



Universidad Austral de Chile

Facultad de Ciencias

Profesor Patrocinante

Dra. Leyla Cárdenas T.

Instituto de Ciencias Ambientales y
Evolutivas

Facultad de Ciencias.

**PATRONES DE DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE
BIVALVOS DEL GÉNERO *KIDDERIA* DE REGIONES
SUBANTÁRTICAS Y ANTÁRTICAS**

Tesis de Grado presentada como parte de
los requisitos para optar al grado de
Licenciado en Bioquímica y Título
Profesional de *Bioquímico*

DANIELA PAZ LEVICOY MANCILLA

VALDIVIA – CHILE

2017

Agradecimientos

Agradecer al Proyecto FONDAP IDEAL 15150003 por su financiamiento y especialmente a la profesora Leyla Cárdenas, por acogerme en su laboratorio desde mis primeras experiencias en él hasta esta etapa, a su apoyo, permitiéndome ser parte de la ciencia antártica, y a las correcciones que le brindó a esta tesis.

Agradecer de forma muy especial a mi familia, mis amados, queridos padres Daniel y Marcela y hermano Ignacio, que sin su apoyo incondicional y fortaleza nada de esto hubiera sido posible. A mi hermosa mascota Serenita que nos acompaña con su incuantificable cariño.

A mis cuatro abuelos, que tengo la fortuna de tenerlos conmigo.

A todas las personas que conocí en este camino que de algún modo permitieron mi evolución y finalizar una nueva etapa de la vida.

Hace varios años leí esta frase cito: *"Cuando una persona desea realmente algo, el Universo entero conspira para que pueda realizar su sueño..."* (El alquimista- Paulo Coelho) se viene a mi mente ya que hoy hace aún más sentido.

¡Muchas gracias!

INDICE GENERAL

INDICE DE FIGURAS	II
INDICE DE TABLAS	IV
ABREVIATURAS	V
1. RESUMEN	1
1.1 SUMMARY	2
2. INTRODUCCIÓN	3
2.1 Eventos históricos en el Océano Austral	3
2.2 Diversificación de especies en el Océano Austral	6
2.3 Bivalvos antárticos	10
2.4 Especies del género <i>Kidderia</i> como modelo de estudio	11
2.5 Utilidad de los estudios filogenéticos y filogeográficos en modelos Antárticos	15
2.6 HIPÓTESIS	19
2.7 OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS	20
3. MATERIALES Y MÉTODOS	21
4. AVANCE DE RESULTADOS	32
5. DISCUSIÓN	44
6. RESULTADOS ESPERADOS	51
7. LITERATURA CITADA	54

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo de circulación oceánica global que enfatiza el papel central del Océano Austral.

4

Figura 2. Resumen de los principales eventos históricos geológicos ocurridos durante la Era del Cenozoico.

7

Figura 3. Localización de las especies del género *Kidderia* en regiones Antárticas y Punta sur de América (Subantártico).

14

Figura 4. Mapas de los sitios de muestreo en las regiones Antártica y Subantártica.

22

Figura 5. Imágenes de microscopía electrónica *Kidderia bicolor* (Martens, 1885) de Isla Doumer (Antártica).

33

Figura 6. Imágenes de microscopía electrónica *Kidderia sp1* de Isla Diego Ramírez (Subantártica).

35

Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica *Kidderia sp2* de Isla Livingston (Punta Hannah, Shetland del Sur).

36

Figura 8. Filogenia molecular del gen *ssu* de bivalvos antárticos. 42

Figura 9. Filogenia molecular del gen citocromo C oxidasa I (*cox1*) de bivalvos antárticos.

43

INDICE DE TABLAS

Tabla I. Sitios de muestreo, coordenadas y tamaño muestral de las muestras recolectadas durante el año 2017.	23
Tabla II. Partidores de los genes <i>ssu</i> y <i>cox1</i> para el desarrollo de procesos de estandarización de PCR.	26
Tabla III. Índices de diversidad genética para secuencias mitocondriales.	38
Tabla IV. Grupos internos y externos usados para los análisis filogenéticos, obtenidos de la Base pública Genbank.	40

ABREVIATURAS

ADNg: Ácido desoxirribonucleico (genómico)

ADNmt: Ácido desoxirribonucleico (mitocondrial)

CCA: Corriente circumpolar antártica

CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio

cox1: gen Citocromo oxidasa subunidad 1

FPA: Frente polar antártico

FPS: Frente polar subtropical

Ma: Millones de años

OA: Océano austral

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

ssu: gen small subunit rRNA (Subunidad menor del ARN ribosomal)

1. RESUMEN

El continente Antártico está separado por tres grandes barreras que determinan el flujo genético entre diferentes taxa que lo habitan: i) la corriente circumpolar antártica (CCA), ii) la batimetría y iii) la distancia geográfica entre los continentes América del Sur y la Antártica. El modelo biológico de este estudio son pequeños bivalvos del género *Kidderia*, organismos que habitan en el intermareal rocoso con una distribución que incluye las islas Subantárticas como Georgia del Sur, Heard, Kerguelen, Falkland y la región magallánica, y en la Antártica como la región del Mar de Weddell. Poseen un ciclo de vida incubatorio y su clasificación taxonómica es aun controversial existiendo apenas algunos caracteres morfológicos usados para diferenciar las especies del género. Utilizando genes nucleares ribosomales como el gen *ssu* y genes mitocondriales como el gen del citocromo C oxidasa I (*cox1*) se intentará poner a prueba las siguientes hipótesis: 1) Debido a barreras históricas que limitaron el flujo genético entre la Antártica y regiones Subantárticas, se espera que las especies de género *Kidderia* de ambos ambientes correspondan a entidades taxonómicas diferentes, y 2) Dado el bajo potencial de dispersión y a la distribución geográfica de *Kidderia bicolor* se espera que exista estructuración genética entre diferentes poblaciones localizadas en la península Antártica. Resultados preliminares muestran que existiría concordancia entre las descripciones morfológicas y la sistemática molecular revelando que *Kidderia bicolor* pertenece a la familia Cyamiidae y que las unidades taxonómicas *Kidderia bicolor* y *Kidderia sp2* son taxa válidos y separados por 13 pasos mutacionales, determinado a través del gen *ssu*.

1.1 SUMMARY

The Antarctic continent is separated by three major barriers that determine the genetic flow between different taxa that inhabit it: (i) Antarctic circumpolar current (CCA), (ii) bathymetry and (iii) geographical distance between continents South America and Antarctica. The biological model of this study are the small bivalves of *Kidderia* genus organisms that inhabits the rocky intertidal with a distribution that includes subantarctic islands such as South Georgia, Heard, Kerguelen, Falkland and the Magellanic region, and in Antarctica as the Region of the Weddell Sea. They have a brooding life cycle and its taxonomic classification is still controversial, with only a few morphological characters used to differentiate species from the genus. Using nuclear ribosomal genes such as *ssu* gene and mitochondrial genes such as the cytochrome C oxidase I gene (*cox1*) we will try to test the following hypotheses: 1) Due to historical barriers that limited the genetic flow between Antarctica and Subantarctic regions, *Kidderia* genus species of both environments correspond to different taxonomic entities, and 2) Given the low potential for dispersal and the geographic distribution of *Kidderia bicolor*, it is expected that there will be genetic structure between different populations located in the Antarctic peninsula. Preliminary results show that there would be concordance between the morphological descriptions and the molecular systematics revealing that *Kidderia bicolor* belongs to the Cyamiidae family and that the taxonomic units *Kidderia bicolor* and *Kidderia sp2* are valid taxa and separated by 13 mutational steps, determined by *ssu* gene.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Eventos históricos en el Océano Austral.

El Océano Austral (OA) incluye todas las aguas al sur del frente polar, y corresponde a un área oceanográfica circumpolar antártica bien definida que marca el punto más septentrional de las aguas superficiales frías (Rintoul *et al.*, 2001, Aronson *et al.*, 2008 y González-Wevar *et al.*, 2012). A su vez, el aislamiento que presenta el continente Antártico es consecuencia de cambios geológicos que han ocurrido por millones de años (Crame 1999, Aronson & Blake 2001, Aronson *et al.*, 2007, Clarke *et al.*, 2007). Es así como la divergencia continental del Gondwana hace aproximadamente 130 millones de años atrás (Crame, 1999) fue modificando las características geológicas de los continentes, dando como resultado la profundización del Mar de Tasmania (34 - 33 Ma) (Stickley *et al.*, 2004) y la apertura del Paso de Drake (49 - 17 Ma) (Crame, 1999). Tales cambios modificaron la circulación oceanográfica del Océano Austral (Stickley *et al.*, 2004), formando o dando inicio aproximadamente hace 34 Ma a la Corriente Circumpolar Antártica (CCA). La CCA es la corriente oceánica más importante del planeta (Orsi *et al.*, 1995, Clarke *et al.*, 2007 y Scher *et al.*, 2015). Esta corriente conecta los océanos Pacífico, Atlántico e Índico trasladando calor, sal y nutrientes (Pudsey y Howe, 1998) y transportando un volumen de 173,3 Sv (1 Sv equivale a $10^6 \text{m}^3 \text{s}^{-1}$), con dirección de Oeste a Este, alrededor del Océano Antártico (Pudsey & Howe, 1998). Representación de esta barrera oceanográfica en Figura 1.

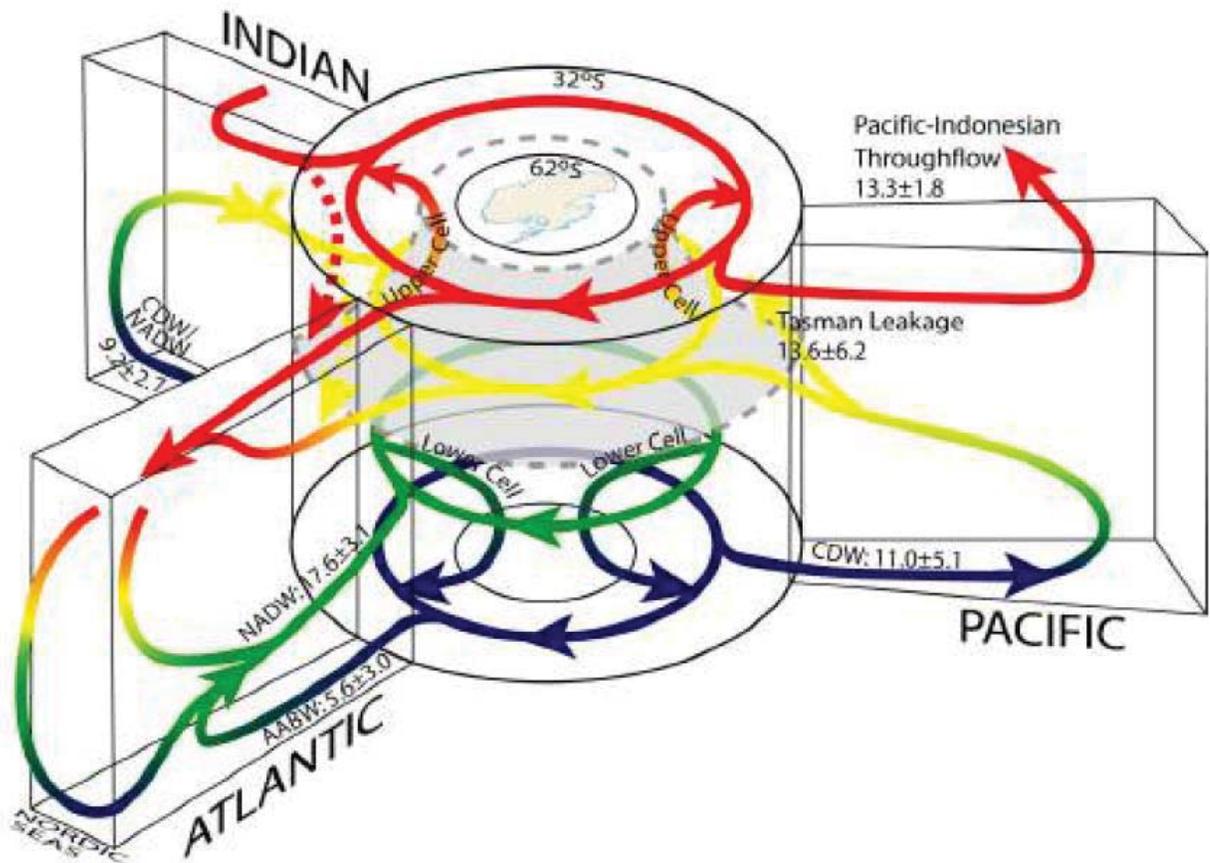


Figura 1: Modelo de circulación oceánica global que enfatiza el papel central del Océano Austral. NADW= Aguas profundas del Atlántico Norte; CDW= Aguas profundas circumpolares; AABW= Aguas profundas de la Antártica. Las unidades están en Sverdrups (1 Sv = 106 m³ de agua por segundo). Las dos celdas de circulación principal son la superior (rojo y amarillo) y la inferior (azul, verde y rojo). Las aguas profundas de la celda inferior (azul) suben y se juntan con las aguas profundas que fluyen hacia el sur (verde o amarilla) las cuales a su vez se conectan con la celda superior (amarilla y roja). Esto demuestra una unión global entre la convección del Océano Austral, la formación de aguas profundas y el proceso convectivo en el hemisferio norte. Tomado desde Alder *et al.* (2016).

La CCA se encuentra delimitada por dos frentes, uno polar y otro subantártico (Poulin *et al.*, 2014). La posición de ambos frentes tiene marcadas implicancias biogeográficas separando la fauna Antártica de la Subantártica (Hunter *et al.*, 2008, González Wevar *et al.*, 2012) y Poulin *et al.*, 2014).

De esta forma, la biodiversidad en el Océano Austral (OA), y particularmente la de Antártica, es consecuencia de eventos históricos y contemporáneos que han generado: (1) barreras geográficas como la distancia entre ambos continentes que supera los 1000 km, (2) Barreras batimétricas, con profundidades por sobre los 4000 m (Ferraris y Aldunate, 2010) y (3) barreras oceanográficas como el frente polar antártico (FPA) y subantártico (FPS) que rodean a la CCA (Orsi *et al.*, 1995).

2.2 Diversificación de especies en el Océano Austral.

La fauna marina bentónica Antártica es típicamente estenotérmica (capaces de resistir pequeñas variaciones de temperatura), euribática (capaces de vivir a diferentes profundidades bajo el mar) y endémica (propia de una región geográfica) (Hunter *et al.*, 2008 y Chown *et al.*, 2015). Estudios filogenéticos y filogeográficos se han centrado en el papel que ha tenido la CCA en la promoción de la especiación y divergencia de diferentes especies en el Océano Austral (OA). Estas investigaciones soportan la idea de que el flujo de genes a través de la CCA ha sido limitado por varios millones de años lo cual ha sido observado en una amplia gama de grupos marinos, tales como moluscos (Linse *et al.*, 2002 y 2007), equinodermos (Hunter *et al.*, 2008 y González Wevar *et al.*, 2012) y crustáceos (Patarnello *et al.*, 1996 y Held *et al.*, 2000). De acuerdo a lo anterior, existen algunos registros de colonizaciones exitosas que parecen haber ocurrido después de la formación CCA en el Plioceno. Además, eventos de dispersión ocasionales dentro y fuera de las aguas antárticas parecen haber ocurrido desde aquella época (Chown *et al.*, 2015).

Para tener una mejor asociación de los tiempos de divergencia estimados en algunas especies, tomados como ejemplo que se presentan a continuación, se presenta la Figura 2.

Estimaciones más antiguas se han registrado para el krill, crustáceo abundante en todas las aguas que circunda a estos continentes (América del Sur y Antártica), cuya divergencia genética entre las especies Antárticas del género *Euphausia* (*E. superba* y *E. crystallorophias*) y la especie Subantártica (*E. vallentini*) ocurrió hace unos 20 Ma,

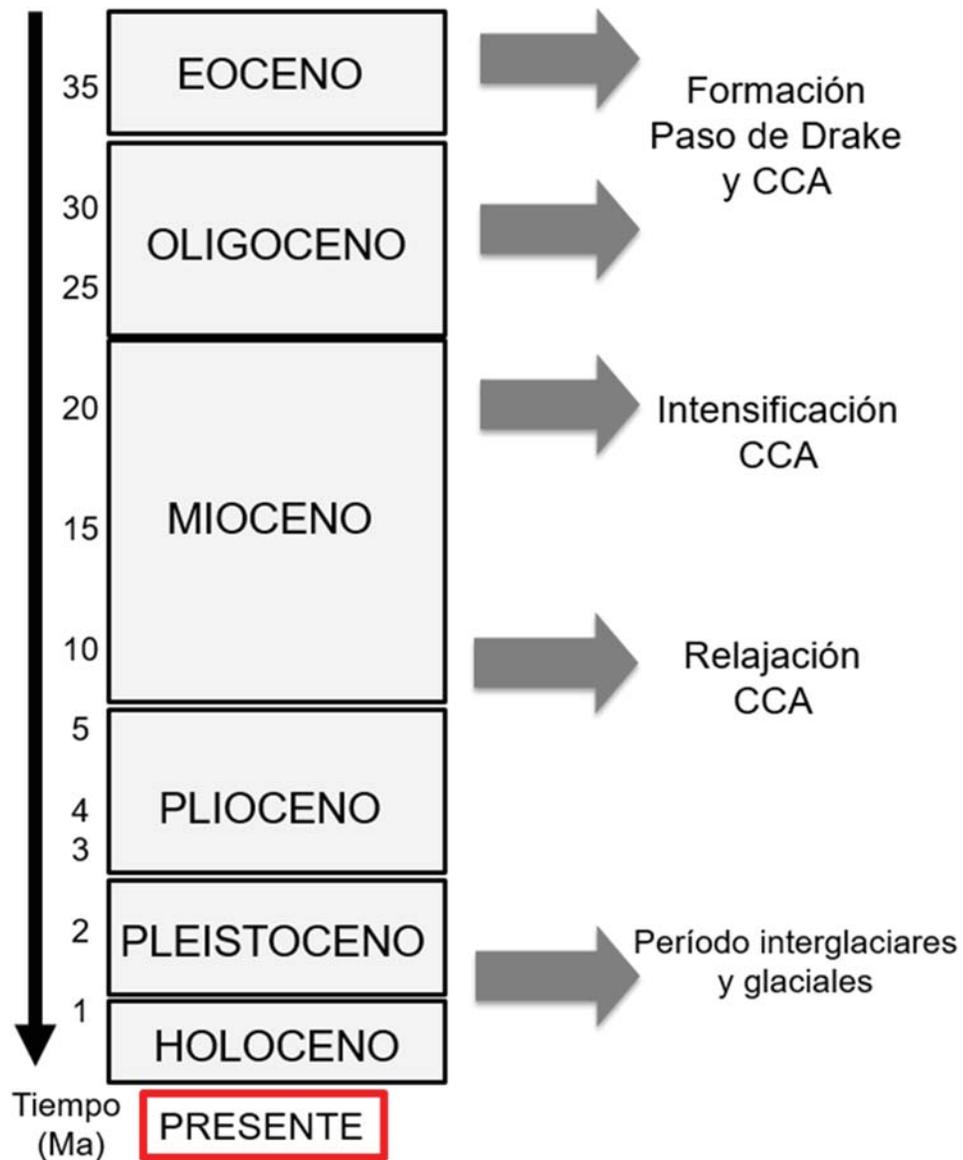


Figura 2: Resumen de los principales eventos históricos geológicos ocurridos durante la Era del Cenozoico. Esta era está compuesta por los periodos Terciario (Paleoceno al Plioceno) y el Cuaternario (Pleistoceno – Holoceno) los cuales han sido asociados a la divergencia genética de especies de distribución Subantártica y Antártica. Las fechas grises representan procesos geológicos y oceanográficos que ocurrieron aproximadamente en la época señalada.

lo que es comparable con el tiempo geológico donde ocurrió la intensificación de la CCA (Patarnello *et al.*, 1996). Además, en bivalvos, estudios en dos especies exclusivamente antárticas del género *Philobrya* (*P. wandelensis* y *P. sublaevis*) mostraron un tiempo de divergencia asociado a la apertura del paso de Drake durante la transición Eoceno-Oligoceno (34 Ma). En el caso de bivalvos del género *Adacnarca* (*A. nitens* y *A. wandelensis*) la divergencia genética fue asociada a mediados del Mioceno, aproximadamente 10 – 15 Ma (Jackson *et al.*, 2015).

En gastrópodos, González-Wevar *et al.* (2010) determinó que la divergencia de linajes del género *Nacella* distribuidos en la Antártida, Chile central, provincias Magallánica y de Kerguelen fue entre 9.3 (\pm 1.5) y 5.4 (\pm 1.1) Ma. En el Plioceno, período de las últimas glaciaciones, Díaz *et al.* (2008) y González-Wevar *et al.* (2012) estimaron que el tiempo de divergencia para los equidermos de distribución Antártida y Subantártica del género *Sterechinus* (*S. neumayeri* y *S. agassizi*) fue entre 5.9 – 4.2 Ma. A su vez, en un estudio más reciente González-Wevar *et al.* (2012) estimó que la divergencia entre las lapas *Nacella magellanica* (Subantártica) y *Nacella concinna* (Antártica) fue hace 3.7 Ma y para los bivalvos *Yoldia eightsi* de la Antártica y *Yoldia woodwardi* de América del Sur fue hace 3.9 Ma aproximadamente. Asociado a la época del Pleistoceno, se estimó que las divergencias para las estrellas de mar del género *Odontaster* (*O. penicillatus* y *O. pearsei*) y los peces *Harpagifer* (*H. antarcticus* y *H. bispinis*) fueron hace 1 y 1.7-0.8 Ma respectivamente (Janosik *et al.*, 2011 y Hüne *et al.*, 2015).

Por lo tanto, casos donde la divergencia de especies es más antigua han permitido apoyar la hipótesis de especiación por la vicarianza de las placas tectónicas que se separaron tras la ruptura del Gondwana y que fue determinante para el aislamiento de la Antártica (Crame 1999 y González-Wevar *et al.*, 2012).

2.3 Bivalvos antárticos

Los bivalvos antárticos son de tamaño pequeño (menos de 15,0 mm) con conchas delgadas, calcáreas, sin colores brillantes ni mucha ornamentación, probablemente relacionado con la estacionalidad del medio ambiente polar.

Estos organismos son abundantes en sistemas bentónicos antárticos con una variada gama de estrategias reproductivas caracterizadas como sigue: los sexos son separados (organismos gonocórico) y la fecundación es externa, es decir los gametos femeninos y masculinos son liberados al medio, donde ocurre la fecundación. Como consecuencia se desarrolla un embrión, que posteriormente se convierte en una larva de vida libre (desarrollo indirecto). Sin embargo, en varios bivalvos los embriones son retenidos por la hembra, la cual proporciona los cuidados parentales a las crías (especies incubadoras). Esta protección puede ser parcial, si las larvas empiezan a desarrollarse en el interior de la hembra y completan su desarrollo en la columna de agua, o total, si el desarrollo ocurre completamente dentro del ejemplar parental (en esta estrategia se mantienen los huevos fecundados en la cavidad paleal, región del cuerpo donde se ubican los órganos respiratorios) y a una vez liberadas al medio ocurre directamente su asentamiento (Helmuth *et al.*, 1994, Page *et al.*, 2002, Häuseermann y Försterra, 2009 y Contador *et al.*, 2015). Por lo tanto, se puede inferir que estos mecanismos de dispersión son contrastantes, donde existen especies que presentan estados larvales y un potencial de dispersión mayor versus especies que no poseen estados de larva libre o de bajo potencial de dispersión como los incubadores. Para especies incubadoras, la presencia de barreras geográficas como la distancia geográfica propiamente tal puede resultar ser

una barrera efectiva a la migración de adultos, en contraste con organismos de alta dispersión en donde es más probable que las corrientes permitan una efectiva dispersión de sus larvas (Jasonik *et al.*, 2011).

Sin embargo, el conocimiento de los bivalvos antárticos está todavía restringido solo a unas pocas especies (Passos *et al.*, 2011). Algunos de los bivalvos antárticos estudiados previamente han sido *Yoldia eightsii*, *Mysella minuscula*, *Adamussium colbecki*, *Laternula elliptica* y *Lisarcca notorcadensis* (Barnes *et al.*, 2007, Canapa *et al.*, 2000, Chenuil y Féral, 2008 y Hoffman *et al.*, 2012). Por ejemplo, en el estudio de *Yoldia eightsii* se determinó una alta diferenciación genética entre las muestras Antárticas y Subantárticas (González Wevar *et al.*, 2012). En otro estudio realizado para la especie *Lisarcca notorcadensis*, en la región Antártica, se observó una baja diversidad genética entre poblaciones del Mar de Weddel y Mar de Ross, lo cual podría estar explicado por una conexión marítima entre ambas regiones durante el Eoceno y Mioceno medio (Linse *et al.*, 2007).

2.4 Especies del Género de *Kidderia* como modelo de estudio

Como se señaló previamente, existen varios organismos antárticos que permanecen sin ser estudiados en términos de su historia evolutiva, conectividad de sus poblaciones y biogeografía, un ejemplo de esta falta de conocimiento de la biodiversidad son las especies del género *Kidderia* que habitan en el Océano Austral.

Los primeros registros del género *Kidderia* en la literatura corresponden al trabajo de Dall (1876) quien describe el género y la especie *Kidderia minuta*. Su descripción para la especie señala textualmente: “Concha diminuta, con biso, concéntricamente esculpida

con dos dientes cardinales en cada valva y un ligamento interno parcialmente unido a unos más o menos prominentes procesos sobre el margen interior de cada valva. Línea paleal simple”.

Las especies de *Kidderia spp.* son pequeños bivalvos de un largo promedio de sus conchas de 4.5 mm (Simpson, 1977), siendo el individuo de mayor longitud reportado con una longitud máxima de 7 mm (Engl *et al.*, 2016). Sus conchas son alargadas y planas, presentan un ligamento interno situado detrás del diente cardinal; de conducta gregaria, habitando las zonas del intermareal rocoso y en zonas submareal bajo rocas de ambientes antárticos y subantárticos. Las hembras son ovovivíparas desarrollando sus embriones, de estado inmaduro a un estado juvenil (largo promedio 0.8 mm), en los espacios interlamelares de las demibranquias (interna y externa) de las branquias, por lo tanto, posee un ciclo de vida del tipo incubador (Simpson, 1977). Los ciclos gametogénicos son largos, más de un año, tomando a menudo dos años. El seno paleal está ausente, lo cual es característico de especies cuyos umbos poseen un coloreado púrpura. Son organismos filtradores, por lo que su alimentación está compuesta por diatomeas, fragmentos de algas, dinoflagelatos y detritos orgánicos de acuerdo a lo reportado para la especie *Kidderia bicolor* (Schories, 2016).

En WORMS (World Register Marine Species) se identifican 24 especies para este género, de las cuales 17 son especies reconocidas o podrían constituir un grupo taxonómico diferenciado. De acuerdo a lo anterior, cabe señalar que una especie está reconocida como *Gaimardia adamsiorum* y 11 especies tienen distribución geográfica asociadas a Nueva Zelanda.

Zelaya (2005) registró 5 especies de *Kidderia* en las regiones Antárticas y Subantárticas (Patagonia de América del Sur y/o región Magallánica) de interés de este estudio. Una de ellas es *Kidderia bicolor* reportada por Martens (1885) en las islas Georgias del Sur. Además, su distribución incluye a las Islas Orcadas, Heard y Kerguelen y en las zonas intermareales rocosas del mar de Weddell en la Antártica. En ambientes subantárticos como la Patagonia, Islas Diego Ramírez y la Isla Falkland se han descrito las especies *Kidderia subquadrata* y *Kidderia pusilla*, además de otras dos especies que no fueron identificadas claramente en los registros de Zelaya (2005). Cabe señalar que algunos trabajos tempranos en la zona antártica también reportan la presencia de especies *K. Subquadrata* (Shavica, 1974). Detalle de las distribuciones de especies de *Kidderia* en la Figura 3.

Las especies de *Kidderia* han sido clasificadas como miembro de la subclase heterodonta, orden Veneroida y perteneciente a la superfamilia Cyamioidea. La superfamilia Cyamioidea no tiene bien definido a las familias por las cuales está compuesta, sin embargo, algunos de los grupos taxonómicos que se han identificado dentro de esta superfamilia son las familias Gaimardiidae, Cyamiidae, Sportellidae y Neoleptonidae (Passos *et al.*, 2011). Cabe señalar que algunas de estas familias han sido consideradas como sinónimos o taxa hermanos como es el caso de las familias Gaimardiidae y Cyamiidae (Morton, 2005). A través de los primeros análisis filogenéticos, realizados con marcadores ribosomales nucleares, donde se incluyeron estas familias Taylor *et al.* (2007) determinó que el taxón perteneciente a la especie *Gaimardia trapesina* (Gaimardiidae) se agrupó cerca de taxa representativos de la superfamilia Ungulinidae

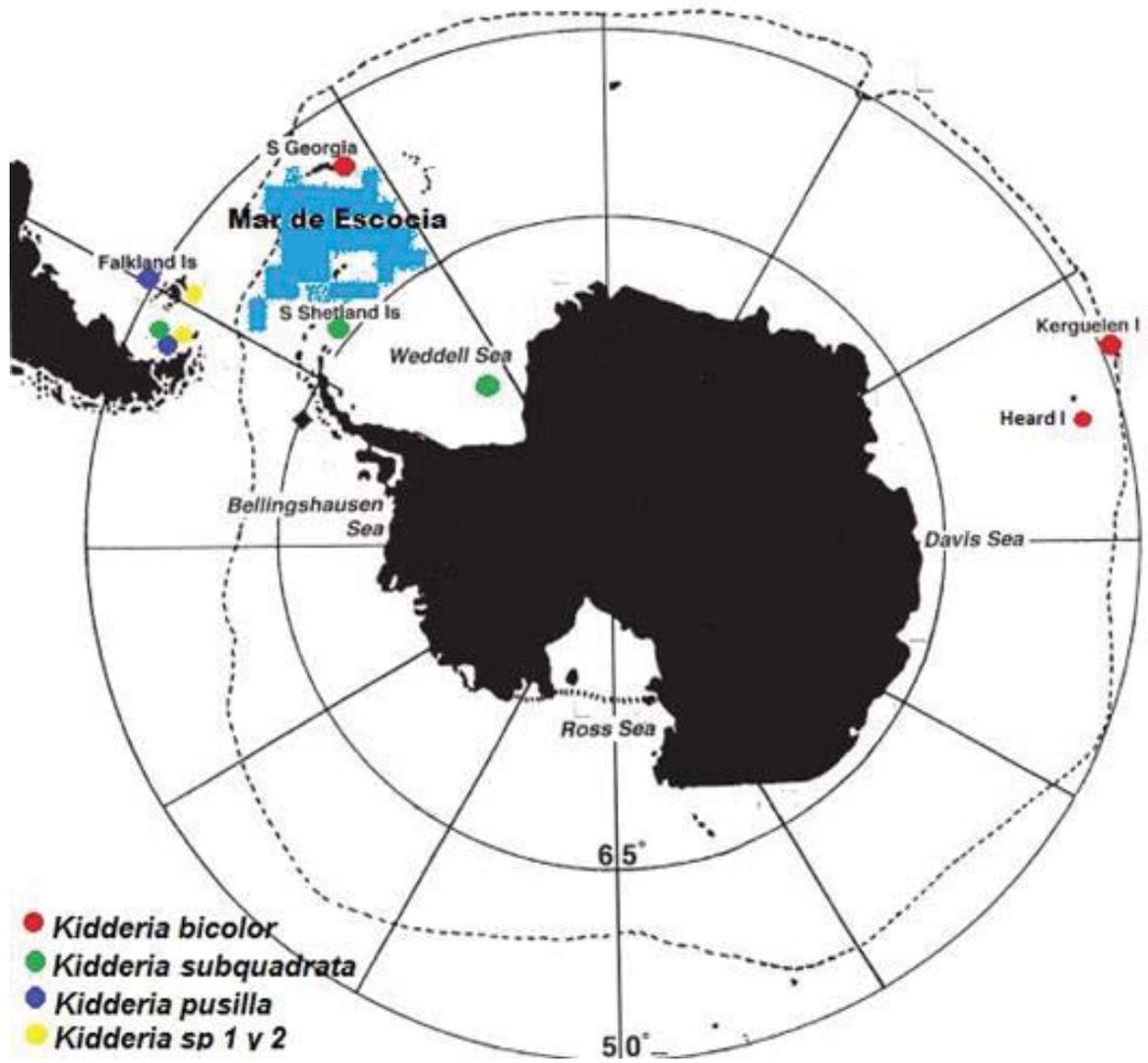


Figura 3: Localización de las especies del género *Kidderia* en regiones Antárticas y Punta sur de América (Subantártico). Según el último reporte realizado tras la expedición en la región del Arco de Escocia por Zelaya (2005), se informa de tres especies ya conocidas y otras dos no descritas. Imagen modificada Brandt, 1999.

y no cerca de la superfamilia Cyamioidea como había sido considerado. A pesar de las discordancias anteriores nuevos estudios filogenéticos denominados “árboles de vida de bivalvos” han permitido al menos establecer la relación evolutiva cercana entre las familias Cyamiidae y Gaimardiidae, de igual forma la incorporación de nuevas taxa irán esclareciendo mejor estas relaciones, al menos a nivel de género (Bieler *et al.*, 2014, González *et al.*, 2015 y Combosh *et al.*, 2017).

2.5 Utilidad de los estudios filogenéticos y filogeográficos en modelos antárticos

En los últimos años, algunos estudios han mostrado la utilidad potencial de técnicas moleculares en estudios de taxonomía molecular en la Antártica (Chown *et al.*, 2015). Su uso puede proporcionar una valiosa fuente de datos para entender la estructura genética de las poblaciones de especies antárticas. Además, se ha puesto de manifiesto el grado de variación genética contenida dentro de una especie, e incluso puede ser un factor decisivo en la reclasificación de especies o subespecies (Fraser *et al.*, 2009, Dettai *et al.*, 2011 y Williams *et al.*, 2012).

Uno de los marcadores seleccionados para este estudio es la subunidad pequeña del ARN ribosomal, cuyas siglas en inglés son *ssu* (small subunit rRNA), como marcador nuclear. Su uso ha sido descrito debido a algunas características particulares, por ejemplo, que es altamente conservado exhibiendo bajas tasas de mutación en general. Presenta baja variación intraespecífica y alta variación interespecífica, siendo muy útil en algunos casos para delimitación de especies (Miller *et al.*, 2013 y Ellegren *et al.*, 2016). Además, estos marcadores genéticos nucleares a menudo son utilizados para estimar abundancia relativa y diversidad de especies en muestras del medio ambiente,

añadiendo que han sido recomendados como imprescindibles en la descripción de nuevas especies (Blasco *et al.*, 2016, Miller *et al.*, 2013 y Ellegren *et al.*, 2016). Una de las ventajas adicionales de los marcadores nucleares es su representación en las bases de datos. A su vez, estos marcadores han revelado divisiones filogenéticas profundas en moluscos, equinodermos, artrópodos, entre otros, indicando divergencias históricas vicariantes (Ellegren *et al.*, 2016).

Dentro de los marcadores moleculares más utilizados para establecer patrones filogeográficos está el gen citocromo oxidasa I (*cox1*) encontrado en el genoma mitocondrial (Miller *et al.*, 2013). Una característica del genoma mitocondrial es la ausencia de recombinación. Por esta razón, las distintas posiciones polimórficas observables en un conjunto de datos de ADN mitocondrial (ADNmt) comparten una genealogía común.

Varios factores contribuyen al ritmo rápido de evolución del ADNmt algunos de estos, por ejemplo, son los ineficientes mecanismos de reparación del ADN en las mitocondrias y el ambiente oxidativo del sistema mitocondrial por la presencia de especies reactivas de oxígeno a los que está expuesto el ADNmt en el organelo. Además, el ADNmt está desnudo (es decir, no está estrechamente unido a las proteínas histonas y que pueden limitar la evolución en el ADN nuclear). La rápida tasa mutacional del ADNmt se refleja dentro de la mayoría de las especies animales (Rogers, 2007). Por otro lado, los marcadores mitocondriales tienen la ventaja de evitar problemas relacionados con copias múltiples como en los nucleares. También otro punto a considerar es que las frecuencias de haplotipos pueden derivar rápidamente y se pueden identificar variaciones genéticas entre poblaciones en lapsus de tiempo cortos, es por eso que la ausencia de

recombinación permite que dos haplotipos independientes coalescan rápidamente en el ancestro común más reciente, de esta forma la monofilia puede ser alcanzada más rápido que en genes autosómicos nucleares (Hewitt, 2004, Avise, 2009 y Riesgo *et al.*, 2015).

En relación con otras áreas marinas, entre la región Subantártica y Antártica existen linajes que han evolucionado de forma independiente permaneciendo morfológicamente indistinguibles entre sí (especies crípticas), es por eso que en estos ambientes las herramientas moleculares han permitido describir nuevas especies o aclarar relaciones evolutivas entre diferentes géneros de la fauna marina Antártica (Roger, 2007, Cook, *et al.*, 2010, Riesgo *et al.*, 2015 y Chown, 2015).

Hasta hoy los estudios filogenéticos se han centrado en entender la variabilidad genética entre organismos antárticos/subantárticos y la diversidad genética de sus poblaciones, permitiendo correlacionar los modos de reproducción y los patrones espaciales de distribución que poseen estos organismos a procesos de divergencia genética asociado a tiempos geológicos donde se sabe que ocurrieron eventos tales como la formación e intensificación de la CCA, que pudieron haber sido determinantes en la promoción de la especiación y divergencia de especies que habitan en el océano Austral de especies (Patarnello *et al.*, 1996, Zane *et al.*, 1998, Linse *et al.*, 2007, Janosik *et al.*, 2011, González-Wevar *et al.*, 2012 y Hüne *et al.*, 2015).

Tres principales características hacen de *Kidderia* un buen modelo biológico para este tipo de estudios: (1) la ausencia de una fase larval, predice un bajo potencial de dispersión, (2) la presencia de taxa similares en ambos ambientes, supone la divergencia de dos o más especies, (3) su distribución geográfica en ambientes antárticos sugiere

alta estructuración poblacional en poblaciones espacialmente separadas de la misma especie. Es por eso que las especies del género *Kidderia* constituyen un buen modelo para avanzar en la mejor comprensión de procesos de colonización, estudiar la historia evolutiva, y evaluar modos y tiempos de especiación y diversificación de invertebrados marinos que habitan el intermareal de la Antártica y Subantártica.

Este estudio aportará nuevos antecedentes para una mejor comprensión de la relación faunística entre Antártica y Sudamérica y el papel de ésta en la evolución de invertebrados bentónicos marinos, y en el caso de las especies modelo se plantean las siguientes preguntas:

1. ¿Son válidas las especies del género *Kidderia*? ¿Cuál es la relación filogenética entre las especies de *Kidderia*? ¿Son las especies de *Kidderia* encontradas en las regiones Subantártica y Antártica especies congénicas?
2. Debido a que las especies de *Kidderia* tiene un bajo potencial de dispersión, ¿Cuál es el patrón de distribución espacial de la diversidad genética dentro de Antártica? ¿Existe estructuración poblacional entre localidades diferentes de la Península Antártica?

2.6 HIPÓTESIS:

H1: Debido a barreras históricas que limitaron el flujo genético entre la Antártica y regiones Subantárticas, las especies de género *Kidderia* de ambos ambientes corresponden a entidades taxonómicas diferentes, con un tiempo de divergencia asociado a la intensificación de la CCA.

H2: Dado el bajo potencial de dispersión y la distribución geográfica de *Kidderia bicolor* existe estructuración genética entre diferentes poblaciones localizadas en la península Antártica.

2.7 OBJETIVO GENERAL:

Comparar la diversidad y estructura genética de especies del género *Kidderia* que habitan en la Antártica y Subantártica.

2.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- 2.8.1 Estandarización de protocolos de PCR con partidores universales para los genes *cox1* y *ssu*. (Resultados de esta tesis)
 - 2.8.1.1 Desarrollar una nueva búsqueda de marcadores moleculares para especies de *Kidderia* mediante secuenciación del genoma mitocondrial.
- 2.8.2 Determinar las relaciones filogenéticas entre especies congénicas de la Antártica y Subantártica, utilizando un marcador nuclear (*ssu*) y mitocondrial (*cox1* y/o otros).
- 2.8.3 Realizar un análisis filogeográfico de poblaciones espacialmente aisladas de *Kidderia bicolor* en el continente Antártico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

Sitios de colección de muestras: para continuar con el desarrollo de este estudio, se colectaron individuos de la especie *Kidderia bicolor* en diferentes puntos de muestreo dentro de la región Antártica durante la expedición científica Antártica (ECA) n°53, además de otros sitios en la región subantártica donde se colectaron otros individuos que serían del género *Kidderia*. Detalle de los sitios, coordenadas y tamaño muestral en Figura 4 y Tabla I.

Análisis morfológico a través de Microscopía electrónica de las especies de *Kidderia*: se utilizó esta herramienta para apoyar la caracterización en base a caracteres estructurales de: tamaño (altura y largo), dirección de las vueltas o giros (abertura), características de la charnela (bisagra que une las valvas de los bivalvos, disposición de los dientes), detalles de las ornamentaciones esculturales presentes en la superficie, área del seno paleal, posición del umbo respecto al eje anteroposterior y detalles de las protoconchas, en las conchas de especies de *Kidderia*, además de las vistas internas, externas (izquierda y derecha) y posteriores de la valva (Zelaya *et al.*, 2004). Para ello se lavaron las conchas, las cuales posteriormente fueron secadas y montadas en una cinta de doble cara de carbono unida a una matriz de aluminio. Las conchas fueron sombreadas previamente con oro para su observación (Weiss *et al.*, 2002).

Para identificar si los individuos de las islas Doumer y Diego Ramírez correspondían a entidades del género *Kidderia* se enfatizó en visualizar la forma de las conchas y los dientes de la charnela, esto debido a que las descripciones originales del género

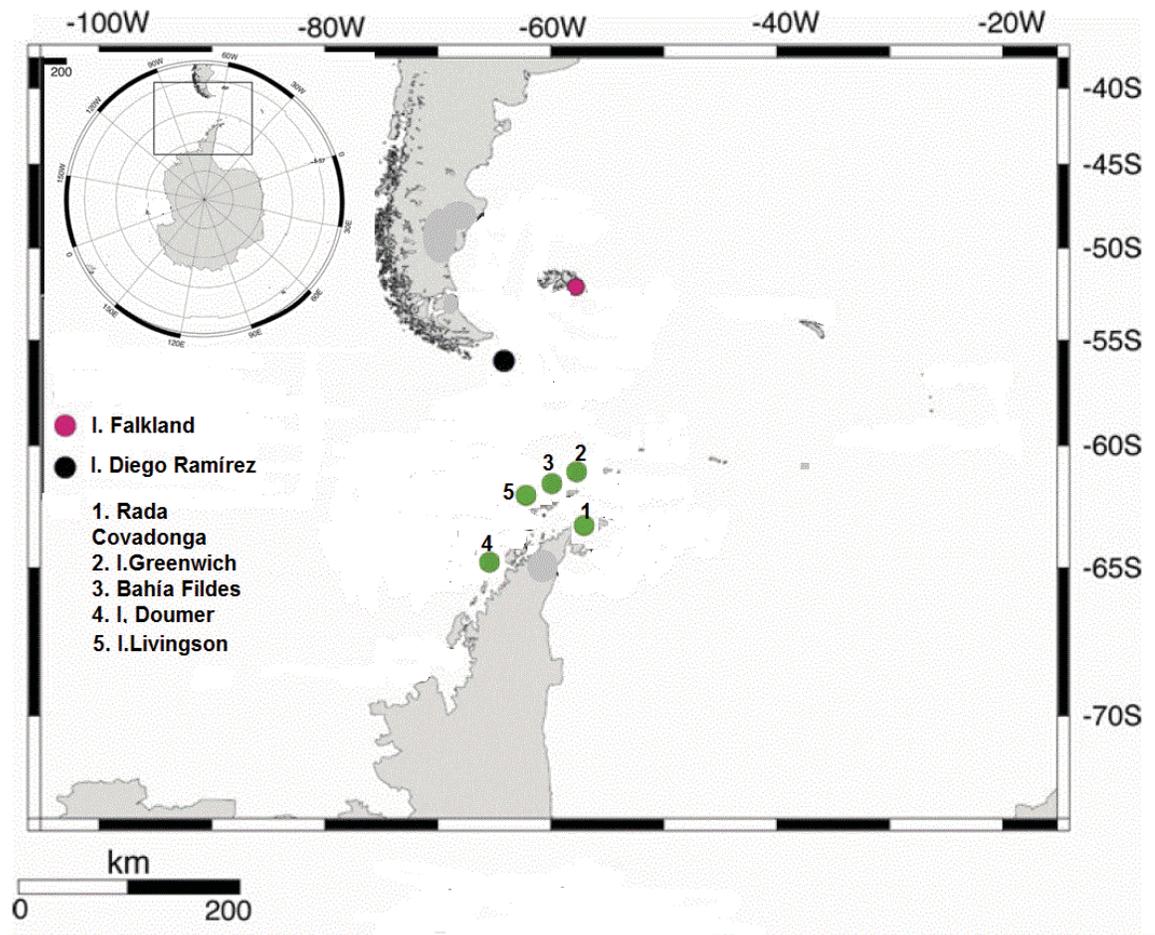


Figura 4: Mapas de los sitios de muestreo en las regiones Subantártica y Antártica.

Mapa detalle de las islas Falkland y Diego Ramírez en la región Subantártica y la bahía Fildes, las islas Greenwich, Livingston y Doumer en la región Antártica. Finalmente, en la Península Antártica, Rada Covadonga. Imagen modificada de Jackson *et al.* (2015).

Tabla I: Sitios de muestreo, coordenadas y tamaño muestral de los individuos del género *Kidderia* recolectados durante el año 2017.

Especie	Localidad	Coordenada	Tamaño muestra (aproximado)
<i>Kidderia sp</i>	Isla Doumer	64° 52' 0" S, 63° 35' 0" W	150
	Isla Greenwich	62° 30' S; 59° 39' W	150
	Bahía Fildes	62°15'S-58°51'O	100
	Isla Livingston	62° 39' S- 60° 35' O	30
	Rada Covadonga	63°19'15"S 57°53'55"O	50
	Isla Falkland	51°45'S 59°00'O	100
	Isla Diego Ramírez	56°31'21.20"S- 68°42'46.05"O	50

Kidderia reportan la descripción de estos caracteres. Dall (1876) describe que “las especies de *Kidderia* en general son especies de conchas pequeñas de 4 mm con estrias concéntricas, con dos dientes en cada valva con el ligamento interno unido. Línea del seno paleal simple”. Ohdner (1924) reporta la forma del diente en forma de V (cironoides) de *Kidderia bicolor*. E. Von Martens (1885) describió otras características generales de las que se puede inferir de su reporte en latín: concha redondeada – elongada, estrias concéntricas, manchas oscuras en la parte posterior, margen rectilíneo ventral y cara interna de color intenso. Vivíparo (testa oblonga, utraque extremitate obtuse rotundata, radiantim striata, dorso et postice plus minusve fusco tincta, convexo, margine ventrali rectilíneo, facies interna intense colorata. Lebendig gebärend).

Extracción de ADN: se utilizó el protocolo CTAB - proteinasa K descrito por Page y Linse (2002) como primera estrategia, ya que además se probó el Kit comercial “E.Z.N.A. ® Tissue DNA kit”, empresa OMEGA bio-tek (www.omegabiotek.com), según el protocolo descrito por el fabricante, sin resultados óptimos en cuanto a calidad y concentración de ADN.

Para verificar la concentración y calidad del ADN extraído se utilizó un espectrofotómetro (NanoDrop ® ND-1000) con la finalidad de evaluar las razones de 260/280 y 260/230 y medir la concentración del ADNg (ng/µl). Para evaluar la calidad (integridad) de cada muestra de ADNg se realizaron geles de agarosa al 1%.

Amplificación de genes *cox1* y *ssu*: dado la disponibilidad y uso preferencial de partidores universales para el gen de citocromo oxidasa 1 (*cox1*), se utilizaron los partidores descritos por Folmer *et al.* (1994) y la variante del partidore reverse HCOout descrito por

Schwendinger y Giribet (2005), detallados en la Tabla II. Estos partidores no otorgaron resultados óptimos, obteniendo solo 8 secuencias exitosas, de 140 individuos utilizados para esta parte experimental. A partir de estos resultados, se ha decidido desarrollar tres estrategias para asegurar la obtención de un fragmento adecuado del gen *cox1* para los análisis a realizar: (i) De acuerdo a la revisión bibliográfica desarrollada en esta tesis, existen varios conjuntos de partidores que podrían ser evaluados (Plazzi *et al.* 2010, Geller *et al.*, 2013 y Bieler *et al.*, 2014, Tabla II). (ii) una segunda estrategia contempla desarrollar un alineamiento de mitogenomas para la generación de nuevos potenciales partidores degenerados siguiendo el protocolo descrito por Geller *et al.* (2013). Finalmente, (iii) se realizará una secuenciación masiva para obtener el mitogenoma de la especie modelo en estudio *Kidderia bicolor* (ver más adelante en ítem secuenciación masiva).

Como segundo marcador genético se seleccionó el gen nuclear ribosomal *ssu* (small subunit). Se utilizaron los partidores descritos por William *et al.* (2003) para la hebra “reverse” y Winnipennickx *et al.* (1998) para la hebra “forward”, detallados en la Tabla II.

Las amplificaciones de ambos genes se realizaron en el termociclador Multigene OPTIMAX TCL. Tras la amplificación de PCR se verificó la presencia de amplicones a través de geles de agarosa al 2%. Posteriormente, aquellas muestras que tenían una banda nítida de amplificación, fueron seleccionadas para su secuenciación.

Tabla II: Partidores de los genes *ssu* y *cox1* utilizados en el desarrollo de procesos de estandarización de PCR (avance) y partidores que se probarán durante la continuación de esta tesis. SE: sin estandarizar.

Locus	Partidor	Secuencia 5'→ 3'	Referencia	Tm (°C)	Prueba PCR
<i>ssu</i>	18s-5'-F	CTG GTT GAT CCT GCC AGT	Winnipennickx <i>et al.</i> (1998)	54	Sí
<i>ssu</i>	18S1100-R	CTT CGA ACC TCT GAC TTT CG	Williams <i>et al.</i> (2003)	54	Sí
<i>cox1</i>	LCO 1490 ("Forward")	GGTCAACAAATCATAAA GATATTGG	Folmer <i>et al.</i> (1994)	48	Sí
<i>cox1</i>	HCO2198 ("reverse")	TAAACTTCAGGGTGACC AAAAAATCA	Folmer <i>et al.</i> (1994)	48	Sí
<i>cox1</i>	HCOout ("reverse")	CCA GGT AAA ATT AAA ATA TAA ACT TC	Schwendinger y Giribet (2005)	48	Sí
<i>cox1</i>	HCOoutout ("reverse")	GTA AAT ATA TGR TGD GCT C	Bieler <i>et al.</i> , (2014)	SE	No
<i>cox1</i>	COIF	ATYGGNGGNTTYGGNAA YTG	Plazzi <i>et al.</i> , (2010)	SE	No
<i>cox1</i>	COIR	ATNGCRAANACNGCNCC YAT	Plazzi <i>et al.</i> , (2010)	SE	No
<i>cox1</i>	jgLCO1490	TITCIACIAAYCAYAARGA YATTGG	Geller <i>et al.</i> , (2013)	SE	No
<i>cox1</i>	jgHCO2198	TAIACYTCIGGRTGICCRA ARAYCA	Geller <i>et al.</i> , (2013)	SE	No

Secuenciación: todas las muestras amplificadas fueron purificadas y posteriormente secuenciadas en el equipo ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer en Unidad de Innovación en Biotecnología de la Facultad de Ciencias UACH, AUSTRAL-omics.

Ensamblaje y edición: las secuencias fueron editadas y alineadas (creando una hebra consenso o contig desde las hebras “formard” y “reverse”) con el programa Geneious Pro 9. software (Kearse *et al.*, 2012). Para comprobar la similitud y homología de las secuencias obtenidas, se realizó una búsqueda por similitud en la base de datos del National Center for Biotechnology Information usando el programa BLASTn.

Secuenciación masiva para búsqueda de marcadores mitocondriales de la especie *Kidderia bicolor*. Para la prueba de aislamiento de mitocondrias se utilizó el kit comercial “Mitochondria Isolation Kit for Tissue” (Thermo Scientific). Posteriormente con las mitocondrias aisladas se realizó una extracción del ADN mitocondrial utilizando las estrategias mencionadas en ítem extracción ADN. La cuantificación del ADN se realizó por fluorimetría (Qubit 3.0 - Thermo Scientific) y la construcción de las librerías genómicas se realizó en la Unidad de biotecnología e innovación AUSTRAL-omics. Hasta este punto se esperaba obtener un ADN integro o fragmentos de ADN de al menos 500 pb, con una concentración mínima de 10 ng/ μ l y con un control positivo de PCR para ser secuenciados mediante una plataforma de secuenciación masiva Hiseq2500. Dado que no se logró realizar las librerías debido a que el ADN se encontraba muy degradado obteniéndose fragmentos menores a lo esperado, se realizará un nuevo aislamiento de mitocondrias siguiendo el protocolo descrito en Gaitián *et al.*, (2016) utilizando individuos de uno de los sitios de muestreo del verano 2017.

Por lo tanto, se procederá a realizar una secuenciación masiva de la especie *Kidderia sp.*, con la finalidad de obtener secuencias de al menos los trece los genes que codifican proteínas mitocondriales con posibilidades de reconstruir el genoma mitocondrial completo. Para ello se realizará una secuenciación masiva en el equipo Miseq Illumina de la unidad AUSTRAL-omics, realizando un enriquecimiento con el ADN de la especie previa a la generación de la biblioteca genómica con el Kit Nextera 2x150pb con salidas de 1.000.000 de lecturas. El ensamble de las lecturas obtenidas será realizado *de novo*. La aproximación para la reconstrucción del genoma mitocondrial se realizará utilizando el programa Geneious Pro 9. software.

Análisis filogenéticos: para realizar las reconstrucciones filogenéticas se utilizaron los datos de secuencias editadas de este estudio y se realizó una búsqueda en la base de datos pública Genbank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) para enriquecer la base de datos con secuencias de otros bivalvos antárticos. Para el desarrollo de la tesis de magíster se considerarán para una nueva búsqueda bivalvos de otras regiones geográficas que pertenezcan a la familia Cyamiidae.

Para este análisis se utilizaron las aproximaciones de Maximum Likelihood (ML, máxima verosimilitud) e inferencia Bayesiana. Se realizó una búsqueda del mejor modelo evolutivo mediante el programa JModeltest v0.1. (Darriba *et al.*, 2011). La selección del mejor modelo, fue estimado bajo el cálculo de criterio Akaike (AIC) considerando una proporción de sitios invariables y distribución gamma. Seleccionado el modelo se procedió a la búsqueda y construcción del mejor árbol mediante la utilización de las aproximaciones filogenéticas de Máxima verosimilitud ejecutado en el programa PAUP

4b10 e Inferencia Bayesiana en el programa MrBayes v.3.2.6 (Ronquist *et al.*, 2012). Para el análisis estadístico de soporte de nodos se aplicaron 500 réplicas de Bootstrap. El análisis bayesiano comenzó con la estructuración al azar de un árbol con cadenas de Markov (MCMC). Este análisis, MCMC fue realizado para 10.000.000 de generaciones, con muestras de árboles filogenéticos cada 10000 generaciones. Las primeras 500.000 de muestras de árboles filogenéticos fueron descartados, estas muestras fueron consideradas como la base prueba y los 9.500.000 de árboles restantes fueron utilizados para construir el 50% del árbol definitivo.

Para los análisis filogenéticos, con las nuevas muestras de este estudio, que se desarrollarán para la tesis de magíster, los soportes estadísticos serán ajustados a 1000 réplicas de bootstrap y se aumentarán el número de generaciones según lo necesario.

Los análisis que se describen a continuación serán realizados para completar los los objetivos faltantes que corresponden a los objetivos que se desarrollarán durante la tesis de magíster.

Estimación tiempo de divergencia de especies del género *Kidderia*: para estimar la divergencia entre taxa de este género se pondrá a prueba la hipótesis de reloj molecular. Previo a asumir esta hipótesis se relizará una Prueba de razón de verosimilitud (Felsenstein 1981) usando DAMBE (Xia y Xie, 2001). Con el fin de proporcionar una restricción informativa sobre la altura de la raíz (es decir, la divergencia de veneroides de otros bivalvos de la subclase heterodonta) se examinarán los datos fósiles disponibles del orden Veneroida según lo descrito por Lauriat-Rage *et al.*, (2002). Los tiempos de

divergencia se medirán usando el análisis bayesiano de reloj relajado en el programa BEAST v1.8.1.

Delimitación de especies: para delimitar los grupos de especies de este estudio, se plantean dos enfoques. En primer lugar, el modelo de umbral múltiple General mixed Yule Coalescence (GMYC) (Fujisawa *et al.*, 2013) que se llevará a cabo utilizando la aproximación “Species Limits by Threshold Statistics” (SPLITS v1.0-19) en el programa R (www.r-project.org), implementado por Monaghan *et al.* (2009). Este es un método basado en verosimilitud, que delimita las especies ajustando modelos ramificados intra y entre especies a un árbol de genes reconstruido. El árbol ultramétrico de entrada se obtendrá del análisis de tiempo de divergencia descrito anteriormente, aplicando el modelo de reloj molecular. Los clusters únicos de "especies" obtenidos con el gen *ssu* serán resueltos como grupos múltiples de especies utilizando el mismo método GMYC con marcadores de ADN mitocondrial. En segundo lugar, se realizará una prueba de divergencia intraespecífica basado en el “barcoding gap”, utilizando el programa Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) (Puillandre *et al.*, 2012).

Análisis filogeográficos: Para estimar los niveles de polimorfismo genético en las poblaciones antárticas de *Kidderia bicolor* se utilizarán índices de diversidad estándar: número de haplotipos (k), número de sitios segregantes (S), diversidad de haplotipos (H) y el número promedio de diferencia pareadas entre secuencias (π) para cada región usando DnaSP 5.00.07 (Librado y Rozas, 2009).

Para determinar la estructuración genética de las poblaciones de *Kidderia bicolor* se estimarán los valores del índice de diferenciación genética (F_{st}), que mide el grado de

diferenciación entre poblaciones, el cual puede ser afectado por diferentes procesos tales como conectividad entre las poblaciones, tamaño e historia de cada población. Estos cálculos se realizarán a través del análisis de F_{st} pareados. Además, si existen grupos genéticos diferenciados (por ejemplo, islas versus península) entonces se realizará un análisis de AMOVA, el cual es un análisis jerárquico de la varianza genética entre grupos (F_{ct}), localidades dentro de cada grupo (F_{sc}), y entre todas las localidades (F_{st}). Estas estimaciones serán obtenidas con el programa ARLEQUIN v.3.51 (Excoffier *et al.*, 2010). Se realizarán 10000 permutaciones no paramétricas para asegurar precisión en la probabilidad final. Para determinar si las secuencias analizadas siguen un modelo molecular neutral, y para realizar inferencias demográficas históricas se realizarán pruebas de neutralidad utilizando el test D de Tajima (1989) y el F_s de Fu (1997). El test de Tajima se fundamenta en el hecho que, en un modelo neutral, las estimaciones del número de sitios segregantes y el número promedio de diferencias nucleotídicas están correlacionados. El test de Fu está basado en el modelo de sitios infinitos sin recombinación. Se estima la probabilidad de observar una muestra aleatoria con un número de alelos iguales o menores que el valor observado, dado el nivel observado de la diversidad y la suposición de que todos los alelos son selectivamente neutrales. Ambos estadígrafos serán calculados en el programa el ARLEQUIN.

Para reconstruir relaciones genealógicas de los haplotipos de *Kidderia bicolor* se realizarán redes de haplotipos utilizando el algoritmo Median-Joining con el programa Network 4.6 (Röhl, 2002). Este método permite realizar reconstrucciones simples de filogenias basadas en datos genéticos intraespecíficos como la variación del ADN mitocondrial (Bandelt *et al.*, 1999 y Posada y Crandall, 2001).

4. AVANCES DE RESULTADOS

Descripción morfológica con imágenes de microscopía electrónica.

A continuación, se detallan las descripciones morfológicas realizadas para las especies que corresponde a las muestras con las se contaban para este avance, del año 2016.

Se obtuvieron imágenes de la concha externa e interna con la finalidad observar las ornamentaciones de la concha, los dientes de la charnela y la presencia de la línea paleal. Dado la concordancia de estos caracteres morfológicos, descritos para esta especie, y la imagen disponible en el libro “*Marine wildlife King George Island – Antarctic*” (Schories ed., 2016), permite determinar que los individuos de Isla Doumer podrían corresponder a la especie *Kidderia bicolor*.

***Kidderia bicolor*, Isla Doumer (Antártica):** conchas con longitud máxima observada de 4 mm (radio ancho/altura= $0,4\pm 0,2$, $n=25$), oval, moderadamente alargada. Umbos anchos, subcentrales cercanos al extremo anterior. Superficie de la concha bastante lisa, con estrías concéntricas marcadas, de color rosáceo y márgenes blanquecinos. Línea paleal Ausente. Presencia de 2 dientes o dientes bífido en forma de V. Vistas laterales exteriores e internas de ambas valvas derecha e izquierda en Figura 5.

***Kidderia sp2*, Isla Diego Ramírez (Subantártica):** conchas de longitud máxima observada de 3,5 mm (radio ancho/altura= $0,4\pm 0,1$, $n=6$), de contorno oval o algo subcuadrangular o trapezoidal alto, moderadamente inflada; umbo algo desplazado hacia atrás, prominente y amplio. Superficie de la concha con estrías concéntricas

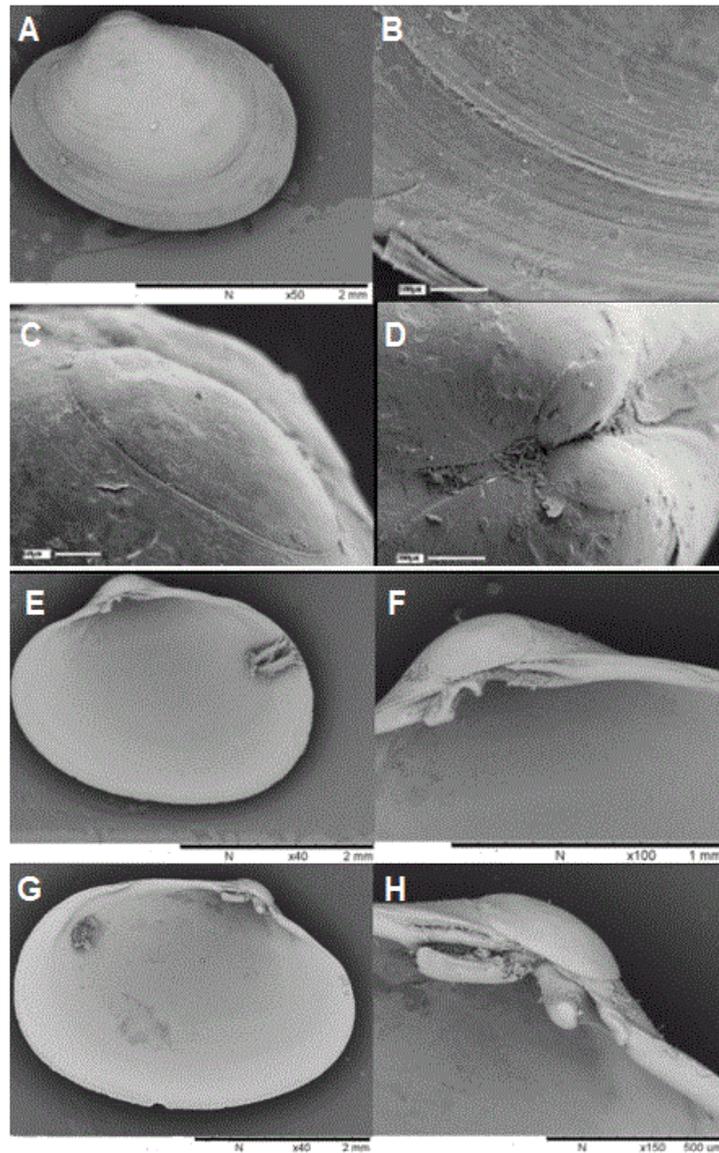


Figura 5: *Kidderia bicolor* (Martens, 1885) de Isla Doumer, Antártica. A. Vista lateral exterior de valva derecha. **B.** Detalles de las esculturas de la concha en la valva derecha. **C y D.** Detalles de la protoconcha **E.** Vista interior valva izquierda. **F.** Zoom diente de la charnela. **G.** Vista interior valva derecha. **H.** Zoom diente charnela. Escala imágenes B, C y D = 100, 60 y 200 μm , respectivamente.

levemente marcadas. Línea paleal ausente. Dientes de la charnela reducidos. Vistas laterales exteriores de ambas valvas derecha e izquierdas, y vistas internas de la concha en Figura 6.

***Kidderia sp1*, Isla Livingston (Punta Hannah - Shetland del Sur):** conchas con longitud máxima observada de 4 mm (radio ancho/altura= $0,3\pm 0,2$, $n=5$), oval y alargada. Umbos anchos, subcentrales cercanos al extremo anterior. Superficie de la concha lisa, con estrías concéntricas marcadas. La Figura 7 muestra solo imágenes de la parte interna de ambas valvas. Debido a la presencia en la charnela de 2 dientes en forma de V característico del género *Kidderia*, esta especie podría ser *Kidderia bicolor*.

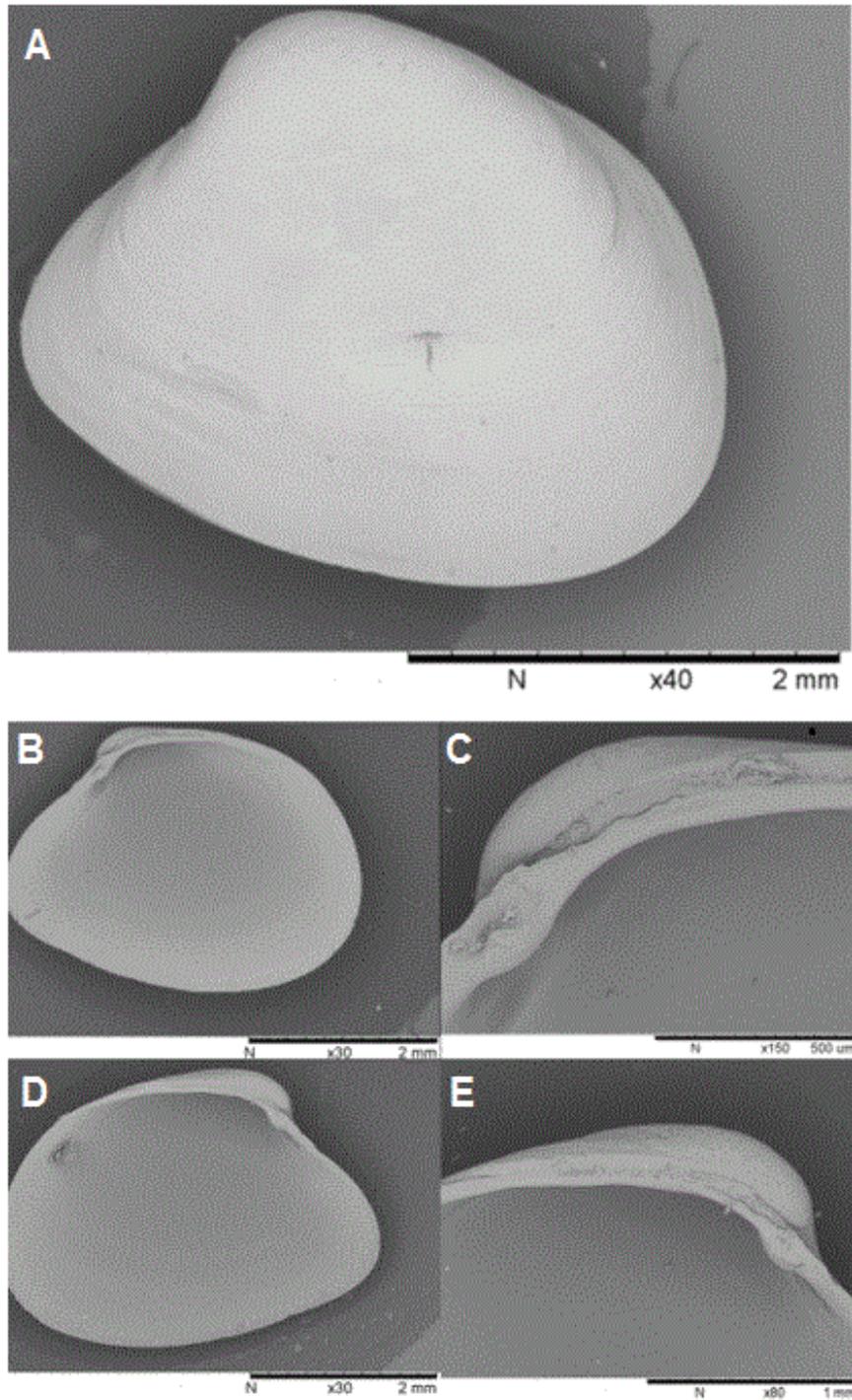


Figura 6: *Kidderia* sp1 de la Isla Diego Ramírez, Subantártica. **A.** Vista lateral exterior de la valva derecha. **B.** Vista interna valva izquierda. **C.** zoom diente de la charnela **D.** Vista interna valva derecha **E.** zoom diente charnela.

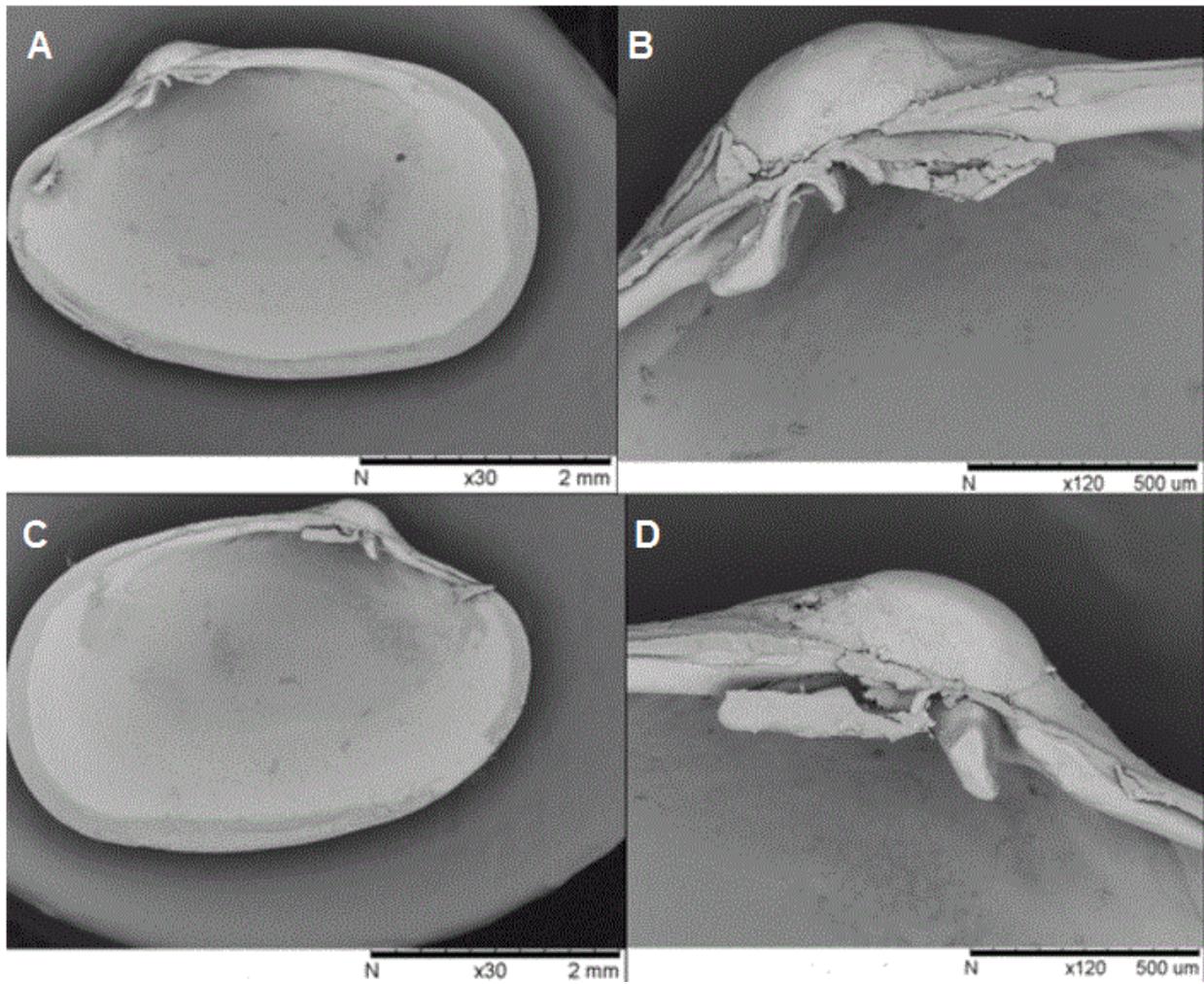


Figura 7: *Kidderia sp2* de Isla Livingston (Punta Hannah - Shetland del Sur). **A.** Vista interna valva derecha. **B.** zoom diente charnela. **C.** Vista interna valva izquierda **D.** zoom diente charnela.

Diversidad genética

A partir de las muestras de la especie *Kidderia bicolor* de la Isla Doumer (región Antártica), se secuenciaron los genes *ssu* y *cox1*. En el caso de las muestras de la Isla Diego Ramírez sólo se obtuvieron secuencias para el gen *ssu*. En el caso del gen *ssu* no se encontraron sitios polimórficos en el fragmento analizado de secuencias obtenidas de una misma localidad. Por otro lado, un alineamiento de 940 pb con una secuencia de *Kidderia bicolor* y una secuencia de *Kidderia sp2*, detectó 13 sitios polimórficos entre ambos taxa.

En el caso del gen *cox1*, se analizaron ocho secuencias exitosas resultantes de los productos de PCR secuenciados, de los individuos provenientes de Isla Doumer, encontrando tres haplotipos entre las secuencias analizadas, en la determinación de los índices de diversidad, detallado en la Tabla III.

Reconstrucción filogenética preliminar

La reconstrucción filogenética se realizó con un alineamiento de 845 pb para el gen *ssu* y 528 pb para el gen *cox1*. Como resultado de la búsqueda del modelo evolutivo, los modelos seleccionados fueron TIM1+I+G para el gen *cox1* y TIM3+I+G para el gen *ssu*. Tras la selección del modelo se procedió a la reconstrucción del mejor árbol mediante las aproximaciones filogenéticas de Máxima verosimilitud e Inferencia Bayesiana. Para el análisis máxima verosimilitud los valores de $-\ln L$ del árbol ML fueron 4464.6 para el gen *cox1* y 3375.8 para el gen *ssu*.

Tabla III: Índices de diversidad genética. Los índices del gen *cox1* obtenidos por los programas DnaSP (S, Pi y Hd) y Arlequin (Nº haplotipos, He y nº de alelos)

Locus	<i>cox1</i>
Nº Secuencias	8
Largo alineamiento (bp)	528
Nº sitios polimórficos (S)	40
Diversidad nucleotídica (π)	0,03
Diversidad Haplotípica (Hd)	0,46
Nº Haplotipos	3
He	0,33

Dado el uso y utilidad del marcador molecular *ssu* para realizar reconstrucciones tanto en unidades taxonómicas mayores, como a nivel de familias, se realizó una reconstrucción filogenética preliminar con este gen, utilizando las secuencias de las taxa de *Kidderia* obtenidas de este estudio. Además, se realizó una búsqueda de secuencias adicionales en la base de datos pública Genbank de familias de bivalvos antárticos de ordenes taxonómicos diferentes. Detalle de las especies a las cuales pertenecen las secuencias y su número de acceso en Genbank en Tabla IV.

En el caso del gen *cox1* se utilizaron solo las secuencias de haplotipos únicos. Para enriquecer el conjunto de datos con nuevas secuencias, se realizó una búsqueda de secuencias de especies de familias hermanas a la cual pertenece el género *Kidderia*. Cabe señalar que sólo existen tres taxa con datos genéticos para la familia Cyamiidae, donde las especies *Peregrinamor gastrochaenans* y *Peregrinamor ohshimai*, no son de la región Antártica.

Tabla IV. Grupos internos y externos usados para los análisis filogenéticos en esta tesis. Contiene el nombre científico de cada especie, localidad geográfica y código de acceso a la base de datos pública de Genbank.

Especie	Nº acceso <i>ssu</i>	Nº acceso <i>cox1</i>
<i>Cyamiomactra laminifera</i>	KC429382.1	KC429131.1
<i>Gaimardia trapezina</i>	AM774546.1	KX713464.1
<i>Lissarca notorcadensis</i>	-----	KF612461.1
<i>Lissarca miliaris</i>	KP340860.1	-----
<i>Yoldia eightsii</i>	KC984696.1	KC984730.1
<i>Peregrinamor gastrochaenans</i>	AB714771.1	AB714895.1
<i>Peregrinamor ohshimai</i>	AB714772.1	AB714896.1
<i>Mysella charcoti</i>	KC429372.1	-----
<i>Adacnarca nitens</i>	KT757767.1	-----
<i>Adacnarca limopsoides</i>	KP340849.1	-----
<i>Philobrya magellanica</i>	KP340855.1	-----
<i>Philobrya crista</i>	KP340859.1	-----
<i>Laternula elliptica</i>	AY192687.1	NC_022846.1
Grupos externos		
<i>Limatula ovalis</i>	AJ422060.1	-----
<i>Venus antiqua</i>	-----	JF301941.1

Como se puede observar en la Figura 8, el árbol filogenético presenta dos grandes clados. En el clado de interés, se genera un subclado donde se agrupan las especies *Cyamiomactra laminifera*, *Gaimardia trapesina* y *Kidderia sp2* (este estudio) mientras que *Kidderia bicolor* aparece en un terminal diferente dentro del grupo, siendo la especie basal del clado, con buen soporte de la probabilidad posterior bayesiana y bootstrap de análisis de máxima verosimilitud. Esta ubicación permite inferir que eventualmente *Kidderia bicolor* pudiera ser el ancestro de las especies contenidas en ese subclado, destacando que los taxa externos corresponden a especies que pertenecen a familias hermanas del género *Kidderia*.

El mismo análisis fue desarrollado para el gen *cox1* donde se observa que los haplotipos encontrados entre los individuos estudiados se ubican en un clado asociado al taxón *Cyamiomactra laminifera* el cual pertenece a la misma familia Cyamiidae, familia en la cual ha sido clasificado por morfología *Kidderia bicolor*, cuyos terminales comparten el mismo ancestro, como se observa en la Figura 9.

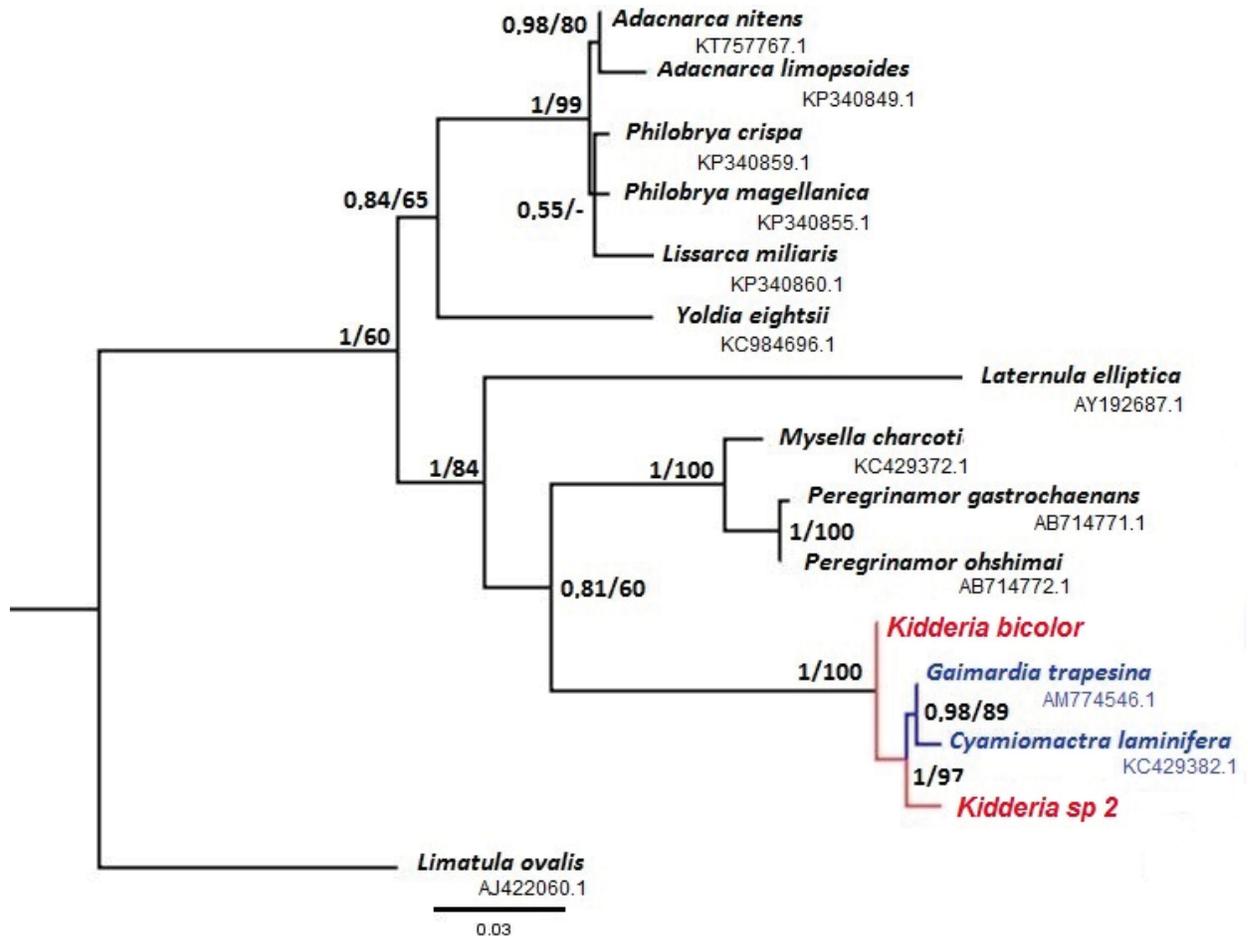


Figura 8: Filogenia molecular del gen *ssu* de bivalvos Antárticos. Valores de los nodos muestran la probabilidad posterior bayesiana y el soporte bootstrap de máxima verosimilitud respectivamente.

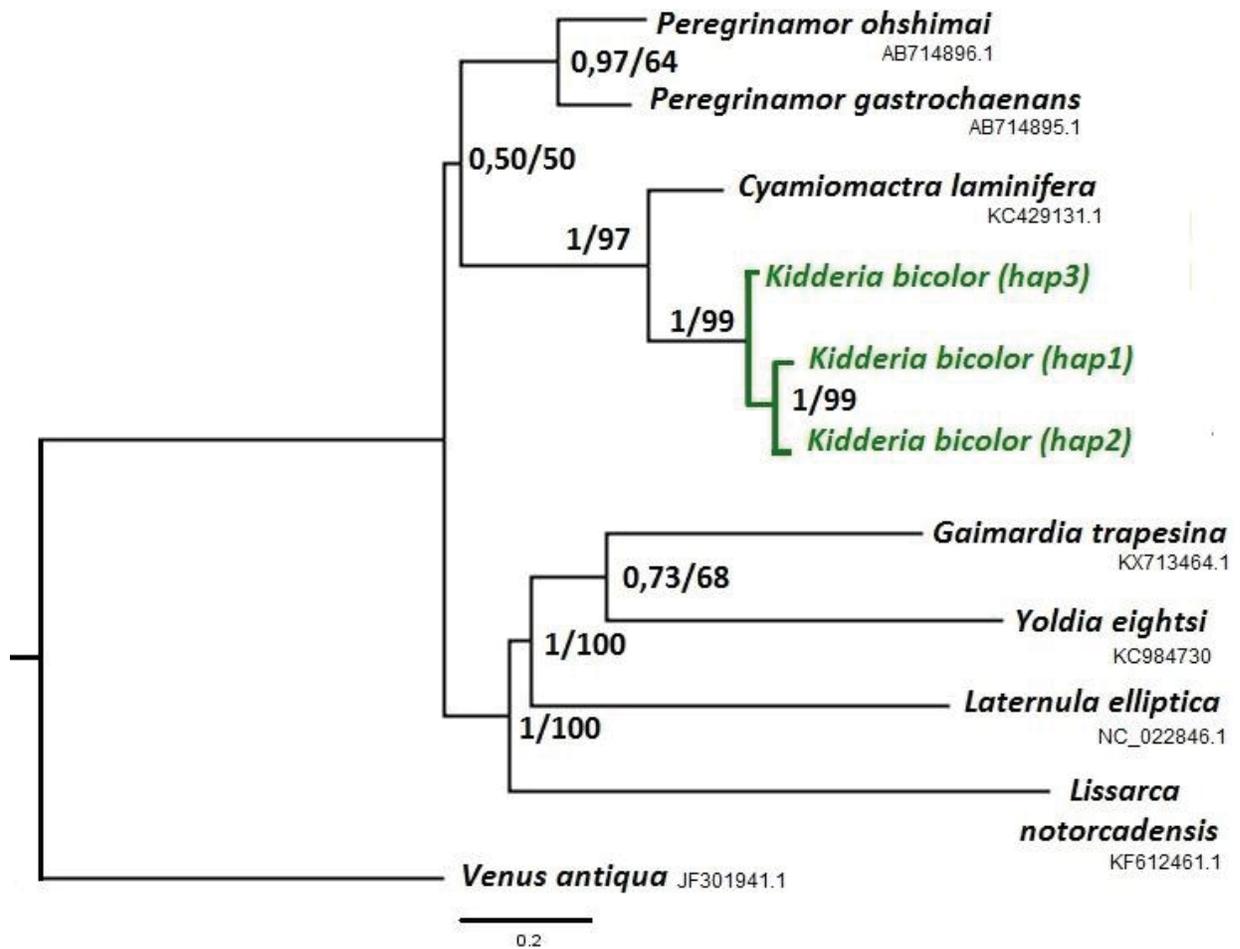


Figura 9: Filogenia molecular del gen citocromo C oxidasa I (*cox1*) de bivalvos Antárticos. Hap 1, 2 y 3= Haplotipos. Valores de los nodos muestran la probabilidad posterior bayesiana y el soporte bootstrap de máxima verosimilitud respectivamente.

5. DISCUSIÓN

Este estudio muestra el primer análisis filogenético realizado con especies del género *Kidderia*. La biodiversidad marina del continente Antártico y de regiones Subantárticas para algunos taxa de bivalvos permanece sin ser estudiados en detalle, es por eso que la identificación de especies tanto morfológicamente como genéticamente es esencial para una correcta clasificación taxonómica.

Con la finalidad de investigar los orígenes evolutivos y la radiación latitudinal de la familia Cyamiidae pobremente conocida en el Océano Austral y Antártico, se realizó una identificación de individuos pertenecientes a esta familia, a través de algunos caracteres morfológicos y utilizando herramientas moleculares secuenciando dos loci, uno nuclear (*ssu*) y uno mitocondrial (*cox1*).

Lo primero que se quiere esclarecer es si los taxa de *Kidderia* son válidos y si su identificación por morfología que sitúa a las especies de *Kidderia* dentro de la familia Cyamiidae es correcto. Al revisar la literatura de la clase Bivalvia en general se puede notar que aún hay relaciones evolutivas no resueltas. En conclusión, este estudio es relevante por dos razones. Primero, las diferentes expediciones que se han realizado en el continente Antártico y en la región Magallánica han registrado diferentes especies sin claves taxonómicas claras, es así como en bivalvos los datos morfológicos no han conducido a una filogenia estable, ni a una taxonomía de nivel superior ampliamente aceptada (Taylor *et al.*, 2007). Por lo tanto, es necesario realizar una aclaración acerca de los caracteres que fueron determinantes para señalar que las especies de la familia Gaimardiidae y Cyamiidae corresponden a entidades diferentes y no a la misma o

sinónimas unidades taxonómicas como han sido tratadas en el registro de la literatura histórica. Por ejemplo, algunas características morfológicas que relacionan a miembros de las familias Cyamiidae y Gaimardiidae, fueron reportadas por Morton (1979) donde señala que los dientes de la charnela son de tipo lucenoide, con un ligamento que es subinterno o externo en *Gaimardia* y *Kidderia*, características comunes en ambas familias. Además, declara que ambos grupos están cercanamente relacionados y considera que *Gaimardia* es una subfamilia de los Cyamiidae. De lo declarado por Morton (1979) se destaca que hasta esa fecha no existen estudios sobre la morfología funcional de los Cyamiidae y Gaimardiidae. Es por eso que dentro de estos géneros se produce una confusión al momento de clasificar sus especies, como es el caso de los géneros *Gaimardia* (Gaimardiidae) y *Kidderia* (Cyamiidae). Segundo, la falta de incorporación de nuevos datos genéticos para especies de bivalvos que habitan las regiones de este estudio, se ve limitado por períodos de muestreos acotados. Lo anterior se traduce en no incluir nuevas secuencias de ADN de especies, que solo han sido descritas por morfología, en reconstrucciones filogenéticas a nivel de familia que se han realizado en estos últimos años de la clase Bivalvia (González *et al.*, 2015 y Combosh *et al.*, 2017).

La falta de claridad dentro de las relaciones evolutivas de la superfamilia Cyamioidea, y en general de la clase Bivalvia se debe en gran parte a lo que señala Cook *et al.*, (2010), donde discute que los taxónomos tradicionales raramente explicitan sus métodos de delimitación de especies, ya que las características para poder clasificar diferentes entidades en parte deben ser inferidos por cada lector. En lo más básico una especie podría ser un tipo morfológico que es diferente de otros tipos (Mayr, 1996). Para algunos taxónomos practicantes, esto podría ser suficiente, pero para otros usuarios de

taxonomía, es importante capturar otros aspectos de la biodiversidad (por ejemplo, grupos genéticos, diversidad genética, diversidad de linajes evolutivamente distintos), en lugar de identificar sólo discontinuidades morfológicas (Hey, 2001).

Es por eso que los datos moleculares dieron inmediatas contribuciones a la taxonomía y filogenia de los bivalvos, a pesar que aún es discutida en literatura la falta de consenso de enfoques metodológicos compartidos para recuperar y analizar datos moleculares en bivalvos. Por otro lado, Giribet y Distel (2003), discuten que la morfología resuelve nodos más profundos que las herramientas moleculares mientras que las secuencias de ADN son más adecuadas para las divergencias recientes (Giribet y Distel, 2003; Mikkelsen *et al.*, 2006 y Plazzi *et al.*, 2010). Es importante señalar que para mejorar la filogenia de los bivalvos se han realizado intentos de unir la morfología con aproximaciones genéticas como en los trabajos realizados por Giribet *et al.* (2002) y Bieler *et al.* (2014).

Actualmente, por medio de aproximaciones filogenéticas a mayor escala se ha demostrado la monofilia de las 5 subclases por los cuales está compuesto la clase Bivalvia (Taylor *et al.*, 2007, Plazzi *et al.*, 2010, Sharma *et al.*, 2013, Bieler *et al.*, 2014, González *et al.*, 2015 y Combosh *et al.*, 2017). Sin embargo, dentro de la subclase Heterodonta, las relaciones taxonómicas inferiores permanecen en duda, como ocurre en los órdenes Myoida y Veneroida (Matsumoto *et al.*, 2003, Williams *et al.*, 2004 y Taylor *et al.*, 2007).

Según los resultados de microscopía electrónica, el carácter morfológico clave para señalar que el taxa denominado hasta aquí como *Kidderia sp2* no corresponde, es

debido a que no presenta el diente en forma de V o también referido como bífido característico del género *Kidderia* (Ohdner, 1924). Dado que los dientes de esta especie son muy tenues casi ausentes y la forma trapezoidal lisa de la concha se puede asociar con la descripción de una especie de *Gaimardia* (Hedley, 1916), que tampoco el taxón *Gaimardia trapesina* debido a que la forma de la concha externa no corresponde. Su confusión pudo deberse a que la concha externa presenta la forma trapezoidal o subquadrangular característico de la especie *Kidderia subquadrata* (Shavica, 1974). Lo anteriormente señalado se condice con los resultados filogenéticos obtenidos con el gen *ssu* ya que el denominado taxa *Kidderia sp2* se agrupa cercano al taxón *Gaimardia trapesina*. Por lo tanto, el status de las especies de la Isla Diego Ramírez permanece como indeterminada, con probable asociación al género *Gaimardia*.

Cabe señalar también que los registros muestran que las especies de *Kidderia* han sido confundidas en diferentes puntos dentro de la región Antártica. En el estudio de Clarke (1996) reporta la presencia de *Kidderia bicolor* en Isla Amsler, donde se ubica la base estadounidense Palmer. Mientras que Barnes *et al.* (2004) reporta como “gaimardido” a *Kidderia sp* en las Islas Georgia del Sur. Así mismo, Aghmich *et al.* (2016) reporta a *Kidderia subquadrata* en la Isla Rey Jorge (Shetland del Sur), sin embargo, ésta última se asemeja a la *Kidderia bicolor* descrita por Schories (2016). Esta última referencia fue la usada para describir a *Kidderia bicolor* de este estudio.

De acuerdo a lo anteriormente señalado se requiere evaluar nuevamente este género con nuevas muestras de esta localidad con las que ya se cuenta.

Según los resultados filogenéticos obtenidos, realizado con el marcador nuclear *ssu* se puede observar en la [Figura 8](#), que en un clado se agrupan los taxa de *Kidderia bicolor*, *Kidderia sp2*, *Cyamiomactra laminifera* y *Gaimardia trapesina*, siendo *Kidderia bicolor* basal en el clado y posiblemente ancestro común de los demás taxa.

En la reconstrucción realizada con el marcador mitocondrial *cox1*, se logró identificar que los haplotipos de los individuos de *Kidderia bicolor* se agruparon junto al taxón de *Cyamiomactra laminifera*, miembro de la familia Cyamiidae (Figura 9).

Como se observa en la [Figura 9](#) los taxa de *Cyamiomactra laminifera* y *Kidderia bicolor* respecto a *Gaimardia trapesina*, se encuentran separados en clados parafiléticos. Esta filogenia es discordante respecto a la filogenia obtenida con el gen *ssu*, dado que los taxa de *Kidderia*, *Cyamiomactra* y *Gaimardia* se agruparon juntos. Esto puede deberse a las siguientes razones: (i) no se contaban con los mismos taxa, debido a que no estaban disponibles para ambos genes de este estudio, por ejemplo, *Mysella charcoti* taxón disponible solo para el gen *ssu*. (ii) El fragmento analizado para el gen *ssu* fue de 845 pb versus 528 pb para el gen *cox1* y considerando las diferentes variabilidades en sus tasas de mutación, siendo alta para *cox1* y bajo para el gen *ssu*, hace que el fragmento analizado no otorgue la suficiente resolución en los árboles inferidos, según la información genética que se puede obtener de cada gen, evidenciado en el bajo soporte en uno de los nodos del árbol de la filogenia molecular de *cox1* en el clado donde se ubican los haplotipos de *Kidderia bicolor*. (iii) De acuerdo a lo anterior, también cabe señalar que el número de individuos utilizados en este análisis fue diferente debido a que solo existía una secuencia para algunos taxa, es decir un haplotipo por cada taxón.

Finalmente, (iv) la diferencia entre las tasas de sustitución entre ambos marcadores podría explicar esta discordancia. Para el gen *cox1* se reporta una tasa de sustitución de 1.3%/Ma⁻¹ (Wilke *et al.*, 2009) y para el gen *ssu* una tasa de 0.006–0.04 %/Ma (Anne, 2006).

Esta primera aproximación filogenética realizada con el gen *ssu* (Figura 8) es concordante con los estudios realizados por González *et al.* (2015) y Combosh *et al.* (2017) agrupando los taxa representativos de las familias hermanas (*Cyamiomactra* y *Gaimardia*) junto con los taxa de este estudio en un clado y, además permitiendo inferir una mayor distancia genética de *Kidderia bicolor* ubicándose como ancestral. Se puede corroborar también que el marcador genético nuclear *ssu* permitió validar preliminarmente estos nuevos taxa de las localidades de Isla Diego Ramírez (Subantártica) e Isla Doumer (Antártica). Estos datos se sumarían a los datos genéticos existentes en la base pública Genbank donde se cuenta con datos para especies de los géneros *Philobrya*, *Adacnarca*, *Lissarca*, *Limatula*, *Cyamiomactra*, *Yoldia*, *Laternulla* y *Adamussium*.

Por lo tanto, la combinación al utilizar tantos genes nucleares como mitocondriales permiten reconstruir la historia evolutiva de la especie, evitando el sesgo de reconstruir solo la historia evolutiva de los genes, lo cual sería erróneo (Cutter, 2013). De igual forma es importante que la existencia de linajes divergentes en un gen mitocondrial sea corroborada por la divergencia en un locus nuclear, para aclarar si esos linajes de ADNmt reflejan la variación de haplotipos a nivel de población, especialmente si sólo unos

cuantos individuos han sido secuenciados de diferentes localidades, o que los linajes históricos independientes debieran ser reconocidos como especies distintas.

Finalmente, señalar que estudios mitogenómicos comparativos de especies estrechamente relacionadas podría permitir el descubrimiento de genes mitocondriales más informativos para la identificación de especies, teniendo el potencial de proporcionar un mejor soporte nodal para la inferencia de la relación filogenética (Cutter, 2013 y Ellegen *et al.*, 2016). Es así como la información contenida en las secuencias de ADN constituye una prometedora fuente de datos para determinar patrones biogeográficos de este grupo de bivalvos bentónicos antárticos. Por otra parte, estimar patrones de diversidad genética y estructura en cada una de las especies y provincias analizadas permitirá comprender mejor los procesos detrás de estos patrones como pudo haber sido el impacto de los periodos glaciales en la radiación de taxa de bivalvos a lo largo de un gradiente latitudinal en las regiones Antártica y Subantártica.

6. RESULTADOS ESPERADOS

Para la primera hipótesis se espera que los análisis filogenéticos para los taxa del género *Kidderia* de las regiones Antártica y Sudamérica revelen la presencia de al menos las 5 especies que han sido descritas en esta zona. Por otro lado, se espera que la divergencia de estos taxa Antárticos y Subantárticos sea concordante con los tiempos de divergencia detectados en algunas familias de bivalvos (Jackson *et al.*, 2015) asociados a acontecimientos como la formación y posterior intensificación de la CCA (entre las épocas del Oligoceno y Mioceno). Esto debido a que es importante considerar que la hipótesis de Pearse plantea que las fuertes corrientes en el Paso de Drake en los últimos 30 millones de años ha desplazado y transportado a especies incubadoras a nuevas ubicaciones en el Mar de Escocia y otros sectores dentro del continente Antártico (Pearse *et al.*, 2009).

En el caso de la segunda hipótesis donde se abordará una aproximación filogeográfica, se espera que exista estructuración entre poblaciones de *Kidderia bicolor* dentro del continente Antártico. Algunos estudios poblacionales que soportan esta idea son estudios de especies con capacidad de dispersión de larvas como las del género *Nacella*, donde se observaron bajos niveles de diversidad genética y ausencia de estructuraciones genéticas en distribuciones Antárticas (González Wevar *et al.*, 2012). Es de esperar por tanto que en especies con una estrategia contrastante ocurra el proceso inverso. Además, como se señaló anteriormente, el mismo patrón se observó con la especie *Lissarca notorcadensis* (Linse *et al.*, 2007) encontrándose seis grupos de haplotipos geográficamente explícitos en poblaciones Antárticas.

Búsqueda de marcadores mitocondriales por medio de secuenciación masiva.

Actualmente para resolver problemas taxonómicos dentro de los órdenes de la clase Bivalvia se está haciendo preferente uso de marcadores mitocondriales (por ejemplo, 16s, *cox1*, *nad6*) debido a que una existe mayor cobertura de datos genéticos en las bases públicas (ejemplo, Genbank) lo que facilita la comparación con los datos que se obtengan de este estudio. Además, la adquisición de marcadores variables es requisito para continuar con la aproximación filogeográfica.

Hasta la fecha, la mayoría de los trabajos publicados se han basado en la amplificación de un único marcador de ADN (típicamente estándar) como es el caso del marcador mitocondrial *cox1* utilizado en este estudio, cuyos partidores fueron descritos por Folmer *et al.* (1994), siendo uno de los partidores universales más utilizados en animales. Sin embargo, su estandarización presenta eficiencias muy variadas de unión de estos partidores a través de los diferentes taxa, presentando reportes de fallas en pruebas de PCR (Rubidoff *et al.*, 2006 y Chen, 2011). Es por eso que estos marcadores han sufrido diferentes modificaciones por parte de otros autores con la finalidad de generar partidores específicos para los taxa en estudio (Matsumoto, 2003, Prendini *et al.*, 2005, Rubidoff *et al.*, 2006, González Wevar *et al.*, 2010 y Chen, 2011). Lo anterior demuestra que con este partidore no siempre se logra estandarizar protocolos de PCR, como es el caso de este estudio. Aunque se han hecho progresos significativos hacia la construcción de bibliotecas de referencia de ADN útiles para la identificación taxonómica, como es el caso del proyecto de código internacional de barras de la vida (iBOL, <http://ibol.org>), tales esfuerzos se centran principalmente en marcadores cuidadosamente

seleccionados, como es el gen *cox1*, dejando a un lado otros genes taxonómicamente informativos. Para otros genes mitocondriales (por ejemplo, *cytb* y *nad6*) se ha demostrado su efectividad en reconstrucciones filogenéticas y análisis de delimitación de especies (Nicolas *et al.*, 2012 y Wu *et al.*, 2014).

Alternativamente, se plantea la estrategia de secuenciación del genoma mitocondrial completo. Este resultado puede producir un conjunto de datos completo de referencias en un solo proceso, incluyendo genes codificantes de proteínas, ADN ribosómico (16 y 12s), ARN de transferencia y la región de control hipervariable (D-loop). A pesar que puede ser considerado de igual forma como un locus, la secuenciación de mitogenomas permitirá obtener la secuencia codificante completa del gen *cox1* específico para los taxa de este estudio y no solo el fragmento obtenido hasta ahora de 528 pb, un tamaño bastante inferior a lo esperado de 710 pb utilizando los partidores “barcoding” de Folmer *et al.*, (1994). Con esta estrategia existe mayor probabilidad de evitar engorrosos procesos de estandarización, que pueden ser explicados preliminarmente en parte por la alta variabilidad intraespecífica del gen *cox1* detectado en individuos de *Kidderia bicolor* secuenciados hasta este avance.

Por las razones presentadas se permite justificar la realización de la secuenciación del genoma mitocondrial de al menos la especie *Kidderia bicolor*.

7. LITERATURA CITADA

Aghmich, A., Taboada, S., Toll, L., & Ballesteros, M. (2016). First assessment of the rocky intertidal communities of Fildes Bay, King George Island (South Shetland Islands, Antarctica). *Polar Biology*, 39(1), 189-198.

Alder, V., Azzaro, M., Hucke-Gaete, R., Mosetti, R., Orgeira, J. L., Quartino, L., ... & Marschoff, E. R. (2016). H. Southern Ocean.

Anne, C. (2006). Choosing the right molecular genetic markers for studying biodiversity: from molecular evolution to practical aspects. *Genetica*, 127(1-3), 101-120.

Aronson, R. B., & Blake, D. B. (2001). Global climate change and the origin of modern benthic communities in Antarctica. *American Zoologist*, 41(1), 27-39.

Arntz, W., Brey, T., & Gallardo, V. A. (1994). Antarctic zoobenthos. *Oceanography and marine biology*, 32, 241-304.

Arntz W, Gutt J, Klages M (1997) Antarctic marine biodiversity. In: Battaglia B, Valencia J, Walton DWH (eds) Antarctic communities: species, structure and survival. Cambridge University Press, Cambridge, pp 3–1.

Arntz, W. E. (1999). Magellan-Antarctic: ecosystems that drifted apart. Summary review. *Scientia Marina*, 63(S1), 503-511.

Avise, J.C., 2009. Phylogeography: retrospect and prospect. *J. Biogeogr.* 36 (1), 3–15.

Barnes, D. K., Linse, K., Waller, C., Morely, S., Enderlein, P., Fraser, K. P., & Brown, M. (2006). Shallow benthic fauna communities of South Georgia Island. *Polar Biology*, 29(3), 223-228.

Barnes, D. K., & Conlan, K. E. (2007). Disturbance, colonization and development of Antarctic benthic communities. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 362(1477), 11-38.

Bandelt H-J, P Forster & A Rohl (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Bieler, R., Mikkelsen, P. M., Collins, T. M., Glover, E. A., González, V. L., Graf, D. L., ... & Staubach, S. (2014). Investigating the Bivalve Tree of Life—an exemplar-based approach combining molecular and novel morphological characters. *Invertebrate Systematics*, 28(1), 32-115.

Brandt, A., Linse, K., & Mühlenhardt-Siegel, U. (1999). Biogeography of Crustacea and Mollusca of the Subantarctic and Antarctic regions. *Scientia Marina*, 63(S1), 383-389.

Canapa, A., Barucca, M., Caputo, V., Marinelli, A., Cerioni, P. N., Olmo, E., & Odierna, G. (2000). A molecular analysis of the systematics of three Antarctic bivalves. *Italian Journal of Zoology*, 67(S1), 127-132.

Chown, S. L., Clarke, A., Fraser, C. I., Cary, S. C., Moon, K. L., & McGeoch, M. A. (2015). The changing form of Antarctic biodiversity. *Nature*, 522(7557), 431-438.

Clarke, A. (1996). *The distribution of Antarctic marine benthic communities* (pp. 219-230). American Geophysical Union.

Clarke, A., & Johnston, N. M. (2003). Antarctic marine benthic diversity. *Oceanography and marine biology*, 41, 47-114.

Clarke A, Barnes DKA, Hodgson DA (2005) How isolated is Antarctica? *Trends Ecol Evol* 20:1–3.

Contador, T., S. Rosenfeld, J. Ojeda & J. Kennedy. 2015. Historia natural de los invertebrados acuáticos del Cabo de Hornos. Fundación Omora, Universidad de Magallanes, Punta Arenas, Chile 49 pp.

Combosch, D. J., Collins, T. M., Glover, E. A., Graf, D. L., Harper, E. M., Healy, J. M., ... & Taylor, J. D. (2017). A family-level Tree of Life for bivalves based on a Sanger-sequencing approach. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 107, 191-208.

Cook, L. G., Edwards, R. D., Crisp, M. D., & Hardy, N. B. (2010). Need morphology always be required for new species descriptions? *Invertebrate systematics*, 24(3), 322-326.

Cutter, A. D. (2013). Integrating phylogenetics, phylogeography and population genetics through genomes and evolutionary theory. *Molecular phylogenetics and evolution*, 69(3), 1172-1185.

Crame, J. A. (1999). An evolutionary perspective on marine faunal connections between southernmost South America and Antarctica. *Scientia Marina*, 63(S1).

Chen, J., Li, Q., Kong, L., & Yu, H. (2011). How DNA barcodes complement taxonomy and explore species diversity: the case study of a poorly understood marine fauna. *PLoS one*, 6(6), e21326.

Dall, W. – 1914. Mollusca from South Georgia. *Sci.Bull. Brooklyn Instit.* 2:67-70

Dettai, A., Adamowicz, S. J., Allcock, L., Arango, C. P., Barnes, D. K., Barratt, I., & Denis, F. (2011). DNA barcoding and molecular systematics of the benthic and demersal organisms of the CEAMARC survey. *Polar Science*, 5(2), 298-312.

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 Part II: Topical Studies in Oceanography*, 58(1), 205-211.

Ellegren, H., & Galtier, N. (2016). Determinants of genetic diversity. *Nature Reviews Genetics*.

Excoffier L & Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.

Fevolden, S. E., & Schneppenheim, R. (1988). Genetic population structure of *Euphausia superba* DANA in the Atlantic sector of the Southern Ocean as demonstrated by different electrophoretic techniques. *Polar Biology*, 9(1), 1-8.

Ferraris, F., & Aldunate, R. (2010). ANALISIS MORFOESTRUCTURAL DE LA ZONA DEL PASO DRAKE. *Andean Geology*, (7).

Folmer O (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular marine biology and biotechnology*, 3 (5), 294-299.

Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic biology*, syt033.

Fraser, C. I., Nikula, R., Spencer, H. G., & Waters, J. M. (2009). Kelp genes reveal effects of subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(9), 3249-3253.

Gaitán-Espitia, J. D., & Hofmann, G. E. (2016). Mitochondrial genome architecture of the giant red sea urchin *Mesocentrotus franciscanus* (Strongylocentrotidae, Echinoidea). *Mitochondrial DNA Part A*, 27(1), 591-592.

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(7), 869-896.

Giribet, G., & Wheeler, W. (2002). On bivalve phylogeny: a high-level analysis of the Bivalvia (Mollusca) based on combined morphology and DNA sequence data. *Invertebrate Biology*, 121(4), 271-324.

Giribet, G., & Distel, D. L. (2003). Bivalve phylogeny and molecular data. *Molecular systematics and phylogeography of mollusks*, (3), 45-90.

González-Wevar, C. A., Nakano, T., Cañete, J. I., & Poulin, E. (2010). Molecular phylogeny and historical biogeography of *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) in the Southern Ocean. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(1), 115-124.

González-Wevar, C. A., Diaz, A., Gerard, K., Cañete, J. I., & Poulin, E. (2012). 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, V. L., Andrade, S. C., Bieler, R., Collins, T. M., Dunn, C. W., Mikkelsen, P. M., ... & Giribet, G. (2015, February). A phylogenetic backbone for Bivalvia: an RNA-seq approach. In *Proc. R. Soc. B* (Vol. 282, No. 1801, p. 20142332). The Royal Society.

González-Wevar, C. A., Hüne, M., Rosenfeld, S., Saucède, T., Féral, J. P., Mansilla, A., & Poulin, E. (2016). Patterns of genetic diversity and structure in Antarctic and sub-Antarctic *Nacella* (Patellogastropoda: Nacellidae) species. *Biodiversity*, *17*(1-2), 46-55.

Griffiths, H. J. (2010). Antarctic marine biodiversity—what do we know about the distribution of life in the Southern Ocean? *PloS one*, *5*(8), e11683.

Helmuth, B., Veit, R. R., & Holberton, R. (1994). Long-distance dispersal of a subantarctic brooding bivalve (*Gaimardia trapesina*) by kelp-rafting. *Marine biology*, *120*(3), 421-426.

Held, C. (2000). Phylogeny and biogeography of serolid isopods (Crustacea, Isopoda, Serolidae) and the use of ribosomal expansion segments in molecular systematics. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, *15*(2), 165-178.

Hewitt, G. M. (2004). The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. *Frontiers in zoology*, *1*(1), 4.

Hey, J. (2001). The mind of the species problem. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(7), 326-329.

Hoffman JI, Clarke A, Clark MS, Fretwell P, Peck LS (2012) Unexpected Fine-Scale Population Structure in a Broadcast-Spawning Antarctic Marine Mollusc. PLoS ONE 7(3): e32415.

Hunter, R. L., & Halanych, K. M. (2008). Evaluating connectivity in the brooding brittle star *Astrofoma agassizii* across the Drake Passage in the Southern Ocean. *Journal of Heredity*, 99(2), 137-148.

Häuseermann, V., & Försterra, G. (2009). Fauna Marina Bentónica de la Patagonia Chilena: Guía de identificación ilustrada. *Nature in Focus, Santiago*.

Hüne, M., González-Wevar, C., Poulin, E., Mansilla, A., Fernández, D. A., & Barrera-Oro, E. (2015). Low level of genetic divergence between Harpagifer fish species (Perciformes: Notothenioidei) suggests a Quaternary colonization of Patagonia from the Antarctic Peninsula. *Polar Biology*, 38(5), 607-617.

Jackson, J. A., Linse, K., Whittle, R., & Griffiths, H. J. (2015). The evolutionary origins of the Southern Ocean philobryid bivalves: hidden biodiversity, ancient persistence. *PloS one*, 10(4), e0121198.

Janosik, A. M., Mahon, A. R., & Halanych, K. M. (2011). Evolutionary history of Southern Ocean *Odontaster* sea star species (Odontasteridae; Asteroidea). *Polar biology*, 34(4), 575-586.

Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., ... & Thierer, T. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649.

Lauriat-Rage, A., Carriol, R. P., Lozouet, P., Giret, A., & Leyrit, H. (2002). Miocene molluscs and barnacles from Mont Rond, Kerguelen Islands. *Alcheringa*, 26(2), 275-287.

Librado P & J Rozas (2009) DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Linse, K., Griffiths, H. J., Barnes, D. K., & Clarke, A. (2006). Biodiversity and biogeography of Antarctic and sub-Antarctic mollusca. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53(8), 985-1008.

Linse, K., Cope, T., Lörz, A. N., & Sands, C. (2007). Is the Scotia Sea a centre of Antarctic marine diversification? Some evidence of cryptic speciation in the circum-Antarctic bivalve *Lissarca notorcadensis* (Arcoidea: Philobryidae). *Polar Biology*, 30(8), 1059-1068.

Martens, E – 1885. Vorläufige Mittheilungen über die Mollusken-fauna von Süd Georgien S.B. *Ges.naturf. Fr. Berlin*, 89-94.

Matsumoto, M. (2003). Phylogenetic analysis of the subclass Pteriomorphia (Bivalvia) from mtDNA COI sequences. *Molecular phylogenetics and evolution*, 27(3), 429-440.

Mayr, E. (1996). What is a species, and what is not?. *Philosophy of science*, 63(2), 262-277.

Medlin, L., & Zingone, A. (2007). A taxonomic review of the genus *Phaeocystis*. *Biogeochemistry*, 83(1-3), 3-18.

Mikkelsen, P. M., BIELER, R., Kappner, I., & Rawlings, T. A. (2006). Phylogeny of Veneroidea (Mollusca: Bivalvia) based on morphology and molecules. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 148(3), 439-521.

Miller D. et al., 2013. *Ocean currents influence the genetic structure of an intertidal mollusc in southeastern Australia – implications for predicting the movement of passive dispersers across a marine biogeographic barrier*. *Ecol Evol*.

Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., ... & Vogler, A. P. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic biology*, syp027.

Morton, B. (1979). The biology, functional morphology and taxonomic status of Gaimardia (Neogaimardia) finlayi (BivaMa: Gaimardiidae). *Journal of Zoology*, 188(1), 123-142.

Morton, B. (2015). The biology and functional morphology of the placental embryo-brooding Neolepton salmoneum, a comparison with Neolepton subtrigonum (Bivalvia: Cyamioidea: Neoleptonidae), and a discussion of affinities. *American Malacological Bulletin*, 33(1), 1-21.

Page, T. J., & Linse, K. (2002). More evidence of speciation and dispersal across the Antarctic Polar Front through molecular systematics of Southern Ocean Limatula (Bivalvia: Limidae). *Polar Biology*, 25(11), 818-826.

Passos, F. D., & Magalhães, F. T. (2011). A comparative study of the Bivalvia (Mollusca) from the continental shelves of Antarctica and Brazil. *Biota Neotropica*, 11(1), 143-155.

Patarnello T, Bargelloni L, Varotto V, Battaglia B (1996) Krill evolution and the Antarctic ocean currents: evidence of vicariant speciation as inferred by molecular data. *Mar Biol* 126:1432–1793.

Pearse, J. S., Mooi, R., Lockhart, S. J., & Brandt, A. (2009). Brooding and species diversity in the Southern Ocean: selection for brooders or speciation within brooding clades. *Smithsonian at the poles: contributions to international polar year science*, 181-196.

Poulin, E., González-Wevar, C., 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.

Posada D & Ka Crandall (2001) Intraspecific phylogenetics: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution* 16: 37-45.

Pudsey, C. J., & Howe, J. A. (1998). Quaternary history of the Antarctic Circumpolar Current: evidence from the Scotia Sea. *Marine Geology*, 148(1-2), 83-112.

Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular ecology*, 21(8), 1864-1877.

Plazzi, F., & Passamonti, M. (2010). Towards a molecular phylogeny of Mollusks: Bivalves' early evolution as revealed by mitochondrial genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 57(2), 641-657.

Prendini, L., Weygoldt, P., & Wheeler, W. C. (2005). Systematics of the *Damon variegatus* group of African whip spiders (Chelicerata: Amblypygi): evidence from behaviour, morphology and DNA. *Organisms Diversity & Evolution*, 5(3), 203-236.

Pörtner, H. O., Peck, L., & Somero, G. (2007). Thermal limits and adaptation in marine Antarctic ectotherms: an integrative view. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1488), 2233-2258.

Riesgo, A., Taboada, S., & Avila, C. (2015). Evolutionary patterns in Antarctic marine invertebrates: An update on molecular studies. *Marine genomics*, 23, 1-13.

Rintoul, S., Hughes, C., & Olbers, D. (2001). The Antarctic circumpolar current system. *In: Ocean Circulation and Climate/G. Siedler, J. Church and J. Gould, eds. New York: Academic Press. p.*, 271-302.

Rozas J., Librado P., Sánchez-Del Barrio J., Messeguer X. & Rozas R. 2010. DnaSP Version 5.

RÖHL A (2002) NETWORK software.

Rogers, A. D., Morley, S., Fitzcharles, E., Jarvis, K., & Belchier, M. (2006). Genetic structure of Patagonian toothfish (*Dissostichus eleginoides*) populations on the Patagonian Shelf and Atlantic and western Indian Ocean Sectors of the Southern Ocean. *Marine Biology*, 149(4), 915-924.

Rogers, A. D. (2007). Evolution and biodiversity of Antarctic organisms: a molecular perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 362(1488), 2191-2214.

Ronquist F., Teslenko M., van der Mark P., Ayres D., Darling A., Höhna S., Larget B., Liu L., Suchard M. & Huelsenbeck J. 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic biology* 61:539-42.

Rubinoff, D., Cameron, S., & Will, K. (2006). A genomic perspective on the shortcomings of mitochondrial DNA for “barcoding” identification. *Journal of Heredity*, 97(6), 581-594.

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(11), 3293-3303.

Scher, H. D., & Martin, E. E. (2006). Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science*, 312(5772), 428-430.

Simpson, R. D. (1977). The reproduction of some littoral molluscs from Macquarie Island (Sub-Antarctic). *Marine biology*, 44 (2), 125-142.

Sharma, P. P., Zardus, J. D., Boyle, E. E., González, V. L., Jennings, R. M., McIntyre, E., ... & Giribet, G. (2013). Into the deep: a phylogenetic approach to the bivalve subclass Protobranchia. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 69(1), 188-204.

Shabica SV. Reproductive biology of the brooding Antarctic lamellibranch *Kidderia Subquadrata* Pelseneer 1974. MSc Thesis. School of Oceanography, Oregon.

Schories, D. Marine Wildlife King George Island Antarctica páginas 145.146.

Stankovic, A., Spalik, K., Kamler, E., Borsuk, P., & Weglenski, P. (2002). Recent origin of sub-Antarctic notothenioids. *Polar Biology*, 25(3), 203-205.

Stickley, C. E., Brinkhuis, H., Schellenberg, S. A., Sluijs, A., Röhl, U., Fuller, M., ... & Williams, G. L. (2004). Timing and nature of the deepening of the Tasmanian Gateway. *Paleoceanography*, 19(4).

Taylor, J. D., Williams, S. T., Glover, E. A., & Dyal, P. (2007). A molecular phylogeny of heterodont bivalves (Mollusca: Bivalvia: Heterodonta): new analyses of 18S and 28S rRNA genes. *Zoologica Scripta*, 36(6), 587-606.

Thatje, S. (2012). Effects of capability for dispersal on the evolution of diversity in Antarctic benthos. *Integrative and Comparative Biology*, ics105.

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(23), 5104-5117.

Orsi, A. H., Whitworth, T., & Nowlin, W. D. (1995). On the meridional extent and fronts of the Antarctic Circumpolar Current. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 42(5), 641-673.

Weiss, I. M., Tuross, N., Addadi, L., & Weiner, S. (2002). Mollusc larval shell formation: amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite. *Journal of Experimental Zoology*, 293(5), 478-491.

Wilke, T., Schultheiß, R., & Albrecht, C. (2009). As time goes by: a simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin*, 27(1/2), 25-45.

Williams, S. U., Taylor, J. D., & Glover E. A. (2004). Molecular phylogeny of the Lucinoidea (BIVALVIA): non – monophyly and separate acquisition of bacterial chemosymbiosis. *Journal of Molluscan Studies*, 70(2), 187-202.

Williams, R. C., Newman, S. J., & Sinclair, W. (2012). DNA barcoding in *Nautilus pompilius* (Mollusca: Cephalopoda): evolutionary divergence of an ancient species in modern times. *Invertebrate systematics*, 26(6), 548-560.

Wu, Z. Z., Li, H. M., Bin, S. Y., Ma, J., He, H. L., Li, X. F., ... & Lin, J. T. (2014). Sequence analysis of mitochondrial ND 1 gene can reveal the genetic structure and origin of *Bactrocera dorsalis* ss. *BMC evolutionary biology*, 14(1), 55.

Zane, L., Ostellari, L., Maccatrozzo, L., Bargelloni, L., Battaglia, B., & Patarnello, T. (1998). Molecular evidence for genetic subdivision of Antarctic krill (*Euphausia superba* Dana) populations. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 265(1413), 2387-2391.

Zelaya, D. G., & Ituarte, C. (2004). The genus *Neolepton* Monterosato, 1875 in Southern South America (Bivalvia: Neoleptonidae). *Journal of Molluscan Studies*, 70(2), 123-137.

Zelaya, D. G. (2005). The bivalves from the Scotia Arc islands: species richness and faunistic affinities. *Scientia Marina*, 69(S2), 113-12.