

Patrones de diversidad y estructura genética en especies antárticas y subantárticas de *Nacella* (Nacellidae)

Patterns of genetic diversity and structure in antarctic and subantarctic *Nacella* (Nacellidae) species

Claudio A. González-Wevar^{1,2,4}, Mathias Hüne^{2,3}, Sebastián Rosenfeld^{2,4}, Karin Gérard^{1,4}, Andrés Mansilla^{2,4} & Elie Poulin²

Resumen

La biogeografía del Océano Austral es el resultado de la compleja interacción de distintas fuerzas macroevolutivas sobre su particular biota en el tiempo y en el espacio. Los procesos de tectónica de placas que derivaron en la separación de los continentes junto al establecimiento de la Corriente Circumpolar Antártica y el enfriamiento paulatino de la región desde el Eoceno se han asociado directamente a la composición, abundancia y distribución de su fauna marina bentónica. Más recientemente, los procesos glaciales del Cuaternario impactaron fuertemente la distribución de la variación genética intraespecífica en una variedad de taxones. El género *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) incluye 11 especies nominales que se distribuyen en distintas provincias del Océano Austral. En este estudio se compararon los patrones de diversidad y estructura genética a nivel del DNA mitocondrial de cuatro especies de *Nacella* provenientes de Antártica marítima (*Nacella concinna*), Sudamérica (*Nacella magellanica*) y de dos islas ubicadas en el sector Índico del Océano Austral: Kerguelén (*Nacella edgari*) y Marión (*Nacella delesserti*). Bajos niveles de diversidad genética y ausencia de estructura caracterizan a cada una de las especies analizadas lo que muestra el tremendo impacto del avance y retroceso de los hielos sobre la demografía de todas ellas. Baja diversidad haplotípica, genealogías cortas y las demografías específicas sugieren la ocurrencia de efectos poblacionales más severos en Antártica marítima e Isla Marión que en el resto de las regiones subantárticas.

Palabras clave:

Océano Austral, biogeografía, filogeografía, Corriente Circumpolar Antártica, Último Máximo Glacial, *Nacella*.

Abstract

The biogeography of the Southern Ocean is the result of the complex interaction of different macroevolutionary forces over its particular biota in space and time. Plate tectonics processes derived in the separation of the continents, together with the establishment of the Antarctic Circumpolar Current and the gradual cooling of the region since the Eocene, are directly associated to the composition, abundance, and distribution of its marine benthic fauna. More recently, glacial processes of the Quaternary strongly impacted the distribution of the intraspecific genetic variation in different taxa. The genus *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) includes 11 nominal species that are distributed in different provinces of the Southern Ocean. In this study, we compared mitochondrial DNA patterns of genetic diversity and structure

¹ GAIA Antártica/Universidad de Magallanes, Av. Bulnes 01890, Punta Arenas, Chile.

² Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB).

³ Fundación Ictiológica, Providencia, Santiago, Chile.

⁴ Laboratorio de Macroalgas Antárticas y Subantárticas, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile.
✉ claudio.gonzalez@umag.cl; omeuno01@hotmail.com

in four *Nacella* species from maritime Antarctica (*Nacella concinna*), South America (*Nacella magellanica*), and two islands located in the Indian sector of the Southern Ocean: Kerguelen (*Nacella edgari*), and Marion (*Nacella delesserti*). Low levels of genetic diversity and absence of genetic structure characterize each one of the analyzed species showing the major impact of ice advances and retreats over the species' demographies. Low haplotypic diversity, short genealogies and specific demographies suggest the occurrence of more severe population effects in maritime Antarctica and Marion Island than in the rest of the subantarctic provinces.

Key words:

Southern Ocean, biogeography, phylogeography, Antarctic Circumpolar Current, Last Glacial Maximum, *Nacella*.

INTRODUCCIÓN

El Océano Austral (OA) alrededor del continente Antártico incluye 34,8 millones de kilómetros cuadrados (km²), representa un 8% de la superficie oceánica global y es considerado como el motor de la circulación planetaria (Rintoul *et al.* 2001). Esta vasta región alberga aproximadamente el 5% de la diversidad marina del planeta (Barnes & Peck, 2008; Barnes *et al.* 2009). La distribución de su fauna marina bentónica refleja la interacción entre procesos tectónicos, oceanográficos y climáticos sobre la distribución de los organismos a distintas escalas temporales y espaciales (Crame, 1999; Aronson *et al.* 2007; Griffiths *et al.* 2009; Pierrat *et al.* 2013). De acuerdo a Mackensen (2004) la biogeografía del OA durante el Cenozoico se ha visto dramáticamente afectada durante tres periodos de su historia. Primero, el límite Eoceno/Oligoceno hace 34 millones de años atrás (Ma) que marca el inicio del aislamiento del continente Antártico producto de la apertura de los pasos de Drake y de Tasmania y el inicio de la Corriente Circumpolar Antártica (CCA) (Zachos *et al.* 2001; Barker & Thomas, 2004). Actualmente, la CCA es delimitada por el Frente Polar (FP) y el Frente Subantártico (FSA) (Rintoul *et al.* 2001; Barker *et al.* 2007) y la posición de ellos tiene profundas implicancias biogeográficas

(Strugnell *et al.* 2008; González-Wevar *et al.* 2010; Griffiths *et al.* 2009; Poulin *et al.* 2014). Por un lado, la CCA actúa como una gran barrera para la mayoría de los invertebrados marinos entre provincias antárticas y subantárticas (Shaw *et al.* 2004; Page & Linse, 2002; Griffiths *et al.* 2009; González-Wevar *et al.* 2012a; Poulin *et al.* 2014). Por otro lado, a lo largo de Subantártica la CCA actúa como un importante medio de transporte entre provincias geográficamente distantes, especialmente para organismos con alta capacidad dispersiva (Gérard *et al.* 2008; Waters, 2008; Fraser *et al.* 2009; Díaz *et al.* 2011) y para aquellos que viven asociados a macroalgas (Nikula *et al.* 2010; Fraser *et al.* 2011; Cumming *et al.* 2014). El segundo periodo durante el Mioceno medio (~ 14 Ma) se asocia a un incremento en la formación de aguas de profundidad en el OA, la intensificación de CCA y al re-establecimiento de una capa de hielo permanente en Antártica Este y en el margen Pacífico de Península Antártica (Lawver & Gahagan, 2003; Verducci *et al.* 2009). Estudios moleculares recientes indican que las separaciones entre especies congénicas de invertebrados antárticos y subantárticos habría ocurrido mucho tiempo después de la separación física de los continentes. La divergencia molecular entre linajes de Antártica y Sudamérica estaría relacionada a cambios importantes ocurridos en el OA asociados a la evolución del Arco de Escocia y a la profundización del Paso de Drake a mediados del Mioceno (Dalziel *et al.* 2013). Junto a todos estos procesos geológicos y oceanográficos, el cambio climático ha tenido un gran rol en el OA desde el Cenozoico modelando la abundancia, estructura y distribución de su biota (Clarke & Crame, 1989, 2010; Aronson *et al.* 2007). El tercer periodo de marcados cambios en el OA ocurre durante el Cuaternario cuando la alternancia entre periodos glaciales e interglaciales afectaron en gran medida la estacionalidad e intensidad de la formación de hielo marino, así como también la posición de la ACC (Gersonde *et al.* 2005; Kemp *et al.* 2010). Junto con esto, la formación de grandes capas de hielo oceánico y continental generaron cambios mayores en la distribución espacial y en la demografía de poblaciones, especies y comunidades (Hewitt, 2000; Provan & Bennett, 2008; Marko *et al.* 2010). El avance y retroceso de

los hielos alteró radicalmente el rango geográfico y los tamaños poblacionales de muchas especies y por lo tanto afectaron la distribución de la variación genética intraespecífica (Maggs *et al.* 2008; Provan & Bennett, 2008; Alcock & Strugnell, 2012). Las comunidades marinas someras del OA, particularmente aquellas de Antártica, habrían sido especialmente vulnerables al avance y retroceso de los hielos (Thatje *et al.* 2005; Alcock & Strugnell, 2012; Dambach *et al.* 2012). Por lo tanto, se espera una relación directa entre latitud y el impacto de la formación de hielo continental sobre la demografía de las poblaciones y especies.

El género de patelogasterópodos *Nacella*

(Schumacher, 1817) incluye al menos 11 especies nominales distribuidas en provincias antárticas y subantárticas donde dominan los ecosistemas someros rocosos (Powell, 1973; Gúzman, 1978; González-Wevar *et al.* 2010, 2011; Ojeda *et al.* 2014). La mitad de las especies del género son endémicas de islas oceánicas subantárticas. A modo de ejemplo, las especies *Nacella delesserti* (Philippi, 1849), *Nacella edgari* (Powell, 1957) y *Nacella terroris* (Filhol, 1880) son endémicas de las islas Marión, Kerguelén y Campbell, respectivamente (Powell, 1973). Otras especies como *Nacella kerguelensis* (E.A Smith, 1877) y *Nacella macquariensis* (Finlay, 1926)

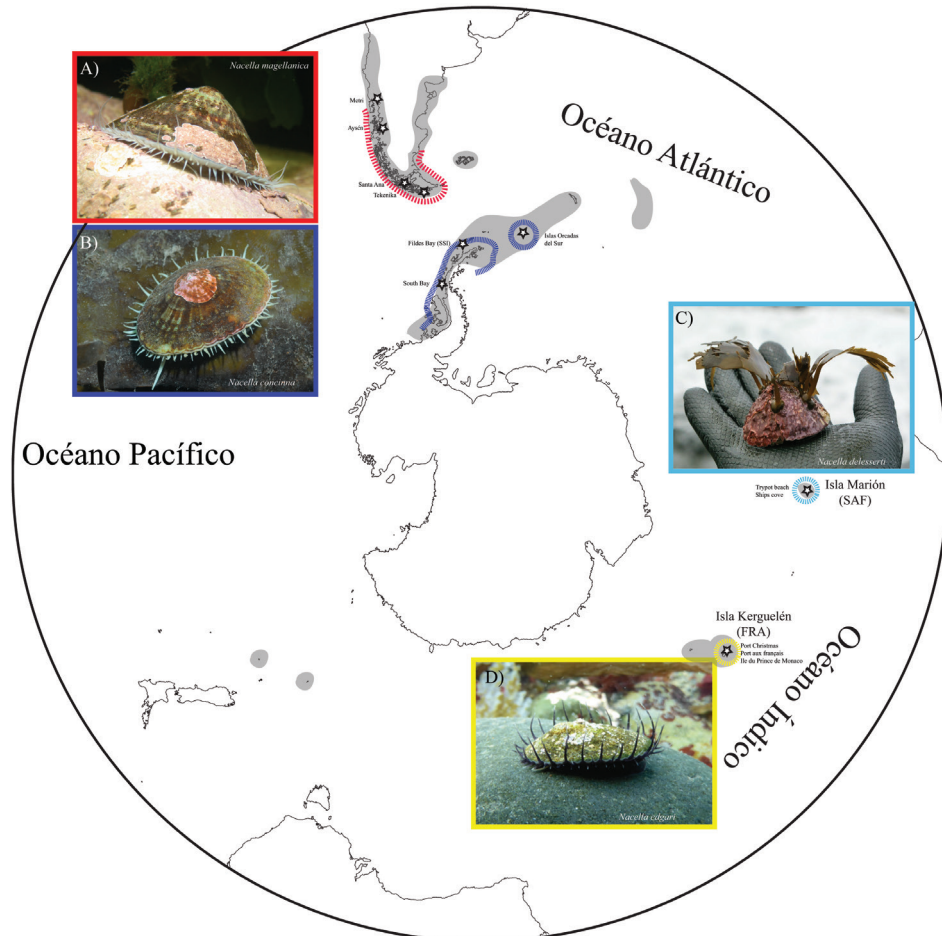


Fig. 1. Distribución de *Nacella* en el Océano Austral (en gris) incluyendo Antártica marítima, Sudamérica, e islas subantárticas (Marión, Kerguelén, Heard, Macquarie, y Campbell).

Las líneas discontinuas representan la distribución aproximada de las especies analizadas de *Nacella* donde rojo = *N. magellanica*; azul = *N. concinna*; celeste = *N. delesserti*, y amarillo = *N. edgari*. Fotografías submarinas cortesía de César Cárdenas (*N. magellanica*), Dirk Schories (*N. concinna*) y Elie Poulin (*N. edgari* y *N. delesserti*).

se encuentran en dos o más islas subantárticas. La lapa Antártica, *Nacella concinna* (Strebel, 1908) se distribuye en áreas libres de hielo a lo largo de Antártica marítima que incluye Península Antártica, archipiélagos e islas continentales, e islas asociadas como Georgia del Sur, Sandwich del Sur y Bouvet. Sudamérica alberga la mayor diversidad de especies para el género con nueve especies nominales descritas, ocho de las cuales se encuentran en Patagonia (Powell, 1973; Valdovinos & Rùth, 2005). No obstante, estudios moleculares recientes y estimaciones de tiempos de divergencia basadas en DNA mitocondrial (mtDNA) indican que la radiación patagónica de *Nacella* sería muy reciente (González-Wevar *et al.* 2010) y sólo cuatro de las ocho especies descritas *Nacella deaurata* (Gmelin, 1791), *Nacella flammea* (Gmelin, 1791), *Nacella magellanica* (Gmelin, 1791), y *Nacella mytilina* (Helbling, 1779) constituirían Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) (González-Wevar *et al.* 2011). Entre ellas, *N. magellanica* muestra la mayor distribución, encontrándose desde Chiloé en el Pacífico hasta la Provincia de Río Negro en el Atlántico, incluyendo la zona de los fiordos patagónicos, Tierra del Fuego, Cabo de Hornos e Islas Falkland/Malvinas (Powell, 1973; Valdovinos & Rùth, 2005). Finalmente, una de las especies del género, *Nacella clypeater* (Lesson, 1831), extiende su distribución por sobre los 40°S a lo largo de la costa Pacífica hasta la altura de Coquimbo (30°S) siguiendo la Corriente de Humboldt, una de las ramas de la CCA.

El principal objetivo del presente estudio fue evaluar y caracterizar los niveles de divergencia molecular entre especies congénicas de *Nacella* provenientes de distintas provincias del OA incluyendo Isla Kerguelén (*N. edgari*), Isla Marión (*N. delesserti*), Patagonia (*N. magellanica*) y Península Antártica (*N. concinna*). La información contenida en su material genético nos permitirá determinar los ritmos y tendencias en la biogeografía de este importante grupo de invertebrados bentónicos del OA. Al mismo tiempo, a través de análisis de genética de poblaciones estimaremos los patrones de diversidad y estructura en cada una de las especies analizadas para tener un mejor entendimiento acerca del impacto de los procesos glaciales del Cuaternario a lo largo de un gradiente latitudinal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las especies de *Nacella* analizadas fueron identificadas en base a Powell (1973) y Valdovinos y Rùth (2005). Nuevos ejemplares inter y submareales de *N. edgari* fueron colectados desde en distintas localidades de Isla Kerguelén (Tabla 1) y analizados de manera comparativa con datos previamente publicados para *N. magellanica* (González-Wevar *et al.* 2012), *N. concinna* (González-Wevar *et al.* 2011, 2013) y *N. delesserti* (González-Wevar *et al.* 2016). Todos los ejemplares fueron fijados en etanol (95%) y se extrajo DNA desde el manto mediante el método salino descrito por Aljnabi & Martínez (1997). Se amplificó un fragmento parcial del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI) utilizando partidores universales (Folmer *et al.* 1994) y específicos (González-Wevar *et al.* 2010). Las mezclas para las reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) fueron preparadas en 25 µl de reacción conteniendo 2,5 µl 10X Buffer (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0), 1,0 µl de 50 mM MgCl₂, 200 mM dNTPs, 0,5 µl de cada uno de los partidores (10 pg/µl), 1 U Taq polimerasa (Invitrogen), 17,5 µl de agua destilada deshionizada y 50 ng de DNA. Los parámetros térmicos de las PCR incluyeron una denaturación inicial a 94°C por 5 minutos, seguida de 35 ciclos a 94°C (1 min), 48°C (1 min), y 72°C (1 min), y una extensión final a 72°C (5 min). Los productos de PCR amplificados fueron purificados mediante el Kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN) y secuenciados en ambas direcciones. Las secuencias de cada uno de los ejemplares fueron ensambladas independientemente y editadas con el programa Proseq v.3.5 (Filatov, 2009), y alineadas con Muscle (Edgar, 2004). Las secuencias fueron traducidas a amino ácidos en MEGA v6.0 (Tamura *et al.* 2013) para corroborar la correcta amplificación y para descartar la posibilidad de amplificación inespecífica o de pseudogenes. Al mismo tiempo, se utilizó el programa MEGA para determinar la composición en bases nucleotídicas. Paralelamente, se realizó una prueba de saturación de DNA (Roe & Sperling, 2007) para evaluar de qué forma la saturación de transiciones se acumula en relación a la divergencia de los nucleótidos en el conjunto

Tabla 1. Índices de diversidad y pruebas de neutralidad en especies de *Nacella* provenientes de distintas provincias biogeográficas del Océano Austral incluyendo: *N. edgari* (Isla Kerguelén), *N. delesserti* (Isla Marión), *N. concinna* (Antártica marítima) y *N. magellanica* (Patagonia).

Especies y localidades	<i>n</i>	<i>k</i>	<i>H</i>	<i>S</i>	Π	π	Tajima's D	Fu's FS
<i>N. edgari</i>								
Port Christmas	28	7	0,767	8	1,354	0,0019		
Port Aux Français	32	9	0,633	8	0,869	0,0012		
Ile du Prince de Monaco	41	13	0,788	15	1,505	0,0021		
Total	101	20	0,750	19	1,287	0,0018	-1,92*	-16,013***
<i>N. concinna</i>								
South Bay (Pen. Ant.)	31	5	0,688	5	0,985	0,0014		
Islas Shetland del Sur	32	6	0,573	6	0,724	0,0010		
Isla Orcadas del Sur	26	9	0,625	8	0,757	0,0011		
Total	89	12	0,0627	11	0,827	0,0012	-1,84*	-8,07***
<i>N. delesserti</i>								
Trypot beach	40	4	0,345	3	0,362	0,0005	-1,06	1,73*
Ships cove	24	3	0,359	2	0,373	0,0005	-0,66	-0,63
Total	64	5	0,345	4	0,362	0,0005	1,23*	-2,73**
<i>N. magellanica</i>								
Metri	25	9	0,743	10	1,380	0,0020		
Aysén	24	6	0,496	6	0,790	0,0011		
Santa Ana	24	10	0,775	11	1,365	0,0020		
Tekenika	24	11	0,822	13	1,822	0,0027		
Total	97	25	0,714	28	1,409	0,0022	-2,24**	-24,33***

n = número de individuos analizados; *k* = número de haplotipos; *S* = sitios polimórficos; *H* = diversidad haplotípica; Π = número promedio de diferencia entre pares de secuencias; π = diversidad nucleotídica. **p*<0,05, ***p*<0,01, *** *p*<0,001.

completo de secuencias COI de *Nacella*.

Para efectos comparativos se incluyeron en los análisis de genética de poblaciones tamaños poblacionales similares por especie, localidad y área. Se estimó el número promedio de sustituciones y se calculó el porcentaje pareado de divergencia (*uncorrected p-distance*) entre los linajes de *Nacella* provenientes de distintas provincias del OA. Se determinó si la tasa de evolución era constante en las especies analizadas mediante un *likelihood ratio test* (Felsenstein, 1981) en DAMBE (Xia & Xie, 2001). Una vez que la constancia en la tasa

de evolución fue confirmada en *Nacella* se llevó a cabo estimaciones de los tiempos de divergencia utilizando la hipótesis del reloj molecular estricto (HRM) utilizando una tasa de evolución específica para *Nacella* (González-Wevar *et al.* 2010). Dicha hipótesis asume que las secuencias de DNA/proteínas evolucionan a una tasa constante en el tiempo y por lo tanto la divergencia genética entre dos especies es proporcional al tiempo desde el cual ellas compartieron un ancestro común (Bromham & Penny, 2003).

Se determinaron los niveles de

polimorfismo genético mediante la estimación de índices de diversidad estándar como el número de haplotipos (k), el número de sitios segregantes (S), la diversidad haplotípica (H), el número promedio de diferencias entre pares de secuencias (P), la diversidad nucleotídica (p) en cada localidad y para cada una de las especies en DnaSP v.5.00.07 (Librado & Rosas, 2009). Se realizaron pruebas de neutralidad, (D de Tajima y F_s de Fu; Tajima, 1989; Fu & Li, 1993) para estimar si las secuencias de COI en cada una de las especies se desvían significativamente de lo esperado bajo un modelo neutral. Se determinaron los niveles de diferenciación genética poblacional entre localidades de las distintas especies analizadas en base a sus frecuencias de haplotipos (G_{ST}) y a las diferencias promedio entre pares de secuencias (N_{ST}) (Pons & Petit, 1996) en el programa Arlequin (Excoffier *et al.* 2005). Se determinó la significancia estadística de la diferenciación genética mediante pruebas de permutación (20000 iteraciones) de las identidades de los haplotipos. Se determinó la estructura genética espacial de cada una de las especies a través del número y composición de grupos que más se diferencian entre ellos mediante un análisis de la varianza molecular (AMOVA) en Arlequin. El análisis de AMOVA permite utilizar múltiples escalas espaciales en métodos estadísticos para caracterizar la estructura espacial particionando la varianza molecular: i) dentro de las poblaciones, ii) entre poblaciones dentro de grupos y iii) entre grupos.

Se reconstruyeron relaciones genealógicas en cada una de las especies analizadas mediante redes de haplotipos de máxima parsimonia en Hapview (<http://www.cibiv.at>). Esta metodología permite la reconstrucción simple de filogenias basadas en datos de diversidad genética intraespecífica (Posada & Crandall, 2001). Finalmente, se compararon los patrones demográficos en las especies de *Nacella* utilizando la distribución de desajuste o de diferencias pareadas entre haplotipos (*mismatch distribution*) y comparándolas con la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional súbita (Rogers & Harpending, 1992). Este es un método comúnmente utilizado en inferencia demográfica considerando que la cantidad de diferencias nucleotídicas entre haplotipos depende de la cantidad de tiempo desde que divergieron.

RESULTADOS

Las secuencias mitocondriales de COI en las especies de *Nacella* analizadas incluyó un fragmento de 658 pares de bases y como se espera al trabajar con secuencias exónicas o codificantes no se detectaron inserciones/deleciones o codones de término al comparar el alineamiento con el marco de lectura de la proteína COI de invertebrados. Al mismo tiempo, las secuencias no estuvieron saturadas en ninguna posición pero se detectó un alto grado de polimorfismo entre las especies de *Nacella*, particularmente entre aquellas especies provenientes de distintas provincias biogeográficas del OA. Un total de 100 posiciones fue variable (15,19%) de las cuales 85 (85,00%) fueron informativas bajo el criterio de parsimonia. Se detectaron dos cambios de amino ácidos, una transición (de A a G: posición 157) y una transversión (de T a G: posición 106). Las secuencias mitocondriales del gen COI en *Nacella* fueron ricas en A-T (60,4%) comparado con el promedio de G-C.

Como se había determinado previamente en el género (González-Wevar *et al.* 2010), se detectó una marcada divergencia molecular entre los linajes de *Nacella* provenientes de Antártica marítima (*N. concinna*), Patagonia (*N. magellanica*) y la isla Subantártica Kerguelén (*N. edgari*). Al mismo tiempo, se detectó una estrecha relación entre la especie *N. delesserti* proveniente de Isla Marión en Subantártica y la geográficamente lejana *N. concinna* de Antártica marítima (Fig. 2A).

Al analizar estos resultados bajo un marco filogenético basado en multigenes (González-Wevar *et al.* 2016), se detecta una clara separación de *Nacella* en dos clados principales. El primero de ellos incluye a todos los linajes del género que actualmente se distribuyen en Sudamérica. El segundo clado incluye aquellas especies de Antártica marítima y de islas subantárticas (Marión y Kerguelén). Por un lado, la divergencia molecular entre la especie antártica *N. concinna* y las especies subantárticas *N. edgari* y *N. magellanica* fue de 6,9% y 8,3%, respectivamente. Similarmente, la divergencia molecular entre las especies subantárticas *N. magellanica* (Patagonia) y *N. edgari* (Isla Kerguelén) fue de 8,0%. Por otro lado, la divergencia molecular entre la especie antártica

N. concinna y la especie subantártica *N. delesserti* de Isla Marión fue menor a un 0,5%, lo cual habla de la estrecha relación entre ellas a pesar de la distancia geográfica que las separa.

Considerando una tasa específica de sustitución para nacélidos (González-Wevar *et al.* 2011), la divergencia entre los linajes principales de *Nacella* varía entre 3,5 Ma y 4,2 Ma. Sin embargo, la separación entre *N. concinna* y *N. delesserti* habría sido mucho más reciente, no más de 350000 años atrás.

Los patrones de diversidad genética entre las especies de *Nacella* mostró mayores niveles de diversidad en la mayoría de las especies subantárticas (Sudamérica e Isla Kerguelén) que en *N. concinna* de Antártica marítima (Tabla 1). De hecho, todos los índices de diversidad genética detectaron mayores niveles de diversidad en *N. edgari* (Isla Kerguelén) y *N. magellanica* (Patagonia) comparado con *N. concinna* de Antártica marítima. El caso particular de la especie subantártica *N. delesserti* de Isla Marión es interesante ya que muestra una menor diversidad genética que *N. concinna* en Antártica pero esto se debe a que *N. delesserti* se habría separado recientemente de la especie antártica. Las comparaciones poblacionales pareadas de N_{ST} y G_{ST} detectaron una ausencia de estructura genética en cada una de las especies analizadas.

Tanto la red general (Fig. 2A), como las redes específicas de haplotipos (Figs. 2B y 2E) mostraron patrones demográficos similares en las especies analizadas con topologías en forma de estrella y genealogías cortas con pocos pasos mutacionales. Sin embargo, como demostraron los índices de diversidad, el número de haplotipos fue considerablemente menor en la lapa Antártica *N. concinna* que en sus parientes subantárticas *N. magellanica* (Patagonia) y *N. edgari* (Isla Kerguelén). Nuevamente, la especie *N. delesserti* mostró el menor número de haplotipos entre las especies analizadas y esto puede estar asociado a un efecto fundador muy reciente en la especie.

La red de haplotipos de máxima parsimonia en *N. concinna* incluyó un total de 12 haplotipos con un haplotipo central (H1; Fig. 2B) presente en todas las localidades con una frecuencia de 58,4%. Un segundo haplotipo (H2) de frecuencia media (16,8%) se encuentra ampliamente distribuido en la especie. Todos los haplotipos de *N. concinna*

se encuentran relacionados al haplotipo dominante H1 a través de una diferencia de no más de dos pasos mutacionales (Fig. 2B). La red de haplotipos en *N. magellanica* (Patagonia) incluyó un total de 25 haplotipos diferentes (Fig. 2C). El haplotipo dominante (H1) se encuentra presente en el 51,5% de los ejemplares y se registró en todas las localidades analizadas. Un segundo haplotipo (H2) de frecuencia media (14,4%) se detectó en todas las poblaciones analizadas. Todos los haplotipos de *N. magellanica* están asociados al haplotipo dominante por no más de tres pasos mutacionales (Fig. 2C). La red de haplotipos en *N. edgari* (Isla Kerguelén) incluyó un total de 21 haplotipos diferentes (Fig. 2D). El haplotipo dominante en la especie (H1) se encontró en un 45,5% de los ejemplares y se registró en todas las poblaciones analizadas. En esta especie se detectaron dos haplotipos (H2 y H3) de frecuencia media 15,8% y 13,9%, respectivamente, en todas las poblaciones analizadas. Todos los haplotipos de *N. edgari* se encuentran relacionados al dominante (H1), por no más de seis pasos mutacionales. Finalmente, en la especie *N. delesserti* (Isla Marión) se detectó un total de cinco haplotipos (Fig. 2E). El haplotipo dominante en la especie (H1) se encontró en el 76,9% de los individuos y en todas las localidades analizadas. Un segundo haplotipo de frecuencia media (14,1%) también se registró en todas las localidades. Todos los haplotipos de *N. delesserti* se encuentran a un paso mutacional del haplotipo dominante de la especie (Fig. 2E).

Como se espera en base a las genealogías en forma de estrella, las pruebas de neutralidad de Tajima y Fu fueron todas negativas y significativas en todas las especies analizadas (Tabla 1). Similarmente, las distribuciones de *mismatch* en todas las especies analizadas tuvieron forma de L en el caso de *N. concinna* y *N. delesserti* y fueron unimodales sesgadas al eje Y en *N. magellanica* y *N. edgari*. Tales distribuciones se deben a que en cada una de las especies analizadas, la mayoría de los ejemplares compartían el mismo haplotipo. Asumiendo el modelo de expansión poblacional súbita y considerando una tasa de sustitución específica para *Nacella* (González-Wevar *et al.* 2011), las expansiones demográficas habrían comenzado alrededor de 3500 años para *N. delesserti* (Isla Marión), 5500 años para *N.*

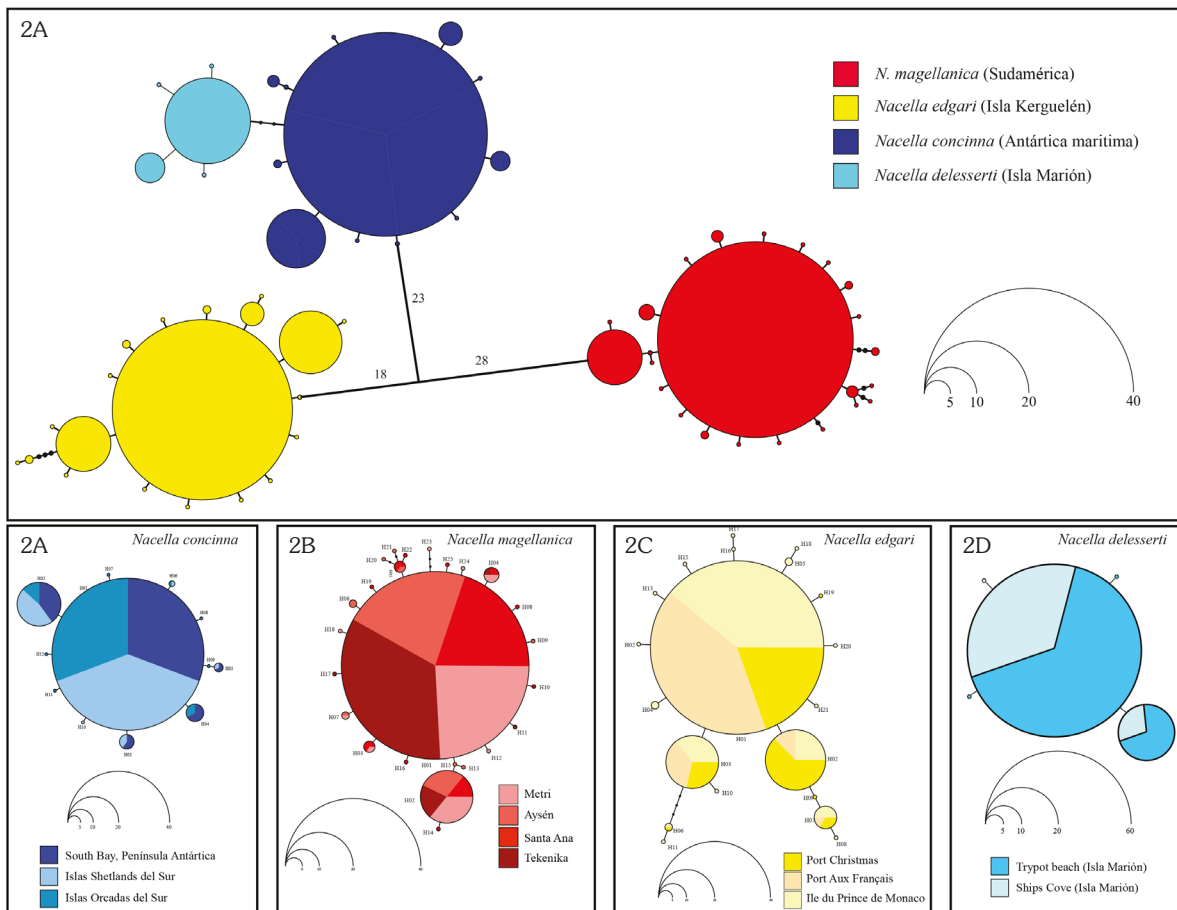


Fig. 2. A) Red general de haplotipos de máxima parsimonia en especies de *Nacella* donde se muestran la divergencia (basadas en *uncorrected p-distances*) entre ellas. Cada círculo coloreado indica la provincia a la que pertenece cada uno de los haplotipos mitocondriales registrado. Donde Amarillo = Isla Kerguelén (*N. edgari*); Azul = Antártica marítima (*N. concinna*); Celeste = Isla Marión (*N. delesserti*); y Rojo = Patagonia (*N. magellanica*). El tamaño de cada círculo es proporcional a su frecuencia en el esfuerzo de muestreo. B) Red de haplotipos de máxima parsimonia en *N. concinna* a lo largo de Península Antártica. C) Red de haplotipos de máxima parsimonia en *N. magellanica* a lo largo de Patagonia. D) Red de haplotipos de máxima parsimonia en *N. edgari* provenientes de distintas localidades de Isla Kerguelén. E) Red de haplotipos de máxima parsimonia en *N. delesserti* en dos localidades de Isla Marión.

concinna (Península Antártica), 7500 años para *N. magellanica* (Patagonia) y 4000 años para *N. edgari* (Isla Kerguelén).

DISCUSIÓN

El advenimiento de nuevas aproximaciones metodológicas en biología molecular y genética de poblaciones ha revolucionado los estudios en biogeografía, particularmente en la biota del Océano Austral (Linse *et al.* 2006; Griffiths *et al.* 2009; Fraser *et al.* 2009; González-Wevar *et al.* 2010, 2012; Downey *et al.* 2012; Pierrat *et al.*

2013; Poulin *et al.* 2014). El uso de distintas fuentes de información provenientes de la paleontología, paleoclimatología y de la paleogeografía, junto a aquellos obtenidos de secuencias de DNA hace posible la interpretación de los patrones actuales de distribución en un marco biogeográfico más preciso (Pearse *et al.* 2009).

Las comparaciones de DNA mitocondrial en especies del género *Nacella* provenientes de distintas provincias biogeográficas del OA reconocen marcadas divergencias moleculares entre linajes de Antártica marítima (*N. concinna*), Isla Kerguelén (*N. edgari*) y Patagonia (*N.*

magellanica). En este estudio, cada uno de los linajes anteriores representa diferentes unidades taxonómicas que han estado separadas por millones de años. Estimaciones de tiempos de divergencia basados en una tasa específica de sustitución indican una separación definitiva entre los linajes antárticos y subantárticos (Patagonia e Isla Kerguelén) durante el Plioceno, entre 3,5 y 4,2 Ma. De acuerdo a esto, para el género *Nacella* la CCA constituye una barrera efectiva que evita la conectividad entre provincias geográficamente lejanas de Antártica marítima, Isla Kerguelén y Patagonia. De esta forma, en el caso de *Nacella* se confirma uno de los paradigmas biogeográficos del Océano Austral, la clara diferenciación entre la fauna antártica y subantártica (Hedgepeth *et al.* 1969; Linse *et al.* 2006; Griffiths *et al.* 2009). En Subantártica, la marcada diferenciación entre los linajes de Patagonia e Isla Kerguelén contrastan con los resultados registrados en otros invertebrados que muestran altos niveles de conectividad entre provincias geográficamente alejadas. Distintos grupos de invertebrados incluyendo mitílidos (Gérard *et al.* 2008), crustáceos (Nikula *et al.* 2010), equinodermos (Díaz *et al.* 2011) y gasterópodos pulmonados (Cumming *et al.* 2014) muestran evidencia de conectividad contemporánea entre provincias subantárticas geográficamente alejadas. De esta forma, para *Nacella* la distancia geográfica, los patrones oceanográficos y rasgos de historia de vida como su modo de desarrollo representan una barrera infranqueable para la conectividad a lo largo de Subantártica (González-Wevar *et al.* 2010). Dentro de un marco filogenético basado en genes mitocondriales (González-Wevar *et al.* 2010), el origen de *Nacella* habría ocurrido hace aproximadamente 12 Ma cercano a la transición climática del Mioceno medio, un periodo de marcados cambios climáticos y oceanográficos en el Océano Austral (Zachos *et al.* 2001; Mackensen, 2004). Posteriormente, a fines del Mioceno y Plioceno, *Nacella* habría diversificado en distintas provincias del Océano Austral. Considerando que el origen y diversificación de *Nacella* es muy posterior a la separación física de los continentes en los que actualmente se distribuye (Livermore *et al.* 2005; Scher & Martin, 2006), la biogeografía del género no se asocia a eventos tectónicos sino que a procesos oceanográficos y climáticos más recientes (Zachos *et al.* 2001). Los niveles de divergencia estimados en *Nacella* son congruentes con datos moleculares recientes estimados en peces nototenoídeos (Stankovic *et al.* 2002; Near *et al.* 2012) y en distintos grupos de invertebrados marinos (Page & Linse, 2002; Wilson *et al.* 2009) que muestran procesos más recientes de diversificación que los esperados por procesos de vicarianza asociada tectónica de placas. En este contexto, los niveles de distancias genéticas en *Nacella* son comparables a aquellos detectados entre linajes de Antártica y Sudamérica de los géneros *Astrotoma* (Hunter & Halanych, 2008), *Odontaster* (Janosik *et al.* 2011), *Sterechinus* (Poulin *et al.* 2014) y *Yoldia* (González-Wevar *et al.* 2012a; Poulin *et al.* 2014). Por lo tanto, el inicio de la divergencia entre provincias del Océano Austral no parece ser una consecuencia directa de los procesos de deriva continental ocurridos en la región sino que se encuentran asociados a procesos climáticos y oceanográficos más recientes ocurridos durante el Mio-Plioceno (Zachos *et al.* 2001; Mackensen, 2004; Verducci *et al.* 2009). El caso particular de la especie subantártica *N. delesserti* en Isla Marión intriga considerando su estrecha relación con la especie antártica *N. concinna*. La estrecha relación entre ambas especies que provienen de provincias biogeográficas distintas y distantes no concuerda con el paradigma biogeográfico sobre la clara distinción entre la fauna antártica y subantártica. Al mismo tiempo, pone a prueba el concepto del aislamiento histórico de Antártica y sugiere la posible permeabilidad de la CCA durante el Cuaternario. Barnes *et al.* (2006) sugieren que a escalas temporales y ecológicas cortas ocurren eventos de dispersión natural entre antártica y subantártica mediada por aire, corrientes locales (eddies) y rafting. Al mismo tiempo, el transporte directo e indirecto mediado por humanos se ha vuelto cada vez más probable entre provincias del OA. Por lo tanto, a macro- y meso-escala el flujo de la CCA es complejo en dirección y velocidad y flujos turbulentos de velocidad crean eddies que hace que la corriente sea “porosa” al transporte de plancton en sentido Norte y Sur (Froneman *et al.* 1997). La presencia de krill antártico en la zona de los fiordos chilenos (Antezana, 1999) y la presencia de larvas de crustáceos no-antárticos en las Islas Shetland del Sur, Península Antártica (Thatje & Fuentes,

2003; Thatje & Arntz, 2004; Thatje *et al.* 2005) son evidencia de la conectividad entre provincias del OA a través de la CCA (Clarke *et al.* 2005). Sin embargo, en el caso de *Nacella*, la ausencia de haplotipos compartidos entre *N. concinna* (Antártica marítima) y *N. delesserti* (Isla Marión) sugieren una fuerte evidencia hacia la ausencia de flujo genético contemporáneo entre ambas provincias. De esta forma, la CCA aparentemente representa una barrera contemporánea al flujo de adultos o larvas de *Nacella* entre ambas regiones. Más aún, la monofilia recíproca entre ambas especies ha sido registrada con distintos tipos de marcadores moleculares (COI, Cytb, 28S rDNA), lo que sugiere un tiempo prolongado de evolución independiente (Hudson & Coyne 2002; de Queiroz, 2007). El proceso cladogenético que separó a ambas especies (350000 años) concuerda con la edad geológica de Isla Marión estimada en 450000 (Chown *et al.* 2008). Por lo tanto, nuestros resultados pueden explicarse a través de una permeabilidad transitoria de la CCA durante el Cuaternario permitiendo la colonización de la recientemente formada Isla Marión. Posterior a esto, la CCA se vuelve a transformar en una barrera biogeográfica efectiva que evita la conectividad entre ambas regiones. Una explicación alternativa para estos resultados implican que la colonización de Isla Marión por *Nacella*, más que estar relacionada a una mayor o menor permeabilidad de la CCA, se relacionaría a cambios latitudinales en la posición del Frente Polar durante los procesos glaciales del Cuaternario. Los límites de la CCA son dinámicos en el tiempo y en el espacio y su posición latitudinal ha variado durante el Cuaternario (Barnes *et al.* 2006; Fraser *et al.* 2009). Estudios paleontológicos basados en depósitos de diatomeas en el Atlántico registran movimientos del Frente Polar hacia el Norte de hasta 6° de latitud. El Pleistoceno medio marca un movimiento de hasta 7° de latitud hacia el Norte que se sostiene por 450000 años hasta el retorno a su posición actual (Kemp *et al.* 2010). Similarmente, Gersonde y colaboradores (2005) registraron una expansión de las aguas Antárticas de entre 5° y 10° durante el Último Máximo Glacial. En base a estos antecedentes, es posible que Isla Marión se haya encontrado al interior del Frente Polar durante los eventos glaciales más fríos del Cuaternario lo cual podría haber permitido

los eventos de dispersión a gran distancia desde Antártica marítima (González-Wevar *et al.* 2016).

Durante los últimos dos millones de años el clima de la Tierra ha sufrido fluctuaciones climáticas recurrentes que han resultado en las Eras de Hielo del Cuaternario. Actualmente, existe gran evidencia que demuestra como muchas especies experimentaron marcados y rápidos cambios latitudinales como respuesta al avance y retroceso de los hielos (Provan & Bennett, 2008; Marko *et al.* 2010). Muchos estudios han demostrado el impacto de los procesos glaciales del Cuaternario sobre las dinámicas poblacionales y la demografía de organismos en el Océano Austral (Convey *et al.* 2009; Fraser *et al.* 2009, 2010; Allcock & Strugnell, 2012; González-Wevar *et al.* 2012a). El registro fósil y los datos biogeográficos indican que la mayoría de la biota, y particularmente aquella de altas latitudes, habrían persistido en refugios ubicados en latitudes menores donde las condiciones climáticas habrían sido menos extremas (Hewitt, 2000; Provan & Bennett, 2008). Por lo tanto, el avance de hielos durante los periodos más fríos habría generado una mayor reducción de los ambientes marinos someros rocosos generando al mismo tiempo marcadas reducciones poblacionales. De acuerdo a esto, a altas latitudes se esperaría encontrar una marcada disminución de la diversidad genética producto de efectos cuellos de botella poblacionales o de efectos fundadores seguidos de expansiones poblacionales (Slatkin & Hudson, 1991). El conocimiento actual de dónde y cómo la especies antárticas y subantárticas sensibles al hielo habrían sobrevivido los procesos de extinción y colonización a medida que el hielo glacial cubría las regiones (Fraser *et al.* 2009). Las capas de hielo durante los máximos glaciales se habrían extendido hacia el norte por sobre los 60°S (Gersonde *et al.* 2005), restringiendo la penetración de la luz y la productividad primaria. Sin embargo, la fauna marina somera del OA sobrevivió y nuevos estudios moleculares ayudan a explicar los procesos y mecanismos asociados a su resiliencia (Strugnell & Allcock, 2012). Como patrón general, las especies de *Nacella* antárticas y subantárticas mostraron una fuerte señal de expansiones poblacionales post-glaciales. En cada una de las especies analizadas se detectó la presencia de un haplotipo dominante rodeado de varios haplotipos únicos o de baja

frecuencia (genealogías en forma de estrella). Tales resultados evidencian el impacto de los procesos glaciales sobre la demografía tanto en especies congénicas antárticas y subantárticas producto de la reducción de sus tamaños poblacionales y probablemente de sus respectivas distribuciones durante los periodos más fríos del Cuaternario. Los niveles de diversidad genética en especies antárticas y subantárticas son menores que los registrados en otros patelógasteropodos templados y tropicales (Nakano & Ozawa, 2005; Bird *et al.* 2007, 2011), pero comparables a aquellos registrados en nacélidos de altas latitudes (Goldstien *et al.* 2006; de Aranzamendi *et al.* 2009, 2011; González-Wevar *et al.* 2011). Estos resultados permiten corroborar el impacto generado por los ciclos glaciales del Cuaternario sobre los patrones de diversidad y estructura genética en Antártica y Subantártica. Bajos niveles de diversidad como los registrados en la lapa antártica han sido registrados en otros invertebrados de la región incluyendo *Chorismus antarcticus* (Pfeffer, 1887) (Raupach *et al.* 2010), *Parborlasia corrugatus* (McIntosh, 1876) (Thornhill *et al.* 2008) y *Sterechinus neumayeri* (Meissner, 1900) (Díaz *et al.* 2011). Como se esperaba dentro de un contexto latitudinal, los niveles de diversidad genética en *N. concinna* de Antártica fueron menores que los registrados en sus parientes subantárticos *N. magellanica* (Patagonia) y *N. edgari* (Isla Kerguelén), lo que sugiere un efecto demográfico más pronunciado de las glaciaciones a medida que aumenta la latitud. Dicha hipótesis debe ser puesta a prueba a través de estudios comparativos en otros géneros de invertebrados con distribuciones similares a la de *Nacella*. Los patrones de distribución de desajuste (*mismatch distribution*) en las especies de *Nacella* son consistentes con los patrones de diversidad genética registrados en las especies analizadas y sugieren la existencia de procesos post-glaciales de expansión poblacional en Antártica y Subantártica.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado gracias al apoyo del Proyecto de Iniciación Fondecyt 11140087, y a un proyecto de Gabinete INACH G_04-11 (C.G-W). Al mismo tiempo se agradecen a los proyectos P05-002 ICM y PFB 023 (Instituto de

Ecología y Biodiversidad IEB; C.G.-W. y E.P.). El acceso a Isla Kerguelén fue apoyado por el programa IPEV 1044 Proteker (E.P.). El acceso a Isla Marión fue a través de una colaboración con investigadores sudafricanos (Steven Chown). Agradecemos el apoyo de los programas de SCAR (Scientific Antarctic Research) AntEco y EBA y a CAML por apoyar los estudios en biología evolutiva de Antártica y Subantártica. Agradecimientos especiales a dos revisores anónimos por sus comentarios y sugerencias.

LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, 25, 4692-4693.
- Allcock, A. L., & Strugnell, J. M. (2012). Southern Ocean diversity: new paradigms from molecular ecology. *Trends in Ecology and Evolution*, 27, 520-528.
- Antezana, T. (1999). Plankton of Southern Chilean fjords: trends and linkages. *Scientia Marina*, 63, 69-80.
- Aronson, R. B., Thatje, S., Clarke, A., Peck, L. S., Blake, D. B., Wilga, C. D., & Seibel, B. A. (2007). Climate Change and Invasibility of the Antarctic Benthos. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 38, 129-154.
- Barker, P. F., & Thomas, E. (2004). Origin, signature and paleoclimatic influence of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth-Science Review*, 66, 143-162.
- Barker, P. F., Filippelli, G. M., Florindo, F., Martin, E. E., & Scher, H. D. (2007). Onset and role of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 54, 2388-2398.
- Barnes, D., Linse, K., Waller, C., Morley, S., Enderlein, P., Fraser, K., & Brown, M. (2006). Shallow benthic fauna communities of South Georgia Island. *Polar Biology*, 29, 223-228.
- Barnes, D. K. A., & Peck, L. S. (2008). Vulnerability of Antarctic shelf biodiversity to predicted regional warming. *Climate Research*, 37, 149-163.

- Barnes, D. K. A., Griffiths, H., & Kaiser, S. (2009). Geographic range shift response to climate change by Antarctic benthos: where to look. *Marine Ecology Progress Series*, 393, 13-26.
- Bird, C. E., Holland, B. S., Bowen, B. W., & Toonen, R. J. (2007). Contrasting phylogeography in three endemic Hawaiian limpets (*Cellana* spp.) with similar life histories. *Molecular Ecology*, 16, 3173-3186.
- Bird, C. E., Holland, B. S., Bowen, B. W., & Toonen, R. J. (2011). Diversification of sympatric broadcast-spawning limpets (*Cellana* spp.) within the Hawaiian archipelago. *Molecular Ecology*, 20, 2128-2141.
- Bromham, L., & Penny, D. (2003). The modern molecular clock. *Nature Reviews Genetics*, 4, 216-224.
- Chown, S., Lee, J., & Shaw, J. (2008). Conservation of Southern Ocean Islands: invertebrates as exemplars. *Journal of Insect Conservation*, 12, 277-291.
- Clarke, A., & Crame, A. (1989). The origin of the Southern Ocean marine fauna. En Crame, A. (Ed.), *Origins and evolution of the Antarctic Biota. Geological Society Special Publication*, 47, 253-268.
- Clarke, A., Barnes, D. K. A., & Hodgson, D. A. (2005). How isolated is Antarctica? *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 1-3.
- Clarke, A., & Crame, J. (2010). Evolutionary dynamics at high latitudes: speciation and extinction in polar marine faunas. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365, 3655-3666.
- Convey, P., Stevens, M., Hodgson, D., Smellie, J., Hillenbrand, C.-D., Barnes, D. K. A., Clarke, A., ... Cary, S. C. (2009). Exploring biological constraints on the glacial history of Antarctica. *Quaternary Science Reviews*, 28, 3035-3048.
- Crame, J. (1999). An evolutionary perspective on marine faunal connection between southernmost South America and Antarctica. *Scientia Marina*, 63, 1-14.
- Cumming, R. A., Nikula, R., Spencer, H., & Waters, J. M. (2014). Transoceanic genetic similarities of kelp-associated sea slug populations: long-distance dispersal via rafting? *Journal of Biogeography*, 41, 2357-2370.
- Dalziel, I. W. D., Lawver, L. A., Pearce, J. A., Barker, P. F., Hastie, A. R., Barfod, D. N., Schenke, H.-W., & Davis, M. B. (2013). A potential barrier to deep Antarctic circumpolar flow until the late Miocene? *Geology*, 41, 947-950.
- Dambach, J., Thatje, S., Rödder, D., & Basher, Z. (2012). Effects of late-Cenozoic glaciation on habitat availability in Antarctic benthic shrimp (Crustacea: Decapoda: Caridea). *Plos One*, 7, e46283.
- De Aranzamendi, M., Gardenal, C., Martin, J., & Bastidas, R. (2009). Limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) from the Southwestern Atlantic: species identification based on molecular data. *Journal of Molluscan Studies*, 75, 241-251.
- De Aranzamendi, M. C., Bastida, R., & Gardenal, C. N. (2011). Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the Southwestern Atlantic coast. *Marine Biology*, 158, 2405-2418.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879-886.
- Díaz, A., Féral, J.-P., David, B., Saucède, T., & Poulin, E. (2011). Evolutionary pathways among shallow and deep-sea echinoids of the genus in the Southern Ocean. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58, 205-211.
- Downey, R., Griffiths, H., Linse, K., & Janussen, D. (2012). Diversity and distribution patterns in high southern latitude sponges. *Plos One*, 7, e41672.
- Edgar, R. (2004). MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*, 5, 1.
- Excoffier, L., Laval, G., & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1, 47-50.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary Trees from

- DNA sequences : A maximum Likelihood Approach. *Journal of Molecular Evolution*, *17*, 124-138.
- Filatov, D. A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, *25*, 3189-3190.
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., & Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C Oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine Biology and Biotechnology*, *3*, 294-299.
- Fraser, C., Nikula, R., Spencer, H., & Waters, J. (2009). Kelp genes reveal effects of subantarctic sea during the Last Glacial Maximum. *Proceedings of the National Academy of Science, USA*, *106*, 3249-3253.
- Fraser, C. I., Thiel, M., Spencer, H. G., & Waters, J. M. (2010). Contemporary habitat discontinuity and historic glacial ice drive genetic divergence in Chilean kelp. *BMC Evolutionary Biology*, *10*.
- Fraser, C., Nikula, R., & Waters, J. (2011). Oceanic rafting by a coastal community. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *278*, 649-655.
- Froneman, P., Perissinotto, R., & Pakhomov, E. A. (1997). Biogeographical structure of the microphytoplankton assemblages in the region of the Subtropical Convergence and across a warm core eddy during austral winter. *Journal of Plankton Research*, *19*, 519-531.
- Fu, Y. X., & Li, W.-H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, *133*, 693-709.
- Gérard, K., Bierne, N., Borsa, P., Chenuil, A., & Féral, J.-P. (2008). Pleistocene separation of mitochondrial lineages of *Mytilus* spp. mussels from Northern and Southern Hemispheres and strong genetic differentiation among southern populations. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *49*, 84-91.
- Gersonde, R., Crosta, X., Abelmann, A., & Armand, L. (2005). Sea-surface temperature and sea ice distribution of the Southern Ocean at the EPILOG Last Glacial Maximum—a circum-Antarctic view based on siliceous microfossil records. *Quaternary Science Reviews*, *24*, 869-896.
- Goldstien, S., Schiel, D., & Gemmel, N. (2006). Comparative phylogeography of coastal limpets across a marine disjunction in New Zealand. *Molecular Ecology*, *15*, 3259-3268.
- Gonzalez-Wevar, C. A., Nakano, T., Cañete, J., & Poulin, E. (2010). Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *56*, 115-124.
- González-Wevar, C. A., Nakano, T., Cañete, J. I., & Poulin, E. (2011). Concerted genetic, morphological and ecological diversification in *Nacella* limpets in the Magellanic Province. *Molecular Ecology*, *20*, 1936-1951.
- Gonzalez-Wevar, C. A., Díaz, A., Gérard, K., Cañete, J., & Poulin, E. (2012a). Divergence time estimations and contrasting patterns of genetic diversity between Antarctic and southern South America benthic invertebrates. *Revista Chilena de Historia Natural*, *85*, 445-456.
- González-Wevar, C. A., Hüne, M., Cañete, J. I., Mansilla, A., Nakano, T., & Poulin, E. (2012b). Towards a model of postglacial biogeography in shallow marine species along the Patagonian Province: lessons from the limpet *Nacella magellanica* (Gmelin, 1791). *BMC Evolutionary Biology*, *12*, 139.
- González-Wevar, C. A., Saucède, T., Morley, S. A., Chown, S. L., & Poulin, E. (2013). Extinction and recolonization of maritime Antarctica in the limpet *Nacella concinna* (Strebel, 1908) during the last glacial cycle: toward a model of Quaternary biogeography in shallow Antarctic invertebrates. *Molecular Ecology*, *22*, 5221-5236.
- Gonzalez-Wevar, C. A., Chown, S. L., Morley, S. A., Coria, N., Saucède, T., & Poulin, E. (2016). Out of Antarctica: quaternary colonization of sub-Antarctic Marion Island by the limpet genus *Nacella* (Patellogastropoda:

- Nacellidae). *Polar Biology*, 39, 77-89.
- Griffiths, H. J., Barnes, D. K. A., & Linse, K. (2009). Towards a generalized biogeography of the Southern Ocean benthos. *Journal of Biogeography*, 36, 162-177.
- Guzmán, L. (1978). Patrón de distribución espacial y densidad de *Nacella magellanica* (Gmelin 1971) en el intermareal del sector oriental del Estrecho de Magallanes (Mollusca, Gastropodo). *Anales del Instituto de la Patagonia, Serie Ciencias Naturales*, 9, 207-219.
- Hedgpeth, J. (1969). *Distribution of selected groups of marine invertebrates in Waters South of 35°S Latitude* American Geographical Society, New York.
- Hewitt, G. M. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405, 907-913.
- Hudson, R., & Coyne, J. (2002). Mathematical consequences of the genealogical species concept. *Evolution*, 56, 1557-1565.
- Hunter, R. L., & Halanych, K. M. (2008). Evaluating connectivity in the brooding brittle star *Astrothoma agassizii* across the Drake Passage in the Southern Ocean. *Journal of Heredity*, 99, 137-148
- Janosik, A. M., Mahon, A. R., & Halanych, K. M. (2011). Evolutionary history of Southern Ocean *Odontaster* sea star species (Odontasteridae; Asteroidea). *Polar Biology*, 34, 575-586.
- Kemp, A. E. S., Grigorov, I., Pearce, R. B., & Naveira Garabato, A. C. (2010). Migration of the Antarctic Polar Front through the mid-Pleistocene transition: evidence and climatic implications. *Quaternary Science Reviews*, 29, 1993-2009.
- Lawver, L. A., & Gahagan, L. M. (2003). Evolution of Cenozoic seaways in the circum-Antarctic region. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, 198, 11-37.
- Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- Linse, K., Griffiths, H., Barnes, D. K. A., & Clarke, A. (2006). Biodiversity and biogeography of Antarctic and sub-Antarctic mollusca. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53, 985-1008.
- Livermore, R., Nankivell, A., Eagles, G., & Morris, P. (2005). Paleogene opening of Drake Passage. *Earth and Planetary Science Letters*, 236, 459-470.
- Mackensen, A. (2004). Changing Southern Ocean palaeocirculation and effects on global climate. *Antarctic Science*, 16, 369-386.
- Maggs, C. A., Castihlo, R., Foltz, D., Henzler, C., Jolly, M. T., Kelly, J., Olsen, J.,...Wares, J. (2008). Evaluating signatures of glacial refugia for North Atlantic benthic marine taxa. *Ecology*, 89, S108-S122.
- Marko, P. B., Hoffman, J. M., Emme, S. A., McGovern, T. M., Keever, C. C., & Nicole Cox, L. (2010). The 'Expansion-Contraction' model of Pleistocene biogeography: rocky shores suffer a sea change? *Molecular Ecology*, 19, 146-169.
- Nakano, T., & Ozawa, T. (2005). Systematic revision of *Patelloida pygmaea* (Dunker, 1860) (Gastropoda: Lottiidae), with a description of a new species. *Journal of Molluscan Studies*, 71, 357-370.
- Near, T. J., Dornburg, A., Kuhn, K. L., Eastman, J. T., Pennington, J. N., Patarnello, T., Zane, L.,...Jones, C. D. (2012). Ancient climate change, antifreeze, and the evolutionary diversification of Antarctic fishes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 109, 3434-3439.
- Nikula, R., Fraser, C. I., Spencer, H. G., & Waters, J. M. (2010). Circumpolar dispersal by rafting in two subantarctic kelp-dwelling crustaceans. *Marine Ecology Progress Series*, 405, 221-230.
- Ojeda, J., Rosenfeld, S., Marambio, J., Rozzi, R., & Mansilla, A. (2014). Patrones estacionales y espaciales de la diversidad de moluscos intermareales de bahía Róbaló, canal Beagle, Reserva de la Biosfera Cabo de Hornos, Chile. *Revista de Biología Marina y Oceanografía*, 49, 493-509.
- Page, T., & Linse, K. (2002). More evidence of speciation and dispersal across Antarctic Polar Front through molecular systematics of Southern Ocean *Limatula* (Bivalvia:

- Limidae). *Polar Biology*, 25, 818-826.
- Pearse, J. S., Mooi, R., Lockhart, S. J., & Brandt, A. (2009). Brooding and species diversity in the Southern Ocean: selection for brooders of speciation within brooding clades? En Krupnik, I., Lang, M., & Miller, S. (Eds), *Smithsonian at the Poles: Contribution to International Polar Year Science*. Washington D.C.: Smithsonian Institution Scholarly Press.
- Pfuhl, H. A., & McCave, N. I. (2005). Evidence for late Oligocene establishment of the Antarctic Circumpolar Current. *Earth and Planetary Science Letter*, 235, 715-728.
- Pierrat, B., Saucède, T., Brayard, A., & David, B. (2013). Comparative biogeography of echinoids, bivalves and gastropods from the Southern Ocean. *Journal of Biogeography*, 40, 1374-1385.
- Pons, O., & Petit, R. (1996). Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, 144, 1237-1245.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into Networks. *Trends in Ecology & Evolution*, 16, 37-45.
- Poulin, E., Gonzalez-Wevar, C. G., Díaz, A., Gérard, K., & Hüne, M. (2014). Divergence between Antarctic and South American marine invertebrates: What molecular biology tells us about Scotia Arc geodynamics and the intensification of the Antarctic Circumpolar Current. *Global and Planetary Change*, 123, 392-399.
- Powell, A. (1973). *The Patellid limpets of the World (Patellidae)* Auckland Institute and Museum Auckland, New Zealand.
- Provan, J., & Bennett, K. (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution*, 23, 564-571.
- Raupach, M. J., Thatje, S., Dambach, J., Rehm, P., Misof, B., & Leese, F. (2010). Genetic homogeneity and circum-Antarctic distribution of two benthic shrimp species of the Southern Ocean, *Chorismus antarcticus* and *Nematocarcinus lanceopes*. *Marine Biology*, 157, 1783-1797.
- Rintoul, S., Hughes, C., & Olbers, D. (2001). The Antarctic Circumpolar Current system. En G. Siedler, J. Church & J. Gould (Eds.), *Ocean Circulation and Climate* (pp. 1-32). Academic Press.
- Roe, A. D., & Sperling, F. A. H. (2007). Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44, 325-345.
- Rogers, A. R., & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9, 552-569.
- Scher, H. D., & Martin, E. E. (2006). Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science*, 312, 428-430.
- Shaw, P. W., Arkhipkin, A. I., & Al-Khairulla, H. (2004). Genetic structuring of Patagonian toothfish populations in the Southwest Atlantic Ocean: the effect of the Antarctic Polar Front and deep-water troughs as barriers to genetic exchange. *Molecular Ecology*, 13, 3293-3303.
- Slatkin, M., & Hudson, R. R. (1991). Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129, 555-562.
- Stankovic, A., Spalik, K., Kamler, E., Borsuk, P., & Weglenski, P. (2002). Recent origin of sub-Antarctic notothenioids. *Polar Biology*, 25, 203-205.
- Strugnell, J. M., Rogers, A. D., Prodöhl, P. A., Collins, M. A., & Allcock, A. L. (2008). The thermohaline expressway: the Southern Ocean as a centre of origin for deep-sea octopuses. *Cladistics*, 24, 853-860.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 585-595.
- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., & Kumar, S. (2013). MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30, 2725-2729.
- Thatje, S., & Fuentes, V. (2003). First record of anomuran and brachyuran larvae (Crustacea: Decapoda) from Antarctic waters. *Polar*

- Biology*, 26, 279-282.
- Thatje, S., & Arntz, W. E. (2004). Antarctic reptant decapods: more than a myth? *Polar Biology*, 27, 195-201.
- Thatje, S., Hillenbrand, C.-D., & Larter, R. (2005). On the origin of Antarctic marine benthic community structure. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 534-540.
- Thornhill, D. J., Mahon, A. R., Norenburg, J. L., & Halanych, K. M. (2008). Open-ocean barriers to dispersal: a test case with the Antarctic Polar Front and the ribbon worm *Parborlasia corrugatus* (Nemertea: Lineidae). *Molecular Ecology*, 17, 5104-5117.
- Valdovinos, C., & Ruth, M. (2005). Lapas Nacellidae del extremo sur de Sudamérica: taxonomía y distribución. *Revista Chilena de Historia Natural*, 78, 497-517.
- Verducci, M., Foresi, L. M., Scott, G. H., Sprovieri, M., Lirer, F., & Pelosi, N. (2009). The Middle Miocene climatic transition in the Southern Ocean: Evidence of paleoclimatic and hydrographic changes at Kerguelen plateau from planktonic foraminifers and stable isotopes. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 280, 371-386.
- Waters, J. M. (2008). Driven by the West Wind Drift? A synthesis of southern temperate marine biogeography, with new directions for dispersalism. *Journal of Biogeography*, 35, 417-427.
- Wilson, N. G., Schrödl, M., & Halanych, K. M. (2009). Ocean barriers and glaciation: evidence for explosive radiation of mitochondrial lineages in the Antarctic sea slug *Doris kerguelenensis* (Mollusca, Nudibranchia). *Molecular Ecology*, 18, 965-984.
- Xia, X., & Xie, Z. (2001). DAMBE: Software package for data analysis in Molecular Biology and Evolution. *The Journal of Heredity*, 92, 371-373.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., & Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations on global climate 65 Ma to present. *Science*, 292, 686-693.