterechinus* (familia Echinidae, orden Echinoida), es uno de los equinodermos que forma parte importante de la fauna marina bentónica de Antártica. Este género está conformado por seis especies descritas en base a criterios

morfológicos y geográficos y agrupa a especies de distribución tanto antártica como subantártica. Estas especies presentan fecundación externa con un desarrollo larval de tipo pelágico planctotrófico. Debido a su abundancia en los fondos Antárticos someros, *S. neumayeri* ha sido la especie más estudiada del género y gracias a ella se han podido establecer algunas características que son relativamente comunes para todas las especies del género. Por ejemplo, habitan grava y rocas basálticas y el color de la testa y espinas varía en todas las especies, desde un olivo oscuro a púrpura blanquecino, aunque la testa es generalmente de color verdoso. La dieta ha sido descrita como principalmente herbívora ya que la mitad es en base a algas, aunque también se alimentan de diatomeas, foraminíferos, esponjas, briozoos, hidrozoos, poliquetos y anfípodos (Pearse y Giese 1966, Jacob *et al.* 2003). Se caracterizan por un crecimiento lento y alcanzan un diámetro máximo de 7 centímetros a los 40 años de edad (Marsh *et al.* 2001). Se ha descrito que sus gametos tienen boyantes negativa (Marsh y Manahan 2000), pero el desarrollo larval ocurre en la columna de agua (Bosch *et al.* 1987) y se presume que presentan una elevada dispersión a través de corrientes, ya que el asentamiento y metamorfosis ocurre cerca de 4 meses después de la fertilización (Bosch *et al.* 1987), sin embargo, se ha observado que su fase dispersiva puede extenderse hasta por ocho meses en condiciones de laboratorio (Dra. Theresinha Monteiro, comunicación personal). En ambientes someros sus depredadores más importantes son la estrella *Odontaster validus* (familia *Odontasteridae*) y peces de la familia *Nototheniidae* (e.g., *Trematomus bernacchii*) (La mesa *et al.* 2004).

En cuanto a las especies descritas para el género *Sterechinus*, en aguas antárticas se pueden encontrar tres especies: *S. neumayeri* (Meissner 1900); *S. antarcticus* (Koehler 1901) y *S. dentifer* (Koehler 1926). En cuanto a las tres especies restantes del género, éstas habitan regiones subantárticas: *S. diadema* (Studer 1876), endémica de la plataforma de Kerguelen; *S. agassizii* (Mortensen 1910), habita la plataforma continental Argentina, y *S. bernasconiae* (Larraín 1975), habita la Costa del Pacífico, entre Concepción y el Estrecho de Magallanes (Figura I-1). De manera general, las diferencias entre cada especie corresponden a caracteres muy particulares y sutiles, como por ejemplo el número de dientes en la valvas de pedicelarios y el número de placas insertas en el disco apical, por lo que no es suficiente una inspección general de los individuos para su clasificación (Figura I-2).

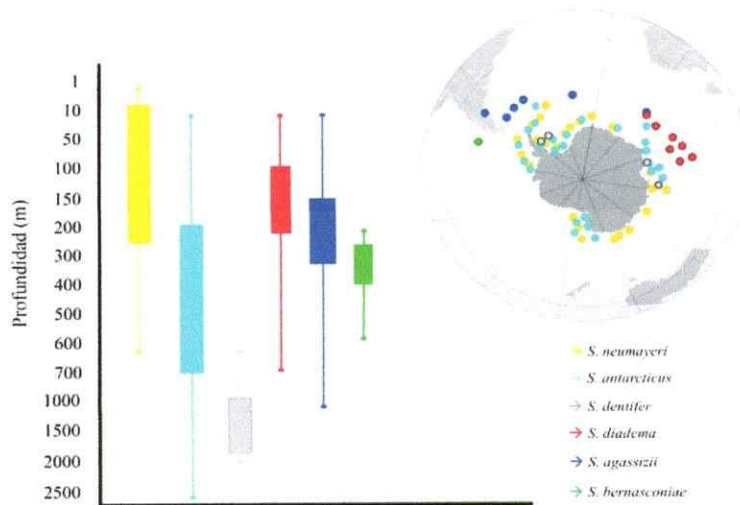


Figura I-1: Mapa con la distribución geográfica y batimétrica de las especies descritas para el género *Sterechinus*. (David e al. 2005)

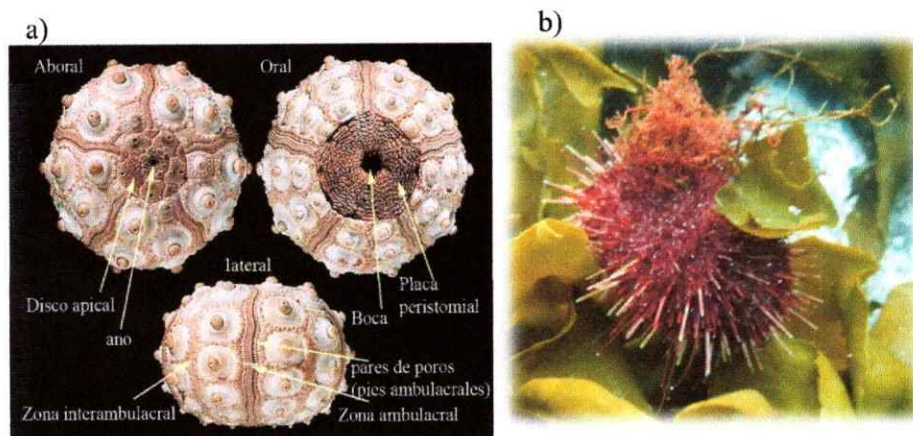


Figura I-2: a) Esquema con los caracteres básicos para la descripción de especies de erizos regulares, b) Ejemplar de *Sterechinus neumayeri* en su hábitat natural.

Las características de distribución geográfica y batimétrica, hacen de este género un buen modelo de estudio para determinar el momento en que las faunas marinas Antárticas y Subantárticas dejaron de estar en contacto, siguiendo historias evolutivas independientes, además de determinar las relaciones evolutivas entre la fauna profunda

y somera del Océano Austral. En este sentido, el trabajo realizado por Díaz *et al.* (2011) realiza el interés hacia este grupo en particular, puesto que realiza un importante acercamiento hacia la estimación del tiempo de divergencia entre individuos provenientes de los continentes Antártica y Sudamérica en aprox. 5 Ma (estimación basada en la hipótesis del reloj molecular), muy posterior a la separación física de ambos continentes. Además, es posible detectar una marcada separación entre las especies presentes en ambas regiones y una considerable conexión dentro de cada región biogeográfica, planteándose la posibilidad de que existan anillos de conectividad biológica al interior de estas zonas, el primero impulsado por la corriente “East Wind Drift” o Corriente Costera Antártica (ACoC), que bordea al continente Antártico y uniría a las distintas poblaciones de *S. neumayeri*, y la corriente “West Wind Drift” o Corriente Circumpolar Antártica (CCA), que uniría a las especies que habitan la costa de Argentina y la Isla Kerguelen. Quizás lo más relevante de éste estudio es la estrecha relación que muestran las especies de distribución profunda del género *Sterechinus* con las de distribución somera de la región Subantártica y no con la especie somera antártica *S. neumayeri*. Lo interesante de estos resultados es que no apoyan a ninguna de las hipótesis planteadas acerca de las relaciones biogeográficas y evolutivas entre el bentos Antártico somero y profundo (Submergencia o Emergencia evolutiva polar). Por el contrario, estos resultados indicarían la probabilidad de una colonización reciente de Antártica, a través de las grandes profundidades, a partir de la región Subantártica, promovida probablemente por la geomorfología del Arco de Escocia (Thompson 2004). Por otra parte, no deja de sorprender que especies supuestamente distintas muestren relaciones filogenéticas muy estrechas, lo que no es congruente con la clasificación taxonómica establecida. De las cinco especies que fueron analizadas, sólo se logra distinguir *S. neumayeri*, mientras que el resto se encuentra en un grupo donde no se pueden establecer relaciones filogenéticas claras.

A pesar del avance en el entendimiento del origen y evolución de la fauna marina bentónica somera y profunda de Antártica, y en particular en el de las relaciones filogenéticas entre las morfo-especies del género *Sterechinus*, muchas preguntas quedan sin resolver. Además de la incerteza que muestra la filogenia del género en cuanto al número de especies, surgen otras interrogantes como la estrecha relación que muestran las especies profundas (*S. antarcticus* y *S. dentifer*) con las especies de la región Subantártica (*S. agassizii* y *S. diadema*) y, la considerable conectividad que muestran entre sí las especies Subantárticas y la especie antártica somera alrededor de todo el

continente (*S. neumayeri*).

En esta tesis se evaluaron las relaciones filogenéticas entre las seis especies del género *Sterechinus*. Además, se estudiaron las relaciones evolutivas entre la fauna bentónica de Antártica y de la región Subantártica, somera y profunda, junto con determinar la estructura genética y los patrones de conectividad dentro de cada región a través de distintos marcadores moleculares mitocondriales y nucleares. De modo general se discute la pertinencia de las hipótesis que plantea la literatura (Submergencia y Emergencia), para explicar los patrones generales que determinan la composición de especies de la fauna bentónica en el Océano Austral.

1.2 HIPOTESIS Y OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo fue evaluar las relaciones filogenéticas entre las seis especies de *Sterechinus* y estudiar las relaciones evolutivas entre la fauna bentónica de Antártica y de la región Subantártica, somera y profunda, junto con determinar la estructura genética y los patrones de conectividad dentro de cada región a través de distintos marcadores moleculares mitocondriales y nucleares

HIPOTESIS

1.- De acuerdo a la evidencia previa para las relaciones filogenética entre las especies de *Sterechinus*, los nuevos análisis filogenéticos corroboran la presencia de sólo dos grupos para el género.

2.- Debido al alto potencial de dispersión larval de *Sterechinus neumayeri*, junto con un patrón de circulación oceánico impulsado por la Deriva del Este, esta especie mantiene conectividad entre sus poblaciones alrededor del continente antártico y por ende no presenta estructuración genética.

3.- De la misma manera, la Deriva del Oeste permite la dispersión de larvas planctotróficas a través de la Corriente Circum-Antártica, uniendo el continente sudamericano con las islas Subantárticas, determinándose la existencia de una única especie del género *Sterechinus* en toda la región.

4.- La relación evolutiva entre las especies antárticas de distribución somera y profunda no se explica por las hipótesis clásicas de Emergencia y Submergencia polar.

5.- La zona antártica profunda ha sido colonizada por especies de la fauna Subantártica somera con la cual mantiene una conexión actual a través de flujo genético.

OBJETIVOS

(i) Establecer las relaciones filogenéticas entre las seis especie descritas para el género *Sterechinus*, en base a filogenias moleculares basadas en distintos marcadores nucleares y mitocondriales.

(ii) Evaluar la conectividad alrededor del continente antártico en la especie *Sterechinus neumayeri*, a través de la estimación de la estructuración genética de distintas poblaciones.

(iii) Evaluar la existencia de dos anillos de conectividad genética, impulsados (1) por la corriente "East Wind Drift" que bordea al continente Antártico y (2) por la corriente "West Wind Drift" que une la provincia Subantártica.

(iv) Evaluar la conexión y posible relación evolutiva entre la región Antártica y Subantártica a través de las grandes profundidades, por medio de la relación que muestran las especies *S. dentifer* y *S. antarcticus* (muestras profundas) con las especies de distribución subantártica (*S. diadema* y *S. agassizii*).

CAPITULO II: FILOGENIA MOLECULAR Y TIEMPOS DE DIVERGENCIA EN ERIZOS REGULARES DEL GÉNERO *Sterechinus* (Echinidae: Echinoidea).

II.1 INTRODUCCION

Sterechinus neumayeri es la especie más común en los fondos marinos someros de Antártica sobre los 400 m de profundidad (Brey *et al.* 1995, Sahade *et al.* 1998) y se la reconoce por jugar un rol importante en la trama trófica bentónica (i.e. McMurdo) y por su amplia distribución circum-Antártica (Mortensen 1936, Pawson 1969, Brey y Gutt 1991). Pertenece a un género que agrupa seis especies de distribución Antártica y Subantártica (descritas principalmente en base a criterios morfológicos), de las cuales *S. neumayeri* es la especie que ha sido objeto del mayor número de investigaciones, principalmente relacionadas con su ecología (McClintock 1994, Brey *et al.* 1995, Amsler *et al.* 1999, Brockington *et al.* 2001), su embriología (Bosch *et al.* 1987, Pearse *et al.* 1991), fisiología (Marsh *et al.* 2001), e incluso toxicología (King y Riddle 2001). No obstante, un conocimiento más profundo sobre la historia evolutiva del grupo, dada su relevante distribución en el Océano Austral, es escaso e incluso incierto.

Del conocimiento existente sobre el género es relevante señalar que su taxonomía parece no estar resuelta, puesto que algunos autores plantean que el grupo puede estar más bien representado por tan solo dos grupos con amplia distribución y no por seis especies (Díaz *et al.* 2011). Las especies descritas en la literatura son: *S. agassizii*, *S. antarcticus*, *S. diadema*, *S. dentifer*, *S. neumayeri* y *S. bernasconiae* (Mortensen 1936, Pawson 1969, Larrain 1975). Las diferencias morfológicas entre las especies parecen ser tan sutiles que ya en el siglo pasado Mortensen (1936), considera que tres de ellas: *S. antarcticus*, *S. agassizii* y *S. diadema* estarían tan relacionadas entre sí que finalmente representarían sólo a fenotipos distintos de una sola especie y que *S. neumayeri* si sería una especie distinta. Sin embargo, el mismo autor plantea que híbridos putativos entre *S. neumayeri* y *S. antarcticus* serían difíciles de identificar y de asignar a cualquier especie del género.

El género de erizos regulares *Sterechinus* pertenece a la familia *Echinidae*, orden *Echinoidea*. Las seis especies descritas en base a criterios morfológicos y biogeográficos, presentan fecundación externa con un desarrollo larval de tipo pelágico planctotrófico.

En el continente antártico podemos encontrar a tres especies de *Sterechinus*: *S. neumayeri* (Meissner 1900) especie de erizo regular más abundante de las aguas someras del continente (Brey *et al.* 1996), que alcanza una distribución batimétrica hasta los 750 m; *S. antarcticus* (Koehler 1901), es dominante después de los 450 m a pesar de presentar un amplio rango de distribución batimetría y, *S. dentifer* (Koehler 1926), que presenta un rango más restringido hacia grandes profundidades (1500 - 2000 m) (David *et al.* 2005). Las tres especies restantes del género habitan regiones Subantárticas: *S. diadema* (Studer 1876), es endémica de la Plataforma de Kerguelen, *S. agassizii* (Mortensen 1910), se encuentra en la plataforma continental Argentina desde los 55 hasta los 35°S y presenta una amplia distribución batimétrica (25 - 1000 m aproximadamente) (David *et al.* 2005) y *S. bernasconiae* (Larraín 1975), es la última especie descrita para el género y ha sido recolectada alrededor de los 300 m de profundidad en la costa Subantártica del Pacífico y en el canal de Magallanes (Figura II-1).

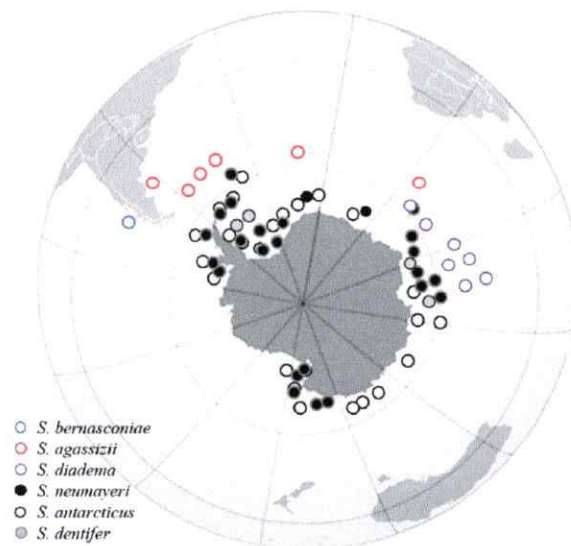


Figura II-1: Esquema que muestra la distribución geográfica de las seis especies descritas para el género *Sterechinus*.

En cuanto al conocimiento existente sobre la historia evolutiva del género, Lee *et al.* (2004) establecen que las relaciones filogenéticas entre la especie *S. neumayeri*

(Antártica) y dos especies pertenecientes a la misma familia *Loxechinus albus* y *Paracentrotus lividus* (Sudamérica) indican un tiempo aproximado que coincide con la última conexión entre ambos continentes, es decir entre 24 – 35 Ma (Figura II-2). Sin embargo, dicho estudio estableció las diferencias acumuladas entre especies pertenecientes a géneros distintos y no entre especies hermanas pertenecientes al mismo género, por lo que dicho periodo de tiempo podría estar sobrestimado.

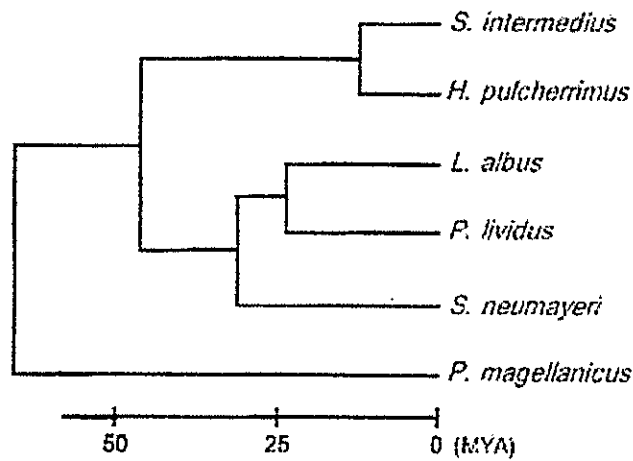


Figura II-2: Reconstrucción filogenética por Máxima verosimilitud en base a los genes 12S rDNA-tRNA^{gln}, que muestra el tiempo estimado para la separación de la especie *S. neumayeri* del clado hermano conformado por *P. lividus* y *L. albus*. (Extraído de Lee *et al.* 2004, las especies en estudio fueron: *Strongylocentrotus intermedius*, *Hemicentrotus pulcherrimus*, *Loxechinus albus*, *Paracentrotus lividus*, *Stereochinus neumayeri*, *Pseudechinus magellanicus*).

Más recientemente el trabajo de Díaz *et al.* (2011) estableció un periodo de tiempo para la divergencia entre la fauna Antártica y Subantártica bentónica somera mucho menor, alrededor de 5 -7 Ma, utilizando secuencias mitocondriales (COI) de cinco especies del género. Aunque este último trabajo parece presentar mejor evidencia para entender la historia evolutiva del género, sus resultados fueron sorprendentes en cuanto a que si bien logran establecer una divergencia entre la fauna somera de Antártica y Subantártica, también muestran que las relaciones filogenéticas entre las

especies Subantárticas someras con las especies Antárticas profundas, son estrechas y parecen pertenecer a un mismo grupo (complejo *Sterechinus*, Figura II-3). Por lo tanto, se pone en duda la clasificación taxonómica del grupo y a cuantas especies representa.

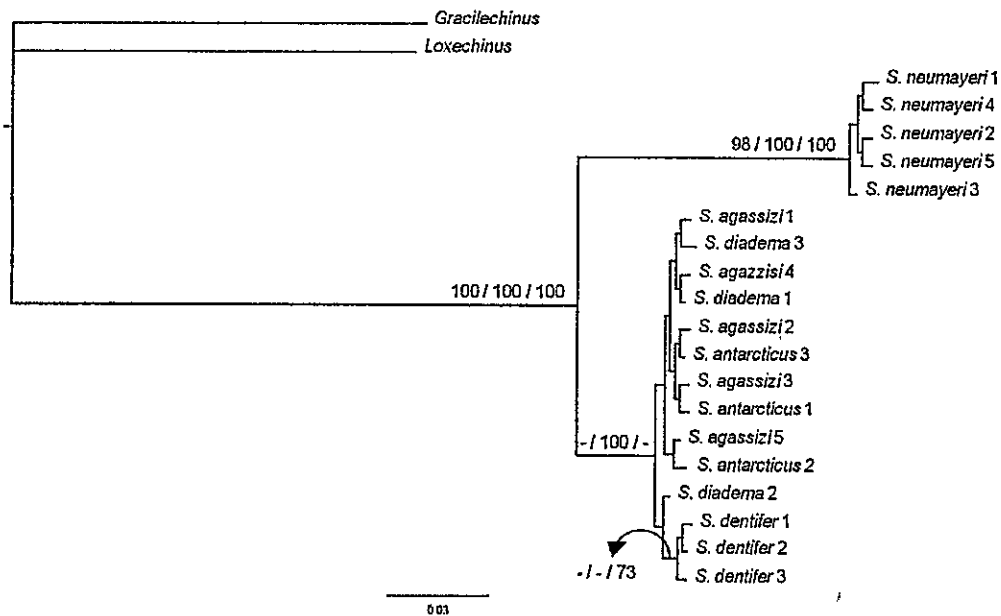


Figura II-3: Árbol de reconstrucción filogenética por inferencia Bayesiana en base al gen COI para el género *Sterechinus*, el soporte de las ramas son: Máxima verosimilitud (MV) y máxima parsimonia (MP) bootstrap con 1000 replicas e inferencia Bayesiana (IB). (Extraído de Díaz *et al.* 2011).

Debido a la problemática que significa definir las relaciones evolutivas entre las especies de *Sterechinus*, la presente investigación busca establecer dichas relaciones a través de la reconstrucción filogenética molecular del género en base a tres marcadores y con muestras de las seis especies descritas. Junto con esto, se busca establecer los tiempos en que las especies divergieron y si dichos tiempos son congruentes con estudios anteriores y entre los distintos marcadores utilizados.

II.2 MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de muestras

Las muestras utilizadas para las reconstrucciones filogenéticas provienen de distintas localidades de la plataforma continental de Antártica, Argentina y Chile así como del Archipiélago de Kerguelen. Entre las muestras se incluyen ejemplares de *S. dentifer* y *S. antarcticus* de distribución profunda (sobre 700 m), otorgadas por el Dr. Thomas Saucède. Las muestras de *S. neumayeri* fueron recolectadas durante las campañas de terreno de los proyectos INACH 02-02 y 13-05 en las Islas Shetland del Sur y la parte oeste de la Península Antártica (Estrecho Bransfield). Algunas muestras provenientes de la base Antártica Francesa de Terre Adélie, ubicada en la región Este del continente Antártico, junto con muestras provenientes del Mar de Weddell, Bellinghausen, Rothera y Arco de Escocia fueron facilitadas por los Investigadores Dr. Bruno David y Dr. Thomas Saucède de la Université de Dijon (Francia). Las muestras de las especies de distribución Subantártica fueron aportadas por distintos colaboradores: Ejemplares de *S. agassizii*, fueron recolectados por el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP Argentina), facilitados por la Dra. Claudia Bremec; las muestras de *S. diadema* fueron proporcionadas por el Dr. Jean-Pierre Ferál (Centre d'Océanologie de Marseille, CNRS UMR7628) y; la muestra de *S. bernasconiae* proviene de la Costa frente a Concepción y fue facilitada por el Dr. Javier Sellanes de la Universidad Católica del Norte (Tabla II-1).

2. Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de genes

De manera general, la utilización de un solo tipo de marcador (mitocondrial o nuclear) entrega una visión sesgada de la historia evolutiva de un grupo, principalmente en casos de estudio donde los escenarios evolutivos son complejos y se pueden encontrar introgresiones, hibridización y/o selección (Chan y Levin 2005, Spinks y Schaffer 2009). Por este motivo es importante considerar conjuntos de datos independientes, para así determinar el grado de congruencia entre las reconstrucciones obtenidas con cada uno de ellos y de tal manera obtener una visión más completa de la historia evolutiva del grupo en estudio. Por lo tanto, este trabajo incluye secuencias mitocondriales y nucleares, las cuales poseen tasas de sustituciones distintas y son heredadas de distinta forma.

A partir del tejido gonadal de un total de 45 individuos de *Sterechinus* (Tabla II-1), se realizó la extracción del ADN total utilizando el método salino (Aljanabi y Martínez 1997) y posteriormente se amplificaron por PCR de los genes mitocondriales Citocromo c Oxidasa Subunidad I (COI) y 16S rARN (16S). El gen COI forma parte de un complejo de proteínas en bacterias y mitocondrias que participa en la cadena transportadora de electrones y el gen 16S cumple una función estructural en la formación de los ribosomas (Lodish *et al.* 2002). Además se incluye ADN nuclear, fragmentos de ARN no funcional ITS 1 y 2 (Internal Transcribed Spacer), situados entre rARN estructural, ampliamente utilizados en taxonomía y filogenias moleculares debido a su alto grado de variación.

Tabla II-1: Resumen con la codificación otorgada a las muestras analizadas de cada especie del género *Sterechinus*.

ESPECIE	LOCALIDAD	CODIGO
<i>S. bernascoi</i>	Concepción	S.bernas
<i>S. agassizii</i>	Argentina	SA3
	"	SA7
	"	SA11
	"	SA18
	"	SA30
<i>S. diadema</i>	Kerguelen	Sdia4
	"	Sdia5
	"	Sdia12
	"	Sdia14
	"	Sdia16
<i>S. neumayeri</i>	Isia Rose	SW2
	"	SW3
	"	SW5
	B. O'Higgins	SOH1
	"	SHO6
	"	SHO7
	"	SOH11
	"	SOH12
	B. Fildes	SF2
	"	SF3
	"	SF8
	"	SF9
	"	SF25
	Bahia Paraiso	SBP3
	"	SBP6
	"	SBP7
	"	SBP12
	Rothera	SRO21
	"	SRO23
	"	SRO25
	Tierra Adelia	STA1
	"	STA3
	"	STA4
	"	STA16
<i>S. antarcticus</i>	M. de Weddell	Sant5
	Rothera	Sant28
	"	Sant29
	"	Sant30
	"	Sant31
<i>S. dentifer</i>	Bellinghausen	Sden1
	A. Escocia	Sden21
	"	Sden23
	"	Sden24
	"	Sden25

Las condiciones para la amplificación de cada gen, junto con información sobre partidores y condiciones de las respectivas PCRs se resumen en la Tabla II-2. Los productos de PCR fueron purificados con un kit "Qiagen Qiaquick columns" y luego enviados a secuenciar a la empresa Coreana "Macrogen", en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems). Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa Proseq v. 2.91 (Filatov, 2002) y alineadas en grupo. Las secuencias fueron traducidas a proteínas con un marco de lectura completo para descartar la presencia de inserciones-deleciones (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 y Xie, 2001).

Debido a que para el gen ITS sólo se tiene un outgroup, *Paracentrotus lividus*, en el análisis concatenado se utilizó sólo a este outgroup. Los análisis independientes para los genes COI y 16S se realizaron con tres outgroup (Tabla II-3). Los outgroup escogidos son parte de mismo orden *Echinoida*: *Hemicentrotus* pertenece a la familia *Strongylocentrotidae*, mientras que *Loxechinus* y *Paracentrotus* son géneros que corresponden a la misma familia de *Sterechinus*, *Echinidae*.

Tabla II-2: Resumen de las condiciones de amplificación para los distintos marcadores. Se detalla la secuencia de los partidores y referencias. Las posiciones degeneradas se representan por el siguiente código: R = A|G; Y = C|T.

	COI	COI (internos)	16S
Partidor F (5' - 3')	LCOI1490: TCTA CAA ACC ACA ARG AYA TTG G	ERZin: GAC CGA CTG CCC TTA TTT	16S: GTT TCG CCT GTT TAC CAA AAA CAT
Partidor R (5' - 3')	HCOIN: CCC ATT GAA AGA ACG TAG TGA AAG TG	ERZin: CTC GCT TTC CTG AGT AGT	16S: CGA ACA GAC CAA CCC TTA AAA GC
Referencia partidores	Lee et al. 2004	Díaz et al. 2011	Palumbi 1996
Programa para PCR	4' 94°: 35x (50' 94°, 50' 54-56°, 1' 72°); 5' 72°: ∞ 4°	4' 94°: 35x (50' 94°, 50' 54-56°, 1' 72°); 5' 72°: ∞ 4°	3' 94°: 40x (40' 94°, 30' 65°, 2' 72°); 10' 72°: ∞ 4°
Condiciones del MIX	25	25	25
por cada muestras	1µL	1µL	1µL
ADN	1X	1X	1X
Buffer	0,2mM	0,2mM	0,2mM
dNTP	1,55mM	1,55mM	1,55mM
MgCl2	0,9µM	0,9µM	0,9µM
Partidores	0,005U/µL	0,005U/µL	0,005U/µL
Taq	volumen restante	volumen restante	volumen restante
Agua estéril	~500	~500	~500
Tamaño del fragmento			
	ITS1	ITS2	
Partidor F (5' - 3')	ITS1F1: AGG AAG TAA AAG TCG TAA CAA G	ITS2F: GTC GAT GAA GAA CGC AG	
Partidor R (5' - 3')	ITS1R: GCT GCG TTC TTC ATC GAC	ITS2R1: ATA TGC TTA AAT TCA GCG GGT	
Referencia partidores	Chemil 2011	Chemil 2011	
Programa para PCR	3' 94°: 35x (40' 94°, 35' 65° 55°, 2' 72°); 10x (3' 94°, 35' 60°, 2' 72°); 5' 72°: ∞ 4°	3' 94°: 35x (40' 94°, 35' 65° 55°, 2' 72°); 10x (3' 94°, 35' 60°, 2' 72°); 5' 72°: ∞ 4°	
Condiciones del MIX	25	25	
por cada muestras	1µL	1µL	
ADN	1X	1X	
Buffer	0,2mM	0,2mM	
dNTP	1,55mM	1,55mM	
MgCl2	0,9µM	0,9µM	
Partidores	0,005U/µL	0,005U/µL	
Taq	volumen restante	volumen restante	
Agua estéril	~500	~500	
Tamaño del fragmento			

Tabla II-3: Resumen de los outgroup utilizados para cada análisis filogenético, códigos de accesos Genbank respectivos y el tamaño de fragmento aproximado obtenido luego del alineamiento.

Gen	Outgroups	Acceso Genbank	Tamaño fragmento (pb)
COI	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	JQ742947.1	933
	<i>Paracentrotus lividus</i>	NC_001572.1	
	<i>Loxechinus albus</i>	AY275550.1	
16S	<i>Hemicentrotus pulcherrimus</i>	AJ130798.1	553
	<i>Paracentrotus lividus</i>	EU399960.1	
	<i>Loxechinus albus</i>	AB154275.1	
ITS (1 y 2)	<i>Paracentrotus lividus</i>	AJ457832.1	1139
Concatenado	<i>Paracentrotus lividus</i>	NC_001572.1; EU399960.1; AJ457832.1	933 + 555 + 1139

3. Reconstrucción filogenética y tiempos de divergencia

Los análisis filogenéticos fueron realizados para cada matriz genética (16S, COI e ITS) y para una matriz construida mediante la concatenación de cada partición (16S + COI + ITS). La concatenación de las matrices fue realizada con el software Mesquite versión 2.74 (Maddison y Maddison 2010) compilando cada partición previamente alineada, mediante el software Muscle (Edgar 2004). Los modelos de mutacionales de cada gen fue obtenido mediante criterio de Akaike implementado en el software JModeltest versión 0.1.1 (Posada 2008, Guindon y Gascuel 2003), correspondiendo a GTR + Γ para 16S e ITS, mientras que para COI fue GTR I + Γ . Se infirieron las relaciones filogenéticas mediante búsquedas basadas en el criterio de Máxima Verosimilitud usando el software RaxML versión 7.0.3 (Stamatakis et al 2008), usando bootstrap con 1.000 réplicas. Además, se implementaron búsquedas bayesianas mediante el software Beast versión 1.6.2 (Drummond y Rambaut 2007) para poder dar cuenta de los tiempos de divergencia junto con las relaciones filogenéticas. Se utilizó el modelo Relaxed clock: uncorrelated Lognormal" para estimar los tiempos de divergencia, debido a que ese modelo es ampliamente utilizado y análisis realizados

mostraron que posee una mejor capacidad que el modelo "uncorrelated exponential" para predecir las tasas evolutivas en secuencias simuladas (Drummond et al. 2006). Se dató la divergencia entre el complejo de especies dentro de *Stereochinus* y el grupo *S. neumayeri* en 6,175 con una desviación estándar de la distribución normal de 0.57 (Díaz et al. 2001). Cada análisis bayesiano corrió durante 30 millones de generaciones. Mediante el software Tracer 1.5, se constató que las búsquedas bayesianas hayan alcanzado la convergencia y el tamaño efectivo de la muestra efectivo (ESS, según siglas en inglés) mayor a 200. Debido a la dificultad de llegar a la convergencia con las matrices genéticas COI y concatenadas, se realizaron análisis adicionales para esas matrices en Mr. Bayes (Ronquist y Hulsenbeck 2003) para chequear la coherencia con la búsqueda realizada en Beast. En ambos casos la búsquedas realizadas en Mr. Bayes (15 millones de generaciones) arrojaron una topología similar.

II.3 RESULTADOS

Los tamaños de los fragmentos amplificados en cada uno de los marcadores se resumen en la Tabla II-3. Las pruebas de saturación mostraron bajos niveles en todos los fragmentos amplificados, indicando que las secuencias son adecuadas para realizar reconstrucciones filogenéticas.

Relaciones filogenéticas

Las reconstrucciones realizadas para los tres genes más el análisis concatenado muestran topologías muy similares. Se destaca en primer lugar que las relaciones filogenéticas de la especie *S. bernasconiae* con el resto de las especies del género no están bien resueltas. Las topologías para los genes 16S y COI (Figura II-4 y 5) muestran a *S. bernasconiae* como grupo hermano del outgroup *Loxechinus albus*, mientras que los resultados para ITS y genes concatenados la muestran como un grupo muy distante del resto de la especies, pero no permiten descartar la monofilia (Figura II-6 y 7).

En cuanto al resto de las especies, ellas aparecen como dos grupos monofiléticos en todas las topologías y se observa una importante divergencia entre el clado que agrupa a todas las poblaciones de *S. neumayeri* y el clado que une al resto de las especies (complejo *Stereochinus*), en el cual no se observan relaciones filogenéticas claras entre

las especies, salvo *S. dentifer* (Figura II-4 b, c, d).

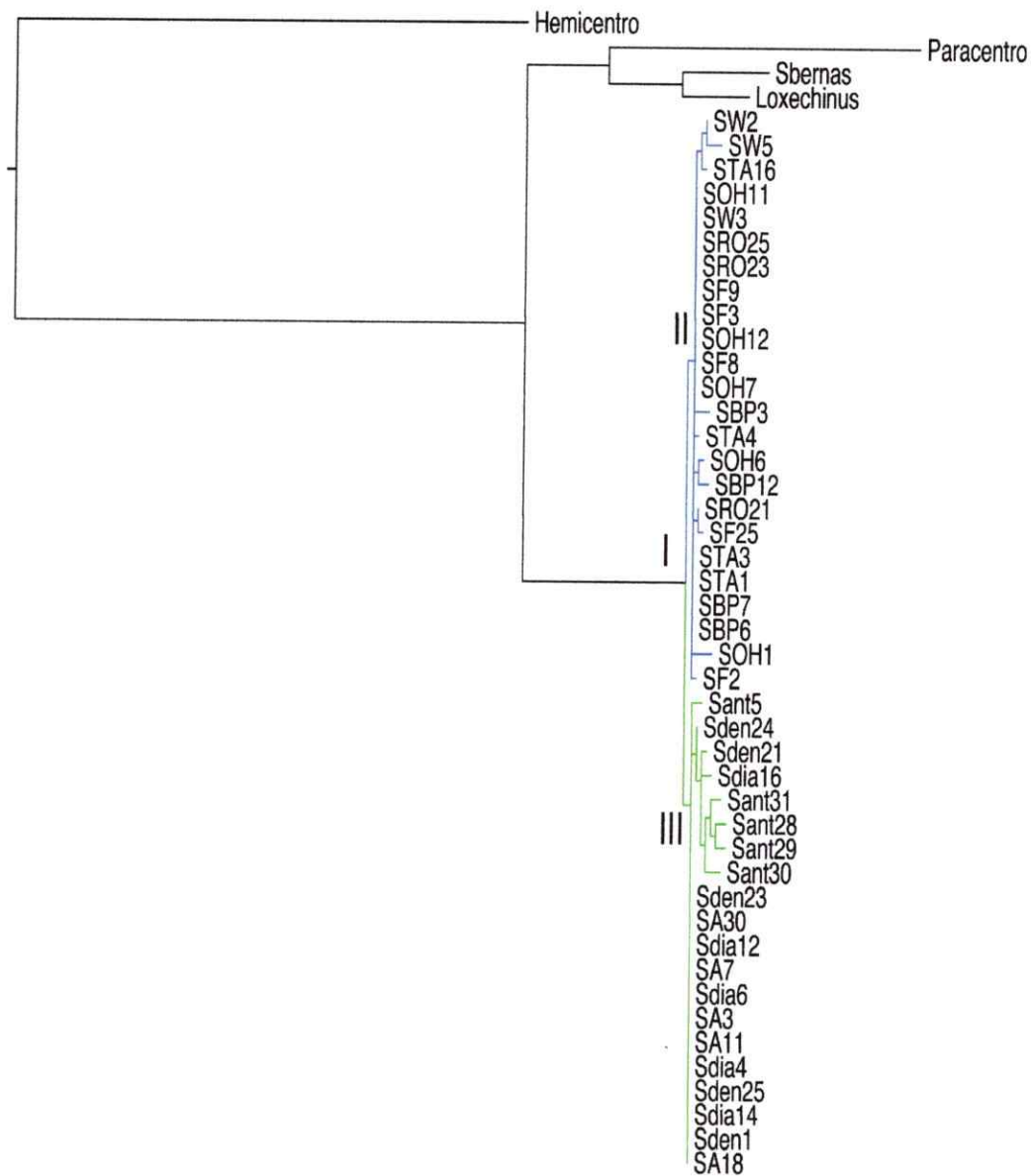


Figura II-4: Filograma del género *Sterechinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el gen 16S. El subclado color verde corresponde al complejo *Sterechinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Sterechinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4.

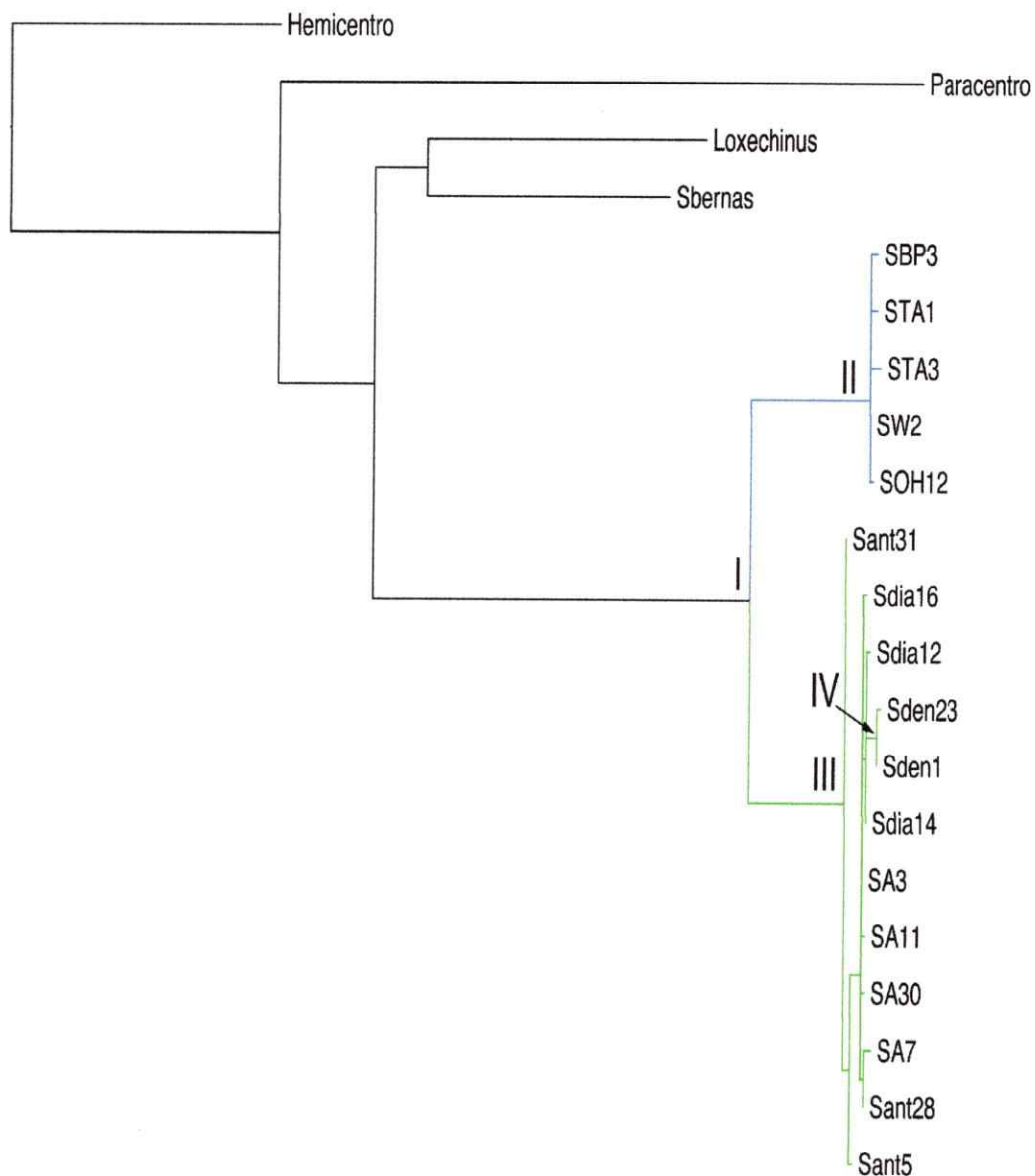


Figura II-5: Filograma del género *Sterechnus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el gen COI. El subclado color verde corresponde al complejo *Sterechnus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Sterechnus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4.

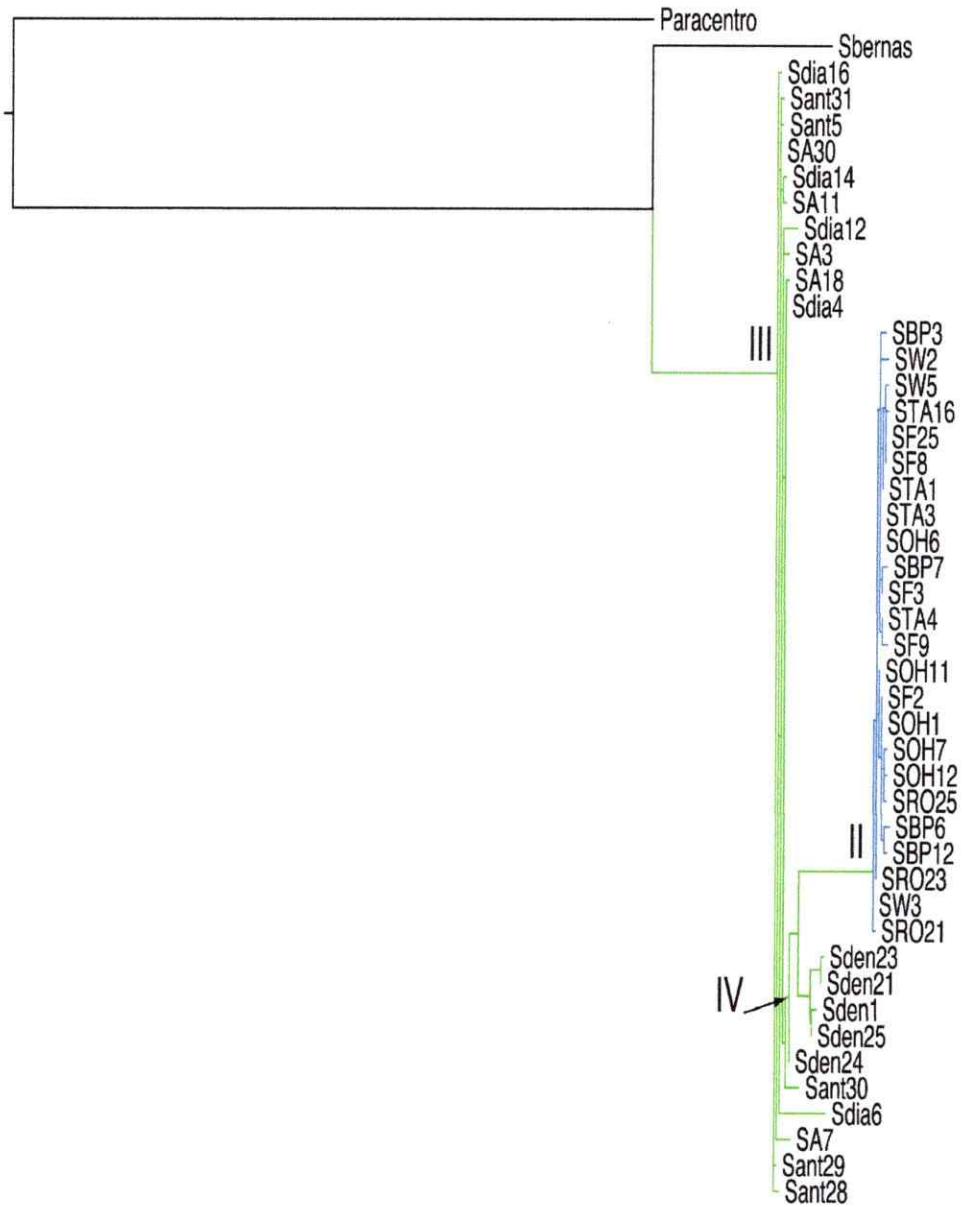


Figura II-6: Filograma del género *Stereochinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el gen ITS. El subclado color verde corresponde al complejo *Stereochinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Stereochinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4.

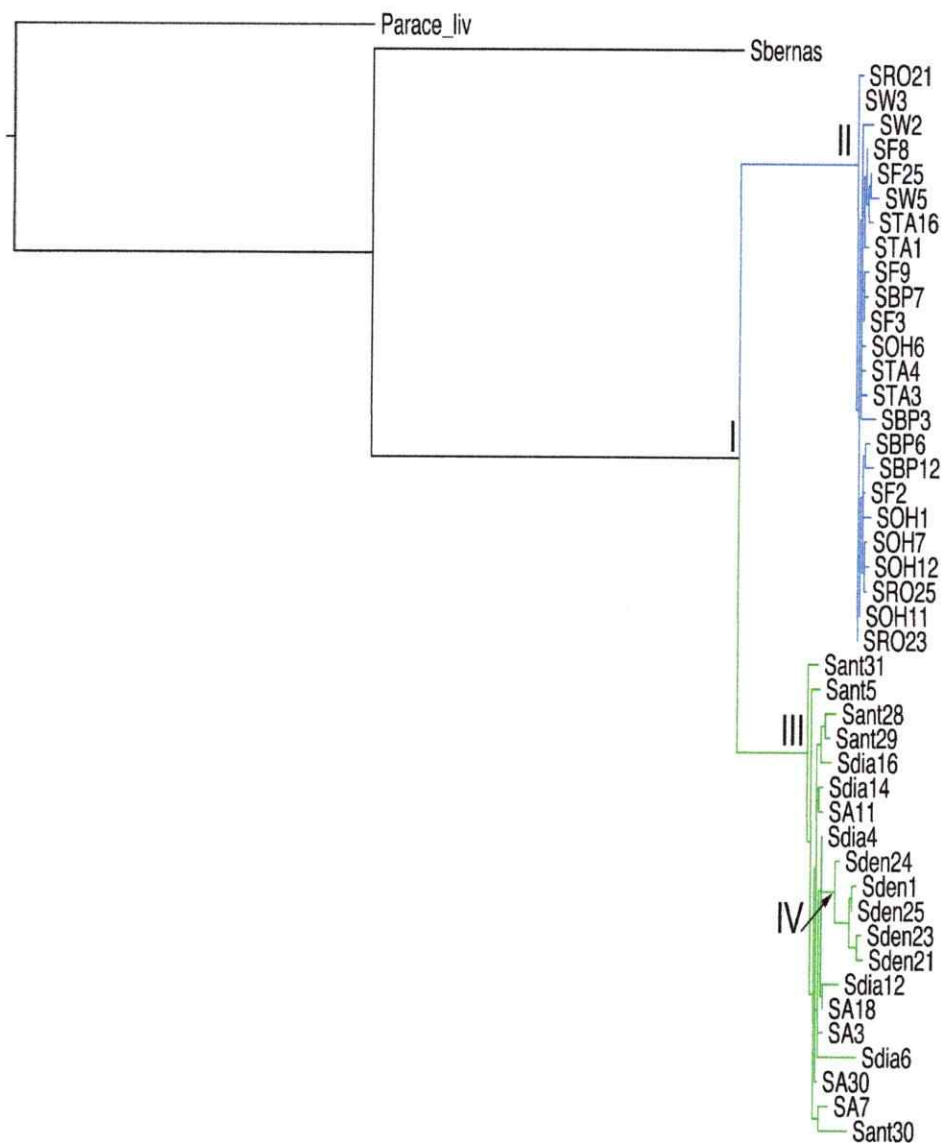


Figura II-7: Filograma del género *Stereochinus* mediante búsquedas de máxima verosimilitud para el análisis con genes concatenados. El subclado color verde corresponde al complejo *Stereochinus* y en azul se encuentra el subclado constituido por *S. neumayeri*. La codificación de cada ingroup esta en la tabla II-1, las distintas localidades muestreadas para *S. neumayeri* y las distintas especies del complejo *Stereochinus*. Los números romanos indican los nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el grupo, los valores de soporte y las fechas de divergencias se encuentran en la tabla II-4.

Todos los genes son congruentes en separar a *S. neumayeri* del complejo (clado I), sólo el análisis independiente para el gen ITS muestra una diferencia al ubicar al clado de *S. neumayeri* (clado II) como grupo hermano del que representa a la especie más profunda del género, *S. dentifer* (clado IV) (Figura II-6). Este un punto importante, puesto que tres de los 4 grupos de análisis son capaces de discriminar a este pequeño clado IV, emergente del clado que representa al complejo *Stereochinus* (clado III) (Figura II-5, 6 y 7).

Tabla II-4: Resumen de valores de soporte de bootstrap (RaxML), probabilidades a posteriori (Beast) y edad estimada (Beast) de aquellos nodos que marcan los principales eventos de divergencia en el género *Stereohinus*. La ausencia de un valor indica que ese nodo no fue apoyado por el análisis. * En paréntesis los valores bayesianos de probabilidad a posteriori obtenidos en Mr. Bayes (ver materiales y métodos).

Nodo	COI				ITS				Concatenación			
	Valor de Bootstrap	Probabilidad a posteriori	Edad (Ma) (95% intervalo de confianza)	Valor de Bootstrap	Probabilidad a posteriori (*)	Edad (Ma) (95% intervalo de confianza)	Valor de Bootstrap	Probabilidad a posteriori	Edad (Ma) (95% intervalo de confianza)	Valor de Bootstrap	Probabilidad a posteriori (*)	Edad (Ma) (95% intervalo de confianza)
I	100	0.69	3.99 (1.7-5.7)	100	0.98 (1.0)	5.3 (3.6-6.7)	-	-	-	100	1.0 (1.0)	5.1 (3.3-6.6)
II	62	0.7	3.06 (1.1-5.0)	100	0.94 (1.0)	3.1 (1.3-4.7)	98	1	2.8 (1.2-4.6)	100	1.0 (1.0)	2.3 (0.1-4.3)
III	-	-	-	99	0.79 (1.0)	3.4 (1.5-5.1)	92	0.97	4.1 (2.1-6.1)	96	1.0 (1.0)	3.3 (1.6-5.3)
IV	-	-	-	84	1.0 (0.98)	1.1 (0.1-2.4)	-	-	-	74	1.0 (1.0)	1.8 (0.5-3.6)

En cuanto a los valores de soporte para los distintos análisis realizados, los clados I, II y III son los que reciben mayores bootstrap y probabilidad *a posteriori*. El análisis independiente para el gen 16S es el que muestra valores mas bajos, pero a medida que se avanza en el estudio de los demás genes los valores de soporte aumentan y ya el análisis concatenado muestra valores de soporte y probabilidades más robustos para los cuatro nodos (clados) de interés (Tabla II-7).

Tiempos de divergencia

Los tiempos de divergencia entregados por los análisis sitúan la separación entre *S. neumayeri* y el complejo *Sterechinus* entre 3,99 y 5,1 Millones de años atrás. Es interesante notar que dichos análisis permiten establecer un tiempo para eventos de cladogenesis en los clados de *S. neumayeri* y el complejo distintos, ya que según los resultados obtenidos primero habría ocurrido la diversificación del complejo, entre 3,3 y 4,1 Ma y luego la diversificación de *S. neumayeri*, entre 2,3 y 3,1 Ma. Por otra parte, se observa una reciente diversificación desde el complejo hacia las grandes profundidades de Antártica, representada por la especie *S. dentifer*, a mediados del pleistoceno, entre tan sólo 1,1 y 1,8 Ma (Tabla II-3).

II.4 DISCUSION

La distribución de la fauna marina bentónica en el Océano Austral (OA) es sin duda el reflejo de complejas interacciones entre procesos geológicos, oceanográficos y biológicos en el tiempo y en el espacio (Clarke y Crame 1989, Crame 1999, Clarke y Johnston 2003, Thatje *et al.* 2005 b, Linse *et al.* 2006, Clarke *et al.* 2007, Aronson *et al.* 2007). La interpretación de los patrones de 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 del hemisferio sur (Griffith *et al.* 2009) y si bien desde el siglo pasado diversos investigadores han tratado de explicar los patrones de distribución del bentos en el OA (Ekman 1928, Powell 1965, Hedgpeth 1969), una pregunta fundamental y previa es validar las categorías de las especies descritas.

Sobre los tiempos, modos de origen y diversificación de la fauna marina bentónica en el Océano Austral, la presente investigación entrega un valioso aporte, resultante de un

muestreo exhaustivo de las especies que conforman al género *Sterechinus*, las relaciones evolutivas entre ellas y estimaciones de los tiempos de divergencia que indican la separación del género.

Es importante descartar algún error sobre la correcta identificación del espécimen estudiado, para esto se contó con la asesoría del taxónomo experto en equinodermos Dr. Thomas Saucède (UFR Sciences de la Vie, de la Terre et de l'Environnement, Université de Bourgogne), quien validó la clasificación de las muestras otorgada por el Dr. Sellanes. A pesar de no tener dudas acerca de la clasificación de los individuos, los análisis realizados no fueron evidencia suficiente para considerar a la especie *S. bernasconiae* como parte del género *Sterechinus*. No obstante, análisis anexos con esta especie, una rápida búsqueda con el programa Blast en GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), para determinar a qué secuencias disponibles en la base de datos se asemejaban las nuestras, los resultados arrojaron un 99% de congruencia con las secuencias de *Gracilechinus multidentatus*, mientras que con *Sterechinus neumayeri* muestra un 86% de congruencia. Esta especie pertenece a otro género de la familia *Echinidae*, cuya distribución conocida es para la zona profunda de Nueva Zelanda. Además, análisis que forman parte de otra investigación, ubican a "*S. bernasconiae*" como un grupo muy distante y distinto de las especies de *Sterechinus* y muy relacionado con las secuencias de *G. multidentatus* (Figura II-5). Sin duda nuestros resultados dan cuenta de la problemática que significa la clasificación taxonómica del grupo *Sterechinus* (y quizás de la familia *Echinidae*), puesto que a pesar de reconocerse las especies como tales, en base a claves y los caracteres diagnósticos descritos, estudios exhaustivos como el presente, en base a caracteres moleculares, no son congruentes. Es importante recordar en este punto la reflexión que realizó Mortensen (1936), quien a pesar de realizar la clasificación y descripción de la especie *S. agassizii*, intuía la probable estrecha relación de dicha especie con *S. diadema* y *S. antarcticus*. Según los resultados de la presente investigación su planteamiento es válido, lo que implica la necesidad de un nuevo esfuerzo para procurar encontrar nuevos caracteres diagnósticos que permitan una nueva clasificación de las especies.

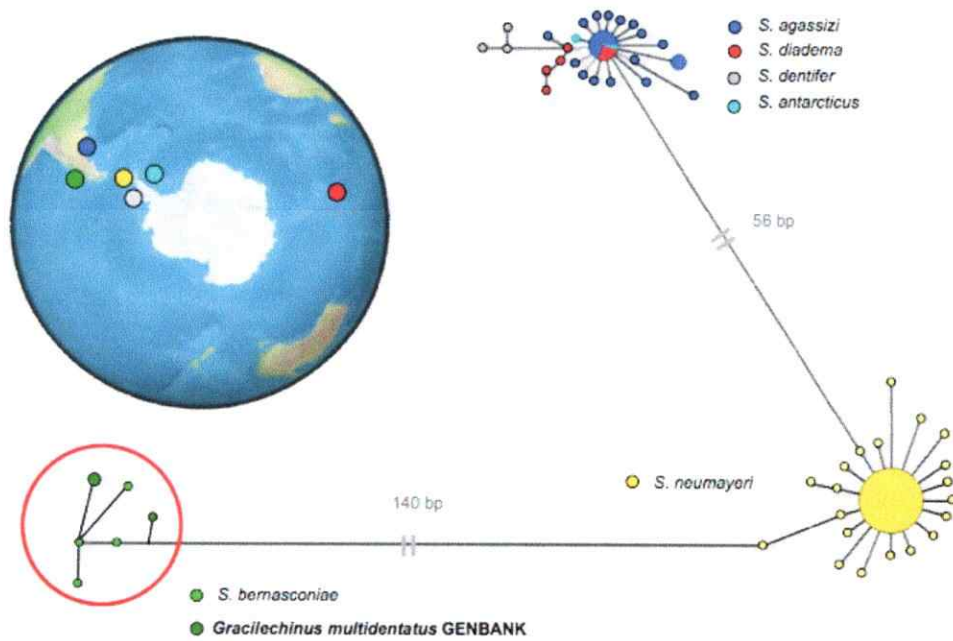


Figura II-8: Esquema que muestra las relaciones genealógicas de las especies del género *Stereochinus* con las muestras identificadas como *S. bernasconiae* y *Gracilechinus multidentatus* obtenidas desde GENBANK.

Por lo tanto, según la información expuesta, las especies del género *Stereochinus* conforman dos grupos muy diferenciados: uno representado exclusivamente por la especie *S. neumayeri* y otro que agrupa al resto de las especies del género, corroborando lo publicado por Díaz *et al.* (2011). De acuerdo a las fechas estimadas, el inicio de la divergencia entre las especies del género *Stereochinus* ocurre entre finales del Mioceno y principios del Plioceno. Este periodo estimado indica que las poblaciones someras de Antártica y Subantárticas someras/profundas mantuvieron una importante conectividad muy posterior a la separación física de los continentes, la cual puede ser sustentada por la presencia de una larva de alta capacidad de dispersión y prolongada vida en el plancton.

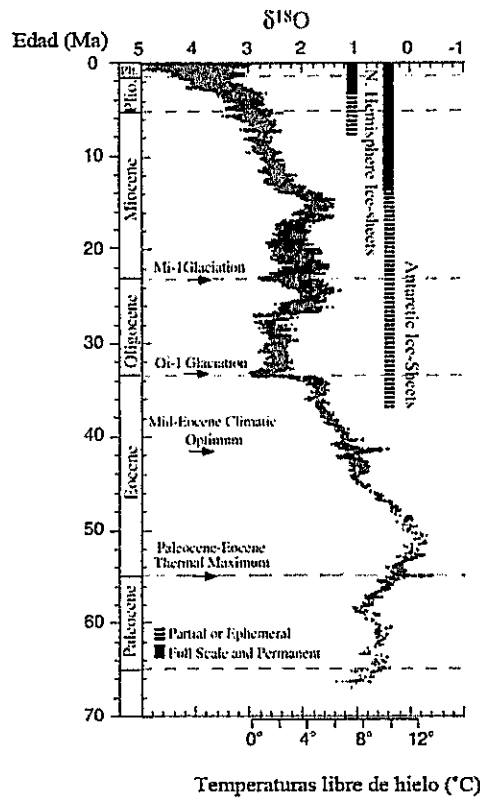


Figura II-9: Paleorreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 70 Ma, (Extracto de Zachos *et al.* 2001)

El origen y diversificación de *Sterechinus* habría ocurrido a fines del Mioceno e inicios del Plioceno. Stankovich *et al.* (2002), a través del análisis de dos genes mitocondriales estiman la divergencia de peces nototénidos Subantárticos en 6.6 – 7.0 Ma, mientras que el análisis de ADN en dos especies provenientes de ambos lados del frente polar de *Euphausia*: *E. vallentini* y *E. frigida*, indican que se diversificaron hace 7 Ma (Bargelloni *et al.* 2000 b). Crame (1999) sugiere que a fines del Mioceno (12 – 10 Ma) habría ocurrido un mayor y rápido desarrollo de la capa de hielo que cubre la región Oeste del continente Antártico, durante el Mioceno – Plioceno, como producto del cambio en la velocidad de la corriente circum-antártica (David *et al.* 2005), con esto habría ocurrido un marcado patrón de zonación vertical y horizontal en el OA que sería responsable de una intensificación de la CCA, promoviendo la diferenciación entre las faunas Antárticas y Subantárticas. Por su parte Zachos *et al.* (2001), describen que posterior al peak del calentamiento ocurrido a los 15 Ma (óptimo climático, Figura II-6), continua un congelamiento gradual y restablecimiento de una mayor capa de hielo sobre

la Antártica por espacio de 10 Ma, seguido de un enfriamiento adicional que generó una nueva expansión de la capa de hielo en la parte Oeste del continente, fenómeno que incluso se registró en el Ártico (Figura II-6), (Gersonde 1987, Zachos *et al.* 2001). Junto con esta evidencia y a través de un particular ensamble de silicoflagelados (indicador de estrés medioambiental), se plantea que durante el Mio-Plioceno ocurrió una considerable inestabilidad de la capa de hielo en Antártica y por ende una importante variabilidad oceánica. Si las observaciones de Crame (1999) son correctas, la diversificación y diferenciación de *Sterechinus* en el OA podría estar asociada al posible efecto vicariante que habría tenido una intensificación de la CCA durante el Mioceno medio. Evidencia biológica adicional aportada por Page y Linse (2002), estimaron un tiempo de separación similar al señalado para *Sterechinus*, en especies de gastrópodos del género *Limatula* (*L. ovalis* y *L. pygmaea*), en aproximadamente 5.8 – 8 Ma con el gen 16S. Al igual que en peces nototénidos (Clarke y Johnston 1996, Bargelloni *et al.* 2000a) y moluscos del género *Nacella* (Gonzales-Wevar *et al.* 2010) quienes también revelan un periodo similar para la divergencia entre especies provenientes de Antártica (*N. concinna*) y la región de Magallanes en el extremo sur de Sudamérica (*N. magellanica*, *N. deurata* y *N. mytilina*) de aproximadamente 7 Ma.

Los resultados detectan señales que evidencian un flujo genético entre provincias Subantárticas del OA lo que sugiere que la distancia geográfica no constituye una barrera efectiva para el flujo genético en el género sobre todo entre zonas someras de regiones biogeográficas distantes (O' Foighil *et al.* 1999, Page y Linse 2002, Donald *et al.* 2005 a-b, Waters 2007, Gérard *et al.* 2008, Fraser *et al.* 2009) (Figura II-7).

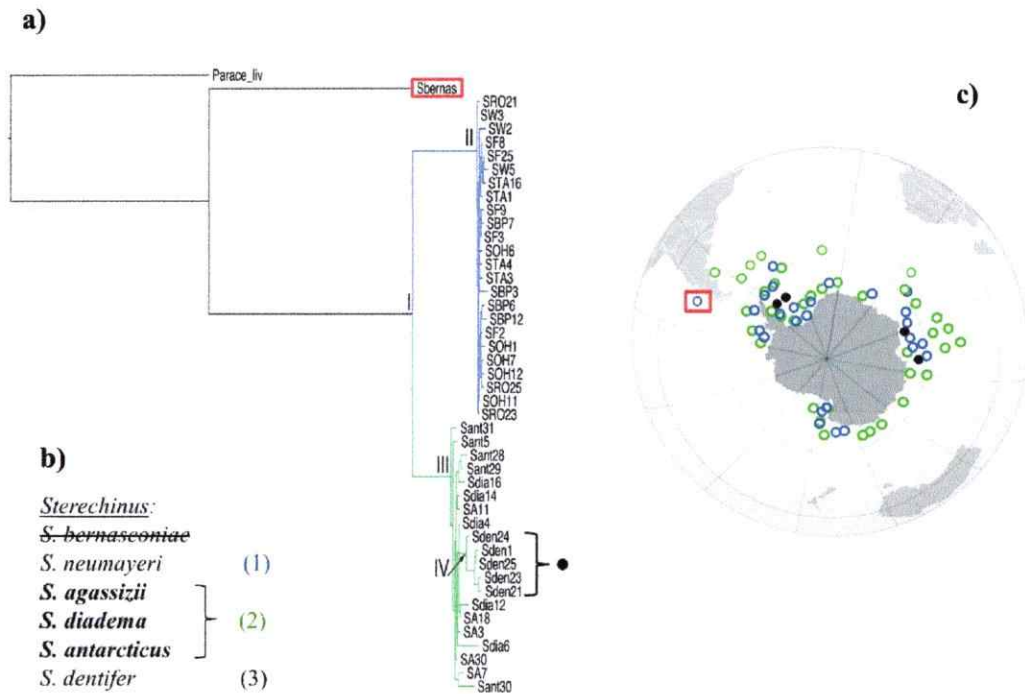


Figura II-10. Esquema que resume los principales resultados de la investigación. a) Relaciones filogenéticas basadas en el análisis de genes concatenados; b) El número de especies que grupos que existen para el género *Stereochinus*; y c) Distribución geográfica de las especies o grupos taxonómicos definidos por los análisis.

**CAPITULO III: DISPERSIÓN A GRAN ESCALA EN EL OCÉANO AUSTRAL:
ANILLOS DE CONECTIVIDAD EN LAS REGIONES ANTÁRTICA Y
SUBANTÁRTICA Y VÍAS EVOLUTIVAS ENTRE AMBAS REGIONES A
TRAVÉS DE LAS GRANDES PROFUNDIDADES.**

III.2 INTRODUCCION

El Océano Austral (OA) abarca un área de $\sim 3,800,000 \text{ km}^2$, cuyo 60% se encuentra cubierto por hielo durante el máximo de invierno (Zwally *et al.* 2002, Aronson *et al.* 2007). Este océano incluye distintas masas de agua y los mares Antárticos de Amundsen, Bellinghausen, Ross, Cooperación, Cosmonauta, Escocia, Weddell y parte del Paso de Drake (Knox 2007). La circulación del OA está dominada por la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) (Figura III-1), un sistema de corriente que conecta a los mayores océanos: Pacífico, Atlántico e Índico, al sur de los 60° S , y por lo tanto juega un importante rol en la distribución global de calor, sales y gases (Rintoul *et al.* 2001, Cunningham *et al.* 2003, Meredith *et al.* 2004, Florindo y Siegert 2009). La delimitación del OA incluye zonas de mezcla entre y dentro de los océanos anteriormente mencionados y, aunque no existe un límite claro y definido con el régimen Subantártico, el frente subtropical representa un claro gradiente en las propiedades superficiales de las aguas que lo separan de las aguas más templadas y salinas de la circulación subtropical (Orsi *et al.* 1995, Gille 2002, Meredith *et al.* 2004).

La Corriente Circumpolar Antártica es el mayor sistema de corriente del planeta, con una extensión de $\sim 24000 \text{ km}$ (Whitworth 1988) y con un volumen de $136.7 \pm 7.8 \text{ Sv}$ ($1 \text{ Sv} = 10^6 \text{ m}^3 \text{ seg}^{-1}$) en el Paso de Drake (Cunningham *et al.* 2003, Orsi *et al.* 1995, Rintoul *et al.* 2001, Barker *et al.* 2004). Se encuentra delimitada al norte por los frentes polar y subantártico y por el continente Antártico al sur, fluye en dirección este-oeste y posee altas velocidades a nivel de los extremos de sus frentes y se hace más lenta ($<20 \text{ cm/seg.}$) hacia su interior (Orsi *et al.* 1995, Pickard y Emery 1995, Rintoul *et al.* 2001). Ambos frentes son verticalmente coherentes y alcanzan grandes velocidades hacia mayores profundidades, Su profundidad alcanza los 2000-4000 m y posee un ancho de hasta 2000 kms (Knox 2007). Estas características tienen grandes implicancias para la ecología de la región ya que actúa como una barrera a la dispersión genética de algunas especies hacia/desde el resto de los océanos (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).

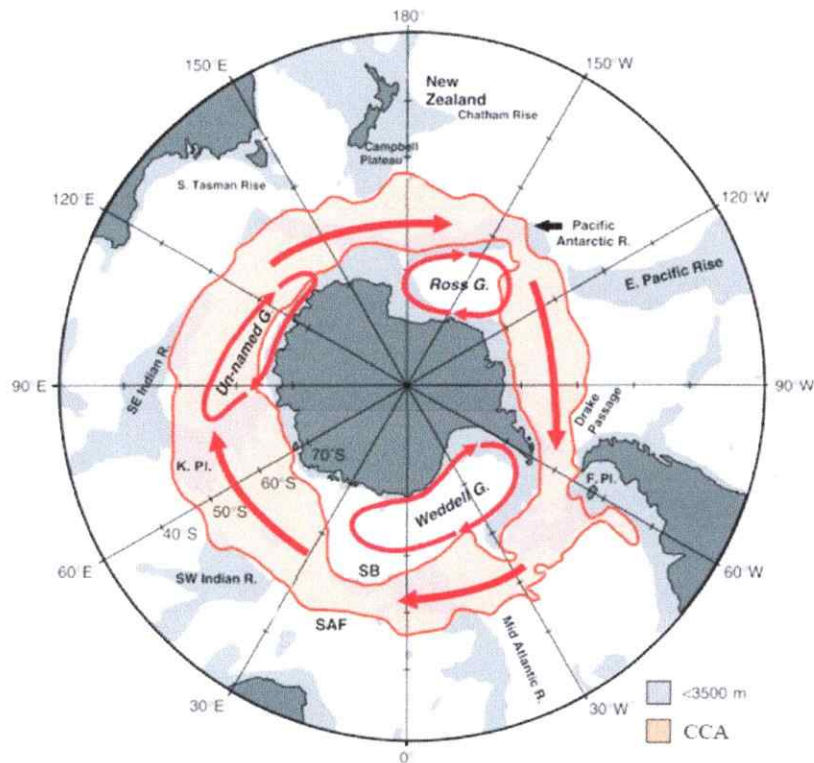


Figura III-1: Elementos del Océano Austral: Corriente Circumpolar Antártica (CCA); Frente Polar Antártico (SAF); Giros del Mar de Weddell y Ross. (Extraído de Florindo F. y M. Siegert, 2009)

La CCA, originalmente denominada como “Deriva de los vientos de Oeste” (Deacon 1937) debido a que los vientos del Oeste de latitudes medias a altas son los que fuerzan y dan sentido a su circulación (Orsi *et al.* 1995, Whitworth *et al.* 1998), presenta una velocidad promedio que varía entre 15 a 24 kts (1 knot = 1.852 km/h). Es una corriente fría con temperaturas promedio que varían entre -1 a 5°C según el periodo del año y latitud. A mayores latitudes disminuye su salinidad superficial (Orsi *et al.* 1995, Knox 2007), debido a la combinación y redistribución con otras masas de aguas (Smith

et al. 2008).

En cuanto al origen de la CCA, este se encuentra estrechamente relacionado con los cambios tectónicos y climáticos ocurridos en la región durante los últimos 200 Ma (Coleman 1980, Kennet 1980, Crame 1999, Lawver y Gahagan 2003, Fitzgerald 2002, Barker *et al.* 2007, Knox 2007). La fragmentación en dos grandes bloques continentales del supercontinente Gondwana, en el Jurásico temprano (208 – 158 Ma), separó por el este a Antártica, Australia, Madagascar e India, y por el oeste a Sudamérica y África (Crame 1999, Jokat *et al.* 2003, Torsvik *et al.* 2008). Este proceso de fragmentación y dispersión culminó con dos importantes eventos: (1) a fines del Oligoceno (33,5 - 32 Ma), el distanciamiento entre Antártica y Australia, que dio inicio a la formación y profundización (> 2000 m) del mar de Tasmania (Barker *et al.* 2007, Pfühl y McCave 2005, Torsvik *et al.* 2008) y (2) la apertura del paso de Drake, que corresponde al último gran evento tectónico 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 y Livermore 2002, Pfühl y McCave 2005, Scher y Martin 2006, Barker *et al.* 2007, Lyle *et al.* 2007). La apertura del Paso de Drake y la formación del Arco de Escocia, entre los 29,7 Ma y 21.8 Ma (Barker 2001, Eagles y Livermore 2002), completan el aislamiento geográfico del continente y habrían permitido la circulación profunda e intensificado el proceso de disminución de las temperaturas superficiales del Océano Austral (Clarke y Crame 1989-1992, Lawver y Gahagan 2003, Lyle *et al.* 2007, Torsvik *et al.* 2008). A partir de entonces 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, FiguraIII-1) (Zachos *et al.* 2001).

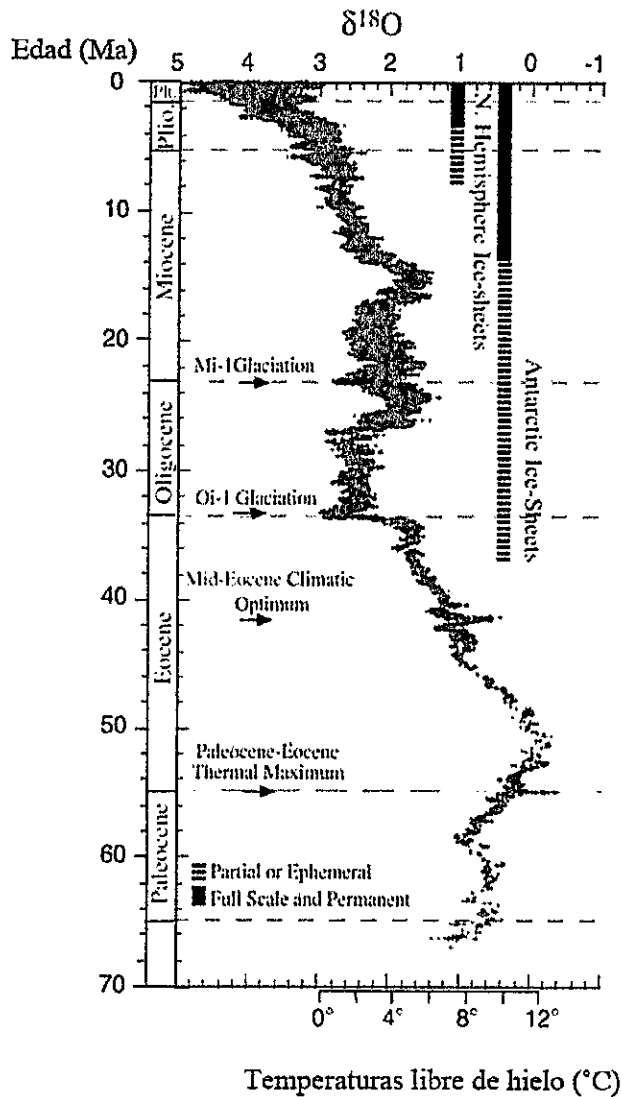


Figura III-2: Paleoreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 70 Ma, (Extracto de Zachos *et al.* 2001)

La fauna marina bentónica del Océano Austral difiere substancialmente de otras regiones debido a la historia geológica del continente Antártico, a las barreras que se han instalado alrededor del continente desde su separación con Sudamérica (Distancia geográfica, corriente oceánica y existencia de grandes profundidades), y a las extremas condiciones medioambientales a las cuales están expuestas las especies (Clarke 1983, Lawver *et al.* 1992, Crame 1999, Aronson y Blake 2001, Peck 2002, Clarke *et al.* 2005, Pfuhl y McCave 2005, Tripathi *et al.* 2005). Por lo tanto, la biodiversidad actual es el

resultado de los procesos biogeográficos y evolutivos direccionados por la tectónica de placas y eventos climáticos desde el Mesozoico (Clarke y Crame 1989, Crame 1999, Zachos *et al.* 2001, Bryt y Yreoli 2005, Pfuhl y McCave 2005, Scher y Martin 2006, Bryt *et al.* 2007, Rogers 2007, Aronson *et al.* 2007). Como resultado de los varios procesos anteriores se generó una rica fauna endémica (~ 15000 especies, Gutt *et al.* 2004), que habita una plataforma continental angosta e inusualmente profunda (cerca de 450 m de ancho y sobre 1000 m de profundidad en algunos lugares), alrededor de Antártica (Poulin *et al.* 2002, Clarke y Johnston 2003, Clarke *et al.* 2005, Thatje 2005).

A pesar del aislamiento experimentado hace millones de años, Arntz *et al.* (2005), sugiere una importante conexión entre la fauna marina bentónica de la Península Antártica y la región de Magallanes explicada por la historia geológica en común de ambos continentes. Desde la década de los 70' se ha planteado la posibilidad de intercambio de fauna posterior a la separación de los continentes (Dell 1972), argumentándose que la CCA y el frente polar podrían no haber alcanzado suficiente intensidad al inicio del proceso tectónico (Barker y Thomas 2004, Hassold *et al.* 2009). En este sentido, evidencia más reciente sobre la recolección de larvas e individuos adultos de decápodos braquiuros (i.e. *Hyas aranaeus*), un grupo históricamente ausente dentro de la convergencia Antártica, permiten sugerir una probable reconexión de faunas entre Antártica y Sudamérica (Thatje y Fuentes 2003, Tavares y De Melo 2004). Si bien dichos estudios apuntan a probables procesos operando a una escala temporal mucho más reciente (é.g., cambio climático con efecto sobre regímenes oceanográficos), sugieren la posibilidad de contactos actuales entre dichas faunas, equivalentes a los propiciados por cambios oceanográficos similares que se habrían producido durante periodos interglaciares del Pleistoceno. Por otra parte, otros estudios son más tajantes al plantear que ni la CCA ni el Frente Polar serían barreras absolutas (Stanchowicz *et al.* 2002, Page y Linse 2002).

Entre los mecanismos que pueden explicar una eventual reconexión entre la fauna Antártica y la región Subantártica, encontramos la dispersión larval (Ó Foighil *et al.* 1999, Coyer *et al.* 2001, Gerard *et al.* 2008) y el rafting (Fraser *et al.* 2009). Ya sea por migración activa o por transporte pasivo a través de corrientes, la dispersión de individuos permitiría una rápida recolonización de las áreas perturbadas por el hielo (Poulin *et al.* 2002, Díaz *et al.* 2011, González-Wevar *et al.* 2011). En cuanto al transporte activo por corrientes, el Océano Austral presenta dos importantes corrientes: (a) la Corriente Circumpolar Antártica, que ha sido considerada como responsable de la

distribución circumpolar de algunas especies de eufáusidos y nototénidos (Bargelloni *et al.* 2000), (b) la Corriente Antártica Costera (CACo) o de la deriva del Este (Deacon 1937), que fluye hacia el Oeste alrededor del continente Antártico.

Por otra parte, la estrecha similitud descrita entre la fauna marina bentónica de la plataforma continental Antártica y la que habita las grandes profundidades ha llevado a varios autores a plantear una continuidad entre ambos ambientes que además podría permitir una conexión con la región Subantártica (Clarke y Crame 1997, Held 2000, Rogers 2000, Briggs 2003, Gage 2004, Clarke *et al.* 2005, Bryt *et al.* 2007, Strugnell *et al.* 2008). La amplia distribución batimétrica de crustáceos isópodos en el Océano Austral reveló una compleja historia evolutiva que abrió una interesante discusión sobre las relaciones evolutivas entre la fauna somera y profunda del continente Antártico (Menzies *et al.* 1973). De este debate científico surgieron dos hipótesis que proponen explicar las relaciones evolutivas de estas faunas: 1) Submergencia Evolutiva Polar, donde taxa someros habrían colonizado las grandes profundidades, y 2) Emergencia Evolutiva Polar, en la cual taxa que habitan las profundidades habrían colonizado la zona somera (Menzies *et al.* 1973, Zinsmeister y Feldmann, 1984, Clarke y Crame 1989, Bryt 1991-1992, Crame 1999, Bryt *et al.* 2007, Aronson *et al.* 2008).

En cuanto a la historia climática reciente de Antártica, los ciclos glaciales del Pleistoceno se caracterizaron por la extensión y contracción de una gruesa capa de hielo (entre 500 y 1000 m), que cubría la plataforma continental y hasta unos 100 km del talud continental (Grobe y Mackensen 1992). La importante perturbación que implican estos periodos glaciales, principalmente para la fauna que habita los fondos marinos, ha generado un gran interés científico sobre las estrategias que ha desarrollado su fauna para tolerarlos (Kennet 1977, Brey *et al.* 1996, Zachos *et al.* 2001, Convey *et al.* 2008). En este sentido, tres hipótesis han sido propuestas para explicar la sobrevivencia de especies bentónicas que habitan la plataforma continental Antártica durante los periodos de máximos glaciales. La primera hipótesis sugiere que muchos taxa bentónicos antárticos habrían extendido su rango batimétrico en comparación con especies similares en otras plataformas continentales. Esto habría permitido movimientos hacia y desde las zonas más profundas (Brey *et al.* 1996), y podría ser una adaptación evolutiva que habría permitido mantener grandes tamaños poblacionales y una diversidad genética importante durante los periodos glaciales. Ejemplo de esto son el nudibranquio *Doris kerguelensis* (Wilson *et al.* 2009) y el picnogónido *Nymphon australe* (Mahon *et al.* 2008, Arango *et al.* 2011). La segunda hipótesis propone que de acuerdo al modelo

de expansión - contracción de la capa de hielo durante los periodos glaciales del Cuaternario (Provan y Bennett 2008), es probable que taxa con un estrecho rango batimétrico, cuyos ecosistemas fueron completamente perturbados por la extensión del hielo, podrían haber soportado los máximos glaciales en los extremos norte de su distribución tales como islas subantárticas del arco de Escocia y otras áreas subantárticas (González-Wever *et al.* 2011, Hoffmann *et al.* 2011), donde los ecosistemas someros habrían sido menos impactados (Convey *et al.* 2008). De acuerdo a esto, poblaciones actuales pueden presentar recientes procesos de recolonización. La tercera hipótesis plantea la persistencia de taxa en refugios glaciales *in situ* como se ha demostrado en invertebrados antárticos terrestres que incluyen a especies de ácaros, colémbolos, copépodos (Convey y Stevens 2007, Rogers 2007, Convey *et al.* 2008) y algas verdes (De Wever *et al.* 2009).

El análisis espacial de linajes genéticos es necesario para reconstruir la historia evolutiva de especies Antárticas. Aunque estudios de este tipo son relativamente escasos debido a la compleja logística que conllevan, la mayoría de los trabajos realizados se han concentrado en peces, crustáceos y moluscos, y han abordado amplias interrogantes acerca de la colonización de hábitat, patrones de ocurrencia de especies y adaptaciones evolutivas (Stanchowicz *et al.* 2002). Sin embargo, estudios que examinen las relaciones evolutivas entre fauna somera y profunda del Océano Austral son aún escasos, más aún aquellos que planteen escenarios biogeográficos que puedan explicar la historia evolutiva de un linaje dentro y fuera de la convergencia Antártica, además del efecto de los ciclos glaciales sobre la fauna bentónica somera del continente (Held, 2000, De Mesel *et al.* 2006, Bryt *et al.* 2007, Strugnell *et al.* 2008, Díaz *et al.* 2011).

El género de erizos regulares *Sterechinus* (familia Equinidae, Orden Equinoidea), representado por cinco especies nominales clasificadas principalmente en base a criterios morfológicos y biogeográficos, conforma un buen modelo de estudio para abarcar distintas interrogantes sobre la evolución de la fauna marina bentónica de Antártica, sobre la base de las relaciones evolutivas entre la zona somera y profunda del continente y de éste con la zona Subantártica. Esta aproximación es posible debido a que dicho género presenta tres especies con una distribución circumantártica: *S. neumayeri* (Meissner, 1900), es la especie de erizo regular más abundante en los fondos marinos someros de Antártica (Clarke, 1992), mientras que *S. antarcticus* (Koehler, 1901) y *S. dentifer* (Koehler, 1926), habitan mayores profundidades (sobre los 500 m), siendo *S. dentifer* la especie restringida a mayores profundidades (1200 – 1600 m)

(David *et al.* 2005a). Las dos especies restantes son de distribución Subantártica y ambas habitan la zona somera: *S. diadema* (Studer, 1876), es endémica del archipiélago de Kerguelen, y *S. agassizii* (Mortensen, 1910) habita la plataforma continental Argentina (entre los 55° y 35' LS) (David *et al.* 2005a).

El estudio realizado por Díaz *et al.* (2011), reveló nuevas interrogantes sobre el origen y evolución del género *Sterechinus*. En base a secuencias parciales del gen mitocondrial COI, plantean una fecha de divergencia entre las faunas someras de las regiones Antártica y Subantártica muy posterior a la separación física de los continentes Antártico y Sudamérica (aproximadamente 5 millones de años atrás). Proponen la hipótesis de que el género estaría representado por sólo dos grupos (linajes): uno que representa exclusivamente a la especie Antártica somera (*S. neumayeri*) y, un segundo grupo que relaciona estrechamente a las especies de distribución Antártica profunda (*S. antarcticus* – *S. dentifer*), con las especies de distribución Subantártica somera (*S. agassizii* – *S. diadema*), denominado “complejo *Sterechinus*”. De lo anterior se desprende además la hipótesis de que existirían dos importantes anillos de conectividad oceánica impulsados por distintas corrientes del Océano Austral: uno en la región Subantártica impulsado por la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), que mantendría conectadas a las especies que habitan la costa de Argentina y la Isla Kerguelen, mientras que el otro anillo se ubica en la región Antártica, impulsado por la corriente Antártica costera (CACo), que conectaría a las distintas poblaciones de *S. neumayeri* alrededor del continente. En base a la información existente sobre el género *Sterechinus*, el objetivo de esta investigación es, a través de la utilización de marcadores multilocus (microsatélites) y el marcador mitocondrial COI: a) evaluar el efecto de la historia climática reciente de Antártica (periodos glaciales del Pleistoceno) sobre la especie Antártica de distribución bentónica somera *S. neumayeri*, b) evaluar la existencia de anillos de conectividad en la región Antártica y Subantártica y c) determinar la conexión y probable relación evolutiva entre ambas regiones, a través de las grandes profundidades, estudiando las relaciones entre las especies del complejo *Sterechinus*.

III.2 MATERIALES Y METODOS

Recolección de Muestras

Las muestras de la especie *S. neumayeri* fueron obtenidas desde la zona somera

de distintas localidades alrededor de Antártica (Tabla III-1, Fig. III-3). Las muestras de *S. diadema* y *S. agassizii* fueron recolectadas desde la zona submareal somera del archipiélago Kerguelen y la plataforma continental de Argentina, respectivamente. En el caso de las muestras profundas correspondientes a la especie *S. dentifer*, fueron dragadas en la zona del mar de Bellinghausen e Islas Sándwich del Sur, mientras que las muestras de *S. antarcticus* fueron obtenidas desde tres localidades alrededor de Antártica (Tabla III-1).

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial

Para el estudio filogeográfico en el género *Sterechinus* se eligió al gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI). Este gen es una de las zonas más variables del ADN mitocondrial y permite la identificación y el seguimiento de linajes maternos debido a su modo de transmisión uniparental y la ausencia de recombinación. Ha sido ampliamente utilizado en invertebrados marinos para estudios genéticos a nivel intraespecífico o intra-générico (Palumbi *et al.* 1997, McCartney *et al.* 2000, Lessios *et al.* 2001).

Tabla III-1: Lista con las poblaciones de las especies del género *Sterechinus* bajo estudio, se indica el número de individuos analizados para el marcador mitocondrial y microsátélites.

Especies	Sitios	Coordenadas Geográficas (Lat - Long)	Nº individuos analizados con COI	Nº de loci	Nº de indiv. para cada locus
<i>S. neumayeri</i>	Base O'Higgins	63°19'11"S-57°54'02" W	44	5	16
	Base Fildes	62°12'24"S-58°56'20" W	66	5	18
	Bahía Paraíso	64°51'05"S-62°54'36" W	10	5	16
	Base Rothera	67°42'55"S-68°04'30"W	19	5	15
	Tierra Adelia	65°59'11"S-139°36'41" E	15	5	14
	Isla Rose	64°18'53"S-57°07'53" W	14	5	10
	Mar de Weddell	71°56'02"S-47°59'53" W	6	--	--
<i>S. diadema</i>	Kerguelen	49°23'54"S-70°25'37" E	13	8	20
<i>S. agassizii</i>	Argentina	43°36'19"S-59°49'59"W	40	8	35
<i>S. antarcticus</i>	Mar de Weddell	71°56'02"S-47°59'53" W	3	8	3
	Tierra Adelia	65°59'11"S-139°36'41"E	2	8	2
	Rothera	67°42'55"S-68°04'30"W	18	8	21
<i>S. dentifer</i>	Mar de Bellingshausen	71°37'13"S-81°47'50"W	4	8	4
	Arco de Escocia	59°16'32"S-28°09'16"W	6	8	6

El ADN total fue extraído desde el tejido gonadal de un total de 260 muestras, siguiendo el método Salino (Aljanabi y Martínez 1997). Se realizó la amplificación parcial por PCR del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), utilizando los partidores descritos por Lee *et al.* (2004), LCOI1490 (5'- TCTA CAA ACC ACA ARG AYA TTG G -3') y HCOIN (5'- CCC ATT GAA AGA ACG TAG TGA AAG TG -3'). Un fragmento de 945 pb fue amplificado, lo que corresponde a parte del gen COI de *S. neumayeri*, desde el nucleótido 65 al 1009 (acceso Genbank AY275548, tamaño 1077 pb). Sin embargo, debido a la baja calidad de algunas muestras provenientes de la región Subantártica (ADN degradado), fue necesario diseñar partidores intermedios a partir de las secuencias obtenidas de *S. neumayeri*, ERZin-F (5'- GAC CGA CTG CCC TTA TTT -3') y ERZin-R (5'- CTC GCT TTC CTG AGT AGT -3'). La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) fue llevada a cabo en un termociclador Thermo PxE 0.5 utilizo DNA Taq polimerasa (Invitrogen, Recombinant, 500 U) bajo condiciones estándares de amplificación con un volumen de reacción de 25 µL. Cada tubo de

reacción contiene: 1 µL (aprox. 10 ng) de ADN genómico, 2.5 µL 10XPCR buffer, 1.5 Mm MgCl₂, 2.5 µL 10mM de cada dNTP, 10 picomoles de cada partidor, 0.2 U-Taq polimearasa. Luego de 7 min de desnaturalización inicial a 95° C, se realizó la amplificación en 35 repeticiones de un ciclo de tres pasos (desnaturalización a 95° C por 1 min, anillamiento a 58° C por 1.5 min, extensión a 72° C por 1.5 min) y un periodo final de extensión de 10 min. Los productos de PCR fueron purificados con un kit "Qiagen Qiaquick columns" y luego enviados a secuenciar a Corea, a la empresa Macrogen, en un secuenciador automático ABI 3100 (Applied Biosystems), las secuencias obtenidas fueron alineadas con el programa Proseq v. 2.91 (Filatov 2002) y alineadas en grupo correspondientes a los fragmentos analizados con el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1992), y comparados con secuencias de referencia de la base de datos nucleotídicos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) usando BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). 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 utilizo el programa DAMBE 4.5.27 (Xia y Xie 2001).

Desarrollo de Microsatélites

Los marcadores moleculares utilizados fueron diseñados por un servicio externo (ATG Genetics), que elaboró un set de microsatélites a partir de ADN concentrados y de buena calidad de *S. agassizii*.

Se evaluó el nivel de polimorfismo de estos microsatélites en individuos de las otras cuatro especies del género. Los loci que resultaron ser más polimórficos y con mejor amplificación fueron seleccionados, y sus respectivos partidores fueron marcados con distintos fluoróforos universales que han sido utilizados en numerosos estudios basados en microsatélites (El-Kassaby *et al.* 2001, Farias 2006, Edwards 2008).

Amplificación de Microsatélites

Luego del marcaje se realizaron una serie de estandarizaciones para la amplificación mediante técnica de PCR. Se utilizaron diferentes estrategias de amplificación para cada uno de los 8 loci escogidos. La amplificación fue revisada en un gel de agarosa al 2% y aquellos que resultaron exitosos fueron enviados

a electroforesis capilar en el Centro de Biotecnología Roy J. Carver en la Universidad de Illinois (Urbana- USA). Los tamaños alélicos de cada locus utilizado se visualizaron con el programa Peak Scanner™ Software v1.0 (Applied Biosystems).

Las amplificaciones se realizaron por medio de PCR en un termociclador Px2 (Thermo Electron Corporation). Las reacciones de PCR para los 8 loci fueron realizadas en un volumen final de 15 µL el cual contenía: 1,5 µL 10X de Buffer, 1,5-2,0 mM MgCl₂, 0,2 mM de cada dNTP, 0,5 U de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 0,16 µM del partidor reverse, 0,064 µM del partidor forward y 10 ng de ADN. Las condiciones utilizadas en el termociclador fueron las siguientes: Desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 25 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 60°C para el anillamiento por 45 segundos (esta temperatura fue disminuyendo en 0.5 °C cada dos ciclos, TOUCH-DOWN), 72°C por 30 segundos, luego un paso de 10 ciclos de: 95°C por 30 segundos, 50°C para el anillamiento por 45 segundos y 72°C por 30 segundos, y una extensión final de 72°C por 10 minutos.

Los tamaños de los alelos de cada locus se visualizaron en relación al tamaño del estándar GS500 ROX con el programa GeneScan® Analysis Software 3.7 (Applied Biosystems) y el programa Peak Scanner 1.0 (ABI) para calibrar de manera precisa los tamaños de alelos. Se utilizó el programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout *et al.* 2004) para la identificación de errores de lectura y genotipificación, como tartamudeo, alelos nulos o alelos ausentes.

Análisis de datos

1. Análisis de diversidad genética e inferencia demográfica, ADN mitocondrial

Con el fin de determinar una posible estructura espacial en base al marcador mitocondrial de las distintas poblaciones alrededor de Antártica de *S. neumayeri* y entre las especies del complejo *Sterechinus*, se determinaron en primer lugar los niveles de polimorfismo a través de índices standards de diversidad genética como: número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (k) y la diversidad haplotípica (h), con el programa DNAsp. ver 5.00.07 (Librado y Rozas *et al.* 2009). Las relaciones genealógicas entre los distintos haplotipos se graficaron por median-joining network utilizando el programa Network 4.502 (Röhl 2002). Cada haplotipo encontrado se representa por círculos cuyos tamaños reflejan su frecuencia respectiva en la muestra.

Para realizar inferencias demográficas en *S. neumayeri*, una vez identificada la

diversidad genética, se estudió la probable ocurrencia de eventos históricos de contracción-expansión demográfica realizando análisis basados en la distribución de las diferencias entre pares de secuencias (Mismatch Distribution, Rogers y Harpending 1992) y estimaciones con las Pruebas de Neutralidad de Tajima (Tajima 1989), Fu y Li F* (Fu y Li 1993) y D*, y Fu F (Fu 1997) calculadas con el programa DnaSP ver 5.00.07 (Librado y Rozas 2009). Además, se determinó la dinámica poblacional pasada a través del tiempo utilizando el modelo de estimación bayesiana Skyline plot en BEAST (Drummond *et al.* 2005, 2012), para lo cual el mejor modelo de mutación estimado para el conjunto de datos fue GTR+G+I, determinado con el programa JModelTest ver. 3.06 (Posada 2008). Se corrieron dos cadenas independientes de $3,5 \times 10^8$ iteraciones y los parámetros fueron muestreados cada 1000 iteraciones. Utilizamos las dos tasas de mutaciones estandarizadas por Lee *et al.* (2004) para *Stereochinus*: 0.72 y 0.51% Ma⁻¹, las que fueron modificadas a 7.2 y 5.1 % realizando la corrección planteada por Ho *et al.* (2005), quienes han 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). Las gráficas demográficas fueron visualizadas con Tracer v1.0.1 (Drummond y Rambaut 2007).

El programa Geneland ver.4.0.0 (Geneland, Guillot *et al.* 2005), a través de la inferencia bayesiana y el uso combinado de la información genética (sitios polimórficos) e información geográfica, nos permite tratar de entender el factor que afecta el flujo génico a lo largo del espacio e inferir el número de poblaciones y la ubicación de discontinuidades genéticas entre las poblaciones de *S. neumayeri*. Se realizaron dos corridas independientes con 5×10^6 de cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con estimaciones de un tamaño poblacional máximo de 200 individuos, utilizando el modelo de frecuencias alélicas correlacionado, para permitir que el programa detecte pequeñas diferenciaciones.

2. Microsatélites

Los datos provenientes de microsatélites fueron analizados para contrastar y complementar la información entregada por el gen mitocondrial, para tratar de dilucidar posibles procesos de estructuración entre las distintas poblaciones muestreadas para *S. neumayeri* (5 loci, 89 individuos) y entre las del Complejo *Stereochinus* (8 loci, 91 individuos). Se evaluó la diversidad genética con el programa GENETIX 4.05 (Belkhir

et al. 1996), para estimar los índices descriptivos de diversidad, como heterocigosidad y número de alelos por locus. Además de testear posibles desviaciones del equilibrio de Hardy-Weinberg para cada locus a través del índice Fis (Weir y Cockerham 1984). Se realizó el Análisis Factorial de Correspondencias (AFC) para ver gráficamente la dispersión de los genotipos e identificar alguna relación sistemática entre los datos. El índice de estructuración (F_{ST}) fue evaluado para ambos set de datos, global y entre las distintas poblaciones/especies con el programa Genetix4.05 (Belkhir *et al.* 1996) utilizando un número de 5000 permutaciones.

Se utilizó el programa Structure 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000) para detectar patrones de migración reciente (migrantes durante las últimas generaciones). El programa Structure define cuántos clusters o grupos genéticos (K) existen y designa los individuos a estos clusters con un porcentaje de asignamiento asociado. Se utilizaron 10 iteraciones de 500.000 de duración del periodo de quemado y largo de MCMC, además del modelo de ancestros con admixture y utilizando las poblaciones muestreadas como "priors". Se evaluaron los valores de verosimilitud para K, el número de poblaciones asumidas, de 1 a 7. Se compararon los resultados de las 10 réplicas distintas del análisis para evaluar la varianza y estabilidad de los valores de verosimilitud correspondientes a distintos valores de K, testeando la convergencia efectiva de la cadena de Markov. Finalmente con el programa GENECLASS2 ver 2.0.h (Piry *et al.* 2004), se realizó un test de asignamiento de individuos excluyendo la población de origen utilizando el método basado en frecuencia (Paetkau *et al.* 1995) sobre todos los loci y entre las distintas localidades (y especies), este test en base a una distribución de frecuencia asigna a cada individuo a la población más probable de la cual debería provenir en base a su perfil genético.

III.3 RESULTADOS

I. Filogeografía y patrones de conectividad alrededor de Antártica en el erizo regular *S. neumayeri*.

ADN mitocondrial

Para las comparaciones entre las distintas localidades de *S. neumayeri* alrededor de Antártica, se amplificó un fragmento de 945 pb en 174 individuos. El número de

individuos analizados para cada localidad y sus correspondientes índices de diversidad se resumen en la tabla III-2. En el conjunto de muestras no se detectó la presencia de indels, como es de esperar al trabajar con regiones codificantes.

Lo resultados obtenidos muestran que a nivel general la especie presenta una baja diversidad haplotípica, situación observada además en casi todas las localidades, con la excepción de las muestras provenientes del Mar de Weddell, donde a pesar de disponer de un bajo número de individuos su diversidad sobrepasa el 50%. En cuanto a los sitios polimórficos y número de haplotipos, estos índices fueron bajos en general y sólo Bahía Fildes muestra mayores valores, pero en ésta localidad se realizó un mayor esfuerzo de muestreo por lo que estos índices pueden no reflejar una característica real y comparativamente presenta una menor diversidad que la Base Rothera (ubicada 800 km al sur a lo largo del lado oeste de la península Antártica), de la cual se analizó un tercio menos de muestras. Por otro lado, Tierra Adelia presentó un mayor número de diferencias entre pares de secuencias (II), lo que explica comparativamente su mayor diversidad con respecto a las otras localidades.

Tabla III-2: Índices de diversidad genética para cada población estudiada de *S. neumayeri*. Pruebas de neutralidad para la especie alrededor del continente. (N) número de individuos analizados, (k) número de haplotipos, (H) diversidad haplotípica, (S) sitios polimórficos, (II) número promedio de diferencias entre par de secuencias. Para las pruebas de neutralidad, ** P < 0.01 y * P < 0.05.

Localidad	N	k	H	S	II	Tajima's D	Fu's F _s
Base O'Higgins	44	6	0.217±0.083	5	0.227	-1.99835*	-3.60305**
Base Fildes	66	10	0.256±0.072	12	0.364	-2.41713**	-5.21771**
Bahía Paraiso	10	2	0.200±0.154	2	0.400	-1.40085	-1.71902
Base Rothera	19	4	0.380±0.134	3	0.409	-1.42238	-1.46876
Tierra Adelia	15	5	0.476±0.155	8	1.067	-2.08600*	-2.96256**
Isla Ross	14	2	0.143±0.119	2	0.286	-1.48074	-1.97405
Mar de Weddell	6	3	0.600±0.215	2	0.667	-1.13197	-1.19511
TOTAL	174	25	0.277 ±0.046	30	0.402	-2.6478*	-6.6185**

La red de haplotipos construida para la especie se caracterizó por presentar una genealogía corta con forma de estrella, con un haplotipo central de alta frecuencia presente en todas las localidades. A partir del haplotipo central aparecen haplotipos de baja frecuencia separados en su mayoría por sólo un paso mutacional. La mayoría de estos haplotipos representan a un solo individuo y son sitio-específicos, aunque se observan ciertas particularidades, como un haplotipo de Tierra Adelia que proviene directamente de uno muestreado en la Base Rothera y, otro muestreado en Tierra Adelia, que proviene paralelamente de haplotipos de Fildes y O'Higgins (Figura III- 2).

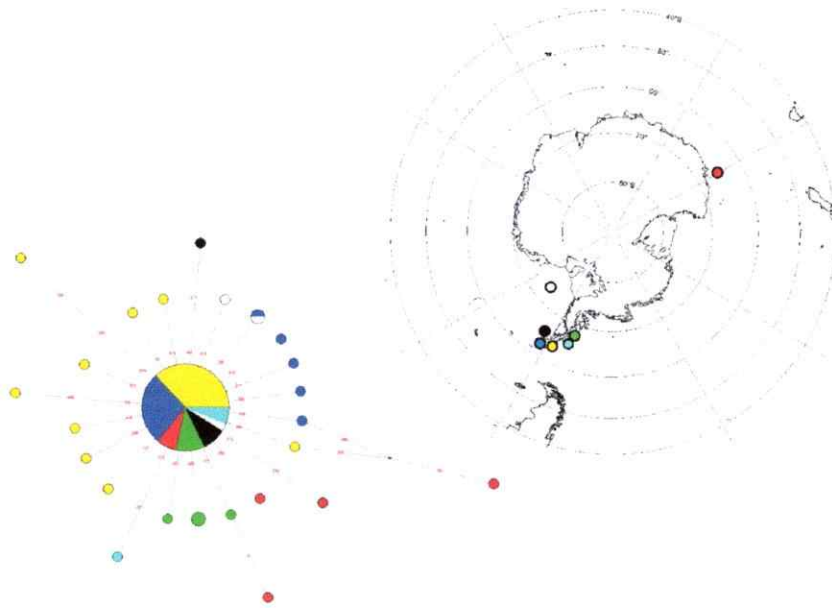


Figura III-3: Red de haplotipos construida a partir de 174 secuencias de COI en *S. neumayeri*, provenientes de siete poblaciones ubicadas alrededor del continente. Cada círculo representa a un haplotipo (tipo único de secuencia) y su tamaño es proporcional a su frecuencia en la muestra. O' Higgins (azul), Bahía Fildes (amarillo), Bahía Paraíso (celeste), Rothera (verde), Tierra Adelia (rojo), Mar de Weddell (blanco), Isla Rose (negro).

La inferencia bayesiana realizada sobre los sitios polimórficos de un total de 174 secuencias de *S. neumayeri*, para determinar si se ve afectado el flujo génico entre las poblaciones alrededor del continente, entregó un número de cluster igual a 1 (Figura III-3), lo que indicaría que probablemente alrededor de Antártica se encuentra una

población no diferenciada en términos genéticos entre las distintas localidades muestreadas, pero debido a que no sabemos cuanto es el error tipo II, la evidencia no es suficiente para descartar la hipótesis nula de una población no diferenciada genéticamente alrededor de Antártica.

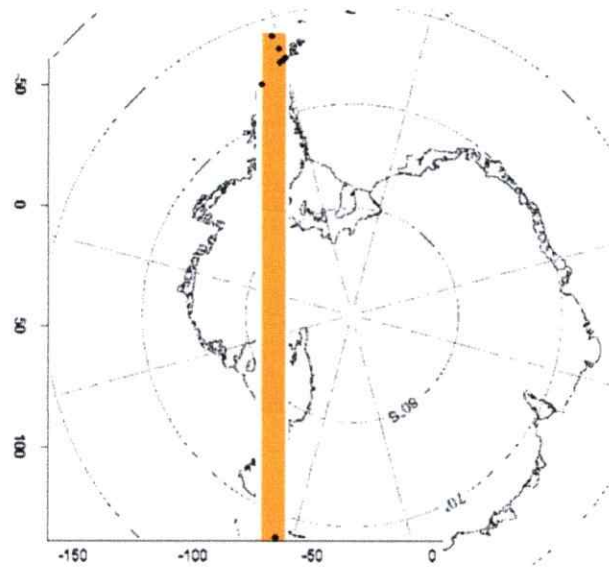


Figura III-4: Mapa de la probabilidad de pertenencia a una población.

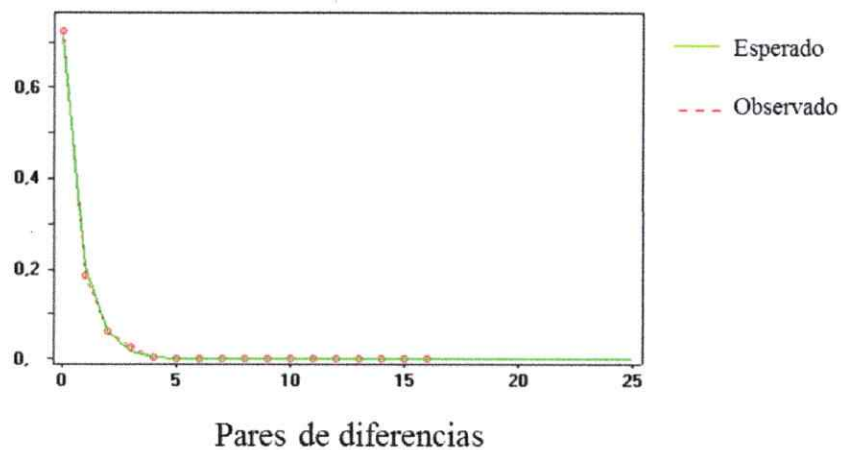


Figura III-5: Distribución de diferencias pareadas en el gen Citocromo Oxidasa subunidad I en la especie *S. neumayeri*.

Como era de esperar para una genealogía con forma de estrella, las pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F_s) para el conjunto de localidades, resultaron ser negativamente significativas, lo que sugiere que la especie ha experimentado eventos demográficos de expansión reciente, bajo un modelo neutral (Tabla III-2). Esta señal de expansión es confirmada por la distribución de las diferencias entre pares de secuencias, que muestra una marcada forma de L (Figura III-5). Mientras que el análisis Skyline plot bayesiano, respalda la idea de una expansión poblacional reciente de *S. neumayeri*, ya que muestran una señal de expansión muy reciente que comenzó entre 6000 – 8500 años, con un tamaño efectivo poblacional cercano a 200 individuos que incremento hasta unos 200000 - 250000 individuos aproximadamente en el presente (Figura III-6 a y b).

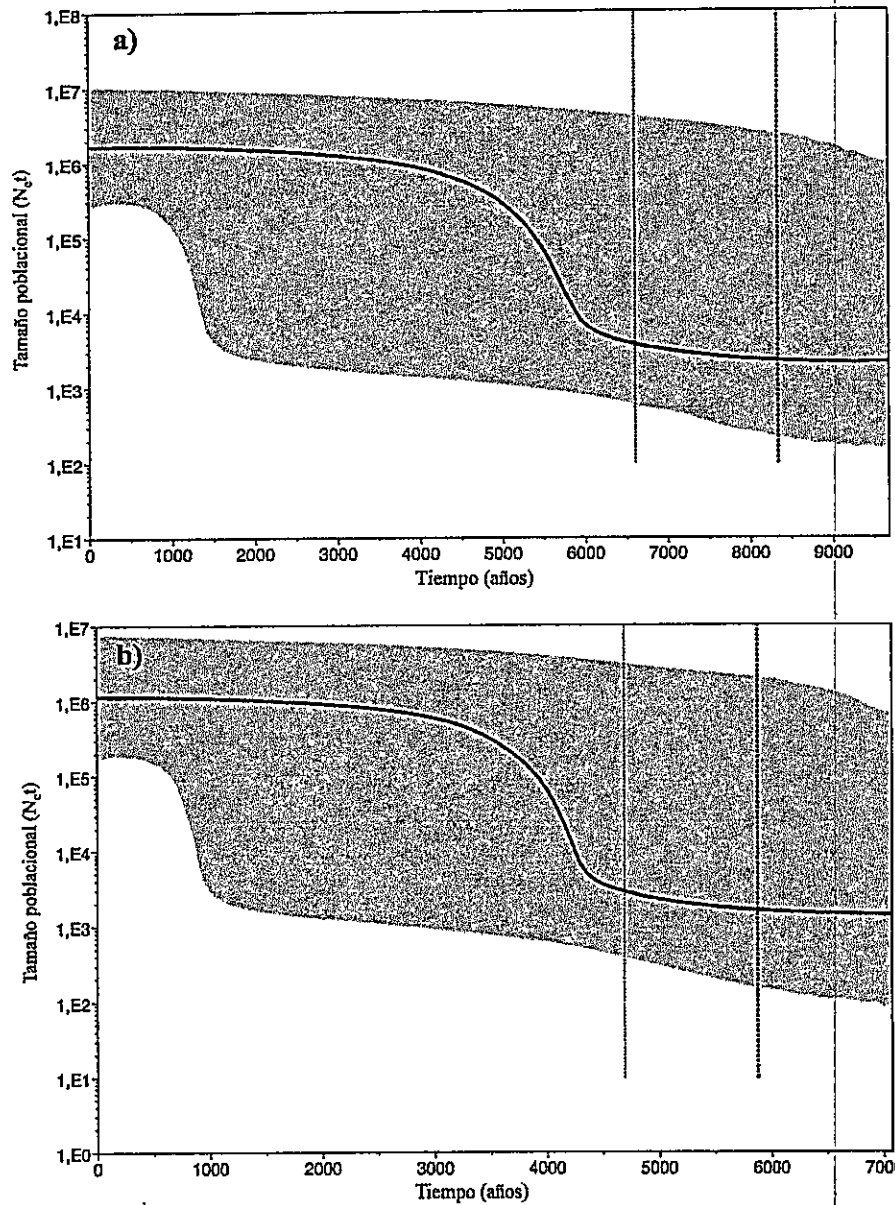


Figura III-6: Tendencia demográfica histórica del tamaño poblacional efectivo (N_e) construido con la aproximación bayesiana Skyline plot basado en haplotipos del citocromo oxidasa subunidad I (COI) de *S. neumayeri* con dos tasas de mutación para el gen: a) 5.1 % y b) 7.2 %. El eje x es el tiempo en unidades de años y el eje y es igual a $N_e t$, el producto del tamaño poblacional efectivo (N_e) y la extensión de la generación en una escala logarítmica. Se muestran la estimación media (línea negra) y el 95% de los límites más altos de densidad de probabilidad (HPD) (área gris). La línea discontinua gruesa representa el tiempo del ancestro común más reciente (tACMR) y la línea discontinua delgada representa el tiempo de la expansión en la especie.

Microsatélites

Del total de muestras de *S. neumayeri* se obtuvieron genotipos multilocus para 89 individuos. De 8 loci que fueron evaluados en el conjunto de muestras para el género *Stereochinus* (*S. neumayeri* y especies del complejo), cinco lograron ser amplificados para las muestras bajo estudio, los que resultaron ser polimórficos y de mejor señal (Tabla III-3).

Tabla III-3: Resumen de los 5 loci utilizados en el presente estudio. SSR: (Short Sequence Repeat) motivo de repetición, pb: pares de bases.

Locus	Secuencia (5' - 3')	SSR	Tamaño alélico (pb)
F32St	F:TGAAATTCGTCGTCAACACA R:CGTTACTACCGGGGACACTG	(CTT)8	210
P1St	F:TAAAGACATTCCCTGTTTCATCA R:ACACACACACTTCCCCTC	(TC)8	150
P2St	F:CACACCCCACACTCTCTCT R:TGTGGAAAATGTGCGTGAGT	(AG)12	151
N4St	F:ACTCACGCACATTTCCACA R:GAGGTCGGGAGAGATTCTGA	(GA)10	185
V6St	F:GTGCATGTATGAGCTGGCTC R:CCTGTTGCGCAAACAGCÁAG	(ATT)10	253

Los análisis de diversidad genética basados en los 89 individuos muestran un número promedio de 10 alelos por locus en las poblaciones, con un rango de 6 y 15 alelos para V6St y P2St, respectivamente. Se obtuvieron niveles medios de heterocigocidad observada con un rango entre 0.28 y 0.80 para P1St y N4St, respectivamente. Se observó déficit de heterocigotos en tres loci y no se detectó desequilibrio de ligamiento entre loci (Tabla III-4).

Tabla III-4: Resumen de la diversidad genética encontrada en cada loci. NA: Número promedio de alelos, PIC: Contenido de información polimórfica, Ho: Heterocigocidad observada, He: Heterocigocidad esperada. (*) Valor de $p < 0.05$, (***) $p < 0.001$.

Locus	NA	PIC	Ho	He	FIS
F32St	11	0.5110	0.1642	0.1866	-0.03366***
P1St	9	0.4000	0.1871	0.3364	0.48667***
P2St	15	0.6148	0.3970	0.6153	0.36964***
N4St	11	0.8157	0.6679	0.7149	0.06068
V6St	6	0.3800	0.5295	0.4199	-0.20066*

El índice de estructuración global no identifica estructuración para el conjunto de localidades, por lo que se analizó la existencia de diferenciación genética significativa entre las localidades realizando un F_{ST} pareado (Tabla III-5), cuyos resultados fueron no significativos para todos los pares por lo que no hay evidencia suficiente para indicar que existe estructuración.

Tabla III-5: Medida de diferenciación genética (F_{ST}) entre distintos grupos geográficos basados en la información de 5 loci.

FST	O'Higgins	Fildes	B. Paraíso	Rothera	Isla Ross
Tierra A	0,03196	-0,0054	0,02337	0,08615	0,05482
O'Higgins		-0,00365	0,01927	0,08592	0,08002
Fildes			-0,01669	0,06311	0,03935
B. Paraíso				0,09081	0,08358
Rothera					0,01362

El análisis Structure identifica sólo un cluster para todas las localidades de *S. neumayeri* ($k = 1$), señalando una importante homogeneidad genética entre todas las localidades. De igual manera, el programa GENECLASS2, indica que la mayoría de los individuos de todas las localidades pueden ser asignados a cualquier localidad, demostrando una baja fidelidad a la muestra de origen. Sólo se destaca Bahía Fildes, donde el 50% de los

individuos es asignado a la misma localidad. En otras palabras, el análisis señala que sobre el 50% de ocasiones en que uno toma una muestra al azar, ésta puede ser asignada a cualquier localidad, con prácticamente una misma probabilidad.

Tabla III-6: Asignación independiente para cada individuo a las distintas localidades muestreadas de *S. neumayeri*.

	O'Higgins	B. Fildes	B. Paraíso	Rothera	T. Adelia	I. Ross
O'Higgins	6/16	1/16	7/16	1/16	--	1/16
B. Fildes	4/18	3/18	5/18	1/18	5/18	--
B. Paraíso	1/16	6/16	8/16	--	1/16	--
Rothera	3/15	1/15	3/15	4/15	1/15	3/15
T. Adelia	2/14	3/14	4/14	--	4/14	1/14
I. Ross	3/10	2/10	--	--	2/10	3/10

II. Conectividad en la zona Subantártica somera y relaciones evolutivas con Antártica profunda.

ADN mitocondrial

Para las comparaciones entre las especies del complejo *Sterechinus*, se amplificó un fragmento de 945 pb en un total de 86 individuos. El número de individuos analizados por especie y sus índices de diversidad se muestran en la Tabla III-7. En este conjunto de muestras no se observó indels.

Todas las especies muestran una diversidad haplotípica elevada, aunque dos de ellas presentaron un bajo número de individuos muestreados con un bajo número de haplotipos y sitios polimórficos (*S. diadema* y *S. dentifer*), el valor de dicha diversidad para el conjunto de especies sigue siendo elevado (0.877, Tabla III-7).

La red de haplotipos para el complejo, muestra una genealogía relativamente corta con forma de estrella, con un haplotipo central de alta frecuencia compartido principalmente por las especies de distribución Subantártica (*S. diadema* y *S. agassizii*), y algunas muestras de la especie Antártica profunda *S. antarcticus*. Se observa que a partir de este haplotipo central surgen nuevos haplotipos de baja frecuencia (representan en su mayoría a un solo individuo). A partir de solamente un haplotipo de la especie *S.*

diadema surge un pequeño haplogrupo que representa exclusivamente a la especie *S. dentifer* (Figura III-7).

El análisis de las especies en conjunto mostró para las pruebas de neutralidad Tajima (D) y Fu (F_s), valores negativos y significativos que permiten sugerir, bajo un modelo neutral, que el complejo *Sterechinus* ha experimentado eventos demográficos de expansión reciente.

Tabla III-7: Índices de diversidad genética por especie y total para el complejo *Sterechinus*. Pruebas de neutralidad para el complejo. (N) número de individuos analizados, (k) número de haplotipos, (H) Diversidad haplotípica, (S) Sitios polimórficos, (II) número promedio de diferencias entre par de secuencias. Para las pruebas de neutralidad, ** P < 0.01 y * P < 0.05.

Localidad	N	k	H	S	II	Tajima's D	Fu's F_s
<i>S. agassizii</i>	40	16	0.768±0.061	21	1.885	-2.05617*	-4.18608**
<i>S. diadema</i>	13	4	0.679±0.112	2	0.897	1.10249	1.12165
<i>S. antarcticus</i>	23	9	0.723±0.096	12	2.625	-0.66817	-0.79523
<i>S. dentifer</i>	10	5	0.667±0.163	5	1.156	-1.38818	-0.52186
Complejo Strch.	86	31	0.877±0.026	36	2.772	-1.93105*	-4.08579**

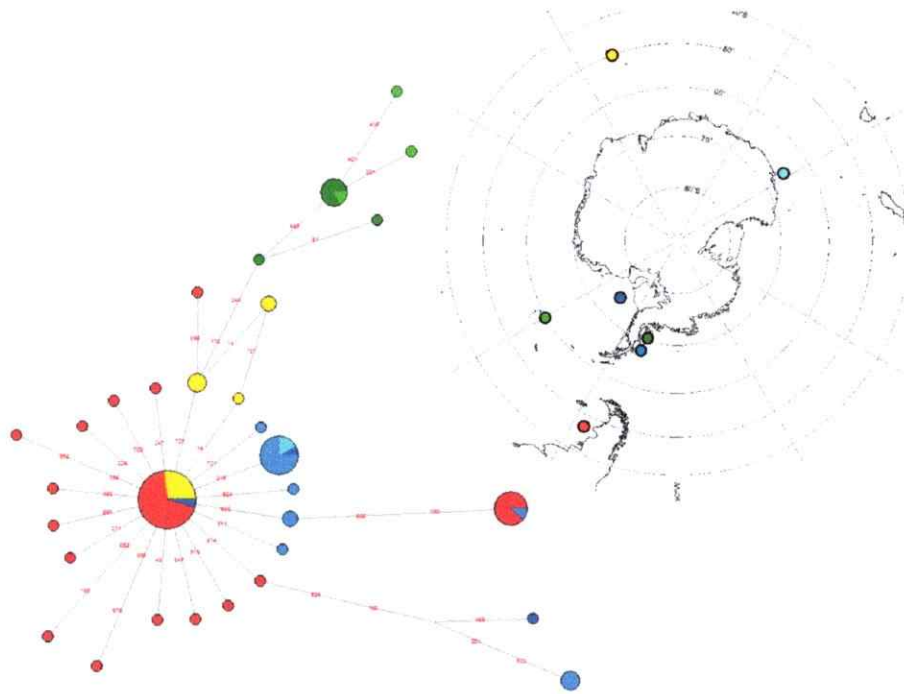


Figura III-7: Red de haplotipos construida a partir de 86 secuencias de COI de las cuatro especies del complejo *Sterechinus*, provenientes de la región Antártica y Subantártica. Cada círculo representa a un haplotipo (tipo único de secuencia) y su tamaño es proporcional a su frecuencia en la muestra. *S. agassizii* (rojo), *S. diadema* (amarillo), *S. antarcticus*: Tierra Adelia (calipso), Mar de Weddell (azul) y Rothera (azul claro), *S. dentifer*: Mar de Bellinghausen (verde oscuro) y Arco de Escocia (verde claro).

Microsatélites

Para los análisis realizados con microsatélites, se obtuvieron 8 loci para un total de 91 individuos, los cuales resultaron ser polimórficos y de buena señal para las cuatro especies del complejo (Tabla III-8).

Tabla III-8: Resumen de los 8 loci utilizados en el presente estudio. SSR: (Short Sequence Repeat) motivo de repetición, pb: pares de bases.

Locus	Secuencia (5' - 3')	SSR	Tamaño alélico (pb)
F8St	F:TTCGTTTCTTCTGACGACGA R:ATTCAAGCAAGATGGGATGC	(GTAT)8	207
F32St	F:TGAAATTCGTCTCAACACA R:CGTTACTACCGGGGACACTG	(CTT)8	210
P1St	F:TTAAAGACATTCCCTGTTTCATCA R:ACACACACACACTTCCCACTC	(TC)8	150
P2St	F:CACACCCACACACTCTCTCT R:TGTGGAAAATGTGCGTGAGT	(AG)12	151
P3St	F:GGGGGCTTACATATCTTCCTG R:TCAAACCATCCCTTCTTCAA	(CT)7	155
N4St	F:ACTCACGCACATTTCCACA R:GAGGTCGGGAGAGATTCTGA	(GA)10	185
N5St	F:TTGTTTGCAAACCTTGTTCGGG R:TCAAACCATCCCTTCTTCAA	(AGx7-Tx16- Gx16)	191
V6St	F:GTGCATGTATGAGCTGGCTC R:CCTGTTGCGCAAACAGCAAG	(ATT)10	253

Los análisis de diversidad genética para las muestras analizadas muestran un número promedio de 15 alelos por locus en las especies del complejo, con un rango de 3 y 24 alelos para V6St y F32St, respectivamente. Se obtuvieron niveles medios de heterocigocidad observada con un rango entre 0.4915 y 0.6454 para la especie *S. dentifer* y *S. diadema*. No se detectó desequilibrio de ligamiento entre loci y se observó que cinco loci presentan déficit de heterocigotos (Tabla III-9).

Tabla III-9: Resumen de la diversidad genética encontrada en las poblaciones de *S. neumayeri*. NA: Número promedio de alelos, PIC: Contenido de información polimórfica, Ho: Heterocigocidad observada, He: Heterocigocidad esperada. (*) Valor de $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

Locus	NA	PIC	Ho	He	FIS
F8St	20	0.8671	0.5772	0.8515	0.3388
F32St	24	0.6121	0.4464	0.8609	0.5056***
P1St	14	0.6577	0.3413	0.5275	0.4141*
P2St	16	0.6314	0.4968	0.8285	0.4352***
P3St	16	0.6811	0.4673	0.6454	0.3416**
N4St	16	0.7421	0.8160	0.8276	0.1404
N5St	14	0.5947	0.4084	0.7840	0.5219***
V6St	3	0.1300	1	0.5000	-1.000***

El índice de estructuración global F_{ST} no permitió identificar una estructura poblacional para el conjunto de muestras analizadas. Se realizó el análisis de diferenciación genética por pares de especies y, aunque todos los valores de estructuración fueron bajos, se observaron valores significativos para todos los pares de especies analizados, menos entre las muestra Subantártica somera *S. diadema* con la especie Antártica profunda *S. antarcticus* (Tabla III-10). Al realizar una exploración visual, en el análisis de correspondencia se puede observar un patrón donde el eje principal define una marcada separación entre la especie *S. dentifer* del resto de las especies del complejo, mientras que el segundo eje separa a la especie *S. antarcticus* del resto (Figura III-8).

Tabla III-10: Medida de diferenciación genética (F_{ST}) entre distintos grupos geográficos basados en la información de 8 loci. (*) Valor de $p < 0.05$, (**) $p < 0.01$, (***) $p < 0.001$.

FST	<i>S. dentifer</i>	<i>S. agassizii</i>	<i>S. antarcticus</i>
<i>S. diadema</i>	0,07001***	0,03637***	0,01019
<i>S. dentifer</i>		0,05384*	0,03008*
<i>S. agassizii</i>			0,02522**

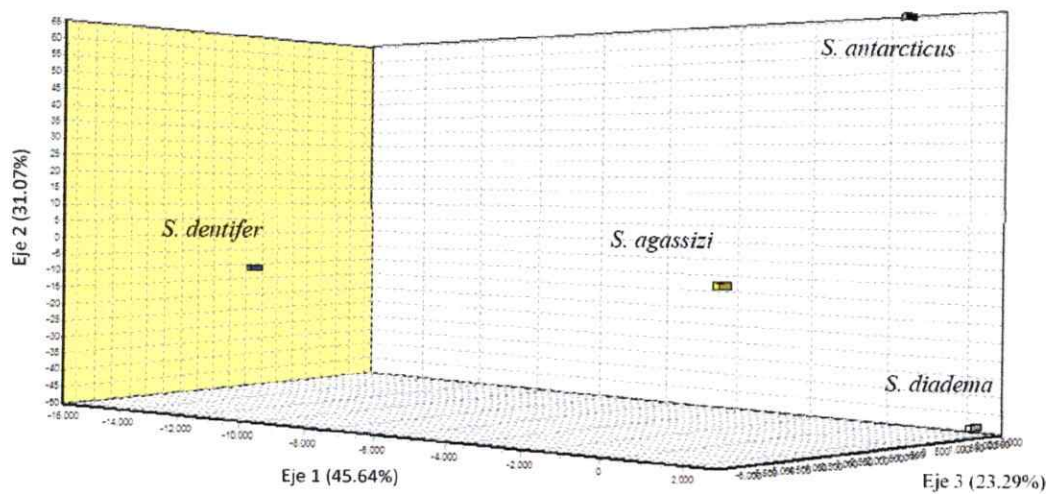


Figura III-8: Análisis de correspondencia factorial para las distintas especies estudiadas.

El análisis Structure entrega interesante resultados para las posibles relaciones de las especies del complejo *Sterechinus*. De los tres cluster identificados por el programa se puede observar que el cluster “azul” es asignado a sobre el 80% de los individuos de la especie *S. dentifer*, le sigue la especie *S. antarcticus* con aproximadamente el 50% de los individuos asignados al mismo cluster, pero en esta especie se observa un segundo cluster (rojo) con una importante probabilidad de asignación. Este cluster “rojo” representa a una importante proporción de la especie *S. diadema* (cerca del 60%), que también comparte importante proporción de sus muestras con el tercer cluster “verde”, también compartido por la especie *S. agassizii*, especie que muestra una proporción de asignación similar para los cluster verde y azul a la mayoría de sus individuos (Figura III-9).

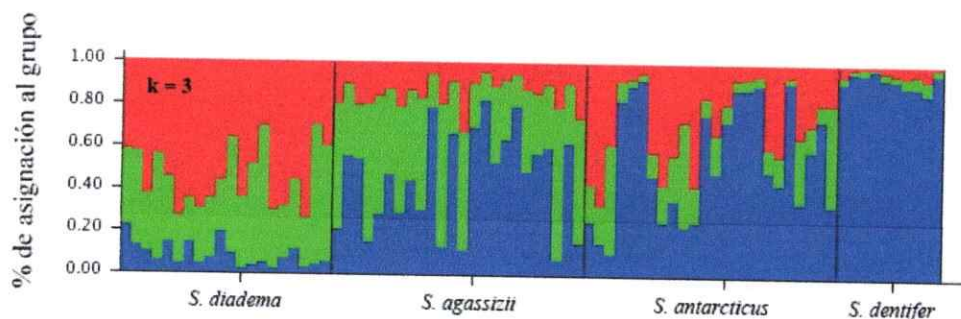


Figura III-9: Estructuración genética y asignación de clusters del programa Structure. Cada línea vertical representa un individuo, los que están agrupados de acuerdo a su localidad de origen. Los clusters están codificados con 3 colores y la fracción de color para cada individuo representa la probabilidad de asignación al cluster de ese color.

Tabla III-11: Asignación independiente para cada individuo a las distintas especies del complejo *Stereochimus*.

	<i>S. diadema</i>	<i>S. agassizii</i>	<i>S. antarcticus</i>	<i>S. dentifer</i>
<i>S. diadema</i> (20)	10/20	5/20	5/20	--
<i>S. agassizii</i> (35)	11/35	15/35	6/35	3/35
<i>S. antarcticus</i> (26)	7/26	4/26	13/26	2/26
<i>S. dentifer</i> (10)	--	--	4/10	6/10

Los resultados obtenidos para GENECLASS2 muestran, para todas las especies, que al menos la mitad de los individuos de cada una pueden ser asignados por azar a la misma especie (muestra) de origen. Llama la atención que la especie Antártica profunda (*S. dentifer*) no muestre relación aparente con las especies Subantárticas, tal como mostró el programa Structure, aunque sí tres individuos de *S. agassizii* (3/35) puedan ser asignado a ella (Tabla III-11). Igual proporción de individuos de *S. diadema* pueden ser asignados a *S. agassizii* o *S. antarcticus*, mientras que individuos de *S. agassizii* son asignados a su congénere Subantártico somero, *S. diadema*, en una mayor proporción que a la especie antártica profunda.

III.4 DISCUSION

I. Filogeografía y patrones de conectividad alrededor de Antártica del erizo regular *S. neumayeri*.

La interpretación de la distribución de la fauna marina bentónica del OA ha permitido tener una mejor comprensión sobre procesos ecológicos y evolutivos en el hemisferio sur (Griffith *et al.* 2009). *Sterechinus neumayeri* es una especie que no muestra estructura filogeográfica alrededor del continente Antártico, lo que puede reflejar la existencia de una pasada o presente alta conectividad que impide algún proceso de divergencia a escala de miles de kilómetros, indicando que distantes localidades no se encuentran aisladas genéticamente. La información obtenida en este estudio, permite plantear que podría existir una sola población de distribución circumentártica para esta especie.

De acuerdo a las características oceanográficas del OA, una actual o presente alta conectividad puede ser facilitada por la corriente Antártica costera (CACo) o de la deriva del Este, que fluye hacia el Oeste alrededor del continente Antártico (Figura III-10). Aunque no existe un amplio conocimiento de las corrientes costeras que rodean a Antártica, Moffat *et al.* (2008) han realizado importantes aportes al conocimiento de la corriente costera de la Península Antártica (APCC), principalmente en la parte Oeste de la península. En este trabajo ellos plantean que la APCC es una corriente con una importante estacionalidad que se forma durante las estaciones de primavera-verano cuando la costa queda libre del hielo acumulado durante el invierno y que presenta una velocidad superficial aproximada de $0,30 \pm 0,40 \text{ m s}^{-1}$ y que puede transportar un volumen de agua de $0,32 \pm 0,13 \text{ Sv}$ (orden de $126 \pm 50 \text{ Km}^3$ por año) en zonas cercanas a la Isla Adelaida (Figura III-11). En este trabajo los autores plantean además que la APCC representa una vía de transporte por la costa somera para el plancton durante la temporada libre de hielo.

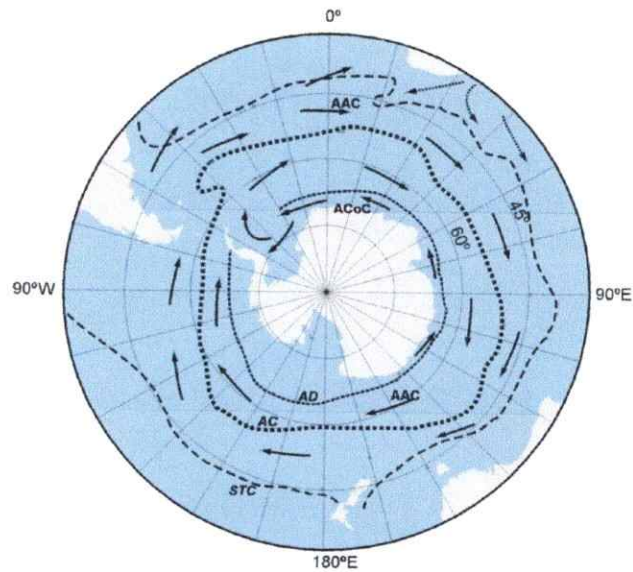


Figura III-10: Mapa con la circulación superficial del Océano Austral. AAC: Corriente Circumpolar Antártica, ACoC: Corriente Antártica Costera. Las líneas punteadas representan a los distintos frentes: STC: Zona de convergencia subtropical, AC: Convergencia antártica, AD: Divergencia Antártica. Siglas en Inglés (<http://dino-atlas.pangaea.de/Oceanographic.html>).

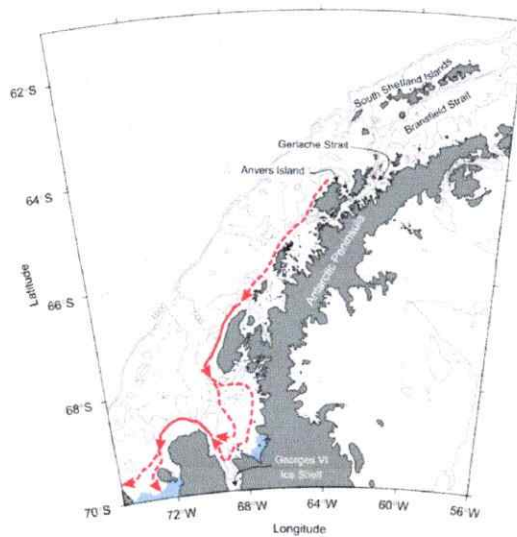


Figura III-11: Mapa que muestra la vía de la Corriente Costera de la Península Antártica en la sección Oeste de la península (Moffat *et al.* 2008). La línea continua muestra la sección para la cual fue evaluada la velocidad de la corriente, mientras que la línea discontinua muestra las vías sugeridas en dicha zona.

La conectividad planteada podría estar además facilitada por la capacidad de dispersión descrita para la especie. En este sentido una importante permanencia en el plancton de larva de *S. neumayeri* podría facilitar su transporte por extensas distancias. Bowden *et al.* (2009) estiman que el desarrollo larval de *S. neumayeri* puede extenderse por cerca de cuatro meses. Junto con esto Marsh *et al.* (2001), muestran que las larvas de la misma especie presentan un metabolismo extremadamente lento, lo que podría permitir una permanencia mucho más prolongada en el plancton (cerca de un año, Manahan poner la inicial del nombre, comunicación personal).

Una característica relevante de la fauna marina bentónica del OA es que debe haber sobrevivido a las masivas perturbaciones ocurridas en la zona provocadas por los ciclos glaciales del Plio-Pleistoceno. 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 y Stephens, 2001). Particularmente la fauna bentónica, debe haber sido muy vulnerable a dichos cambios de disponibilidad de sustrato extremos, con una extensa y gruesa capa de hielo cubriendo la plataforma continental (Convey *et al.* 2009, Thatje *et al.* 2005, Dell 1972). Algunos autores plantearon inicialmente que la fauna bentónica debió desaparecer completamente de la plataforma continental durante los periodos de máximo glacial (Dell 1972), viéndose obligadas a colonizar las zonas más profundas, expandiendo sus rangos batimétricos hacia el talud (Brey *et al.* 1996). Esta misma característica les permitiría volver a colonizar la zona somera durante el posterior periodo interglacial (Clarke y Crame 1989). Los resultados obtenidos para *S. neumayeri* sugieren la posibilidad de supervivencia en la misma plataforma continental (Thatje *et al.* 2005, Clarke y Crame 1989, Smith *et al.* 2010). La señal molecular es indicativa de un patrón de refugio de diversidad genética en el medio ambiente marino, un solo haplotipo de alta frecuencia compartido por todas las localidades alrededor de Antártica (Allcock y Strugnell 2012). Anderson *et al.* 2002 sugieren que durante el último máximo glacial (LGM) la capa de hielo de la región Este del continente pudo haber estado ausente en importantes áreas, mientras que en otras pueden haber estado cubiertas por glaciares en distintos tiempos. Lo anterior permite plantear que el refugio para *S. neumayeri* puede haber existido en la zona somera, probablemente en el Mar de Ross o Mar de Weddell (Smith *et al.* 2010, Barnes y Kuklinski 2010). Por otra parte, el modelo planteado por Rogers (2012), señala que la extensión de una gruesa capa de hielo sobre el continente

habría extinguido a las poblaciones que habitaban la zona somera, quedando remanentes en los límites norte de su “paleodistribución”, desde las cuales luego del retroceso de los hielos (periodo interglacial), habrían vuelto a colonizar Antártica. En este sentido, los lugares más factibles como posibles refugios serían las Islas Subantárticas y la Península Antártica (III-12), no obstante Pugh y Convey (2008) descartan esta última explicación planteando que la extensa y gruesa capa de hielo que se instaló sobre dicha zona durante el último máximo glacial habrían impedido la existencia de refugios en la zona somera, por lo que islas subantárticas como las del Arco de Escocia y Georgias del Sur surgen como refugios más probables para *S. neumayeri*. En este sentido, los trabajos de Fenton (1982) y Björk *et al.* (1991), respaldan el planteamiento de Pugh y Convey (2008) al plantear que el ecosistema de Antártica no debe tener mas de 10.000 a 6.000 años, fechas que además concuerdan con el periodo estimado para nuestra especie en estudio.

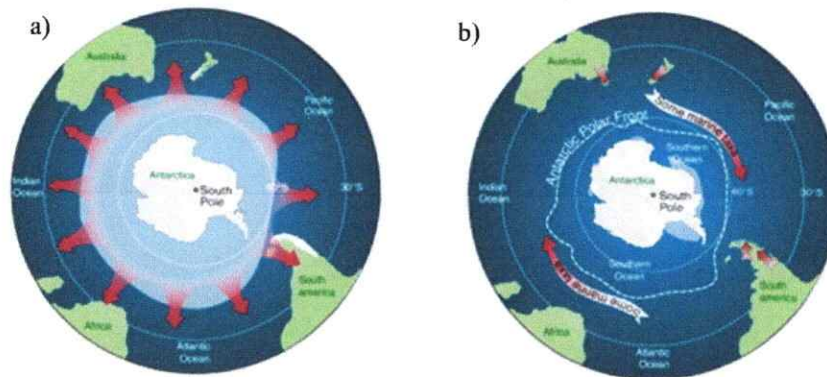


Figura III-12: Esquema que muestra una generalización de la dirección (flecha roja), que debió haber tomado la fauna Antártica durante el periodo glacial a) al expandirse la capa de hielo y b) probables refugios que sustentarían una recolonización durante el último máximo glacial. (Extraído de Frasser et al. 2012).

La señal genética para refugio único, tipo estrella con un haplotipo de alta frecuencia (probablemente ancestral), del que se desprenden otros de baja frecuencia, describe un evento de cuello de botella seguido por una expansión poblacional (Slatkin y Hudson 1991). A partir de los resultados se puede suponer que este cuello de botella refleja un refugio pequeño y que la extinción del resto de las poblaciones fue catastrófica,

generando una disminución considerable de la diversidad haplotípica de la especie. Este patrón es compartido con la especie de nemertinos *Parbolasia corrugatus* (Thornhill *et al.* 2008) y el camarón *Chorismus antarcticus* (Raupach *et al.* 2010), ambas especies con una amplia capacidad de dispersión que les permite distribuirse rápidamente alrededor de Antártica luego del máximo glacial y de que los hielos retrocedieran. En este sentido, aunque se puede esperar una rápida “recolonización” de la costa Antártica, los resultados muestran que *S. neumayeri* experimentó un periodo de expansión poblacional muy reciente (aprox. 6000 – 8500 años), lo que indica que probablemente el retroceso de la capa de hielo durante el periodo post glacial fue muy lento, lo que no permitió un rápido restablecimiento de la Corriente Costera. No obstante, una vez establecido dicho anillo de conectividad, los mismos datos muestran que la expansión poblacional alrededor del continente fue muy rápida.

II. Conectividad en la zona Subantártica somera y relaciones evolutivas con Antártica profunda

Las especies de distribución Antártica profunda, *S. diadema* y *S. agassizii*, no muestran ningún tipo de estructura. Principalmente los datos mitocondriales, muestran a los individuos de ambas especies como prácticamente una sola especie para la región con un haplotipo dominante de alta frecuencia en ambas “poblaciones” Subantárticas. Esto da cuenta de una importante conexión entre ambas regiones, la cual puede ser facilitada o explicada en su totalidad por el anillo de circulación que representa la Corriente Circumpolar Antártica. En este sentido Moyano (1999) propuso la existencia de una alta conectividad para la zona Subantártica, enfatizando en el probable rol que cumpliría la CCA. En esta misma línea, estudios moleculares más recientes en otros organismos marinos bentónicos son congruentes con nuestros resultados, estos muestran alto flujo génico para la región Subantártica en diversas especies: *Ostrea chilensis* (O’ Foighil *et al.* 1999), *Macrocystis pyrifera* (Coyer *et al.* 2001), *Mytilus* spp. (Gérard *et al.* 2008), *Durvillaea antarctica* (Fraser *et al.* 2009) y *Nacella* (González-Wevar *et al.* 2010). Todos estos trabajos apoyan la idea de que la biogeografía de las especies que habitan esta zona, en especial aquellas que presentan un estado de libre dispersión larval, son influenciadas por recientes eventos de dispersión a gran escala mediada por la CCA y los vientos de la deriva del Oeste (Waters 2007). Nuestros resultados permiten

inferir que la fauna somera Subantártica, además de presentar una importante dispersión entre distintas y distantes localidades del OA somero, pueden dispersar y mantener cierto flujo génico con especies Antárticas a través de las grandes profundidades.

En cuanto a los resultados que entregan los marcadores microsatélites, estos mostraron cierta homogeneidad de las muestras Subantárticas con la especie Antártica profunda *S. antarcticus* (morfoespecie), principalmente entre ésta y la especie que habita la plataforma de Kerguelen (*S. diadema*) (valores de F_{ST} , Tabla III-10). Aunque todos los análisis mitocondriales designan a *S. dentifer* en un grupo independiente del resto del complejo, los marcadores microsatélites muestran evidencia cruzada. Por una parte presenta estructuración con las demás especies y por otro, como demuestra el programa Structure, comparte principalmente un cluster con las demás especies (cluster azul, Figura III-9), especialmente con *S. antarcticus*. Los resultados muestran entonces escenarios distintos; con marcadores mitocondriales un proceso de especiación muy reciente y con marcadores microsatélites, dicho proceso sería tan sólo de estructuración genética.

CAPITULO IV: DISCUSIÓN GENERAL

El Océano Austral (OA), representa un área interesante para plantearse importantes preguntas en biología evolutiva. En primer lugar, los procesos como la tectónica de placas, cambios climáticos y oceanográficos que fuerzan patrones macroevolutivos desde el Eoceno son relativamente bien conocidos y han tenido mayor impacto sobre la biogeografía de la fauna bentónica del OA, (Linse *et al.* 2006, Rogers 2007, Griffith *et al.* 2009-2011, González-Wevar *et al.*, 2010). En este sentido, las reconstrucciones filogenéticas y estimación de tiempos de divergencia entre especies de diferentes regiones del OA es la aproximación adecuada para poner a prueba las clásicas hipótesis de vicarianza y dispersión. En segundo lugar, identificamos los eventos climáticos del Cuaternario, que tienen mayor efecto a una escala menor sobre la distribución y abundancia de organismo bentónicos marinos, además de afectar a los respectivos patrones de diversidad genética, estructura y conectividad.

Para abordar estas preguntas, elegimos como modelo de estudio el género de erizo regular *Sterechinus*, perteneciente al Phylum de los Equinodermos, un grupo dominante en el bentos antártico (éxito ecológico) y caracterizado por una elevada riqueza de especies, por lo que los mayores cambios climáticos y oceanográficos del OA no impidieron su éxito evolutivo (Clarke y Crame 1989-1992; Clarke y Johnston 1996, Crame 1999, Aronson y Blake 2001, Linse *et al.* 2006, Rogers 2007, Aronson *et al.* 2008).

IV.1 RELACIONES FILOGENETICAS Y PROBABLE ESCENARIO EVOLUTIVO.

La historia del Océano Austral responde a importantes procesos geológicos y climáticos que se relacionan con el origen de un sistema de circulación circumantártico que culminaron en dos importantes eventos: 1) la formación del Mar de Tasmania a raíz del distanciamiento entre Antártica y Australia (a fines del Eoceno, ~33.5 Ma) y 2) la apertura del Paso de Drake y Arco de Escocia que corresponde a la separación física del continente Antártico con Sudamérica (~ 28 Ma) y que habría permitido la disminución progresiva de las temperaturas superficiales del Océano Austral (Clarke y Crame 1989-

1992, Lawver y Gahagan 2003, Lyle *et al.* 2007, Torsvik *et al.* 2008), proceso que culminó el aislamiento del continente Antártico y que es indicado como un proceso vicariante importante para las faunas que habitaban los ambientes marinos bentónicos de ambos continentes. Junto con esto, el ensanchamiento progresivo del paso de Tasmania y del Mar de Escocia que permitió la formación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) también es indicado como un proceso vicariante que habría comenzado a operar desde principios del Mioceno, instalándose así un aislamiento oceanográfico para el continente (Crame 1999; Pfuhl and McCave 2005). En este sentido Griffiths *et al.* (2009), reconocen evidencias del marcado efecto vicariante a largo plazo que ha tenido la instalación de la CCA sobre la distribución del bentos en el OA.

No obstante los antecedentes previos, nuestros resultados para la estimación de los tiempos de divergencia en el grupo *Sterechinus* señalan un tiempo aproximado de 5 Ma. (Mioceno tardío), periodo que no se relaciona con el estimado para los eventos tectónicos vicariantes en el OA como las aperturas de los pasos de Tasmania y Drake. Las relaciones filogenéticas indican que durante este periodo se originaron dos linajes: 1) *S. neumayeri* y 2), el resto de las especies descritas (complejo *Sterechinus*). Estos resultados sugieren un aislamiento muy posterior a los eventos tectónicos entre las regiones Antártica y Subantártica, resultando probablemente de la interacción entre la capacidad de dispersión de la fase larval de estos organismos con la instalación y desarrollo de la CCA, caracterizada por una intensidad que aumenta a escala de millones de años, de manera que en un periodo cercano a los 5 Ma. alcanzó una intensa suficiente para constituir una barrera oceanográfica real y total entre las faunas someras de ambas regiones. Al respecto Crame (1999), planteó que un patrón de zonación vertical y horizontal del OA pudo haber generado una intensificación de la CCA hacia fines del Mioceno (12 – 10 Ma). Esta observación explica tanto nuestros resultados como los de otras investigaciones sobre grupos presentes en los fondos marinos bentónicos someros del OA, Antárticos y Subantárticos (e.g., *Nacella*, *Yoldia*, *Euphausia*, bivalvos del género *Limatula* y peces Nototénidos). En este sentido, nuestros resultados realzan la importancia de dicho periodo para los procesos evolutivos de la fauna bentónica somera del OA (Bargelloni *et al.* 2000a-b, Page y Linse 2002, González-Wevar *et al.* 2012).

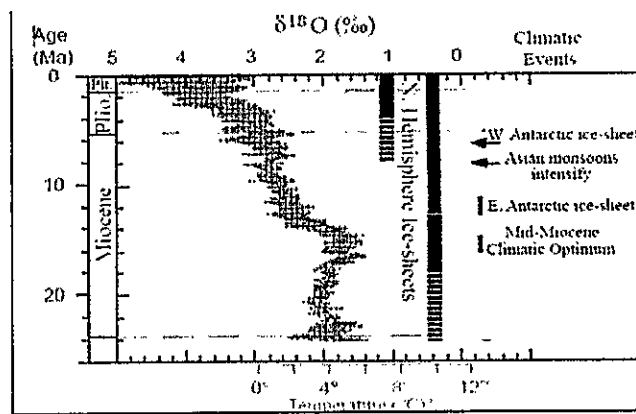


Figura IV-1: Paleorreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 20 Ma, (Extracto de Zachos *et al.* 2001).

En relación a las hipótesis planteadas para las relaciones evolutivas entre la fauna somera y profunda de Antártica (Hipótesis de la Submergencia Evolutiva Polar y la Hipótesis de la Emergencia Evolutiva Polar) (Menzies *et al.* 1973, Zinsmeister y Feldmann 1984, Brandt 1991-1992, Brandt *et al.* 2007, Aronson *et al.* 2008), nuestros resultados no permiten avalar ninguno de los dos escenarios que describen dichas hipótesis. En primer lugar, porque la especie de distribución Antártica somera (*S. neumayeri*), presenta una importante divergencia del clado que agrupa a las especies de distribución Antártica profunda. Y, en segundo lugar, porque en este último clado se incluyen además las especies de distribución Subantártica somera, lo que nos lleva a proponer otro escenario. Debido a que la separación de los dos cladros se explica por una intensificación de la barrera oceanográfica, la Corriente Circumpolar Antártica, en un periodo de tiempo estimado que coincide además con otros grupos que habitan la zona somera de ambas regiones, el escenario más probable para el grupo en estudio indica una separación efectiva entre las faunas someras de ambos continentes hace aproximadamente 5 Ma. Posteriormente, y después de este proceso de especiación, habría ocurrido una colonización de las zonas profundas por parte del clado Subantártico, colonización que habría alcanzado la parte inferior de la plataforma continental antártica, generando una zona de contacto secundaria entre *S. neumayeri* y el complejo Subantártico y profundo. En la actualidad estas dos especies se encuentran en simpatria en una franja batimétrica que corresponde al límite de sus distribuciones

respectivas (Brey y Gutt 1991). Esto último se ve sustentado en el último proceso de cladogenesis que se observa para el género, donde recientemente (alrededor de 1 Ma), se describe un proceso de diversificación hacia las grandes profundidades desde la zona Subantártica somera, proceso representado por el clado de la especie *S. dentifer* (Figura IV-2).

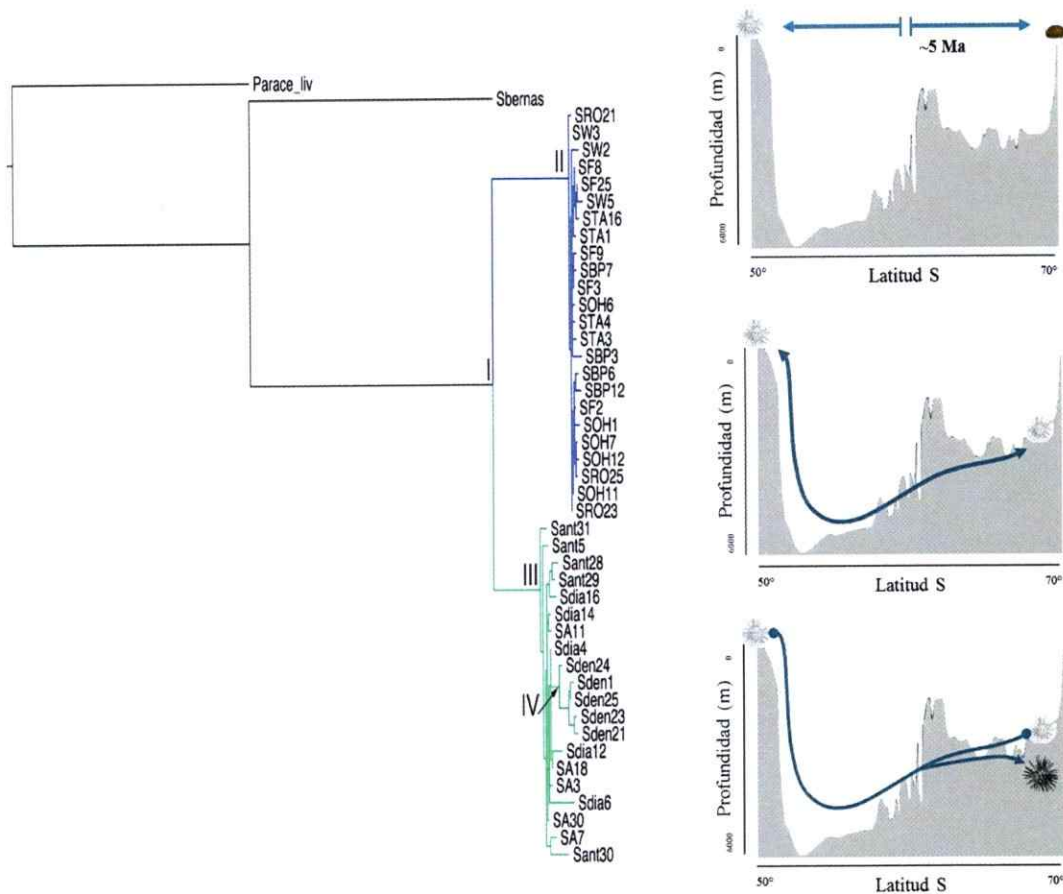


Figura IV-2: Esquema que muestra los distintos escenarios planteados para los principales clados obtenidos en los análisis filogenéticos y posible escenario evolutivo.

Finalmente, nuestro estudio permite plantear una nueva hipótesis acerca de las relaciones de las faunas someras y profundas en el OA, la cual podríamos denominar “Submergencia Evolutiva Subantártica”. A pesar de la escasez de este tipo de estudio en la actualidad, se espera poder evaluar esta nueva hipótesis en otros grupos en un futuro cercano, como resultado de los esfuerzos recientes de muestreo realizados a través de los programas de Censo de la Biodiversidad.

IV.2 ANILLOS DE CONECTIVIDAD

La distribución, abundancia y composición actual de la fauna marina somera del OA refleja complejas interacciones de factores geológicos, oceanográficos y biológicos a través del tiempo y el espacio (Knox 1980-2007, Lawver *et al.* 1993, Clarke y Johnston 1996, Crame 1999, Zachos *et al.* 2001, Linse *et al.* 2006, Rogers 2007, Aronson *et al.* 2008, Griffiths *et al.* 2009, Palma *et al.* 2007). De acuerdo con Knox y Lowry (1977) el bentos marino del OA representa una mezcla de taxa con diferentes afinidades biogeográficas: (a) Grupos autóctonos relictos; (b) grupos derivados de adyacentes aguas profundas; (c) un grupo que dispersa desde Sudamérica a través del Arco de Escocia; (d) un grupo que dispersa hacia el norte a través del Arco de Escocia.

En el caso de los resultados para *S. neumayeri*, su distribución circumpolar e historia evolutiva reciente refleja un escenario donde conforma una especie relictiva del continente. Los ciclos glaciales del pleistoceno marcaron a Antártica con el avance y retroceso de una gruesa capa de hielo sobre la plataforma continental, la hipótesis que respalda la sobrevivencia de *S. neumayeri* a los máximos glaciales es una persistencia *in situ* que hasta el momento cuenta con mayor evidencia para invertebrados terrestres, que incluyen ácaros, colémbolos y copépodos (Convey y Stevens 2007, Rogers 2007, Convey *et al.* 2008) y algas verdes (De Wever *et al.* 2009). No obstante, el reciente trabajo de Allcock y Strugnell (2012) plantea varios modelos que describen escenarios para diversos mecanismos de sobrevivencia al último máximo glacial, señalando que la diversidad genética que deberían presentar especies marinas que sobrevivieron en un único refugio glacial es lo que observamos en *S. neumayeri*, un patrón de “estrella” donde un haplotipo de alta frecuencia del cual se desprenden pocos haplotipos de baja frecuencia, también observado en *Parbolasia corrugatus* (Thornhill *et al.* 2008) y *Chorismus antarcticus* (Raupach *et al.* 2010).

Por otra parte, la presente investigación confirma la existencia de importantes anillos de conectividad a gran escala dentro de cada región, al observar homogeneidad dentro de cada uno de los grupos. La corriente Antártica costera (CACo) o de la deriva del Este (Deacon 1937), es el anillo de circulación que facilita la dispersión alrededor del continente para la especie *S. neumayeri* (Figura IV-3. Mientras que la Corriente Circumpolar Antártica sería la responsable del importante flujo génico observado entre las especies de Argentina (*S. agassizii*) y de Kerguelen (*S. diadema*), quienes se

encuentra en sectores opuestos alrededor del continente Antártico. A pesar de la gran distancia de transporte que implica este anillo de circulación, escenarios similares son descritos para algunas especies de eufáusidos y nototénidos (Bargelloni *et al.* 2000, Thorpe *et al.* 2004). La posibilidad de una conectividad en esta amplia zona ya ha sido planteada para el ecosistema Subantártico (Moyano 1999), destacando que la región Magallánica sería una zona zoogeográficamente unida a la región circum-austral Subantártica a través de la Deriva de Oeste. Además, no se debe olvidar que la capacidad dispersiva, pasiva o no, de una larva con al menos 4 meses en el plancton, como la descrita para *S. neumayeri*, puede potenciar dicha conectividad a amplia escala.

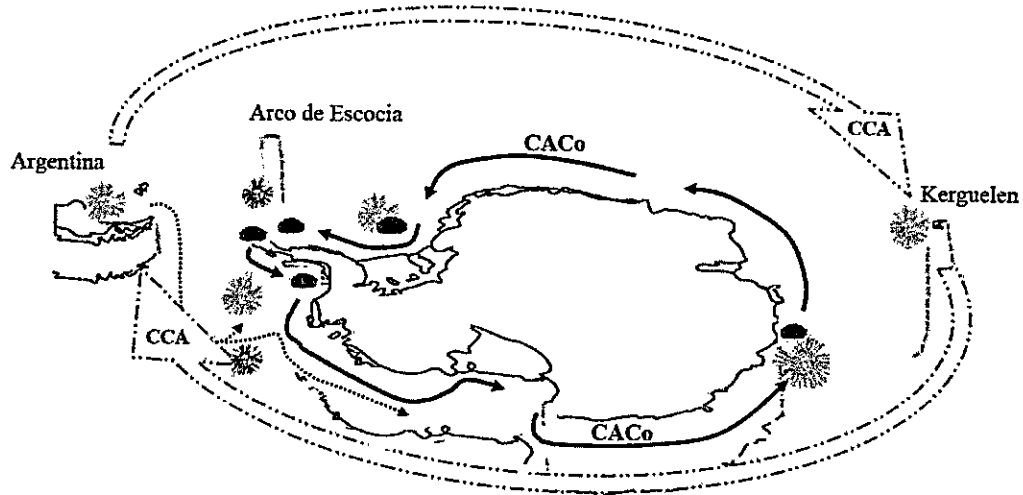


Figura IV-3: Esquema que muestra los anillos de conectividad detectados por la presente investigación. La flecha de línea continúa negra señala a la corriente Antártica Costera (CACo) y la flecha gruesa de línea discontinua señala a la Corriente Circumpolar.

IV.3 IMPLICANCIAS TAXONOMICAS

Si bien los resultados de la presente investigación no permiten por si solos descartar a la especie *S. bernasconiae* del género *Sterechinus*, la evidencia en conjunto con recientes

investigaciones si permite plantear que probablemente correspondería a otra especie, pero investigaciones al respecto aún son incipientes. Los resultados enfatizan en la actual problemática que significan por una parte las incongruencias entre filogenias de caracteres morfológicos y genéticos, y por otra lo esencial que resulta poder contar con caracteres diagnósticos que permitan hacer buenas clasificaciones taxonómicas. En cuanto a los caracteres morfológicos que determinan las diferencias entre las especies de *Sterechinus* estos son muy puntuales de difícil observación a simple vista (David *et al.* 2005). En la figura IV-4 se muestran los caracteres descritos para la identificación de *Sterechinus*, aquí se puede que por ejemplo, la diferencia para clasificar entre *S. diadema* y *S. antarcticus* puede ser una simple plasticidad fenotípica en la forma de la testa, mientras que *S. neumayeri* comparte varios caracteres con las especies del complejo. Se muestra además un esquema del carácter diagnóstico para *S. bernasconiae*, un largo extremo de las valvas de sus pedicelarios tridáctilos. (Los pedicelarios son pequeñas estructuras con funciones defensivas, alimentarias y limpiadora, ubicadas principalmente alrededor de la boca, <http://www.nhm.ac.uk/research-curation/research/projects/echinoid-directory/intro/introduction.html>).

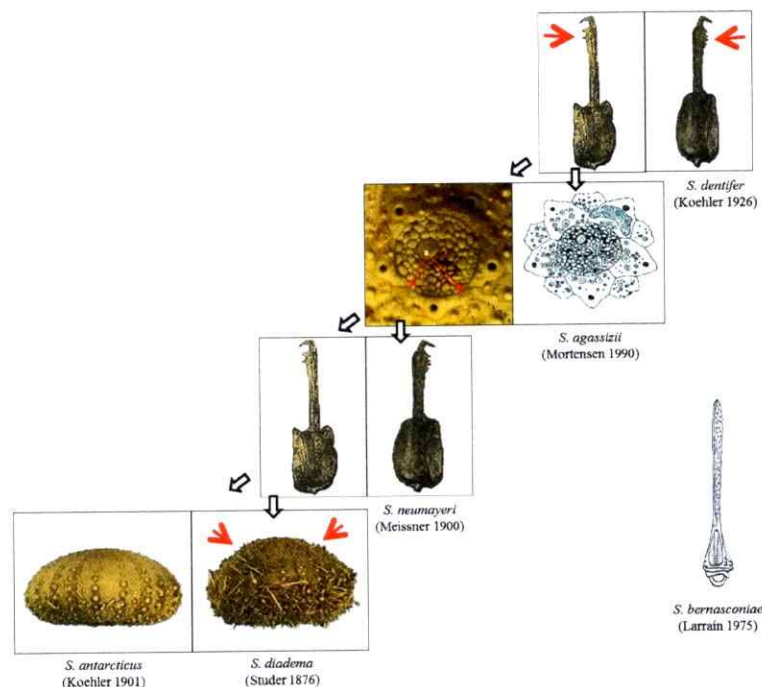


Figura IV-4: Esquema de los caracteres que permiten diferenciar a las especies de *Sterechinus*. Desde arriba describen distintas formas para el número de dientes en valvas de pedicelarios; placa ocular; forma de los hombros de las valvas y; forma de la testa.

En base a nuestros resultados, estimamos necesario una revisión completa de los caracteres que han sido utilizados para describir estas especies. La información proporcionada por los marcadores moleculares indicarían la existencia de solo 2 o 3 especies?. Este trabajo ya se está realizando en colaboración con los Drs. Thomas Saucède y Bruno David de la Universidad de Bourgogne en Francia.

V.4 COMENTARIOS FINALES.

Los resultados obtenidos para *Sterechinus* entregan nueva información que aporta al entendimiento sobre los tiempos y modos de origen y diversificación de la fauna marina bentónica en el OA. El muestreo exhaustivo del género representa el primer trabajo en el que se incorporan todas las especies descritas para el género, provenientes de distintas provincias biogeográficas. Esto ha permitido exhibir la evidencia más completa sobre la evolución de este importante y abundante género de erizos regulares del Océano Austral.

La presente investigación determinó estrechas relaciones evolutivas entre las regiones Antártica y Subantártica. Se ratificó una relación entre las especies que habitan la zona somera de Subantártica (Argentina y Kerguelen) con las que habitan la zona profunda de Antártica (*S. antarcticus* y *S. dentifer*), escenario descrito por Díaz *et al.* (2011). Las especies del género (con la excepción de "*S. bernasconiae*"), entregan información genética que permite describirlas dentro de un mismo grupo que comparte un ancestro común.

El complejo *Sterechinus* sobresale en términos de la dispersión a gran escala que muestran nuestros datos, debido a que individuos atribuidos a tres especies nominales podrían presentar actualmente flujo génico (*S. agassizii*, *S. diadema* y *S. antarcticus*), para lo cual sus individuos (larvas) deben atravesar grandes profundidades e importantes distancias (Figura IV-3). Además, se establece la existencia de importantes anillos de conectividad, alrededor del continente Antártico la Corriente Antártica Costera (CACo), representa un anillo que permite un importante flujo génico para la especie *S. neumayeri*. Mientras que en la zona somera Subantártica, los resultados señalan a la corriente circumpolar Antártica como un anillo de conectividad entre las

poblaciones (y especies) presentes en Argentina y Kerguelen.

Finalmente, se constató la existencia de dos grandes grupos para el género *Sterechinus* separados probablemente por 1 evento de vicariancia que podría haberse iniciado por una intensificación de la Corriente Circumpolar hace aproximadamente 5 Ma.

REFERENCIAS

- Aljanabi S.M. y I. Martínez** (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research* 25: 4692-4693.
- Allcock A.L. y J.M. Strugnell** (2012) Southern Ocean Diversity: New paradigms from molecular ecology. *TREE* 27: 520 – 528.
- Amsler C.D., J.B. McClintock y B.J. BAKER** (1999). An Antarctic feeding triangle: defensive interactions between macroalgae, sea urchins and sea anemones. *Marine Ecology Progress Series* 183: 105–114.
- Anderson J.B. et al.** (2002) The Antarctic ice sheet during the last glacial maximum and its subsequent retreat history: a review. *Quaternary Science Reviews* 21: 49–70.
- Arango C.P., A Soler-Membrives y K.J. Miller** (2011) Genetic differentiation in the circum-Antarctic sea spider *Nymphon australe* (Pycnogonida; Nymphonidae). *Deep Sea Research II: Topical Studies in Oceanography* 58: 212-219.
- Aronson R.B. y D.B. Blake** (2001) Global climate change and the Origin of modern Benthic Communities in Antarctica. *American Zoology* 41: 27 – 39.
- Aronson R.B., S. Thatje, A. Clarke, L.S. Peck, D.B. Blake, C.D. Wilga, y B.A. Seibel** (2007) Climate Change and Invasibility of the Antarctic Benthos. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 38: 129 – 54.
- Arntz W.E., Thatje S., Gerdes D., Gili J-M., y Gutt J.,** (2005) The Antarctic-Magellan connection: macrobenthos ecology on the shelf and upper slope, a progress report. *Scientia Marina* 69 (Suppl. 2): 237 – 69.
- Bandelt H-J., P. Forster y A. Röhl** (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bargelloni L., S. Marcato, L. Zane y T. Patarnello** (2000 a) Mitochondrial phylogeny of Notothenioids: A molecular approach to Antarctic fish evolution and biogeography. *Systematic Biology* 49: 114-129.
- Bargelloni L., L. Zane, N. Derome, G. Lecointre y T. Patarnello** (2000b) Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of genetic variation. *Ant. Sci.* 12, 259-268.
- Barker P.B. y J. Burrell** (1982) The influence upon southern ocean circulation, sedimentation, and climate of the opening of drake passage. 377 – 385 pg. In: C. Craddock (ed.) *Antarctic Geosciences*. University of Wisconsin Press, Madison.
- Barker P.T.** (2001) Scotia Sea regional tectonic evolution: implications for mantle flow

- and palaeocirculation. *Earth-Science Reviews* 55: 1-39.
- Barker P.F. y E. Thomas** (2004) Origin, signature and paleoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth-Science Reviews* 66: 143-162.
- Barker P.F., G.M. Filipelli, F. Florindo, E.E. Martin y H.D. Scher** (2007) Onset and role of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep-Sea Research II*. 54: 2388-2398.
- 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.
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste, y F. Bonhomme** (1996/2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la genetique des populations. Laboratoire Genome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171. Universite' de Montpellier II, Montpellier
- Berkman P.A., R. Cattaneo-Vietti, M. Chiantore, y C. Howard-Williams** (2004) Polar emergence and the influence of increased sea-ice extent on the Cenozoic biogeography of pectinid mollusks in Antarctic coastal areas. *Deep-sea Research parte II* 51: 1839 – 1855.
- Björk S., P. Sandgren y R. Zale** (1991) Late Holocene tephrochronology of the northern Antarctic Peninsula region. *Quaternary Research* 36: 322-328.
- Bosch I., K.A. Beauchamp, M.E. Steele y J.S. Pearse** (1987) Development, Metamorphosis, and Seasonal Abundance of Embryos and Larvae of the Antarctic sea urchin *Stereochinus neumayeri*. *Biology Bulletin* 173: 126 – 135.
- Bowden D.A., A. Clarke y L.S. Peck** (2009) Seasonal variation in the diversity and abundance of pelagic larvae of Antarctic marine invertebrates. *Marine Biology* 156: 2033 - 2047.
- Brandt A.** (1991) Zur Besiedlungsgeschichte des antarktischen Schelfes am Beispiel der Isopoda (Crustacea, Malacostraca). *Berichte zur Polarforschung* 98:1–240.
- Brandt A.** (1992) Origin of Antarctic Isopoda (Crustacea, Malacostraca). *Marine Biology* 113:15–23.
- Brandt D. y M. Andreoli** (2005) The late Mesozoic palaeosoils and Cenozoic fluvial deposits at Vaalputs, Namaqualand, South Africa: possible depositional mechanisms and their bearing on the evolution of the continental margin. *South African Journal of Geology* 108: 271-284.
- Brand A., A. Gooday, S.n. Brandao, S. Brix, W. Brokeland, T. Cedhagen, M. Choudhury, N. Cornelius, B. Danis, I. De Mesel, R. Diaz, D.C. Gillan, B. Ebbe,**

- J.A. Howe, D. Janussen, S. Kaiser, K. Linse, M. Malyutina, J. Pawlowski, M. Raupach y A. Vanreusel** (2007) First insights into the biodiversity and biogeography of the Southern Ocean deep sea. *Nature* 447: 307 – 311.
- Brey T. y J. Gutt** (1991) The genus *Sterechinus* (Echinodermata: Echinoidea) on the Weddell Sea shelf and slope (Antarctica): distribution, abundance and biomass. *Polar Biology* 11: 227-232.
- Brey T., J. Pearse, I. Basch, M.S. McClintock y M. Slattery** (1995) Growth and production of *Sterechinus neumayeri* (Echinoidea: Echinodermata) in McMurdo Sound, Antarctica. *Marine Biology* 124: 279–292.
- Brey T., C. Dahm, M. Gorfny, M. Klages, M. Stiller y W. E. Arntz** (1996) Do antarctic benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarctic Science* 8: 3-6.
- Briggs J.C.** (2003) Marine centres of origin as Evolutionary engines. *Journal of Biogeography* 30: 1-18.
- Brockington S., A. Clarke y A.L.G. Chapman** (2001) Seasonality of feeding and nutritional status during the austral winter in the Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Marine Biology* 139: 127–138.
- Chan K.M.A. y S.A. Levin** (2005) Leaky prezygotic isolation and porous genomes: rapid introgression of maternally inherited DNA. *Evolution* 59: 720-729.
- Clarke A.** (1983) Life in cold water: the physiological ecology of polar marine ectotherms. *Oceanography and Marine Biology: an Annual Review* 21: 341 – 453.
- Clarke A. y J.A. Crame** (1989) The origin of the Southern Ocean marine fauna. In: Crame J.A. (ed.) *Origins and evolution of the Antarctic Biota*: 253-568.
- Clarke A. y J.A. Crame** (1992) The Southern Ocean benthic fauna and climate change: a historical perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 338: 299 – 309.
- Clarke, A. y A. Johnston** (1996) Evolution and adaptative radiation of Antarctic fishes. *Trends in Ecology and Evolution* 11: 211-218.
- Clarke A. y Crame J.A.** (1997) Diversity, latitude and time: patterns in the shallow sea. In *Marine Biodiversity: Causes and Consequences*, ed. RFG Ormond, JD Gage, MV Angel, pp. 122–47. Cambridge: Cambridge Univ. Press
- Crame J.A.** (1999) An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost south America and Antarctica. *Scientia Marina* 1: 1 – 14.
- Clarke A. y N.M. Johnston** (2003) Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography*

- Marine Biology 41: 47 – 114.
- Clarke A., D.K.A. Barnes y D.A. Hodgson (2005) How isolated is Antarctica? Trends in Ecology and Evolution 1: 1-3.
- Clarke A., H.J. Griffiths, K. Linse, D.K.A. Barnes y A. Crame (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 Distribution 13: 620-632.
- Convey P. y M.I. Stevens (2007) Antarctic Biodiversity. Science 317: 1877-1878.
- Convey P., Jae Gibson, C.D. Hillenbrand, D.A. Hodgson, P.J.A. Pugh, J.L. Smellie y M.I. Stevens (2008) Antarctic terrestrial life – challenging the history of the frozen continent? Biological Reviews 83: 103-117.
- Convey P. *et al.* (2009) Exploring biological constraints on the glacial history of Antarctica. Quaternary Science Reviews 28: 3035–3048.
- Coyer J.A., Smith G.J. y R.A. Anderson (2001) Evolution of *Macrocystis* spp. 439 (Phaeophyceae) as determined by ITS1 and ITS2 sequences. Journal of Phycology 37: 574-585
- Cunningham, S.A., Alderson, S.G. y B.A King (2003) Transport and variability of the Antarctic Circumpolar Current in Drake Passage. Journal of Geophysical Research 180: SOV11-1-SOV11-17.
- David B., T. Chone, R. Mooi y C. De Ridder (2005) Antarctic Echinoidea. Theses Zoologicae volume 35.
- Deacon G.E.R. (1937) A general account of the hydrology of the Southern Ocean, Discovery Reports 15: 177–238.
- Dell R.K. (1972) Antarctic benthos. Advances in Marine Biology 10:1–216.
- De Wever A., F. Leliaert, E. Verleyen, P. Vanormelingen, K. van der Gucht *et al.* (2009) Hidden levels of phylodiversity in Antarctic green algae: further evidence for the existence of glacial refugia. Proceedings of Royal Society B 276: 3591-3599.
- De Mesel I., H.J. Lee, S. Vanhove, M. Vincx y A. Vanreusel (2006) Species diversity and distribution within the deep-sea nematode genus *Acantholaimus* on the continental shelf and slope in Antarctica. Polar Biology 29: 860 – 871.
- Díaz A. J-P. Féral. B. David, T. Saucedo y E. Poulin (2011) Evolutionary pathways among shallow and deep-sea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. Deep-Sea Research II 58: 205 – 211.

- Donald K.M., M. Kennedy y H.G. Spencer (2005 a).** Cladogenesis as the result of long distance rafting events in South Pacific topshells (Gastropoda, Trochidae). *Evolution* 59: 1701-1711.
- Donald K.M., M. Kennedy y H.G. Spencer (2005 b).** The phylogeny and taxonomy of austral monodontine topshells (Mollusca: Gastropoda: Trochidae), inferred from DNA sequences. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 37: 474-483.
- Drummond A.J., A. Rambaut, B. Shapiro y O.G. Pybus (2005)** *Molecular Biology and Evolution* 22: 1185 – 1192.
- Drummond A.J. y A. Rambaut (2007)** BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.
- Drummond A.J., M.A. Suchard, D. Xie y A. Rambaut (2012)** Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, doi: 10.1093/molbev/mss075
- Eagles G. Y R.A. Livermore (2002)** Opening history of Powell Basin, Antarctic Peninsula. *Marine Geology* 185: 195-205.
- Edgar R.C. (2004)** MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797.
- Ekman V.K. (1928)** A survey of some theoretical investigations in ocean current, *Journal du Conseil, Conseil Permanent International pour l'Exploration de la Mer*, 3, 295-297.
- Edwards C.E, D.E. Soltis y P.S. Soltis (2008)** Isolation, characterization and cross-species amplifications of microsatellite loci from *Conradina* (Lamiaceae). *Molecular Ecology Resources* 8:363-366
- El-Kassaby Y.A., C.H. Newton y C.E. Ritland (2001)** Characterization of microsatellite loci in white pine weevil (*Pissodes strobi*). *Molecular Ecology Notes* 1:248-249.
- Farias I.P., I. Sampaio y L.B. Muniz (2006)** Isolation and characterization of DNA microsatellite primers for *Cynoscion acoupa*, the most exploited sciaenid fish along the coast of Brazil. *Molecular Ecology Notes* 6:660-663.
- Fenton J.H.C. (1982)** The formation of vertical edges on Antarctic moss peat banks. *Arctic and Alpine Research* 14: 21-26.
- Filatov D.A. (2002)** PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology 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 Society New Zealand Bulletin* 35: 453-459.
- Florindo F. y M. Siegert (2009)** *Antarctic Climate Evolution*. Primera Edición, Elsevier, Oxford Reino Unido.
- Fraser C.I., R. Nikula, H. Spencer y J.M. Waters (2009)** Kelp genes reveal effects of Subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proceeding of the National Academy of Science U.S.A.* 106: 3249-3253.
- Fraser C.I. et al. (2012)** Poleward bound: biological impacts of Southern Hemisphere glaciation. *Trends in Ecology and Evolution* 27: 462 - 471.
- Gage J.D. (2004)** Diversity in deep-sea benthic macrofauna: the importance of local ecology, the larger scale, history and the Antarctic. *Deep-sea Research part II* 51: 1689 – 1708.
- Gérard K., N. Bierne, P. Borsa, A. Chenuil y J-P Féral (2008)** Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from northern and southern hemisphere and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetic and Evolution* 49: 84-91.
- Gersonde R., y G. Wefer (1987)** Sedimentation of biogenic siliceous particles in Antarctic waters (Atlantic Sector), *Marine Micropaleontology* 11: 311–332.
- Gille, S.T. (2002)** Warming of the Southern Ocean since the 1950s. *Science* 295: 1275-1277.
- González-Wevar, C.A., T. Nakano, J.I. Cañete y E. Poulin (2010)** Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 56: 115–124.
- González-Wevar, C.A., T. Nakano, J.I. Cañete y E. Poulin (2011)** Concerted genetic, morphological and ecological diversification in *Nacella* limpets in the Magellanic Province. *Molecular Ecology* 20: 1936-1951.
- Griffiths H.J., D.K.A. Barnes y K. Linse (2009)**. Towards a generalized biogeography of the Southern Ocean benthos. *Journal of Biogeography* 36: 162-177.
- Griffiths H.J., C. Arango, T. Munilla y S.J. McInnes (2011)** Biodiversity and biogeography of Southern Ocean pycnogonids. *Ecography* 34: 616-627.
- Grobe H. y A. Mackensen (1992)** Late quaternary climatic cycles as recorded in sediments from the Antarctic continental margin. *Antarct. Res. Ser.* 56: 349-376.
- Guillot G., A. Estoup, F. Mortier y J.F. Cosson (2005)** A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics* 170: 1261-1280.

- Gutt J., B.I. Sirenko, I.S. Smirnov y W.E. Arntz (2004)** How many macrozoobenthic species might inhabit the Antarctic shelf? *Antarctic Science* 16: 11-16.
- Hassold N.J.C., D.K. Rea, B.A. van der Pluijm y J.M. Parés (2009)** A physical record of The Antarctic Circumpolar Current: Late Miocene to recent slowing of abyssal circulation. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and 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. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 15: 165 – 178.
- Ho S.Y.W., M.J. Phillips, A. Cooper, y A.J. Drummond (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., B. Shapiro, M.J. Phyllips, A. Cooper y A.J. Drummond (2007)** Evidence for time dependency of Molecular rate estimates. *Systematic Biology* 56: 517-522.
- Hoffman J.I., L.S. Peck, G. Hillyard, A. Zieritz y M.S. Clark (en prensa)**. No evidence for genetic differentiation between Antarctic limpet *Nacella concinna* morphotypes. *Marine Biology* 157: 765 – 778.
- Jacob U., S. Terpstra y T. Brey (2003)** High-Antarctic regular sea urchins – the role of depth and feeding in niche separation. *Polar Biology* 26: 99 – 104.
- Jokat, W., Bochel, T., König, M., Meyer, U., (2003)** Timing and geometry of early Gondwana breakup. *Journal of Geophysical Research* 108: EPM4-1-EPM4-15.
- Kennet J.P. (1977)** Cenozoic evolution of Antarctic glaciation, the circum-Antarctic Ocean and their impact on global paleoceanography. *Journal of Geophysical Research* 82: 3843-3860.
- Keeling, R.F., y B.B. Stephens (2001)** Antarctic sea ice and the control of Pleistocene climate instability. *Paleoceanography* 16: 121-131.
- 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.
- King C.K. y M.J. Riddle (2001)** Effects of metal contaminants on the development of the common Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri* and comparisons of

- sensitivity with tropical and temperature echinoids. *Marine Ecology Progress Series*, 215: 143–154.
- 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.
- Knox G.A. y J.K. Lowry** (1977) *Polar Oceans*, Dunbar, E.J., Ed. Arctic Institute of North America, Calgary, 423.
- La Mesa M., M. Dalú y M. Vacchi** (2004) Trophic ecology of the emerald notothen *Trematomus bernacchii* (Pisces, Nototheniidae) from Terra Nova Bay, Ross Sea, Antarctica. *Polar Biology* 27: 721 – 728.
- Larraín, A.P.** (1975) Los equinoideos regulares fosiles y recientes de Chile. [Fossil and recent echinoids of Chile. *Gayana Zoologia* 35: 1–189.
- Lawver L.A., L. Cahagan y M. Coffin** (1992) The development of paleoseaways around Antarctica. *Antarct. Res. Ser.* 56: 7 – 30.
- Lawver L.A. y L.M. Gahagan** (2003) Evolution of Cenozoic seaways in the circumAntarctic region. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology* 198: 11-37.
- Lee Y., M. Song, S. Lee, R. Leon, S. Godoy y I. Canete** (2004) Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the south American sea urchins. *Antarctic Science* 1: 29 – 36.
- Librado P. y J. Rozas** (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25, 1451-1452.
- Linse K., H.J. Griffiths, D.K.A. Barnes y A. Clarke** (2006) Biodiversity and biogeography of Antarctic and sub-Antarctic mollusca. *Deep-Sea Res. II.* 53, 985-1008.
- Livermore R., A. Nankivell, G. Eagles y P. Morris** (2005) Paleogene opening of Drake Passage. *Earth and Planetary Science Letter* 236: 459-470.
- Lodish H., A. Berk, S.L. Zipurski, P. Matsudaira, D. Baltimore y J. Darnell** (2002) *Biología Celular y Molecular*, 4ta Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. Marcelo T. de Alvear 2145, Buenos Aires, Argentina. Pp. 1084
- Ludwig, W.J.** (1983) Geological framework on the Falkland Plateau. *Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project* 71: 281 – 293.
- Lyle M., S. Gibbs, T.C. Moore y D.K. Rea** (2007) Late Oligocene initiation of the Antarctic Circumpolar Current: Evidence from the South Pacific. *Geology* 35: 691 –

- Mackensen A.** (2004) Changing Southern Ocean palaeocirculation and effect on global climate. *Antarctic Science* 16: 369-384.
- Maddison W.P. y D.R. Maddison** (2010) Mesquite: a modular system for evolutionary analysis. Version 2.74 <http://mesquiteproject.org>
- Mahon A.R., C.P. Arango y K.M. Halanych** (2008) Genetic diversity of *Nymphon* (Arthropoda: Pignogonida: Nymphonidae) along the Antarctic Peninsula with focus on *Nymphon australe* Hodgson 1902. *Marine Biology* 155: 315-323.
- Marsh A.G. y D.T. Manahan** (2000) Metabolic differences between “demersal” and “pelagic” development of Antarctic sea urchin *Sterechinus neumayeri*. *Marine Biology* 137: 215 – 221.
- Marsh, A.G., R.E. Maxson y D.T. Manahan** (2001) High macromolecular synthesis with low metabolic cost in antarctic sea urchin embryos. *Science* 291: 1950 – 1952.
- Meredith M.P., P.L. Woodworth, C.W. Hughes y V. Stepanov** (2004) Changes in the ocean transport through Drake Passage during the 1980s and 1990s, forced by changes in the Southern Annular Mode. *Geophysical Research. Letter* 31: L21305.
- McCartney M.A., G. Keller y H.A. Lessios** (2000). Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchin of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology* 9: 1391 – 1400.
- McClintock J.** (1994) Trophic biology of Antarctic shallow-water echinoderms. *Marine Ecology Progress Series* 111: 191–202.
- Menzies R.J., R.Y. George y G.T. Rowe** (1973) *Abyssal Environment and Ecology of the World Oceans*. New York:Wiley. 488 pp.
- Mortensen T.** (1936) Echinoidea and Ophiuroidea, *Discov. Rep.*, 12, 199–348.
- Ó Foighil D., B.A. Marshall, T.J. Hilbish y M.A. Pino** (1999) Trans-Pacific range extension by rafting inferred for the flat oyster *Ostrea chilensis*. *Biological Bulletin* 196: 122 - 126.
- Moffat C., R.C. Beardsley, B. Owens y N. Van Lipzing** (2008) A first description of the Antarctic Peninsula Coastal Current. *Deep-Sea Research Part II* 55: 277 – 293.
- Moyano H.I.** (1999) Magellan bryozoa: a review of the diversity and of the subantarctic and Antarctic zoogeographical links. *Scientia Marina* 63: 219 – 226.
- Orsi A.H., Whitworth III T., Nowlin Jr., W.D.,** (1995) On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep-Sea Research I*. 42: 641-673.
- Page T.J. y K. Linse** (2002) More evidence of speciation and dispersal across the

- Antarctic polar front through molecular systematics of Southern ocean *Limatula* (Bivalvia: Limidae). *Polar Biology* 25: 818 – 826.
- Palma A.T., E. Poulin, M.G. Silva, R.B. San Martín, C.A. Muñoz y A.D. Díaz** (2007) Antarctic shallow subtidal echinoderms: is the ecological success of broadcaster related to ice disturbance?
- Pawson, D.L.** (1969b) Echinoidea Antarctic Map Folio Series II, American Geographical Society, Washington, DC, 38–41.
- Palumbi S.R., G. Grabowsky, T. Duda, L. Sëller y N. Tachino** (1997) Speciation and population genetic structure in tropical pacific sea Urchins. *Evolution* 5: 1506 – 1517.
- Pearse J.S., J.B. McClintock y I. Bosch** (1991) Reproduction of Antarctic benthic marine invertebrates: tempos, modes, and timing. *American Zoologist* 31: 65–80.
- Perase J.S. y A.C. Giese** (1966) Food, reproduction and organic constitution of the common antarctic echinoid *Sterechinus neumayeri* (Meissner). *Biological Bulletin* 130: 387 – 401.
- Peck L.S.** (2002) Ecophysiology of Antarctic marine ectotherms: limits to life. *Polar Biology* 25: 31–40.
- Piry S., A. Alapetite, J.M. Cornuet, D. Paetkau, L. Baudouin y A. Estoup** (2004) geneclass2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity* 95: 536–539.
- Pfuhl H.A. y I.N. McCave** (2005) Evidence for late Oligocene establishment of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth and Planetary Science Letters* 235: 715–728.
- Posada D.** (2008). jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.
- Poulin E., A.T. Palma y J-P. Féral** (2002) Evolutionary versus ecological success in Antarctic benthic invertebrates. *Trends in Ecology and Evolution* 5: 218 - 222.
- Provan J. y K.D. Bennett** (2008) Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 564-571.
- Pugh P.J.A. y P. Convey** (2008) Scotia Arc Acari: antiquity and origin. *Zoological Journal of the Linnean Society* 130: 309-328.
- Raupach, M.J. et al.** (2010) Genetic homogeneity and circum-Antarctic distribution of two benthic shrimp species of the Southern Ocean, *Chorismus antarcticus* and *Nematocarcinus lanceopes*. *Marine Biology* 157: 1783–1797.
- Pritchard, J.K., M. Stephens y P. Donnelly** (2000) Inference of population structure

- using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945 - 959.
- Rintoul, S.R., Hughes, C., Olbers, D.** (2001) The Antarctic Circumpolar Current System. In: Siedler, G., Church, J., Gould, J (Eds.), Pp 271-302. *Ocean Circulation and climate*. New York Academic Press.
- Rogers A.D.** (2000) The role of the oceanic oxygen minima in generating biodiversity in the deep sea. *Deep-Sea research Parte II* 47: 119 – 148
- Rogers A.D.** (2007) Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society (B)* 362: 2191-2214.
- Rogers A.D.** (2012) Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. In *Antarctic Ecosystems: An Extreme Environment in a Changing World* (Rogers, A.D. et al., eds), pp. 417–467, Blackwell Publishing .
- Ronquist F., y J.P. Huelsenbeck** (2003) MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574
- Röhl, A.** (2002) Network, netw3111.exe downloaded in the web site: www.fluxusengineering.com
- Scher H.D. y E.E. Martin** (2006) Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science*. 312, 428-430.
- Smith R., M. Desflots, S. White, A.J. Mariano y E.W. Ryan** (2008) The Antarctic CP Current. *Ocean Surface Currents*.
- Smith J.A. et al.** (2010) The presence of polynyas in the Weddell Sea during the last glacial period with implications for the reconstruction of sea-ice limits and ice sheet history. *Earth and Planetary Science Letters* 296: 287–298
- Slatkin M. y R.R. HUDSON** (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics* 129: 555-562.
- Stamatakis A., P. Hoover y J. Rougemont** (2008) A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Systematic Biology* 75: 758-771.
- Stankovic A., K. Spalik, E. Kamler, P. Borsuk y P. Weglenski** (2002) Recent origin of sub-Antarctic notothenoids. *Polar Biology* 25: 203-205.
- Strugnell J.M., A.D. Rogers, P.A. Prodohl, M.A. Collins y A.L. Allcock** (2008) The thermohaline expressway: the Southern Ocean as a centre of origin for deep-sea octopuses. *Cladistics* 24: 1 – 8.
(<http://oceancurrents.rsmas.miami.edu/southern/antarctic-cp.html>).
- Spinks P.Q. y H.B. Shaffer** (2009) Conflicting mitochondrial and nuclear phylogenies for the widely disjunct *Emys* (Testudines: Emydidae) species complex, and what

- they tell us about biogeography and hybridization. *Systematic Biology* 58: 1-20.
- Tajima F.** (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tavares M. y De Melo G.A.S.** (2004) Discovery of the first known benthic invasive species in the Southern Ocean: the North Atlantic spider crab *Hyas araneus* found in the Antarctic Peninsula. *Antarctic Science* 16: 129-131.
- Thatje S. y V. Fuentes** (2003) First record of anomuran and brachyuran larvae (Crustacea: Decapoda) from Antarctic waters. *Polar Biology* 26: 279-282.
- Thatje S.** (2005) The future fate of the Antarctic marine biota. *Trends in Ecology and Evolution* 8: 418-419.
- Thatje S., K. Anger, J.A. Calcagno, G.A. Lovrich, H-O Portner y W.E. Arntz** (2005) Challenging the cold: crabs reconquer the Antarctic. *Ecology* 86: 619 - 625.
- Thompson J.D., D.G. Higgins y T.J. Gibson** (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., A.R. Mahon, J.L. Norenburg y K.M. Halanych** (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.
- Thorpe S.A., K. Heywood, D. Stevens y M.A. Brandon** (2004) Tracking passive drifters in a high resolution ocean model: implications for interannual variability of larval krill transport to South Georgia. *Deep-Sea Research 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.
- Tripati A., J. Backman, H. Elderfield y P. Ferretti** (2005) Eocene bipolar glaciation associated with global carbon cycle changes. *Nature* 436: 341 - 346.
- Van Oosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills y P. Shipley** (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4: 535-538.
- Waters J.M.** (2007) Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern temperate

- marine biogeography, with new directions for dispersalism. *Journal of Biogeography* 35: 1 - 11.
- Weir B.S. y C.C. Cockerham** (1984) Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1370.
- Wilson N.G., M. Schrödl y K.M. Halaných** (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.
- Xia X. y Z. Xie** (2001) DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371 - 373.
- Zachos J., M. Pagani, L. Sloan, E. Thomas y K. Billups** (2001) Trends, rhythms, and aberrations on global climate 65 Ma to present. *Science* 292: 686-693.
- Zinsmeister W.J. y R.M. Feldmann** (1984) Cenozoic high latitude heterochroneity of Southern Hemisphere marine faunas. *Science* 224: 281 - 83.
- Zwally H.J., J.C. Comiso, C.L. Parkinson y P. Gloersen** (2002) Variability of Antarctic sea ice 1979-1998. *Journal of Geophysical Research* 107: 3041 - 3059.