

UCH-FC  
MAG-EBE  
D 542  
C. 1

**Departamento de Ciencias Ecológicas**

**Facultad de Ciencias**

**Universidad de Chile**



**“Origen y evolución de la fauna marina bentónica  
antártica: diversidad genética y divergencia molecular  
entre especies congénéricas de Echinoidea de Antártica y  
Sudamérica”**

**Tesis Entregada A la Universidad de Chile en Cumplimiento Parcial de  
Los Requisitos para Optar al Grado De Magíster en Ciencias Biológicas,  
Mención en Ecología Y Biología Evolutiva**



**Facultad De Ciencias**

**Por**

**Angie Dominique Díaz Lorca**

**Noviembre, 2008**

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

# UNIVERSIDAD DE CHILE

## INFORME DE APROBACION TESIS DE MAGISTER

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

### ANGIE DOMINIQUE DIAZ LORCA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 15 de Septiembre de 2008.

**Director de Tesis:**

- Dr. Elie Poulin



.....

**Co-Director de Tesis:**

- Dr. Jean-Pierre Féral

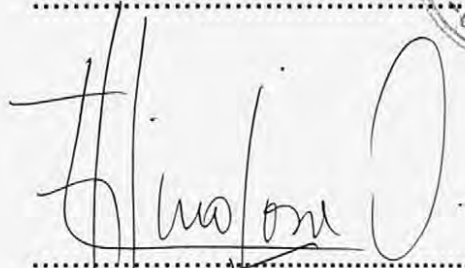


.....



**Comisión de Evaluación de la Tesis**

- Dr. Felipe Hinojosa



.....

- Dr. Marco Méndez



.....



A mis incondicionales... mi Familia

## RESUMEN BIOGRÁFICO



Angie Dominique Díaz Lorca nació en Santiago, el 1 de febrero de 1979. Se graduó de enseñanza media el año 1996, en el Colegio Bertrand Russell de La Florida. Ingresó a la Universidad Católica de la Santísima Concepción en 1998, donde obtuvo el grado académico de Licenciado en Ciencias, mención Biología Marina y el título profesional de Biólogo Marino. En 2006 ingresó al Programa de Magíster en Ciencias Biológicas, mención Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile. Actualmente cursa en esta misma casa de estudios el Programa de Doctorado en Ciencias, mención Ecología y Biología Evolutiva.



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a todas las personas que colaboraron de una u otra manera en el desarrollo y término de este trabajo. De manera especial, a mi tutor Dr. Elie Poulin y al Dr. Álvaro Palma, ya que gracias a ellos tuve la oportunidad de conocer Antártica, bucear en este fascinante mundo y sobre todo, porque fueron un motor muy importante en generar mi interés por hacer ciencia en este ambiente tan particular y extremo. A mi tutor, muchas gracias por sus enseñanzas, ideas y conocimientos compartidos, su constante motivación y paciencia.

Agradezco igualmente a los Drs. Marco Méndez y Felipe Hinojosa, quienes son parte de mi comisión evaluadora, por sus correcciones, observaciones y comentarios. A mi amiga Andrea Silva, quien me introdujo en el mundo de las técnicas moleculares (partidores, PCRs, geles, secuencias... "*to much*"), muchas gracias por tus enseñanzas. A mis compañeros y amigos del Laboratorio de Ecología Molecular (LEM): Ma.Cecilia, Christian, Constanza, Pamela, Claudia y Claudio, Denisse, Benito, David, Pablo, Marcela... gracias por hacer de la convivencia en el "lab" algo muy agradable, por todos los conocimientos y momentos, esas extensas tardes de estudio y aquellas de relax después de clases.

De manera especial, gracias a todos los investigadores que ayudaron a la realización de esta tesis mediante los aportes de material biológico e intercambio de ideas: A mi co-tutor Dr. Jean-Pierre Ferál (Centre d'Océanologie de Marseille, CNRS UMR7628), el Dr. Bruno David y el Dr. Thomas Saucède de la Université de Dijon (Francia), quienes aportaron muestras de la Isla Kerguelen,

base Antártica de Terre Adélie (región Este del continente) y la zona del mar de Weddell, gracias a la ayuda de sus proyectos ANR AntFlock y los programas 195 (Kerguelen) y 345 (Terre Adélie) del Instituto Paul Emile Victor (IPEV). Agradezco también la colaboración de la Dra. Claudia Bremec del Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP Argentina) y al Dr. Héctor Zaixso de la Universidad Nacional de la Patagonia (San Juan Bosco, Argentina), quienes aportaron las muestras provenientes de Argentina. Finalmente, deseo agradecer el apoyo logístico y financiero de los proyectos INACH 02-02 y 13-05, ECOS/CONICYT C06-B02 y al Instituto de Ecología y Biodiversidad proyecto ICM cod P05-002.





## INDICE DE MATERIAS

	Página
Índice de materias .....	vi
Índice de figuras .....	viii
Índice de tablas .....	xi
Abreviaturas .....	xiii
1. Resumen .....	xiv
Abstract .....	xvi
2. Introducción .....	2
2.1 Género <i>Sterechinus</i> .....	7
2.2 Género <i>Abatus</i> .....	8
3. Hipótesis .....	10
4. Objetivos .....	13
4.1 Objetivos Generales .....	13
4.2 Objetivos Específicos .....	13
5. Metodología .....	14
5.1 Obtención de muestras .....	14
5.2 Extracción, Amplificación y secuenciación .....	15
5.2.1 Citocromo Oxidasa I (COI) <i>Sterechinus</i> .....	17
5.2.2 Citocromo Oxidasa I (COI) <i>Abatus</i> .....	18
5.3 Análisis filogenético .....	19
5.4 Análisis de diversidad genética .....	21
5.5 Estimación de tiempos de divergencia .....	22

<b>6. Resultados</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1 Variación de secuencias (COI) y análisis filogenético</b> .....	<b>24</b>
<b>6.1.1 <i>Sterechinus</i></b> .....	<b>24</b>
<b>6.1.2 <i>Abatus</i></b> .....	<b>27</b>
<b>6.2 Análisis de secuencias e Historia Demográfica</b> .....	<b>31</b>
<b>6.2.1 <i>Sterechinus</i></b> .....	<b>31</b>
<b>6.2.2 <i>Abatus</i></b> .....	<b>36</b>
<b>6.3 Separación de Faunas</b> .....	<b>38</b>
<b>6.3.1 <i>Sterechinus</i></b> .....	<b>38</b>
<b>6.3.2 <i>Abatus</i></b> .....	<b>39</b>
<b>7. Discusión</b> .....	<b>41</b>
<b>7.1 Filogenia y taxonomía</b> .....	<b>41</b>
<b>7.2 Estimación de los tiempos de divergencia</b> .....	<b>42</b>
<b>7.3 Conectividad en el Océano Austral</b> .....	<b>46</b>
<b>7.4 <i>Diversidad genética intra-específica e historia demográfica</i></b> .....	<b>49</b>
<b>8. Conclusiones</b> .....	<b>52</b>
<b>9. Bibliografía</b> .....	<b>55</b>
<b>Anexos</b> .....	<b>63</b>





## INDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura 1</b>	<b>2</b>
Representación esquemática de la posición de los continentes durante el Eoceno Superior y el Mioceno Medio	
<b>Figura 2</b>	<b>4</b>
Paleorreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 70 Ma	
<b>Figura 3</b>	<b>8</b>
Reconstrucción filogenética por Máxima verosimilitud en base a los genes 12S rDNA-tRNA (gln) para la separación de la especie <i>S. neumayeri</i> de <i>P. lividus</i> y <i>L. albus</i> .	
<b>Figura 4</b>	<b>15</b>
Sitios de muestreo donde fueron obtenidas las especies en estudio Fauna Antártica y Subantártica	
<b>Figura 5</b>	<b>25</b>
Árbol por MP para las relaciones filogenéticas <i>Stereochinus</i>	

**Figura 6** 27

Análisis Bayesiano para COI de: las especies del género *Sterechinus*

**Figura 7** 29

Árbol por MP para las relaciones filogenéticas del género *Abatus*.

**Figura 8** 30

Análisis Bayesiano para COI de las especies del género *Abatus*.

**Figura 9** 33

Distribución mismatch para las especies Antártica *S. neumayeri*  
y Sudamericana *S. agassizi*

**Figura 10** 34

Red de haplotipos para la separación entre las especies  
del género *Sterechinus* provenientes de Argentina y Antártica

<b>Figura 11</b>	<b>35</b>
Red de haplotipos para la separación entre las especies de <i>Sterechinus</i> de distribución subantártica y antártica	
<b>Figura 12</b>	<b>37</b>
Mismatch para <i>A. agassizii</i> (Antártica)	
<b>Figura 13</b>	<b>38</b>
Red de haplotipos para la separación entre la fauna antártica y subantártica del género <i>Abatus</i>	
<b>Figura 14</b>	<b>44</b>
Tiempo y épocas del Mioceno	
<b>Figura 15</b>	<b>48</b>
Esquema de las corrientes que conforman el mar del sur y frente polar	

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1</b>	<b>9</b>
Distribución y batimetría de las especies del género <i>Abatus</i> .	
<b>Tabla 2</b>	<b>16</b>
Número de secuencias obtenidas y analizadas para las especies de ambos géneros en estudio	
<b>Tabla 3</b>	<b>17</b>
Condiciones para la amplificación por PCR del gen mtDNA COI, para las especies del género <i>Sterechinus</i> .	
<b>Tabla 4</b>	<b>18</b>
Condiciones para la amplificación por PCR del gen mtDNA COI, para las especies del género <i>Abatus</i> .	
<b>Tabla 5</b>	<b>32</b>
Análisis de diversidad molecular para las especies <i>S. neumayeri</i> , <i>S. agassizi</i> y <i>S. diadema</i> .	

**Tabla 6****37**

Análisis de diversidad molecular para la especie

*A. agassizi* y *A. cavernosus*.

**Tabla 7****40**

Estimación de los tiempos de divergencia entre erizos

de los géneros *Sterechinus* y *Abatus*.

## ABREVIATURAS

CCA	Corriente Circumpolar Antártica
MtDNA	DNA mitocondrial
COI	Citocromo Oxidasa I
Ma	Millones de años
ka	kilo de años (miles de años)
K	Número de haplotipos
h	Diversidad haplotípica
S	Número de sitios polimórficos
$\Pi$	Número promedio de diferencias entre par de secuencias
$\Pi_{inter}$	Número promedio de diferencias entre par de secuencias de distintas especies
PCR	Reacción en cadena de La polimerasa
MP	Máxima parsimonia
AIC	Criterio de información de Akaike
LRT	Likelihood Ratio Test

## 1.- RESUMEN

La presencia de especies congéneres de invertebrados marinos bentónicos en Antártica y Sudamérica, ha sido históricamente interpretado como el resultado del proceso de vicarianza, consecuencia de la separación de ambos continentes y posterior instalación de la corriente circumpolar Antártica. Sin embargo, pocas evidencias han sido aportadas para validar este modelo. Los géneros *Abatus* y *Sterechinus* (Echinidae), son parte importante de la fauna marina bentónica somera de ambos continentes y representan un buen modelo para estudiar los tiempos y modos de especiación entre ambos continentes. De hecho, *Sterechinus* agrupa especies que se desarrollan a través de una larva planctotrófica de alto poder dispersivo, mientras que las especies del género *Abatus* no presentan tal estado libre. En este sentido, ambos géneros permitirán contrastar las estimaciones de los tiempos de separación en relación con los distintos modos de desarrollo.

Los marcadores moleculares representan una buena herramienta de trabajo, que nos permiten evaluar el tiempo de separación entre las especies congéneres que habitan estos continentes. El análisis del gen COI (mtDNA) de tres especies de *Sterechinus*: dos que se encuentran fuera de la convergencia antártica (Argentina y Kerguelen) y una dentro de ésta; y dos especies de *Abatus*, una de cada continente (Argentina y Antártica) indican que para ambos géneros, los especímenes provenientes de Antártica y Subantártica presentan una clara separación. Asumiendo la hipótesis de reloj molecular, los resultados definen distintos tiempos de divergencia entre la fauna Antártica y Sudamericana para cada género: 5.9 – 4.2 Ma (*Sterechinus*) y 17 Ma (*Abatus*). Estos resultados sugieren que la falta de estadio dispersivo en el género

*Abatus* resultó en una separación precoz entre taxa, asociada a la separación física de ambos continentes y a la instalación de una barrera batimétrica entre ellos. En el caso de *Sterechinus*, el gran potencial de dispersión larval de estas especies podría haber permitido mantener una conectividad muy posterior a los eventos tectónicos y solamente el establecimiento de una barrera oceanográfica efectiva, como la corriente circumpolar antártica (CCA), podría haber iniciado la divergencia entre Antártica y Sudamérica en este género. En el caso de *Sterechinus*, los patrones filogeográficos muestran una gran conectividad dentro de cada zona, sugiriendo dos grandes vías de dispersión (modelo de los anillos antárticos y subantárticos).

## ABSTRACT

The presence of congeneric species of marine benthic invertebrates in Antarctica and South America has been historically interpreted as the result of vicariant speciation due to plate tectonics, enhanced by the installation of the Antarctic Circumpolar Current (ACC). Nevertheless, few evidences have been contributed to validate this model. The genera *Abatus* and *Sterechinus* (Echinidae) are good examples of this kind of transoceanic distribution and excellent models to study the times and modes of speciation in the Southern Ocean. Actually, *Sterechinus* have an indirect development mode with a high dispersive planctotrophic larva, while the brood-protecting species of *Abatus* have a direct development mode. In this regard, both genera constitute good models to determine how the mode of development is related to divergence times.

Molecular markers allowed us to evaluate divergence time between congeneric species from Antarctica and South America. We analyzed Cytochrome Oxidase subunit I (mtDNA) in three species of *Sterechinus* from different biogeographic regions, namely *S. agassizi* (Argentina), *S. diadema* (Kerguelen Province) and *S. neumayeri* (Antarctica); and two species of *Abatus*, *A. cavernosus* (Magellan) and *A. agassizii* (Antarctica). Our results indicate that both genera show marked genetic differences between species from antarctic and subantarctic regions. Assuming the molecular clock hypothesis, our results indicate different divergence times between the Antarctic and Southamerica fauna of 5,9 - 4,2 Ma (*Sterechinus*) and 17 Ma (*Abatus*). These results suggest that the absence of a dispersive stage in *Abatus* resulted in an ancient

separation of the taxa, related to the continental separation. On other hand, the great dispersive potential of *Sterechinus* species could have allowed to maintain a certain degree of connectivity after tectonic events. In this regard, only the establishment of an effective oceanographic barrier, a possible intensification of the ACC, could have initiated the diversification of this genus in the Southern Ocean. In *Sterechinus*, phylogeographic pattern suggests also a great connectivity within each region, which is evidence of two major dispersion routes (Antarctic and subantarctic 2-rings model).

## 2.- INTRODUCCION

La fauna marina bentónica que bordea al continente antártico siempre ha sido considerada como parte del ecosistema más aislado del planeta, debido a la existencia de barreras supuestamente infranqueables que se instalaron a su alrededor hace millones de años (Clarke and Barnes 2005, Thatje 2005). La fragmentación y dispersión de los bloques que conformaban el supercontinente Gondwana culminó con dos importantes eventos: (1) A fines del Eoceno (33,5 Ma), el distanciamiento entre Antártica y Australia inicia la formación del mar de Tasmania y (2) la apertura del paso de Drake, que corresponde al último gran evento tectónico (inicio aproximado hace 28 Ma), generan una separación oceánica entre Suramérica y la península Antártica, completando el aislamiento geográfico del continente (Fig. 1).

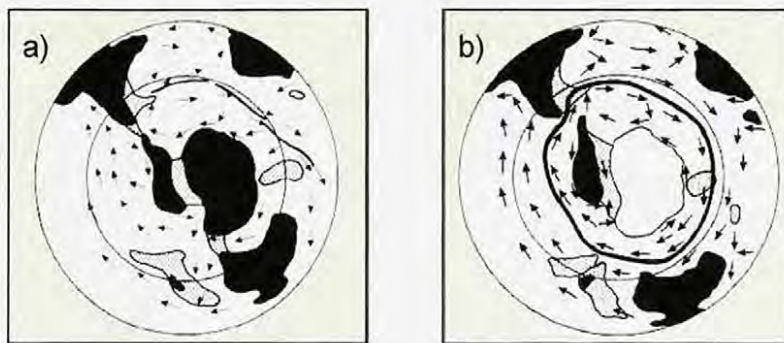


Figura 1: Representación esquemática de la posición de los continentes y circulación oceánica durante (a) el Eoceno Superior (35 millones de años atrás) y (b) el Mioceno Medio (15 millones de años atrás). (Extracto de Crame 1999)

Posteriormente, el ensanchamiento progresivo del paso de Tasmania y del Mar de Escocia permitió la formación de la Corriente Circumpolar Antártica, generando un aislamiento oceanográfico para el continente a comienzos del Mioceno (Crame 1999; Pfuhl and McCave 2005). Junto con lo anterior, a medida que aumentaron las distancias entre los continentes, Antártica se encontró progresivamente rodeada por una zona profunda generando un aislamiento batimétrico (Lawver *et al.* 1992, Clarke and Barnes 2005), que se sumó entonces a las barreras geográficas (distancia) y oceanográficas (corriente). Aunque el tema de la fecha para la completa instalación de la corriente sigue siendo objeto de debate, existe un consenso en aproximadamente 25 Ma (Thompson 2004; Clarke and Barnes 2005). A partir de entonces, según la evidencia que entregan las paleoreconstrucciones de temperaturas desde el registro fósil (isótopos estables de  $O_{18}$ ), comenzó una reorganización del sistema de circulación oceánica que generó la producción de aguas frías profundas en el margen del continente, responsable del establecimiento del frente polar (Zachos *et al.* 1999, Zachos *et al.* 2001). Este fenómeno habría contribuido a la paulatina disminución de las temperaturas que se inició durante el Mioceno Medio (Fig. 2).

Durante la progresiva disminución de la temperatura, se distinguen dos marcados descensos (Fig. 2): El primero, a inicios del plioceno (5.3 Ma), provocó un notable crecimiento de la masa de hielo vinculado con la completa cobertura de la región Oeste del continente (DeConto and Pollard 2003). El segundo período

corresponde al inicio de los ciclos glaciales – interglaciales, hace 2 millones de años, que marcaron el período Pleistocénico (Mackensen *et al.* 1992).

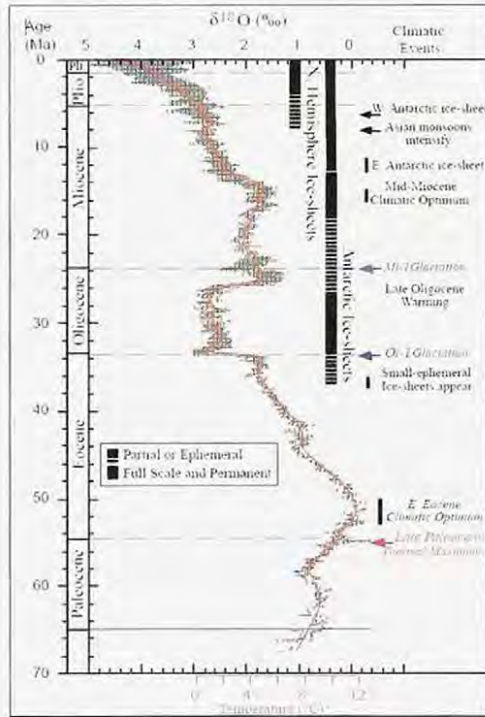


Figura 2: Paleoreconstrucción de las temperaturas del Océano Antártico durante los últimos 70 Ma, (Extracto de Zachos *et al.* 2001)

En el ambiente terrestre, los drásticos cambios climáticos que marcaron al continente antártico provocaron la extinción de la casi-totalidad de la macro-flora y fauna, dejando un desolador paisaje que contrasta con la gran diversidad y abundancia de la fauna marina bentónica que habita en la estrecha plataforma continental (Clarke and Johnston 2003). Sin embargo, los cambios ambientales

asociados al descenso de la temperatura del mar y a los periodos glaciales del Pleistoceno afectaron igualmente, pero en menor proporción, este ecosistema. La ausencia de depredadores modernos capaces de triturar huesos como decápodos y la mayor parte de peces Teleósteos (depredadores durofagos), ilustran este fenómeno (Aronson and Blake 2001, Clarke *et al.* 2004, Thatje and Arntz 2004, Thaje *et al.* 2005).

En conformidad con el escenario histórico planteado anteriormente, la fauna bentónica que ocupa actualmente la plataforma continental antártica está, en gran medida, estrechamente relacionada con la que caracteriza la zona Magallánica y Austral de Sudamérica. Con la excepción de algunas especies, la mayoría de las relaciones que se reconocen son al nivel de género. Es el caso por ejemplo del asteroideo *Odontaster* (Odontasteridae), del gastrópodo *Nacella* (Patellidae) (Valdovinos *et al.* 2005) y de los echinoideos *Sterechinus* (Echinidae) y *Abatus* (Schizasteridae).

Esta situación reflejaría entonces el proceso de vicarianza que se inició al establecerse las barreras geográficas (distancia), batimétricas (profundidad) y oceanográficas (corriente circumantártica) entre Sudamérica y Antártica hace alrededor de 25 Ma. Sin embargo, existen escenarios alternativos en que estas faunas o parte de ellas habrían mantenido contactos posteriores a esta fecha. Por un lado, la existencia de los montes submarinos que conforman el Arco de Escocia podría permitir una continuidad entre las faunas de la Península Antártica y Sudamérica (Thompson 2004). Por otro lado, la gran diversidad de historias de vida en los invertebrados bentónicos, podría haber generado variaciones en los

tiempos del último contacto para los diferentes taxa (Clarke *et al.* 2004). En este sentido, uno de los rasgos más relevante a tomar en cuenta corresponde a la capacidad de dispersión de las especies, muy ligada al modo de desarrollo para estos organismo generalmente poco móviles (Poulin *et al.* 2001, 2002). El predominio de especies incubantes en los invertebrados bentónicos antárticos podría resultar de las mayores extinciones sufridas por las especies con desarrollo planctónico durante los periodos glaciales (Poulin and Féral 1996, Poulin *et al.* 2002). Durante las etapas más frías de este período, los glaciares invadieron la plataforma continental y el mar circundante se encontró cubierto por una capa de hielo marino grueso y permanente (Ciesielkin *et al.* 1982, Kennett and Barker 1990, Grobe and Mackensen 1992). Algunas consecuencias directas de estos eventos fueron la importante disminución de la cantidad de luz que recibían las aguas superficiales, con la consecuente disminución en la productividad primaria alrededor de la Antártica. La duración de estos episodios fue típicamente muy superior al tiempo de vida de los organismos y muy probablemente, la causa de la extinción local de muchas especies, géneros y familias con desarrollo planctotrófico (Poulin and Féral 1994, 1996, Brey *et al.* 1996).

Al respecto, los erizos representan un buen modelo para determinar el momento en que ambas faunas marinas dejaron de estar en contacto siguiendo historias evolutivas independientes, debido a la presencia de especies congéneres en ambas costas. Este grupo además presenta modos de desarrollo contrastantes, como es el caso de los géneros *Sterechinus* (Echinidae) y *Abatus* (Schizasteridae), ambos presentes en Antártica y Sudamérica (David *et al.* 2005).

## 2.1 Género *Sterechinus*

El género de erizos regulares *Sterechinus* pertenece a la familia Echinidae, orden Echinoida. Está conformado por cinco especies descritas en base a criterios morfológicos y biogeográficos, quienes presentan fecundación externa con un desarrollo larval de tipo pelágico planctotrófico. En el continente antártico podemos encontrar a tres especies de *Sterechinus*: *S. neumayeri* (Meissner 1900) especie de erizo regular más abundante de las aguas someras del continente (Brey *et al.* 1996), que alcanza una distribución batimétrica hasta los 750 m; *S. antarcticus* (Koehler 1901), es dominante después de los 450 m a pesar de presentar una amplia batimetría y, *S. dentifer* (Koehler 1926), quien presenta un rango más restringido y profundo (1500 - 2000 m de profundidad) (David *et al.* 2005). En cuanto a las dos especies restantes del género, éstas habitan regiones subantárticas: *S. diadema* (Studer 1876), es endémica de la Plataforma de Kerguelen, mientras que *S. agassizii* (Mortensen 1910), se encuentra en la plataforma continental Argentina desde los 55 hasta los 35°S y presenta una amplia distribución batimétrica (25 - 1000 m aproximadamente) (David *et al.* 2005).

Con respecto a la historia evolutiva, Lee *et al.* (2004) plantean que al nivel de género, la última conexión entre Antártica y Sudamérica habría ocurrido entre 24 – 35 Ma. Sin embargo, este estudio estableció las relaciones filogenéticas entre la especie *S. neumayeri* (Antártica) y dos especies pertenecientes a la misma familia *Loxechinus albus* y *Paracentrotus lividus* (Sudamérica) y no entre especies hermanas pertenecientes al género *Sterechinus* (Fig. 3).

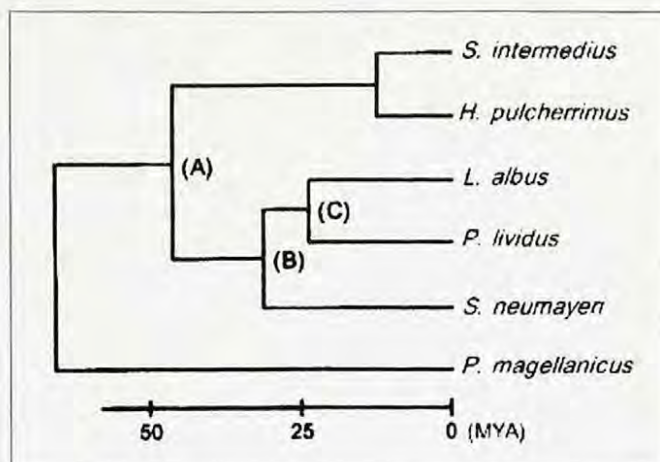


Figura 3: Reconstrucción filogenética por Máxima verosimilitud en base a los genes 12S rDNA-tRNA (gln), que muestra el tiempo estimado para la separación de la especie *S. neumayeri* del clado hermano conformado por *P. lividus* y *L. albus*. (extraído de Lee *et al.* 2004)

## 2.2 Género *Abatus*

El género de erizos irregulares *Abatus*, pertenece a la familia Schizasteridae, orden Spatangoida y agrupa a once especies descritas en base a criterios morfológicos (Poulin *et al.* 2002, David *et al.* 2005). Su desarrollo no contempla ninguna fase larval libre y todas las especies del género son incubantes, presentando un desarrollo directo en estructuras adaptadas o “bolsillos” de su testa (Giese *et al.* 1991, Schatt and Féral 1996). En general las especies de este género, presentan un amplio rango batimétrico y prácticamente todas, cómo *A. bidens*, habitan solamente en la región antártica. Sin embargo la especie *A. cavemosus*, ha sido descrita en el continente sudamericano, mientras que *A. cordatus* es endémica del Archipiélago Kerguelen (Tabla 1).

Tabla 1: Distribución y batimetría de las especies del género *Abatus*.

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	RANGO BATIMETRICO
<i>A. agassizii</i>	Antártica	5 – 750 m
<i>A. beatriceae</i>	Antártica	3500 m
<i>A. bidens</i>	Antártica	70 – 250 m
<i>A. cavernosus</i>	Argentina	20 – 1000 m
<i>A. cordatus</i>	Plataforma Kerguelen	5 – 600 m
<i>A. curvidens</i>	Antártica	20 – 1000 m
<i>A. elongatus</i>	Antártica	15 – 1000 m
<i>A. ingens</i>	Antártica	20 – 1000 m
<i>A. nimrodi</i>	Antártica	15 – 600 m
<i>A. Philippi</i>	Antártica	15 – 1000 m
<i>A. shackletoni</i>	Antártica	5 – 600 m

En cuanto a la historia evolutiva de *Abatus*, no se tiene conocimiento de las probables relaciones entre las especies que habitan ambos continentes y menos acerca de estimaciones del tiempo en que éstas dejaron de tener contacto. Aunque dado su tipo de desarrollo y el no poseer una fase de libre dispersión, es atinente asumir que éste probable contacto se ubique en un periodo de tiempo en que ambos continentes formaban una sola masa de tierra.

### 3.- HIPÓTESIS

La presente investigación esta dirigida a estimar los tiempos de separación entre especies bentónicas antárticas y sudamericanas en dos géneros de equinoideos con modos de desarrollo contrastantes, además de comparar la diversidad genética entre especies dentro de los mismos géneros.

#### 3.1.- Hipótesis 1

Debido a su reducido potencial de dispersión como consecuencia de la ausencia de estadio larval (Poulin and Féral 1994, Schatt and Féral 1996), se espera que los tiempos estimados para el inicio de la divergencia entre las especies antárticas y sudamericanas de *Abatus* será cercano al inicio de la separación de los continentes. El caso contrario se espera para *Sterechinus*, ya que la existencia de una larva planctotrófica que permanece meses en la columna de agua, podría haber permitido mantener contacto entre ambos continentes por mucho más tiempo.

### **3.2.- Hipótesis 2**

En caso de posibles contactos posteriores a la separación de los continentes, cómo por ejemplo durante los períodos interglaciales del Pleistoceno, sólo las especies del género *Sterechinus* podrían haber logrado cruzar la Corriente Circum-Antártica y presentar por lo tanto haplotipos compartidos o poco diferenciados entre ambos continentes.

### **3.3.- Hipótesis 3**

Las glaciaciones que caracterizan al periodo pleistocénico impactaron drásticamente el ambiente antártico, por lo que las especies que habitan sobre la plataforma continental antártica deberían haber sido afectada de manera significativa. Estas especies presentarían entonces una menor diversidad genética intraespecífica en comparación a su especies hermana que habitan la región subantártica.

## 4.- OBJETIVOS

### 4.1.- Objetivo general:

Establecer el inicio de la divergencia entre la fauna marina bentónica de Antártica y Sudamérica, mediante la utilización de herramientas moleculares, en especies congéneres de Equinodermos presentes en ambos continentes.

### 4.2.- Objetivos específicos:

A. Establecer las relaciones filogenéticas de ambos géneros para determinar si las comparaciones entre especies que se realizaran en el presente trabajo, es entre especies hermanas.

B. Determinar el tiempo de separación entre especies congéneres de Antártica y Sudamérica a través del modelo de Coalescencia e hipótesis del Reloj Molecular.

C. Evaluar cómo el modo de desarrollo (planctotrófico vs. incubante) de ambos géneros afecta los tiempos de divergencia entre especies antárticas y sudamericanas.

D. Comparar los patrones de diversidad entre las poblaciones de antártica y argentina para cada género, con el fin de establecer el efecto que pueden haber tenido las glaciaciones pleistocénicas.

## 5.- METODOLOGÍA

### 5.1 Obtención de muestras

Las especies en estudio fueron colectadas en distintos sitios de la plataforma continental antártica y argentina, así como del Archipiélago de Kerguelen. Las especies antárticas *Sterechinus neumayeri* y *Abatus agassizii*, fueron recolectadas durante las campañas de terreno de los proyectos INACH 02-02 y 13-05 en las Islas Shetland del Sur y la parte oeste de la Península Antártica (Estrecho Bransfield), además de algunas muestras de *S. neumayeri* provenientes de la base Antártica Francesa de Terre Adélie, ubicada en la región Este del continente Antártico. Algunas muestras de *S. diadema* (13 individuos) fueron donadas por el Dr. Jean-Pierre Féral (Centre d'Océanologie de Marseille, CNRS UMR7628). Las especies de distribución sudamericana (costa de Argentina), fueron aportadas por investigadores argentinos: Los ejemplares de *S. agassizii*, recolectados durante cruceros oceanográficos realizados por el Instituto Nacional de Investigación y Desarrollo Pesquero (INIDEP Argentina), fueron otorgados por la Dra. Claudia Bremec y los ejemplares de *A. cavemosus*, por el Dr. Héctor Zaixso de la Universidad Nacional de la Patagonia, San Juan Bosco, Argentina. Posteriormente, gracias al Proyecto ECOS/CONICYT C06-B02 y a la colaboración de los Investigadores Dr. Bruno David y Dr. Thomas Saucède de la Université de Dijon (Francia) y Jean-Pierre Féral de la Université de Aix- Marseille (Francia), se obtuvieron algunas muestras que provienen de la parte Este de la Península Antártica, Mar de Weddell así como del Archipiélago Kerguelen (Fig. 4).

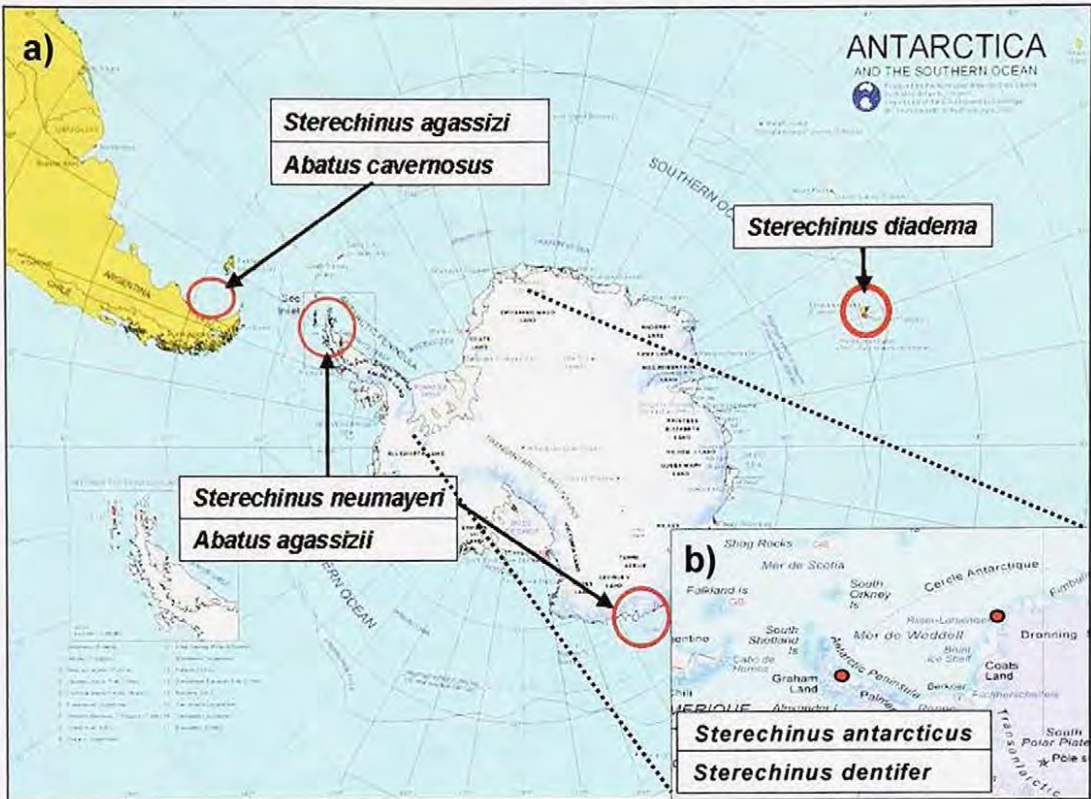


Figura 4: Sitios de muestreo donde fueron obtenidas las especies en estudio. **a)** Fauna Antártica y Subantártica, **b)** Procedencia de muestras otorgadas por investigadores Franceses.

## 5.2 Extracción, Amplificación y secuenciación

A partir del tejido gonadal de un total de 238 muestras, entre las especies congéneres de ambos continentes en los géneros *Abatus* y *Sterechninus* (Tabla 2), se realizó la extracción del ADN total siguiendo el método Salino (Aljanabi & Martínez 1997). Se realizó la amplificación parcial del gen Citocromo Oxidasa I (COI) del ADN mitocondrial, obteniendo una extensión promedio de 900 pb. Este gen es una de las zonas más variables del ADN mitocondrial y permite la

identificación y el seguimiento de linajes maternos debido a su modo de transmisión uniparental y la ausencia de recombinación. Ha sido ampliamente utilizado en invertebrados marinos para estudios genéticos a nivel intraespecífico o intra-générico (Palumbi *et al.* 1997; McCartney *et al.* 2000; Lessios *et al.* 2001).

Tabla 2: Número de secuencias obtenidas y analizadas para las especies de ambos géneros en estudio

<b>Especie</b>	<b>Origen geográfico</b>	<b>n° secuencias obtenidas</b>	<b>N° secuencias analizadas</b>	<b>Modo de desarrollo</b>
<i>Abatus cavernosus</i>	Plataforma continental Argentina	27	27	Incubante
<i>Abatus agassizi</i>	Península Antártica (Bahía Fildes)	27	27	Incubante
<i>Sterechinus agassizi</i>	Plataforma continental Argentina	40	40	Planctotrófico
<i>Sterechinus neumayeri</i>	Península Antártica (Bahía Fildes)	110	48	Planctotrófico
		6	6	
	Península Antártica (Este)	15	15	
	Tierra Adelia (Este de Antártica)			
<i>Sterechinus diadema</i>	Archipiélago Kerguelen	13	13	Planctotrófico
<i>Sterechinus antarcticus</i>	Península Antártica (Este)	3	3	Planctotrófico
<i>Sterechinus dentifer</i>	Península Antártica (Este)	4	4	Planctotrófico

### 5.2.1 Citocromo Oxidasa I (COI) *Stereochinus*

Para la amplificación parcial del gen COI se utilizaron los partidores descritos por Lee *et al.* (2004) (Tabla 3). El resultado de la amplificación son 945 bp que corresponden a la zona del gen COI de *S. neumayeri*, desde el nucleótido 65 hasta el 1009 (Genbank acceso AY275548, tamaño 1077pb). Sin embargo, debido a la baja calidad de las muestras provenientes de Argentina (ADN degradado), fue necesario diseñar partidores intermedios a partir de las secuencias obtenidas de *S. neumayeri* (ERZin-F: GAC CGA CTG CCC TTA TTT y ERZin-R: CTC GCT TTC CTG AGT AGT).

Tabla 3: Condiciones para la amplificación por PCR del gen mtDNA COI, para las especies del género *Stereochinus*.

Género	Citocromo Oxidasa I (COI)				
	Reactivos	Concentración	PCR	T° C	Tiempo
<i>Stereochinus</i>	Taq. Polimerasa	0.2 U	Denat. Inicial	95	7 min.
	Buffer	1X	Denaturación	95	1 min.
	dNTPs	0.2 mM c/u	Annealing	58	1:30 min.
	Partidor	10 pmol c/u			
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 Mm	Extensión	72	1:30 min.
	DNA templ.	5 – 10 ng	Núm. Ciclos	35	
	Vol. Final	15 ul	Ex. final	72	10 min.

### 5.2.2 Citocromo Oxidasa I (COI) *Abatus*

Para amplificar un fragmento parcial del gen COI, se utilizaron en primera instancia los partidores degenerados descritos por Stockley *et al.* (2005) (Tabla 4), para obtener un par de secuencias de *A. agassizii*. Posteriormente, con estas secuencias se diseñaron partidores intermedios para el resto de las muestras (ABAin-F: TTG CCA TTT TCT CAC TCC ACC T y ABAin-R: AAG AAT CAG AAT AGA TGY TGA AAT A), con los cuales se logró extender el tamaño de la amplificación a 799 pb. Debido a que *A. agassizii* y *A. cavemosus* presentaron bajos niveles de diversidad haplotípica, se optó por limitar el número de muestras analizadas (27 muestras para ambas especies).

Tabla 4: Condiciones para la amplificación por PCR del gen mtDNA COI, para las especies del género *Abatus*.

Género	Citocromo Oxidasa I (COI)				
<i>Abatus</i>	Reactivos	Concentración	PCR	T° C	Tiempo
	Taq. polimerasa	0.2 U	Denat. Inicial	94	4 min.
	Buffer	1X	Denaturación	94	50 seg.
	dNTPs	0.2 mM c/u	Annealing	56.4	45 seg.
	Partidor	10 pmol c/u			
	MgCl <sub>2</sub>	1.5 mM	Extensión	72	1 min.
	DNA templ.	1 ng	Núm. Ciclos	35	
	Vol. final	15 ul	Extensión final	72	5 min.

La secuenciación de los fragmentos de DNA obtenidos por PCR, fue realizada por la empresa Coreana Macrogen, en secuenciador automático ABI 3100 de Applied Biosystems.

### 5.3 Análisis filogenético

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas de ambos géneros tiene un doble objetivo. El primero, es poder determinar si es pertinente realizar las estimaciones de tiempo de divergencia con las especies en estudio, ya que a priori no se tiene conocimiento acerca de si estos pares de especies congéneres (*S. neumayeri* con *S. agassizi* y *A. agassizii* con *A. cavernosus*), son especies hermanas o pertenecen a grupos hermanos. Una vez establecido lo anterior, los árboles filogenéticos de cada género, serían útiles para los análisis que nos permitirán realizar las estimaciones de los tiempos de divergencia.

Para la reconstrucción de los árboles filogenéticos se usaron como grupo externo las siguientes especies: Para el género *Sterechinus* se utilizó *Arbacia lixula* (X80396), *Psammechinus millaris* (AF279196) y *Paracentrotus lividus* (NC\_001572); Para el género *Abatus* se utilizó *Spatangus raschi* (AJ639911), *Brissopsis atlantica* (AJ639917) y *Paleopneustes cristatus* (AJ639908).

La reconstrucción de árboles filogenéticos para ambos géneros fue realizada mediante el criterio de optimización de Máxima Parsimonia (MP) con el programa PAUP\* v4.0 b10 (Swofford 1999). Todos los caracteres fueron

tratados como no ordenados con igual peso, utilizando el método de búsqueda heurística con adición de secuencia ordenada e intercambio de ramas (TBR Branch Swapping algorithm) (Nei and Kumar 2000). Para estimar el soporte de los nodos, se utilizó el remuestreo por bootstrap con 1000 réplicas (Felsenstein 1981). Por otra parte se realizaron análisis de inferencia filogenética Bayesiana con el programa MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck and Ronquist 2003), utilizando los modelos de sustitución GTR+G para el género *Abatus* y GTR+I+G para el género *Sterechinus* (MrModeltest, Nylander 2004). Este método nos permite estimar la probabilidad posterior de que cada taxa recuperado corresponda a una unidad monofilética. Todos los análisis de MCMC fueron realizados dos veces, usando corridas independientes con árboles al azar por un total de  $5 \times 10^6$  generaciones. Los árboles fueron muestreados cada 500 generaciones y los primeros 1000 árboles fueron descartados, con los datos restantes se realizó el filograma de consenso con la regla de la mayoría y probabilidad posteriori para los nodos. Las reconstrucciones filogenéticas, para ambos criterios de búsqueda, fueron realizadas con una submuestra de los haplotipos encontrados para cada especie. Para *Abatus* se utilizó un haplotipo por cada especie y para *Sterechinus* tres de cada una.

## 5.4 Análisis de diversidad genética

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con los programas Proseq v. 2.91 (Filatov 2002) y ClustalX 1.8 (Thompson *et al.* 1997). Para cada sitio de muestreo y especie, se determinaron las frecuencias haplotípicas, la diversidad haplotípica ( $h$ ), el número de sitios polimórficos ( $S$ ), y el número promedio de diferencia entre pares de secuencias ( $\pi$ ), con el programa DNAsp. ver 4.10 (Rozas *et al.* 2003). Las relaciones genealógicas entre haplotipos de un mismo género se graficaron por median-joining network (Bandelt *et al.* 1999) utilizando el programa Network 4.502 (Röhl 2002). Los diferentes haplotipos encontrados para cada especie se representan por círculos cuyos tamaños reflejan su frecuencia respectiva. La señal de un crecimiento poblacional pasado, como una inferencia de la historia demográfica de las poblaciones, fue realizado a través de los índices de neutralidad de Fu ( $F_s$ ) y Tajima ( $D$ ), por medio del programa ARLEQUIN 3.1, y de la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias ("mismatch distribution"), calculados por medio del programa DNAsp. ver 4.10 (Rozas *et al.* 2003). Finalmente, se realizó un ajuste al número de haplotipos ( $K$ ) mediante la utilización de curvas de rarefacción con el programa Past 1.81 (Hammer *et al.* 2008), lo que nos permite comparar el número de haplotipos entre muestras de diferentes tamaños. En este caso, las muestras corresponden a las especies de *Stereochinus* que habitan el continente antártico (*S. neumayeri*) y a la especie Sudamericana (*S. agassizi*).

## 5.5 Estimación de tiempos de divergencia

La estimación de los tiempos de separación entre las faunas marinas bentónicas de Antártica y Sudamérica, se realizó por coalescencia utilizando la hipótesis del reloj molecular, que supone que las mutaciones se fijan a una tasa constante sobre los linajes. Este método consiste en la reconstrucción de la historia genealógica de una muestra de secuencias hasta el ancestro común más reciente. Para esto se determinó el número promedio de diferencias entre par de secuencias de los grupos antártico y sudamericano para cada género ( $\Pi_{inter}$ ) con el programa DnaSP v. 4.50 (Rozas *et al.* 2003). De acuerdo a la teoría, se calculó el tiempo ( $t$ ) de divergencia entre dos linajes (antártico y sudamericano), que es igual a  $\Pi_{inter}/2u$ , donde " $\Pi_{inter}$ " es el número promedio de diferencias haplotípicas entre los grupos antárticos y sudamericanos y " $u$ " es el número de sustituciones por secuencia por millón de año. Para validar la utilización de la hipótesis del reloj molecular, antes fue chequeada la heterogeneidad de las tasas de evolución entre las ramas mediante el Likelihood Ratio Test (LRT) con el programa DAMBE (Xia and Xie 2001), que compara la probabilidad máxima de un resultado entre un árbol o topología de árbol con reloj molecular esforzado contra uno no esforzado. Finalmente y en las ocasiones en que fue pertinente, se estimaron las fechas de crecimiento o expansión poblacional, a partir de la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias de la misma especie (estimación de  $\pi$ , programa DNAsp, v. 4.50 Rozas *et al.* 2003).

Para la estimar los tiempos de divergencia en el género *Stereochinus* se utilizaron dos tasas de sustitución 0,51 y 0,72 % Ma<sup>-1</sup> (Lee *et al.* 2004). En el caso del género *Abatus*, se realizó una calibración a partir de una filogenia realizada por Smith *et al.* (2006), la cual nos entregó una estimación de la tasa de sustitución de 0.1 % Ma<sup>-1</sup> (Anexo 1).

## 6.- RESULTADOS

### 6.1 Variación de secuencias (COI) y Análisis Filogenético

#### 6.1.1 *Sterechinus*

La extensión de la sección del gen COI, lograda para las especies de *Sterechinus* y los outgroup utilizados, fue de 774 pb. De estas 744 posiciones nucleotídicas 534 fueron constantes con 101 sitios informativos para Parsimonia. La composición nucleotídica es: 27.14% A, 21.95% C, 18.24% G, 32.67% T. El test de saturación en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0.2945 < I_{ss.c} = 0.7363$ ;  $df = 463$   $p < 0.0000$ ), lo que valida su utilización en filogenia.

Los análisis filogenéticos para las especies de *Sterechinus* contemplaron a las especies *Arbacia lixula*, *Psammechinus millari* y *Paracentrotus lividus* como outgroup. Para la aproximación por MP se encontraron 10 árboles igualmente parsimoniosos, con un índice de consistencia de (IC) = 0.8228, índice de homoplasia (IH) = 0.1772, índice de retención (IR) = 0.8260 (Fig. 5). La topología del árbol muestra a dos grupos bien diferenciados, uno que incluye los haplotipos de la especie *S. neumayeri* y otro que agrupa al resto de las especies del género. Estos dos grupos se encuentran corroborados por los elevados valores de bootstrap (100%).

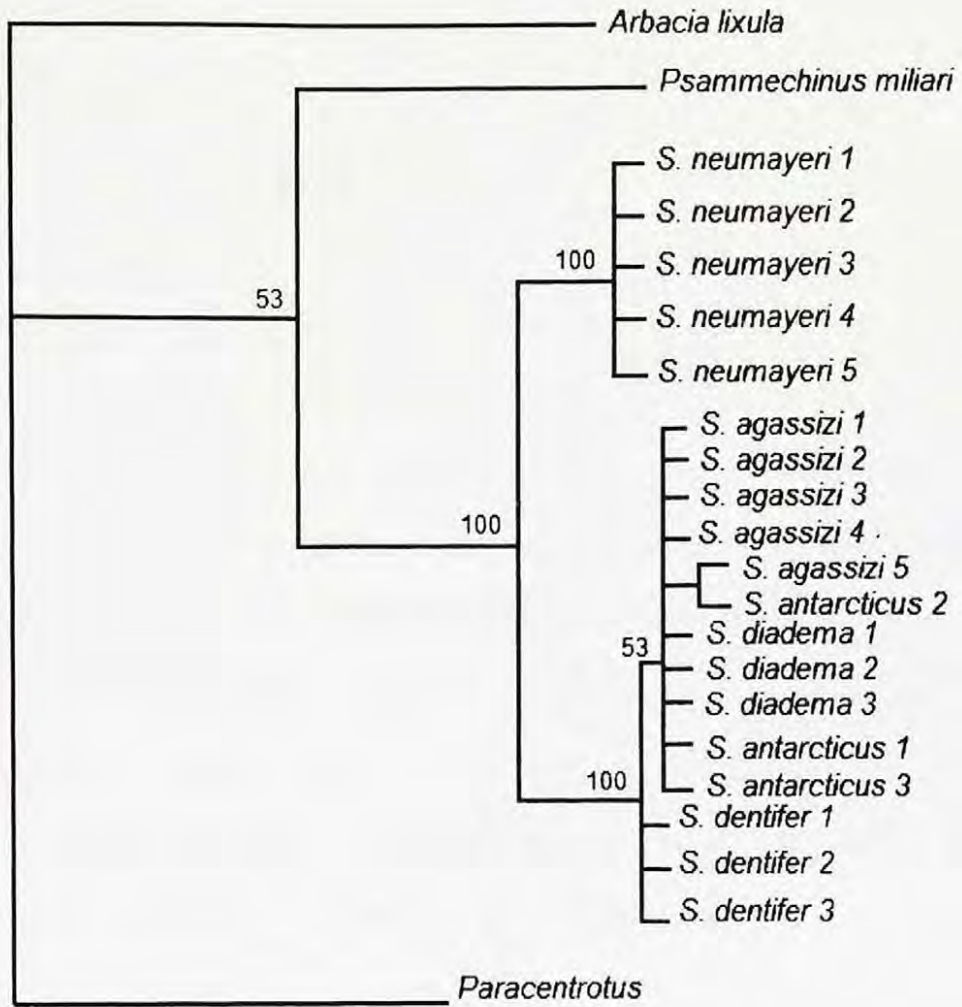
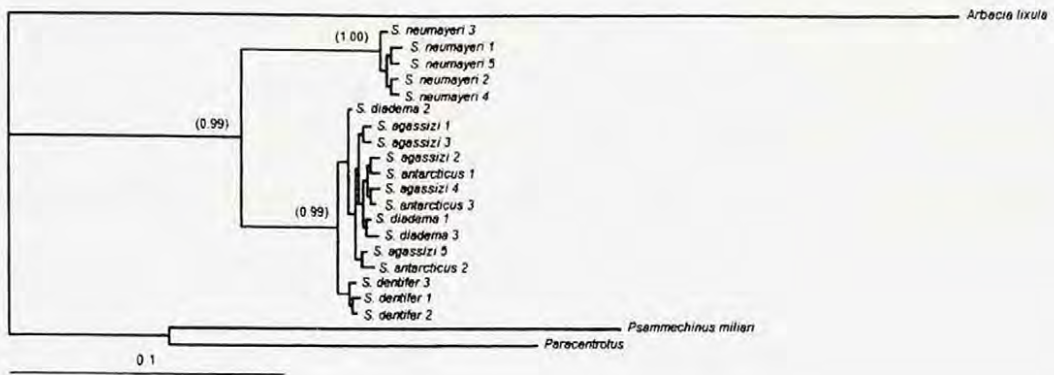


Figura 5: Árbol por MP que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados para el género *Stereochinus*. El valor sobre los nodos representa el valor de bootstrap para el análisis.

El resultado del Mrmodeltest indica que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es GTR+I+G. El análisis Bayesiano generó resultados similares a MP, con una topología donde se pueden identificar los mismos dos grupos que diferencian a la especie *S. neumayeri* del resto de las especies con elevados valores de probabilidad (Fig. 6a). Para evaluar la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las ramas se realizó LRT, que resultó significativo para éste análisis. Sin embargo, debido a que el objetivo del análisis filogenético de cada género es poder determinar la pertinencia de las comparaciones entre especies (hermanas), se escogió al haplotipo más común del grupo que reúne a cuatro de las especies de *Stereochinus* (segundo grupo) y con éste se realizó nuevamente el análisis Bayesiano (Fig. 6b), sobre el cual se evaluó la homogeneidad de las ramas. El resultado para el LRT fue no significativo ( $LRT = 2 * (2601.6390 - 2597.9814) = 7.3153$ ,  $X^2_{(7, 0.05)} = 14.07$ ).

a)



b)

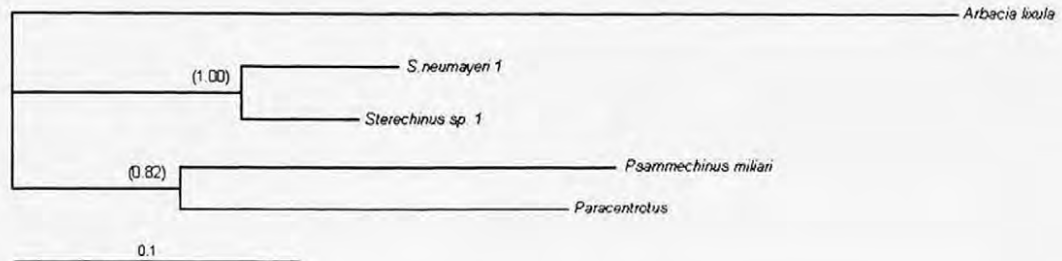


Figura 6: Análisis Bayesiano para COI de: (a) Las especies del género *Stereochinus*; (b) *S. neumayeri* con el haplotipo más común que representa al resto de las especies.

### 6.1.2 *Abatus*

La extensión de la sección del gen COI, lograda para las especies de *Abatus* y outgroups utilizados, fue de 567 pb. De estas posiciones nucleotídicas, 394 fueron constantes con 100 sitios informativos para Parsimonia. La composición nucleotídica es: 29.34% A, 26.57% C, 13.51% G, 30.58% T. El test de saturación

en la sustitución mostró que las secuencias no están saturadas ( $I_{ss} = 0.1278 < I_{ss.c} = 0.7251$ ;  $df = 566$   $p < 0.0000$ ), lo que valida su utilización en filogenia.

Los análisis filogenéticos para *Abatus* contemplaron a las especies *Brissopsis atlantica*, *Spatangus raschi* y *Paleopneustes cristatus* como outgroups, además de otras especies representantes de otros géneros de la familia *Schizasteridae* (*Amphipneustes*, *Brachistemaster* y *Tripylus*). Para la aproximación por MP se encontraron 10 árboles igualmente parsimoniosos, con un índice de consistencia de (IC) = 0.7075, índice de homoplasia (IH) = 0.2925, índice de retención (IR) = 0.5525 (Fig. 7). La topología del árbol muestra que el género *Abatus* no representa a un grupo monofilético, al incluir a las especies de otros géneros dentro de su filogenia. Sin embargo, se observa monofilia a nivel de la familia, lo que es corroborado por con un elevado valor de bootstrap (> 90%). En cuanto a las especies con las que se harán las comparaciones para la estimación de separación, se observa que ambas (*A. cavemosus* y *A. agassizii*) se encuentran dentro de un mismo grupo, aunque en parafilia con la especie *A. cordatus*.

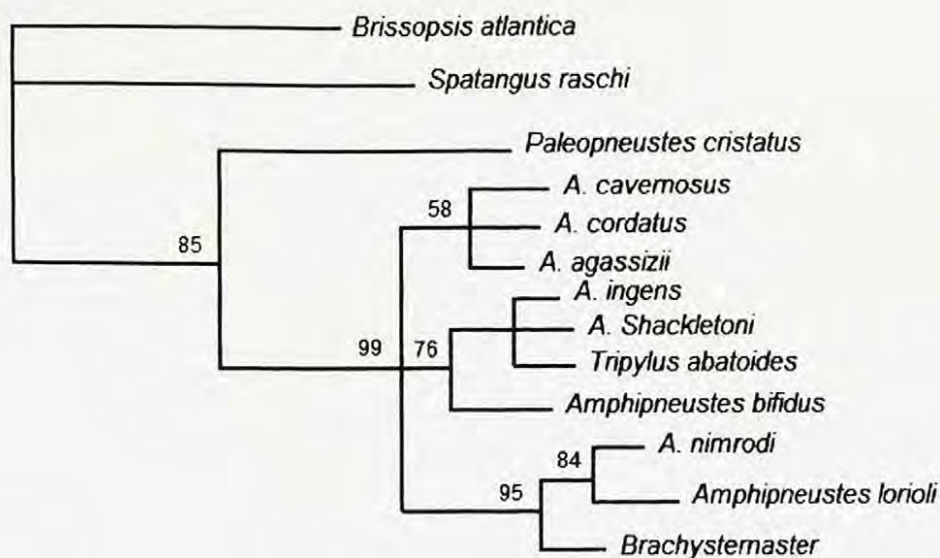


Figura 7: Árbol por MP que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados para el género *Abatus*. El valor sobre los nodos representa el valor de bootstrap para el análisis.

El resultado del Mrmodeltest indica que el modelo de sustitución nucleotídica que mejor explica los datos es GTR+G. El análisis Bayesiano generó una topología similar a la obtenida por MP, donde se puede observar la no monofilia del género, pero sí a nivel de familia con un elevado soporte. Por otra parte, este análisis permite definir la relación filogenética de *A. cordatus* con las especies de interés, revelando que ésta especie es hermana de la especie Antártica *A. agassizii* y que este clado se relaciona con la especie Subantártica *A. cavemosus* (Fig. 8). Para evaluar la existencia de tasas de evolución homogéneas entre las

amas se realizó LRT, cuyo resultado no fue significativo ( $LRT = 2 * (2414.0064 - 2407.9613) = 12.0903$ ,  $X^2_{(12, 0.05)} = 21.03$ ).

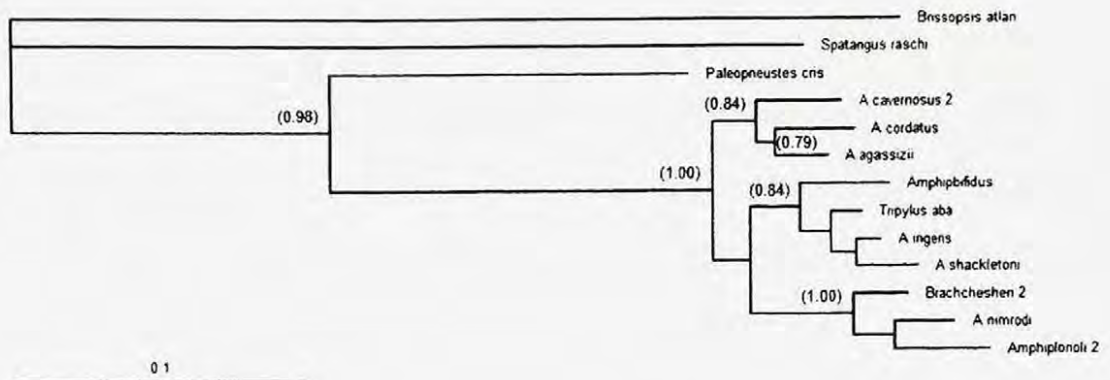


Figura 8: Análisis Bayesiano para COI de las especies del género *Abatus*.

## 6.2 Análisis de secuencias e Historia Demográfica

### 6.2.1 *Sterechinus*

Para los análisis de secuencia realizados a las especies de *Sterechinus*, se logró obtener una extensión total de 945 pb del gen COI (mtDNA). Estos análisis incluyen a las especies *S. neumayeri* (Antártica) y las especies subantárticas *S. agassizi* (Argentina) y *S. diadema* (Kerguelen, que es incluida posteriormente). Los índices de diversidad haplotípica muestran que estas especies presentan valores relativamente altos (mayores a 0,5), además de similares número de sitios polimórficos y de haplotipos. La corrección del número de sitios polimorficos (k), realizada por rarefacción señala un menor número esperado para la especie Antártica. Al comparar los índices de ambas zonas observamos que la especie Argentina presenta un mayor índice de diversidad, al igual que el número promedio de diferencias entre par de secuencias (Tabla 5).

El test de neutralidad indica que ambas especies pueden haber pasado por una fase de crecimiento poblacional ( $D < 0$ ). Sin embargo, al observar la mismatch construida para cada grupo (Antártico y subantártico), solamente la especie antártica muestra una señal de crecimiento demográfico reciente según el modelo de Rogers and Harpending (1992) (Fig. 9).

Tabla 5: Análisis de diversidad molecular para las especies *S. neumayeri* provenientes desde tres sitios de muestreo en Antártica, *S. agassizi* (Subantártica) y, para comparaciones entre ambas regiones, se incluyó a *S. diadema* (Subantártica).

<b>Índices de Diversidad Molecular</b>	<b><i>S. neumayeri</i> n= 69</b>	<b><i>S. agassizi</i> n= 40</b>	<b>Ant. + Subant n= 122 (<i>S. diadema</i>)</b>
Nº sitios polimórficos (S)	23	21	--
Nº haplotipos (K)	19	16	39
K Corregido por rarefacción	12,03 ± 1,75	16	--
Diversidad haplotípica (H)	0,517 ± 0,075	0,768 ± 0,061	--
Nº promedio de diferencias entre par de secuencias ( $\Pi$ )	0,833 ± 0,286	1,885 ± 0,660	56,766
$\Theta(\Pi)$	0,83	1.88	
$\Theta(K)$	8,32	9,39	
<b>Test de Neutralidad</b>			
Fu's F	-5.028 (P<0,02)	-4,186 (P<0,02)	--
Tajima's D	-2,556 (P<0,001)	-2,056 (P<0,05)	--

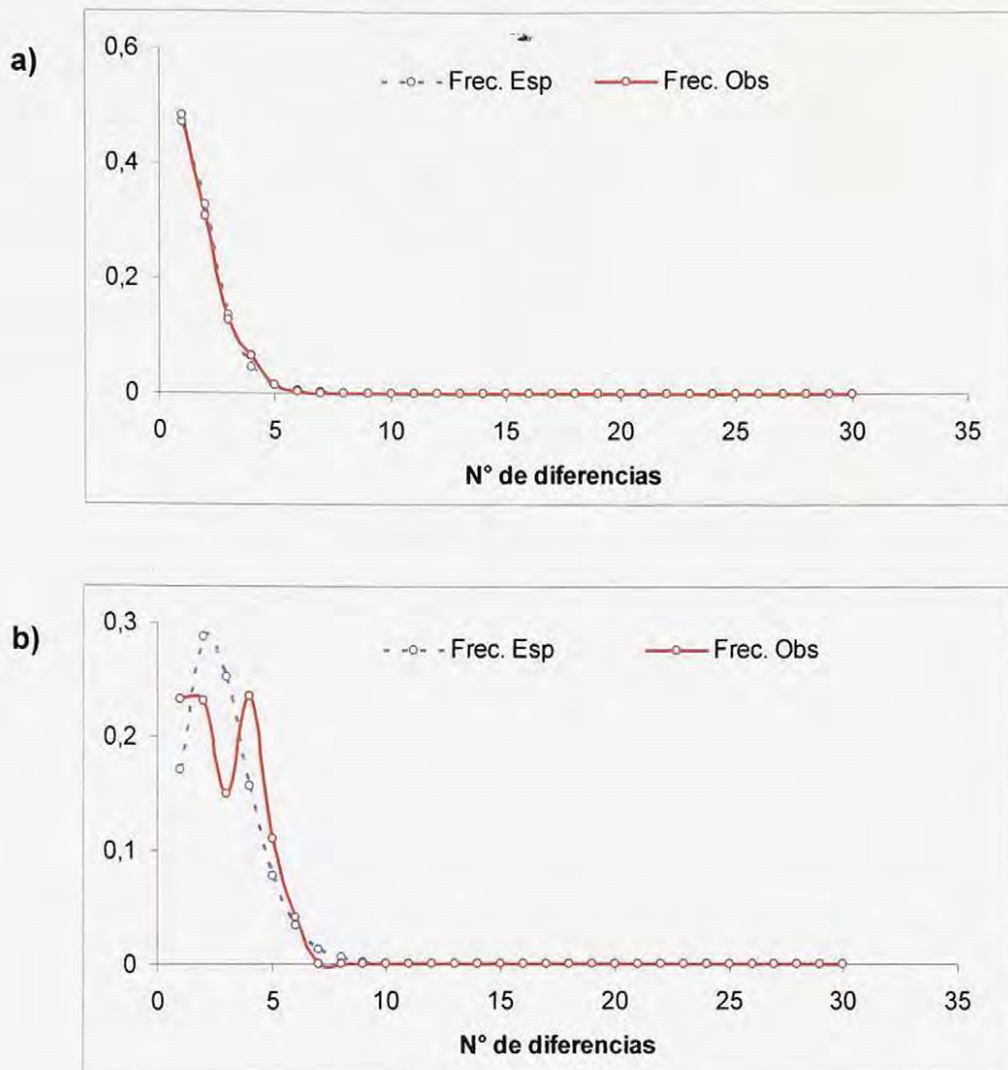


Figura 9: Distribución mismatch para las especies Antártica (a) *S. neumayeri* y Sudamericana (b) *S. agassizi*.

La red de haplotipos construida en primer lugar para las especies *S. neumayeri* y *S. agassizi*, muestra que existe una clara separación entre ambas regiones biogeográficas dada por un número de 56 diferencias fijadas o pasos mutacionales (Fig. 10).

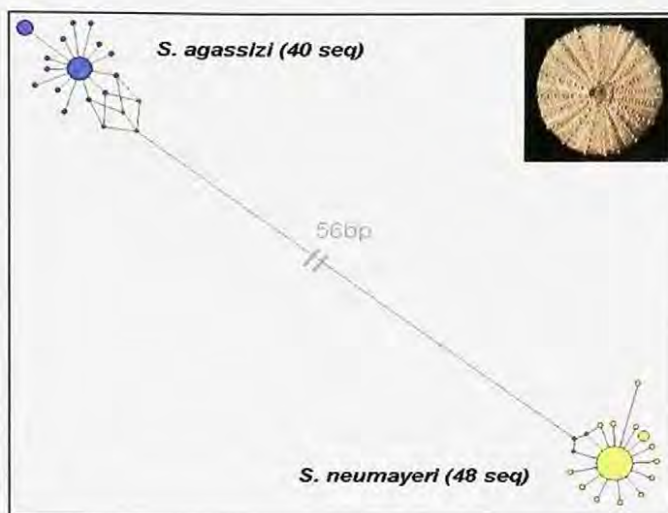


Figura 10: Red de haplotipos que muestra la separación entre las especies del género *Stereochinus* provenientes de Argentina (*S. agassizi*) y Antártica (*S. neumayeri*).

Se incluyó en esta red de haplotipos a la especie endémica de la Isla Kerguelen (*S. diadema*), además de otros individuos de *S. neumayeri* provenientes de la base Francesa en Terre Adélie (TA, ubicada en la región Este del continente Antártico), y de otros individuos provenientes de la parte Este de la Península antártica (PE-E, Mar de Weddell). Observamos el mismo escenario, con dos grupos bien diferenciados por la misma cantidad de pasos mutacionales. Uno que representa a la especie de distribución antártica y otro que agrupa a las especies subantárticas (Fig. 11), quienes comparten el haplotipo central o más frecuente.

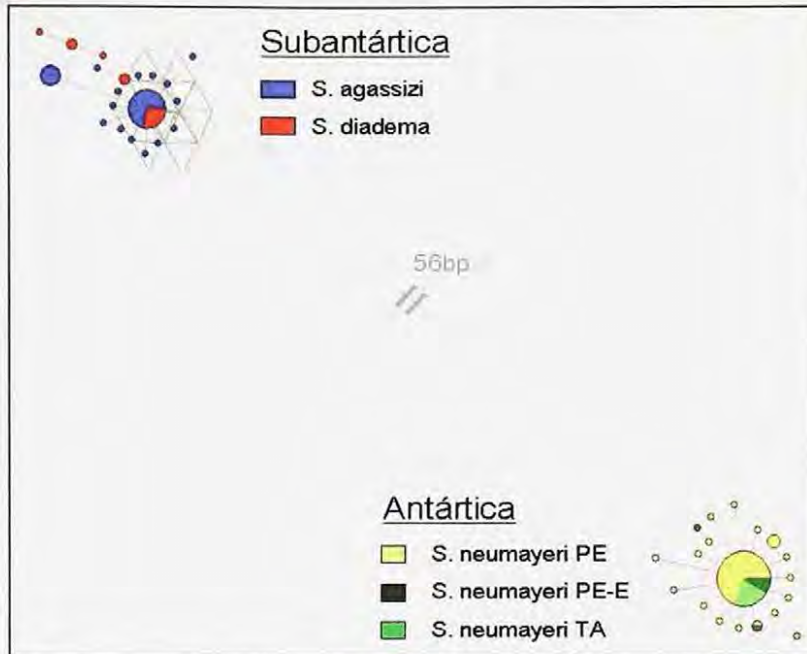


Figura 11: Red de haplotipos que muestra la separación existente entre las especies del género *Stereochinus* con distribución subantártica (*S. agassizi* y *S. diadema*) y antártica (*S. neumayeri* provenientes de tres sitios).

En base al número de diferencias entre par de secuencias (tau) y a la utilización de la hipótesis del reloj molecular, la estimación de las fechas en que pudo ocurrir el periodo de expansión para las especies de *Stereochinus*, señalan que tal proceso se ubica en el periodo pleistoceno. Para la especie *S. neumayeri* el periodo de tiempo estimado va desde los 35 mil años (ka) hasta los 28 ka aproximadamente.

### 6.2.2 *Abatus*

Para las especies de *Abatus* se logró amplificar un segmento de 799 pb del gen COI (mtDNA). Los análisis realizados muestran un bajo índice de diversidad haplotípica para la especie Antártica *A. agassizii* ( $< 0,5$ ), además del número de sitios polimórficos y haplotipos. Sin embargo, estos valores muestran un mejor escenario al ser comparados con la especie Argentina, ya que ésta especie presenta valor cero para la diversidad haplotípica y sitios polimórficos, debido a que sólo se encontró un haplotipo (Tabla 6). En cuanto a la señal de crecimiento que presentó *A. agassizii*, la mismatch muestra que esta señal es muy reciente, ya que el número acumulado de diferencias entre par de secuencias es cercano a cero (Fig. 12), escenario que se observa además en la red de haplotipos construida para las especies del género, donde se aprecia el bajo número obtenido para cada especie. (Fig. 13). Por otra parte, en esta representación gráfica es evidente la separación entre ambas regiones, determinada por un número promedio de 28 pasos mutacionales.

Tabla 6: Análisis de diversidad molecular para la especie *A. agassizi* proveniente de Antártica y *A. cavernosus* proveniente de Argentina (Subantártica).

Índices de Diversidad Molecular	Antártica (n= 27)	Subantártica (n= 27)	Ant + Subantártica (n= 54)
Nº sitios polimórficos (S)	4	0	--
Nº haplotipos (k)	5	1	6
Diversidad haplotípica (H)	0,279 ± 0,112	0,0	--
Nº promedio de diferencias entre par de secuencias ( <i>II</i> )	0,296	0,0	28,148
Fu's F	-3,024 (P<0,05)	--	--
Tajima's D	1,888 (P<0,05)	--	--

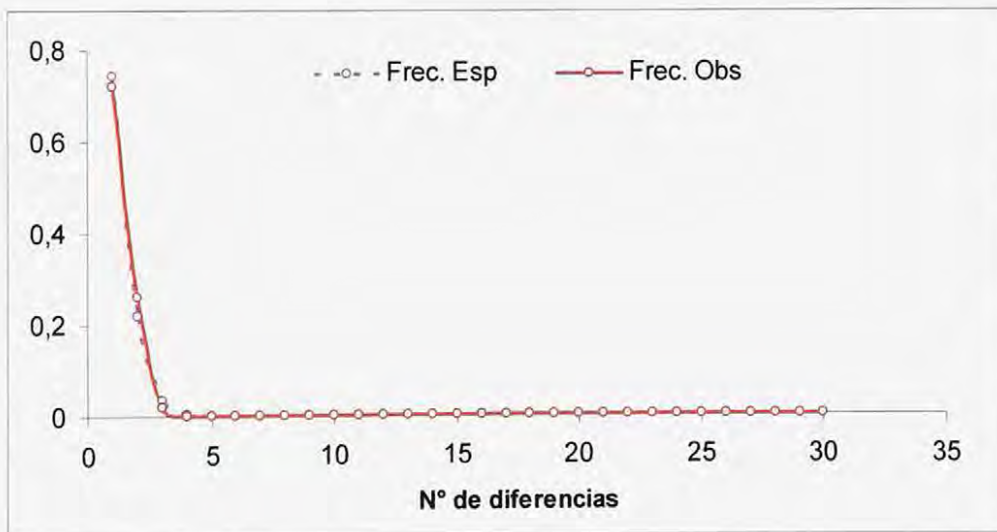


Figura 12: Mismatch para *A. agassizii* (Antártica), donde se puede observar una muy reciente señal de crecimiento poblacional.

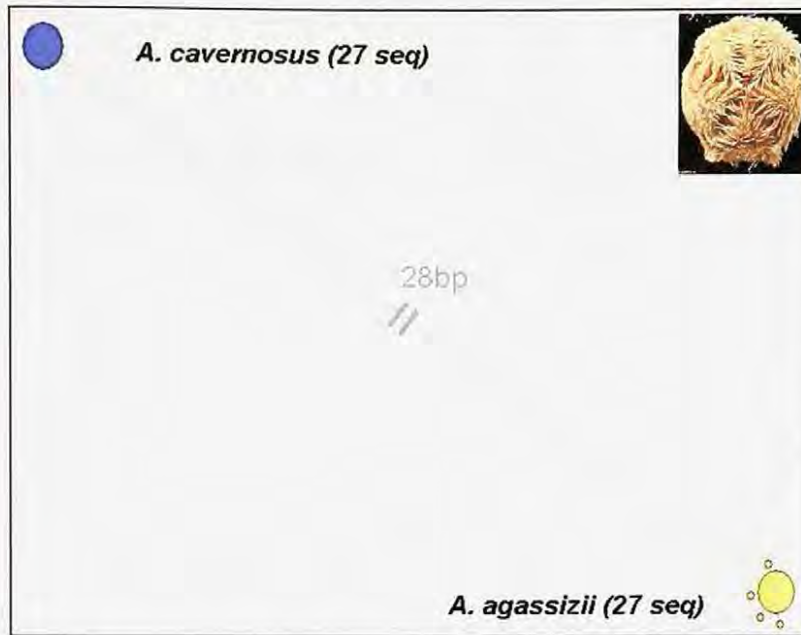


Figura 13: Red de haplotipos que muestra la separación entre la fauna antártica y subantártica para el género *Abatus*: *A. cavernosus* (Argentina) y *A. agassizii* (Antártica).

## 6.3 Separación de Faunas

### 6.3.1 *Sterechinus*

Como primera aproximación a la separación entre las especies de *Sterechinus*, la red de haplotipos indicó que ésta se encuentra establecida por 56 pasos mutacionales. Al utilizar esta información a través de la aproximación de coalescencia, junto con la tasa de mutación calibrada por Lee *et al.* (2004) se estimó que el tiempo de último contacto entre las especies congéneres se encuentra dentro del rango de 5.0 – 4.4 Ma, periodo que se encuentra entre

finales del Mioceno y comienzos del plioceno (Tabla 8). Este periodo estimado es muy posterior a la separación de los continentes y a la fecha señalada para la instalación de la corriente circumpolar, quien sería la barrera más efectiva para las especies con capacidad de dispersión.

### 6.3.2 *Abatus*

Para la estimar la separación entre las especies de *Abatus* se realizó una calibración de la tasa de mutación para este género. La calibración fue realizada a partir de la filogenia construida en el presente trabajo, junto con la filogenia planteada por Smith *et al.* (2006) en base a datos moleculares de distintas familias de equinodermos calibrada con registro fósil (Anexo 1). En base a la filogenia de Smith *et al.* (2006), se determinó el tiempo de separación entre las familias *Schizaseridae* y *Paleopneustidae*, la cual fue extrapolada a la filogenia construida para *Abatus* y posteriormente, se calculó el tiempo de separación para cada nodo hasta la separación entre las especies en estudio, lo que resultó en una tasa de 0.1 %.

Con la tasa de mutación calibrada se determinó que el periodo de separación entre las especies de *Abatus* es de aproximadamente 17 Ma. Periodo mucho mayor al tiempo estimado para las especies de *Sterechinus* y que además se sitúa a mediados del Mioceno, por lo que su separación puede estar más ligada a la separación física de los continentes (Tabla 7).

Tabla 7: Estimación de los tiempos de divergencia entre erizos de los géneros *Sterechinus* y *Abatus*.

<b>Género</b>	<b>Tasa de mutación (<math>\mu</math>)</b>	<b>Tiempo de divergencia</b>
<i>Abatus</i>	Based on Smith <i>et al.</i> 2006 (0,1 %)	17 Ma (Mioceno)
<i>Sterechinus</i>	Lee <i>et al.</i> 2004 (0,51 – 0,72 %)	5.0 – 4.4 Ma (Mio-plioceno)

## 7.- DISCUSIÓN

### 7.1 *Filogenia y taxonomía*

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas para ambos géneros validó las comparaciones realizadas en el presente estudio. En el caso del género *Sterechinus*, las especies en estudio (*S. neumayeri* y *S. agassizi*) se encontraron en los grupos que se diferenciaron mediante las técnicas utilizadas. Es decir, de las 5 especies clasificadas (en base a criterios morfológicos) sólo se diferenció *S. neumayeri*, mientras que el resto se encuentra en un grupo donde no se pudo establecer ninguna relación filogenética. Al respecto, los resultados obtenidos toman relevancia al presentar incongruencias con las clasificaciones taxonómicas establecidas. No obstante, son congruentes con el planteamiento de Mortensen (1936) y David *et al.* (2005), debido a que estos investigadores consideran que las especies *S. antarcticus*, *S. agassizi* y *S. diadema* están cercanamente relacionadas y sólo representan fenotipos locales de una especie. De la misma manera, el género *Abatus* mostró un escenario en el cual tampoco se muestran relaciones filogenéticas en acuerdo con la taxonomía actual, llegando a un caso más extremo con especies representantes de otros géneros insertas en la topología. Al respecto, existe evidencia que apoya la incerteza de los caracteres que son considerados diagnóstico para la clasificación de estas especies, como el trabajo de Céline Madon (1998), quien obtuvo resultados similares a los del

presente trabajo para sus reconstrucciones filogenéticas en base a caracteres morfológicos. A pesar de lo anterior, los resultados permitieron validar las comparaciones realizadas, ya las especies de interés: *A. cavemosus* y *A. agassizii*, son parte de un mismo clado y conforman grupos hermanos.

## **7.2 Estimación de los tiempos de divergencia**

El tiempo estimado del inicio de la divergencia entre especies congéneres de Antártica y Sudamérica revela que efectivamente procesos vicariantes promovieron esta separación, con importantes diferencias entre las fechas estimadas para cada género.

Las especies congéneres de *Abatus* presentaron un periodo de tiempo mucho mayor al estimado para *Sterechinus*, indicando una mayor relación con el momento de la separación física de los continentes, durante el Mioceno (aprox. 28 Ma). Debido a que el modo de desarrollo de estas especies no permite una conexión entre parches relativamente distantes unos de otros (Poulin and Féral 1994), la paulatina separación de los continentes provocó una discontinuidad del ya reducido flujo génico. Por lo tanto, de las tres barreras instaladas alrededor de Antártica, probablemente la más efectiva para la separación de las especies de *Abatus* fue la barrera geográfica, la cual se instaló paulatinamente y en conjunto con la deriva de los continentes. Por otra parte, la progresiva separación de los continentes fue rodeando a Antártica de profundidades cada vez mayores, entre

4000 y 6000 m (Knox 2006), lo que generó la formación de la barrera Batimétrica quien impide la conectividad entre parches de especies bentónicas relativamente cercanas (modelo de conectividad "Stepping Stones").

De acuerdo a las fechas estimadas, el inicio de la divergencia entre las especies del género *Sterechinus* se sitúa entre finales del Mioceno y principios del Plioceno. El periodo de último contacto estimado para *Sterechinus* indica que las poblaciones antárticas y subantárticas mantuvieron una conectividad muy posterior a la separación física de los continentes. La mantención de esta prolongada conectividad posterior a la separación de los continentes, puede ser facilitada por la presencia de una larva de alta capacidad de dispersión y prolongada vida en el plancton. Según lo anterior, la interrupción del flujo genético entre poblaciones de *Sterechinus* podría corresponder a la instalación de una barrera oceanográfica efectiva, probablemente ligada a una intensificación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA). De hecho, Crame (1999), plantea que, entre 6.2 – 4.8 Ma, junto con la disminución de las temperaturas, habría ocurrido un mayor y rápido desarrollo de la capa de hielo que cubre la region Oeste del continente antártico durante el Mioceno – Plioceno, como producto del cambio en la velocidad de la corriente circum-antártica (David et al 2005). En este sentido, Zachos *et al.* 2001 describen que posterior al peak del calentamiento ocurrido a los 15 Ma (óptimo climático), continua un congelamiento gradual y restablecimiento de una mayor capa de hielo en Antártica por 10 Ma, seguido de un enfriamiento adicional que generó una nueva expansión de la capa de hielo en

la parte oeste del continente, fenómeno que incluso se registró en el Ártico (Fig. 14) (Gersonde and Censarek 2006; Zachos *et al.* 2001). Junto con esta evidencia, a través de un particular ensamblaje de silicoflagelados indicador de estrés medioambiental, se plantea que durante este periodo (Mioceno/Plioceno) ocurrió una considerable inestabilidad de la capa de hielo en Antártica y por ende una importante variabilidad oceánica. Posterior a este periodo (comienzo del Plioceno ~ 4.8 Ma) y gracias al registro de secuencias sedimentarias, se determinó un cese en el depósito de turbiditas, que es indicador de condiciones paleogeográficas, tectónicas y deposicionales, que refleja un desarrollo estable de la capa de hielo en la parte Oeste del continente (Kennett and Barker 1990), lo que evidencia la importancia de este periodo y respalda además nuestros resultados.

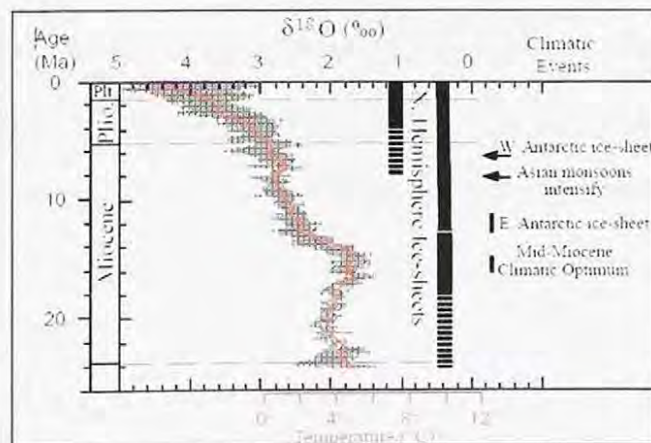


Figura 14: Tiempos geológicos (Extracto de Zachos *et al.* 2001)

En cuanto a la evidencia biológica adicional, Page and Linse (2002) estimaron un tiempo de separación similar al señalado para *Stereochinus*, en especies de gastrópodos del género *Limatula* (*L. ovalis* y *L. pygmaea*) en aproximadamente 5.8 – 8 Ma con el gen 16S. Por otra parte, González (tesis en revisión) también revelan un periodo similar para la divergencia entre especies del género *Nacella* provenientes de Antártica (*N. concina*) y la región de Magallanes en el extremo sur de Sudamérica (*N. magellanica*, *N. deurata* y *N. mytilina*) de aproximadamente 7 Ma. Esto evidencia un proceso de especiación más reciente y muy posterior a la formación del frente polar antártico (FPA). Aunque la fecha exacta para la instalación de la CCA es tema de debate científico, por consenso se estima en aprox. 28 Ma, aunque autores como Barker and Thomas (2004) plantean un tiempo de 34 Ma. Nuestra estimación puede ser señal de una aceleración en la velocidad de la corriente o una intensificación de las bajas temperaturas del continente al estar dentro de un anillo de aguas frías que no permite el traspaso de calor norte-sur. Además la posibilidad de un eventual debilitamiento de la corriente circumpolar, cerca de su profundidad media, donde la fricción es mínima y por lo tanto el movimiento del agua dado por Eckman se ve también reducido (Knox 2006), puede tener implicancia en los tiempos establecidos.

Los trabajos publicados por Thatje y Fuentes (2003) y Tavares y De Melo (2004), plantean un re-establecimiento de contacto entre las faunas antárticas y sudamericanas, mediante un debilitamiento de la corriente al reportar la presencia

de larvas zoea de decápodos e individuos adultos del cangrejo araña *Hyas aranaeus*, grupo históricamente ausente dentro de los límites de la convergencia antártica, en la Península antártica. Las tres hipótesis que se han propuestas para explicar este acontecimiento hacen referencia a: (1) un aumento del tráfico marítimo entre Sudamérica y Antártica que generan el turismo y las actividades científicas y/o, el incremento exponencial de la cantidad de desechos flotantes capaces de transportar invertebrados marinos; (2) el debilitamiento de la corriente debido fenómeno de cambio climático global, en relación al aumento de las emisiones de gases invernaderos. La tercera hipótesis (3) considera potenciales variaciones naturales en la intensidad de la Corriente Circum Antártica asociadas a la alternancia de los periodos glaciales e interglaciales del pleistoceno. Nuestros resultados rechazan tajantemente esta última hipótesis. Claramente la separación entre la fauna marina bentónica de Antártica y Sudamérica se inicio hace varios millones de años atrás, previo al inicio de los ciclos glaciales-interglaciales. Finalmente, podemos afirmar que la introgresion de fauna subantártica a la Península Antártica, recientemente detectada, corresponde a un fenómeno excepcional en la historia de la región y esta ligada a las actividades humanas.

### **7.3 Conectividad en el Océano Austral**

La gran capacidad dispersiva de las especies de *Sterechinus*, ayuda a explicar la elevada conectividad entre poblaciones de *S. neumayeri* entre la

Península antártica y el sector este del continente (muestra proveniente de Terre Adélie). De acuerdo a las características oceanográficas del mar del sur, esta conectividad podría estar facilitada por la existencia de la corriente East Wind Drift que bordea al continente y es de sentido antihorario (Fig. 15). De la misma manera, la ausencia de diferencia genética entre Argentina y el Archipiélago Kerguelen, (aunque descritas como dos especies distintas, *S. agassizi* y *S. diadema*) podría reflejar la existencia de contactos actuales o recientes favorecidos por la corriente circumpolar (CCA ó West Wind Drift) (Tomczak and Godfrey 1994). En este sentido Moyano (1999) plantea una amplia conectividad del ecosistema subantártico, destacando a la región Magallánica como una zona zoogeográficamente unida a la región circum-austral subantártica a través de la West Wind Drift.

Marsh *et al.* (2001) demuestran que las larvas de *S. neumayeri* poseen un metabolismo extremadamente lento, lo que puede traducirse a una permanencia de hasta un año en el plancton (Manahan, comunicación personal). Este planteamiento es corroborado por los datos (no publicados) de la Dra. Theresinha Monteiro, quien logró mantener con vida a larvas de esta misma especie, por un periodo de 8 meses sin que hayan comenzado el proceso de metamorfosis (Elbers *et al.* 2004). En este sentido, otra evidencia apoya la existencia de especies que presentan larvas con una prolongada vida en la columna de agua. un ejemplo es el reciente trabajo de Strathmann & Strathmann (2007), donde determinan un tiempo de vida larval para el molusco gastrópodo *Fusitriton*

*oregonensis* entre 4.5 a 4.6 años, bajo condiciones de laboratorio. Estos datos sugieren entonces que las corrientes marinas podrían transportar a este tipo de larvas por distancias transoceánicas. Tomando en consideración que en el sector del paso de Drake la velocidad de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), es de aproximadamente de  $40 \text{ cm s}^{-1}$  (Hoffman 1985), Extrapolando esta velocidad a un año de vida larval, obtenemos una distancia de dispersión superior a 12.000 Km, indicando claramente que las especies con capacidad dispersiva podrían intercambiar individuos a escala del Océano Austral.

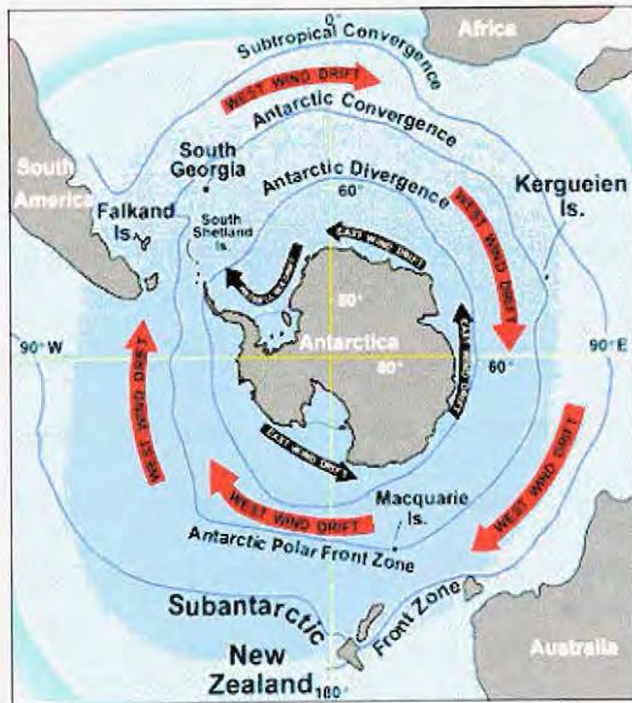


Figura 15: Esquema que muestra a las corrientes que conforman el mar del sur y frente polar (imagen extraída de [http://www.logicalsience.com/skeptics/Claude Allegre.html](http://www.logicalsience.com/skeptics/Claude_Allegre.html))

Según la información entregada en el presente trabajo, las especies del género *Sterechinus* conforman dos grupos genéticamente muy diferenciados: uno antártico y el otro subantártico. Además se puede observar una homogeneidad dentro de cada uno de estos grupos, lo que sugiere una gran conectividad dentro de cada zona. Proponemos entonces un modelo de anillos antárticos y subantárticos incluyendo dos grandes vías de dispersión que corresponderían a (1) la Corriente Circumpolar Antártica (West Wind Drift) que tiene una circulación en sentido horario y conectaría las zonas subantárticas y (2) la Corriente Costera Antártica (East Wind Drift) que bordea el margen del continente y que tiene un sentido antihorario, manteniendo la conectividad alrededor de la Antártica (figura 15).

#### **7.4 Diversidad genética intra-específica e historia demográfica**

En general, podemos observar una baja diversidad genética de las especies estudiadas, es decir que cada una de ellas se caracteriza por bajos tamaños efectivos. La especie *S. neumayeri* (Antártica) presenta menor diversidad que su contraparte sudamericana *S. agassizi*. Sin embargo, ambas especies han sido descritas como muy abundantes, en particular en el caso de *S. neumayeri*, especie de mayor biomasa en el submareal somero, además de presentar una gran conectividad alrededor del continente antártico, según lo indicado por nuestros resultados. Por lo que podríamos estar en presencia de una sola

población poco estructurada. En este contexto, observamos una considerable diferencia entre los tamaños efectivos estimados para *S. neumayeri* (entre 70.000 y 700.000 hembras a partir de los valores de  $\theta_{\pi}$  y  $\theta_K$ ) y los tamaños reales. Diferencias de varios órdenes de magnitud entre estas estimaciones reflejan generalmente variaciones drásticas y recientes (en una escala de tiempo del tiempo mutacional, aquí del orden de 150.000 años).

El periodo de tiempo para la última expansión demográfica de la especie Antártica (*S. neumayeri*), según un modelo simple de crecimiento instantáneo, se ubicaría entre 22 a 35.000 años atrás, lo que, considerando las imprecisiones ligada al tiempo mutacional, podría relacionarse con la última glaciación. Es también probable que estos bajos tamaños efectivos sean reflejo de reiterados fenómenos de cuellos de botella seguidos por una fase de expansión poblacional, relacionado con todos los periodos glaciales del Pleistoceno (Anexo 2). Con respecto a la especie subantártica (*S. agassizi*), en términos de diversidad haplotípica, esta especie presentó valores relativamente mayores que sugieren que la zona en la cual habita podría haber sido un sistema más estable, en cuanto a los efectos del último periodo glacial.

En el caso de *Abatus*, debido a que los índices de diversidad son extremadamente bajos, no fue posible determinar intervalos de tiempos que nos ayuden a inferir los efectos de las glaciaciones Pleistocénicas. El caso más extremo, la especie que habita la plataforma continental argentina *A. cavemosus* (1 solo haplotipo), pudo deberse a la distribución espacial de las poblaciones de

estas especies, que se caracteriza por presentar pequeños parches aislados (Poulin and Féral 1995), y a que la ausencia de fase larval en este género se asocia a una ausencia de conectividad entre ellos, lo que se traduce a una fuerte estructuración genética a muy pequeña escala (Poulin and Féral 1994). Por lo tanto, es probable que nuestros resultados reflejen la situación de un solo parche.

## 8.- CONCLUSIONES

Las estimaciones de las relaciones filogenéticas para cada género permitieron la veracidad de las comparaciones realizadas en el presente trabajo. No obstante incitan a una mejor exploración de los caracteres diagnósticos que han sido utilizados para la clasificación taxonómica de los grupos en estudio, para lo cual reconstrucciones filogenéticas a partir de genes mitocondriales y nucleares pueden ser de gran ayuda.

De acuerdo a los resultados del presente trabajo, las diferencias en los tiempos de separación estimados están principalmente determinadas por el modo de desarrollo que distinguen a las especies estudiadas. Se comprueba que las especies que poseen estado larval de libre dispersión, presentaron menores tiempos de separación, por lo cual este tipo de desarrollo permitió el intercambio de individuos y probablemente la mantención de una sola especie (o incluso una sola población), por un tiempo muy posterior a la separación de los continentes (aprox. 5 Ma). Un escenario contrario, aunque en acuerdo con las expectativas de este trabajo es el que mostró el género *Abatus*, indicando que la ausencia de estado larval limita sus rangos de dispersión, por lo que podemos determinar que el modo de desarrollo afecta de manera directa en los tiempos de divergencia estimados. En este sentido, debido a que la dispersión es el modo de desarrollo mas conspicuo en ambas regiones (Antártica y Sudamérica), nuestros resultados

pueden ser extrapolables y por tanto ayudar a describir la historia evolutiva de la fauna antártica, para lo cual es necesario ampliar este tipo de estudios a otros grupos de especies que estén presentes en dichas regiones.

A pesar de la considerable extensión que tuvo el intercambio de individuos del género *Sterechinus*, posterior a la divergencia de los continentes, no se observan reestablecimientos de dicho contacto una vez ocurrida la separación o divergencia de las especies, por lo que se descartan posibles intercambios de individuos entre ambas regiones durante el periodo pleistoceno (1,8 Ma – actual). Indicando que la amplia cobertura que tuvieron los hielos durante los periodos glaciales, junto con una probable homogenización de las temperaturas del mar, no fueron sucesos suficientemente fuertes o relevantes como para crear un puente viable para el intercambio de especies. Por lo que la intensificación de la barrera oceanográfica, ocurrida hace aproximadamente 5 Ma, conformo un cierre definitivo entre ambas regiones.

Junto con la marcada separación entre las especies presentes en ambos continentes, los resultados mostraron una considerable conexión dentro de cada zona biogeográfica: Antártica y Subantártica. Para tal efecto se plantea la existencia de anillos de conectividad biológica dentro de cada zona, impulsados por las corrientes “East Wind Drive” que bordea al continente antártico y une a las distintas poblaciones de *S. neumayeri* y la corriente “West Wind Drive” o Corriente Circumpolar Antártica (CCA), que une a las especies que habitan la costa de Argentina y la Isla Kerguelen.

En general ambos géneros se caracterizaron por presentar una baja diversidad genética. En el caso de *Abatus*, esta situación podría ser resultado de la distribución en pequeñas poblaciones aisladas que caracteriza al género, mientras que *Sterechinus* refleja las consecuencias de variaciones demográficas asociadas a los ciclos glaciales.

Finalmente, es posible concluir que el inicio de la divergencia entre la fauna marina bentónica de Antártica y Sudamérica, representada por especies congéneres de Equinodermos, ocurrió en distintos tiempos de acuerdo al modo de desarrollo (Planctotrofia *versus* incubación) de las especies en cuestión.

## 9.- BIBLIOGRAFIA

- Aljanabi S.M. and I. Martínez. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25: 4692-4693
- Aronson R. B. and D. B. Blake (2001) Global climate change and the Origin of modern Benthic Communities in Antarctica. *American Zoology* 41: 27 – 39.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol* 16:37-48
- Barker P.B. and J. Burrell (2004) The influence upon southern ocean circulation, sedimentation, and climate of the opening of drake passage. In: C. Craddock (ed.) *Antarctic Geosciences*. University of Wisconsin Press, Madison: 377 – 385.
- Brey, T, C. Dahm, M. Gorfny, M. Klages, M. Stiller and W. E. Arntz (1996) Do antarctic benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarct. Sci.* 8: 3-6.
- Clarke A. and N. M. Johnston (2003) Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography Marine Biology* 41: 47 – 114.
- Clarke A., R. B. Aronson, J. A. Crame, J-M. Gili and D.B. Blake (2004) Evolution and diversity of the benthic fauna of the Southern ocean continental shelf. *Antarctic Science* 16: 559 – 568.
- Clarke A., D. K. A. Barnes and D. A. Hodgson (2005) How isolated is Antarctica? *TREE* 1: 1-3.

- Ciesielkin, P. F., M. T. Ledbetter and B. B. Ellwood (1982) The development of Antarctic glaciation and the Neogene paleoenvironment of the Maurice Edwig Bank, Mar. Geol. 46: 1-51.
- Crame J. A. (1999) An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost south America and Antarctica. *Scientia Marina* 1: 1 – 14.
- DeConto R. M. and D. Pollard (2003) Rapid cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO<sub>2</sub>. *Nature* 16: 245 – 249.
- David B., T. Chone, R. Mooi and C. De Ridder (2005) Antarctic Echinoidea. *Theses Zoologicae* volume 35.
- Elbers, K. L., T. M. Absher, Y. Kern, and M. G. Vianna (2004) Reprodução e desenvolvimento larval de *Sterechinus neumayeri* da Baía do Almirantado, Ilha Rei George, Antártica. In: Congresso Brasileiro de Oceanografia 2004 (CBO 2004) e XVI Semana Nacional de Oceanografia (XVI SNO), 2004, Itajaí. Livro de Resumos do Congresso Brasileiro de Oceanografia 2004 (CBO 2004). 14-14.
- Felsenstein, J., (1981) Related articles, links evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17, 368-376.
- Filatov D.A., (2002) PROSEQ: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, 2: 621-624.
- Geise, A.C., Pearse, J.S., and V.B. Pearse (1991) *Reproduction of Marine Invertebrates: Volume VI Echinoderms and Lophophorates*. The Boxwood Press: Pacific Grove, CA.

- Gersonde R. and B. Censarek (2006) Middle-Late Miocene southern ocean climate development and its implication on Antarctic ice sheet development – diatom evidence from atlantic sector ODP sites. Geophysical Research Abstract 8.
- González C. (2008). Reconstrucción de la historia evolutiva y demográfica del género *Nacella* (PATELLOGASTROPODA; NACELLIDAE), a lo largo de su distribución en las regiones Antártica y Subantártica. Tesis Doctoral en curso.
- Grobe, H. and A. Mackensen (1992) Late quaternary climatic cycles as recorded in sediments from the Antarctic continental margin. *Antarct. Res. Ser.* 56: 349-376.
- Hammer O., D.A.T. Harper and P.D. Ryan (2008) PAST - PAleontological STatistics, ver. 1.81.
- Hofmann E.E. (1985) The large-scale horizontal structure of the Antarctic Circumpolar Current from FGGE drifters. *J. Geophys. Res.* 90: 7080-7097.
- Huelsenbeck, J.P. and F. Ronquist (2003) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. Version 3.0B4. Computer program distributed by the authors.
- Kennett, J. P. and B. F. Barker (1990) Latest Cretaceous to Cenozoic climate and oceanographic developments in the Weddel Sea, Antarctica: an ocean-drilling perspective. *Proc. ODLP Sci. Res.* 113: 937-960.
- Knox G.A. (2006) *Biology of the Southern Ocean*. CRC Press, 2ª edición. Universidad de Canterbury New Zealand, 624 pp.

- Lawver L. A., L. Cahagan and M. Coffin (1992) The development of paleoseaways around Antarctica. *Antarct. Res. Ser.* 56: 7 – 30.
- Lee Y., M. Song, S. Lee, R. Leon, S. Godoy and I. Canete (2004) Molecular phylogeny and divergence time of the Antarctic sea urchin (*Sterechinus neumayeri*) in relation to the south American sea urchins. *Antarctic Science* 1: 29 – 36.
- Lessios H. A., B. D. Kessing and J. S. Pearse (2001) Population structure and speciation in tropical seas: Global phylogeography of the sea urchin diadema. *Evolution* 5: 955 – 975.
- Mackensen A., E. Barrera and H. W. Hubberten (1992) Neogene circulation in the Southern Indian Ocean: evidence from benthic foraminifers, carbonate data, and stable isotope analices (site 751). *Proceedings of the Ocean Drilling Program, Scientific Results* 120: 867 – 878.
- Madon S.C. (1998) Disparité morphologique et architecturale des Schizasteridae incubants (Echinoidea, Spatangoida) des régions australes = Morphological and architectural disparity of brooding Schizasterids (Echinoidea, Spatangoida) from south polar regions. These nouveau doctorat, Université de Dijon, Dijon, France.
- Marsh A.G., R.E. Maxson and D.T. Manahan (2001) High macromolecular synthesis with low metabolic cost in antarctic sea urchin embryos. *Science* 291: 1950 – 1952.

- McCartney M.A., G. Keller and H.A. Lessios (2000). Dispersal barriers in tropical oceans and speciation in Atlantic and eastern Pacific sea urchin of the genus *Echinometra*. *Molecular Ecology* 9: 1391 – 1400.
- Mortensen T.H. (1936) Echinoidea and Ophiuroidea. *Discovery Reports* 12: 199 – 348.
- Moyano H.I. (1999) Magellan bryozoa: a review of the diversity and of the subantarctic and Antarctic zoogeographical links. *Scientia Marina* 63: 219 – 226.
- Nei, M., and S. Kumar (2000) *Molecular evolution and phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford.
- Nylander, J. (2004) MrModeltest v. 2.2b. Department of Systematic Zoology. Uppsala University, Sweden.
- Page T. J. and K. Linse (2002) More evidence of speciation and dispersal across the Antarctic polar front through molecular systematics of Southern ocean *Limatula* (Bivalvia: Limidae). *Polar Biology* 25: 818 – 826.
- Palumbi S. R., G. Grabowsky, T. Duda, L. Séller and N. Tachino 1997. Speciation and population genetic structure in tropical pacific sea Urchins. *Evolution* 5: 1506 – 1517.
- Pfuhl H. A. and I. N. McCave (2005) Evidence for late Oligocene establishment of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth and Planetary Science Letters* 235: 715–728.
- Poulin E. and J.-P. Féral (1994) The fiction and the facts of Antarctic brood protecting: population genetics and evolution of schizasterid echinoids. In

Echinoderms through time (David, Guille, - Féral & Roux eds.) pp. 837-843, Balkema, Rotterdam.

Poulin, E. and J.P. Féral (1995) Pattern of spatial distribution of a brood-protecting schizasterid echinoid, *Abatus cordatus*, endemic to the Kerguelen Islands. *Marine Ecology Progress Series* 118: 179-186.

Poulin E. and J-P Féral (1996) Why are there so many species of brooding Antarctic Echinoids? *Evolution* 50: 820 – 830.

Poulin, E., S. v. Boletzky and J.P. Féral (2001) Combined ecological factors permit classification of developmental patterns in benthic marine invertebrates: a discussion note. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 257: 109-115.

Poulin E., A. T. Palma and J-P. Féral (2002) Evolutionary versus ecological success in Antarctic benthic invertebrates. *TREE* 5: 218 - 222.

Rogers AR and Harpending HC (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9:552-569.

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

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

Schatt P. and J.-P. Féral (1996) Complete direct development of *Abatus cordatus*, a brooding schizasterid (Echinodermata: Echinoidea) from

- Kerguelen, with description of 'perigastrulation', a hypothetical new mode of gastrulation. *Biol. Bull. (Woods Hole)*, 190: 24-44.
- Schneider S, D Roessli and L Excoffier (2000) ARLEQUIN, Version 2000: a software for population genetics data analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Smith A.B., D. Pisani, J.A. Mackenzie-Dodds, B. Stockley, B.L. Webster and T.J. Littlewood (2006) Testing the molecular clock: Molecular and paleontological estimates of divergence times in the Echinoidea (Echinodermata). *Molecular Biology and Evolution* 23: 1832 – 1851.
- Stockley B., A.B. Smith, T. Littlewood, H.A. Lessios and J.A. Mackenzie-Dodds (2005) Phylogenetic relationships of spatangoid sea urchins (Echinoides): taxon sampling density and congruence between morphological and molecular estimates. *Zoologica Scripta* 34: 447 – 468.
- Strathmann M.F. and R.R. Strathmann (2007) An extraordinarily long larval duration of 4.5 years from hatching to metamorphosis for teleplanic veligers of *Fusitriton oregonensis*. *Biol. Bull.* 213: 152 – 159.
- Swofford DL. (1999) PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tavares, M. and De Melo G. A. S. (2004) Discovery of the first known benthic invasive species in the Southern Ocean: the North Atlantic spider crab *Hyas araneus* found in the Antarctic Peninsula. *Antarct. Sci.* 16, 129–131.
- Thatje, S. and V. Fuentes (2003) First record of anomuran and brachyuran larvae (Crustacea: Decapoda) from Antarctic waters. *Polar Biol.* 26, 279–282

- Thatje, S. and Arntz, W.E. (2004) Antarctic reptant decapods: more than a myth? *Polar Biol.* 27, 195–201
- Thatje S., K. Anger, J. A. Calcagno, G. A. Lovrich, H-O Portner and W. E. Arntz (2005) Challenging the cold: crabs reconquer the Antarctic. *Ecology* 86: 619 – 625.
- Thatje, S. (2005) The future fate of the Antarctic marine biota. *TREE* 8: 418-419.
- Thompson JD, TJ Gibson, F Plewniak, F Jeanmougin and DG Higgins (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 24: 4876-4882.
- Thompson M. R. A. (2004) Geological and palaeoenvironmental history of the Scotia Sea region as a basis for biological interpretation. *Deep-Sea Research II* 51: 1467–1487.
- Tomczak M. and J. S. Godfrey (1994) *Regional oceanography: An introduction*. Primera Edición, Printed and bound in Great Britain by Butler & Tanner Ltd. Frome and London . 383 pg.
- Valdovinos C. and M. Ruth (2005) *Lapas Nacellidae del extremo sur de Sudamérica: taxonomía y distribución*. *Rev. chil. hist. nat.*,78: 497-517.
- Xia X. and Xie Z. (2001) DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Heredity* 92: 371 – 373.
- Zachos J., B. N. Opdyke, T. M. Quinn, C. E. Jones and A. N. Halliday (1999) Early cenozoic glaciation, Antarctic weathering, and seawater  $^{87}\text{Sr}/^{86}\text{Sr}$ : is there a link? *Chemical Geology* 161: 165 – 180.

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