

UCH-FC
B. Ambiental
P. 644e
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE – FACULTAD DE CIENCIAS – ESCUELA DE PREGRADO

**“ESTRUCTURA GENÉTICA E INFERENCIA DEMOGRÁFICA DEL
PINGÜINO BARBIJO (*PYGOSCELIS ANTARCTICUS*) EN LA PENÍNSULA
ANTÁRTICA EN EL CONTEXTO DE LA ÚLTIMA TRANSICIÓN GLACIAL-
INTERGLACIAL”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los
requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente

CAROLINA ALEJANDRA PIMENTEL GAETE

Director del Seminario de Título: Dr. ELIE POULIN

Co-Directora de Tesis: Dra. JULIANA A. VIANNA

Fecha: 30 de julio del 2015

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TITULO

Se informa a la escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el seminario de Título, presentado por la Srta.

“ESTRUCTURA GENÉTICA E INFERENCIA DEMOGRÁFICA DEL PINGÜINO BARBIJO (*PYGOSCELIS ANTARCTICUS*) EN LA PENÍNSULA ANTÁRCTICA DURANTE LA ÚLTIMA TRANSICIÓN GLACIAL-INTERGLACIAL”

Ha sido aprobado por la Comisión de evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Bióloga con mención en Medio Ambiente

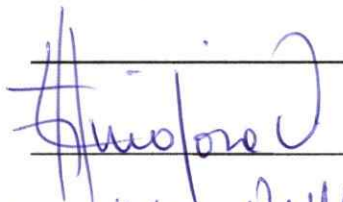
Director Seminario de Título:

 ela Poulín

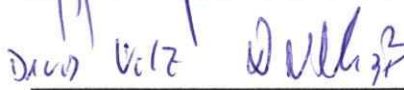


Comisión Revisora y Evaluadora

Presidente Comisión:

 Lt. Anupre

Evaluador:

 Duco Vitz

Santiago de Chile,06/07/2015



**“De nuestros miedos
nacen nuestros corajes,
y en nuestras dudas
viven nuestras certezas.
Los sueños anuncian otra realidad posible,
y los delirios otra razón.
En los extravíos
nos esperan los hallazgos
porque es preciso perderse
para volver a encontrarse”**

Eduardo Galeano

Agradecimientos

Quisiera agradecer y dedicar este trabajo a mi familia por su amor incondicional, comprensión, confianza, y apoyo en mis decisiones de vida. A Patricia mi maravillosa madre, por estar siempre presente, por la fortaleza que me entrega, por ser la mejor guía y porque me inspira a querer ser cada día mejor persona. A Jorge por ser un padre amoroso, por ayudarme a cumplir mis sueños, por su esfuerzo permanente de entregarme las mejores herramientas para surgir y desenvolverme en la vida. A mi hermanita Dani porque tuve la suerte de crecer junto a ella, por su gran corazón y por ser un ejemplo en mi vida. Los amo, admiro y me siento muy afortunada de tenerlos en mi vida.

A mis tutores Elie Poulin y Juliana Vianna por creer en mí, darme la oportunidad de trabajar con ellos, por su constante apoyo, orientación, buen humor y paciencia.

A mis compañeros de laboratorio de la Universidad de Chile, Fabi, Coni, Angie, Jime, MariJo, Esteban, Claudio, Ceci y Cristian, así como también a mis compañeros de laboratorio de la Universidad Católica, Isi, Nicole y Daly. Porque todos ellos han sido importantes en este proceso y de distintas maneras han contribuido para que logre desarrollar este proyecto. Gracias por todo lo que me han enseñado, por su siempre buena disposición, consejos, apoyo moral, motivación, grato ambiente y por compartir conmigo en esta etapa de gran crecimiento personal y académico.

Y por supuesto a mis amigos de la vida, Lua, Saya, Naty, Luis, Flavia, Karlita, Carofer, Nacho y Claudio, por las alegrías compartidas, apoyo incondicional y amor entregado.

Me hacen muy feliz.

A la comisión evaluadora compuesta por Felipe Hinojosa y David Veliz por sus comentarios y correcciones.

Al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) por el financiamiento para la realización de este seminario.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Hipótesis y Objetivos	15
Hipótesis general	15
Predicción	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
Materiales y Métodos	16
Área de estudio	16
Elección de marcadores moleculares	17
Amplificación de Polymerase Chain Reaction (PCR) y Secuenciación	18
Diversidad genética	21
Estructura genética poblacional	22
Inferencia demográfica	23
“Mismatch distribution”	23
“Crecimiento exponencial”	23
“Inferencia Bayesiana”	24
<i>Marcador mitocondrial</i>	25
<i>Marcador nuclear</i>	25
Tasas mutacionales	26

Resultados	28
Diversidad genética	28
<i>Marcador mitocondrial</i>	28
<i>Marcador nuclear</i>	30
Estructura genética poblacional	32
<i>Marcador mitocondrial y nuclear</i>	32
Inferencia demográfica	34
<i>Marcador mitocondrial</i>	34
<i>Marcador nuclear</i>	35
“Mismatch distribution”	35
“Crecimiento exponencial”	37
“Inferencia Bayesiana”	38
<i>Marcador mitocondrial</i>	38
<i>Marcador nuclear</i>	38
Discusión	40
<i>Estructura genética</i>	40
<i>Inferencia demográfica</i>	44
<i>Diferentes respuestas demográficas de los Pygoscelis frente al Cambio climático actual e histórico</i>	46
<i>Proyecciones</i>	50
Conclusiones	51
Bibliografía	52

ÍNDICE DE FIGURAS

Introducción

Figura 1. Distribuciones, abundancias (con recuentos basados en pares) y tendencias poblacionales de *P. antarcticus*, *P. papua* y *P. adeliae*. Modificado de Woehler (1993), Lynch *et al.* (2012) y Borboroglu & Boersma (2013).....

Figura 2. Patrones biogeográficos de *P. adeliae*, *P. antarcticus* y *P. papua*. Los datos están basados en avistamientos desde el mar, principalmente durante el verano austral (entre los años 1955 y 2011). Extraído de Roupert-Courdet (2014).....

Figura 3. Espacios de nicho ecológicos durante el periodo de crianza (verano austral) para las tres especies de *Pygoscelis*. Espacio de nicho definido por concentración del hielo marino (SIC), temperatura superficial oceánica (SST), y batimetría para pingüinos Adelia en el continente (rojo), Adelia en la WAP (naranja), Papua (verde), y Barbijo (azul). Cada punto representa condiciones promedio en un sitio a través de records satelitales.....

Figura 4. Variaciones climáticas desde el Paleoceno al Holoceno asociadas a la filogenia de los mayores grupos de pingüinos. Modificado de Zachos *et al.* (2001); Subramanian *et al.* (2013); Petit *et al.* (1999); Shevenel *et al.* (2011) y Parks *et al.* (2015).....

Metodología

Figura 5. Mapa de las 4 localidades muestreadas en el conglomerado de Islas Shetland del Sur y en Península antártica.....

Resultados

Figura 6. Relaciones genealógicas entre los haplotipos de las localidades reconstruidas para el marcador mitocondrial (HVR-I). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos como muestra la escala de la figura. Cada punto en la línea azul que separa los haplotipos representa un paso mutacional.....

Figura 7. Relaciones genealógicas entre los haplotipos de las localidades reconstruidas para el marcador nuclear (β fibint7). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos como muestra la escala de la figura. Cada punto en la línea azul que separa los haplotipos representa un paso mutacional.....

Figura 8. Distribuciones Mismatch para ambos marcadores. A) Marcador mitocondrial (HVR-I). B) Marcador nuclear (β fibint7). Línea punteada roja indica los valores esperados con el ajuste al modelo poblacional de crecimiento instantáneo (Rogers &

Harpending 1992). Línea punteada azul corresponde a los valores observados de diferencias entre los pares de las secuencias analizadas.....

Figura 9. Variaciones del tamaño efectivo ($N_e = \theta/2u$) en el tiempo para ambos marcadores. La flecha roja indica el tiempo estimado de la expansión (considerado al 1% tamaño relativo). A) Marcador mitocondrial (HVR-I) muestra una expansión desde los 4700 años para las hembras de la población. B) Marcador nuclear (β fibint7) muestra una expansión desde los 29700 años para la población.....

Figura 10. Estimación media para el valor a posteriori del tamaño efectivo (N_e) en el tiempo de ambos marcadores (Línea solida negra). A) Modelo de coalescencia GMRF Bayesian Skyride para el marcador mitocondrial (HVR-I); N_e alude solo a las hembras de la población. B) Modelo de coalescencia Bayesian Skyline para el marcador nuclear (β fibint7); N_e alude a toda la población. La flecha roja indica el promedio para el Ancestro Común Más Reciente (ACMR). La línea vertical punteada indica el intervalo de credibilidad del ACMR. El área celeste indica el intervalo de credibilidad de la curva de crecimiento de cada gráfico con un 95% de Densidad Posterior Alta (HPD).....

Discusión

Figura 11. “Óptimos climáticos” para los Pingüinos. Extraído de Huang *et al.* (2009)

ÍNDICE DE TABLAS

Introducción

Tabla 1. Estructura genética e inferencia demográfica para las 3 especies de *Pygoscelis* a diferentes escalas geográficas y usando diversos marcadores moleculares.....

Metodología

Tabla 2. Códigos de acceso a Genbank y nombre de especies utilizadas para el diseño de partidores del intron 7 del gen β -fibrinógeno.....

Resultados

Tabla 3. Índices de diversidad estándar calculados para las localidades empleando el marcador mitocondrial (HVR-I): Número de secuencias (**N**); Número de Haplotipos (**h**); Número de sitios polimórficos (**S**); Diversidad genética observada (**H_d**); Número promedio de diferencias entre pares de secuencias (**II**) y Diversidad nucleotídica (π). Tests de Neutralidad: índices Tajima (**D**) y Fu (**F_s**) con sus respectivos valores de significancia para cada localidad y para el conjunto de localidades. Valores destacados en negrita presentan significancia estadística ($p < 0,05$).....

Tabla 4. Índices de diversidad estándar calculados para las localidades empleando el marcador nuclear (β fibint7): Número de secuencias (**N**); Número de Haplotipos (**h**); Número de sitios polimórficos (**S**); Diversidad genética observada (**Hd**); Número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) y Diversidad nucleotídica (π). Tests de Neutralidad: Índices de Tajima (**D**) y Fu (**F_s**) con sus respectivos valores de significancia para cada localidad y para el conjunto de localidades. Ningún valor presentó significancia estadística ($p < 0,05$).....

Tabla 5. Índices de estructuración filogeográfica (ϕ_{st}) y genética (**F_{st}**), para las localidades empleando el marcador mitocondrial (HVR-I). Valores de ϕ_{st} y **F_{st}** se encuentran bajo la diagonal y sobre ésta su significancia estadística. Ningún valor significativo ($p < 0,05$).....

Tabla 6. Índices de estructuración filogeográfica (ϕ_{st}) y genética (**F_{st}**), para las localidades empleando el marcador nuclear (β fibint7). Valores de ϕ_{st} y **F_{st}** se encuentran bajo la diagonal y sobre ésta su significancia estadística. Ningún valor significativo ($p < 0,05$).....

Lista de abreviaturas

WAP: Zona Oeste de la Península Antártica

SIC: Concentración del hielo marino

SST: Temperatura superficial del océano

UMG ; LGM: Último Máximo Glacial

Ma ; Myr: Millones de años atrás

tACMR: Tiempo ancestro común más reciente

N_e: Tamaño efectivo poblacional

MCMC: Cadenas de Markov-MonteCarlo

pb: Pares de base

RESUMEN

Actualmente, la Península Antártica es reconocida como una de las regiones más impactadas por el cambio climático a nivel mundial. En esta zona se han observado cambios rápidos en los tamaños poblacionales de aves y mamíferos marinos. En particular, los pingüinos del género *Pygoscelis* han mostrado respuestas diferenciales en sus dinámicas poblacionales. Cambios climáticos de mayor magnitud a los experimentados hoy han existido en el pasado, afectando principalmente las regiones polares y templadas. Por ejemplo, la transición hacia el actual periodo interglacial, iniciada luego del Último Máximo Glacial (UMG), ha tenido importantes consecuencias sobre la distribución geográfica y la demografía de especies presentes en estas regiones, alterando a su vez su diversidad y estructuración genética. Para evaluar la respuesta del pingüino barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) durante la última transición glacial-interglacial, se caracterizó la diversidad genética de poblaciones provenientes de la Península Antártica y de las Islas Shetlands del Sur, se analizó su estructura genética y su historia demográfica a partir de secuencias de la Región Hipervariable I (HVR-I) del ADN mitocondrial (666pb) y del Intrón 7 del β -fibrinógeno (β fibint7) del ADN nuclear (476pb). Al igual que para *P. papua* y *P. adelia*, especies congénéricas estudiadas previamente en la misma zona, *P. antarcticus* presentó una alta diversidad genética para la Región Control, además de señales de crecimiento poblacional a finales del Pleistoceno, mostrando una historia común para estas tres especies. Sin embargo, a diferencia de las otras especies de *Pygoscelis*, no se encontró estructuración poblacional en *P. antarcticus*, lo que podría sugerir un mayor flujo génico entre poblaciones y un comportamiento filopátrico menos estricto.

ABSTRACT

At the present time, the Antarctic Peninsula is known as one of the most impacted regions by climate change in the world. Fast changes in population sizes of birds and marine mammals have already occurred in this area. Particularly, the penguins of the genus *Pygoscelis* have shown differential responses in their population dynamics. Global changes of larger magnitude than the experienced today have occurred in the past affecting mainly polar and temperate regions. For example the transition to the actual interglacial period, which started after the Last Glacial Maximum (LGM), have had important consequences on the geographic distribution and demography of the species, altering their diversity and genetic structure. To evaluate the response of chinstrap penguin (*Pygoscelis antarcticus*) during the last glacial-interglacial transition, the genetic diversity of populations from the Antarctic Peninsula and the South Shetland islands was characterized, were made analysis of their genetic structure and demographic history from the Hypervariable Region I (HVR-I) of mitochondrial DNA (666pb) and Intron 7 of β -fibrinogen (β fibint7) of nuclear DNA (476pb). As for *P. papua* and *P. adelia*, congeneric species previously studied in the same area, *P. antarcticus* showed high genetic diversity for the Control Region and population growth signature at the ending of the Pleistocene, showing a common history for these three species. However, unlike other species of *Pygoscelis*, no population structure was found in *P. antarcticus*, which might suggest a greater gene flow between populations and a less strict philopatric behavior.

INTRODUCCIÓN

Actualmente, la zona oeste de la Península Antártica (*West Antarctic Peninsula*, WAP) es reconocida como una de las regiones más impactadas por el cambio climático a nivel mundial (Turner *et al.* 2013). En esta zona se han observado cambios rápidos ambientales y ecológicos. En la WAP la temperatura atmosférica se ha elevado 6°C desde 1950 (Stokstad 2007), y se ha estimado que el hielo marino ha reducido su extensión en aproximadamente un 5-6% por década y su duración estacional se ha acortado en $3.1 \pm$ días por año desde que existen las mediciones satelitales (Comiso *et al.* 2011; Stammerjohn *et al.* 2012). Además se ha reportado un aumento en la frecuencia de eventos climáticos extremos tales como tormentas con precipitaciones más fuertes (Turner *et al.* 2005b) y tasas de acumulación de nieve mayores (Thomas *et al.* 2008).

Asociados a esos drásticos cambios climáticos se han detectado cambios en las distribuciones y abundancias de aves y mamíferos, así como en su fenología (Jenouvrier *et al.* 2003; Weimerskirch *et al.* 2003; Forcada *et al.* 2005; Ducklow *et al.* 2007). Es el caso de las tres especies de pingüinos del género *Pygoscelis*, que juegan un rol de mesopredadores marinos en la cadena trófica y coexisten en la zona oeste de la Península Antártica. Abarcando el rango total de distribución de las 3 especies, la más numerosa es *P. antarcticus* con más de 7,5 millones de pares, le sigue *P. adeliae* con al menos 2,61 millones de pares y *P. papua* con un total de 387 mil pares (Woehler 1993). Particularmente, en la zona de la Península las abundancias corresponden a $\sim 1.058.410$

Varias hipótesis han sido sugeridas para explicar las respuestas poblacionales diferenciales entre las especies. Una primera hipótesis está relacionada con las distribuciones de las especies y la asociación de su historia de vida con la capa de hielo marino. Barbijo y Papua presentan una distribución principalmente sub-Antártica, catalogándose “ice avoiding species”, mientras que Adelia posee una distribución fundamentalmente circum-Antártica siendo tildada de “ice loving species” (Figuras 2). Hinke *et al.* (2007) postula que serían principalmente las condiciones de invierno las que contribuirían a las respuestas divergentes entre los pingüinos.

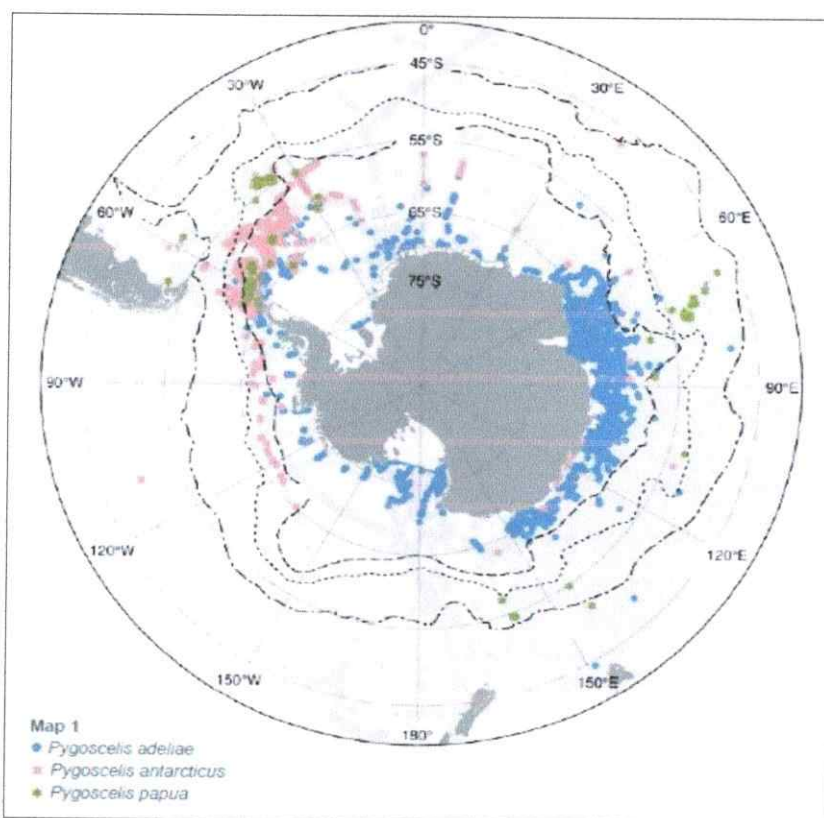


Figura 2. Patrones biogeográficos de *P. adeliae*, *P. antarcticus* y *P. papua*. Los datos están basados en avistamientos desde el mar, principalmente durante el verano austral (entre los años 1955 y 2011). Extraído de (eg) Yan Roupert-Courdet (2014).

Cimino *et al.* (2013) determinó con mayor precisión la contribución de la concentración del hielo marino (SIC) y de la temperatura superficial del océano (SST) como variables ambientales en el nicho de las 3 especies de *Pygoscelis*. (Figura 3)

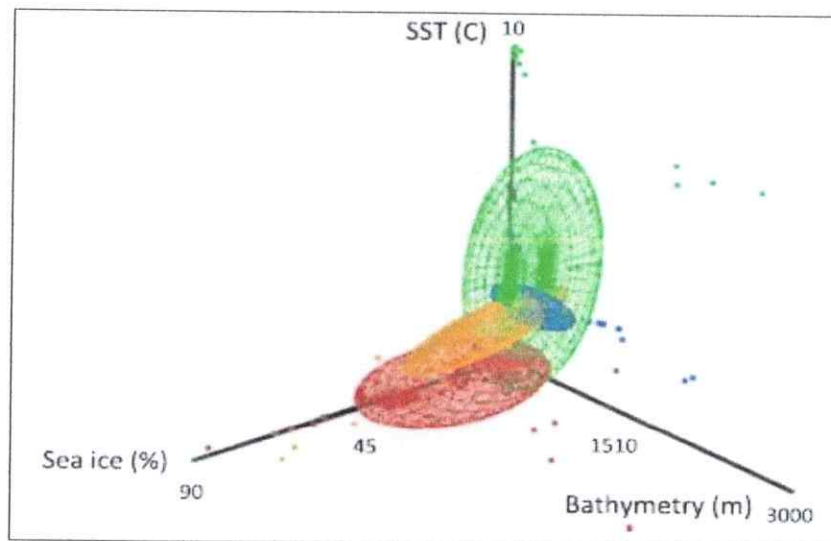


Figura 3. Espacios de nicho ecológicos durante el periodo de crianza (verano austral) para las tres especies de *Pygoscelis*. Espacio de nicho definido por concentración del hielo marino (SIC), temperatura superficial oceánica (SST), y batimetría para pingüinos Adelia en el continente (rojo), Adelia en la WAP (naranja), Papua (verde), y Barbijo (azul). Cada punto representa condiciones promedio en un sitio a través de records satelitales.

La afinidad por el hielo de Adelia explicaría por qué esta especie se ha visto perjudicada por los cambios recientes de la capa de hielo marino (Fraser *et al.* 1992; Williams 1995; Borboroglu & Boersma, 2013) y la aversión tanto de Papua como Barbijo haría prever que estas especies serían beneficiadas con dichos cambios. Sin embargo, esta hipótesis, que se cumplía en algunos estudios de escalas espaciales pequeñas, ha sido cuestionada al ser considerada a una escala espacial mayor (Lynch *et al.* 2012) puesto que no sería capaz de explicar la razón por la que Barbijo se encontraría disminuyendo globalmente en la zona de la Península Antártica. Se sugiere que las dinámicas de la capa de hielo

juegan un rol más complejo en la ecología de las especies del género *Pygoscelis* que las reflejadas por la clásica “hipótesis del hielo marino”.

Otra forma descrita en la cual el calentamiento global estaría afectando las poblaciones de pingüinos es reduciendo su éxito reproductivo. Producto de las mayores tasas de acumulación de nieve y la pérdida de plataforma de hielo (la cual permite la migración a las zonas ricas en Krill), los pingüinos Adelia habrían sufrido un aumento en la mortalidad de sus huevos (Wilson *et al.* 2001; Ducklow *et al.* 2007; McClintock *et al.* 2008). Además eventos extremos e inusuales de fuertes precipitaciones y vientos catabáticos, asociados a los efectos del cambio global, pueden aumentar la mortalidad de sus crías, como se ha observado en Terre Adélie donde se produjo una falla reproductiva completa para las crías de Adelia (Ropert-Coudert *et al.* 2014).

Otra hipótesis está relacionada con la disponibilidad de alimento por medio de una regulación poblacional del tipo “Bottom up” (Fraser *et al.* 1992). Se ha documentado que los cambios en la extensión y duración del hielo marino han provocado una disminución en la abundancia de la principal fuente de alimento que sustenta la red trófica en la antártica: el Krill, *Euphausia superba* (Atkinson *et al.* 2004; Montes-Hugo *et al.* 2009). Éste suceso tendría implicancias negativas sobre las poblaciones de depredadores superiores, entre ellos los pingüinos (Loeb *et al.* 1997; Hinke *et al.* 2007; Ballerini *et al.* 2009; Trivelpiece *et al.* 2011). La dependencia del recurso es mayor en *P. adelia* y *P. antarcticus* en comparación con *P. papua*, la cual se describe como una especie con dieta más flexible y generalista, y por ende menos sensible a la actual

disminución de Krill (Miller *et al.* 2009; Lima & Estay, 2013; Polito *et al.* 2015). Finalmente, la “hipótesis Krill-surplus” en la cual se postula que la regulación del ecosistema pelágico antártico del tipo “Top down” también podría haber jugado un rol en las dinámicas poblacionales por medio de competencia con otros predadores por presas (Lynnes *et al.* 2002). La caza de ballenas y focas, producida durante el siglo XIX y comienzos del siglo XX, habría provocado una reducción en la competencia con los pingüinos por el Krill. Éste hecho habría derivado en un aumento temporal en las abundancias de los pingüinos (Conroy *et al.* 1974; Trivelpiece & Volkman 1979) y hoy el cese de la caza podría estar influyendo en la disminución poblacional de las especies de *Pygoscelis* por un consecuente aumento en la competencia interespecifica.

Cambios climáticos de mayor magnitud a los experimentados hoy han existido en el pasado, afectando principalmente las regiones polares y templadas (Baker *et al.* 2001). Estos cambios climáticos habrían jugado un papel relevante en la historia evolutiva de los pingüinos (Baker *et al.* 2006; Clarke *et al.* 2007; Hospitaleche *et al.* 2013; Subramanian *et al.* 2013). La abrupta disminución de la temperatura ocurrida hace ~12 Ma habría resultado en la formación de la capa de hielo permanente en el continente Antártico, lo cual es coincidente con el periodo de diversificación de la mayoría de los linajes hace ~11-16 Ma (de 7,6 Ma es el registro fósil más antiguo del género *Pygoscelis*, *P. grandis*), y por ende podría haber jugado un rol importante en este proceso biológico (Subramanian *et al.* 2013) (Figura 4).

Las oscilaciones climáticas entre periodos glaciares e inter-glaciales del Cuaternario (Figura 4), con sus consecuentes expansiones y contracciones de las capas de hielo marino, han modelado los patrones biogeográficos de las especies presentes en el Océano Antártico (Hewitt 2004). Extinciones, migraciones a latitudes más bajas, adaptación y sobrevivencia en refugios, son las formas en que respondieron muchas especies a estos cambios. Durante el Pleistoceno, la transición desde el Último Máximo Glacial (UMG) (~21000 años atrás) al presente periodo inter-glacial (el Holoceno, comenzando ~12000 años atrás) fue el último gran evento de cambio climático (Turner *et al.* 2013). En el UMG la capa de hielo marino antártico alcanzó su máxima extensión (siendo el doble de la actual durante el invierno; Turner *et al.* 2013), se estima que la temperatura fue $\sim 6.1 \pm 1.0$ °C más fría que en la actualidad (1961–1990) en la Península Antártica (Abram *et al.* 2011) y los niveles eustáticos del mar descendieron en un rango de 120 a 135 metros (Clark *et al.* 2002). A pesar de las adversas condiciones del UMG se piensa que pudieron existir áreas libres de hielo en las plataformas continentales y polinias que permitiesen la existencia de refugios glaciales antárticos (Anderson *et al.* 2002). Además el estudio de Fraser *et al.* (2014) sugiere que áreas con actividad geotérmica en la Antártica pudieron ser importantes como refugios durante las glaciaciones.

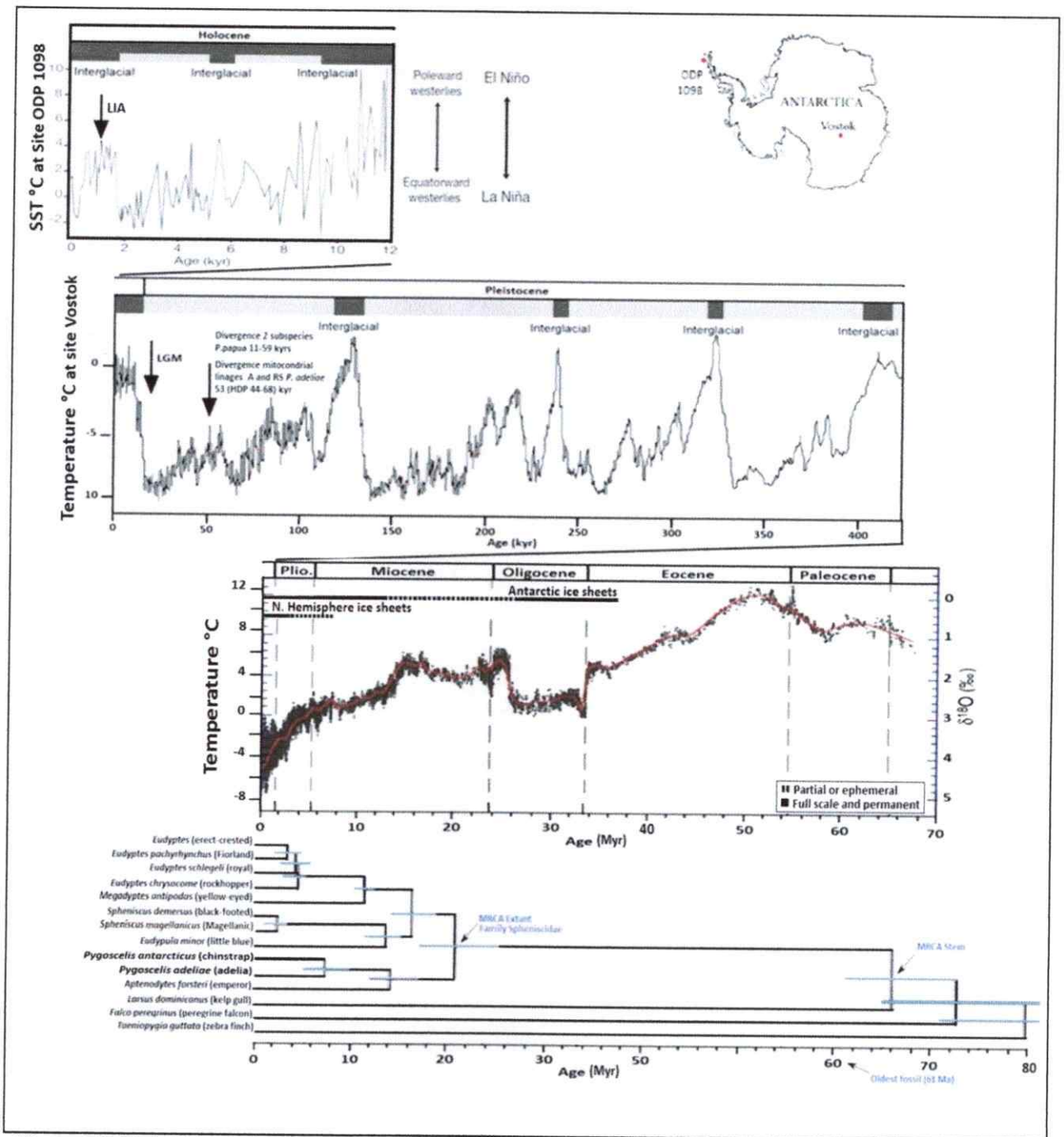


Figura 4. Variaciones climáticas desde el Paleoceno al Holoceno asociadas a la filogenia de los mayores grupos de pingüinos. Modificado de Zachos *et al.* (2001); Subramanian *et al.* (2013); Petit *et al.* (1999); Shevenel *et al.* (2011) y Parks *et al.* (2015).

A partir de los registros paleoecológicos de *Pygoscelis* (existentes en su mayoría para *P. adeliae*), se sabe que han respondido a los cambios climáticos principalmente abandonando sus colonias reproductivas, dispersándose y colonizando hábitats más favorables (Emslie *et al.* 1998; Smith *et al.* 1999; Forcada & Trathan 2009). Los pingüinos Adelia han formado y abandonado colonias en relación a la persistencia y desaparición del hielo marino durante milenios (Ainley 2002; Emslie *et al.* 2003; Emslie *et al.* 2014). Los registros más antiguos encontrados para Adelia corresponden a 45.000 años atrás en el Mar de Ross (Emslie *et al.* 2007; Millar *et al.* 2012), para Papua a ~1100 años atrás en la Península Byers de la Isla Livingston (Emslie *et al.* 2011) y para Barbijo se remontan a no más de 500 años en la Isla King George. (Emslie S. D. com pers. 2014; Emslie *et al.* 2014). Cabe destacar la ausencia de hallazgos de suelos ornitogénicos de más de 1100 años en la zona norte de la Península Antártica.

De forma complementaria al estudio de la evidencia fósil (muchas veces inexistente, por la falta de exposición de roca en el continente) para reconstruir la historia evolutiva, y para dilucidar las respuestas demográficas de las especies ante los cambios climáticos, es particularmente útil una aproximación filogeográfica. Existe una impronta en la genética, donde patrones característicos de su diversidad se pueden interpretar como señales de sobrevivencia en refugios, eventos de expansión, recolonización y/o reducción en los tamaños efectivos poblacionales de las especies (Rogers 2007; Allcock & Strugnell, 2012). Dichas interpretaciones deben hacerse tomando en cuenta las estrategias de historia de vida de las especies.

Diversos estudios filogeográficos con marcadores moleculares ya han revelado parte de la historia demográfica y estructuración de las poblaciones de los pingüinos de este género (Tabla 1).

Tabla 1. Estructura genética e inferencia demográfica para las 3 especies de *Pygoscelis* a diferentes escalas geográficas y usando diversos marcadores moleculares.

Especie	Marcador Molecular	Escala geográfica	Estructura Filogeográfica (Fst) y Genética (Fst)	Inferencia demográfica	Referencia
<i>P. antarcticus</i>	Mitocondrial (HVR-I)	West Antarctic Peninsula (WAP): Orne Harbour, King George, South Orkney; Signy, South Sandwich; Zvezdovski	Estructuración fue solo con la colonia de Zavaloovski en las islas South Sandwich (Fst)	Expansión post-UMG	Citena <i>et al.</i> 2014
	AFLP	WAP: Isla King George Penguin Island	Debil o ausente estructuración poblacional		Korczak <i>et al.</i> 2012
	Nuclear (βBink7)	WAP: Ardley Island, O'Higgins Base, GGV Base	No fue posible detectar estructuras (Fst, Fst).		Peña <i>et al.</i> 2014
<i>P. papua</i>	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Elephant Island, Admiralty Bay, Ardley Island, O'Higgins Base, GGV Base.	Estructuración baja (Fst, Fst) entre todas las poblaciones, excepto dos poblaciones pertenecientes a King George Island (Admiralty Bay y Ardley Island) muy cercanas geográficamente.	Expansión poblacional Post-UMG.	Citena <i>et al.</i> 2014
	Región Control y NADH dehidrogenasa subunit 2 (IND2)	WAP: Port Lockroy, King George, Falklands: Volunteer Point, Saunders (E/M), South Georgia: Bird Island, South Orkneys: Signy.	Estructuración entre todas las poblaciones (Fst)	Expansión post-UMG, tiempo de divergencia de las dos subespecies fue entre 11 y 59 mil años.	Citena <i>et al.</i> 2014
	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Admiralty Bay, King George Island	Se encontró estructuración (Fst) significativa entre colonias	Población estable en los últimos 500.000 años	Dantas <i>et al.</i> 2014
<i>P. Adeliae</i>	Nuclear (MPP4, UCHL3, AKI5, HMG-2, ODC6)	WAP: Livingston Island, Galindez Island, Argentine Islands, Kerguelen Islands; Ramanoff-Ancodes Pappus, Filiklandis; New Islands.	Estructuración entre todas las poblaciones	Expansión poblacional	deDinechin, <i>et al.</i> 2012
	Mitocondrial (HVR-I)	Ross Sea	No se detectó estructura	Expansión poblacional previa al UMG	Beana-Picón 2012
	Mitocondrial (HVR-I)	Ross Sea	Se encontró estructuración (Fst) significativa entre colonias	Expansión poblacional post-UMG	
	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Torgersen Island, Ross Sea, Balfour Island, Port Martin, Welch Island Gardner Island.	2 linajes monofiléticos, uno distribuido por todo el continente Antártico (A) y otro restringido a Ross Sea (RS)	2 refugios ancestrales sometidos a cuellos de botella (como consecuencia de los efectos del último ciclo glacial), una consiguiente expansión y enzela secundaria IMRCA A-RS = 75kyr (37-122kyr)	Ritchie <i>et al.</i> 2004
	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Bahía Almirantazgo, Isla Ardley	Se encontró estructuración (Fst y Fst) significativa	Expansión temprana posterior a un cuello de botella	Peña 2013
	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Admiralty Bay, King George Island	Sin estructura (Fst)	Expansión poblacional desde 300.000 a 400.000 años atrás	Dantas <i>et al.</i> 2014
	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Lagoellerie, King George, South Orkney; Signy, South Sandwich; Saunders(SS)	Sin estructura (Fst)	Expansión post-UMG	Citena <i>et al.</i> 2014
	Mitocondrial (HVR-I)	WAP: Torgersen Island, Ross Sea, Bechervaise Island, Welch Island, Wyatt Earp Island, Gardner Island, Magnetic Island.	Sin estructura (Fst) a nivel de colonia		Roeder <i>et al.</i> 2001
	Mitocondrial (HVR-I)	Ross Sea: Inexpressible Island, Terra Nova Bay		Detectaron cambios microevolutivos	Shepherd <i>et al.</i> 2005
	Genome Pairwise Sequential Markovian Coalescent		No se encontró estructura (Fst) significativa entre colonias	Expansión desde 1 Ma intensificándose a los 150 mil años durante un período cálido post-peak último máximo glacial. A los 60 mil años el tamaño efectivo poblacional disminuyó en un 40% durante un período frío	Li <i>et al.</i> 2014
	Mitocondrial Completo	Ross Sea	2 linajes monofiléticos (A y RS)	Tiempo de divergencia de los 2 linajes (A) y (RS) fue de 35kyr (HDP 44-68kyr)	Pauls <i>et al.</i> 2015



Como se puede apreciar en la Tabla 1, dentro del género, la especie *P. antarcticus* sigue siendo la menos conocida y estudiada en termino genético. Se pretende en este estudio complementar los conocimientos que se tienen sobre su estructura poblacional e historia demográfica y compararla con las especies del mismo género. Se realizará un análisis conjunto de ADN mitocondrial y nuclear, aproximación particularmente potente dado que estos dos marcadores moleculares permiten proveer información complementaria y superpuesta (Rowe & Beebe 2004) a la hora de inferir historia demográfica y estructuración poblacional.

La comprensión de la respuesta demográfica de los pingüinos del género *Pygoscelis*, catalogados como centinelas del océano (Boersma 2008), a eventos históricos de cambio climático podría dar luces acerca de las respuestas actuales y futuras de las poblaciones frente al fenómeno de calentamiento global en la Península Antártica (Hoelzel 2010; Pauls *et al.* 2013)

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis general: Las poblaciones de pingüino Barbijo (*Pygoscelis antarcticus*) habrían experimentado un proceso de expansión después del Último Máximo Glacial.

Predicción: Se espera detectar una señal de expansión poblacional post-glacial en la diversidad genética para los marcadores genéticos mitocondrial y nuclear, manifestándose en una red de haplotipos con forma de estrella, distribuciones *Mismatch* unimodales y valores negativos significativos en los test de neutralidad.

Objetivo general: Evaluar la demografía histórica del pingüino Barbijo (*P. antarcticus*) durante la transición glacial-interglacial, posterior al Último Máximo Glacial (UMG), en la zona de la Península Antártica y las Islas Shetland del Sur mediante el análisis conjunto de un marcador genético mitocondrial (Región Hipervariable I) y uno nuclear (Intrón 7 del β -fibrinógeno).

Objetivos específicos:

1. Estimar la diversidad genética de las poblaciones de *P. antarcticus*.
2. Determinar la estructura genética de las poblaciones de *P. antarcticus*.
3. Inferir la historia demográfica y calcular los tamaños efectivos poblacionales de *P. antarcticus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

Durante Febrero del 2012 el Dr. Daniel González-Acuña y la Dra. Gisele Dantas colectaron muestras de sangre de *P. antarcticus* de cuatro colonias reproductivas de la WAP. Tres de ellas pertenecen al conglomerado de las Islas Shetland del Sur: Isla Elefante ($61^{\circ}08'S$; $55^{\circ}07'O$), Cabo Shirreff ($62^{\circ}27'S$; $60^{\circ}47'O$), Narebski ($62^{\circ}14'S$; $58^{\circ}47'O$); y una se ubica en la Península Antártica: la Isla Kopaitic ($63^{\circ}19'S$; $57^{\circ}55'O$) (Figura 5).

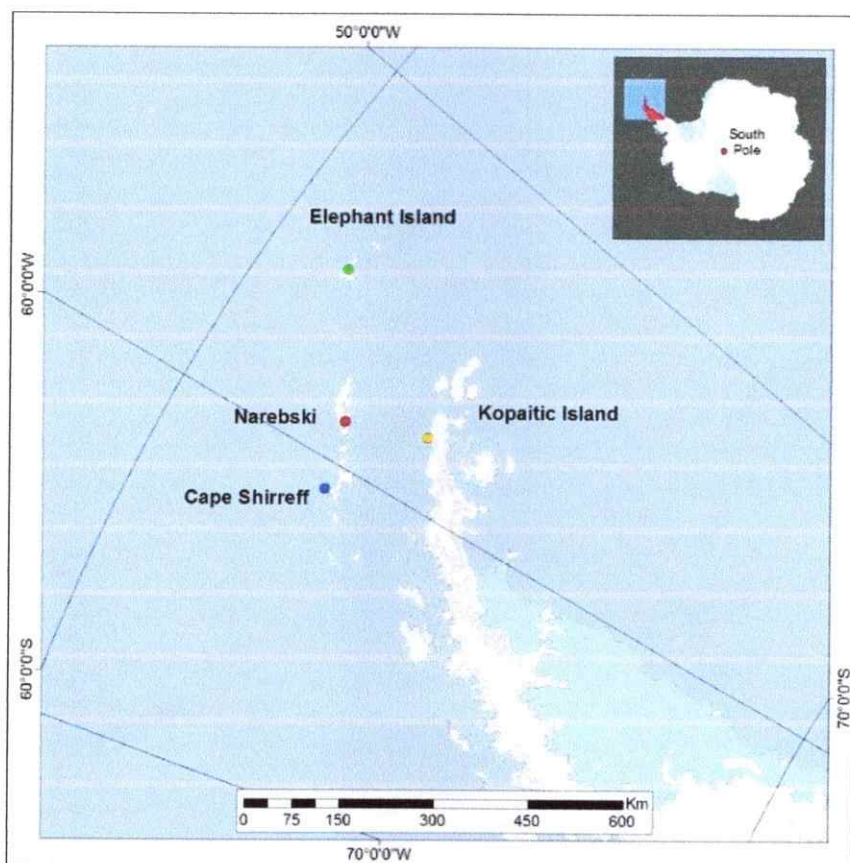


Figura 5. Mapa de las 4 localidades muestreadas en el conglomerado de Islas Shetland del Sur y en Península antártica.

Elección de marcadores moleculares

Un análisis conjunto de ADN mitocondrial y nuclear permite proveer información complementaria y superpuesta (Rowe & Beebe, 2004). Las inferencias poblacionales basadas en múltiples loci no ligados, permiten estimaciones genealógicas independientes de las relaciones evolutivas entre poblaciones, especies y de su historia demográfica. Se puede así abordar la historia poblacional de los organismos (Ballard & Whitlock 2004) a diferentes escalas de tiempo debido a sus diferentes modos de herencia, tamaño efectivo poblacional, y tasas de mutación. El ADN mitocondrial revela solo el aspecto matrilineal, y al ser complementado por un marcador nuclear se puede obtener además información (biparental) de flujo génico efectuada por emigración e inmigración de machos. Como marcadores multilocus, la utilización de intrones, ha mostrado ser igualmente útil que los genes mitocondriales a la hora de mostrar señales filogenéticas, dada su falta de funcionalidad, su alta tasa de sustitución y típicamente bajos niveles de homoplasia (Friesen *et al.* 1997; Friesen 2000; Creer *et al.* 2007).

Como marcador mitocondrial, se eligió la Region Hipervariable I (HVR-I) de la región control del ADN mitocondrial (D-Loop). Entre las características que hacen que la utilización de ésta región no codificante sea conveniente para estudios moleculares están, el que posee una alta tasa mutacional que permite detectar eventos demográficos recientes en la historia evolutiva, tales como efectos fundadores y cuellos de botella (Rowe & Beebe 2004).

Como marcador nuclear, se eligió Intrón 7 del β -fibrinógeno (β fibint7) por las siguientes razones: 1) las secuencias para una gran cantidad de aves cercanas filogenéticamente a *P. antarcticus* se encuentran disponibles en Genbank, lo que permite que se puedan diseñar partidores moleculares conservados para esta región (Tabla 2); 2) Las sustituciones nucleotídicas están azarosamente distribuidas lo largo del intrón lo cual sugiere neutralidad; 3) La señal filogenética dada por el intrón puede ser tan fuerte como la del citocromo b (ADN mitocondrial), como se ha mostrado en la subfamilia de aves Picinae (familia Picidae: Orden Piciformes) (Prychitko & Moore 2000).

Amplificación de Polymerase Chain Reaction (PCR) y Secuenciación

Para la amplificación (PCR) del marcador mitocondrial (HVR-I), se utilizó un partidor descrito en la literatura (t-glu) (Roeder *et al.* 2002) en conjunto con partidores diseñados específicamente a partir de la secuencia de la región control de *P. antarcticus* publicada en Genbank bajo el código de acceso KF020634.1. El diseño se realizó con los programas OligoExplorer y OligoAnalyzer v.1.2. (disponibles gratis online: <http://oligo-explorer.software.informer.com/1.2/> y <http://oligo-analyzer.software.informer.com/>) Los pares de partidores que dieron mejor resultado de amplificación fueron los siguientes: (t-glu) (Forward 5'-CCCGCTTGGCTTYTCTCCAAGGTC-3') e inverso (Rev1) (Reverse 5'- CTTGGGTGCATATAGCATCATCTTG-3') y el par (Forw2) (Forward 5' ACAGTACGAGATAAGTCATGGTCC-3') y (Rev1). Se modificó el protocolo de Peña (2013) para lograr la amplificación. Cada reacción de PCR fue de un

volumen total de 25 μ l, conteniendo 2 μ l de DNA a una concentración de 25ng, 2 μ l de Buffer de reacción 10X (50mM KCL10mM Tris-HCL pH 8.0), 1,5 μ l de MgCl₂ a 50mM, 0,4 μ l de cada partidior (forward y reverse) a 10 μ mol/ μ l, 2,5 μ l a 0,25 mM cada dNTP's y 0,5 μ l de Taq *Platinum* DNA polymerase (invitrogen). La reacción se llevó a cabo con una fase de denaturación inicial durante 4 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30s a 95°C, 30s a 64°C, 45s a72°C, y una fase de extensión final de 10 minutos a 72°C.

Para la amplificación (PCR) nuclear (β fibint7), se necesitó diseñar partidiores. Para ello en el programa ClustalX v 2.1 (Larkin *et al.* 2007), se alinearon secuencias de la cadena beta del fibrinógeno que contuvieran el intrón 7 de aves cercanas filogenéticamente y publicadas en Genebank (Tabla 2). Una vez alineadas, para poder localizar los partidiores Forward y Reverse, se buscó en el interior del conjunto de secuencias un tramo que se mantuviera conservado y fuera parte del intrón 7. Luego, los partidiores fueron creados con la opción "Primer designer tool" incorporada en la página de Genebank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). El tramo de la secuencia seleccionado contiene parte del exón 7 (previo al intrón 7) y parte del intrón 7.

Tabla 2. Códigos de acceso a Genebank y nombre de especies utilizadas para el diseño de partidores del intron 7 del gen β -fibrinógeno

Espece	Código de acceso a Genebank
<i>Anhinga anhinga</i>	EU739364.1
<i>Buteo jamaicensis</i>	EU739353.1
<i>Balaeniceps rex</i>	EU739371.1
<i>Cathartes aura</i>	EU739383.1
<i>Ciconia ciconia</i>	EU739354.1
<i>Charadrius vociferus</i>	EU739386.1
<i>Eudocimus albus</i>	EU739409.1
<i>Eudypula minor</i>	EU739410.1
<i>Fregata magnificens</i>	EU739415.1
<i>Grus canadensis</i>	EU739423.1
<i>Gavia immer</i>	EU739419.1
<i>Haematopus palliatus</i>	EU739424.1
<i>Oceanites oceanicus</i>	EU739449.1
<i>Oceanodroma tethys</i>	EU739450.1
<i>Pygoscelis papua</i>	KF803990.1
<i>Puffinus griseus</i>	EU739478.1
<i>Phoebastria nigripes</i>	EU739406.1
<i>Spheniscus humboldti</i>	DQ881996.1
<i>Sarcoramphus papa</i>	EU739486.1

Los partidores obtenidos corresponden a (ForwFib) de 20 nucleótidos: (Forward 5'-GGAGGACTGGAATGGCGATA-3') e inverso (RevFib) de 20 nucleótidos (Reverse 5'-CCACCAYCAGTCTCTGACAA-3'). Se modificó el protocolo de Peña (2013) para lograr la amplificación. Cada reacción de PCR fue de un volumen total de 20 μ l, conteniendo 4 μ l de DNA a una concentración de 25ng, 2 μ l de Buffer de reacción 10X (50mM KCL10mM Tris-HCL pH 8.0), 1 μ l de MgCl₂ a 50mM, 0,5 μ l de cada partidador (forward y reverse) a 10pmol/ul, 1 μ l a 0,25 mM cada dNTP's y 0,5 μ l de Taq *Platinum* DNA polymerase (invitrogen). La reacción se llevó a cabo con una fase de denaturación inicial durante 10 minutos a 95°C, seguido de Touchdown de 95°C por 15s, 62-52°C por 30s y 72°C por 45s durante 10 ciclos, luego se prosiguió a 95°C por 15s, 58,5°C por

30s y 72°C por 45s durante 30 ciclos y una última fase de extensión por 10 minutos a 72°C.

Los productos de PCR de ambos marcadores, se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con Bromuro de Etidio y fueron posteriormente enviados a purificar y secuenciar a la empresa Macrogen S.A. en Korea del Sur (www.macrogen.com). Las secuencias obtenidas se editaron y alinearon en el programa Proseq (Filatov, 2002).

Diversidad genética

Para las secuencias mitocondriales (HVR-I) se determinaron los haplotipos en el programa DnaSP v. 5.0 (Librado & Rozas 2009). Para las secuencias nucleares (β fibint7), los haplotipos fueron reconstruidos empleando el módulo Phase presente en el mismo programa DnaSP. La resolución de estos haplotipos se basa en los algoritmos planteados en PHASE v. 2.1 (Stephens *et al.*, 2001; Stephens & Donnelly 2003) metodología bayesiana basada en coalescencia y que asume equilibrio de Hardy-Weinberg para la inferencia de los haplotipos.

Se estimaron los índices estándares de diversidad genética tanto para las secuencias mitocondriales (HVR-I) como para las nucleares (β fibint7) de cada una de las localidades (Tabla 3). Los índices de diversidad estándar fueron los siguientes: Número de secuencias (**N**); Número de haplotipos (**h**); Número de sitios polimórficos (**S**); Diversidad genética (**Hd**); Número promedio de diferencias entre pares de secuencias

(Π) y Diversidad nucleotídica (π). Para el cálculo de estos índices, se utilizó el programa DnaSP v. 5.0 (Librado & Rozas 2009).

Las relaciones genealógicas entre haplotipos para ambos marcadores se construyeron en el programa HapView v. beta (Salzburger *et al.* 2011). El árbol filogenético, utilizado para correr el programa HapView v. beta, fue generado en MEGA v. 6 (Tamura *et al.* 2013). Las preferencias de análisis para la construcción de los árboles fueron las siguientes: Statistical Method: Neighbor-joining; Phylogeny test: none, Substitution Model/Method: No. Of differences; Substitutions to include: Transitions + Transversions; Rates among sites: Uniform rates; Gaps/Missing Data Treatment: Complete deletion.

Estructura genética poblacional

Para evaluar la existencia de estructuración genética y filogeográfica, en ambos marcadores, se calcularon los índices respectivos de F_{st} (basado en frecuencia de haplotipos) y ϕ_{st} (basado en el número de diferencias entre pares de secuencias) de forma global (abarcando todas las localidades como un solo grupo) y entre cada par de localidades. Se utilizó el programa Arlequín v.3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) para dichos cálculos.

Inferencia demográfica

Para evaluar desviaciones del equilibrio de Wright-Fisher (deriva-mutación) se realizaron los test de neutralidad de Tajima (Tajima 1989) y de Fu (Fu 1997) utilizando el programa Arlequín v.3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010) (Tabla 3).

Los cambios demográficos históricos se infirieron mediante tres metodologías diferentes. 1) Ajuste de la “Mismatch distribution” al modelo de crecimiento instantáneo, 2) Ajuste al modelo de crecimiento exponencial por Máximo de verosimilitud 3) Inferencia Bayesiana en base a la teoría de la coalescencia

1) “Mismatch distribution”

En primer lugar se construyó la distribución del número de diferencias entre par de secuencias (*Mismatch distribution*) para ambos marcadores (Figura 8). Para estimar el tiempo de expansión se realizó un ajuste al modelo poblacional de crecimiento instantáneo (Rogers & Harpending 1992) en el programa DnaSP v. 5.0 (Librado & Rozas 2009). Se estimó el tiempo de expansión demográfica a partir del parámetro Tau (T) = $2ut$, donde u corresponde a la tasa mutacional y t el tiempo en el cual ocurrió la expansión poblacional.

2) “Crecimiento exponencial”

La segunda inferencia del tiempo en el que ocurrió la expansión, en ambos marcadores, se realizó a partir del modelo de crecimiento exponencial empleando la formula $\theta_t =$

$\theta_0 e^{-(g+u)t}$, donde θ_t corresponde a un parámetro proporcional al tamaño efectivo poblacional en el tiempo t , θ_0 al tamaño efectivo poblacional actual (tiempo cero), g la tasa de crecimiento exponencial y u la tasa mutacional. Los parámetros θ y tasa de crecimiento g fueron estimados empleando el programa Lamarc v.2.1.9 (Kuhner 2006), el cual construye árboles de coalescencia utilizando el criterio de máxima verosimilitud. El tiempo de inicio de la expansión se identificó en aquel momento en que θ_t equivale al 1% del valor de θ_0 (criterio recomendado por los autores del programa). Para mayor fiabilidad de los resultados se corrió el programa 4 veces y se promediaron los resultados.

3) “Inferencia Bayesiana”

El tercer modo de inferencia de la historia demográfica se realizó bajo inferencia bayesiana en el programa BEAST v.1.8. (Drummond *et al.* 2012). Este programa utiliza Cadenas de Markov-MonteCarlo (MCMC) que eficientemente van muestreando variantes del “generalized skylineplot”, para generar una distribución a *posteriori* del parámetro tamaño efectivo poblacional N_e a través del tiempo, y para estimar el tiempo del ancestro común más reciente (tACMR) en las genealogías de coalescencia. Estas distribuciones generan intervalos de credibilidad a posteriori (95% HPD, Highest Posterior Density), representando la incerteza en el N_e y del tACMR. Dentro del paquete de programas de BEAST v.1.8, se encuentran BEAUti y TRACER. BEAUti (Bayesian Evolutionary Analysis Utility) se utiliza para generar el archivo de formato xml ocupado para correr el programa BEAST v.1.8. TRACER v.1.5.0 (Rambaut &

Drummond 2009) provee maneras estadísticas y gráficas para analizar el output de BEAST, chequeando desempeño y precisión. Además provee funciones especializadas para resumir la distribución posterior de los tamaños poblacionales a través del tiempo cuando se utiliza un modelo de coalescencia.

Los supuestos asumidos en programa BEAUti fueron los siguientes:

Marcador mitocondrial: para la selección del mejor modelo de coalescencia bajo inferencia bayesiana, primero se hizo un análisis de BayesFactor entre los modelos de “Bayesian skyline” y “GMRF Bayesian Skyride” en el programa TRACER v.1.5.0 (Rambaut & Drummond 2009). Se determinó como el mejor modelo a “GMRF Bayesian Skyride”. Para el modelo del reloj molecular se utilizó “Lognormal relaxed clock (Uncorrelated)”. La estimación de la altura de la raíz inicial del árbol fue de 15000. Los priors “clock.rate” y “treeModel.rootHeight” fueron modificados a una distribución normal. Se emplearon cadenas de MCMC de 50.000.000 de iteraciones, muestreando parámetros cada 1000 generaciones.

Marcador nuclear: el método de coalescencia bajo inferencia bayesiana elegido fue Bayesian Skylineplot. Para el modelo del reloj molecular se utilizó “Strict clock” debido a que en este análisis la tasa constante entre las ramas no se pudo rechazar (el coeficiente de variación bajo “uncorrelated relaxed molecular clock” no fue diferente de cero). La estimación de la altura de la raíz inicial del árbol fue de 34000. Los priors “clock.rate” y “treeModel.rootHeight” fueron modificados a una distribución normal. Se

emplearon cadenas de MCMC de 100.000.000 de iteraciones, muestreando parámetros cada 2000 generaciones.

La selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica de cada marcador, aplicando un criterio de Máxima Verosimilitud, fue realizada en MEGA v. 6 (Tamura *et al.* 2013). El modelo de sustitución nucleotídica elegido para el marcador mitocondrial fue el de TN93 + G + I (gamma + invariant sites) y para el nuclear HKY.

Tasas mutacionales

La tasa mutacional ocupada para el marcador mitocondrial HVR-I, en los tres métodos de inferencia demográfica, fue de 0,55 sustituciones/sitio/millón de años. Ésta fue estimada por Millar *et al.* (2008) a partir de un análisis de pedigríes a larga escala para la especie congénica *Pygoscelis adeliae*.

La tasa mutacional ocupada para el marcador nuclear β fibint7, en los tres métodos de inferencia demográfica, fue de 0,036 sustituciones/sitio/millón de años. Se consideró la tasa propuesta en el paper de Axelsson *et al.* 2004, la cual fue estimada a partir de una serie de intrones de Gallina (*Gallus gallus*) y Pavo (*Meleagris gallopavo*). A este valor de la tasa de sustitución se le realizó una corrección correspondiente al aumento de un orden de magnitud. El fin de la corrección fue asegurar que el valor correspondiese a la fijación de la tasa y no a la aparición de ésta, teniendo en cuenta que las sustituciones demoran en fijarse. Además la corrección consideró la teoría de dependencia del tiempo

de las tasas de evolución molecular (Ho *et al.* 2005; González-Wevar *et al.* 2011; Ho *et al.* 2011).

RESULTADOS

Para el marcador mitocondrial (HVR-I), se contó con las secuencias de 22 individuos para la localidad de Narebski, 22 para Cabo Shirreff, 26 para isla Kopaitic, y 5 para Isla Elefante. Para el marcador nuclear (β fibint7) se contó con las secuencias de 32 individuos para la localidad de Narebski, 30 para Cabo Shirreff y 35 para isla Kopaitic. El largo de las secuencias obtenido fue de 666 pares de base (pb) para la Región Hipervariable I (HVR-I) y 476 pb para el intrón 7 del gen β -fibrinógeno (β fibint7).

Diversidad genética

Marcador mitocondrial

Se encontró un total de 67 haplotipos mitocondriales (HVR-I) para las 75 secuencias analizadas. Los valores de diversidad genética observados (H_d) fueron elevados, cercanos a 1 en todas las localidades, indicando la existencia de prácticamente 1 haplotipo diferente por cada individuo muestreado (Tabla 3).

Tabla 3. Índices de diversidad estándar calculados para las localidades empleando el marcador mitocondrial (HVR-I): Número de secuencias (**N**); Número de Haplotipos (**h**); Número de sitios polimórficos (**S**); Diversidad genética observada (**Hd**); Número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) y Diversidad nucleotídica (π). Tests de Neutralidad: índices Tajima (**D**) y Fu (**F_s**) con sus respectivos valores de significancia para cada localidad y para el conjunto de localidades. Valores destacados en negrita presentan significancia estadística ($p < 0,05$).

Localidades	Índices de Diversidad						Test Neutralidad			
	N	h	S	Hd	Π	π	Tajima (D)	P	Fu (F _s)	P
Kopaltic Island Antarctic Peninsula	26	26	43	1,000	6,763	0,01019	-1,51699	0,05700	-23,81174	0,00000
Elephant Island south Shetland Islands	5	5	9	1,000	3,8	0,00571	-0,85540	0,27700	-1,80529	0,06200
Cape Shirreff South Shetland Islands	22	21	31	0,996	5,082	0,00765	-1,54802	0,04900	-18,01590	0,00000
Narebski South Shetland Islands	22	22	27	1,000	5,286	0,00796	-1,09125	0,13900	-21,12882	0,00000
Total	75	67	59	0,996	5,604	0,00844	-1,25292	0,13050	-16,19044	0,01550

Las relaciones genealógicas entre haplotipos mitocondriales (HVR-I) de las diferentes localidades, reflejan la alta diversidad encontrada en los índices (Tabla 3). Se observa que la red es extendida donde haplotipos de baja frecuencia se ubican alrededor de un haplotipo central de mayor frecuencia. El haplotipo central de mayor frecuencia (0,05) es compartido por todas las localidades a excepción del sitio de la Península Antártica. Este se encuentra rodeado de 5 haplotipos de menor frecuencia (0,03) también compartidos entre varias localidades mientras el resto corresponden a alelos únicos (Figura 6).

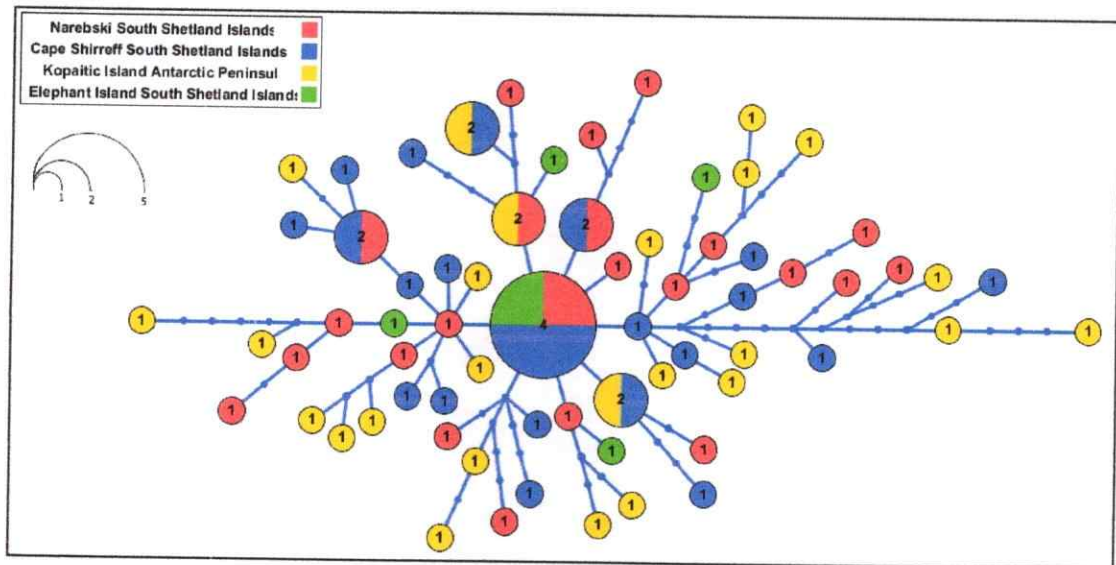


Figura 6. Relaciones genealógicas entre los haplotipos de las localidades reconstruidas para el marcador mitocondrial (HVR-I). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos como muestra la escala de la figura. Cada punto en la línea azul que separa los haplotipos representa un paso mutacional.

Marcador nuclear

Se encontró un total de 7 haplotipos con el marcador nuclear (β fibint7) para los 97 individuos analizados. Los valores de diversidad genética observados (**Hd**) fueron bajos, con un valor de 0,473 para el conjunto de las poblaciones. (Tabla 4).

Tabla 4. Índices de diversidad estándar calculados para las localidades empleando el marcador nuclear (β fibint7): Número de secuencias (**N**); Número de Haplotipos (**h**); Número de sitios polimórficos (**S**); Diversidad genética observada (**Hd**); Número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) y Diversidad nucleotídica (π). Tests de Neutralidad: Índices de Tajima (**D**) y Fu (**Fs**) con sus respectivos valores de significancia para cada localidad y para el conjunto de localidades. Ningún valor presentó significancia estadística ($p < 0,05$).

Localidades	Índices de Diversidad						Test Neutralidad			
	N	h	S	Hd	Π	π	Tajima (D)	P	Fu (Fs)	P
Kopaitic Island Antarctic Peninsula	70	4	3	0,494	0,581	0,00122	-0,12979	0,46100	-0,25596	0,40600
Cape Shirreff South Shetland Islands	60	6	5	0,492	0,595	0,00125	-1,03836	0,15400	-2,47315	0,07200
Narebski South Shetland Islands	64	6	5	0,439	0,572	0,00120	-1,05892	0,14100	-2,54078	0,07200
Total	194	7	6	0,473	0,580	0,00122	-0,88841	0,23000	-2,54753	0,17500

Las relaciones genealógicas para el marcador nuclear (β fibint7) entre las localidades reflejan la baja diversidad encontrada. La red presenta una forma contraída y cuenta con un haplotipo principal de muy alta frecuencia (0,70) seguido de uno con una frecuencia de 0,21 y el resto fluctúa entre frecuencias de 0,04 y 0,005. Los haplotipos de mayor frecuencia son compartidos por todas las localidades. Los haplotipos se encuentran separados por pocos pasos mutacionales, variando de 1 a 4.

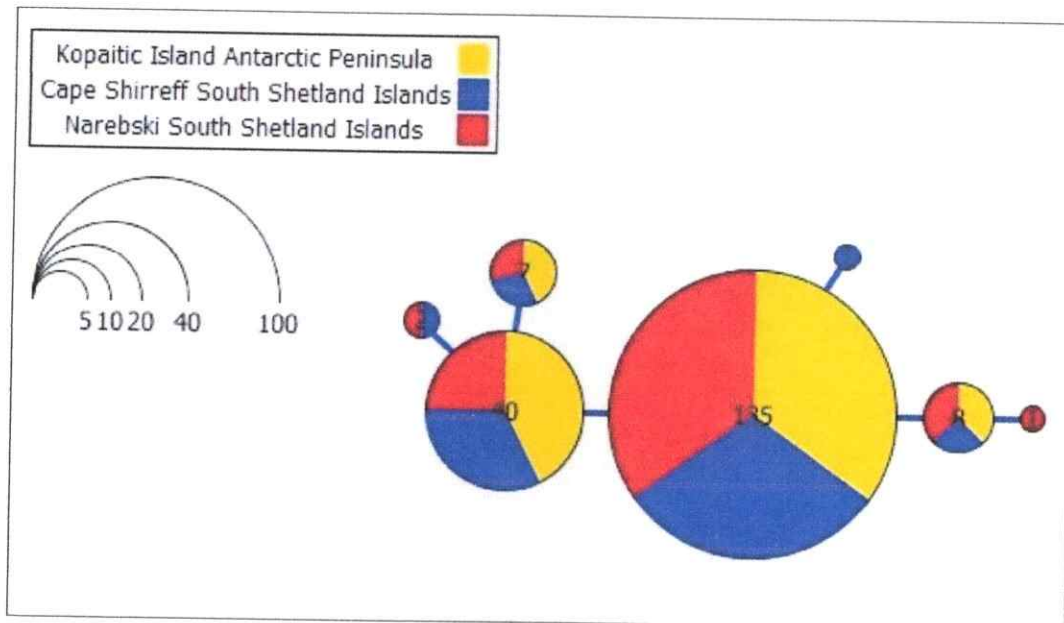


Figura 7. Relaciones genealógicas entre los haplotipos de las localidades reconstruidas para el marcador nuclear (β fibint7). El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos como muestra la escala de la figura. Cada punto en la línea azul que separa los haplotipos representa un paso mutacional.

Estructura genética poblacional

Marcador mitocondrial y nuclear

Al calcular los índices ϕ_{st} y F_{st} de forma global (incluyendo todas las localidades en un solo grupo), se obtuvieron valores negativos y no significativos. Para el marcador mitocondrial los valores globales fueron de $\phi_{st} = -0,01608$ ($p = 0,94119$) y $F_{st} = -0,00378$ ($p = 0,87812$) mientras que para el nuclear fueron de $\phi_{st} = -0,00725$ ($p = 0,73803$) y $F_{st} = -0,00820$ ($p = 0,77908$). De igual manera, los índices ϕ_{st} y F_{st} al ser calculados entre pares de localidades arrojaron valores negativos y sin significancia (Tablas 5 y 6). Por ende, no existe ningún tipo de estructura poblacional y se trató como

una sola unidad genética a las distintas localidades para los análisis de inferencia demográfica.

Tabla 5. Índices de estructuración filogeográfica (Φ_{st}) y genética (F_{st}), para las localidades empleando el marcador mitocondrial (HVR-I). Valores de Φ_{st} y F_{st} se encuentran bajo la diagonal y sobre ésta su significancia estadística. Ningún valor significativo ($p < 0,05$).

Índice de estructuración Filogeográfica Φ_{st}	Kopaitic Island Antarctic Peninsula	Elephant Island South Shetland Islands	Cape Shirreff South Shetland Islands	Narebski South Shetland Islands
Kopaitic Island Antarctic Peninsula	***	0,76478 ± 0,0044	0,74933 ± 0,0048	0,71577 ± 0,0048
Elephant Island South Shetland Islands	-0,02983	***	0,65825 ± 0,0049	0,82328 ± 0,0036
Cape Shirreff South Shetland Islands	-0,0106	-0,02507	***	0,95713 ± 0,0021
Narebski South Shetland Islands	-0,00904	-0,03884	-0,02105	***
<hr/>				
Índice de Estructuración genética F_{st}	Kopaitic Island Antarctic Peninsula	Elephant Island South Shetland Islands	Cape Shirreff South Shetland Islands	Narebski South Shetland Islands
Kopaitic Island Antarctic Peninsula	***	0,99990 ± 0,0000	0,64578 ± 0,0052	0,99990 ± 0,0000
Elephant Island South Shetland Islands	0,00000	***	0,99990 ± 0,0000	0,99990 ± 0,0000
Cape Shirreff South Shetland Islands	-0,0135	-0,01598	***	0,99990 ± 0,0000
Narebski South Shetland Islands	-0,00175	-0,00917	-0,00615	***

Tabla 6. Índices de estructuración filogeográfica (Φ_{st}) y genética (F_{st}), para las localidades empleando el marcador nuclear (β fibint7). Valores de Φ_{st} y F_{st} se encuentran bajo la diagonal y sobre ésta su significancia estadística. Ningún valor significativo ($p < 0,05$).

Índice de estructuración Filogeográfica Φ_{st}	Kopaitic Island Antarctic Peninsula	Cape Shirreff South Shetland Islands	Narebski South Shetland Islands
Kopaitic Island Antarctic Peninsula	***	0,96545 \pm 0,0020	0,62152 \pm 0,0047
Cape Shirreff South Shetland Islands	-0,01379	***	0,37719 \pm 0,0046
Narebski South Shetland Islands	-0,00691	-0,00137	***
Índice de estructuración genética F_{st}	Kopaitic Island Antarctic Peninsula	Cape Shirreff South Shetland Islands	Narebski South Shetland Islands
Kopaitic Island Antarctic Peninsula	***	0,95990 \pm 0,0019	0,66399 \pm 0,0048
Cape Shirreff South Shetland Islands	-0,01408	***	0,41422 \pm 0,0048
Narebski South Shetland Islands	-0,00873	-0,00202	***

Inferencia demográfica

Marcador mitocondrial

Los resultados de los test de neutralidad de Tajima y de Fu se encuentran en la Tabla 3. Ambas pruebas arrojaron valores globales negativos, pero solo el valor de Fu tuvo significancia estadística. (Tajima = -1.25292, $p = 0.13$; Fu = -16.19044, $p = 0.0155$).

Marcador nuclear

Los resultados de los test de neutralidad de Tajima (D) y de Fu (F_s) se encuentran en la Tabla 4. Ambas pruebas arrojaron valores negativos y no significativos para cada localidad así como también para el conjunto de localidades. Para el test de Fu (F_s), los valores de p de las localidades Cape Shirreff y Narebski, estuvieron cerca de ser significativos con un $p = 0,072$ ($p < 0,05$).

1) "Mismatch distribution"

Con ambos marcadores moleculares, las distribuciones Mismatch mostraron una forma unimodal y un ajuste de las frecuencias observadas y con las esperadas, es decir la distribución mismatch no se diferenció de modelo poblacional simulado de crecimiento instantáneo (Rogers & Harpending 1992). (para mitocondrial: valor promedio de raggedness = 0,05170; $p = 0,985$ y para nuclear: valor promedio de raggedness = 0,35077; $p = 0,87606$ (Figura 8 A y B).

Para el marcador mitocondrial se encontró un valor de Tau (T)= 3,883, a partir del cual se calculó que la expansión habría ocurrido hace 5300 años atrás durante el Holoceno medio (8200- 4200 años) (Walker *et al.* 2012).

Para el marcador nuclear se encontró un valor de Tau (τ)= 0,580, a partir del cual se calculó que el tiempo de expansión habría ocurrido hace 16922,4 años atrás a finales del Pleistoceno.

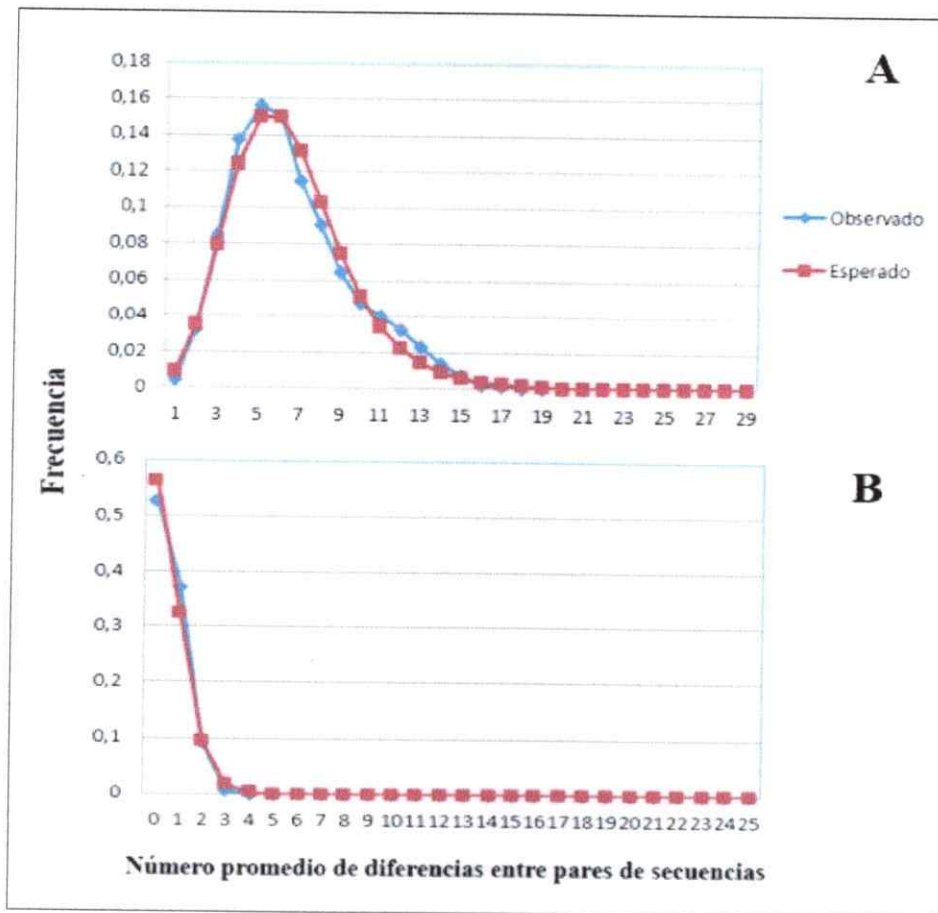


Figura 8. Distribuciones Mismatch para ambos marcadores. **A)** Marcador mitocondrial (HVR-I). **B)** Marcador nuclear (β fibint7). Línea punteada roja indica los valores esperados con el ajuste al modelo poblacional de crecimiento instantáneo (Rogers & Harpending 1992). Línea punteada azul corresponde a los valores observados de diferencias entre los pares de las secuencias analizadas.

2) "Crecimiento exponencial"

El análisis bajo el modelo de crecimiento exponencial indicaría que la expansión poblacional, para el marcador mitocondrial, habría ocurrido hace 4700 años durante el Holoceno medio (Walker *et al.* 2012) (Figura 9A) y para el marcador nuclear habría sido hace 29700 años atrás (Figura 9B) durante el Pleistoceno.

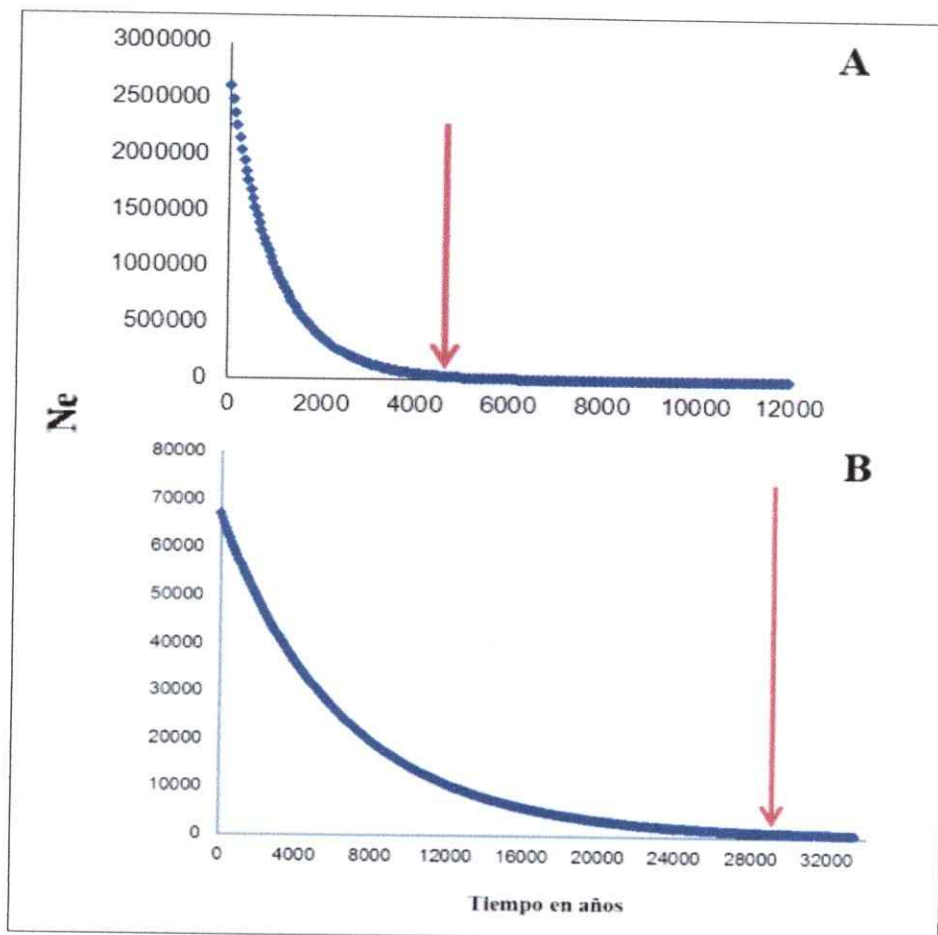


Figura 9. Variaciones del tamaño efectivo ($N_e = \theta/2u$) en el tiempo para ambos marcadores. La flecha roja indica el tiempo estimado de la expansión (considerado al 1% tamaño relativo). **A)** Marcador mitocondrial (HVR-I) muestra una expansión desde los 4700 años para las hembras de la población. **B)** Marcador nuclear (β fibint7) muestra una expansión desde los 29700 años para la población.

3) “Inferencia Bayesiana”

Marcador mitocondrial

El análisis bajo el modelo de coalescencia “*GMRF Bayesian Skyride*” sugiere una expansión poblacional de forma paulatina se habría iniciado hace ~12500 años atrás, a finales del Pleistoceno y comienzo del Holoceno (~11000 años atrás), mientras que el tiempo del Ancestro Común Más Reciente (tACMR) se ubica alrededor de 14500 años atrás. El tamaño efectivo poblacional (N_e) de hembras de la población desde la fecha del ACMR a la actualidad habría aumentado en ~2 órdenes de magnitud (de 10.000 a 1.000.000 de individuos aproximadamente) (Figura 10A).

Marcador nuclear

El análisis bajo el modelo de coalescencia “*Bayesian Skyline*” sugiere que una lenta expansión poblacional se habría iniciado hace ~15000 años atrás para luego acelerarse ~ a los 7500 años atrás. El tiempo del Ancestro Común Más Reciente (tACMR) se ubica alrededor de los 33000 años atrás. El tamaño efectivo poblacional (N_e) de la población desde la fecha del ACMR a la actualidad habría aumentado en ~2 órdenes de magnitud (de 10000 a 1000000 de individuos aproximadamente) (Figura 10B).

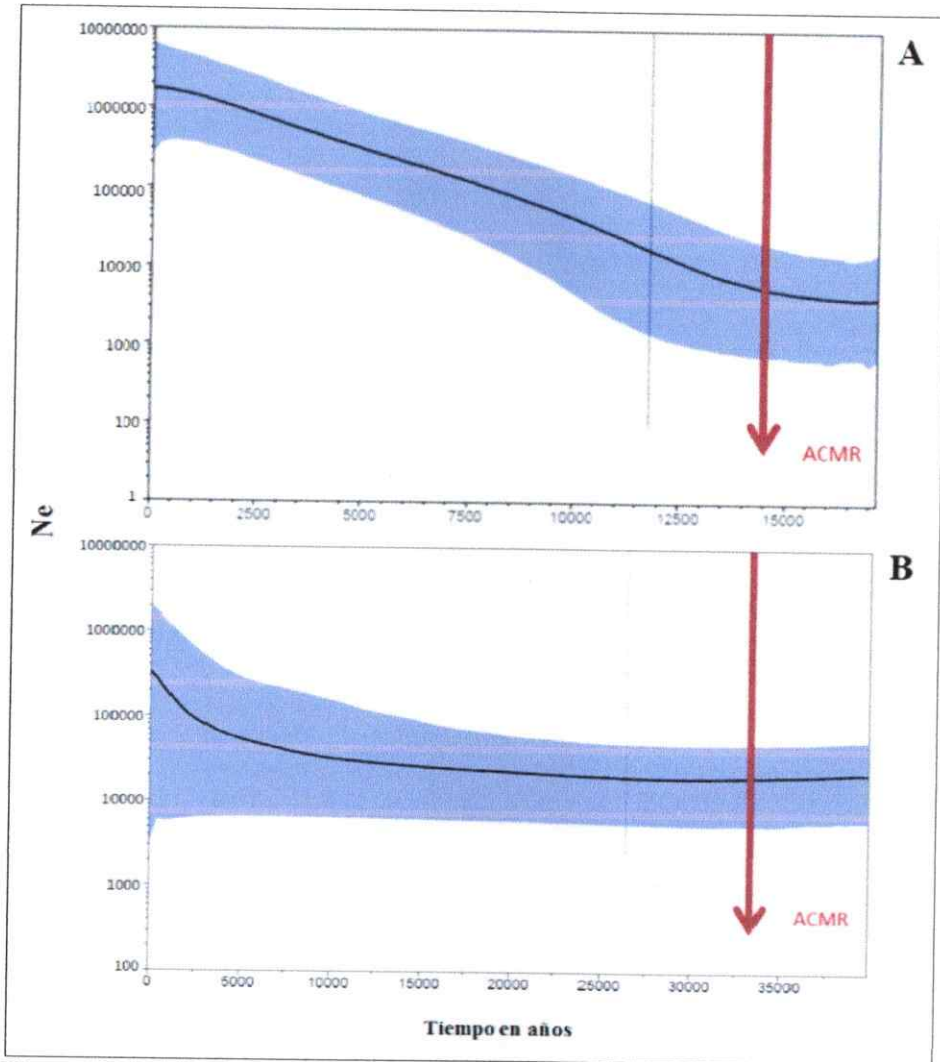


Figura 10. Estimación media para el valor a posteriori del tamaño efectivo (N_e) en el tiempo de ambos marcadores (Línea sólida negra). A) Modelo de coalescencia *GMRF Bayesian Skyride* para el marcador mitocondrial (HVR-I); N_e alude solo a las hembras de la población. B) Modelo de coalescencia *Bayesian Skyline* para el marcador nuclear (β fibint7); N_e alude a toda la población. La flecha roja indica el promedio para el Ancestro Común Más Reciente (ACMR). La línea vertical punteada indica el intervalo de credibilidad del ACMR. El área celeste indica el intervalo de credibilidad de la curva de crecimiento de cada gráfico con un 95% de Densidad Posterior Alta (HPD).

DISCUSIÓN

La alta diversidad mitocondrial (HVR-I), de casi un haplotipo por individuo, y la baja diversidad nuclear (β fibint7) observada en Barbijo, es una característica compartida con las otras dos especies del género (Peña 2013; Clucas *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014). Por una parte, la diferencia observada entre la diversidad de ambos marcadores radicaría en sus contrastantes tasas de sustitución (55% para HVR-I y 3,6% para β fibint7) y por otra parte, la alta diversidad genética encontrada con el marcador mitocondrial, podría indicar que los *Pygoscelis* han mantenido en el tiempo tamaños efectivos poblacionales elevados.

Estructura genética

A la escala analizada no se detectó estructura genética ni filogeográfica para ambos marcadores en Barbijo. Estos resultados son concordantes con el análisis de AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) realizado por Korczak *et al.* (2012) entre 2 localidades más cercanas geográficamente (una en la Isla King George y otra en Penguin Island), y con el estudio de Clucas *et al.* (2014), donde se analizó una porción menor (465pb) de la HVR-I, pero con un mayor del número de individuos ($n= 166$) y a una escala geográfica mayor. Clucas *et al.* (2014), al incluir también poblaciones pertenecientes a las islas sub-antárticas del Arco de Escocia, detectó una baja pero significativa estructuración filogeográfica ($\phi_{st} = 0.027$, $p= 0.002$) entre la población de Zavodovski (la más alejada, y ubicada en las Islas South Sandwich) y las demás poblaciones. A diferencia de lo observado en Barbijo, estudios en la WAP, a una escala

espacial similar y que han utilizado el mismo marcador mitocondrial (HVR-I), sí han encontrado estructuración genética y filogeográfica, aunque baja, entre poblaciones de Papua (deDinechin *et al.* 2012; Clucas *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014; deDinechin *et al.* 2012), exceptuando solo dos poblaciones geográficamente muy cercanas (Admirantly Bay y Ardley Island en la Isla King George) (Peña *et al.* 2014). Para Adelia la existencia de estructuración no es del todo clara. Mientras que Peña *et al.* 2013 encontró valores bajos pero significativos de estructuración filogeográfica ($\phi_{st} = 0.07392$, $p < 0.005$) y genética ($F_{st} = 0.01513$, $p = 0,009$) entre las poblaciones de Admirantly Bay y Ardley Island, otros estudios que analizaron poblaciones, también pertenecientes a la zona de la WAP, con microsatélites y marcador mitocondrial (HVR-I) no detectaron estructuración (Roeder *et al.* 2001; Clucas *et al.* 2014).

A pesar de los niveles relativamente altos de filopatría descritos en *Pygoscelis* (con valores siempre superiores al 60% de retorno a la colonia de la temporada anterior durante 4 años) (Ainley, *et al.* 1983; Trivelpiece & Trivelpiece 1990; Borboroglu & Boersma 2013), estas especies muestran una muy baja (Papua) o una ausencia de estructura genética (Barbijo y Adelia) en la zona de la WAP. Aunque no existe en Barbijo información sobre los individuos que no retornan a su colonia, y que no se conoce la proporción de ellos que fallecieron o llegaron a otra colonia, una hipótesis para explicar la baja o la ausencia de estructuración entre sitios reproductivos en *Pygoscelis* estaría ligada a la existencia de un nivel de dispersión suficiente entre ellos para mantener la homogeneidad genética de la población en la WAP. Por ejemplo, un



estudio con microsatélites en Adelia usando el método de alelos privados, obtuvo un valor alto de migrantes entre colonias por generación ($Nm = 9$) (Roeder *et al.* 2001).

Clucas *et al.* (2014) explicó las diferencias en los grados de estructuración poblacional entre los *Pygoscelis* relacionándolos con los comportamientos migratorios durante el invierno (época no reproductiva). Papua, especie con la mayor estructura observada, permanece en las cercanías de su colonia durante en invierno, razón por la que habría menor probabilidad de flujo entre sitios reproductivos en comparación con Barbijo y Adelia, los cuales abandonan sus colonias y se aventuran a mar abierto durante este periodo (Borboroglu & Boersma 2013). Para Barbijo, estudios de telemetría han documentado que algunos individuos pertenecientes a la WAP han viajado por las islas del Arco de Escocia, tales como South Orkney y South Sandwich (Biuw 2010; Trivelpiece *et al.* 2007) y otros han sido registrados a distancias tan lejanas como 4000 km, hasta el límite superior de Ross (U.S. AMLR 2010).

En el caso de Adelia, para explicar la ausencia de estructura con marcadores microsatélites, Roeder *et al.* (2001) menciona que posiblemente ocurre un relajamiento del comportamiento filopátrico en condiciones de adversidad climática y que la alta filopatría descrita se asociaría a condiciones ambientales estables (Ainley, *et al.* 1983; Ainley 2002; Ainley *et al.* 2010,). Los registros paleoecológicos soportarían también esta hipótesis, ya que dan cuenta del abandono y recolonización de colonias por parte de esta especie conforme las variaciones climáticas históricas (Ainley 2002; Emslie *et al.* 2003; Emslie *et al.* 2014). Además, en la actualidad (1996-2007), frente a condiciones ambientales desfavorables, producidas por la presencia de un Mega-Iceberg en la zona

del Mar de Ross, se reportó un aumento en el comportamiento migratorio de Adelia durante la época reproductiva (Dugger *et al.* 2010; Shepherd *et al.* 2005). En el caso de Papua, Peña *et al.* (2014) acude nuevamente a éste argumento como una posible explicación a los bajos valores de estructura genética encontrados en su estudio. En base a estos antecedentes se podría pensar que Barbijo, al igual que sus congénicas, podría adoptar un comportamiento filopátrico relajado frente a condiciones ambientales adversas.

Finalmente, otra explicación alternativa a la falta de estructura en Barbijo, plantea que el tiempo transcurrido desde la separación de las poblaciones luego de la recolonización masiva post-UMG ha sido insuficiente como para poder detectar diferenciación genética entre las localidades. La datación de los registros fósiles más antiguos de Barbijo encontrados en la WAP apoyaría esta hipótesis, puesto que no sobrepasan los 500 años. Sin embargo la evidencia fósil es escasa, posiblemente debido a que Barbijo se reproduce usualmente en acantilados y en sustratos rocosos expuestos donde los sedimentos ornitogénicos no se acumulan fácilmente, y por ende no dejan depósitos profundos o registros a largo plazo como lo hace Adelia (S. Emslie com pers. 2014, Emslie *et al.* 2014). Es posible también que las paleocolonias se encuentren sumergidas actualmente, dado que durante el UMG los niveles del mar se encontraban 120 metros más bajos (Clark *et al.* 2002). Además no todos los sitios de reproducción de Barbijo actuales han sido investigados en búsqueda de material más antiguo; por ejemplo se sabe que en la Isla Decepción existen depósitos pertenecientes a Barbijo donde potencialmente se podría hacer algún hallazgo (Emslie *et al.* 2014). Además, los

resultados de inferencia demográfica obtenidos a partir de los marcadores moleculares, aunque detectan señales de crecimiento en todas las especies (deDinechin *et al.* 2012; Beans-Picón 2012; Peña 2013, Clucas *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014; presente estudio), no muestran diferencias importantes en los tiempos de expansión de estas 3 especies en la WAP, y Barbijo no aparece en ningún caso como la especie que muestra la expansión más reciente.

Inferencia demográfica

Al igual que en las demás especies de *Pygoscelis* (deDinechin *et al.* 2012; Beans-Picón 2012; Peña 2013, Clucas *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014), nuestro estudio detectó una señal de expansión poblacional post-UMG, para ambos marcadores. La señal es sustentada por los valores negativos, y casi en su totalidad significativos, de los test de neutralidad, los patrones de las redes de haplotipos, y los diferentes análisis de inferencia demográfica. Sin embargo, al comparar los marcadores entre sí, los métodos que utilizaron crecimiento instantáneo y exponencial como modelos demográficos estimaron tiempos de expansión diferentes. Los valores para el crecimiento instantáneo fueron de 5300 años atrás para HVR-I y de 16922,4 para β fibint7, mientras que los de crecimiento exponencial fueron de 4700 años para HVR-I y de 29700 para β fibint7. En contraste, con el método de inferencia bayesiana, los patrones de crecimiento (aumento del N_e de ~ 2 órdenes de magnitud) y los tiempos de expansión encontrados para ambos marcadores dan valores similares (desde ~ 12500 años atrás para HVR-I y de ~ 15000 para β fibint7).

Las estimaciones de tiempo de expansión obtenidas a partir de los métodos que utilizaron crecimiento instantáneo y exponencial como modelos demográficos, tienen como desventaja que los datos son forzados a ajustarse a dichos modelos. En cambio, el método bayesiano realiza una inferencia de tiempo de expansión considerando la teoría de la coalescencia y sin forzar un ajuste de los datos a ningún modelo demográfico específico. Estas ventajas lo han convertido en el método más utilizado en los estudios actuales de ésta índole (eg. González-Wevar *et al.* 2013; Clucas *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014) por lo cual basaremos el resto de nuestras deducciones en los resultados obtenidos a partir de él.

En Barbijo, los tiempos de expansión estimados para ambos marcadores se sitúan a finales del Pleistoceno, periodo coincidente con el proceso de desglaciación en la Península Antártica, iniciándose ~17000 años atrás (Sugden *et al.* 2006; Turner *et al.* 2013). Si se comparan los tiempos de expansión entre los *Pygoscelis*, utilizando el mismo marcador mitocondrial (HVR-I), se infieren valores cercanos entre sí. Para Barbijo los tiempos obtenidos fueron ~12500 (presente estudio) y ~8000 años atrás (Clucas *et al.* 2014); para Papua ~13000 (Peña *et al.* 2014) y ~15000 años atrás (Clucas *et al.* 2014); y para Adelia ~17000 (Peña 2013) y ~16000 años atrás (Clucas *et al.* 2014). El estudio de Clucas *et al.* (2014), comparó la inferencia demográfica entre *Pygoscelis* abarcando escalas geográficas mayores, y sugirió que la magnitud de la expansión demográfica habría sido mediada por su distribución latitudinal. Papua que presenta una distribución más al norte se habría expandido en menor medida, siguiéndole Barbijo y luego Adelia que se habrían expandido en mayor medida.

Las capas de hielo marino antártico durante el UMG prácticamente no habrían dejado zonas libres para el asentamiento de pingüinos (Huang *et al.* 2009), lo que habría provocado que estos migraran a latitudes más bajas, posiblemente a islas peri-antárticas o, en el caso de Papua y Barbijo, hasta islas o áreas subantárticas, las cuales hoy también forman parte de su distribución. La posterior retracción de las capas de hielo provocada por un consiguiente aumento de las temperaturas, habría permitido una recolonización de la WAP y del resto del territorio Antártico.

Para Barbijo, como se ha propuesto anteriormente en Papua, se puede inferir a partir de los grandes tamaños efectivos poblacionales encontrados en ambos marcadores, la alta diversidad genética mitocondrial y la ausencia total de estructuración, que la recolonización habría ocurrido a través de un gran número de individuos desde múltiples refugios o de un solo gran refugio peri-antártico (Peña *et al.* 2014; Clucas *et al.* 2014). Adelia podría haber permanecido en refugios durante el UMG para luego pasar por un proceso de expansión temprana post-UMG (Peña 2013; Clucas *et al.* 2014).

Diferentes respuestas demográficas de los *Pygoscelis* frente al Cambio climático actual e histórico

Las disminuciones poblacionales de Barbijo y Adelia en la WAP asociadas al cambio climático actual, no se condicen con las respuestas demográficas históricas de los *Pygoscelis*. Periodos cálidos en el pasado han sido favorables para todos los *Pygoscelis* en la zona de la WAP, como quedó de manifiesto en la evidencia molecular que muestra

patrones de expansión post-UMG a finales del Pleistoceno. La evidencia fósil circum-Antártica del Holoceno tardío también indica que en el periodo cálido conocido como “*óptimo climático de los pingüinos*”, con temperaturas ligeramente superiores a las actuales en la zona de la Península (Mulvaney *et al.* 2012), los pingüinos *Pygoscelis* habrían alcanzado altas densidades (Baroni, & Orombelli 1994; Ingólfsson *et al.* 2004; Huang *et al.* 2009) (Figura 11). Otros estudios paleoecológicos a bajas latitudes en la Antártica han indicado que los 3 *Pygoscelis* aumentarían en periodos cálidos y disminuirían en periodos fríos (Wang *et al.* 2007; Huang *et al.* 2011). Un estudio molecular basado en los sitios heterocigotos del genoma de Adelia infirió sus tamaños efectivos poblacionales históricos mediante el método “Pairwise sequentially Markovian coalescent (PSMC)”. Este estudio detectó una expansión poblacional gradual desde hace 1 millón de años que se intensificó a los 150 mil años durante un periodo cálido posterior al Penúltimo Máximo Glacial. Mientras que en un período frío hace 60 mil años llamado “Marine Isotope Stage 4 (MIS 4)” el tamaño efectivo poblacional disminuyó en un 40% (Li *et al.* 2014).

Esta respuesta diferencial entre las especies de *Pygoscelis*, reportada por múltiples fuentes (Baroni, & Orombelli 1994; Ingólfsson *et al.* 2004; Wang *et al.* 2007; Clucas *et al.* 2014; Peña *et al.* 2014; Huang *et al.* 2009, 2011; Li *et al.* 2014) podría entonces estar relacionada con condiciones particulares asociadas con el cambio climático global actual. En particular, se ha propuesto que cambios en trama trófica de la WAP asociados principalmente con la disminución del Krill podrían explicar el éxito relativo de Papua, caracterizado por una dieta más generalista, en comparación con Adelia y Barbijo

(Atkinson *et al.* 2004, Montes-Hugo *et al.* 2009). Estos cambios habrían sido en parte desencadenados por el calentamiento en la zona (Mulvaney *et al.* 2012; Shevenell *et al.* 2011), como también por el acción del hombre a través de las pesquería directa del Krill como de la moratoria de la caza de sus principales depredadores (ballenas y focas) (Lynnes *et al.* 2002). Sin embargo, estudios de paleodieta han mostrado que las tres especies de *Pygoscelis* habrían prosperado en los períodos cálidos como el “*óptimo climático de los pingüinos*” (4000- 3000 años atrás en a WAP), en base a una dieta que no dependía principalmente del Krill como recurso, sino que se habrían alimentado predominantemente de presas en una mayor posición en la cadena trófica (eg. de peces) (Lorenzini *et al.* 2010; Emslie *et al.* 2013; Huang *et al.* 2013, 2014). Además, cabe destacar que estos mismos estudios han indicado que la dieta de los *Pygoscelis* basada principalmente en el Krill podría haber sido una consecuencia de la mayor disponibilidad de este recurso dentro de los últimos 200 años debido a la caza intensa de focas y ballenas (Trivelpiece & Volkman 1979; Trivelpiece *et al.* 2011; Emslie *et al.* 2014). En este contexto, podríamos estar entonces presenciando el retorno a una dieta más generalista, característica de los *Pygoscelis*, aunque esta hipótesis no esté todavía avalada por datos empíricos (Trivelpiece *et al.* 2011).

Otra explicación acerca de la discrepancia entre los patrones actuales e históricos de cambios en las dinámicas poblacionales de los *Pygoscelis* podría estar relacionada con un problema de escalas espaciales y temporales. De hecho, diferentes respuestas demográficas se han reportadas a bajas y altas latitudes frente a los cambios climáticos. En latitudes más altas, las condiciones frías también han sido favorables para los

pingüinos; por ejemplo el periodo frío ocurrido entre los años 1490 y 1670 (concordante con “Little Ice Age” (LIA); 1500–1800 años atrás) fue óptimo para que los pingüinos prosperaran en el Mar de Ross (Cape Bird). Sin embargo en el mismo periodo a latitudes menores, en Zolotov Island (Este Antártico), y Ardley Island (Península Antártica), las poblaciones de Adelia habrían disminuido (Wang *et al.* 2007; Huang *et al.* 2011; Hu *et al.* 2013).

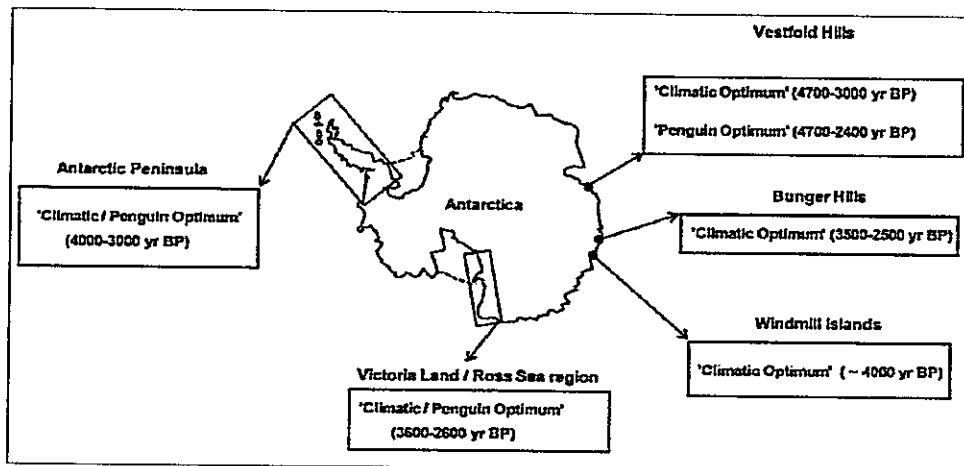


Figura 11. “Óptimos climáticos” para los Pingüinos. Extraído de Huang *et al.* (2009)

En la actualidad, también se observan tendencias poblacionales contraristas a bajas y altas latitudes. Adelia que se encuentra disminuyendo en la WAP estaría aumentando en la zona del mar de Ross (LaRue *et al.* 2013) y si bien Barbijo se encuentra disminuyendo globalmente en la zona de la Península, también se encontraría aumentando en las cercanías de su rango límite más al sur de la Península (Palmer Station) (Lynch *et al.* 2012) por lo que podría estar cambiando su distribución a mayores latitudes. Un estudio de modelación de nicho detectó que los *Pygoscelis* en la

WAP están experimentando un cambio hacia el sur de las áreas más adecuadas para la crianza (Cimino *et al.* 2013).

Proyecciones

En Barbijo, para abarcar todo el rango de distribución, falta evaluar las colonias presentes en Bouvet y Balleny Islands, que se encuentran a distancias geográficas mayores y determinar la existencia de estructura poblacional, además de la historia demográfica en comparación con las poblaciones de WAP. Cabe destacar que también se ha reportado la presencia esporádica de individuos en la isla Heard (Downes *et al.* 1959; Macdonald *et al.* 2002) Para una mejor comprensión de la historia demográfica y evolutiva desde el Pleistoceno al Holoceno de la especie es recomendable el uso de otros marcadores moleculares tales como los microsatelites o SNPs (Polimorfismo de nucleótido simple) para evaluar otras escalas temporales y tener estimaciones de locus independientes (Parks *et al.* 2015; Li *et al.* 2014). Además estudios a largo plazo de los tamaños poblacionales y abarcando todo el rango de distribución pueden ayudar a determinar con mayor precisión las tendencias poblacionales globales y dinámicas metapoblacionales (Southwell *et al.* 2015). Además, la integración de la modelación de nichos ecológicos con los estudios genéticos y poblacionales (Alvarado-Serrano & Knowles, 2014) permitirán la realización de predicciones sobre los cambios de tamaños poblacionales y de distribución geográficas para las 3 especies de *Pygoscelis*.

CONCLUSIONES

Finalmente podemos concluir que al igual que para *P. papua* y *P. adelia*, especies congénicas estudiadas previamente en la misma zona, *P. antarcticus* presentó una alta diversidad genética para la región control, además de señales de crecimiento poblacional a finales del Pleistoceno, mostrando una historia común para estas tres especies. Sin embargo, a diferencia de las otras especies de *Pygoscelis*, para *P. antarcticus* no se encontró estructuración poblacional, lo que podría sugerir un mayor flujo génico entre poblaciones y un comportamiento filopátrico menos estricto.



BIBLIOGRAFÍA

- Abram, N. J., Mulvaney, R. & Arrowsmith, C. (2011) Environmental signals in a highly resolved ice core from James Ross Island, Antarctica. *J. Geophys. Res.* 116, D20116.
- Ainley, D. G., LeResche, R. E., & Sladen, W. J. (1983). Breeding biology of the Adelie penguin (p. 240). Berkeley: University of California Press.
- Ainley, D.G., Nadav, N., Woehler, E. J. (1995). Factors affecting the distribution and size of Pygoscelid penguin colonies in the Antarctic. *The Auk.* 171, 171-182.
- Ainley, D. G. (2002). The Adélie penguin: bellwether of climate change. Columbia University Press.
- Ainley, D., Russell, J., Jenouvrier, S., Woehler, E., Lyver, P. O. B., Fraser, W. R., & Kooyman, G. L. (2010). Antarctic penguin response to habitat change as Earth's troposphere reaches 2 C above preindustrial levels. *Ecological Monographs*, 80(1), 49-66
- Alvarado-Serrano, D. F., & Knowles, L. L. (2014). Ecological niche models in phylogeographic studies: applications, advances and precautions. *Molecular ecology resources*, 14(2), 233-248.
- Allcock, A. L., & Strugnell, J. M. (2012). Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends in ecology & evolution*, 27(9), 520-528.
- Anderson, J. B., Shipp, S. S., Lowe, A. L., Wellner, J. S., & Mosola, A. B. (2002). The Antarctic Ice Sheet during the Last Glacial Maximum and its subsequent retreat history: a review. *Quaternary Science Reviews*, 21(1), 49-70.
- Atkinson, A., Pakhomov, E., Rothery, P., Siegel, V. (2004). Long-term decrease in krill stocks and increase in salps within the Southern Ocean. *Nature* 432:100-103.

- Ballard, J.W.O. & Whitlock, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Mol. Ecol.* 13, 729–744
- Ballerini, T., Tavecchia, G., Olmastroni, S., Pezzo, F., & Focardi, S. (2009). Nonlinear effects of winter sea ice on the survival probabilities of Adélie penguins. *Oecologia*, 161(2), 253-265.
- Baker, P. A., Seltzer, G. O., Fritz, S. C., Dunbar, R. B., Grove, M. J., Tapia, P. M., ... & Broda, J. P. (2001). The history of South American tropical precipitation for the past 25,000 years. *Science*, 291(5504), 640-643.
- Baker, A. J., Pereira, S. L., Haddrath, O. P., & Edge, K. A. (2006). Multiple gene evidence for expansion of extant penguins out of Antarctica due to global cooling. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 273(1582), 11-17.
- Baroni, C., & G. Orombelli. 1994. Abandoned penguin colonies as Holocene paleoclimatic indicators in Antarctica. *Geology* 22: 23-26.
- Beans Picón, G (2012) Nuclear and mitochondrial DNA evolution in adelic penguins: studies of modern and ancient populations. Thesis of Dr of Phylosophy (Phd) in genetics, Auckland, New Zealand, Massey University, Institute for Natural Sciences, Allan Wilson Centre for Molecular Ecology and Evolution. 248p
- Borboroglu, P. G., & Boersma, P. D. (Eds.). (2013). *Penguins: natural history and conservation*. University of Washington Press.
- Boersma, P. D. (2008). Penguins as marine sentinels. *BioScience*, 58(7), 597-607.
- Clark, P. U., & Mix, A. C. (2002). Ice sheets and sea level of the Last Glacial Maximum. *Quaternary Science Reviews*, 21(1), 1-7.

- Cimino, M. A., Fraser, W. R., Irwin, A. J., & Oliver, M. J. (2013). Satellite data identify decadal trends in the quality of *Pygoscelis* penguin chick-rearing habitat. *Global change biology*, 19(1), 136-148.
- Clarke, J. A., Ksepka, D. T., Stucchi, M., Urbina, M., Giannini, N., Bertelli, S., ... & Boyd, C. A. (2007). Paleogene equatorial penguins challenge the proposed relationship between biogeography, diversity, and Cenozoic climate change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(28), 11545-11550.
- Clucas, G. V., Dunn, M. J., Dyke, G., Emslie, S. D., Naveen, R., Polito, M. J., ... & Hart, T. (2014). A reversal of fortunes: climate change 'winners' and 'losers' in Antarctic Peninsula penguins. *Scientific reports*, 4, 5024-5024
- Comiso JC, Kwok R, Martin S, Gordon AL (2011) Variability and trends in sea ice extent and ice production in the Ross Sea. *Journal of Geophysical Research*, 116, C04021.
- Creer, S. (2007). Choosing and using introns in molecular phylogenetics. *Evolutionary bioinformatics online*, 3, 99.
- Conroy, J. W. H. (1974). Recent increases in penguin populations in the Antarctic and sub-Antarctic. In Stonehouse, B. (ed). *The biology of penguins*: 321-326. London: Macmillan
- Dantas, G. P. D. M., Oliveira, L. R. D., Marasco, A. C. M., Araujo, J. D., Hurtado, R., Durigon, E. L., ... & Morgante, J. S. (2014). Demographic History of the Gentoo Penguin (*Pygoscelis papua*) and the Adélie Penguin (*Pygoscelis adeliae*) on Admiralty Bay, King George Island, Antarctica. *Waterbirds*, 37(4), 410-418.
- deDinechin, M., Dobson, F. S., Zehntindjiev, P., Metcheva, R., Couchoux, C., Martin, A., ... & Jouventin, P. (2012). The biogeography of Gentoo penguins (*Pygoscelis papua*). *Canadian Journal of Zoology*, 90(3), 352-360.

- Downes MC, Ealey EHM, Gwynn AM, Young PS (1959) The birds of Heard Island. ANARE Rep Ser B no. 1. Dept. of External Affairs, Melbourne.
- Ducklow, H., Baker, K., Martinson, D., Quetin, B., Ross, R., Smith, R., Stammerjohn, S., Vernet, M. & Fraser, W. (2007). Marine pelagic ecosystems: the West Antarctic Peninsula. *Philosophical Transactions of the Royal Society*. 362:67-94.
- Dugger, K. M., Ainley, D. G., Lyver, P. O. B., Barton, K., & Ballard, G. (2010). Survival differences and the effect of environmental instability on breeding dispersal in an Adélie penguin meta-population. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(27), 12375-12380.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Emslie, S. D., Fraser, W., Smith, R. C., & Walker, W. (1998). Abandoned penguin colonies and environmental change in the Palmer Station area, Anvers Island, Antarctic Peninsula. *Antarctic Science*, 10(03), 257-268.
- Emslie, S. D., Berkman, P. A., Ainley, D. G., Coats, L., & Polito, M. (2003). Late-Holocene initiation of ice-free ecosystems in the southern Ross Sea, Antarctica. *Marine Ecology Progress Series*, 262, 19-25.
- Emslie, S. D., Coats, L., & Licht, K. (2007). A 45,000 yr record of Adélie penguins and climate change in the Ross Sea, Antarctica. *Geology*, 35(1), 61-64.
- Emslie, S. D., Baumann, K., & van Tuinen, M. (2011). Late Holocene occupation of Gentoo Penguins (*Pygoscelis papua*) on Byers Peninsula, Livingston Island, Antarctica. *Polar biology*, 34(2), 283-290.

- Emslie, S. D., Polito, M. J., & Patterson, W. P. (2013). Stable isotope analysis of ancient and modern gentoo penguin egg membrane and the krill surplus hypothesis in Antarctica. *Antarctic Science*, 25(02), 213-218.
- Emslie, S. D., Polito, M. J., Brasso, R., Patterson, W. P., & Sun, L. (2014). Ornithogenic soils and the paleoecology of pygoscelid penguins in Antarctica. *Quaternary International*.
- Excoffier L, Lischer HE (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour* 10: 564-567.
- Filatov, D. A. (2002). ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2(4), 621-624.
- Forcada, J., Trathan, P. N., Reid, K., & Murphy, E. J. (2005). The effects of global climate variability in pup production of Antarctic fur seals. *Ecology*, 86(9), 2408-2417.
- Forcada, J., Trathan, P. N., Reid, K., Murphy, E. J., & Croxall, J. P. (2006). Contrasting population changes in sympatric penguin species in association with climate warming. *Global Change Biology*, 12(3), 411-423
- Forcada, J., & Trathan, P. N. (2009). Penguin responses to climate change in the Southern Ocean. *Global Change Biology*, 15(7), 1618-1630.
- Fu, Y.-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Fraser, W. R., Trivelpiece, W. Z., Ainley, D. G. & Trivelpiece, S. G. 1992 Increases in Antarctic penguin populations: reduced competition with whales or a loss of sea ice due to environmental warming? *Polar Biol.* 11, 525-531. (doi:10.1007/BF00237945)

- Fraser, C. I., Terauds, A., Smellie, J., Convey, P., & Chown, S. L. (2014). Geothermal activity helps life survive glacial cycles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), 5634-5639
- Friesen, V. L., Congdon, B. C., Walsh, H. E., & Birt, T. P. (1997). Intron variation in marbled murrelets detected using analyses of single-stranded conformational polymorphisms. *Molecular Ecology*, 6(11), 1047-1058.
- Friesen V. 2000 Introns. In: Baker AJ, editor. *Molecular Methods in Ecology*. Blackwell Science Ltd; pp. 274-294.
- González-Wevar, C. A., David, B., & Poulin, E. (2011). Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1), 220-229.
- González-Wevar, C. A., Saucède, T., Morley, S. A., Chown, S. L., & Poulin, E. (2013). Extinction and recolonization of maritime Antarctica in the limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908) during the last glacial cycle: toward a model of Quaternary biogeography in shallow Antarctic invertebrates. *Molecular ecology*, 22(20), 5221-5236.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.
- Hinke, J. T., Salwicka, K., Trivelpiece, S. G., Watters, G. M., & Trivelpiece, W. Z. (2007). Divergent responses of *Pygoscelis* penguins reveal a common environmental driver. *Oecologia*, 153(4), 845-855.
- Ho, S. Y., Phillips, M. J., Cooper, A., & Drummond, A. J. (2005). Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Molecular biology and evolution*, 22(7), 1561-1568.

- Ho, S. Y., Lanfear, R., Bromham, L., Phillips, M. J., Soubrier, J., Rodrigo, A. G., & Cooper, A. (2011). Time-dependent rates of molecular evolution. *Molecular ecology*, 20(15), 3087-3101
- Hoelzel, A. Rus. (2010) "Looking backwards to look forwards: conservation genetics in a changing world." *Conservation Genetics* 11.2 655-660.
- Hospitaleche, C. A., Reguero, M., & Scarano, A. (2013). Main pathways in the evolution of the Paleogene Antarctic Sphenisciformes. *Journal of South American Earth Sciences*, 43, 101-111.
- Hu, Q. H., Sun, L. G., Xie, Z. Q., Emslie, S. D., & Liu, X. D. (2013). Increase in penguin populations during the Little Ice Age in the Ross Sea, Antarctica. *Scientific reports*, 3.
- Huang, T., Sun, L., Wang, Y., Liu, X., & Zhu, R. (2009). Penguin population dynamics for the past 8500 years at Gardner Island, Vestfold Hills. *Antarctic Science*, 21(06), 571-578.
- Huang, T., Sun, L., Wang, Y., & Kong, D. (2011). Late Holocene Adélie penguin population dynamics at Zolotov Island, Vestfold Hills, Antarctica. *Journal of Paleolimnology*, 45(2), 273-285.
- Huang, T., Sun, L., Long, N., Wang, Y., & Huang, W. (2013). Penguin tissue as a proxy for relative krill abundance in East Antarctica during the Holocene. *Scientific reports*, 3.
- Huang, T., Sun, L., Wang, Y., & Emslie, S. D. (2014). Paleodietary changes by penguins and seals in association with Antarctic climate and sea ice extent. *Chinese Science Bulletin*, 59(33), 4456-4464.
- Ingólfsson, Ó. (2004). Quaternary glacial and climate history of Antarctica. *Quaternary Glaciations: Extent and Chronology 3: Part III: South America, Asia, Africa, Australia, Antarctica*, 3-43.

- Jenouvrier, S., Barbraud, C., & Weimerskirch, H. (2003). Effects of climate variability on the temporal population dynamics of southern fulmars. *Journal of Animal Ecology*, 72(4), 576-587.
- Korczak-Abshire, M., Chwedorzewska, K. J., Wařowicz, P., & Bednarek, P. T. (2012). Genetic structure of declining chinstrap penguin (*Pygoscelis antarcticus*) populations from South Shetland Islands (Antarctica). *Polar Biology*, 35(11), 1681-1689
- Kuhner, M. K. (2006). LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, 22(6), 768-770.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947-2948.
- LaRue, M. A., Ainley, D. G., Swanson, M., Dugger, K. M., Phil, O., Lyver, B., ... & Ballard, G. (2013). Climate change winners: receding ice fields facilitate colony expansion and altered dynamics in an Adélie penguin metapopulation. *PLoS One*, 8(4), e60568.
- Li, C., Zhang, Y., Li, J., Kong, L., Hu, H., Pan, H., ... & Zhang, G. (2014). Two Antarctic penguin genomes reveal insights into their evolutionary history and molecular changes related to the Antarctic environment. *GigaScience*, 3(1), 27.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451-1452.
- Lima, Mauricio, and Sergio A. Estay (2013). "Warming effects in the western Antarctic Peninsula ecosystem: the role of population dynamic models for explaining and predicting penguin trends." *Population Ecology*: 1-9.

- Loeb V, Siegel V, Holm-Hansen O, Hewitt R, Fraser W, Trivelpiece W, Trivelpiece S (1997) Effects of sea-ice extent and krill or salp dominance on the Antarctic food web. *Nature* 387:897–900
- Lorenzini, S., Baroni, C., Fallick, A. E., Baneschi, I., Salvatore, M. C., Zanchetta, G., & Dallai, L. (2010). Stable isotopes reveal Holocene changes in the diet of Adélie penguins in Northern Victoria Land (Ross Sea, Antarctica). *Oecologia*, 164(4), 911-919.
- Lynch, H. J., Naveen, R., Trathan, P. N., & Fagan, W. F. (2012). Spatially integrated assessment reveals widespread changes in penguin populations on the Antarctic Peninsula. *Ecology*, 93(6), 1367-1377.
- Lynnes, A., Reid, K., Croxall, J., & Trathan, P. (2002). Conflict or co-existence? Foraging distribution and competition for prey between Adélie and Chinstrap Penguins. *Marine Biology*, 141(6), 1165-1174.
- Macdonald JA, Barton KJ, Metcalf P (2002) Chinstrap penguins (*Pygoscelis antarctica*) nesting on Sabrina Islet, Balleny Islands, Antarctica. *Polar Biol* 25:442–447
- Millar, C. D., Dodd, A., Anderson, J., Gibb, G. C., Ritchie, P. A., Baroni, C., ... & Lambert, D. M. (2008). Mutation and evolutionary rates in Adélie penguins from the Antarctic. *PLoS Genetics*, 4(10), e1000209.
- Millar, C. D., Subramanian, S., Heupink, T. H., Swaminathan, S., Baroni, C., & Lambert, D. M. (2012). Adélie penguins and temperature changes in Antarctica: a long-term view. *Integrative zoology*, 7(2), 113-120.
- Miller, A. K., Karnovsky, N. J., & Trivelpiece, W. Z. (2009). Flexible foraging strategies of gentoo penguins *Pygoscelis papua* over 5 years in the South Shetland Islands, Antarctica. *Marine Biology*, 156(12), 2527-2537.
- McClintock, J., Ducklow, H., Fraser, W. (2008). Ecological responses to climate change on the Antarctic Peninsula. *American Scientist* 96:302-310.

- Montes-Hugo, M., Doney, S.C., Ducklow, H.W., Fraser, W., Martinson, D., Stammerjohn, S.E., Schofield, O. (2009). Recent changes in phytoplankton communities associated with rapid regional climate change along the western Antarctic Peninsula. *Science* 323:1470-1473
- Mulvaney, R., Abram, N. J., Hindmarsh, R. C., Arrowsmith, C., Fleet, L., Triest, J., ... & Foord, S. (2012). Recent Antarctic Peninsula warming relative to Holocene climate and ice-shelf history. *Nature*, 489(7414), 141-144.
- Oligonucleotide thermodynamic and primer analysis application. Ver. 1.1. Free download. Copyright. Gene Link, Inc. Hawthorne, NY 10532 USA
- Oligo Analyzer. Oligonucleotide primer analysis application. Ver. 1.1. Free download. Copyright. Gene Link, Inc. Hawthorne, NY 10532 USA
- Pauls, S. U., Nowak, C., Bálint, M., & Pfenninger, M. (2013). The impact of global climate change on genetic diversity within populations and species. *Molecular ecology*, 22(4), 925-946.
- Peña, F., Poulin, E., Dantas, G. P., González-Acuña, D., Petry, M. V., & Vianna, J. A. (2014). Have Historical Climate Changes Affected Gentoo Penguin (*Pygoscelis papua*) Populations in Antarctica?. *PloS one*, 9(4), e95375.
- Peña, F (2013) Efectos del cambio climático sobre la demografía histórica de pingüinos del género *Pygoscelis*: Una aproximación molecular. Tesis de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, Santiago, Chile, Universidad de Chile, Facultad de Ciencias, 66p .
- Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J. M., Basile, I., ... & Stievenard, M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399(6735), 429-436.
- Polito, M. J., Trivelpiece, W. Z., Patterson, W. P., Karnovsky, N. J., Reiss, C. S., & Emslie, S. D. (2015). Contrasting specialist and generalist patterns facilitate

- foraging niche partitioning in sympatric populations of *Pygoscelis* penguins. *MEPS*, 519, 221-237.
- Prychitko, T. M., & Moore, W. S. (2000). Comparative evolution of the mitochondrial cytochrome b gene and nuclear β -fibrinogen intron 7 in woodpeckers. *Molecular Biology and Evolution*, 17(7), 1101-1111.
- Rambaut, A., & Drummond, A. (2009). *Tracer* ver. 1.5. 0.
- Ritchie, P. A., Millar, C. D., Gibb, G. C., Baroni, C., & Lambert, D. M. (2004). Ancient DNA enables timing of the Pleistocene origin and Holocene expansion of two Adélie penguin lineages in Antarctica. *Molecular biology and evolution*, 21(2), 240-248.
- Roeder, A. D., Marshall, R. K., Mitchelson, A. J., Visagathilagar, T., Ritchie, P. A., Love, D. R., ... & Lambert, D. M. (2001). Gene flow on the ice: genetic differentiation among Adélie penguin colonies around Antarctica. *Molecular Ecology*, 10(7), 1645-1656.
- Roeder, A. D., Ritchie, P. A., & Lambert, D. M. (2002). New DNA markers for penguins. *Conservation genetics*, 3(3), 341-344
- Rogers, A. R. and H. Harpending (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol. Biol. Evol.* 9: 552-569
- Rogers, A. D. (2007). Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular Perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1488), 2191-2214.
- Ropert-Coudert, Y., Kato, A., Meyer, X., Pellé, M., MacIntosh, A. J., Angelier, F., ... & Raclot, T. (2014). A complete breeding failure in an Adélie penguin colony correlates with unusual and extreme environmental events. *Ecography*.

- Rowe G. & Beebe T. (2004). An introduction to molecular ecology. Oxford University Press. Pag 141
- Salzburger, W., Ewing, G. B. and Von Haeseler, A. (2011), The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular Ecology*, 20: 1952–1963.
- Shepherd, L. D., Millar, C. D., Ballard, G., Ainley, D. G., Wilson, P. R., Haynes, G. D., ... & Lambert, D. M. (2005). Microevolution and mega-icebergs in the Antarctic. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(46), 16717-16722.
- Shevenell, A. E., Ingalls, A. E., Domack, E. W., & Kelly, C. (2011). Holocene Southern Ocean surface temperature variability west of the Antarctic Peninsula. *Nature*, 470(7333), 250-254.
- Southwell, C., Emmerson, L., Newbery, K., McKinlay, J., Kerry, K., Woehler, E., & Ensor, P. (2015). Re-Constructing Historical Adélie Penguin Abundance Estimates by Retrospectively Accounting for Detection Bias
- Smith, R. C., Ainley, D., Baker, K., Domack, E., Emslie, S., Fraser, B., ... & Vernet, M. (1999). Marine Ecosystem Sensitivity to Climate Change Historical observations and paleoecological records reveal ecological transitions in the Antarctic Peninsula region. *BioScience*, 49(5), 393-404.
- Stammerjohn SE, Massom R, Rind D, Martinson D (2012) Regions of rapid sea ice change: An inter-hemispheric seasonal comparison. *Geophysical Research Letters*, 39, L06501.
- Stephens M, et al. (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am. J. Hum. Genet.*; 68:978-989.

- Stephens M, Donnelly P. A (2003) Comparison of Bayesian methods for haplotype reconstruction from population genotype data. *Am. J. Hum. Genet.*;73:1162-1169.
- Stokstad, E. (2007). Boom and bust in a polar hot zone. *Science* 315:1522–1523.
- Sugden, D. E., Bentley, M. J., & Cofaigh, C. Ó. (2006). Geological and geomorphological insights into Antarctic ice sheet evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*, 364(1844), 1607-1625
- Tajima F (1989) Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, and Kumar S . (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. . *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Thomas ER, Marshall GJ, McConnell R (2008) A doubling of snow accumulation in the western Antarctic Peninsula since 1850. *Geophys Res Lett* 35:L01706. doi:10.1029/2007GL032529
- Turner J, Lachlan-Cope T, Colwell S, Marshall GJ (2005b) A positive trend in western Antarctic Peninsula precipitation over the last 50 years reflecting regional and Antarctic-wide atmospheric changes. *Ann Glaciol* 41:85–91
- Turner, J. B. (2013). Antarctic climate change and the environment: an update. *Polar Record*, 1-23.
- Trivelpiece, W., & Volkman, N. J. (1979). Nest-site competition between Adelie and Chinstrap penguins: an ecological interpretation. *The Auk*, 675-681

- Trivelpiece WZ, Trivelpiece SG (1990) Courtship period of Adelie, Gentoo and Chinstrap penguins. In Davis LS, Darby JT, editors. Penguin Biology. Academic Press, San Diego, CA, pp. 113-127.
- Trivelpiece, W. Z., Buckelew, S., Reiss, C., & Trivelpiece, S. G. (2007). The winter distribution of chinstrap penguins from two breeding sites in the South Shetland Islands of Antarctica. *Polar Biology*, 30(10), 1231-1237.
- Trivelpiece, W. Z., Hinke, J. T., Miller, A. K., Reiss, C. S., Trivelpiece, S. G., & Watters, G. M. (2011). Variability in krill biomass links harvesting and climate warming to penguin population changes in Antarctica. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(18), 7625-7628.
- US AMLR (U.S. Antarctic Marine Living Resources). 2010. Overwinter movement patterns of antarctic predators. <https://swfsc.noaa.gov/ge.aspx?ParentMenuID=42&TopPG=16274&BottomPG=16272&Project=2010FurSealTrack> (accedido 26 de marzo 2015)
- Walker, M. J. C., Berkelhammer, M., Björck, S., Cwynar, L. C., Fisher, D. A., Long, A. J., ... & Weiss, H. (2012). Formal subdivision of the Holocene Series/Epoch: a Discussion Paper by a Working Group of INTIMATE (Integration of ice-core, marine and terrestrial records) and the Subcommittee on Quaternary Stratigraphy (International Commission on Stratigraphy). *Journal of Quaternary Science*, 27(7), 649-659.
- Wang, J., Wang, Y., Wang, X., & Sun, L. (2007). Penguins and vegetations on Ardley Island, Antarctica: evolution in the past 2,400 years. *Polar Biology*, 30(11), 1475-1481.
- Williams, T. D. 1995 *The penguins*. New York, NY: OxfordUniversity Press.
- Wilson, P. R., Ainley, D. G., Nur, N., Jacobs, S. S., Barton, K. J., Ballard, G., & Comiso, J. C. (2001). Adélie penguin population change in the pacific sector of

Antarctica: relation to sea-ice extent and the Antarctic Circumpolar Current. *Marine ecology progress series*, 213, 301-309.

Weimerskirch, H., Inchausti, P., Guinet, C., & Barbraud, C. (2003). Trends in bird and seal populations as indicators of a system shift in the Southern Ocean. *Antarctic Science*, 15(2), 249-256.

Woehler, E. J. 1993. The distribution and abundance of Antarctic and sub-Antarctic penguins. Hobart, Australia: Scientific Committee on Antarctic Research.

(eg) Yan Roupert-Courdet 2014. Chapter 8. Biogeographic patterns of birds and mammals. In: De Broyer C, Koubbi, P, Griffiths H J., Raymond B, Udekem d'Acoz C. et al. (eds). *Biogeographic Atlas of The Southern Ocean Committee. On Antarctic Research*, Cambridge pp 365.

Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., & Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292(5517), 686-693.