



UNIVERSIDAD DE MAGALLANES

Facultad de Ciencias

PROGRAMA DE MAGÍSTER EN CIENCIAS

**FILOGEOGRAFIA Y DIVERGENCIA MOLECULAR DEL GÉNERO HARPAGIFER
(RICHARDSON, 1844) (PERCIFORMES: NOTOTHENIOIDEI) DE ANTÁRTICA Y
PATAGONIA**

Mathias Eduardo Hüne Bustamante

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES
BIBLIOTECA CENTRAL
M 5493 INVENTARIO

PUNTA ARENAS, 2013

Director de Tesis: Dr. Andrés Mansilla.

Codirector: Dr. Elie Poulin.

21/08/2013
Donación

UNIVERSIDAD DE MAGALLANES
Facultad de Ciencias
Programa de Magíster en Ciencias

FILOGEOGRAFIA Y DIVERGENCIA MOLECULAR DEL GÉNERO HARPAGIFER (RICHARDSON,
1844) (PERCIFORMES: NOTOTHENIOIDEI) DE ANTÁRTICA Y PATAGONIA

Mathias Eduardo Hüne Bustamante



Tesis presentada a la Facultad de Ciencias
para la obtención del grado de Magíster en Ciencias
Mención Manejo y Conservación de Recursos Naturales de Ambientes Subantárticos

Punta Arenas - 2013

21/08/2013
Donación

AGRADECIMIENTOS

La Tesis fue realizada mediante al apoyo económico y logístico otorgado por el Instituto Antártico Chileno (INACH), código M_10-11. Además del apoyo brindado por la beca de Magíster del Programa de Financiamiento BASAL código PFB-23-2008, otorgado por el Instituto de Ecologías y Biodiversidad (IEB). Se agradece a los doctores Daniel A. Fernández de CADIC-CONICET y Esteban Barrera-Oro del Instituto Antártico Argentino por facilitar ejemplares de *Harpagifer antarcticus* para su análisis genético. Por último, se agradece al Laboratorio Antártico "Jorge Berguño Barnes" de INACH por facilitar sus instalaciones para el análisis de las muestras y a los Laboratorios de Macroalgas Antárticas y Subantárticas (LMAS) de la Universidad de Magallanes y Laboratorio de Ecología Molecular (LEM) de la Universidad de Chile.

INDICE DE MATERIAS

1. Resumen	ix
Abstract	xi
2. Introducción	1
3. Hipótesis	11
4. Objetivos	13
5. Materiales y Método	14
6. Resultados	24
7. Discusión	41
8. Conclusiones	48
9. Referencias	52

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	2
Paleoreconstrucción de las temperaturas del Océano Austral durante los últimos 70 Ma, (modificado de Zachos <i>et al.</i> , 2001).	
Figura 2	8
Distribución de las especies del género <i>Harpagifer</i> .	
Figura 3	15
Localidades de muestreo para la especie <i>Harpagifer bispinis</i> a lo largo de la costa del extremo sur de Chile y para la especie <i>H. antarcticus</i> en la isla Rey Jorge, Shetland de Sur, Antártica. Los números indican los sitios de muestreo para ambas especies.	
Figura 4	25
Filograma de Máxima verosimilitud y Inferencia Bayesiana estimada en el suborden Notothenioidei. Los valores de soporte cercanos a los nodos corresponden al valor de <i>bootstrap</i> (basado en 1000 replicas), mediante RaxML y GARLI-PART, y la probabilidad posterior bayesiana mediante BEAST.	
Figura 5	25
Relaciones filogenéticas dentro de Nototheniidae. Sobre las ramas se indica el valor medio de la tasa de sustitución estimada para cada segmento, mientras que gradiente de color de las ramas indica las tasa de sustitución.	
Figura 6	26
Relaciones filogenéticos en el suborden Notothenioidei que muestran las estimaciones de los tiempos de divergencia (A). Las barras azules indican los intervalos de confianza de las estimaciones de los tiempos de divergencia. Las ramas verdes indican el origen del clado Antártico. El recuadro (B) exhibe la distribución posterior para los tiempos de divergencia de: el suborden Notothenioidei (color plomo), el clado Antártico (azul), la separación entre Artedidraconidae y Harpagiferidae (verde), la divergencia de	

Channichthyidae (rojo) y Harpagiferidae (naranja). A nivel de las ramas se indica la probabilidad posterior.

Figura 7 **27**

Curvas de rarefacción del número de haplotipos (K) para *H. bispinis* y *H. antarcticus*. La barra indica los sub-muestreos para 54 individuos.

Figura 8 **28**

Curvas de rarefacción del número de haplotipos (K) para las localidades de muestreo en *H. bispinis*. La barra indica los sub-muestreos para 11 individuos.

Figura 9 **29**

Curvas de rarefacción del número de haplotipos (K) para las localidades de muestreo en *H. antarcticus*. La barra indica los sub-muestreos para 6 individuos.

Figura 10 **31**

Genealogía de los haplotipos, basada en la región control (DNAmt) y que muestra la separación existente entre las especies *H. bispinis* y *H. antarcticus*. Los haplotipos se representan por un círculo cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia y los colores indican las diferentes localidades de muestreo.

Figura 11 **34**

Los mapas muestran las probabilidades posteriores de los individuos pertenecientes a las agrupaciones y las localidades de discontinuidad genética para la inferencia de los 3 grupos (K = 3) en *H. bispinis*: A, Canal San Blas (2) y Isla Bavenstock (4); B, Fiordo Penguín (1), Islas Carlos III (5), Isla Cap. Aracena (6), Fiordo Pia (7) y Puerto Williams (8); C, Puerto Bories (3), determinados por GENELAND. Los colores blancos indican una alta probabilidad posterior y los rojos una baja probabilidad de pertenencia a un grupo.

Figura 12 **35**

Grafico que indica la varianza entre grupos para las diferentes particiones generadas por SAMOVA en *H. bispinis*.

Figura 13 **35**

Grafico que ilustra la relación entre la diferenciación genética por pares (F_{st}) y la distancia geográfica en las localidades de muestreo de *H. bispinis*. Indicando el coeficiente de correlación (r) y la significancia mediante la prueba de Mantel.

Figura 14 **39**

Distribución de diferencias pareadas en la región control (DNAm_t) para *H. bispinis* (A) y *H. antarcticus* (B). El eje X indica el número de diferencias entre pares de secuencias, y el eje Y indica la frecuencia. Exhibiendo la distribución obtenida mediante los datos observados, y bajo el modelo de expansión súbita. Entre paréntesis, se indican los intervalos de confianza del 95% para cada parámetro estimado (τ , θ_0 y θ_1).

Figura 15 **40**

Estimación del tamaño poblacional histórico de *H. bispinis* (color azul) y *H. antarcticus* (color gris), mediante el método "Bayesian Skyline Plot". La línea negra es la estimación de la media y el área de color representa la región del 95% HPD.

Figura 16 **44**

Patrones generales que describen los procesos de divergencia (a - b) en invertebrados marinos del genero *Sterechinus*, *Nacella* y *Yoldia* y los procesos de dispersión (c - d) en *Harpagifer* entre Sudamérica y Antártica. CCA (Corriente Circumpolar Antártica). GGP (Gran Glaciación Patagónica).

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	9
Distribución y batimetría de las especies del género <i>Harpagifer</i> .	
Tabla 2	14
Sitios de muestreo en el sur de Chile con sus respectivas coordenadas.	
Tabla 3	14
Sitios de muestreo en la isla Rey Jorge, Shetland del Sur, Antártica con sus respectivas coordenadas.	
Tabla 4	17
Partidores que se utilizaron para amplificar la región control del ADN mitocondrial.	
Tabla 5	30
Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad en <i>H. bispinis</i> (A) y <i>H. antarcticus</i> (B). n: número de ejemplares analizados; K: número de haplotipos; S: sitios polimórficos; H: diversidad haplotípica; $\bar{\Pi}$: número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. T.D: índice de Tajima.	
Tabla 6	32
Comparaciones pareadas de los valores de G_{ST} , calculado en base a la frecuencia de los haplotipos, (sobre la diagonal) y N_{ST} o el número promedio de diferencias nucleotídicas entre localidades (bajo la diagonal) de <i>Harpagifer bispinis</i> (A) y <i>Harpagifer antarcticus</i> (B). 25000 iteraciones, valores significativos ($p < 0.05$) se encuentran marcados en negrita.	
Tabla 7	37
Flujo genético, estimado como el número efectivo de inmigrantes por generación ($N_e m$) y las estimaciones del tamaño efectivo (Θ) (en diagonal) de <i>H. bispinis</i> entre las localidades de Fiordo Penguin (1), Canal San Blas (2), Puerto Bories (3), Isla Bavenstock (4), Islas Carlos III (5), Isla Cap. Aracena (6), Fiordo Pia (7) y Puerto Williams (8). Mediante el	



modelo de migración simétrico con MIGRATE-N. Incluyendo el 2.5% y 97.5% de intervalo de confianza (entre paréntesis).



ABREVIATURAS

Π	Número promedio de diferencias entre pares de secuencias
Π_{inter}	Número promedio de diferencias entre par de secuencias de distintas especies
π	Diversidad nucleotídica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFGP	Antifreeze glycoproteins
BF	Bayes Factor
BIC	Criterio de Información Bayesiana
CCA	Corriente Circumpolar Antártica
DNTPs	Desoxi-nucleótidos trifosfato
EtBr	Bromuro de Etidio
FPA	Frente Polar Antártico
F_{ST}	Índice de diferenciación genética entre las poblaciones
GGP	Gran Glaciación Patagónica
G_{ST}	Índice de diferenciación poblacional basado en las frecuencias de los haplotipos
GTR	modelo Generalised time-reversible
H	Diversidad haplotípica
HDP	Highest Posterior Density
HKY	modelo de Hasegawa, Kishino y Yano
HSD	Honestly Significant Difference
IB	Inferencia Bayesiana
K	Número de haplotipos
Ma	Millones de Años
MCMC	Cadenas de Markov, método Monte Carlo
$MgCl_2$	Cloruro de Magnesio
ML	Máxima Verosimilitud
MRCA	Most Recent Common Ancestor
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
N_e	Tamaño poblacional efectivo
$N_e m$	Número de inmigrantes por generación
N_{ST}	Índice de diferenciación poblacional basado en similitud de haplotipos
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
S	Número de sitios polimórficos
Taq	polimerasa de <i>Thermophyllus aquaticus</i>
UMG	Último Máximo Glacial

1.- Resumen

La evolución de la fauna marina bentónica de la Antártica ha sido modelada por factores geológicos y climáticos como el aislamiento geográfico del continente y la posterior instalación de la Corriente Circumpolar Antártica. A pesar del aislamiento que actualmente afecta a esta región, se han planteado fuertes vínculos biogeográficos entre las especies marinas de la Península Antártica y el extremo sur de Sudamérica. Estudios recientes en distintos taxa han demostrado, por ejemplo, que organismos bentónicos con largos estadios larvales han mantenido contactos después de la separación física de los continentes, y la separación podría haberse producido por la intensificación de la Corriente Circumpolar Antártica a finales del Mioceno - principio del Plioceno.

Los peces del género *Harpagifer* representan un buen modelo para estudiar los tiempos y modos de especiación entre las Provincias Antártica y Magallánica, determinando además, los patrones de estructura y diversidad genética causados por los ciclos glaciales del Cuaternario. Si bien, la mayoría de las especies del género se distribuyen en islas Subantárticas, hay una especie que sólo habita en la Península Antártica y Shetland del Sur, *H. antarcticus* y otra, *H. bispinis*, que sólo se encuentra en el extremo sur de Sudamérica.

En el presente estudio, se realizó un análisis filogenético y filogeográfico, utilizando el marcador molecular de la región control mitocondrial (D-Loop) como herramienta de estudio. Los resultados obtenidos, indican que el tiempo estimado de la separación entre *H. bispinis* y *H. antarcticus* tuvo lugar durante el Pleistoceno Medio (1.1 Ma, 1.5-0.7 Ma). Una explicación plausible a estos resultados, podría estar relacionada a procesos de dispersión hacia el extremo sur de América desde las islas del Arco de Escocia, durante la "Gran Glaciación Patagónica" (~ 1.168-1.016 Ma). Los eventos cálidos de los ciclos interglaciales del Pleistoceno Medio habrían puesto término a la conexión, lo

que se tradujo en una acumulación de diferencias genéticas entre las poblaciones de Antártica y Patagonia.

El nivel de diversidad nucleotídica fue mayor en *H. antarcticus*. Además, los test de neutralidad fueron negativos y significativos en *H. bispinis*, a diferencia de *H. antarcticus* que presentó valores no significativos, sugiriendo eventos demográficos contrastantes entre ambas especies. Finalmente, estos resultados fueron corroborados mediante la evaluación del tamaño poblacional efectivo en el tiempo, exhibiendo en *H. bispinis* una expansión posterior al Último Máximo Glacial hace aproximadamente 15.000 años atrás, mientras que la población de *H. antarcticus* no ha presentado cambios en los últimos 54.000 años.

Abstract

The evolution of marine benthic fauna of Antarctica has been shaped by geological and climatic-atmospheric factors like the geographic isolation of the continent and the subsequent installation of the Antarctic Circumpolar Current. Despite the isolation currently affecting this region, there have been raised strong biogeographic links between marine species of the Antarctic Peninsula and the southern tip of South America. Recent studies in different taxa have shown, for example, that benthic organisms with long larval stages have maintained contact after the physical separation of the continents, perhaps associated with the intensification of the Antarctic Circumpolar Current in the late Miocene - early Pliocene.

The fish of the genus *Harpagifer* represent a good model to study the times and modes of speciation between the Antarctic and Magellanic Provinces, determine also the structure and patterns of genetic diversity caused by the Quaternary glacial cycles. While most species of the genus are distributed in the sub-Antarctic islands, there is a species that lives only in the Antarctic Peninsula and South Shetland, *H. antarcticus*, and another, *H. bispinis*, who is only to be found at the tip of South America.

Phylogenetic and phylogeographic analysis were performed using molecular marker of mitochondrial control region (D-Loop) as a working tool. Our results indicate that the estimated time of separation between *H. bispinis* and *H. antarcticus* took place during Pleistocene (1.1 Ma, 1.5-0.7 Ma). One possible explanation for these results could be related to processes of dispersal to the southern tip of America from the islands of the Scotia Arc during the "Great Patagonian Glaciation" (~ 1.168-1.016 Ma). Warm events of interglacial cycles of Middle Pleistocene could have put an end to the connection, which resulted in an accumulation of genetic differences between populations of Antarctica and Patagonia.

The level of nucleotide diversity was higher in *H. antarcticus*. Furthermore, neutrality tests were negative and significant in *H. bispinis*, unlike *H. antarcticus* exhibited non significant values, suggesting contrasting demographic events between both species. Finally, estimating population size over time corroborated these results, exhibiting in *H. bispinis* an expansion after LGM about 15.000 years ago, while *H. antarcticus* population showed no changes in the last 54.000 years.

2.- Introducción

La Antártica es a menudo considerada como una de las últimas grandes fronteras del planeta; su clima extremo sumado a los meses cercanos a la completa oscuridad proporciona condiciones inhóspitas para la vida animal. A pesar de ello, su historia evolutiva y aislamiento han producido un ambiente único, con especies endémicas adaptadas a las condiciones extremas (Clark *et al.*, 2004; Peck *et al.*, 2005; Aronson *et al.*, 2007).

El aislamiento geográfico de la Antártica se inició en el Jurásico temprano (208 – 158 Ma) con la fragmentación y dispersión en bloques del supercontinente Gondwana (Crame, 1999; Torsvik *et al.*, 2008), culminando en el Eoceno tardío (~ 35.5 Ma) a causa de dos grandes eventos tectónicos ocurridos en el Océano Austral. El primero relacionado a la formación del mar de Tasmania, debido a la separación de Australia y Antártica (Barker *et al.*, 2007) y el segundo que corresponde a la apertura del Paso de Drake (~ 28.5 Ma), evento que repercute en el aislamiento de la fauna marina bentónica, separando definitivamente a Sudamérica de la península Antártica (Lawver & Gahagan, 2003) y permitiendo la formación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) que produce una barrera oceanográfica entre los continentes en el Mioceno temprano (Crame, 1999). Paralelamente, el gradual distanciamiento entre los continentes permitió un aislamiento batimétrico ocasionado por la formación de zonas profundas alrededor de la Antártica (Clarke *et al.*, 2005).

La evidencia geológica, representada por paleorreconstrucciones de temperaturas mediante isótopos de oxígeno de aguas profundas ($\delta^{18}\text{O}$), proporcionan un registro confiable de los cambios de temperatura relativa, demostrando una tendencia al enfriamiento global de aproximadamente 14°C desde principios del Eoceno (Zachos *et al.*, 2008). Del mismo modo, los niveles de isótopos de alquenonas sedimentarias, representados por las presiones parciales de dióxido de carbono paleoatmosférico ($p\text{CO}_2$), revelan un descenso de las temperaturas en el Eoceno tardío que derivó en la expansión de las capas de hielo en la Antártica (Zachos *et al.*,

1996; DeConto *et al.*, 2003; Pagani *et al.*, 2005). Además, el hallazgo de fósiles de diatomeas marinas que dependen del hielo, sugieren la presencia de hielo marino durante el Oligoceno (Olney *et al.*, 2009). Sumado a esto, el establecimiento de la CCA probablemente contribuyó a aumentar el aislamiento térmico, disminuyendo la temperatura del agua en 4°C a mediados del Mioceno (Nong *et al.*, 2000) (Fig. 1)

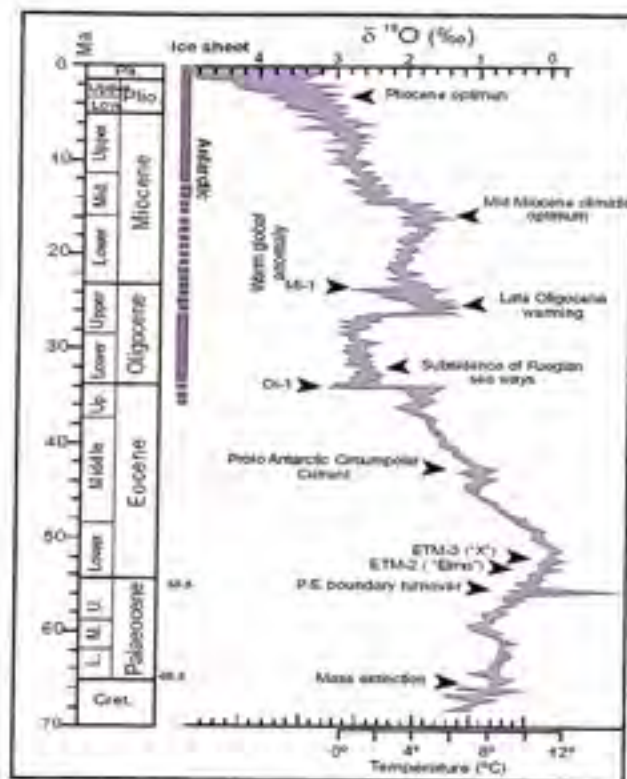


Figura 1. Paleoreconstrucción de las temperaturas del Océano Austral durante los últimos 70 Ma, (modificado de Zachos *et al.*, 2001).

El escenario histórico planteado anteriormente modeló la fauna marina bentónica, manifestándose en la ausencia de depredadores durófagos como crustáceos decápodos y gran parte de los peces Teleósteos (Aronson *et al.*, 2007). Sin embargo, otros invertebrados como los briozoos, equinodermos, poliquetos, pignogónidos y anfípodos son abundantes y diversos, sugiriendo que los cambios ambientales no han impedido su éxito evolutivo (Clarke & Johnston, 1996).

A pesar del aislamiento, se han detectado fuertes vínculos biogeográficos entre la fauna marina bentónica de la Península Antártica y el extremo Austral de Sudamérica (Arntz *et al.*, 2005). Estas conexiones entre ambas zonas pudieron haber tenido lugar, a través de los montes submarinos del Arco de Escocia (Clarke & Crame, 1997; Bargelloni *et al.*, 2000; Clarke *et al.*, 2005; Strugnell *et al.*, 2008; Gonzáles-Wevar *et al.*, 2010). Estudios recientes proponen que especies con largos estadios larvales mantuvieron contactos después de la separación física de los continentes, situando la divergencia entre finales del Mioceno - principio del Plioceno quizás asociado al incremento de la CCA (González-Wevar *et al.*, 2010, 2013; Díaz *et al.*, 2011).

Glaciaciones Pleistocénicas y su efecto sobre la distribución y diversidad genética en especies del sur de Chile y la Antártica.

A partir del Plioceno se puede observar la instalación de oscilaciones cíclicas de la temperaturas que se intensifican durante el Pleistoceno (Fig. 1) (Zachos *et al.*, 2001). Los últimos ciclos glaciales-interglaciales han sido documentados con precisión a través de la variación de isotopo $\delta^{18}\text{O}$ en testigos de hielo antárticos. Estos eventos glaciales que caracterizan el Cuaternario (2,5 Ma – presente) han provocado fluctuaciones en la temperatura y en el nivel del mar, así como en la extensión del manto de hielo, afectando principalmente a las zonas de mayor latitud (Hewitt, 2000, 2004).

Los organismos marinos bentónicos de las zonas someras que habitan dentro del Frente Polar Antártico han tenido que lidiar con la erradicación de su hábitat, a causa del avance y crecimiento del manto de hielo sobre la plataforma continental, el cual ha afectado al ecosistema Antártico en una escala mucho mayor que en otros lugares (Grobe & Mackensen, 1992; Eastman & Clarke, 1998). Frente a la desaparición de los hábitats someros durante los periodos más fríos, se han propuesto 3 hipótesis principales para explicar la persistencia de la

fauna bentónica antártica: (1) Su desplazamiento hacia aguas profundas (Brey *et al.*, 1996; Aronson *et al.*, 2007; Hunter & Halanych 2010), (2) sobrevivencia en islas Antárticas o Subantárticas (Fraser *et al.*, 2009; Gonzáles-Wevar *et al.*, 2011) y (3) la existencia de refugios *in situ* en áreas libres de hielo (Eastman & Clarke, 1998; Thatje *et al.*, 2005; Wilson *et al.*, 2009).

Los efectos directos que pudieron tener los ciclos glaciales incluyen la disminución de la intensidad luminosa en las aguas superficiales debido a la permanencia del hielo marino, generado una disminución en la productividad primaria alrededor del continente. Este fenómeno pudo haber provocado la extinción de un alto número de especies, géneros y familias que presentaban desarrollo plantotrófico (Brey *et al.*, 1996; Poulin & Féral, 1996).

Durante el pleistoceno se detecta poco incremento en la formación de hielo glacial sobre los continentes del Hemisferio Sur, salvo en la Patagonia occidental donde se registró el más documentado de los máximos glaciales, llamado el Último Máximo Glacial (UMG) (23.000 – 19.000 años antes del presente), el cual produjo varios avances y retrocesos en los campos de hielo patagónicos (Hulton *et al.*, 2002; Sudgen *et al.*, 2002). La extensión del Manto de Hielo Patagónico, durante el UMG, abarcó el margen occidental de los Andes desde los 35° a los 55°S (Rabassa & Clapperton, 1990; Hulton *et al.*, 2002; Turner *et al.*, 2005; Hein *et al.*, 2010). Sin embargo, la extensión del campo de hielo no afectó al Archipiélago Cabo de Hornos. Tampoco se encontraba cubierta la boca oriental del Estrecho de Magallanes y la costa al norte de los 43°S. (Hulton *et al.*, 2002; Sudgen *et al.*, 2002). Si bien existieron zonas puntuales no afectadas por el hielo en el extremo sur de Chile, en general, la región al sur de los 53°S permaneció cubierta por hielo al comienzo del periodo interglacial (17.500 – 17.150 años) (Rabassa 2008).

Los ciclos glaciales presentan un aumento en el volumen de hielo continental y una reducción de la temperatura superficial del mar. A causa de la formación del hielo glacial, el nivel del mar habría disminuido entre 125 – 135 metros en relación a su nivel actual (Rabassa *et al.*, 2005). Estos cambios ambientales pueden modelar la distribución de algunas taxa,

ocasionando en ciertas especies la desaparición en gran parte de su distribución o causando un desplazamiento hacia áreas menos alteradas, o sobreviviendo en refugios glaciales (Provan & Bennet, 2008) para, posteriormente, recolonizar nuevas zonas libres de hielo (Hewitt, 2000, 2004). La permanencia de peces continentales de las familias Galaxiidae y Percichthyidae dentro de Patagonia, sugiere la existencia, de zonas de permanencia durante el UMG, en los extremos norte, este y oeste del Manto de Hielo Patagónico (Ruzzante *et al.*, 2006, 2008; Zemlak *et al.*, 2008, 2010; Salinas, 2011). Estas especies, durante las épocas interglaciales, habrían ampliado su rango de distribución, colonizando las zonas fuertemente alteradas durante el UMG. Este efecto sobre las especies marinas ha sido documentado en macroalgas pardas (*Durvillaea antarctica* y *Macrocystis pyrifera*), sugiriendo una recolonización posterior al UMG desde las regiones subantárticas hacia las áreas libres de hielo de la costa occidental de la Patagonia, facilitado por la CCA (Fraser *et al.*, 2009, 2010; Macaya & Zuccarello, 2010). También la presencia de refugios glaciales sumado a la dispersión hacia zonas libres de hielo y posterior re-expansión geográfica, habrían permitido una diversificación reciente de los Gastropodos del género *Nacella* en Patagonia (González-Wevar *et al.*, 2011a). Asimismo, la retracción y posterior ampliación de los rangos de distribución puede tener un efecto sobre los patrones de diversidad genética en poblaciones recolonizadas, conservando una señal genética de baja diversidad (Hewitt, 2000, 2004), causada por el reducido número de mutaciones que han podido acumularse en el breve periodo de tiempo de expansión poblacional. Por el contrario, en las zonas donde se establecieron refugios glaciales o áreas de permanencia, las poblaciones presentan una mayor diversidad genética, debido a sus grandes tamaños poblacionales y por su mayor tiempo de coalescencia (Hewitt, 2004; Provan & Bennet, 2008, Marko *et al.*, 2010; Zemlak *et al.*, 2010). En este contexto, los cambios en la distribución de las especies durante los eventos glaciales producen importantes consecuencias en la dinámica de las poblaciones, generando fluctuaciones demográficas como la extinción de linajes, eventos de

cuellos de botella y efectos fundadores durante los procesos de (re)colonización (Bernatchez *et al.*, 1989; Ruzzante *et al.*, 2006)

Origen y diversificación del Suborden Notothenioidei.

Los cambios ocasionados por el descenso de la temperatura y la expansión de las capas de hielo durante la transición Oligoceno – Mioceno (evento Mi-1, 24.1 – 23.7 Ma, Fig.1) tuvieron fuertes repercusiones sobre la ictiofauna Antártica, ocasionando la casi total extinción de los grupos de peces del Cenozoico (Eastman, 1993). Los peces notothenidos lograron sobrevivir a los cambios ambientales mediante una innovación fisiológica clave, la producción de glicoproteínas anticongelantes (AFGP) que se unen a los cristales de hielo que entran al cuerpo de estos peces e inhiben su crecimiento, previniendo la congelación de la sangre y de otros fluidos corporales (DeVries, 1988; Cheng, 1998). La ausencia de competidores de otros grupos (Balushkin, 2000) y un aumento de la productividad del Océano Austral que comenzó hace aproximadamente 22 Ma (Lutjeharms, 1990; Eastman, 2000) favorecieron la diversificación de los peces de este grupo (Eastman, 2005).

Se han sugerido diferentes tiempos y modos de divergencia para los linajes del suborden Notothenioidei que habitan al norte de la Convergencia subantártica. Por ejemplo, para las familias basales del suborden (Bovichtidae y Pseudaphritidae), eventos de especiación vicariante relacionados a la separación de Australia y Antártica en el Cretáceo tardío (~ 70 Ma.), habrían producido el aislamiento del ancestro de estos peces en el Sur de Australia y la divergencia del linaje Antártico (Eastman, 1993; Balushkin, 2000). Posterior a estos eventos, el ancestro de la familia Eleginopidae se habría separado del linaje Antártico en el Eoceno (~ 40 Ma). La divergencia de esta familia estaría relacionada a los mayores eventos tectónicos durante el Eoceno y Mioceno como la apertura del Paso de Drake (Bargelloni *et al.*, 2000). Finalmente, el descenso de la temperatura del agua y el incremento del hielo marino en el

Oligoceno, habría producido el remplazo de ictiofauna Antártica por el suborden Notothenioidei que experimentó una sorprendente diversificación, ocasionada por la adquisición AFGP (Eastman, 1993; Bargelloni *et al.*, 2000; Eastman & McCunne, 2000; Near *et al.*, 2004). Posterior al aislamiento y adaptación a las bajas temperaturas de los notothenidos antárticos, se han sugerido eventos de dispersión hacia el norte de la Convergencia subantártica del ancestro de los notothenidos no antárticos de la familia Nototheniidae (*Dissostichus*, *Notothenia* y *Patagonotothen*). De esta forma, se ha planteado la dispersión, a continuación de la formación del Frente Polar Antártico (FPA), del ancestro de estos peces, hacia Nueva Zelanda y Sudamérica, a través de los montes submarinos de Macquarie y del Arco de Escocia, respectivamente (Bargelloni *et al.*, 2000a; Cheng *et al.*, 2003). Estos eventos de "dispersión a saltos", se consideran como colonizaciones que se producen en raras ocasiones a través de una barrera importante (Bargelloni *et al.*, 2000a).

Existe escasa información acerca de los patrones microevolutivos en estos peces, a pesar de las numerosas investigaciones filogenéticas de los notothenidos y sus adaptaciones fisiológicas (Chen *et al.*, 1997; Bargelloni *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2003; Near *et al.*, 2012; entre otros). Sólo se han realizado unos pocos estudios sobre la historia demográfica de la ictiofauna Antártica (Zane *et al.*, 2006; Janko *et al.*, 2007; Jones *et al.*, 2008; Matschiner *et al.*, 2009; Damerou *et al.*, 2012), principalmente por la dificultad en la obtención de muestras.

En este contexto, los peces de la Familia Harpagiferidae representan un buen modelo para analizar la historia demográfica entre las faunas marinas de la Antártica y Patagonia, estableciendo los tiempos de divergencia entre ellas. A causa de la presencia de especies congéneres en ambas costas y el restringido rango batimétrico de éstas, además de innovaciones fisiológicas como las AFGP que les permiten vivir asociados a los hielos.

Antecedentes generales de la Familia Harpagiferidae.



La familia Harpagiferidae perteneciente al suborden Notothenioidei, presenta una distribución Antártica y Subantártica representada por un solo género, *Harpagifer* (Richardson, 1844). Sin embargo, se encuentran más relacionados a las islas Subantárticas que a los bordes continentales (Eastman, 1993), presentando solo una especie, *H. antarcticus* (Nybelin, 1947), que habita en la Península Antártica. En el extremo sur de Sudamérica se encuentra la especie *H. bispinis* (Hureau, 1990) y en las islas Subantárticas están descritas las especies *H. georgianus* Nybelin, 1947; *H. kerguelensis* Nybelin, 1947; *H. palliolatus* Richardson 1844 y *H. spinosus* Hureau *et al.* 1980 (Fig. 2). Recientemente, Neyelov & Prirodina (2006), describen seis nuevas especies para las islas subantárticas, sugiriendo la existencia de especies simpátricas para estas islas. Los ejemplares de *Harpagifer* miden entre 7 a 10 cm, presentando hábitos bentónicos someros, principalmente en la zona sublitoral y pozas intermareales. Sin embargo, se han reportado hasta 180 m pero nunca fuera de la plataforma continental (Eastman, 1993) (Tabla 1). Se alimentan principalmente de pequeños crustáceos y poliquetos (Duarte & Moreno, 1981; Hureau, 1990; Casaux, 1998; Hüne & Rivera, 2010). El crecimiento es lento, con una madurez entre los 3 y 5 años, exhibiendo tallas superiores a los 7.5 cm (North & White, 1987; White & Burren, 1992). Los huevos son bentónicos (Hureau, 1990) y las larvas tienen una larga fase pelágica (Kock & Kellerman, 1991; White & Burren 1992).

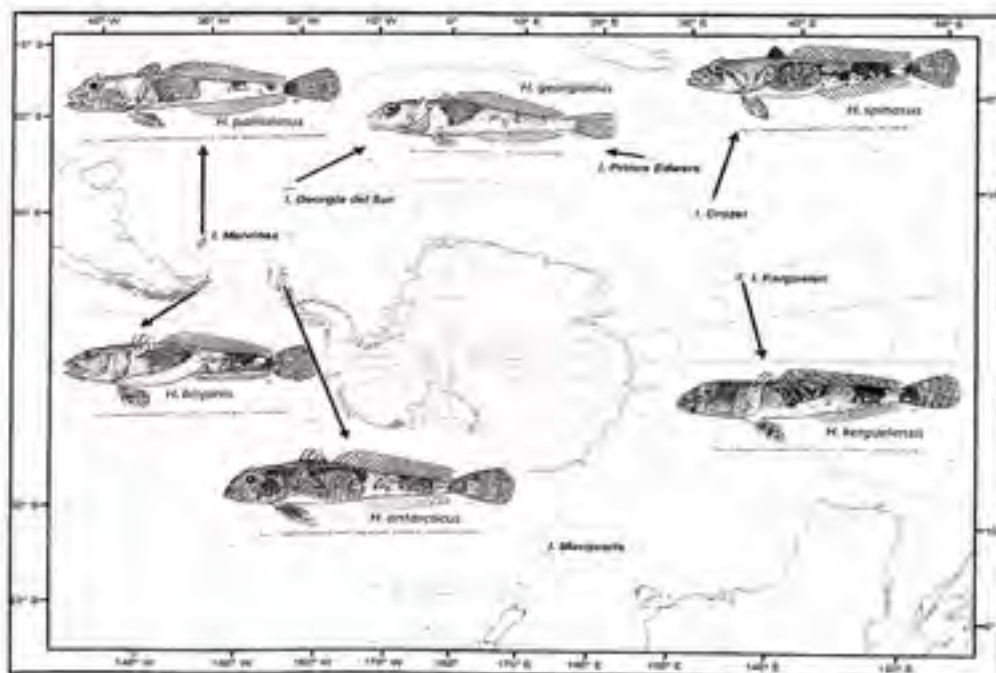


Figura 2. Distribución de las especies del género *Harpagifer* en la península Antártica, Patagonia e islas subantárticas.

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

ESPECIE	DISTRIBUCIÓN	RANGO BATIMETRICO
<i>H. bispinis</i>	Extremo sur de Sudamérica	< 1 – 50 m
<i>H. antarcticus</i>	Península Antártica	< 1 – 100 m
<i>H. palliolatus</i>	Islas Falkland	< 1 – 50 m
<i>H. georgianus</i>	Islas Georgia del Sur y Príncipe Eduardo	< 1 – 80 m
<i>H. kerguelensis</i>	Islas Kerguelen	< 1 – 180 m
<i>H. spinosus</i>	Islas Crozet	< 1 – 180 m

Innovaciones fisiológicas y morfológicas de los Harpagiferidos.

Bajas temperaturas pueden influir fuertemente en una disminución de todos los procesos fisiológicos de los organismos, reduciendo la fluidez de las membranas y aumentando la viscosidad de los fluidos biológicos (Clarke & Johnston, 1999). Sin duda, el conocimiento de los costos fisiológicos y estrategias de comportamiento vinculados a la adaptación térmica pueden ayudar a entender como las especies han respondido al cambio climático en el pasado.

Harpagifer antarcticus es una especie estenoterma, ya que tolera restringidos cambios de temperatura entre -2 y 2°C durante todo el año (Brodeur, 2003; Poulin Com. Pers.). Estos peces presentan proteínas anticongelantes secretadas en altas concentraciones en la sangre, siendo este el principal agente de anticongelación. Por otro lado, los Harpagiferidos Subantárticos son peces euritermos, ya que se ha documentado que resisten a cambios de temperatura desde 0 a 11°C (Fernandez & Calvo, 2009), habitando en pozas intermareales que suelen permanecer congeladas durante el invierno (Hüne Obs. Pers.). Además, la especie patagónica *H. bispinis*, presentaría posibles patrones estacionales en la actividad anticongelante (DeVries Com. Pers.). Esta se ha considerado como una eficiente estrategia de ahorro de energía, presente en peces Árticos, ya que evita los costos de la biosíntesis cuando

la congelación no es un peligro (Cheng & DeVries, 1991). Otra característica de los Harpagiferidos Subantárticos es su capacidad de vivir en un amplio rango de concentración de sales desde 0 a 38‰ (Pérez *et al.*, 2003), habitando en pozas intermareales que a menudo están expuesta a reducciones en la salinidad a causa del flujo de agua dulce proveniente de las lluvias y pequeños arroyos (Hüne Obs. Pers.). La capacidad de tolerar altas fluctuaciones de salinidad, estaría relacionado a que los riñones de los Harpagiferidos exhiben notables adaptaciones morfológicas que le permiten regular la concentración osmótica, ya que sus nefrones presentan la ausencia de corpúsculos renales y modificaciones que podrían facilitar la secreción de la orina (Pérez *et al.*, 2003)

En los notothenidos antárticos, la ausencia de glomérulos estaría relacionada a la conservación de glicopeptidos sanguíneos con propiedades anticongelante, esenciales para la supervivencia en aguas frías (Dobbs *et al.*, 1974; Eastman & DeVries, 1986; Eastman, 1993). Como no existe filtración glomerular, no se necesita de un gasto de energía para reabsorber las proteínas sanguíneas, por lo tanto el costo metabólico de la osmorregulación en los notothenidos es ampliamente menor que en otros teleósteos (Dobbs *et al.*, 1974).

3.- Hipótesis

Hipótesis 1

La divergencia entre especies del género *Harpagifer* provenientes de Antártica y Patagonia esta directamente relacionada a los cambios climáticos y oceanográficos del Océano Austral ocurridos a finales del Mioceno - principio del Plioceno.

Se espera encontrar una congruencia entre los tiempos de divergencia de ambas especies y los procesos climáticos y oceanográficos del Océano Austral, ocurridos a finales de Mioceno – principios del Plioceno, ya que la existencia de una larva planctotrófica que se mantiene en la columna de agua por varios meses, podría haber mantenido el contacto entre la Antártica y Patagonia por largo tiempo.

En el caso contrario, se espera que los tiempos de separación de las especies *H. bispinis* y *H. antarcticus*, estén directamente relacionados a los eventos geológicos más importantes ocurridos en el Océano Austral durante el Cenozoico que impidieron el flujo genético entre ambos continentes.

Hipótesis 2

Durante los periodos glaciales del Pleistoceno, la desaparición de hábitats someros bentónicos fue más marcada en la Antártica que en la Patagonia, afectando de mayor manera a las poblaciones de *H. antarcticus* que a las de *H. bispinis*.

Se espera encontrar una menor diversidad genética en *H. antarcticus* que en *H. bispinis*, a causa de la disminución de los tamaños poblacionales en la Antártica, sumado a efectos de cuello de botella que habrían derivado en una disminución de la diversidad genética.

En caso contrario, se espera que el efecto de los periodos glaciales sobre los hábitat, habrían afectado por igual a las poblaciones de Antártica y Patagonia. En consecuencia, ambas especies deberían exhibir una baja diversidad genética.

Hipótesis 3

A causa de sus particulares adaptaciones fisiológicas y morfológicas para sobrevivir en ambientes de baja temperatura y con variaciones de salinidad, *H. bispinis* permaneció en refugios glaciales patagónicos asociados a los márgenes de formación y acumulación de hielo glacial durante los periodos más fríos del Cuaternario tardío, sin que sus tamaños poblacionales se hayan visto mayormente afectados. Junto al retroceso progresivo de los hielos al inicio de las fases interglaciales, habría recolonizado los canales y fiordos.

Se espera encontrar en *H. bispinis* altos niveles de diversidad genética, a causa de un bajo efecto de la deriva.

El caso contrario, los tamaños poblacionales de *H. bispinis* habrían disminuido durante los ciclos glaciales, exhibiendo bajos niveles de diversidad genética y ausencia de estructuración poblacional, a causa de una recolonización reciente desde las zonas libres de hielo en los extremos de su actual distribución.

4.- Objetivos

- Establecer las relaciones filogenéticas entre la especie *H. antarcticus* (Antártica) y *H. bispinis* (Patagonia), utilizando el criterio de máxima verosimilitud e inferencia bayesiana, mediante el marcador molecular de la región control (D-Loop).
- Estimar el tiempo de divergencia entre las especies *H. antarcticus* y *H. bispinis*, mediante inferencia bayesiana, utilizando los modelos de reloj molecular estricto y relajado, con el marcador molecular de la región control (D-Loop).
- Caracterizar y comparar la diversidad genética entre las poblaciones de *H. antarcticus* (Antártica) y *H. bispinis* (Patagonia), determinando también el grado de estructuración de esta diversidad, utilizando el marcador molecular de la región control (D-Loop).
- Inferir la historia demográfica de las poblaciones dentro de cada zona estudiada, contrastando y comparando la historia glacial local y regional, mediante el marcador molecular de la región control (D-Loop).

5.- Materiales y Método

Recolección de muestras

Las muestras para el estudio de *Harpagifer bispinis* en Patagonia, fueron recolectadas durante los años 2008 y 2012, en distintos sitios del Sur de Chile (Tabla 2). Mientras que las muestras en la Antártica fueron recolectadas durante el año 2011 y 2012. (Tabla 3) (Fig.3)

Tabla 2. Sitios de muestreo en el sur de Chile con sus respectivas coordenadas.

Especie	Localidades	Nº de secuencias obtenidas	Nº de secuencias analizadas	Coordenada
<i>H. bispinis</i>	Fiordo Penguin	20	19	49°58.3'S; 74°17.8'O
<i>H. bispinis</i>	Canal San Blas	18	15	51°13.6'S; 74°59.5'O
<i>H. bispinis</i>	Puerto Bories	20	16	51°41.6'S; 72°32.1'O
<i>H. bispinis</i>	Isla Baverstock	19	18	52°15.6'S; 73°41.1'O
<i>H. bispinis</i>	Isla Carlos III, E. Magallanes	15	11	53°37.2'S; 72°17.6'O
<i>H. bispinis</i>	Isla Capitan Aracena	20	19	54°01.8'S; 71°16.7'O
<i>H. bispinis</i>	Fiordo Pia	17	16	54°47.6'S; 69°36.2'O
<i>H. bispinis</i>	Puerto Williams, Canal Beagle	20	17	54°55.9'S; 67°35.2'O

Tabla 3. Sitios de muestreo en la isla Rey Jorge, Shetland del Sur, Antártica con sus respectivas coordenadas.

Especie	Localidades	Nº de secuencias obtenidas	Nº de secuencias analizadas	Coordenada
<i>H. antarcticus</i>	Bahía Fildes, Isla Rey Jorge	32	30	62°12'S; 58°57'O
<i>H. antarcticus</i>	Caleta Potter, Isla Rey Jorge	20	18	62°14'S; 58°39'O
<i>H. antarcticus</i>	Noroeste Isla Rey Jorge	10	6	61°55'S; 58°21'O

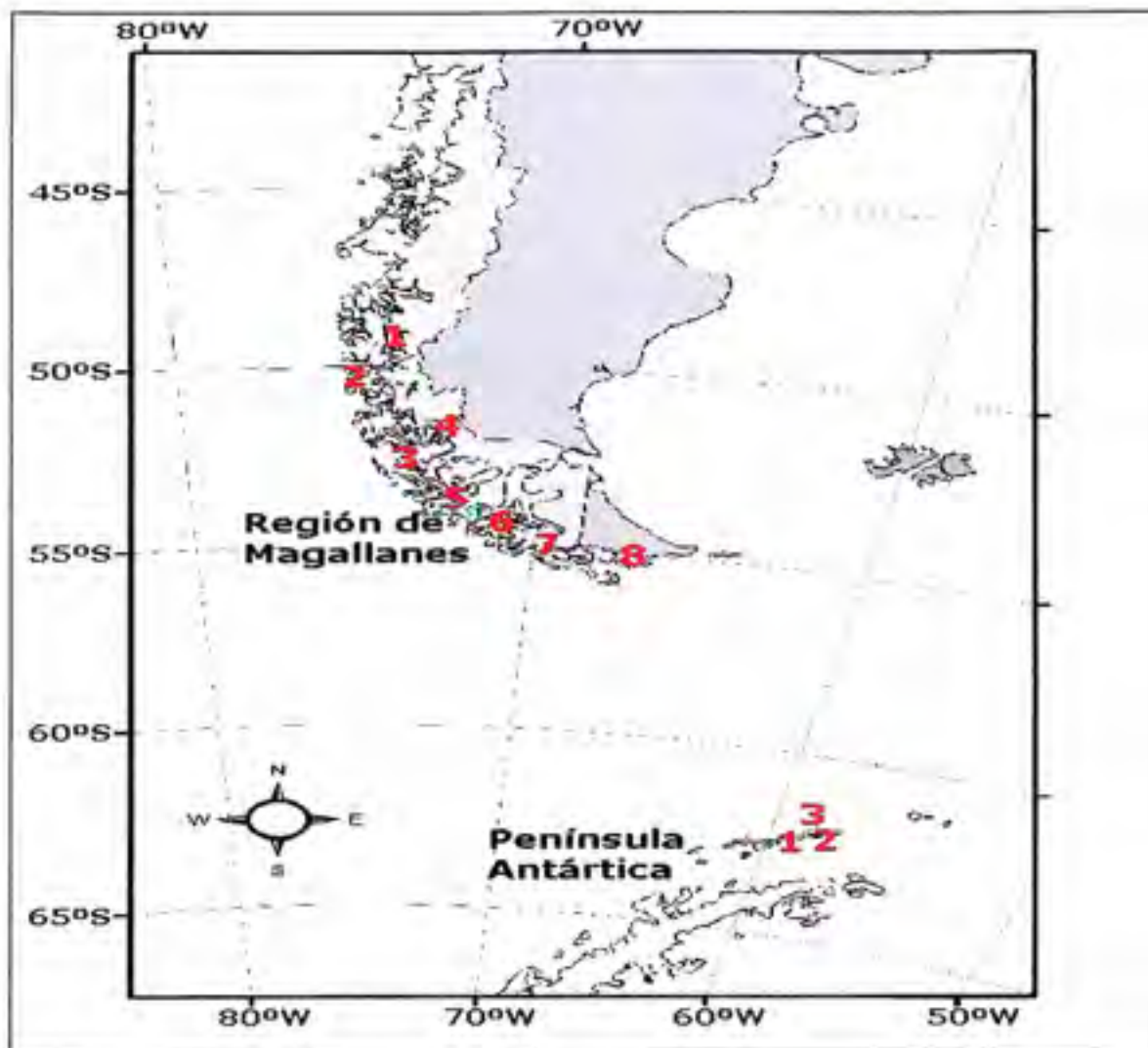


Figura 3. Localidades de muestreo para la especie *Harpagifer bispinis* a lo largo de la costa del extremo sur de Chile y para la especie *H. antarcticus* en la isla Rey Jorge, Shetland de Sur, Antártica. Los números indican los sitios de muestreo para ambas especies.

Extracción del ADN

Los ejemplares de Harpagiferidae recolectados fueron preservados en etanol (95%) y la extracción del material genético de las 211 muestras, se realizó a partir del tejido muscular, mediante un protocolo de extracción salina descrito por Aljnabi & Martínez (1997). Se midió la concentración ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$) y el grado de pureza de los ADNs estimando las relaciones A230/260 y A260/280 con un espectrofotometro NanoDrop modelo N-1000 (Termo Scientific).

Amplificaciones por PCR

La amplificación por PCR se realizó utilizando partidores diseñados para la región control (D-Loop) de *H. antarcticus* descritos por Zhuang & Cheng (2010) y mediante partidores diseñados para la presente investigación (Tabla 4). Este gen, la zona más variable del ADN mitocondrial, ha sido utilizado en el análisis filogenético de los nototénidos antárticos de la familia Bathypagrusidae, donde se incluyeron tres especies de la familia Harpagiferidae (*Harpagifer antarcticus*, *H. georgianus* y *H. Kerguelensis*; Derome *et al.*, 2002) y en la familia Nototheniidae, donde se incluyeron especies antárticas y subantárticas (Sanchez *et al.*, 2007). A nivel poblacional, la región control se ha seleccionado para estudios demográficos de diferentes especies de la familia Nototheniidae (Zane *et al.*, 2006; Matschiner *et al.*, 2009; Damerau *et al.*, 2012). Además, se ha utilizado para la estimación de tasas moleculares en peces continentales de las familias Galaxiidae y Eleotridae (BurrIDGE *et al.*, 2008; Salinas 2010; Zemlak *et al.*, 2010).

La amplificación de un fragmento de aproximadamente 880 pares de bases, se realizó utilizando las mezclas de amplificación que consistían en un volumen de 25 µl correspondiente a: 5 µl de Buffer 5X, 2 µl de MgCl₂ (50mM), 2 µl de dNTPs (2.5mM), 1 µl BSA, 0.25 µl de cada partidor (10 p/µl), 0.3 µl de Taq polimerasa (5 U/ µl) (Promega), 12.2 µl de H₂O destilada desionizada y 2 µl de ADN. Las condiciones de PCR fueron las siguientes: denaturación inicial de 5 minutos a 94°C; 35 ciclos: denaturación a 94° C por 90 segundos, anillamiento a 53° por 90 seg y una extensión a 72°C por 90 seg, seguidos de una extensión final de 5 min a 72°C. Se verificaron los tamaños de los productos de amplificación mediante separación electroforética en geles de agarosa (1.5%) teñidos con Bromuro de Etidio (EtBr). Los amplicones fueron purificados con el Kit QIAquick Gel extracción (Qiagen) y enviados a la empresa Macrogen (Corea) para su secuenciamiento en ambas direcciones.

Tabla 4. Partidores que se utilizaron para amplificar la región control del ADN mitocondrial.

Gen	Nombre	Secuencia (5' - 3')	Referencia
CR	Harpa_Cyb_F	GCTATCCTCACCTGAATCGGTGGCATG	Presente estudio
	Noto_Glu_R	ACGATGGCTTTTCATGTCTTTAGTC	Zhuang y Cheng 2010
	Harpa_Thr_F	TTAAACCCCTCCCTACCGCT	Presente estudio
	Harpa_ND6_R	AGAGTGAAGGGGTGTCAGAAGC	Presente estudio

Las secuencias obtenidas fueron alineadas, ensambladas y editadas en el programa PROSEQ v. 2.91 (Filatov, 2002). Luego, se estimaron los índices de saturación de las secuencias comparándolo con un índice esperado mediante el programa DAMBE v. 5.2.73 (Xia & Xie, 2001). Además, se determinaron las respectivas composiciones nucleotídicas (A, T, C, G), con DAMBE.

Análisis filogenético.

La reconstrucción de las relaciones filogenéticas entre las especies de *H. bispinis* y *H. antarcticus* dentro del suborden Notothenioidei, se hizo mediante la utilización del criterio de máxima verosimilitud (ML) e inferencia Bayesiana (IB). Los árboles filogenéticos permitieron realizar los análisis de las estimaciones de los tiempos de divergencia entre *H. bispinis* y *H. antarcticus*. Para lo cual, se utilizaron tiempos de divergencia de estudios publicados para el suborden Notothenioidei (Matschiner *et al.*, 2011; Near *et al.*, 2012). Además, se excluyó del análisis al fósil *Proeleginops grandeastmanorum*, de la isla Seymour, Antártica (~40 Ma; Eastman & Grande 1991), por su inconsistencia en su asignación taxonómica (Near 2004), ya que fue descrito como gadiforme y reinterpretado como Eleginopidae (Eastman & Grande 1991; Balushkin 1994).

El análisis filogenético se realizó utilizando 13 taxa características del suborden Notothenioidei, correspondientes a 4 secuencias representativas de *H. bispinis* y 4 de *H. antarcticus*, las que fueron complementadas con secuencias adicionales de GenBank:



Chionodraco myersi (GU214228.1), *Racovitzia glaciales* (GU214226.1), *Pleuragramma antarcticum* (GU214212.1), *Notothenia rossii* (GU214216.1), *Pogonophryne scotti* (GU214223.1), *Chaenocephalus aceratus* (GU214227.1), *Champscephalus gunnari* (GU217680.1), *Eleginops maclovinus* (GU214211.1), *Notothenia coriiceps* (GU214214.1), *Pseudaphritis urvillii* (GU214210.1), *Bovichthus variegatus* (GU214209.1). Las secuencias fueron editadas con el programa BioEdit v. 7.0.1 (Hall 1999) y alineadas mediante ClustalW (Larkin *et al.*, 2007). Los análisis se llevaron a cabo bajo el modelo de sustitución HKY+I+G, usando el programa jModelTest (Posada 2008), con el Criterio de Información Bayesiana (BIC). La inferencia filogenética mediante ML se realizó con los programas GARLI-PART v2.0 (Zwickl 2006) y RAxML v7.26 (Stamatakis 2006). El modelo de sustitución seleccionado por BIC no se encuentra disponible en RAxML, por lo que se utilizó el modelo GTRCAT. Como grupo externo se utilizó a *Bovichthus variegatus*, *Eleginops maclovinus* y *Pseudaphritis urvillii*. Los análisis de ML se hicieron mediante búsquedas heurísticas para encontrar el árbol con mejor valor de verosimilitud (topología más probable). La búsqueda concluyó luego de 10.000 generaciones sin optimización significativa ($P < 0.01$) del valor de la topología. Posteriormente, se realizaron *bootstrap* no paramétricos de 1000 réplicas para estimar el soporte de los nodos, que fueron resumidos en un árbol de consenso mediante el programa SumTrees (Sukumaran & Holder 2010) y visualizados en FigTree v1.3.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/FigTree>).

Los análisis de IB para estimar los tiempos de divergencia se realizaron con el programa BEAST v.1.7.1 (Drummond & Rambaut 2007). En primer lugar, se estimó la tasa de fijación para Harpagiferidae, mediante el método que incorpora diferentes tasas entre linajes (reloj molecular relajado) y asumiendo un modelo no correlacionado log-normal de independencia de las tasas entre las ramas (Drummond *et al.*, 2006). Se utilizaron los modelos de reconstrucción, correspondientes al birth-death, donde las tasa de especiación (λ) y extinción (μ) son constantes y el modelo Yule, donde la tasa de extinción es igual a cero (Gernhard 2008). Posteriormente, ambos modelos fueron contrastados para buscar el más apropiado para la

estimación de las tasa. Se utilizaron los resultados previos de estimaciones de divergencia, descritos en el suborden Notothenioidei, con el modelo no correlacionado log-normal (Near *et al.*, 2012). Los que correspondieron a una distribución normal en dos nodos de la filogenia de los nototenidos. Ajustados a los datos de edad estimada para el Ancestro Común Más Reciente (MRCA) del clado Antártico (media 22.4 Ma, 95%HDP: 19.7-25.1 Ma), donde se excluyeron a las especies *B. variegatus*, *P. urvillii* y *E. maclovinus*; y el MRCA de la familia Channichthyidae (media 6.3 Ma, 95%HDP: 4.8-7.8 Ma), donde se incluyó a las especies *C. myersi*, *C. aceratus* y *C. gunnari*. Los análisis mediante BEAST se corrieron 5 veces, donde cada corrida consistió en 3.0×10^7 generaciones, muestreadas cada 1000 generaciones. Posteriormente, se combinó el resultado de los árboles y el valor de los parámetros de cada corrida utilizando el programa LogCombiner v1.7.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/LogCombiner>) y se descartaron los primeros 3000 árboles de cada corrida. La convergencia del modelo de los parámetros y la estimación de la edad de los nodos, fue verificada para cada valor de los parámetros, mediante el tamaño efectivo de muestreo, para asegurar una adecuada mezcla de las cadenas de Markov de Monte Carlo (MCMC; tamaño efectivo de muestreo >1200). Los que fueron graficados por la probabilidad posterior marginal, utilizando Tracer v.1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>). Los modelos Birth-death y Yule en las tasas de ramas se contrastaron mediante el Factor Bayes (BF) implementado en Tracer, usando la verosimilitud marginal de cada modelo. A continuación, la densidad de la probabilidad posterior del árbol combinado fue resumida al árbol de máxima credibilidad mediante el programa TreeAnnotator v.1.7.1 (<http://beast.bio.ed.ac.uk/TreeAnnotator>) que fue visualizado con FigTree. Luego, se estimaron las tiempos divergencia entre *H. bispinis* y *H. antarcticus*, utilizando la tasa de fijación obtenida para Harpagiferidae, mediante los modelos de reloj estricto y relajado, siguiendo los pasos descritos anteriormente para MCMC. Por último, con la prueba BF, se contrastaron ambos modelos para determinar el que mejor se ajusta a los datos, usando la verosimilitud marginal de cada modelo. Los resultados de BF se interpretaron utilizando la escala de Jeffreys (1961).

Mediante TreeAnnotator, se resumió el árbol de máxima credibilidad que fue visualizado con FigTree.

Análisis de diversidad genética y estructuración.

Se estimaron los niveles de polimorfismo de *H. bispinis* y *H. antarcticus*, mediante los diferentes índices de diversidad molecular (número de sitios polimórficos S , número de haplotipos K , diversidad haplotípica H , número promedio de diferencias entre pares de secuencias II y diversidad nucleotídica π), con el programa DnaSP v.5.00.07 (Librado & Rozas 2009). Además, se estimaron los índices poblacionales (Tajima D y Fu F_s) para cada sitio de muestreo mediante DnaSP. Posteriormente, se estimó el número de haplotipos a través de un análisis de rarefacción, utilizando el programa Ecosim 7.72 (Gotelli & Entsminger 2008), con el fin de comparar el número de haplotipos entre muestras de diferentes tamaños. Las estimaciones obtenidas para cada especie fueron comparadas al menor número de individuos (54 individuos en *H. antarcticus*). De igual modo, fueron comparadas al menor número de individuos, entre las localidades (Carlos III, 11 individuos en *H. bispinis* y Noroeste Isla Rey Jorge, 6 individuos en *H. antarcticus*). Las diferencias se evaluaron mediante un Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía con el programa R (R Development Core Team 2007). Posteriormente, se realizaron comparaciones pareadas entre las localidades, mediante la prueba HSD de Tukey.

Las relaciones genealógicas entre haplotipos fueron en primera instancia estimadas mediante el método de redes Median-Joining (Bandelt *et al.*, 1999), con el programa Network v.4.5.1.0. (Röhl, 2002). Sin embargo, este método registró diversos vectores medios y loops sin resolver en las conexiones de la genealogía de los haplotipos. Por esta razón, se generó una red de haplotipos usando algoritmos filogenéticos con migración (Salzburger *et al.*, 2011) y un modelo de sustitución propuesto por BIC (Posada 2008). La reconstrucción filogenética entre haplotipos fue estimada usando el método de máxima verosimilitud (ML), implementado en el

programa DNAML de PHYLIP v.3.69 (Felsenstein 2004) y utilizando el modelo de sustitución nucleotídica HKY+I+G. En base a la inferencia filogenética, se construyó la genealogía de los haplotipos con el programa Haploviewer (Salzburger *et al.*, 2011).

Se realizó un análisis de estructuración genética entre las localidades, mediante las estimaciones de diferenciación poblacional, utilizando los métodos de similitud entre haplotipos (N_{ST}) y análisis directo de la frecuencias de los haplotipos (G_{ST}), realizando pruebas de permutaciones (25.000 iteraciones) para cada método, mediante el programa Arlequin 3.5 (Excoffier *et al.*, 2005), comparación sugerida por Pons y Petit (1995, 1996). Además, los niveles de significancia fueron corregidos utilizando los q -valores, obtenidos mediante el programa QVALUE (Storey *et al.*, 2004). Los parámetros de diferenciación genética (N_{ST} y G_{ST}) fueron comparados mediante PERMUT (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/>), utilizando 1000 permutaciones (Burban *et al.*, 1999). Con el fin de identificar si el valor global de N_{ST} es significativo superior al valor global de G_{ST} , lo que indicaría la presencia de una estructuración filogeográfica (Pons & Petit 1996).

Se realizaron una serie de análisis espaciales de estructuración y flujo genético. Se definió el número y composición de grupos poblacionales geográficamente homogéneos y mayormente diferenciados para cada sitio de muestreo en *H. bispinis*, con el programa SAMOVA v.1 (SAMOVA: Spatial Analysis of Molecular Variance; Dupanloup *et al.*, 2002). Además, se utilizó una aproximación Bayesiana de agrupamiento para inferir el número óptimo de poblaciones y la ubicación de discontinuidades genéticas entre estas poblaciones, mediante el programa de genética del paisaje GENELAND v.3.14 (Guillot *et al.*, 2005), realizando 50.000.000 de iteraciones de MCMC, con un modelo de frecuencia correlacionado. El algoritmo implementado en GENELAND es considerado como un eficiente método de agrupamiento, en condiciones de baja diferenciación genética entre poblaciones (Berry *et al.*, 2004; Coulon *et al.*, 2006). Se analizaron los niveles de correlación entre la divergencia genética mediante el F_{ST} de la linearización de Slatkin y el logaritmo natural de la distancia geográfica "real", es decir, la

distancia entre las localidades por el sistema de canales con el fin de identificar el potencial mecanismo que ha causado la estructura poblacional y flujo genético. Esta medición se realizó utilizando cartas náuticas georreferenciadas del Shoa (Servicio Hidrográfico y Oceanográfico de la Armada de Chile).

Se aplicó un análisis de correlación mediante la prueba de Mantel, utilizando 25.000 iteraciones con el programa Arlequin. Por último, para complementar esta aproximación, se estimó el flujo genético entre las localidades, mediante el programa basado en coalescencia MIGRATE-N v. 3.3.2 (Beerli 2006; Beerli & Palczewski 2010). MIGRATE-N estima los valores de M (m/μ) y θ ($N_e\mu$), donde m es la tasa de inmigración, μ es la tasa de mutación y N_e es el tamaño poblacional efectivo. El producto de $\theta \times M$ da como resultado el número de inmigrantes por generación ($N_e m$). Para *H. bispinis* se implementó un modelo de migración completo, permitiendo la migración asimétrica entre las 8 localidades, incluyendo en el análisis una matriz de distancia geográfica. En *H. antarcticus*, se evaluó un escenario completo con dos tamaños poblacionales y dos tasas de migración en las localidades de bahía Fildes y Caleta Potter. Para el análisis se empleó el método de inferencia Bayesiana, utilizando 5 MCMC largas de 2.5 millones de generaciones con 10 réplicas, descartando los primeros 50.000 árboles. Con el fin de optimizar la búsqueda genealógica, se emplearon 4 MCMC de temperatura estática (1, 1.5, 3, 100000).

Inferencia de la historia demográfica.

Se utilizó el modelo de expansión súbita (Roger & Harpending 1992), para estimar la dinámica poblacional histórica, construyendo la distribución de desajuste (*Mismatch Distribution*), para determinar si *H. bispinis* y/o *H. antarcticus* han sobrellevado un repentino crecimiento poblacional. La estimación de los parámetros se basa en la fórmula: $\tau = 2\mu t$, donde τ es la fecha de expansión/disminución, medida en tiempos mutacionales, μ es la tasa de

mutación por secuencia por generación y t es el tiempo en años. Con un tamaño inicial θ_i (θ), antes de la expansión/disminución poblacional, y un θ_f final (θ_f), después de la expansión/disminución poblacional. Los parámetros de expansión demográfica fueron estimados mediante la aproximación descrita por Schneider & Excoffier (1999) y implementada en el programa Arlequin. Además, se realizó una prueba estadística de bondad de ajuste entre la distribución de desajuste observada y la esperada bajo el modelo de expansión súbita, mediante *bootstraps* paramétricos con el programa Arlequin. Posteriormente, se evaluaron y graficaron las fluctuaciones del tamaño poblacional efectivo a través del tiempo, utilizando el método "Bayesian Skyline Plot" (Drummond *et al.*, 2005), implementado en el programa BEAST. Se aplicó la tasa de fijación obtenida para este análisis para Harpagiferidae, asumiendo un modelo no correlacionado log-normal y realizando cada corrida en 3.5 millones de generaciones, muestreadas cada 1000 generaciones bajo un modelo propuesto por BIC (Posada 2008). Luego, el análisis fue visualizado con el programa Tracer. Los cambios de tamaño de la población se consideraron significativos, si el intervalo superior e inferior de 95% en la raíz del gráfico, no se sobrepone con el de las puntas (los extremos).

6.- Resultados

Análisis Filogenético y estimaciones de los tiempos de divergencia.

El resultado de utilizar una extensión de 530 pb para la reconstrucción filogenética del suborden Notothenioidei, permitió poner a prueba la ausencia de saturación en las secuencias ($Iss = 0.2848 < Iss.c = 0.7188$; $df = 529$ $p < 0.0000$), validando su utilización en el análisis filogenético. Los resultados obtenidos mediante RAxML, GARLI-PART y BEAST, indicaron topologías idénticas (Fig. 4), donde se aprecia una diferenciación entre *H. bispinis* y *H. antarcticus* con elevados valores de bootstrap (100%) y un alto soporte de la probabilidad posterior bayesiana (1.0; Fig. 4). Además, se confirma la monofilia del clado Antártico y la parafilia de la familia Nototheniidae dentro del clado Antártico. La monofilia de la familia Channichthyidae, tuvo un alto soporte de bootstrap y de probabilidad posterior. Mientras que la especie *Pogonophryne scotti*, grupo hermano de Harpagiferidae, presentó un bajo soporte de bootstrap (48 y 66%) y un alto apoyo de la probabilidad posterior (1.0). La estimación de la tasa de fijación obtenida para Harpagiferidae fue de 0.016 mutaciones por sitio por millón de años (95% HPD 0.027-0.008 Ma; Fig. 5), utilizando el modelo de reconstrucción Birth-death que mejor se ajustó a los datos (Factor Bayes = 12.8)

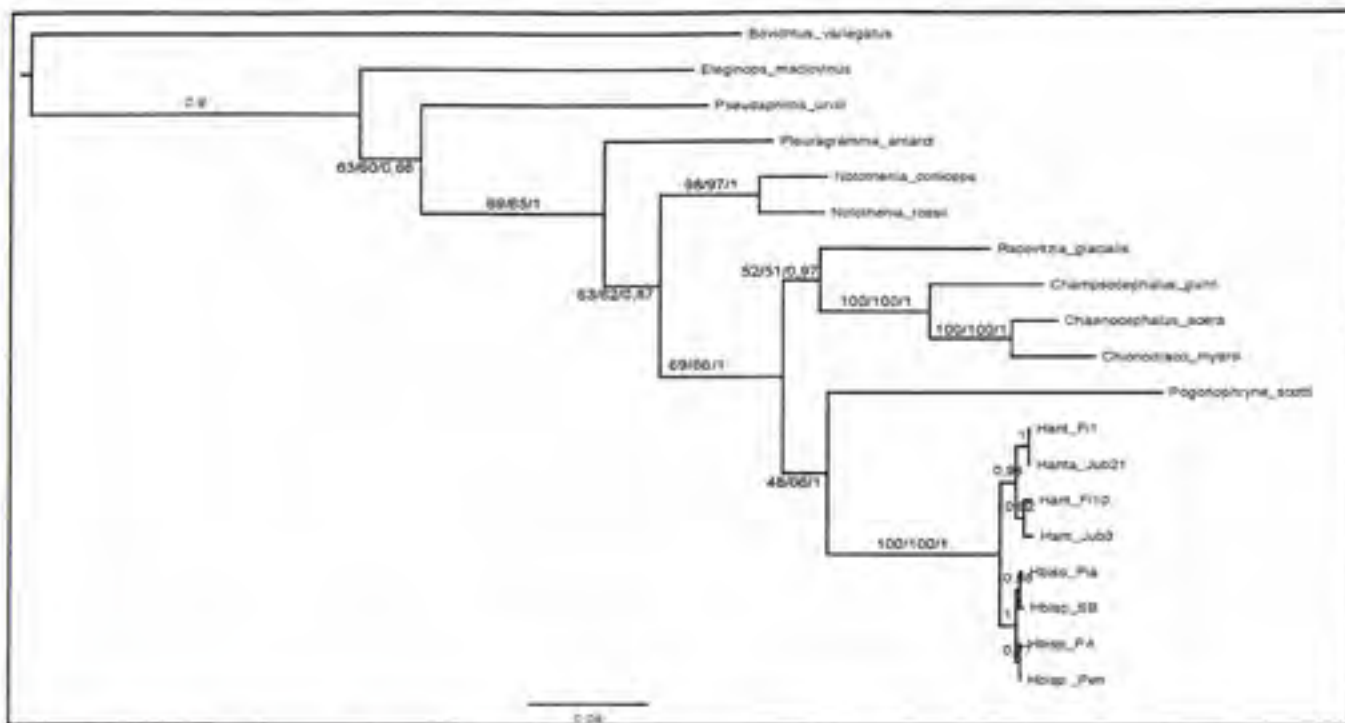


Figura 4. Filograma de Máxima verosimilitud e Inferencia Bayesiana estimada en el suborden Notothenioidei. Los valores de soporte cercanos a los nodos corresponden al valor de *bootstrap* (basado en 1000 réplicas), mediante los programas RaxML y GARLI-PART, y la probabilidad posterior bayesiana mediante el programa BEAST.



Figura 5. Relaciones filogenéticas dentro de Nototheniidae. Sobre las ramas se indica el valor medio de la tasa de sustitución estimada para cada segmento, mientras que gradiente de color de las ramas indica las tasa de sustitución.

Se obtuvieron las estimaciones de los tiempos de divergencia mediante la aproximación bayesiana, utilizando la tasa obtenida para Harpagiferidae (1.6% Ma) y utilizando el modelo que mejor se ajustó a los datos, correspondiente al reloj estricto. La edad media posterior del MRCA de la familia Nototheniidae, fue estimada en el Mioceno medio (14.3 Ma, 16.5-12.2 Ma) (Fig. 6), mientras que la separación entre las familias Harpagiferidae y Artedidraconidae, fue estimada en el Mioceno tardío (9.6 Ma, 11.2-7.9 Ma). Posteriormente, la diversificación de la familia Channichthyidae, se estimó a finales del Mioceno y comienzo del Plioceno (5.5 Ma, 6.5-4.5 Ma). La edad media posterior para la divergencia entre *H. bispinis* y *H. antarcticus*, fue estimada en el Pleistoceno Medio (1.1 Ma, 1.5-0.7 Ma).

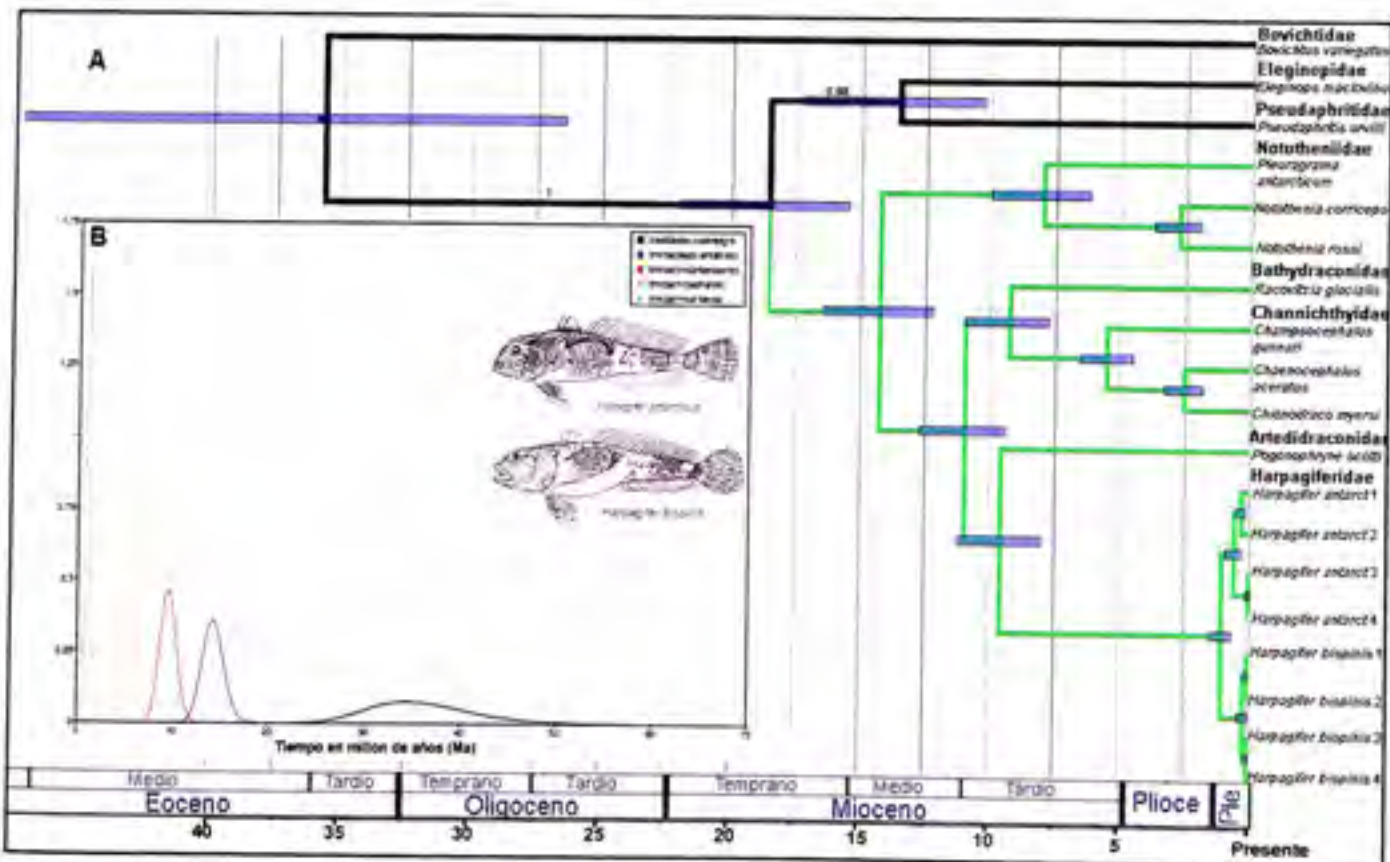


Figura 6. Relaciones filogenéticas en el suborden Notothenioidei que muestran las estimaciones de los tiempos de divergencia (A). Las barras azules indican los intervalos de confianza de las estimaciones de los tiempos de divergencia. Las ramas verdes indican el origen del clado Antártico. El recuadro (B) exhibe la distribución posterior para los tiempos de divergencia de: el suborden Notothenioidei (color plomo), el clado Antártico (azul), la separación entre Artedidraconidae y Harpagiferidae (verde), la divergencia de Channichthyidae (rojo) y Harpagiferidae (naranja). A nivel de las ramas se indica la probabilidad posterior.

Análisis de diversidad genética y estructuración.

Se logró obtener una extensión de 581 pb para los análisis de secuencia de la región control (mtDNA), correspondientes a 131 y 54 individuos de *H. bispinis* y *H. antarcticus*, respectivamente. Las curvas de rarefacción de ambas especies no muestran diferencias en el número de haplotipos a 54 individuos, ya que solapan sus IC 95% (Fig. 7).

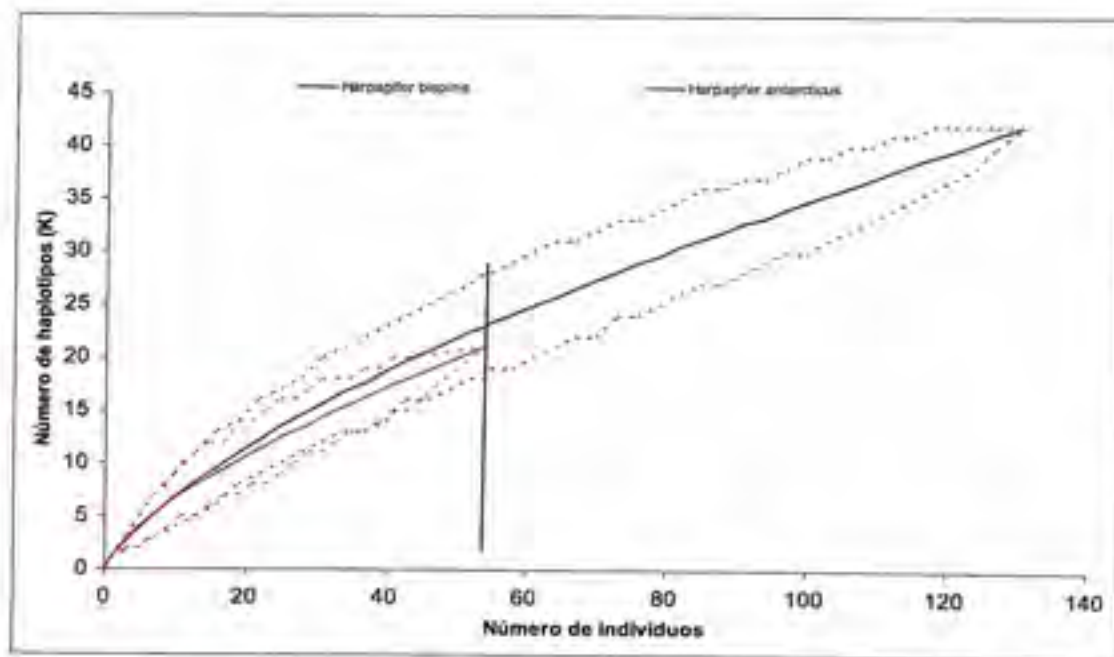


Figura 7. Curvas de rarefacción del número de haplotipos (K) para *H. bispinis* y *H. antarcticus*. La barra indica los sub-muestreos para 54 individuos.

Harpagifer bispinis presentó 37 sitios polimórficos (6.4%) y 19 de ellos (3.3%) fueron parsimoniosamente informativos. La composición nucleotídica estuvo compuesta de: 29.77% A, 16.42% C, 23.63% G, 30.18% T. La prueba de saturación en la sustitución exhibió que las secuencias no están saturadas ($Iss = 0.005 < Iss.c = 0.710$; $df = 579$ $p < 0.0000$). La diversidad haplotípica (H) presentó valores entre 0.45 (Fiordo Pia) y 0.96 (Isla Carlos III y Fiordo Penguin), mientras que el número de haplotipos y los sitios polimórficos fluctuaron entre 5 (Fiordo Pia) y 15 (Fiordo Penguin) y entre 6 (Puerto Bories) y 16 (Fiordo Penguin), respectivamente. (Tabla 5A). Las curvas de rarefacción entre el número de haplotipos de las localidades analizadas, no exhibieron diferencias significativas entre las medias al sub-muestreo de 11 individuos (ANOVA una vía, $F(7.39) = 1.77$; $p = 0.129$; Fig. 8). La prueba de Tukey entre los sitios no presentó diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, las variaciones en el número de haplotipos entre las localidades, son el resultado de los diferentes tamaños de muestreo.

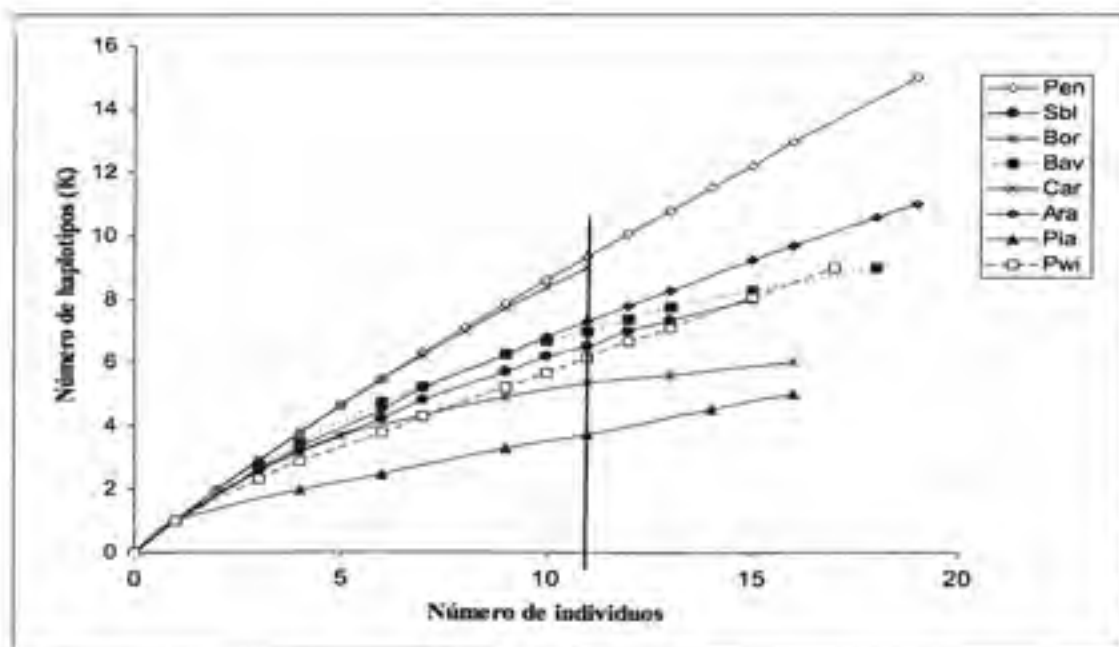


Figura 8. Curvas de rarefacción del número de haplotipos (K) para las localidades de muestreo en *H. bispinis* en Patagonia. La barra indica los sub-muestreos para 11 individuos.

Harpagifer antarcticus, exhibió 21 caracteres polimórficos (sitios variables) (3.6%) y 15 (2.6%) de ellos fueron parsimoniosamente informativos. La composición nucleotídica es: 29.48% A, 16.67% C, 22.96% G, 30.89% T. El test de saturación en la sustitución exhibió que las secuencias no están saturadas ($Iss = 0.012 < Iss.c = 0.729$; $df = 580$ $p < 0.0000$). La diversidad haplotípica (H) presento valores entre 0.73 (Noroeste Isla Rey Jorge) y 0.93 (Caleta Potter). Mientras que el número de haplotipos y los sitios polimórficos fluctuaron entre 3 (Noroeste Isla Rey Jorge) y 13 (Caleta Potter) y entre 10 (Noroeste Isla Rey Jorge) y 19 (Caleta Potter), respectivamente. (Tabla 5B). Las curvas de rarefacción indicaron diferencias significativas entre las medias, al sub-muestreo de 6 individuos entre las localidades analizadas (Fig. 9), mediante el análisis de varianza de una vía ($F(2,12) = 4.768$; $p = 0.03$). Las diferencias se detectaron entre Noroeste Isla Rey Jorge y Caleta Potter (Tukey $p = 0.023$).

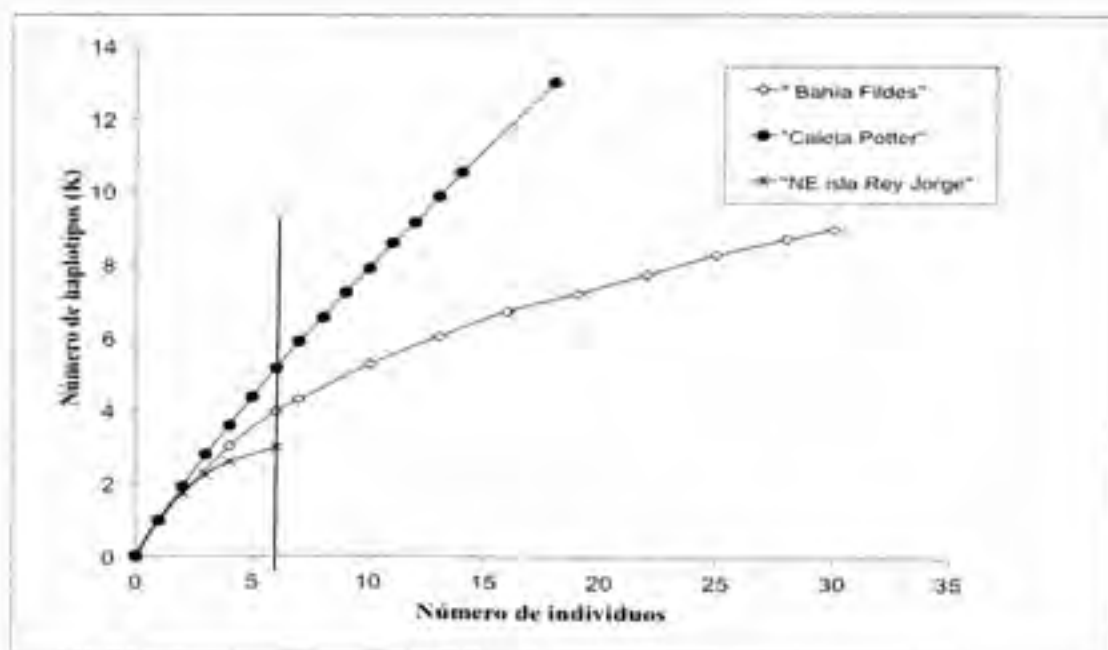


Figura 9. Curvas de rarefacción del número de haplotipos (K) para las localidades de muestreo en *H. antarcticus*. La barra indica los sub-muestreos para 6 individuos.

Al comparar los índices de ambas especies, se observa que *H. antarcticus* presenta mayores valores de diversidad, especialmente en el número promedio de diferencias entre par de secuencias (Tabla 5B).

Tabla 5. Índices de diversidad genética y pruebas de neutralidad en *H. bispinis* (A) y *H. antarcticus* (B). n: número de ejemplares analizados; K: número de haplotipos; S: sitios polimórficos; H: diversidad haplotípica; Π : número promedio de diferencias nucleotídicas; π : diversidad nucleotídica. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. T.D: índice de Tajima.

A

Localidad	n	K	H	S	S/n	Π	π	T.D	Fu's Fs
Fiordo Penguin	19	15	0.96	16	0.84	2.77	0.005	-1.62	-11.89**
Canal SanBlas	15	8	0.84	11	0.73	2.13	0.004	-1.42	-2.84*
Puerto Bories	16	6	0.84	6	0.37	1.65	0.003	-0.29	-1.21
Isla Bavenstock	18	9	0.90	10	0.55	2.40	0.004	-0.62	-2.93*
Isla Carlos III	11	9	0.96	13	1.18	3.27	0.005	-1.15	-4.30*
Isla Aracena	19	11	0.86	14	0.74	2.34	0.004	-1.54	-5.47**
Fiordo Pía	16	5	0.45	8	0.50	1.11	0.002	-1.95*	-1.16
Puerto Williams	17	9	0.73	14	0.82	1.75	0.003	-2.20**	-4.53**
Todos	131	42	0.85	37	0.28	2.21	0.004	-2.09*	-46.23**

B

Localidad	n	K	H	S	S/n	Π	π	T.D	Fu's Fs
Bahía Fildes	30	9	0.81	16	0.53	6.04	0.010	1.68	1.94
Caleta Potter	18	13	0.93	19	1.05	5.82	0.019	0.20	-3.84*
NE Isla Rey Jorge	6	3	0.73	10	1.66	5.33	0.009	1.31	3.11
Todos	54	21	0.88	21	0.39	5.99	0.010	0.95	-3.97

La reconstrucción de la genealogía de los haplotipos construida para las especies *H. bispinis* y *H. antarcticus*, muestra una separación entre la Antártica y Patagonia de 8 pasos mutacionales (Fig. 10). En *H. bispinis*, se observa una topología en forma de estrella con 42 haplotipos diferentes. El haplotipo más frecuente (H1, 37%), que correspondería al más ancestral, estuvo presente en todos los sitios de muestreo. Además, dos haplotipos (H11 y H18) presentaron frecuencias intermedias (6.9 y 6.1%, respectivamente) y se encontraron en distintos sitios de muestreo. Los restantes 39 haplotipos presentaron baja frecuencia y se

identificaron 30 haplotipos únicos. Por otra parte, en *H. antarcticus* se observa una topología más compleja, con una distancia entre los haplotipos más frecuentes de 6 pasos mutacionales. Se observan 21 haplotipos diferentes, donde el más frecuente (H43, 26%) estuvo presente en todos los sitios. Además, se detectaron dos haplotipos (H44 y H46) de frecuencia intermedia (17% en ambos) y un 67% de los haplotipos fueron únicos.

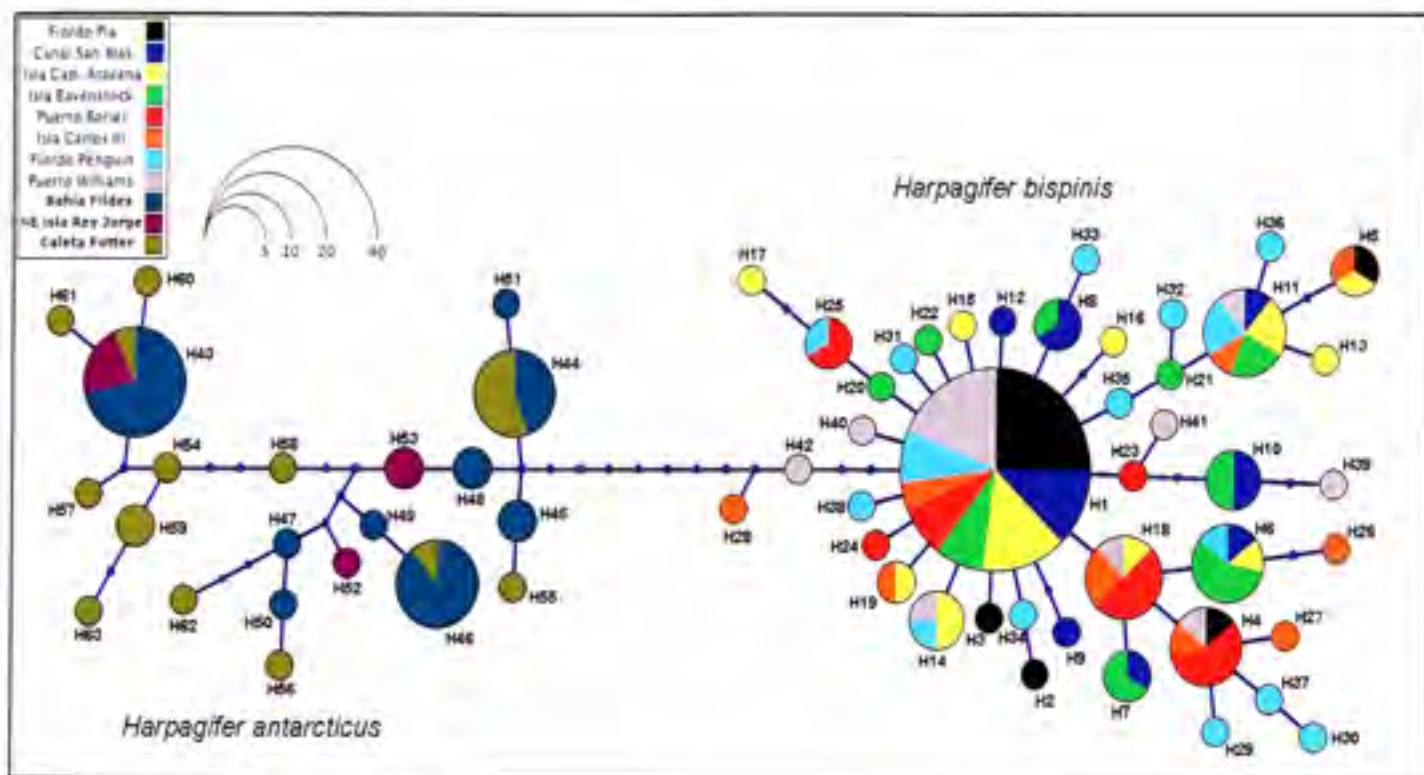


Figura 10. Genealogía de los haplotipos, basada en la región control (DNAmt) y que muestra la separación existente entre las especies *H. bispinis* y *H. antarcticus*. Los haplotipos se representan por un círculo cuyo tamaño es proporcional a su frecuencia y los colores indican las diferentes localidades de muestreo.

Los índices G_{ST} y N_{ST} mostraron un leve grado de estructuración entre algunos de los sitios analizados para *H. bispinis* (Tabla 6A). Las comparaciones pareadas de G_{ST} muestran una diferenciación del Fiordo Pía del resto de los sitios analizados. En menor medida, Puerto Borries presentó también valores significativos de disimilitud con varias localidades. Las comparaciones pareadas de N_{ST} indican que el sitio más disimil corresponden a Puerto Borries. El test de

permutación de los valores observados a nivel global entre G_{ST} (0.045) y N_{ST} (0.026) no evidencia diferencia significativa entre estos índices, indicando una ausencia de estructuración filogeográfica en *H. bispinis*.

Tabla 6. Comparaciones pareadas de los valores de G_{ST} , calculado en base a la frecuencia de los haplotipos, (sobre la diagonal) y N_{ST} o el número promedio de diferencias nucleotídicas entre localidades (bajo la diagonal) de *Harpagifer bispinis* (A) y *Harpagifer antarcticus* (B) 25000 iteraciones. Valores estadísticamente significativos ($p < 0.05$) se encuentran marcados en negrita.

A

Localidades	1	2	3	4	5	6	7	8
1) Fiordo Penguin		0.006	0.042	0.001	0.009	0.010	0.156	0.035
2) Canal San Blas	0.016		0.067	0.013	0.024	0.012	0.082	0.002
3) Puerto Bories	0.041	0.082		0.076	0.016	0.046	0.189	0.059
4) Isla Bavenstock	0.028	0.018	0.066		0.019	0.012	0.184	0.065
5) Isla Carlos III	0.006	0.041	0.003	0.023		0.009	0.189	0.043
6) Isla Aracena	0.015	0.011	0.095	0.029	0.018		0.082	0.014
7) Fiordo Pía	0.007	0.017	0.112	0.086	0.062	0.002		0.010
8) Puerto Williams	0.006	0.018	0.079	0.033	0.029	0.012	0.026	

B

Localidades	1	2	3
1) Bahía Fildes		0.063	0.065
2) Caleta Potter	0.004		0.128
3) NE islas Rey Jorge	0.033	0.045	

H. antarcticus solo presentó evidencias de estructuración mediante las comparaciones paradas de N_{ST} , indicando que NE de islas Rey Jorge sería el sitio más disimil de las localidades analizadas (Tabla 6B). La prueba de permutación exhibió que los valores observados a nivel global de G_{ST} (0.095) y N_{ST} (0.030), no presenta diferencias significativas, indicando la ausencia de estructuración filogeográfica en *H. antarcticus*.

Los análisis espaciales de estructuración en *H. bispinis* basados en el programa GENELAND infirieron 3 poblaciones genéticamente distintas, correspondientes a: i) Fiordo Penguin, Islas Carlos III, Isla Cap. Aracena, Fiordo Pía y Puerto Williams; ii) Canal San Blas y Isla Bavenstock; iii) Puerto Bories (Fig. 11). Sin embargo, la probabilidad posterior para las agrupaciones es baja (60%), indicando un bajo soporte para las agrupaciones. Los análisis del programa SAMOVA en *H. bispinis* indican que la varianza se acrecienta a medida que aumenta el número de particiones (Fig. 13), detectando un porcentaje entre 4.80 y 6.56 del total de la varianza entre las localidades. En contraste, las diferencias dentro de las localidades (F_{ST}) explican entre el 94.39% y 97.07%, a medida que aumenta el número de particiones.

La prueba de Mantel no detectó una correlación significativa entre la distancia genética y geográfica ($r = 0.054$; $p = 0.356$), indicando la ausencia de un aislamiento por distancia (Fig. 14).

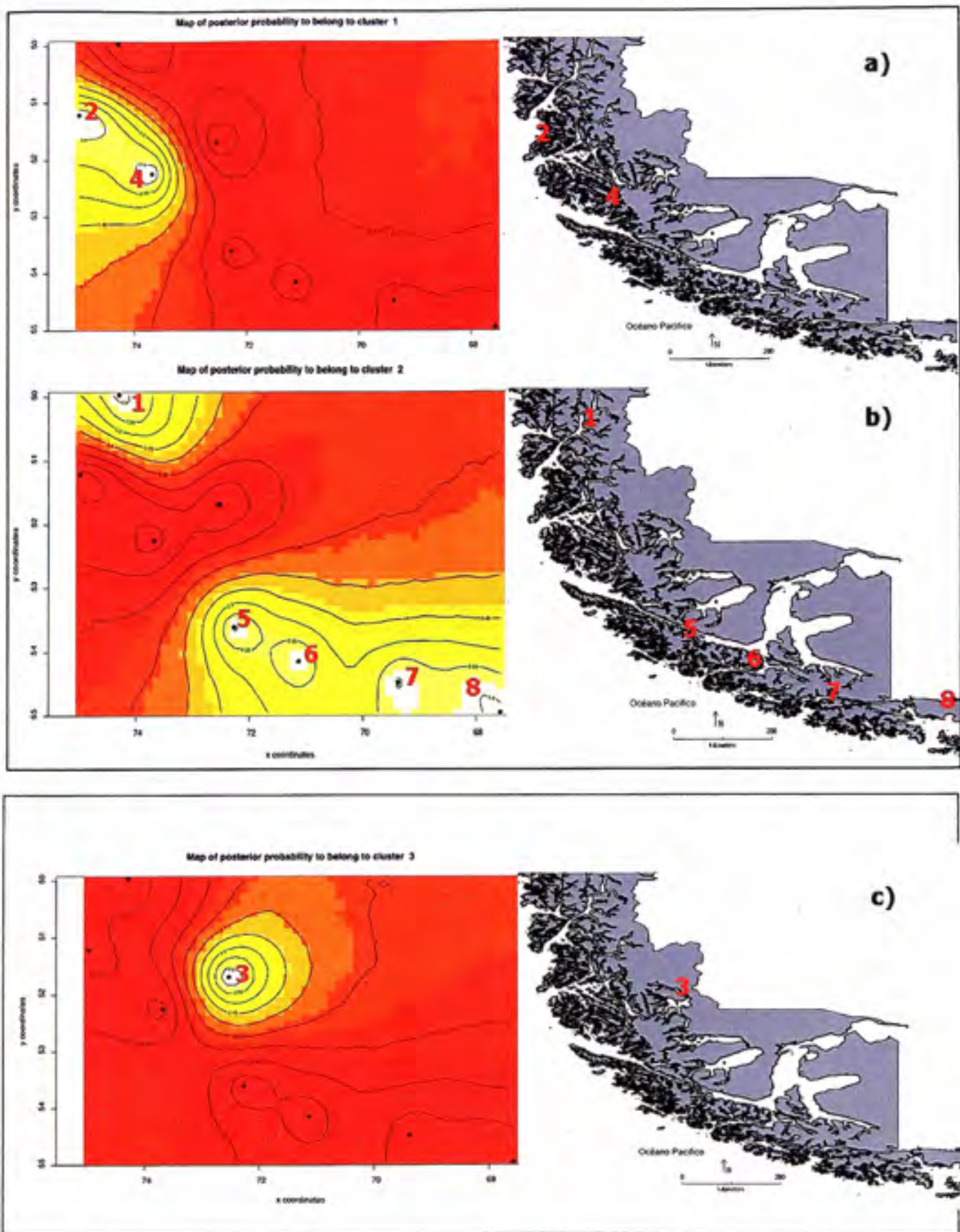


Figura 11. Mapas mostrando las probabilidades posteriores de los individuos pertenecientes a las agrupaciones y las localidades de discontinuidad genética para la inferencia de los 3 grupos ($K = 3$) en *H. bispinis*: A: Canal San Blas (2) e Isla Bavenstock (4); B: Fiordo Penguin (1), Islas Carlos III (5), Isla Cap. Aracena (6), Fiordo Pía (7) y Puerto Williams (8); C: Puerto Bories (3), determinados por GENELAND. Los colores blancos indican una alta probabilidad posterior y los rojos una baja probabilidad de pertenencia a un grupo.

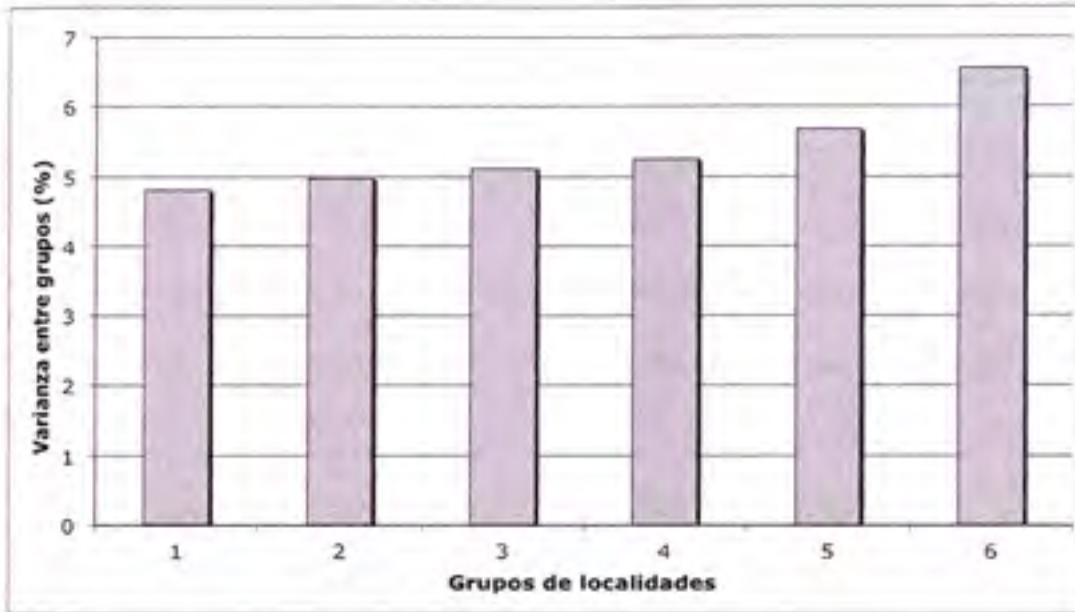


Figura 12. Varianza entre grupos para las diferentes particiones generadas por el programa SAMOVA en *H. bispinis*.

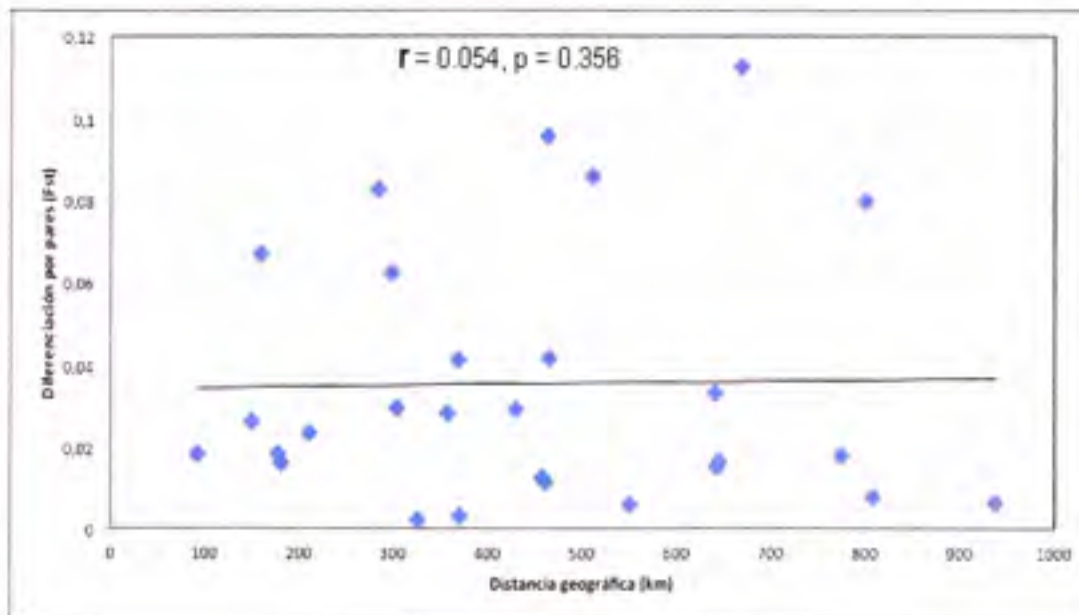


Figura 13. Relación entre la diferenciación genética por pares (F_{st}) y la distancia geográfica en las localidades de muestreo de *H. bispinis*. Indicando el coeficiente de correlación (r) y la significancia mediante la prueba de Mantel.

El análisis de flujo genético mediante MIGRATE-N en *H. bispinis*, presentó diferentes magnitudes de M y Θ entre las localidades. Las estimaciones del tamaño efectivo fluctuaron entre 0.0175 y 0.0037, para Fiordo Penguin y Pia, respectivamente (Tabla 7). El número total de inmigrantes por generación ($N_e m$) presentó valores entre 12.23 y 1.91, correspondientes al flujo genético desde Bavenstock hacia Fiordo Penguin y desde Canal San Blas hacia Fiordo Pia, respectivamente. Por otro lado, *H. antarcticus* evidenció un alto flujo genético desde bahía Fildes hacia Caleta Potter ($N_e m = 45.16$). En contraste, el flujo genético desde Caleta Potter hacia bahía Fildes fue bajo ($N_e m = 2.20$). La estimación del tamaño efectivo fue mayor en Caleta Potter ($\Theta=0.05506$) que en bahía Fildes ($\Theta=0.00536$).

Tabla 7. Flujo genético, estimado como el número efectivo de inmigrantes por generación ($N_e m$) y las estimaciones del tamaño efectivo (Θ) (en diagonal) de *H. bispinis* entre las localidades de Fiordo Penguin (1), Canal San Blas (2), Puerto Bories (3), Isla Bavenstock (4), Islas Carlos III (5), Isla Cap. Aracena (6), Fiordo Pia (7) y Puerto Williams (8). Mediante el modelo de migración simétrico con MIGRATE-N. Incluyendo el 2.5% y 97.5% de intervalo de confianza (entre paréntesis).

	$N_e m$ 1 →	$N_e m$ 2 →	$N_e m$ 3 →	$N_e m$ 4 →	$N_e m$ 5 →	$N_e m$ 6 →	$N_e m$ 7 →	$N_e m$ 8 →
1	$\Theta=0.0175$ (0.0048-0.0348)	10.32 (1.53-17.5)	11.92 (3.52-17.5)	12.23 (3.86-17.5)	10.53 (1.68-17.5)	10.56 (1.70-17.5)	9.55 (1.06-17.4)	9.21 (0.89-17.4)
2	4.58 (0.49-8.5)	$\Theta=0.00854$ (0.0015-0.0173)	4.58 (0.48-8.49)	6.62 (3.28-8.54)	4.77 (0.59-8.54)	4.98 (0.72-8.54)	4.41 (0.39-8.46)	4.705 (0.56-8.52)
3	2.99 (0.41-5.25)	2.83 (0.39-5.23)	$\Theta=0.00525$ (0.0004-0.0109)	3.19 (0.53-5.25)	3.14 (0.48-5.25)	2.77 (0.29-5.22)	2.76 (0.27-5.21)	2.75 (0.31-5.21)
4	4.60 (0.51-8.44)	5.89 (1.76-8.48)	4.96 (0.70-8.48)	$\Theta=0.00848$ (0.0019-0.0163)	5.12 (0.80-8.48)	4.97 (0.72-8.48)	4.38 (0.45-8.41)	4.69 (0.56-8.47)
5	7.81 (0.79-14.81)	7.97 (0.82-14.85)	9.09 (1.43-14.93)	9.65 (1.96-14.93)	$\Theta=0.01493$ (0.0025-0.0347)	10.81 (3.89-14.93)	7.93 (0.85-14.85)	7.69 (0.69-14.79)
6	3.90 (0.42-7.20)	3.86 (0.39-7.19)	3.74 (0.33-7.15)	4.77 (1.19-7.23)	4.38 (0.68-7.23)	$\Theta=0.00723$ (0.0013-0.0145)	3.79 (0.36-7.17)	3.78 (0.36-7.17)
7	1.96 (0.20-3.65)	1.91 (0.18-3.64)	2.08 (0.28-3.67)	1.92 (0.18-3.64)	2.11 (0.29-3.67)	1.94 (0.19-3.65)	$\Theta=0.00367$ (0.0000-0.00827)	2.08 (0.27-3.67)
8	5.79 (0.58-10.88)	6.19 (0.82-10.95)	6.73 (1.20-10.95)	6.61 (1.07-10.95)	6.78 (1.36-10.95)	6.78 (1.21-10.95)	6.31 (0.88-10.95)	$\Theta=0.01095$ (0.0022-0.0223)

Análisis de la inferencia de la historia demográfica.

Las pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F_S) muestran diferentes resultados entre *H. bispinis* y *H. antarcticus*. La mayoría de los valores fueron negativos y significativos con el

índice de F_s (F_s) en *H. bispinis*, a excepción de la localidad de Puerto Bories y Fiordo Pia donde no fue significativo, mientras que el índice de Tajima (D) fue negativo pero no significativo, aunque en los sitios del Fiordo Pia y Puerto Williams sí lo fue (Tabla 5A). En *H. antarcticus* ambos índices fueron positivos y no significativos, a excepción de la localidad de Caleta Potter donde fue negativo y significativo con el índice de F_s (F_s) (Tabla 5B). La distribución de diferencias pareadas entre secuencias también presentó considerables variaciones entre ambas especies. En *H. bispinis* se observó una distribución de desajuste de tipo unimodal (Fig. 15A). En contraste, *H. antarcticus* presentó un patrón de distribución multimodal (Fig. 15B). En *H. bispinis*, la prueba de bondad de ajuste no encontró desviación significativa de lo esperado bajo el modelo de expansión súbita ($SSD = 0.038$; $p = 0.62$). Tomando en cuenta la tasa de fijación estimada para Harpagiferidae de 1.6% (0.016 cambios/sitio/millón de años), el comienzo de la expansión fue estimado en cerca de 120.000 años antes del presente, bajo el modelo de expansión súbita. Sin embargo, al considerar el efecto de dependencia de tiempo en las tasas de evolución (Ho *et al.*, 2005; 2011), donde las tasas de mutación a escala de tiempo genealógico son un orden de magnitud mayores que las tasas de fijación a escala de tiempo filogenético (Ho *et al.*, 2005; 2007; 2011). El comienzo de la expansión de *H. bispinis* podría haber ocurrido hace aproximadamente 12.000 años atrás. En contraste, la distribución de desajuste de *H. antarcticus* presentó una desviación significativa bajo el modelo de expansión súbita ($SSD = 0.054$; $p < 0.01$).

El análisis mediante el método "Bayesian Skyline Plot", incorporando la corrección propuesta por Ho *et al.*, (2005; 2011) (un orden de magnitud mayor), evidenció que la expansión en *H. bispinis* pudo haber comenzado aproximadamente hace unos 15.000 años, incrementando el tamaño medio de la población a 713.300 individuos (95%HDP 1.4-0.086 millones; Fig. 16). El tiempo del Ancestro Común más Reciente (MRCA) fue estimado en ~ 22.000 años (95%HDP 40.000-9.000 años). En contraste, *H. antarcticus* presentó un tamaño poblacional constante a lo largo del tiempo y exhibió un tamaño medio de ~ 135.000 individuos

(95%HDP 533.000-38; Fig. 16). El tiempo del MRCA fue estimado en ~ 54.000 años (95%HDP 91.700-22.700 años).

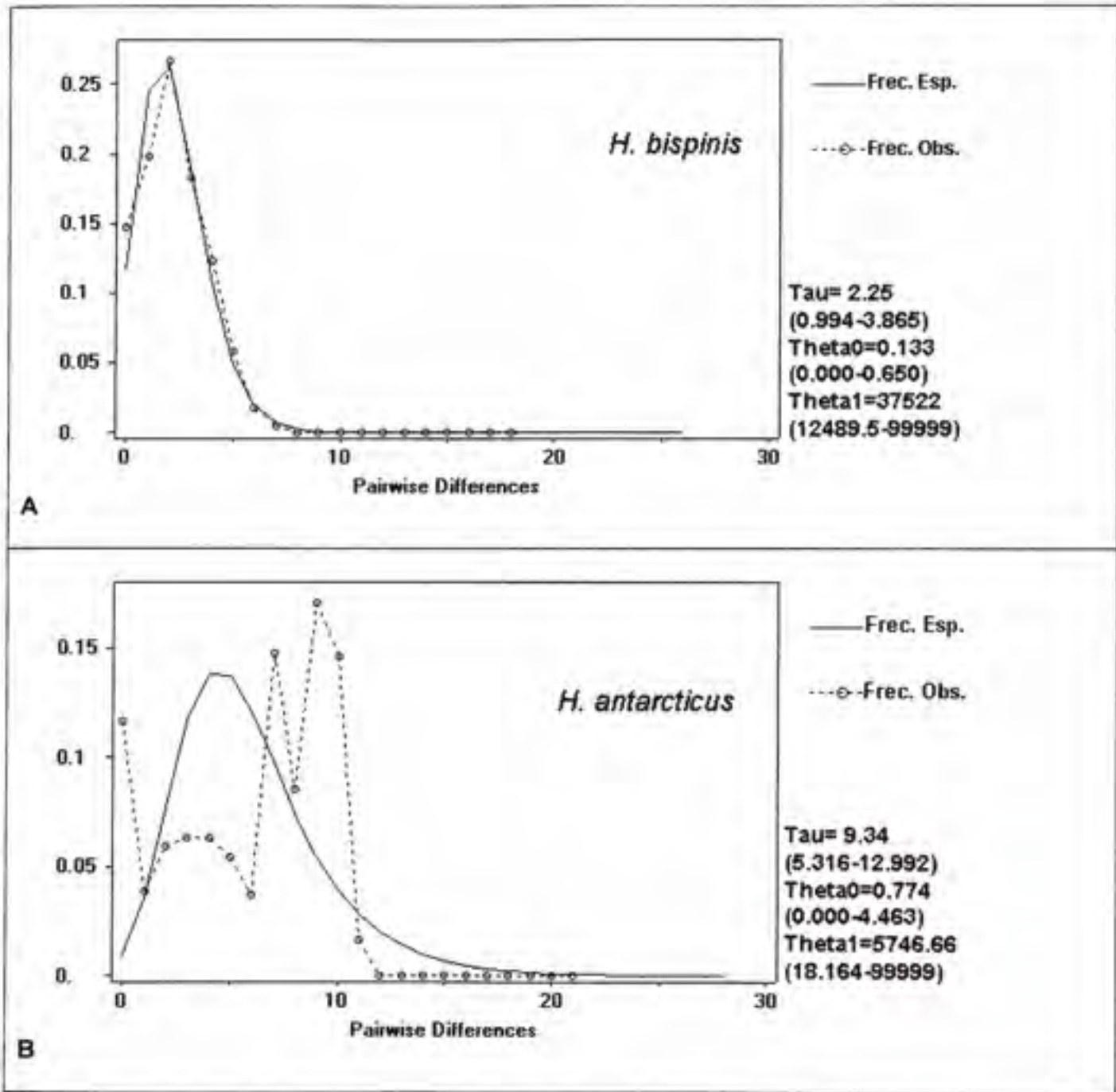


Figura 14. Distribución de diferencias pareadas en la región control (DNAmt) para *H. bispinis* (A) y *H. antarcticus* (B). El eje X indica el número de diferencias entre pares de secuencias, y el eje Y indica la frecuencia. Exhibiendo la distribución obtenida mediante los datos observados, y

bajo el modelo de expansión súbita. Entre paréntesis, se indican los intervalos de confianza del 95% para cada parámetro estimado (τ , θ_0 y θ_1).

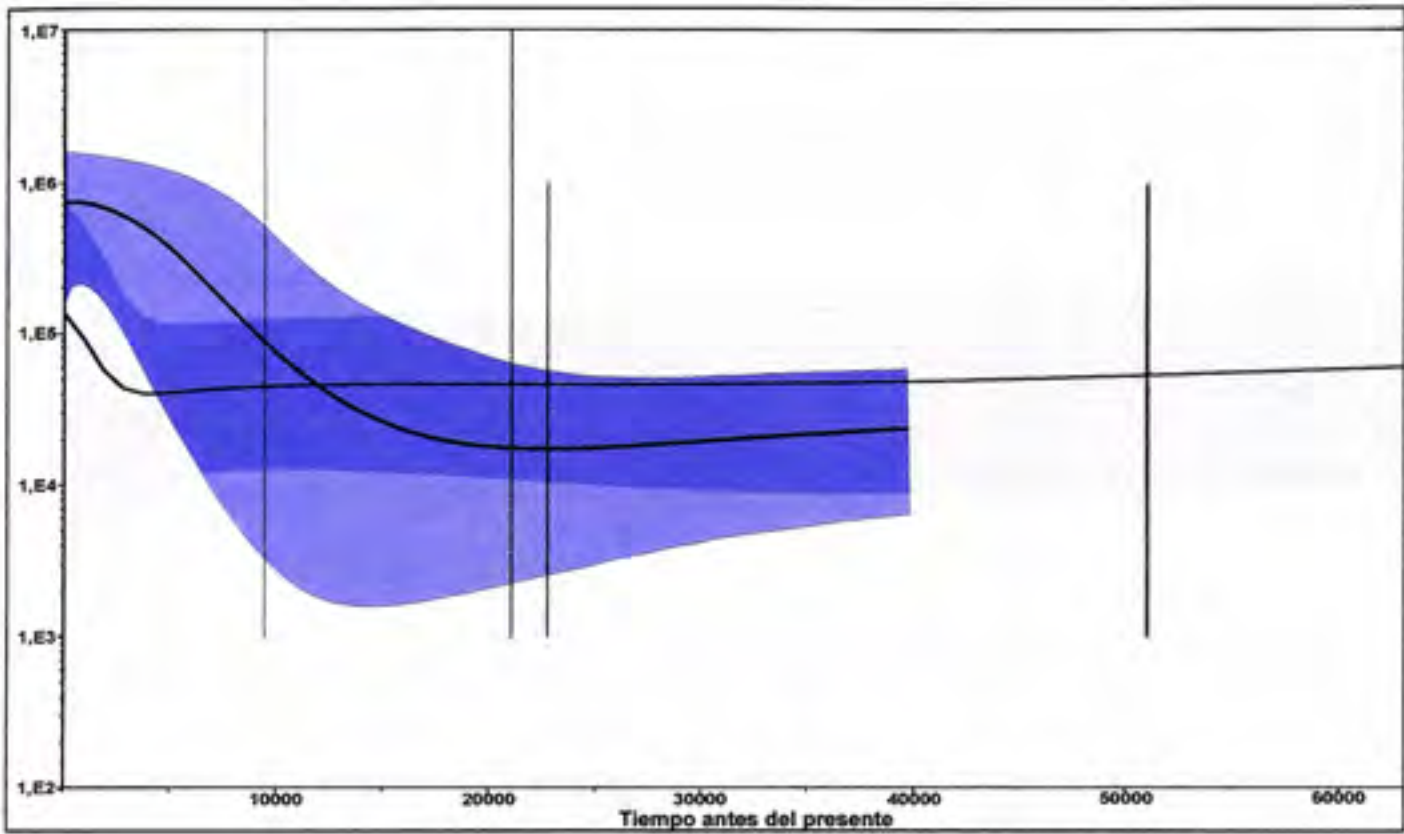


Figura 15. Estimación del tamaño poblacional histórico de *H. bispinis* (color azul) y *H. antarcticus* (color gris), mediante el método "Bayesian Skyline Plot". La línea negra es la estimación de la media y el área de color representa la región del 95% HPD.

7.- Discusión

Filogenia y estimación de los tiempos de divergencia.

El árbol construido a partir de las secuencias de la región control para el suborden Notothenioidei, presentó congruencias con otros estudios, donde utilizaron tanto DNA mitocondrial como nuclear (Demore *et al.*, 2002; Near *et al.*, 2012). Al respecto, la topología del árbol muestra dos grupos monofiléticos correspondientes *H. bispinis* y *H. antarcticus*. Además, los análisis de Máxima Verosimilitud y Inferencia Bayesiana entregaron valores altos de soporte entre dichos linajes.

La tasa de fijación obtenida para la región control, mediante la calibración del reloj molecular de Harpagiferidae (1.6% cambios/sitio/millón de años), es congruente a la utilizada por Zemlak *et al.*, (2010) en estudios filogeográficos de *Galaxias maculatus* en Patagonia y en especies marinas de altas latitudes en el hemisferio norte (Marko *et al.*, 2010). En contraste, Matschiner *et al.* (2009), utilizó tasas entre 4 y 5 veces más rápidas para la región control del notothenido Antártico *Gobionotothen gibberifrons*, basándose en la calibración realizada en peces Ciclidos del Lago Malawi, África, que presentan una rápida acumulación de mutaciones en un limitado periodo de tiempo (Sturmbauer, 2001). Sin embargo, la variación en la tasa de mutación mitocondrial puede ser en parte atribuida a la tasa metabólica, el tiempo generacional y la latitud asociada a la temperatura del agua (Nabholz *et al.*, 2008; Wright *et al.*, 2011; Lourenco *et al.*, 2012). En este sentido, se podría esperar una baja tasa de mutación en los peces notothenidos, a causa de la baja tasa metabólica que presentan y las extremas condiciones ambientales donde habitan (Clarke & Johnston 1999; Bargelloni *et al.*, 1994). En el presente estudio se utilizó la tasa obtenida en Harpagiferidae para estimar el tiempo de separación entre *H. bispinis* y *H. antarcticus*, mientras que para eventos evolutivos de menor antigüedad, relacionados a estimaciones de crecimiento poblacional, - donde el valor de la tasa

calibrada es mayor (Ho *et al.*, 2005; 2011; BurrIDGE *et al.*, 2008) - se utilizó la corrección a la tasa de un orden de magnitud mayor.

La estimación de los tiempos de separación obtenidos para Notothenioidei, presentó discrepancias con estudios previos (Matschiner *et al.*, 2011; Rutschmann *et al.*, 2011; Near *et al.*, 2012), en particular entre los clados de divergencia temprana. Por ejemplo, el MRCA de la familia Nototheniidae fue estimado en 14.3 Ma (95% HPD 16.5-12.2), mientras que Matschiner *et al.*, (2011), Rutschmann *et al.*, (2011) y Near *et al.*, (2012) estimaron en 21.4 Ma (95% HPD; 28.2-15.3 Ma), 18.6 Ma (95% HPD 24.0-13.4 Ma) y 22.4 Ma (95% HPD; 25.1-19.7), respectivamente. Esta incongruencia podría estar relacionada, tanto al modelo utilizado en la estimación de la divergencia, como a la utilización de diferentes marcadores moleculares. Además, en los estudios mencionados, se utilizó un reloj relajado, mientras que en el presente estudio se ocupó un reloj estricto. El reloj estricto es generalmente más apropiado cuando la divergencia entre las secuencias es reciente y la variación entre las tasas entre ramas es baja (95% HPD 0.0121-0.0082), proporcionando un intervalo posterior más reducido en la edad de los nodos (Brown & Yang 2011)

Según nuestra estimación, la divergencia entre las especies congéneres de Patagonia (*H. bispinis*) y Antártica (*H. antarcticus*), se habría iniciado durante el Pleistoceno Medio (1.07; 95% HPD 1.5-0.6 Ma). Por otra parte, al utilizar la aproximación de coalescencia, mediante el número promedio de diferencias haplotípicas entre *H. bispinis* y *H. antarcticus* ($\Pi_{inter} = 14.566$) y junto a la tasa de fijación obtenida para Harpagiferidae, el tiempo estimado de la separación se estimó en aproximadamente 780.000 años (1.6- 0.5 Ma), situando la divergencia otra vez en el Pleistoceno Medio. En base a estos resultados, se sugiere que la divergencia no estaría relacionada con la separación física de los continentes (~28 Ma) y sería además muy posterior a la intensificación de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA), a finales del Mioceno. Los resultados obtenidos, se contraponen con los resultados obtenidos entre invertebrados congéneres de Antártica y Sudamérica, por los cuales se estima la separación entre 5 y 3.7 Ma.

Por ejemplo, en los género de erizo *Sterechinus*, gastrópodo *Nacella* y bivalvo *Yoldia*, las especies congéneres presentan 56, 51 y 48 pasos mutacionales, respectivamente (González-Wevar *et al.*, 2010; González-Wevar *et al.*, 2013). Nuestros resultados, sitúan la separación de *Harpagifer* ~ 4 millones de años después de la divergencia de invertebrados como *Nacella* y *Sterechinus*. La presencia de una larva en *Harpagifer* con una prolongada fase pelágica, reportada en aproximadamente 12 meses (Kock & Kellerman, 1991; White & Burren, 1992), podría haber permitido una conectividad posterior a la intensificación de la CCA. Sin embargo, las especies de invertebrados mencionados anteriormente, al igual que *Harpagifer*, presentan una larva pelágica y en el caso de *Sterechinus*, la larva permanecería un tiempo similar a *Harpagifer*, de aproximadamente un año en la columna de agua (Díaz 2008). Proponemos que la reciente separación de *Harpagifer* habría ocurrido más bien por un proceso de dispersión que por un proceso de divergencia (Fig. 17). La dispersión hacia el extremo sur de América desde las islas del Arco de Escocia, podría estar asociada a una colonización durante la "Gran Glaciación Patagónica", la cual tuvo lugar probablemente entre 1.168 y 1.016 Ma. (Rabassa 2008). Los eventos cálidos de los ciclos interglaciales habrían puesto termino a la conexión, lo que se tradujo en una acumulación de diferencias genéticas entre las poblaciones de Antártica y Patagonia. La reciente separación podría explicar la permanencia de actividad anticongelante en *H. bispinis*, a diferencia de otros peces nototénidos que habitan en Sudamérica (*Dissostichus*, *Eleginops*, *Patagonotothen*), donde no se ha detectado actividad anticongelante (DeVries Com. Pers.). Además, la presencia de anticongelante en *H. bispinis* indicaría que el ancestro de esta especie se originó en la Antártica. Cabe destacar, que los resultados obtenidos deben ser tomados con cautela, ya que solo se utilizó un marcador mitocondrial (región control). En este sentido, para una mejor comprensión de la historia reciente del género *Harpagifer*, se debería incrementar el número de marcadores, tanto mitocondriales como nucleares.

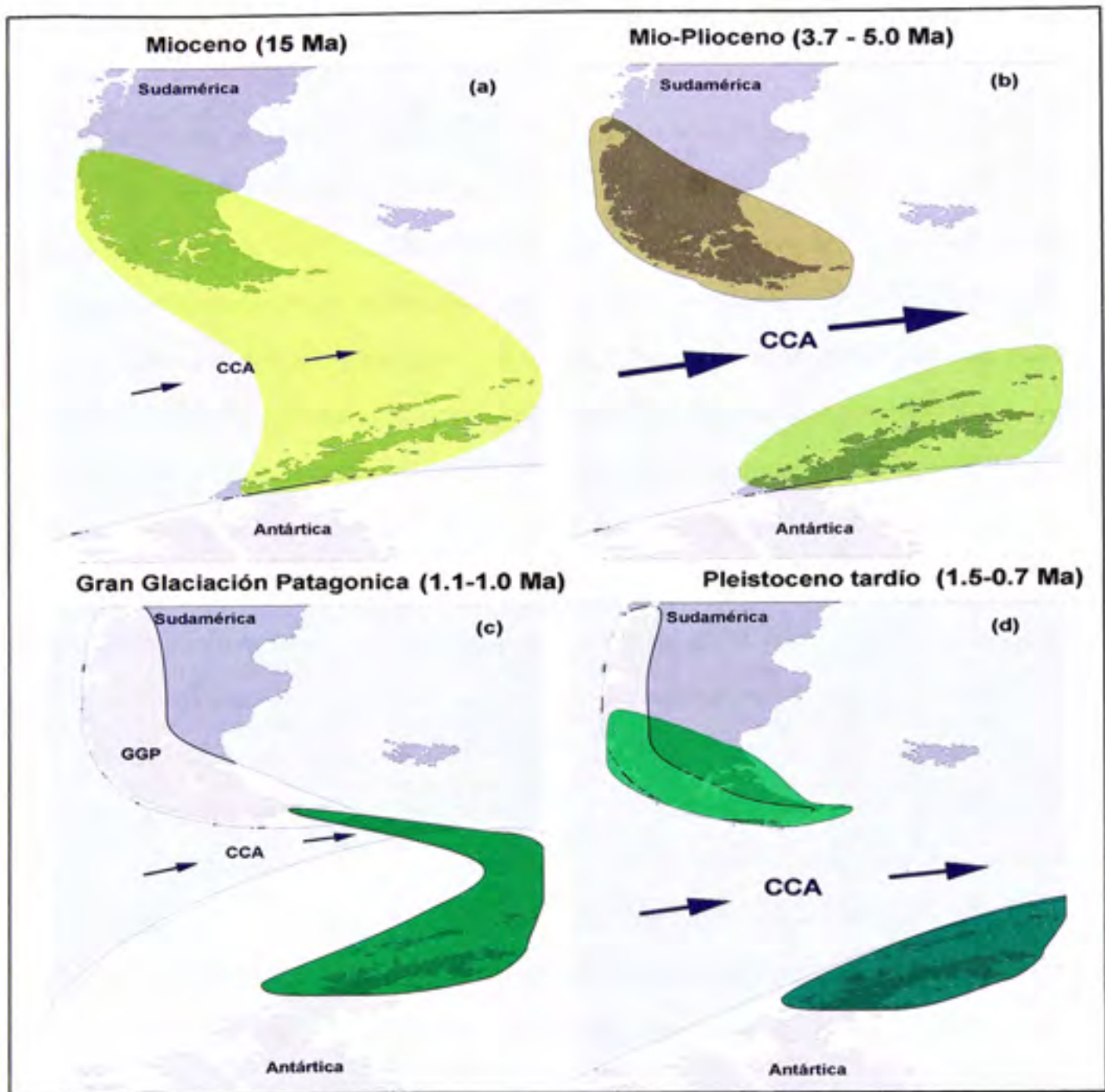


Figura 16. Patrones generales que describen los procesos de divergencia (a - b) en invertebrados marinos del genero *Sterechinus*, *Nacella* y *Yoldia* y los procesos de dispersión (c - d) en *Harpagifer* entre Sudamérica y Antártica. CCA (Corriente Circumpolar Antártica). GGP (Gran Glaciación Patagónica).

Diversidad genética intra-específica e inferencia demográfica.

Los índices de diversidad genética en *H. bispinis* a lo largo de su distribución, detectaron altos niveles de diversidad haplotípica y un moderado número promedio de diferencias nucleotídicas. Por un lado, los menores valores correspondieron al Fiordo Pía, localidad asociada al ventisquero Pía y que podría corresponder a una colonización reciente, a causa del retroceso de los hielos. Por otro lado, Carlos III y Fiordo Penguin registraron los mayores valores de diversidad, mientras que San Blas, la localidad más cercana al océano y que podría haber sido menos afectada por el UMG, presentó una diversidad genética moderada. Los índices estimados de diversidad en *H. bispinis* ($\theta_k = 10.81$; $\theta_H = 8.87$; $\theta_S = 3.46$; $\theta_\pi = 2.19$) deberían ser generados por tamaños efectivos (N_e) entre 11.779 y 58.143 individuos. Estas estimaciones son inferiores a la frecuencia de ocurrencia de *H. bispinis* en el intermareal del sistema de fiordo y canales de la zona central de la Patagonia (48°-52°S) (Hüne & Ojeda 2012) y en la zona sur de la Patagonia (53°-55°S) (Hüne Obs. Pers). En general, los índices de diversidad genética registrados en *H. bispinis*, son comparables a los obtenidos en el notothenido *Eleginops maclovinus* que habita en Patagonia (Ceballos *et al.*, 2012). Similarmente, tanto *H. bispinis* como *E. maclovinus*, exhiben índices de Tajima (D) y F_u (F_S) significativamente negativos, junto a una distribución unimodal de desajuste. En este escenario, las estimaciones de crecimiento en *H. bispinis* bajo el modelo de expansión súbita, habría ocurrido hace ~ 12.000 años, valor que coincide con la aproximación bayesiana Skyline Plot, que estimó el comienzo de la expansión hace ~ 15.000 años.

Por otra parte, *H. antarcticus* registró altos niveles de diversidad haplotípica y un elevado número promedio de diferencias nucleotídicas. Esta diversidad genética ($\theta_k = 8.40$; $\theta_H = 5.68$; $\theta_S = 4.65$; $\theta_\pi = 5.73$) debería sostenerse con tamaños efectivos (N_e) entre 30.819 y 45.180 individuos. La genealogía de *H. antarcticus* se caracterizó por una forma compleja, con un alto número de sustituciones entre los haplotipos. Resultados similares, se han detectado en el

nototénido *Trematomus newnesi*, pez bentónico-pelágico, de las islas Shetland de Sur, Antártica (Janko *et al.*, 2007). Al igual que en *T. newnesi*, en *H. antarcticus* se detectaron índices positivos de Tajima (D) y F_u (F_S) para la localidad de Bahía Fildes. No obstante este escenario, no se detectó *Trematomus bernacchii*. Este pez bentónico común en el submareal de las islas Shetland de Sur, presentó una red de haplotipos en forma de estrella y valores negativos en los índices de Tajima (D) y F_u (F_S) (Janko *et al.*, 2007). De esta forma, los índices positivos de Tajima (D) y F_u (F_S) en *H. antarcticus*, sumado a la distribución de desajuste multimodal y la aproximación bayesiana Skyline Plot, sugieren que esta especie no muestra señal de cambios demográficos

En base a nuestros resultados, las poblaciones de *H. bispinis* en Patagonia podrían evidenciar una expansión posterior al UMG, en los últimos 15.000 años. De esta forma, esta especie podría haber sido afectada por una disminución en su tamaño poblacional durante el UMG. En contraste, en la población de *H. antarcticus* no se detectó desviación del modelo de equilibrio mutación-deriva y presentó una distribución de desajuste multimodal, proponiendo un escenario de estabilidad poblacional en esta especie, reflejado en la ausencia de variaciones en la estimación del tamaño poblacional histórico. Proponemos que el patrón de diversidad genética detectado en *H. antarcticus*, podría haber ocurrido por la rápida recolonización desde múltiples refugios en las islas del Arco de Escocia, como por ejemplo las islas Georgia del Sur. La alta capacidad de dispersión larval (Kock & Kellerman, 1991; White & Burren, 1992), habría permitido mantener una conectividad entre las islas del Arco de Escocia y las islas Shetland de Sur, lo que se traduciría en altos niveles de diversidad genética en las islas Shetland de Sur. Por lo tanto, la presencia de un flujo genético habría permitido la recolonización de las áreas libres de hielo de las islas Shetland de Sur, posterior al UMG.

Harpagifer bispinis en el sistema de canales y fiordo de la Patagonia.

La ausencia de estructuración en *H. bispinis*, a lo largo de su distribución geográfica en el sistema de canales y fiordos de la Patagonia, sumado a la expansión demográfica posterior al UMG, presencia de un haplotipo dominante (H1) y ausencia de una relación entre flujo genético y distancia geográfica, sugieren que *H. bispinis* probablemente habría permanecido asociado al margen oeste del manto de hielo Patagónico, correspondiente al paleolitoral Pacífico. Esta respuesta biogeográfica a los cambios ambientales asociados a los ciclos glaciales, podría estar relacionada a la plasticidad fisiológica que presenta la especie y que le permite subsistir en ambientes de baja temperatura y salinidad (Fernandez & Calvo, 2009; Pérez *et al.*, 2003). Posteriormente, la presencia de una larva con una prolongada fase pelágica habría permitido una recolonización de hábitats postglaciales. En este sentido, el flujo genético entre las localidades analizadas, presentó leves diferencias en ambas direcciones. Esto implicaría una moderada dispersión larval dentro del sistema de canales y fiordos, lo que habría permitido una recolonización postglacial. Al respecto, se ha detectado un flujo genético asimétrico en la lapa *Nacella magellanica* entre los sectores Pacífico y Atlántico de la Patagonia, indicando una alta tasa de migración desde el sector Pacífico hacia la costa Atlántica de la Patagonia (González-Wevar *et al.*, 2012). Relacionado principalmente, a la dirección de los frentes oceánicos y los vientos de componentes Oeste (Acha *et al.* 2004; Waters 2008; Compagnucci 2011). Considerando estos resultados, parece improbable la existencia de una recolonización postglacial desde la costa Atlántica a la costa occidental de la Patagonia.

8.- Conclusiones

Se formularon las siguientes conclusiones en relación a las hipótesis expuestas en la Introducción.

*H1: La divergencia entre especies del género Harpagifer provenientes de Antártica y Patagonia se encuentra directamente relacionada a los cambios climáticos y oceanográficos del Océano Austral ocurridos a finales del Mioceno - principio del Plioceno. De esta forma, se espera encontrar una congruencia entre los tiempos de divergencia de ambas especies y los procesos climáticos y oceanográficos del Océano Austral, ocurridos a finales de Mioceno – principios del Plioceno, ya que la existencia de una larva planctotrófica que se mantiene en la columna de agua por varios meses, podría haber mantenido el contacto entre la Antártica y Patagonia por un mayor tiempo. El caso contrario, se espera que los tiempos de separación de las especies *H. bispinis* y *H. antarcticus*, estén directamente relacionados a los eventos geológicos más importantes ocurridos en el Océano Austral durante el Cenozoico que impidieron el flujo genético entre ambos continentes.*

El tiempo de divergencia estimado no se ajusta a la hipótesis que relaciona la separación de *Harpagifer* con los cambios climáticos y oceanográficos ocurridos en el Océano Austral a finales del Mioceno - principio del Plioceno, descartándose la hipótesis de especiación vicariante por eventos geológicos. En base a los resultados obtenidos a partir de las secuencias de DNA mitocondrial en *H. bispinis* y *H. antarcticus*, se sugiere que procesos de dispersión permitieron la reciente colonización del extremo sur de la Patagonia desde las islas del Arco de Escocia. Este proceso se habría gatillado durante "Gran Glaciación Patagónica" en el Pleistoceno. Los eventos cálidos de los ciclos interglaciales del Pleistoceno Medio habrían puesto término a la conexión, provocando la separación y posterior diferenciación entre ambas especies. Sin embargo, se sugiere que estos resultados deben ser contrastados con la

información que se obtenga de un mayor número de marcadores, tanto mitocondriales como nucleares, para tener una mejor comprensión histórica evolutiva del género *Harpagifer*.

H2: Durante los periodos glaciales del Pleistoceno, la desaparición de hábitat someros bentónicos fue más marcada en la Antártica que en la Patagonia, afectando de mayor manera a las poblaciones de H. antarcticus que a las de H. bispinis. Por lo tanto, se espera encontrar una menor diversidad genética en H. antarcticus que en H. bispinis, a causa de la disminución de los tamaños poblacionales en la Antártica, sumado a efectos de cuello de botella que habrían derivado en una disminución de la diversidad genética. El caso contrario, se espera que el efecto de los periodos glaciales sobre los hábitat, habrían afectado por igual a las poblaciones de Antártica y Patagonia. En consecuencia, ambas especies deberían exhibir una baja diversidad genética.

Los análisis de diversidad nucleotídica en *H. bispinis* y *H. antarcticus*, a diferencia de lo esperado, presentaron mayores valores en la especie Antártica, por lo que se descarta la predicción que plantea una menor diversidad genética en *H. antarcticus*. Estos resultados, están reflejados en la historia demográfica que indica escenarios contrastantes. En este sentido, *H. bispinis* habría experimentado una expansión posterior al UMG. En contraste, *H. antarcticus* no muestra señal de cambios demográficos, lo que queda de manifiesto al reconstruir el tamaño efectivo de la población en el tiempo pasado, utilizando eventos de coalescencia, donde no se aprecian cambios en el tamaño poblacional desde la estimación del MRCA hace ~ 54.000 años (95%HDP 91.700-22.700 años). Además, al observar su red de haplotipos y la distribución de desajuste, se aprecia una ausencia de haplotipos de baja frecuencia. Por lo tanto, la comparación de la historia demográfica entre las poblaciones de Antártica y Patagonia sugiere que los eventos glaciales del pleistoceno habría tenido un mayor efecto sobre *H. bispinis* (Patagonia) que sobre *H. antarcticus*. Al respecto, se plantea que *H. antarcticus* se habría mantenido en las islas del Arco de Escocia durante los periodos más

frios del Pleistoceno. Posterior al UMG, la especie habría recolonizado las islas Shetland del Sur desde múltiples refugios en las islas del Arco de Escocia, gracias a la alta capacidad de dispersión que le otorga la larva en su fase pelágica.

Finalmente, esta nueva hipótesis propuesta para explicar la estabilidad demográfica de *H. antarcticus*, aumenta la necesidad de las islas del Arco de Escocia, principalmente en las islas septentrionales de esta región, correspondientes a las islas Georgia del Sur y Sandwich del Sur.

H3: A causa de sus particulares adaptaciones fisiológicas y morfológicas para sobrevivir en ambientes de baja temperatura y con variaciones de salinidad, H. bispinis permaneció en refugios glaciales patagónicos asociados a los márgenes de formación y acumulación de hielo glacial durante los periodos más fríos del Cuaternario tardío. Sin que sus tamaños poblacionales se hayan visto mayormente afectados. Junto al retroceso progresivo de los hielos al inicio de las fases interglaciales, habría recolonizado los canales y fiordos. Por lo tanto, se espera encontrar en H. bispinis altos niveles de diversidad genética, a causa de un bajo efecto de la deriva. El caso contrario, los tamaños poblacionales de H. bispinis habrían disminuido durante los ciclos glaciales, exhibiendo bajos niveles de diversidad genética y ausencia estructuración poblacional, a causa de una recolonización reciente desde las zonas libres de hielo en los extremos de su actual distribución.

La ausencia de estructuración genética en *H. bispinis* a lo largo de su distribución geográfica, junto a índices de Tajima (D) y Fu (F_s) significativamente negativos y una distribución unimodal de desajuste, no se ajusta a la hipótesis relacionada a la permanencia en refugios glaciales *in situ*. Mas bien, sugiere que *H. bispinis* habría permanecido en el paleolitoral Pacífico adyacente al margen oeste del UMG. Luego del retroceso de los hielos, *H. bispinis* habría ampliado su distribución hacia los fiordos, recolonizando los hábitats postglaciales, mediante la capacidad migratoria que le otorga la larva que presenta una prolongada fase pelágica. Al respecto, se sugiere que la plasticidad de *H. bispinis* para soportar fuertes

variaciones en la salinidad y temperatura, debido a sus adaptaciones fisiológicas y morfológicas, podrían haber acelerado la recolonización.

9.- Referencias

Acha E., Mianzan H., Guerrero R., Favero M., Bava J. (2004) Marine fronts at the continental shelves of austral South America. *J Mar. Syst.* 44: 83-105.

Aljanabi S., Martinez I. (1997) Universal and rapid SALT-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nuc. Acids. Res.* 25: 4692-4693.

Amtz W., Thatje S., Gerdes D., Gili J-M., Gutt J., Jacob U., Montiel A., Orejas C., Teixidó N. (2005) The Antarctic-Magellan connection: macrobenthos ecology on the shelf and upper slope, a progress report. *Sci. Mar.* 69: 237-269.

Aronson R., Thatje S., Clarke A., Peck L., Blake D., Wilga C., Seibel B. (2007) Climate change and invisibility of the Antarctic benthos. *Ann. Rev. Evol. Syst.* 38: 129-154.

Balushkin A. (1994) *Proeleginops grandeastmanorum* gen. et sp. Nov. (Perciformes, Notothenioidei, Eleginopsidae) from the Late Eocene of Seymour Island (Antarctica) is a fossil notothenioid, not a gadiform. *J Ichthyol* 34(8): 10-23.

Balushkin A. (2000) Morphology, classification, and evolution of notothenioid fishes of the Southern Ocean (Notothenioidei, Perciformes) *J. Ichthyol.* 40: 74-109.

Bandelt H., Forster P., Röhl A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.

Bargelloni L., Ritchie P., Patarnello T., Battaglia B., Lambert D., Meyer A. (1994) Molecular Evolution at Subzero temperature: mitochondrial and nuclear phylogenies of fishes from Antarctica (Suborden Notothenioidei), and the Evolution of Antifreeze Glycopeptides. *Mol. Biol. Evol.* 11(6): 854-863.

Bargelloni L., Marcato S., Zane L., Patarnello T. (2000) Mitochondrial phylogeny of notothenioids: a molecular approach to antarctic fish evolution and biogeography. *Syst. Biol.* 49: 114-129.

Bargelloni L., Zane L., Derome N., Lecointre G., Patarnello T. (2000a) Molecular zoogeography of Antarctic euphausiids and notothenioids: from species phylogenies to intraspecific patterns of

genetic variation. *Antarc. Sci.* 12(3): 259-268.

Barker P., Filipelli G., Florindo F., Martin E., Scher H. (2007) Onset and role of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Res. II.* 54: 2388-2398.

Beerli P. (2006) Comparison of Bayesian and maximum-likelihood inference of population genetic parameters. *Bioinformatics.* 22(3): 341-345.

Beerli P., Palczewski M. (2010) Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics.* 185(1): 313-326.

Bermeche L., Dodson J., Boivin S. (1989) Population bottlenecks: influence on mitochondrial DNA diversity and its effect in coregonine stock discrimination. *J. Fish. Biol.* 35: 233-244.

Berry O., Tocher M., Sarre S. (2004) Can assignment tests measure dispersal? *Mol. Ecol.* 13: 551-561.

Brey T., Dahm M., Gorny M., Klages M., Stiller M., Amtz W. (1996) Do antarctic benthic invertebrates show an extended level of eurybathy? *Antarct. Sci.* 8: 3-6.

Brodeur J., Calvo J., Clarke A., Johnston I. (2003) Myogenic cell cycle duration in *Harpagifer* species with sub-Antarctic and Antarctic distributions: evidence for cold compensation. *J. Exp. Biol.* 206: 1011-1016.

Brown R., Yang Z. (2011) Rate variation and estimation of divergence times using strict and relaxed clocks. *BMC Evol. Biol.* 11: 271.

Burban C., Petit R., Carcreff E., Jactel H. (1999) Rangewide variation of the maritime pine bark scale *Matsucoccus feytaudi* Duc. (Homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Mol. Ecol.* 8(10): 1593-1602.

Burridge C., Dave C., Fletcher D., Waters J. (2008) Geological dates and molecular rates: fish DNA sheds light on time dependency. *Mol. Biol. Evol.* 25(4): 624-633.

Casaux R. (1998) The contrasting diet of *Harpagifer antarcticus* (Notothenioidei, Harpagiferidae) at two localities of the South Shetland Islands. *Antarctica Polar Biol.* 19: 283-285.

- Ceballos S., Lessa E., Victorio M., Fernandez D. (2012) Phylogeography of the sub-Antarctic notothenioid fish *Eleginops maclovinus*: evidence of population expansion. *Mar. Biol.* 159: 499-505.
- Chen L., DeVries A., Cheng C.-H.C. (1997) Evolution of antifreeze glycoprotein gene from a trypsinogen gene in Antarctic notothenioid fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 94: 3811–3816.
- Cheng C-HC., DeVries A. (1991) The role of antifreeze glycopeptides and peptides in the freezing avoidance of cold-water fish. En: di Prisco G (ed) *Life under extreme conditions: biochemical adaptation.* Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 1–14.
- Cheng C-HC. (1998) Origin and mechanism of evolution of antifreeze glycoproteins in polar fishes. En: di Prisco G, Pisano E, Clarke A (eds) *Fishes of Antarctica. A biological overview.* Springer, Milano, pp 311–328.
- Cheng C.-H.C., Chen L., Near T., Jin Y. (2003) Funcional antifreeze glycoprotein genes in temperate-water New Zealand Nototheniid fish infer an Antarctic evoluionary origin. *Mol. Biol. Evol.* 20(11): 1897-1908.
- Clark M., Clarke A., Cockell C., Convey P., Detrich III W., Fraser K., Johnston I., Methe B., Murray A., Peck LI., Römish K., Rogers A. (2004) Antarctic genomics. *Comp. Funct. Genom.* 5: 230-238.
- Clarke A., Johnston I.A. (1996) Evolution and adaptive radiation of Antarctic fishes. *Tree* 11(5): 212-218.
- Clarke A., Crame J.A. (1997) Diversity, latitude and time: patterns in the shallow sea. En: Ormond, R.F.G., Gage, J.D., Angel, M.V. (Eds.), *Marine Biodiversity: Causes and Consequences.* Cambridge University Press, Cambridge, pp. 122–147.
- Clarke A., Johnston I. (1999) Scaling of metabolic rate with body mass and temperature in teleost fish. *J. Anim. Ecol.* 68:893–905.
- Clarke A., Barnes D., Hodgson D. (2005) How isolated is Antarctica? *Trends in Ecology and Evolution* 1: 1–3.

- Compagnucci R. (2011) Atmospheric circulation over Patagonia since the Jurassic to Present: a review through proxy data and climatic modeling scenarios. *Biol. J. Lin. S.* 103: 229-249.
- Coulon A., Guillot G., Cosson J., Angibault J., Aulagnier S., Cargnelutti B., Galan M., Hewison A. (2006) Genetic structure is influenced by landscape features: empirical evidence from a roe deer population. *Mol. Ecol.* 15: 1669-1679.
- Crame J.A. (1999) An evolutionary perspectiva on marine faunal connections between southernmost south America and Antarctica. *Sci. Mar.* 1: 1-14.
- Damerau M., Matschiner M., Salzburger W., Reinhold H. (2012) Comparative population genetics of seven notothenioid fish species reveals high level of gene flow along ocean currents in the southern Scotia Arc, Antarctica. *Polar Biol.* 35: 1073-1086.
- DeConto R.M., Pollard D. (2003) Rapid Cenozoic glaciation of Antarctica induced by declining atmospheric CO₂. *Nature* 421: 245–249.
- Derome N., Wei-Jen C., Dettai A., Bonillo C., Lecointre G. (2002) Phylogeny of Antarctic dragonfishes (Bathydraconidae, Notothenioidei, Teleostei) and related families based on their anatomy and two mitochondrial genes. *Mol. Phy. Evol.* 24: 139-152.
- DeVries A. (1988) The role of glycopeptide and peptide antifreeze in the freezing avoidance of Antarctic fishes. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 611–621.
- Díaz A. (2008) Origen y evolución de la fauna marina bentónica antártica: diversidad genética y divergencia molecular entre especies congénica de Echinoidea de Antártica y Sudamérica. Tesis de magister en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Díaz A., Féral J-P., David B., Saucède T., Poulin E. (2011) Evolutionary pathways among shallow and deep sea echinoids of the genus *Sterechinus* in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research II* 58(1–2): 205–211.
- Duarte W., Moreno C. (1981) The specialised diet of *Harpagifer bispinis*: its effect on the diversity of Antarctic intertidal amphipods. *Hydrobiologia* 80:241-250.

Dobbs G.H., Lin Y., DeVries A. (1974) Agglomerularism in Antarctic fish. *Science* 185: 793–794.

Drummond A.J., Rambaut A. (2007) "BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees." *BMC Evol. Biol.* 7: 214.

Drummond A.J., Rambaut A., Shapiro B., Pybus O. (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22(5): 1185-1192.

Drummond A.J., Ho S., Phillips M., Rambaut A. (2006) Relaxed Phylogenetics and dating with confidence. *PlosOne* 4(5): 699-710.

Dupanloup I., Schneider S., Excoffier L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11: 2571-2581.

Eastman J. (1993) *Antarctic Fish Biology: Evolution in a unique Environment*. Acad. Press. San Diego. 322 pp.

Eastman J. (2000) Antarctic notothenioid fishes as subjects for research in evolutionary biology. *Antarctic Sci* 12: 276–287.

Eastman J. (2005) The nature of the diversity of Antarctic fishes. *Polar Biol.* 28: 93-107.

Eastman J., DeVries A. (1986) Renal glomerular evolution in Antarctic notothenioid fishes. *J. Fish Biol.* 29: 649–662.

Eastman J., Grande L. (1991) Late Eocene gadiform (Teleostei) skull from Seymour Island, Antarctic Peninsula. *Antarct Sci.* 3: 87-95.

Eastman J., Clarke A. (1998) Radiations of Antarctic and non-Antarctic fish. In *Fishes of Antarctica: A Biological Overview* Edited En: di Prisco G, Pisano E, Clarke A. Milan: Springer-Verlag Italia, 3-26.

Eastman J., McCune A. (2000) Fishes on the Antarctic continental shelf: evolution of a marine species flock? *J. Fish. Biol.* 57A: 84-102.

Excoffier L., Laval G., Schneider S. (2005) Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.

Fernández D.A., Calvo J. (2009) Fish muscle: the exceptional case of notothenioids. *Fish Physiol. Biochem.* 35: 43-52.

Felsenstein J. (2004) PHYLIP-Phylogeny Inference Package (version 3.2) *Cladistics.* 5: 164-166.

Filatov D.A. (2002) ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes* 2: 621-624.

Fraser C., Nikula R., Spencer H., Water J. (2009) kelp genes reveal effects of subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *PNAS* 106(9): 3249-3253.

Fraser C., Thiel M., Spencer H., Waters J. (2010) Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC Evol. Biol.* 10: 1-12.

Gernhard T. (2008) The conditioned reconstructed process. *J. Theor. Biol.* 253: 769-778.

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

González-Wevar C., Bruno D., Poulin E. (2011) Phylogeography and demographic inference in *Nacella (Patinigera) concinna* (Strebel, 1908) in the western Antarctic Peninsula. *Deep-Sea Research II* 58(1-2): 220-229.

González-Wevar C., Nakano T., Cañete J., Poulin E. (2011a) Concerted genetic, morphological and ecological diversification in *Nacella* limpets in the Magellanic Province. *Mol. Ecol.* 20(9): 1936-1951.

González-Wevar C., Hüne M., Cañete J., Mansilla A., Nakano T., Poulin E. (2012) Towards a model of postglacial biogeography in shallow marine species along the Patagonian Province: lessons from the limpet *Nacella magellanica* (Gmelin, 1791). *BMC Evol. Biol.* 12: 139 doi:10.1186/1471-2148-12-139.

González-Wevar C., Díaz A., Gérard K., Cañete J., Poulin E. (2013) Divergence time estimations and contrasting patterns of genetic diversity between Antarctic and southern South America benthic invertebrates. *Rev. Chi. Hist. Nat. En Prensa*.

Gotelli N., Entsminger G (2008) EcoSim: null models software for ecology. Version 7.72
Acquired Intelligence Inc. & Kesey-Bear. Jericho, VT 05465.
<http://www.garyentsminger.com/ecosim.htm>

Grobe H., Mackensen A. (1992) Late quaternary climatic cycles as recorded in sediments from the Antarctic continental margin. *Antarct. Res. Ser.* 56: 349-376.

Guillot G., Mortier F., Estoup A. (2005) Geneland: a program for landscape genetics. *Mol. Ecol. Notes.* 5: 712-715.

Hall T.A. (1999) BioEdit: A User-Friendly biological sequence alignment editor and analysis. Department of Microbiology, North Carolina State University.

Hein A., Hulton J., Dunai J., Sugden E., Kaplan R., Xu S. (2010) The chronology of the Last Glacial Maximum and deglacial events in central Argentine Patagonia. *Quat. Sci. Rev.* 29: 1212–1227.

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

Hewitt G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359: 183-195.

Ho S., Phillips M., Cooper A., Drummond A. (2005) Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol. Biol. Evol.* 22(7): 1561-1568.

Ho S., Shapiro B., Phillips M., Cooper A., Drummond A. (2007) Evidence for Time Dependency of Molecular Rate Estimates. *Syst. Biol.* 56(3): 515-522.

Larkin M., Blackshields G., Brown N., Chenna R., McGettigan P., McWilliam H., Valentin F., Wallace I., Wilm A., Lopez R., Thompson J., Gibson T., Higgins D. (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23(21): 2947-2948.

Lawver L., Gahagan L. (2003) Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecology*, 198:11-37.

Librado P., Rozas J. (2009) DnaSP v. 5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Lourenço J., Glémin S., Chiari Y., Galtier N. (2012) The determinants of the molecular substitution process in turtles. *J. Evol. Biol.* doi:10.1111/jeb.12031.

Lutjeharms J.E. (1990) The oceanography and fish distribution of the Southern Ocean. En: Gon O, Heemstra, P.C. (eds) *Fishes of the Southern Ocean*. JLB Smith Institute of Ichthyology Grahamstown, pp. 6–27.

Macaya E., Zuccarello G. (2010) Genetic structure of the giant kelp *Macrocystis pyrifera* along the southeastern Pacific. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 420: 103-112.

Marko P., Hoffman J., Emme S., McGovern T., Keever C., Cox N. (2010) The "Expansion-Contraction" model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change? *Mol. Ecol.* 19: 146-169.

Matschiner M., Hanel R., Salzburger W. (2009) Gene flow by larval dispersal in the Antarctic notothenioid fish *Gobionotothen gibberifrons*. *Mol. Ecol.* 18: 2574-2587.

Matschiner M., Hanel R., Salzburger W. (2011) On the origin and trigger of the Notothenioid adaptive radiation. *PlosOne* 6(4): 1-9.

Nabholz B., Glémin S., Galtier N. (2008) Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals – the longevity hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* 25: 120-130.

Near T. (2004) Estimating divergence times of notothenioid fishes using a fossil-calibrated molecular clock. *Mol. Biol. Evol.* 16(1): 37-44.

Near T., Pesavento J., Cheng C. (2004) Phylogenetic investigations of Antarctic notothenioid fishes (Perciformes: Notothenioidei) using complete gene sequences of the mitochondrial encoded 16S rRNA. *Mol. Phylogenet. Evol.* 32: 881-891.

Near T., Dornburg A., Kuhn K., Eastman J., Pennington J., Patarnello T., Zame L., Fernández D., Jones C. (2012) Ancient climate change, antifreeze, and the evolutionary diversification of Antarctic fishes. *PNAS* 109: 3434-3439.

Neyelov A., Prirodina V. (2006) Description of *Harpagifer permitini* sp. nova (Harpagiferidae) from the sublittoral zone of South Georgia and redescription of the littoral *H. georgianus* Nybelin. *J. Ichthyol.* 46: 1-12.

Nong G.T., Najjar R.G., Seidov D., Peterson W.H. (2000) Simulation of ocean temperature change due to the opening of Drake Passage. *Geophys Res Lett* 27: 2689–2692.

North A., White M. (1987) Reproductive strategies of Antarctic fish. En: *Proceedings of the Vth Congress of European Ichthyologists, Stockholm 1985* (Kullander, S. O. & Fernholm, B., eds), pp. 381–391. Stockholm: Swedish Museum of Natural History.

Nybelin O. (1947) Antarctic fishes. Scientific results of the Norwegian Antarctic Expeditions 1927-1928 et spp. *Nor Vidensk-Akad Oslo Arbok.* 2(26): 1-76.

Olney M.P., Bohaty S.M., Harwood D.M., Scherer R.P. (2009) *Creania lacyae* gen. nov. et sp. nov. and *Synedropsis cheethamii* sp. nov., fossil indicators of Antarctic sea ice? *Diatom Res* 24: 357–375.

Pagani M., Zachos J.C., Freeman K.H., Tipler B., Bohaty S. (2005) Marked decline in atmospheric carbon dioxide concentrations during the Paleogene. *Science* 309: 600–603.

Peck LI., Clark M., Clarke A., Cockell C., Convey P., Detrich III W., Fraser K., Johnston I., Methe B., Murray A., Römish K., Rogers A. (2005) Genomics: applications to Antarctic ecosystems. *Polar Biol.* 28: 351-365.

Pérez A.F., Calvo J., Tresguerres M., Carlos L. (2003) Agglomerularism in *Harpagifer bispinis*: a subantarctic notothenioid fish living at reduced salinity. *Polar Biol.* 26: 800-805.

Pons O., Petit R. (1995) Estimation variance and optimal sampling of gene diversity. I: haploid

locus. *Theor. Appl. Genet.* 90: 462-470.

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

Posada D. (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25(7): 1253-1256.

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

Provan J., Bennett D. (2008) Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends Ecol. Evol.* 23: 564-571.

Rabassa J. (2008) Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary sciences* 11: 151-205.

Rabassa J., Clapperton C. (1990) Quaternary glaciations of the Southern Andes. *Quat. Sci. Rev.* 9: 153-174.

Rabassa J., Coronato M., Salemne M. (2005) Chronology of the late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *J. South Am. Earth Sci.* 20: 81-103.

Richardson J. (1844) Ichthyology. In: Richardson J, Gray J.E. (eds) *The zoology of the voyage of HMS "Erebus" and "Terror" Under the command of Captain Sir J.C. Ross during 1839-43* London, 2(2), pp 8-139.

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

Röhl A. (2002) NETWORK, netw3111.exe downloaded from the web site: www.fluxusengineering.com

R Development Core Team. (2007) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna.

- Rutshmann S., Matschiner M., Damerau M., Muschick M., Lehmann M., Hanel R., Salzburger W. (2011) Parallel ecological diversification in Antarctic notothenioid fishes as evidence for adaptive radiation. *Mol. Ecol.* 22: 4707-4721.
- Ruzzante D., Walde S., Cussac V., Dalebout M., Seibert J., Ortubay S, Habit E. (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Ecology* 15: 2949-2968.
- Ruzzante D., Walde S., Gosse J., Cussac V., Habit E., Zemplak S., Adams E. (2008) Climate control on ancestral population dynamics: insight from patagonian fish phylogeography. *Mol. Ecol.* 17: 2234-2244.
- Sanchez S., Dettai A., Bonillo C., Ozouf-Costaz C., Detrich III W., Lecointre G. (2007). Molecular and morphological phylogenies of the Antarctic teleostean family Nototheniidae, with emphasis on the Trematominae. *Polar Bio.* 30: 155-166.
- Salinas P. (2010) Diversidad genética de *Galaxias maculatus* en el río Pascua y en el fiordo Calén: colonización postglacial de una cuenca patagónica y calibración del reloj molecular de la especie. Tesis de magister en Ciencias con mención en Ecología y Biología Evolutiva. Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Salzburger W., Ewing G., Haeseler A. (2011) The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Mol. Ecol.* 20: 1952-1963.
- Schneider S., Excoffier L. (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.
- Stamatakis A. (2006) RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics* 22: 2688-2690.
- Storey J., Taylor J., Siegmund D. (2004) Strong control, conservative point estimation and simultaneous conservative consistency of false discovery rates: a unified approach. *J. R. Stat. Soc. B.* 66: 187-205.
- Strugnell J., Rogers A., Prodohl P., Collins M., Allcock A. (2008) The thermohaline expressway: the Southern Ocean as a centre of origin for deep-sea octopuses. *Cladistics* 24: 1-8.

- Sturmbauer C., Baric S., Salzburger W., Rüber L., Verheyen E. (2001) Lakes level fluctuations synchronize genetic divergences of Cichlid fishes in African lakes. *Mol. Biol. Evol.* 18(2): 144-154.
- Sudgen E., Hulton J., Purves S. (2002) Modelling the inception of the Patagonian icesheet. *Quaternary International* 95-96. pp 55-64.
- Sukumara J., Holder M. (2010) DendroPy: A Python library for phylogenetic computing. *Bioinformatics* 26: 1569-1571.
- Thatje S., Hillenbrand C-D., Larter R. (2005) On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends Ecol Evol* 20: 534-540.
- Torsvik T., Gaina C., Redfield T. (2008) Antarctica and global paleogeography: From Rodinia, through Gondwanaland and Pangea, to the birth of the Southern Ocean and the opening of Gateways. En: Cooper A., Barret J., Storey H., Stump E., Wise W. (ed) *Antarctica: A keystone in a changing world. Proceedings of the 10th International Symposium on Antarctic Earth Science.* The National Academic Press, Washington, DC.
- Turner K., Fogwill C., McCulloch R., Sugden D. (2005) Deglaciation of the eastern flank of the north patagonian icefield and associated continental-scale lake diversions. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography* 87: 363-374.
- Waters J. (2008) Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern temperate marine biogeography, with new directions for dispersalism. *J. Biogeogr.* 35: 417-427.
- White M., Burren P. (1992) Reproduction and larval growth of *Harpagifer antarcticus* Nybelin (Pises, Notothenioidei). *Antarc. Sci.* 4: 421-430.
- Wilson N., Schrödl, M., Halanych K. (2009) Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Mol Ecol.* 18: 965-984.
- Wright S., Howard, R., Keeling J., McBride P., Gillman L. (2011) Thermal energy and the rate of genetic evolution in marine fishes. *Evol. Ecol.* 25: 525-530.

Xia X., Xie Z. (2001) DAMBE: Software package for data analysis in molecular biology and evolution. *J Heredity* 92: 371-373.

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

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

Zachos J., Dickens G., Zeebe R. (2008) An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature*, 451: 279-283.

Zane L., Marcato S., Bargelloni L., Bortolotto E., Papetti C., Simonato M., Varotto V., Patarnello T. (2006) Demographic history and population structure of the Antarctic silverfish *Pleuragramma antarcticum*. *Mol. Ecol.* 15: 4499-4511.

Zemlak T.S., Habit E., Walde S., Battini M., Adams E., Ruzzantes D. (2008) Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Mol. Ecol.* 17: 5049-5061.

Zemlak T.S., Habit E., Walde S., Carrea C., Ruzzante D. (2010) Surviving historical Patagonian landscapes and climate: molecular insights from *Galaxias maculatus*. *BMC, Evol. Biol.* 10:67.

Zhuang X., Cheng C-HC. (2010) ND6 gene "Lost" and found: Evolution of mitochondrial gene rearrangement in Antarctic Notothenioids. *Mol. Biol. Evol.* 27(6): 1391-1403.

Zwickl D. (2006) Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. Ph. D. dissertation. Univ. of Texas en Austin.