Biblioteca Digital
FCEN-UBA

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Ecología molecular de dos especies de cormoranes endémicas de Patagonia (Phalacrocorax magellanicus y P. atriceps)

Calderón, Pablo Luciano S.

2013-05-30

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Calderón, Pablo Luciano S.. (2013-05-30). Ecología molecular de dos especies de cormoranes endémicas de Patagonia (Phalacrocorax magellanicus y P. atriceps). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Calderón, Pablo Luciano S.. "Ecología molecular de dos especies de cormoranes endémicas de Patagonia (Phalacrocorax magellanicus y P. atriceps)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2013-05-30.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Ecología molecular de dos especies de cormoranes endémicas de Patagonia (*Phalacrocorax magellanicus* y *P. atriceps*)

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

en el área de Ciencias Biológicas

Pablo Luciano S. Calderón

Director de tesis: Dr. Pablo Luis Tubaro

Director Asistente: Dr. Flavio Quintana

Consejero de estudios: Dr. Pablo Luis Tubaro

Lugar de trabajo: Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”

Buenos Aires, 2013

Ecología molecular de dos especies de cormoranes endémicas de Patagonia (*Phalacrocorax magellanicus* y *P. atriceps*)

En la presente tesis se abordarán diversos aspectos de la biología de dos especies hermanas de cormoranes: *Phalacrocorax magellanicus* (Cormorán cuello negro, CCN) y *Phalacrocorax atriceps* (Cormorán imperial, CI), utilizándo herramientas moleculares para responder a las preguntas de interés. Estas especies son endémicas de la Patagonia, y comparten muchos de sus requerimientos ecológicos, difiriendo principalmente en lo que respecta a la dispersión post-reproductiva y a los patrones de alimentación. Ambos aspectos han demostrado tener gran influencia en el moldeado de la estructura genética y filogeográfica de otros taxa de aves marinas. Nuestros análisis demostraron que ambas especies presentan una significativa estructuración genética; resultando todo los estimadores (i.e. F_{st}, Φ_{st}) mas altos en el CCN que en el CI, presentando el CI mayores tasas de migración (*m*) que el CCN, además solo la segunda de éstas especies presentó un clara estructura filogeográfica. Estos resultados son acordes a nuestras hipótesis iniciales, y con lo observado en otros taxa de aves marinas, dado que el CCN es una especie residente anual, que forrajea en las cercanías de su colonia; mientras que el CI es una especie dispersiva con un mayor campo de acción en el mar durante los viajes de forrajeo. Por otro lado, se revisaron aspectos taxonómicos y de la biología reproductiva del CI, la cual es una especie politípica y socialmente monogámica. En éste caso encontramos falta de sustento genético para las subespecies *P. atriceps atriceps* y *P. a. albiventer*, aunque si se encontró evidencia soportando la distinción entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis*. Además se demostró que el CI presenta una clara correspondencia entre las denominadas monogamia social y monogamia genética, ya que no se encontró evidencia de copulas por fuera de la pareja, como así tampoco de parasitismo intraespecífico de nidada.

Palabras clave: Cormoranes, aves marinas, Patagonia, estructura genética, filogeografía, flujo génico, copulas extra pareja.

Molecular ecology of two endemic shag species from Patagonia (*Phalacrocorax magellanicus* y *P. atriceps*)

In this thesis we addressed different aspects of the biology of two sister shag species: *Phalacrocorax magellanicus* (Rock shag, RS) and *Phalacrocorax atriceps* (Imperial shag, IS), employing molecular tools to answer our questions. These species are endemic of Patagonia, and share most of their ecological requirements, differing strongly in relation to their non-breeding season dispersion and feeding patterns. These ecological traits have shown to be important at the time of shaping the genetic and phylogeographic structure of other seabird taxa. Our analysis showed that both species have a significant genetic structure, although all estimators (i.e. F_{st}, Φ_{st}) were higher in RS than in IS, the later showed the higher migration rate values (*m*), also only RS showed a neat phylogeographic structure. These results are in agreement with our staring hypothesis and with the observed in other seabird taxa, because RS is a year-round resident species that forages in the proximities of its colonies (inshore); whereas the IS is a dispersive species with offshore foraging habits. On the other hand, we addressed aspects realted to the taxonomic status and the reproductive biology of *P. atriceps*, which is a polytypic and socially monogamus species. In this case, we did not find genetic evidence supporting the *P. a. atriceps* and *P. a. albiventer* subspecies, although we did find support for the distinction between *P. atriceps* and *P. bransfieldensis*. Also, we showed that the Imperial shag presents a clear correspondence between social and genetic monogamy, because we did not find evidence of extra pair paternity, nor intraspecific brood parasitism in it.

Key words: shags, seabirds, Patagonia, genetic structure, phylogeography, gene flow, extra pair paternity.

AGRADECIMIENTOS

A mi *Director PL Tubaro,* cuyos consejos acertados me han ayudado a enderezar el rumbo en más de una ocasión y porque con hechos, más que con palabras, ha sabido ser un ejemplo de persona y de científico. A mi *Director Asistente F Quintana* por el apoyo brindado durante todo este tiempo. A *SC Lougheed,* que me ha recibido en su laboratorio con los brazos abiertos, y también por haber colaborado intensamente en mi formación como profesional y en la publicaciones surgidas de ésta tesis. A *L Campagna,* cuya desinteresada ayuda ha sido esencial durante mis primeros pasos en la biología molecular, y porque lo considero un verdadero amigo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICET) por brindarme el apoyo económico durante el desarrollo de mi doctorado. Además este trabajo fue financiado por los subsidios: PICT 2004-16-25171 y 2010-0805 (ANPCyT), PIP 2009-2011 112-200801-00741 (CONICET), UBACyT 2010-2012 01/1240, IDRC (International Development Research Centre, Canadá) / University of Guelph "Engaging Developing Nations in the Internation Barcode of Life Project (iBOL)" y de la Fundación Richard Lounsbery otorgados a P. Tubaro; *Natural Sciences and Engineering Council of Canada* (NSERC), subsidio otorgado a SC Lougheed y P Handford.

A las personas que colaboraron desinteresadamente en el trabajo de campo, sobre todo en la obtención de las muestras de sangre, las cuales fueron esenciales para realizar este trabajo: *M Uhart, A Raya Rey, S Harris, R Casaux* y *R Matus*. A los curadores de colecciones de museos, por prestarme muestras que también fueron fuandamentales para llevar a cabo éste trabajo: *M Robbins* (KUNHM) y *P Sweet* (AMNH).

A mis compañeros de laboratorio, por su solidaridad y buena predisposición: *P Benites, A Barreira, C Kopuchian, D Lijtmaer, G Cabanne, R Arrieta, N Garcia* y *P Lavinia*.

A la facultad de Ciencias Exactas Químicas y Naturales de la Universidad Nacional de Misiones, por haberme formado como profesional, sobre todo quiero recordar a *C Bidau* quien como profesor supo transmitirme su pasión por la genética evolutiva. Al Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN), por haber sido mi lugar de trabajo, pero sobre todo

me gustaría agradecer a las personas (autoridades, investigadores y becarios) que hacen del MACN una institución ejemplar.

No quiero dejar de agradecer a dos personas que fueron fundamentales durante mis primeros años en la investigación, y sin su apoyo y ayuda no hubiese llegado hasta este momento: *M Ledesma* y *MI Pigozzi*.

Finalmente quiero mencionar a mis afectos personales, en primer lugar a toda mi familia: *Mamá Lilian*, *Papá Germán*, *Hermanas Cecilia* y *Belén,* y *Abuelos Tata* y *Tita* (siempre en mi memoria). Su apoyo emocional y presencia fue determinante para seguir adelante en los momentos de zozobra. También quiero agradecerles por estar presentes para compartir los momentos de alegría. En segundo lugar, pero no menos importantes, quiero agradecerles a mis hermanos de la vida: *M Pereyra*, *L Cotticheli*, *JM Boeris*, *A Tabeni*, *B Elguero*, *E Elguero*, *Y Alippe*, *C Tomatis* y *J Coda*. Por estar siempre, desde el principio y hasta hoy.

'El futuro llegó hace rato'

(Carlos Solari)

ÍNDICE

Resumen en castellano y palabras claves……..... I
Resumen en inglés y palabras claves……..... II
Agradecimientos……..... III
Dedicatoria..... V
Índice……..... VI

CAPÍTULO I
Introducción general……..……..……... 1
1.1 Contexto y organización general del trabajo…..……. 1
1.2 Conceptos importantes y aclaraciones……...……..... 3
1.3 Contexto y objetivo general de cada capítulo……..... 4
1.3.1 Capítulo II……... 4
1.3.2 Capítulo III…….…….. 6
1.3.3 Capítulo IV……... 8
1.3.4 Capítulo V……... 10

CAPÍTULO II
Genética de poblaciones y filogeografía del Cormorán Cuello Negro (Phalacrocorax magellanicus)…….……... 12
2.1 Resumen……..... 12
2.2 Introducción……. 13
2.3 Materiales y Métodos……... 17
2.3.1 Muestreo……..... 17
2.3.2 Extracción de ADN y genotipificación……..... 17
2.3.3 Amplificación del ADN mitocondrial……..... 19
3.3.4 Variación genética en microsatélites…….. 20
2.3.5 Diferenciación poblacional basada en microsatélites……... 21
2.3.6 Historia demográfica. Modelo e intensidad del flujo génico Basado en microsatélites…….……..... 24
2.3.7 Análisis del ADN mitocondrial……. 26
2.4 Resultados……. 27
2.4.1 Desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética en microsatélites……. 27
2.4.2 Diferenciación poblacional basada en microsatélites……..... 29
2.4.3 Historia demográfica y flujo génico basado en microsatélites…….. 33
2.4.4 Resultados de ADN mitocondrial…….…. 35
2.5 Discusión…….. 38
2.5.1 Estructura genética global y modelo de flujo génico……. 38
2.5.2 Patrones filogeográficos……. 40
2.5.3 Taxonomía e implicaciones para la conservación…….. 41
2.5.4 Conclusiones y comentarios finales……... 43

CAPÍTULO III
Genética de poblaciones y filogeografía del Cormorán Imperial (Phalacrocorax atriceps)… 45
3.1 Resumen……..... 45
3.2 Introducción……... 46
3.3 Materiales y Métodos…… 49
2.3.1 Muestreo……..... 49
3.3.2 Extracción de ADN y genotipificación……..... 50
3.3.3 Amplificación del ADN mitocondrial……..... 51
3.3.4 Variación genética en microsatélites……... 52
3.3.5 Diferenciación poblacional basada en microsatélites……..... 53
3.3.6 Historia demográfica. Modelo e intensidad del flujo génico basado en microsatélites…….…….... 55
3.3.7 Análisis del ADN mitocondrial…….. 56
3.4 Resultados…… 57
3.4.1 Desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética en microsatélites……. 57
3.4.2 Diferenciación poblacional basada en microsatélites……..... 58
3.4.3 Historia demográfica y flujo génico basado en microsatélites…….. 64
3.4.4 Resultados de ADN mitocondrial……. 66
3.5 Discusión…….. 68
3.5.1 Estructura genética global y modelo de flujo génico en *P. atriceps*. Aspectos en común con *P. magellanicus*…… 68
3.5.2 Patrones contrastantes de diferenciación poblacional entre *P. atriceps* y *P. magellanicus*…… 72
3.5.3 Observaciones filogeográficas en *P. atriceps*. Patrones comunes con *P. magellanicus*…….. 75
3.5.4 Conservación e implicancias taxonómica en *P. atriceps*……. 76
3.5.5 Conclusiones y comentarios finales……. 78

CAPÍTULO IV
Relación demográfica y taxonómica entre el Cormorán Antártico (Phalacrocorax bransfieldensis) y el Imperial (P. atriceps)……. 80
4.1 Resumen……..... 80
4.2 Introducción……..... 81
4.3 Materiales y Métodos…… 83
4.3.1 Muestreo……..... 83
4.3.2 Extracción de ADN y genotipificación……..... 84
4.3.3 Amplificación del ADN mitocondrial……..... 84
4.3.4 Variación genética en microsatélites……..... 85
4.3.5 Diferenciación poblacional basada en microsatélites……..... 85
4.3.6 Historia demográfica. Modelo e intensidad del flujo génico Basado en microsatélites…….…….... 87
4.3.7 Análisis del ADN mitocondrial……... 87
4.4 Resultados……. 88
4.4.1 Desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética en microsatélites…….. 88

4.4.2 Diferenciación poblacional basada en microsatélites…….... 89
4.4.3 Historia demográfica y flujo génico basado en microsatélites…….. 93
4.4.4 Resultados de ADN mitocondrial……..…… 94
4.5 Discusión…….. 97
4.5.1 Relación taxonómica y demográfica entre *P. bransfieldensis* y *P. atriceps*……. 97
4.5.2 Observaciones filogeográficas……. 99
4.5.3 Conclusiones y comentarios finales……. 100

CAPÍTULO V
Ausencia de paternidad extra pareja y parasitismo intraespecífico de cría en el Cormorán Imperial (Phalacrocorax atriceps)…….. 102
5.1 Resumen…….. 102
5.2 Introducción……..... 103
5.3 Materiales y métodos…….. 106
5.3.1 Área de estudio…….…… 106
5.3.2 Muestreo y genotipificado…….…….... 106
5.3.3 Análisis de parentesco…….. 107
5.4 Resultados……... 108
5.5 Discusión……. 109

CAPÍTULO VI
Discusión final....……..……. 114
6.1 Discusión general……..…….....…..… 114
6.2 Importancia y aportes del estudio…… 118

Bibliografía
Capítulos I, II, III, IV y VI……..…….....……..…..... 122
Capítulo V…..…….....…….....…….…… 130

Apéndices
Apéndice 1. Detalles de las muestras utilizadas..... 134
Apéndice 2. Estadísticas sumarias por colonia..... 145
Apéndice 3. Particiones de BAPS..... 147
Apéndice 4. Delta *K* y Ln *Pr* (X | K)..... 148
Apéndice 5. Distancias pareadas (F_{st}, R_{st} y Φ_{st})..... 149

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN GENERAL

1.1 CONTEXTO Y ORGANIZACIÓN GENERAL DEL TRABAJO

Se abordará el estudio de diversos aspectos de la biología de dos especies hermanas de cormoranes endémicas de Patagonia, *Phalacrocorax magellanicus* (Cormorán de Cuello Negro) y *Phalacrocorax atriceps* (Cormorán Imperial). Se responderá a las preguntas de interés utilizando la evidencia que brindan las herramientas moleculares, y las diversas metodologías de análisis existentes para este tipo de datos. Los resultados obtenidos serán interpretados a la luz del amplio conocimiento que se tiene acerca de la ecología e historia de vida de las especies de interés. Se hará principal énfasis en el análisis y comparación de la estructura genética poblacional y filogeográfica de *P. magellanicus* y *P. atriceps*. Al mismo tiempo se intentará esclarecer el status taxonómico de algunas de las subespecies que posee *P. atriceps,* la cual es una especie politípica. También se abordarán aspectos de la biología reproductiva de ésta especie, más precisamente, se evaluará la fidelidad a la pareja y la existencia o no de parasitismo de cría intraespecífico.

Las dos especies de interés, *P. magellanicus* y *P. atriceps*, son especies hermanas (Kennedy et al. 2000, Holland et al. 2010), que se distribuyen simpátricamente a lo largo de las costas oceánicas de la región más austral del Neotrópico, la Patagonia (Orta 1992, Nelson 2005, Frere et al. 2005). Ambas son aves esencialmente marinas, aunque presentan ciertas colonias ubicadas en cuerpos de agua dulce, sobre todo *P. atriceps* (Nelson 2005). A pesar de presentar requerimientos ecológicos muy similares, estas especies difieren en un par de

aspectos puntuales. Mas precisamente, difieren en lo que respecta a su dispersión post-reproductiva y al patrón de alimentación (i.e. distancia de la costa a la que obtienen el alimento). Siendo *P. magellanicus* una especie residente anual, es decir que permance en sus colonias durante los periodos post-reproductivos (Sapoznikow & Quintana 2008), y que tiende a forrajear en las proximidades de sus colonias (Quintana et al. 2001, Sapoznikow & Quintana 2003, Frere et al. 2008). Por el contrario, *P. atriceps* es una especie con un amplio rango de forrajeo, alcanzando zonas alejadas a las colonia (Sapoznikow & Quintana 2003, Quintana et al. 2011, Harris et al. 2012) y presenta una marcada dispersión post-reproductiva (Rasmussen 1994, Punta et al. 2003, Harris et al. 2013). Por todo esto, es que resulta interesante analizar y comparar estas especies desde la perspectiva de la genética de poblaciones y la filogeografía. Con el fin de determinar si estas diferencias ecológicas se ven reflejadas en las tasas de flujo génico, generando así patrones de estructuración genética contrastantes entre ellas. Los dos aspectos ecológicos en los que difieren estas especies, sobre todo la distribución post-reproductiva, han sido señalados previamente como importantes barreras no-físicas para el flujo génico, con gran influencia en el moldeado de la estructura genética y filogeográfica de otros taxa de aves marinas (revisado en Friesen et al. 2007a). En los capítulos II y III se analizarán por separado la estructura genética y filogeográfica de *P. magellanicus* y *P. atriceps* respectivamente, para luego discutir y comparar los resultados obtenidos para ambas en la sección 3.5 del capítulo III.

También será importante esclarecer el status taxonómico de algunas de las subespecies de *P. atriceps*, la cual es una especie politípica, presentando al menos seis subespecies que constituyen el grupo de los 'cormoranes de ojos azules' (Murphy 1936, Orta 1992, Nelson 2005). A lo largo del capítulo III prestaremos atención a dos de estas subespecies, las cuales son simpátricas y endémicas de la región Patagónica, *P. a atriceps* y *P. a. albiventer*. A

continuación, en el capítulo IV, prestaremos atención a otra de las subespecies, focalizándonos en la relación taxonómica y demográfica entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis* (Cormorán Antártico), ésta última es endémica de la Península Antártica e Islas Shetland del Sur.

En el capítulo V se analizarán aspectos relacionados a la biología reproductiva de *P. atriceps*. Ésta es una especie socialmente monogámica (Svagelj & Quintana 2011), sin embargo muchas especies de aves que habían sido clasificadas de esta forma, basándose solo en datos observacionales, resultaron tener sistemas de apareamientos alternativos. Esta situación ha generado cierta incongruencia, entre lo que se conoce como monogamia social y monogamia genética (Griffith et al. 2002). En este caso será importante determinar si existe o no una correspondencia entre ambas fuentes de evidencia.

Finalmente, en el capítulo VI se realizará una discusión general, integrando los resultados obtenidos a lo largo de ésta tesis.

1.2 CONCEPTOS Y DEFENICIONES IMPORTANTES

Dos conceptos importantes, que surgirán recurrentemente durante este trabajo, son el de "estructura genética" y "estructura filogeográfica", ambos términos son muy similares y muchas veces se los utiliza indistintamente, sin embargo en el contexto de este trabajo no implican lo mismo. La presencia de estructura genética, implica por definición que existen diferencias estadísticamente significativas entre poblaciones, en cuanto a las frecuencias alélicas o haplotípicas, dependiendo de si estamos hablando de microsatélites (e.g. F_{st}, R_{st}) o secuencias de ADN mitocondrial (e.g. Φ_{st}) respectivamente. Por otra parte, estructura filogeográfica hace referencia a la presencia de linajes genealógicos exclusivos a una población, y con distribución geográfica restringida, lo que correspondería a un clado

monofilético en un 'árbol de genes'. La presencia de estructura genética no siempre implica existencia de estructura filogeográfica, ya que diferencias estadísticamente significativas en las frecuencias alélicas pueden no implicar independencia demográfica o genética (Hedrick 1999). Por el contrario, la estructura filogeográfica es indicadora de un prolongado aislamiento genético de las poblaciones (e.g. Neigel & Avise 1986).

Otro término que será utilizado con frecuencia y que puede prestarse a cierta confusión es el de "barreras no-físicas", el cual es ampliamente utilizado en estudios que involucran aves marinas. Se lo utiliza para referirse a todos aquellos aspectos ecológicos o demográficos inherentes a las historias de vida de las especies (e.g. dispersión post-reproductiva, hábitos de forrajeo, etc.), y que pueden ser responsables de generar estructuración genética y/o filogeográfica. Se emplea el término de no-físicas para diferenciar a estos aspectos de las ampliamente estudiadas "barreras físicas" (i.e. geográficas) (ver Friesen et al. 2007a).

1.3 CONTEXTO Y OBJETIVO GENERAL DE CADA CAPITULO

1.3.1 *Capítulo II. Genética de poblaciones y filogeografía del Cormorán Cuello Negro* (*Phalacrocorax magellanicus*)

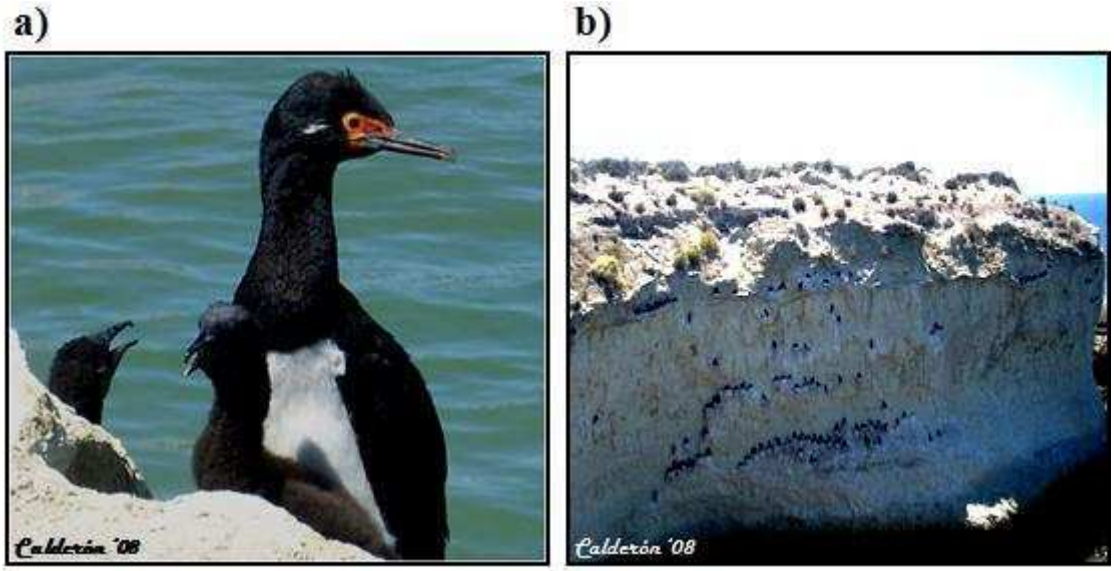
El Cormorán Cuello Negro (*Phalacrocorax magellanicus*) (Figura 1.1.a) es un ave marina endémica de Patagonia. Su distribución abarca las costas de la Patagonia argentina y chilena. Es una especie relativamente abundante a lo largo de la costa Atlántica, presentando aproximadamente 7,000 parejas reproductivas, distribuidas en pequeñas colonias compuestas por pocos individuos, entre 5 y 377 parejas, (ver Figura 1.1.b) (Frere et al. 2005). Nidifica en acantilados rocosos, aunque excepcionalmente pueden nidificar sobre superficies planas (Nelson 2005). Al igual que la mayoría de las aves marinas, presenta un período reproductivo

(Primavera-Verano) y un período post-reproductivo (Otoño-Invierno). La mayoría de las especies de aves marinas se agrupan en colonias durante los periodos reproductivos, lo que varía bastante entre especies, es el comportamiento durante los períodos post-reproductivos (Hamer et al. 2002). En relación a esto último, *P. magellanicus* puede ser considerada como una especie residente anual, por tener la particularidad de no abandonar las colonias reproductivas durante dichos períodos, permaneciendo en ellas o en sus cercanías (Punta et al. 2003, Sapoznikow & Quintana 2008). Sin embargo, se ha observado que algunos individuos juveniles abandonan las colonias durante los periodos post-reproductivos (Sapoznikow & Quintana 2008). El movimiento de estos individuos tiende a ser hacia el norte (Nelson 2005). Por otro lado, el principal alimento de ésta especie son peces y crustáceos marinos (e.g. Bulgarella et al. 2008, Yorio et al. 2010). Con el fin de conseguir su alimento, realiza viajes de forrajeo en zonas relativamente cercanas a las colonias (Quintana 1999, 2001, Sapoznikow & Quintana 2003, Frere et al. 2008). Un trabajo de biogeografía previo realizado en esta especie, en el que se utilizaron aloenzimas como evidencia molecular, demostró cierta diferenciación genética entre colonias de las costa Atlántica, costa Pacífica y de la región Fueguina, adjudicándose dichas diferencias al efecto de los fenómenos paleoclimatológicos que afectaron a la región patagónica durante el Pleistoceno (Siegel-Causey 1997).

El objetivo general de este capítulo será el de analizar la estructura genética y filogeográfica de *P. magellanicus*, como así también determinar el modelo de flujo génico al que ésta se ajusta, utilizando herramientas moleculares de ADN nuclear (microsatélites) y mitocondrial. Se espera encontrar una alta estructuración genética, y una clara estructura filogeográfica como consecuencia de las bajas tasa de flujo génico. En particular, se espera encontrar diferencias genéticas significativas entre las colonias de la costa Atlántica, costa

Pacífica y la región Fueguina. Al mismo tiempo se espera que ésta especie se ajuste a un modelo de flujo génico de *stepping-stone*, siguiendo las líneas de las costas oceánicas.

Figura 1.1 a) *Phalacrocorax magellanicus* adulto junto a dos pichones. b) Típica colonia de *P. magellanicus* (Punta Arco, Chubut).



1.3.2 *Capítulo III. Genética de poblaciones y filogeografía del Cormorán Imperial* (*Phalacrocorax atriceps*)

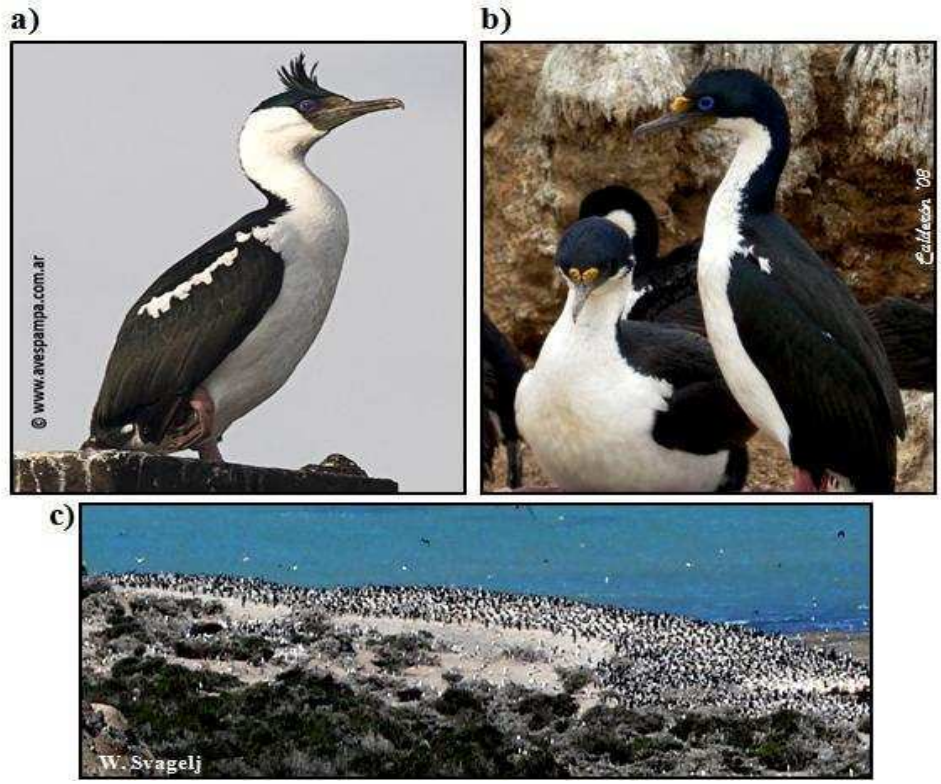
El Cormorán Imperial es una especie endémica de la Patagonia argentina y chilena. Es a la vez es una de las especies más abundantes de la costa Atlántica argentina con ca. 55,000 parejas reproductivas, las cuales se encuentran distribuidas en pocas colonias, generalmente localizadas sobre superficies planas y compuestas de miles de individuos (Frere et al. 2005) (Figura 1.2.c). Al igual que la mayoría de las aves marinas, presentan una época reproductiva (Primavera-Verano) y un período post-reproductivo (Otoño-Invierno) (Hamer et al. 2002). En relación a los periodos post-reproductivos, *P. atriceps* puede ser considerada como una especie dispersiva, debido a su marcada tendencia a abandonar las colonias durante dichos períodos (Rasmussen 1994, Punta et al. 2003, Harris et al. 2013). Se ha observado que los individuos tienden a moverse hacia el norte alcanzando las costas de Uruguay y el sur de

Brasil (Orta 1992, Nelson 2005). También se ha observado que *P. atriceps* tiene un amplio rango de acción en el mar, alejándose considerablemente de las colonias durante sus viajes de alimentación (Quintana & Sapoznikow 2003, Quintana et al. 2011, Harris et al. 2012). Otra particularidad de esta especie, es de que a pesar de ser considerada esencialmente marina, presenta varias colonias en cuerpos de agua dulce (e.g. Lagos Nahuel Huapí, Yehuín y Vintter) (Nelson 2005). Además *P. atriceps* es una especie politípica, que presenta numerosas subespecies, conformando el grupo de los 'cormoranes de ojos azules' (Murphy 1936, Orta 1992, Nelson 2005). Dos de estas subespecies son endémicas de Patagonia, *P. a. albiventer* y *P. a. atriceps*, cuya principal diferencia radica en el patrón de coloración de plumaje, donde *P. a. atriceps* presenta mejillas blancas y una marcada barra alar blanca, mientras que *P. a. albiventer* presenta mejillas negras, y ausencia de la barra alar blanca (Figuras 1.2.a y 1.2.b, respectivamente). A éstas se las encuentra reproduciendo en simpatría a lo largo de su distribución, a pesar de que la mayoría de las colonias son mixtas, existe cierta segregación en su distribución (Rasmussen 1991). Sin embargo, no se encontró evidencia genética, morfológica (Rasmussen 1991, 1994) o comportamental (Siegel-Causey 1986) que respalde el rango de las subespecies mencionadas. Trabajos de biogeografía previos, basándonos en aloenzimas, no encontraron diferencias genéticas a lo largo del rango de distribución de esta especie (Rasmussen 1991, 1994), aunque si encontraron cierta variación morfológica.

El objetivo general de este capítulo será analizar la estructura genética y filogeográfica de *P. atriceps*, también se evaluará el status taxonómico de *P. a. atriceps* y *P. a. albiventer*. Al mismo tiempo se intentará determinar el modelo de flujo génico al que ésta se ajusta. En base a los aspectos ecológicos mencionados, en este caso se espera encontrar una escasa estructuración genética, una falta de estructura filogeográfica y altos niveles de flujo génico. También se espera que la especie siga un modelo de flujo génico de *stepping-stone*, siguiendo

las costas oceánicas. Los resultados descriptos durante este capítulo para *P. atriceps*, serán discutidos de forma comparativa con los obtenidos para *P. magellanicus* (capítulo II). Esto tiene como finalidad, evaluar el efecto de las diferencias observadas en relación de los hábitos de forrajeo y a la distribución post-reproductiva (i.e. barreras no-físicas) sobre la estructuración genética y filogeográfica de las aves marinas.

Figura 1.2 a) *Phalacrocorax atriceps atriceps* adulto. b) *P. a. albiventer* adulto. c) Típica colonia de *P. atriceps* (Punta León, Chubut).



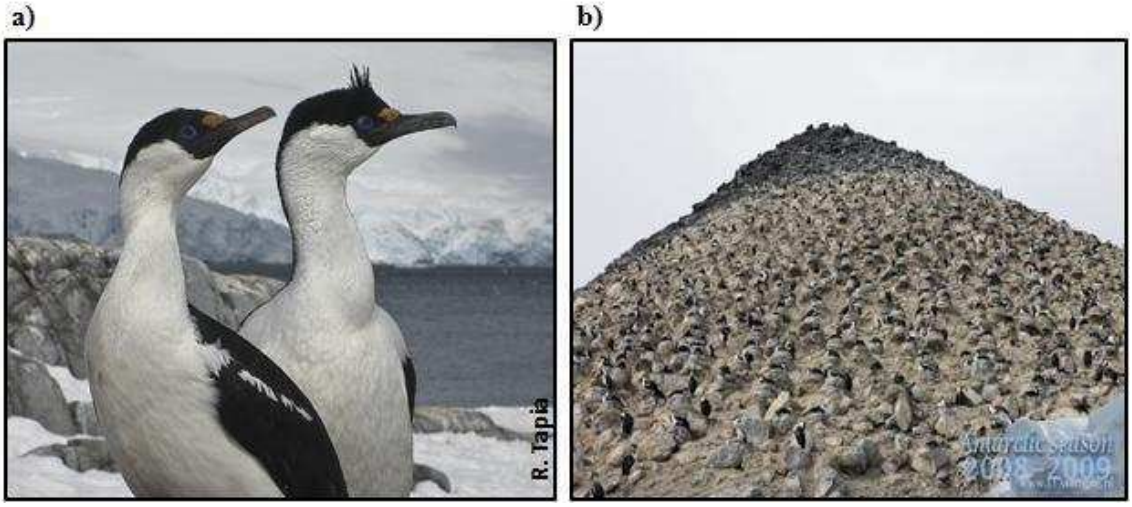
1.3.4 Capítulo IV. Relación taxonómica y demográfica entre el Cormorán Antártico (*Phalacrocorax bransfieldensis*) *y el Imperial* (*P. atriceps*)

Phalacrocorax atriceps (Cormorán Imperial) es una especie politípica, la cual presenta seis subespecies, que conforman lo que se conoce como el grupo de los 'cormoranes de ojos azules' (Murphy 1936, Orta 1992, Nelson 2005). El Cormorán Antártico (*Phalacrocorax bransfieldensis*) fue descripto originalemente por Murphy (1936) como una subespecie de *P.*

atriceps. (Figura 1.3.a). La misma es endémica de la península Antártica e Islas Shetland del Sur (Orta 1992, Nelson 2005). En la actualidad existe cierta controversia acerca de su real rango taxonómico, ya que la precensia de numerosas diferencias a nivel morfológico (Siegel-Causey & Lafevre 1989, Casaux & Baroni 2010, Holland et al. 2010), y de comportamiento (Siegel-Causey 1986), han provocado que muchos autores consideren al Cormorán Antártico como una especie diferente (e.g. Siegel-Causey & Lafevre 1989), nombrandola *P. bransfieldensis*, de hecho este es el nombre científico actualmente aceptado (ver Remsen 2012), y es el que utilizaremos en éste trabajo.

En éste capítulo se utilizará la evidencia molecular para esclarecer cual es la relación taxononómica y demográfica entre *P. bransfieldensis* y *P. atriceps*. Los resultados obtenidos serán analizados desde la perspectiva de la filogeografía y de la genética de poblaciones. En el caso de que *P. bransfieldensis* resulte ser una especie diferente, bajo el concepto filogenético de especie, esta deberá aparecer como un clado monofilético, y separado de *P. atriceps* en los análisis de ADNmt. En cuanto a la evidencia de microsatélites, los individuos de *P. bransfieldensis* deberán emerger como un cluster discreto y diferenciado en los análisis de agrupamiento Bayesiano, presentando bajos o nulos índices de flujo génico con *P. atriceps*. También se espera que todos los estimadores de diferenciación poblacional (e.g. F_{st}, R_{st} y Φ_{st}) entre *P. bransfieldensis* y *P. atriceps* sean altos y significativos.

Figura 1.3 a) Pareja de *Phalacrocorax bransfieldensis* adultos. b) Típica colonia de *P. bransfieldensis* (Isla Paulet, Península Antártica).



1.3.4 *Capítulo V*: *Análisis de parentesco y de parasitismo de cría en el Cormorán Imperial* (*Phalacrocorax atriceps*)

Dos de los mecanismos de reproducción alternativa mejor estudiados en aves son la paternidad extra-pareja (PEP) y el parasitismo intraespecífico de cría (PIC). Ambos son muy comunes entre de las aves paseriformes, siendo prácticamente inexistentes dentro del grupo de las aves marinas. Sorprendentemente y contrario al patrón general observado en aves marinas, las tasas de PEP de las dos especies de cormoranes (Phalacrocoracidae) estudiadas hasta el momento resultaron ser relativamente elevadas. En este capítulo se evaluará la existencia de eventos de PEP y PIC en el Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*), la cual a partir de datos observacionales, fue catalogada como un especie socialmente monógama (Nelson 2005, Svagelj com. pers.). Con el advenimiento de las técnicas moleculares ha surgido un conflicto entre lo que se conoce como monogamia social y monogamia genética (Griffith et al. 2002), dado que muchas especies que habían sido catalogadas como monógamas a partir de datos

observacionales, resultaron tener sistemas de apareamiento alternativos cuando fueron analizadas para datos genéticos.

Aquí se intentantará determinar si existe o no una correspondencia entre los datos observacionales y los genéticos en *P. atriceps*. Con este objetivo, se determinó la relación de filiación de 110 pichones, pertenecientes a 37 nidadas; empleando cuatro microsatélites altamente polimórficos. El muestreo se llevó a cabo en una colonia ubicada en la localidad de Punta León (Chubut), durante dos temporadas reproductivas consecutivas, correspondientes a los años 2004 y 2005. Este capítulo resume datos previamente publicados en Calderón et al. (2011).

CAPITULO II

GENÉTICA DE POBLACIONES Y FILOGEOGRAFÍA DEL CORMORÁN CUELLO NEGRO (*Phalacrocorax magellanicus*)

2.1 RESUMEN

Se estudió la estructura genética y filogeográfica del Cormorán Cuello Negro. Ésta es una especie endémica de Patagonia, cuya distribución reproductiva abarca las costas de la Patagonia argentina y chilena. Se trata de una especie de hábitos sedentarios, debido a su tendencia a permanecer en las colonias reproductivas durante los períodos post-reproductivos, y a forrajear en las cercanías de sus colonias. Se analizaron 151 individuos para siete microsatélites polimórficos, y 84 individuos para un marcador mitocondrial (ATP*asa*); abarcando gran parte del rango de distribución reproductiva de la especie. Se encontró una clara estructuración genética y filogeográfica. Los análisis de agrupamiento Bayesiano basados en microsatélites no resultaron del todo consistentes; se concluyó que el número más probable de clusters genéticos para esta especie es cuatro (K = 4). Los estimadores clásicos de estructuración genética, basados en microsatélites y ADN mitocondrial, también resultaron altos y significativos (F_{st} = 0.10, p < 0.001; Φ_{st} = 0.91, p < 0.001). Al mismo tiempo se observó una clara estructura filogeográfica, encontrándose tres grupos de haplotípos recíprocamente monofiléticos, coincidentes con las siguientes regiones geográficas: costa Atlántica, región Fueguina y costa Pacífica. La división con más soporte, y la más antigua, resulto ser la que separa los clados de la costa Atlántica y Pacífica, de la región Fueguina (un millón de años aproximadamente). Contrario a lo esperado se observó que esta especie se ajusta con mayor probabilidad a un modelo de flujo génico de tipo-n-islas y no a uno de *stepping-stone*. Esto implica flujo génico reciente entre las costas Atlántica y Pacífica a través de la masa continental y por sobre la cordillera de los Andes. Todos los resultados obtenidos en relación a la estructura genética y filogeográfica de *P. magellanicus* resultaron acordes a lo esperado previamente, dadas las características ecológicas de esta especie.

2.2 INTRODUCCIÓN

Cuantificar la estructuración genética de la especies a diferentes escales espaciales, a lo largo de su rango de distribución, puede resultar revelador a la hora de elucidar la fuerzas evolutivas responsables de generar diferenciación genética entre poblaciones. La diferenciación genética entre poblaciones es una función inversa del flujo génico (Wright 1931). Por esto es que, identificar a los factores que modulan los niveles de flujo génico, provee una visión acerca de las fuerzas que se encuentran afectando las trayectorias evolutivas, dirigiendo los procesos que en última instancia conducen al fenómeno de especiación (Coyne & Orr 2004). La reducción del flujo génico esta generalmente asociada con la presencia de barreras físicas (geográficas). Las barreras físicas han demostrado afectar la estructuración genética de algunas aves marinas, de la misma forma que lo hacen con la mayoría de los organismos móviles. Por ejemplo, extensiones de tierra tan angostas como el Istmo de Panamá, pueden actuar como efectivas barreras para el flujo génico en aves marinas (Steeves et al. 2005).

Sin embargo, lo que resulta llamativo, es que a pesar de su alta movilidad y capacidad para volar largas distancias, muchas especies de aves marinas han demostrado estar genética y filogeográficamente estructuradas, aún en ausencia de barreras físicas evidentes (revisado en Friesen et al. 2007a). Esto implica que fuerzas alternativas deben estar moldeando las trayectorias evolutivas dentro de este grupo, y de hecho lo están; factores relacionados con la ecología de las especies y sus historias de vida, también conocidos como barreras no-físicas, han probado ser muy importantes a la hora de moldear la estructura genética y filogeográfica en aves marinas (e.g. Burg & Croxall 2004, Steeves et al. 2005, Morris-Pocock et al. 2008).

En este trabajo analizaremos una especie endémica de Patagonia, *Phalacrocorax magellanicus*. Su rango de distribución abarca, a lo largo del Océano Atlántico, las costas de las provincias de Chubut, Santa Cruz, Tierra del Fuego e Islas Malvinas; y a lo largo de las costas del Océano Pacífico, las regiones chilenas X, XI y XII (Orta 1992, Nelson 2005) (Figura 1). Es una especie relativamente abundante a lo largo de la costa Atlántica, llegando a las 7,000 parejas reproductivas aproximadamente, distribuidas en numerosas colonias compuestas por pocos individuos (entre 5 y 377 parejas) (Frere et al. 2005). Poco se sabe acerca de la distribución de las colonias y del estado demográfico poblacional de esta especie a lo largo del Océano Pacífico. Al igual que la mayoría de las aves marinas depende exclusivamente del mar para su alimentación, siendo peces y crustáceos marinos su principal alimento, en ese orden de preferencia (Bulgarella et al. 2008).

Figura 2.1. Distribución del Cormorán Cuello Negro. En gris oscuro se muestra el rango de distribución reproductiva (42° de latitud sur indican el límite norte de su distribución sobre el Océano Atlántico. En gris claro se observa la distribución que alcanza durante los períodos post-reproductivos (modificado de Nelson 2005).

A pesar de no presentar ninguna subespecie descripta, *P. magellanicus* presenta algunos polimorfismos de coloración de plumaje, tanto de adultos como de juveniles, a lo largo de su rango de distribución. Se ha observado por ejemplo que los adultos de la costa Pacífica tienen mayor cantidad de plumaje blanco en el cuello que los adultos de la costa Atlántica (Rasmussen 1987).

P. magellanicus presenta un período reproductivo (Primavera-Verano) y un período post-reproductivo (Otoño-Invierno) (Hamer et al. 2002). Datos observacionales, y de marcaje y recaptura han mostrado que la mayoría de los adultos, juveniles y pichones recientemente independizados de esta especie tienden a permanecer en las colonias o en sus cercanías durante los periodos post-reproductivos (Punta et al. 2003, Sapoznikow & Quintana 2008). En base a este comportamiento, *P. magellanicus* puede ser catalogada como una especie residente anual (Friesen et al. 2007a). Solo algunos juveniles abandonan las colonias durante el invierno (Sapoznikow & Quintana 2008), alcanzando las costas de Uruguay y ocasionalmente el sur de Brasil (Nelson 2005) (Figura1). En cuanto a los hábitos de forrajeo, se ha observado que los individuos de esta especie no se alejan demasiado de sus colonias para forrajear, raramente se alejan a mas de 5 Km de las mismas (Quintana 2001, Sapoznikow & Quintana 2003, Frere et al. 2008).

En un meta-análisis realizado por Friesen et al. (2007a) se demostró que la distribución post-reproductiva y los hábitos de forrajeo, son dos de los aspectos ecológicos inherentes a las especies (i.e. barreras no-físicas) con mayor incidencia en el moldeado de la estructura genética y filogeográfica de este grupo. Sobre todo la distribución post-reproductiva; al parecer el aislamiento durante estos períodos es de gran importancia a la hora de prevenir el flujo génico en aves marinas. Como consecuencia de esto, las especies residentes anuales tienen más chances de presentar estructura genética y filogeográfica. Por el

contrario, las especies que dispersan o migran poseen menos chances de estar genética y filogeográficamente estructuradas (Friesen et al. 2007a).

Un trabajo biogeográfico realizado por Siegel-Causey (1997) en *P. magellanicus*, utilizando aloenzimas como marcadores moleculares, demostró la existencia de ciertas diferencias genéticas entre las colonias de las costa Atlántica, región Fueguina y costa Pacífica. Las diferencias observadas fueron adjudicadas a los efectos de los fenómenos geológicos que afectaron a la región Patagónica durante el Pleistoceno. Durante éste período, ocurrió en Patagonia lo que se conoce como la gran glaciación Patagónica (GGP), hace aproximadamente un Millón de años (Mercer 1976, Rabassa & Clapperton 1990). Se demostró que capas de hielo cubrieron gran parte del suroeste Patagónico (i.e. región Andina) y gran parte de la Isla de Tierra del Fuego. Durante este período las capas de hielo alcanzaron el Océano Atlántico, a la altura del límite sur de la Patagonia continental (Rabassa & Clapperton 1990, Rabassa et al. 2005). Además se sabe, que numerosos ciclos glaciales afectaron a esta región antes y después de la GGP, habiendo sido datado el último máximo glacial (UMG) 10,000 – 15,000 años atrás (Rabassa et al. 2005, Rabassa et al. 2011). Por otro lado, la evidencia paleoclimatológica sugiere que la región noreste de la Patagonia permaneció libre de hielo durante todo el Pleistoceno, y con temperaturas más cálidas que la región suroeste (Clapperton 1993, Rabassa et al. 2005).

Se espera que ésta especie presente una fuerte estructura genética, como así también bajos niveles de flujo génico. (i) En particular se espera encontrar diferencias genéticas significativas entre la costa Atlántica (Chubut y Santa Cruz), la región Fueguina (Tierra del Fuego, Estrecho de Magallanes e Islas Malvinas) y la costa Pacífica (X Región). (ii) También se espera que esta especie siga un modelo de flujo génico de *stepping-stone*, siguiendo las líneas de la costa. (iii) Desde el punto de vista filogeográfico se espera encontrar grupos

recíprocamente monofiléticos, que se correspondan con las mencionadas regiones geográficas. (iv) Al mismo tiempo se espera encontrar evidencia de refugios en la región noreste de la Patagonia, junto con una reciente colonización desde el norte hacia el sur. (v) Finalmente desde el punto de vista comparativo esperamos que esta especie presente patrones de estructuración genética y filogeográfica mas claros que los de su especie hermana, *P. atriceps*, la comparación entre estas se llevará a cabo en la discusión del capítulo III.

2.3 MATERIALES Y MÉTODOS

2.3.1 Muestreo

El muestreo abarcó la mayor parte del rango de distribución de esta especie. Las muestras utilizadas fueron de sangre o de músculo pectoral, en ambos casos conservadas en etanol al 96%. Las muestras de sangre fueron tomadas exclusivamente para este trabajo; se obtuvieron de la vena yugular de individuos adultos, muestreándose un individuo por nido para evitar muestrear parientes, los individuos muestreados fueron marcados temporalmente con tinta para evitar ser re-muestreados. Estas muestras de sangre se encuentran preservadas en la División de Ornitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN-Or-ct). Las muestras de músculo fueron cedidas en préstamo por el Museo de Historia Natural de Kansas (KUNHM), y el Museo Americano de Historia Natural (AMNH). Las muestras prestadas por el KUNHM fueron también utilizadas para un trabajo de biogeografía que involucró análisis genéticos (Siegel-Causey 1997). En el Apéndice 1.a se muestra un detalle de todas las muestras utilizadas.

2.3.2 Extracción de ADN y genotipificación

Las extracciones de ADN fueron realizas siguiendo el método propuesto por Ivanova et al. (2006), adaptado para columnas individuales (Epoch Life Sciences, Missouri City, TX, USA). Se amplificaron con éxito doce microsatélites: PcT1, PcD2, PcT3, PcT4, PcD5, PcD6 (originalmente desarrollados para *Phalacrocorax carbo* por Piertney et al. 1998); y Cor01, Cor05, CoR06, Cor30, Cor43 and Cor45 (originalmente desarrollados para *Phalacrocorax auritus* por Fike et al. 2009). Sin embargo, algunos de ellos fueron descartados para los posteriores análisis por diferentes motivos. PcT1 fue descartado debido a que cada individuo presentó un alelo diferente, resultando imposible determinar con precisión cuales son los alelos que presenta este locus (i.e. inconsistencia alélica), tornándose así no-informativo. Además un grupo de marcadores fue descartado por no presentar variación entre individuos (i.e. monomórficos): PcD6, Cor30, Cor43 and Cor45. En total 151 individuos fueron genotipificados para siete microsatélites en esta especie, la Tabla 1 muestra la cantidad de individuos genotipificados por colonia.

Los *primers forward* fueron modificados, añadiéndose la secuencia universal M13 al extremo 5' de cada uno de ellos, para permitir la correcta unión del primer M13 marcado fluorescentemente (Neilan et al. 1997). Las reacciones de PCR presentaron volúmenes finales de 10 µl, con cocteles y condiciones de ciclado idénticas para todos los marcadores: 10X buffer de PCR (200mM Tris-HCL, 500 mM KCL), ca. 10 ng ADN genómico, 2.5 mM $MgCl_2$, 0.15 µM de cada *primer*, 0.2 U de Taq polimerasa (Fermentas), 0.1 mM dNTPs y 0.06 µM del FAM-blue, o HEX-green primers M13 marcados fluorescentemente. Todas las PCRs fueron realizadas en un termociclador GenAmp 9700 (Applied Biosystems). Las condiciones térmicas del ciclado incluyeron un paso inicial de desnaturalización 95°C por 3 min., luego 34 ciclos a 95°C por 30 s., 55°C por 45 s., y 72°C por 45 s., con una extensión final a 72°C por 20 min. La genotipificación fue realizada en un secuenciador Beckman-Coulter CEQ™ 8000

Genetic Analysis System, y el tamaño de los microsatélites fue determinado usando el software CEQ 8000 Genetic Analysis System, con estándares de tamaño del fabricante. Tanto las PCR, como las reacciones de genotipificación fueron realizadas en su gran mayoría en el Laboratorio del Dr. Stephen Lougheed, Departamento de Biología de la Universidad de Queen's, Ontario, Canadá.

2.3.3 Amplificación del marcador de ADN mitocondrial

Se obtuvieron secuencias parciales (657 pares de base) de las subunidades seis y ocho del gen de la ATP sintetasa (ATP*asa*). Se secuenciaron 84 individuos, el detalle de la cantidad de individuos secuenciados se puede ver en la Tabla 1 y en el Apéndice 1.a. Este marcador ha sido ampliamente utilizado en estudios genéticos dentro de la familia Phalacrocoracidae (e.g. Kennedy et al. 2000). Con el fin de facilitar y hacer más efectiva su amplificación, diseñamos primers específicos para nuestra especie de interés usando el programa Primer Premier v5 (Lalitha 2000). La secuencia *forward* del *primer* diseñado es: FATP: 5'-CACTCCTAATCCAACCAAAGC - 3' y la secuencia del *primer reverse* es: RATP: 5' - ATTATGGCTACTGCTACTTCTA - 3'. Las reacciones de PCR fueron realizadas en volúmenes finales de 25 µl, y los cocteles consistieron de 10X buffer de PCR (200mM Tris-HCL, 500 mM KCL), 2.5 mM $MgCl_2$, 0.6 mM de cada *primer*, 0.2 mM dNTPs, 1.5 unidades de Taq Polimerasa recombinante, y ~10 ng of ADN genómico. El ciclado térmico consistió de un paso inicial de desnaturalización a 94°C por 3 min., luego le siguieron 40 ciclos de amplificación que consistieron en: 94°C por 1 min., 56°C por 1 min., y 1 min. 30 s. a 72°C y una extensión final a 72°C por 5 min. Las PCRs fueron realizadas en un termociclador Mastercycler ProS (Eppendorf). Estas reacciones fueron realizadas en su mayoría en el Laboratorio de Genética Molecular de la División de Ornitología del Museo Argentino de

Ciencias Naturales. La secuenciación se realizó en un 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) (Perteneciente a la unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Hurligham, Bs. As.). La secuencias fueron editadas en el programa BIOEDIT v7 (Hall 1999), y alineadas utilizando CLUSTALW (Thompson et al.1994).

Tabla 2.1. Detalle de las localidades muestreadas para *P. magellanicus.* Los *n* muestrales se refieren al número de individuos analizados para cada tipo de marcador.

Grupo	Provincia	Localidad	Abrev.	Lat.	Long.	*n* microsat.	*n* ATP*asa*
Costa Atlántica	Chubut	Las Charas	CH	42.50	64.5	10	4
	Chubut	Punta Arco	PA	42.70	64.98	4	4
	Chubut	Punta Loma	PL	42.81	64.88	20	7
	Chubut	Roca Malaspina	RM	45.18	66.51	10	7
	Chubut	Vernaci Este	VE	45.18	66.48	10	7
	Chubut	Puerto Melo	PM	45.05	65.84	8	-
	Santa Cruz	Cabo Blanco	CB	47.20	65.75	10	8
	Santa Cruz	Isla Elena	IE	47.75	65.93	13	8
	Santa Cruz	Isla Pingüino	IP	47.90	65.71	7	-
	Santa Cruz	Bahía Uruguay	UR	47.64	66.01	5	-
	Santa Cruz	Monte León	ML	50.33	68.88	12	9
	Is. Malvinas	Is. Liveley	IM	52.02	58.46	3	3
Región Fueguina	Tierra del Fuego	Bahía Ushuaia	BU	54.84	68.25	12	9
	XII Región	Isla Navarino	IN	54.93	67.65	10	-
	XII Región	Est. de Magallanes	EM	52.47	69.57	3	3
Costa Pacífica	X Región	Llanquihue	LL	41.80	76.66	14	14

2.3.4 Variación genética de microsatélites

Se realizaron test para evaluar la existencia de desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), esto se realizó a nivel de cada cluster obtenido con STRUCTURE para contar con un mayor soporte estadístico. También se estimó la heterocigosidad observada (Ho), la heterocigosidad esperada (He) y el número de alelos, utilizando el programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer 2010). Estos últimos estimadores se obtuvieron para cada locus y para cada colonia; pero debido al bajo *n* muestral de algunas colonias ($n < 4$, para Estrecho de Magallanes e Islas Malvinas) también se realizó al nivel cada cluster obtenido

con STRUCTURE (ver Figura 2.4 para referencia de esos clusters). La frecuencia de alelos nulos promedio, para todos los loci analizados, fue estimada con el programa FREENA (Chapuis & Stoup 2007). Se evaluó el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores utilizados y el coeficiente de endogamia (F_{is}), para cada colonia, empleando GENEPOP v4.0 (Rousset 2009). El programa GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006) fue utilizado para obtener el número de alelos privados de cada colonia. Los niveles de significancia fueron ajustados para comparaciones múltiples con el método de Benjamini- Yekuteli (Benajamini & Yekuteli 2001) modificado para el descubrimiento de tasas de falsos (B-Y FDR). El método fue aplicado siguiendo las recomendaciones de Narum (2006). El programa ADZE (Szpiech et al. 2008) fue utilizado para cuantificar la riqueza alélica estandarizando los tamaños muestréales, estos valores estandarizados se denominan con la letra '*g*'.

2.3.5 Diferenciación poblacional basada en microsatélites

Se realizaron análisis de agrupamiento Bayesiano para estimar el número más probable de clusters genéticos (*K*) subyacentes a nuestra especie de interés. Para esto se emplearon dos programas diferentes: BAPS v5.3 (Coreander et al. 2008), y STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). BAPS trabaja sin asumir ningún número de clusters a priori; por el contrario, STRUCTURE requiere del ingreso de un valor de *K* para testear. Cada uno de estos programas realiza diferentes suposiciones acerca de los datos a analizar, empleando diferentes estrategias para arribar al valor óptimo de *K* (Evanno et al. 2005, Latch et al. 2006), por ello es que se decidió utilizar ambos programas. Las corridas de análisis llevadas a cabo en BAPS asumieron un valor de K_{max} = 20, bajo los modos: *mixture analysis* y *spatial clustering of groups of individuals*. Las corridas analíticas de STRUCTURE fueron realizadas en el modo: *admixture analysis*, usando las localidades de muestreo como

priors (Hubisz et al. 2009) y asumiendo que las frecuencias alélicas se encuentran correlacionadas (recomendado por Falush et al. 2003). Se realizaron corridas preliminares cortas, testeando valores de K = 1 hasta 16 (numero de colonias muestreadas), los valores de K > 10 mostraron muy baja probabilidad a posteriori. Los resultados finales se obtuvieron luego de realizar 20 corridas independientes, evaluando desde K = 1 a K = 9; cada corrida consistió de 100,000 ciclos de burn-in y 300,000 ciclos de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC). La aplicación disponible *on-line*: STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012) fue utilizada para detectar el número de clusters más probable por medio del método de Evanno (ΔK); también utilizamos el clásico Ln Pr(X | K) como indicador de la partición más probable (Falush et al. 2003). La probabilidad de cada individuo de pertenecer a un cluster (i.e. valores Q) de las 20 corridas, para las particiones desde K = 2 a K = 5, fueron promediadas usando CLUMPP v1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) y editadas como imágenes con el programa DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004).

Se obtuvieron los estimadores tradicionales de diferenciación poblacional a nivel global y a nivel de comparaciones pareadas entre colonias, F_{st} (Weir & Cockerman 1984) y R_{st} (Slatkin 1995), utilizando MSATANALYZER (Dieringer et al. 2003) y RSTCALC (Goodman 1997) respectivamente (colonias con n < 7 no fueron incluidas en las comparaciones pareadas). Los valores de p fueron obtenidos luego de 10,000 permutaciones, y fueron corregidos para múltiples comparaciones con el método BY-FDR. Se ha demostrado que el estimador F_{st} es más apropiado que R_{st} en aquellos casos donde se cuenta con un número limitado de loci e individuos muestreados (Balloux & Goudet 2002). Sin embargo, también se ha demostrado que R_{st} es mejor estimador de la diferenciación poblacional, cuando los microsatélites se ajustan al modelo mutacional de 'stepwise' (Balloux & Lugon-Moulin 2002). También se obtuvo D_{est}, el cual es un estimador relativo de la diferenciación

poblacional, que permite escalar por tamaño muestral y número total de alelos (Jost 2008), para esto se utilizó la aplicación on-line SMOGD (Crawford 2010). Los valores pareados de F_{st} fueron utilizados para construir árboles no-enraizados de neighbor-joining (NJ), utilizando PHYLIP 3.6 (Felsenstein 2005).

Se realizaron AMOVAs jerárquicas con ARLEQUIN v3.5, en este caso fue de interés estimar el valor F_{ct}, el cual mide el porcentaje total de la variación genética que es atribuible a la variación entre regiones geográficas, *Va*/*Vt*, donde *Va* es la varianza molecular entre grupos y *Vt* es la varianza total (Excoffier et al. 1992). Se buscaron diferencias significativas entre los grupos: costa Atlántica (AC), región Fueguina (FR) y costa Pacífica (PC). Ver la Tabla 1 para una referencia de que colonias fueron incluidas en cada grupo. La colonia de Isla Navarino no fue utilizada en los análisis de AMOVA debido a que presentó muchos datos faltantes.

Se realizaron test de Mantel, con el objetivo de testear la existencia de aislamiento por distancia, para esto utilizamos el programa GENALEX v6. Lo que se buscó en este caso fue, la existencia o no de una correlación (r) positiva y significativa entre las matrices de distancia genética y distancia geográfica. La distancia genética fue medida como valores de F_{st} linealizados, y las distancias geográficas entre colonias fue estimada a partir de sus coordenadas de latitud y longitud con el algoritmo implementado en GENALEX, el cual es una modificación de la formula Haversine (Sinnot 1984). Los valores de significancia fueron obtenidos luego de 10,000 permutaciones. Para estos análisis empleamos dos aproximaciones diferentes: (i) considerando distancias Euclidianas entre colonias, y (ii) corrigiendo la distancia entre las colonias como si estas estuviesen distribuidas a lo largo de una línea recta. El contraste de los resultados obtenidos entre estas aproximaciones, nos permitirá evaluar el rol de la masa continental que separa a los océanos Atlántico y Pacífico como barrera física (geográfica) para el flujo génico. Si la correlación se incrementa en la aproximación (ii) con

respecto a la (i), será evidencia de que la masa continental constituye una barrera física significativa para esta especie.

2.3.6 Historia demográfica. Modelo e intensidad del flujo génico

Se evaluó la ocurrencia de reducciones recientes del tamaño poblacional efectivo utilizando el programa BOTTLENECK v1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996). Empleando como herramienta estadística el test de Wilcoxon para detectar el exceso significativo de heterocigotos, esto último es una de las señales de la ocurrencia reciente de un cuello de botella. Empleamos un modelo mutacional de dos fases (TPM), el cual asume un 95% del modelo mutacional de *stepwise* y un 5% del modelo de múltiples-pasos (recomendado por Piry et al. 1999), se realizaron 100,000 iteraciones para obtener los valores de significancia. Este test fue realizado sobre cada uno de los clusters diagnosticados por STRUCTURE: Chubut (C1), Santa Cruz (C2), región Fueguina (C3) y Costa Pacífica (C4). Estos mismos clusters se utilizaron también como unidades demográficas para determinar el modelo de flujo génico y las tasas de migración reciente. Para una referencia gráfica de estos clusters ver la Figura 2.2.

Se utilizó una aproximación de modelado basado en simulaciones coalescentes, para evaluar cómo se ajustaban nuestros datos de microsatélites a los diferentes modelos de flujo génico. Los modelos evaluados fueron: (1) un modelo en el que el flujo génico ocurre entre poblaciones adyacentes siguiendo las costas, acorde al modelo de *stepping-stone* (Kimura & Weis 1964) sin asumir migración a través de la masa continental (i.e. trans-contiental), (2) varios modelos en los cuales el flujo génico ocurre en una forma de tipo-n-islas (Wright 1942), con diferentes combinaciones de conexiones entre poblaciones, y (3) se evaluó la posibilidad de panmixia, haciendo colapsar a todas las poblaciones en una única población en

la primera generación. La Figura 4 muestra una representación esquemática de todos los modelos evaluados. Se simularon datos para cada microsatélite de forma separada, empleando BAYESSC (Anderson et al. 2005), una modificación del programa SIMCOAL v1.0 (Excoffier et al. 2000). Los modelos evaluados difirieron en las matrices de migración y los parámetros utilizados para las simulaciones fueron introducidos en forma de intervalos; la tasa de migración (*m*) fue introducida de forma simétrica con una intensidad de moderada a baja [0.001 - 0.01], la tasa de mutación también fue introducida en forma de intervalo, $\mu = [5 \times 10^{-3} - 5 \times 10^{-5}]$ por locus/generación (obtenida de Estoup et al. 2002). Utilizamos un modelo de cuatro poblaciones, los clusters obtenidos en STRUCTURE fueron utilizados como unidades demográficas (i.e. poblaciones) para obtener las estadísticas observadas. Se realizaron 1,000 simulaciones por microsatélite, por modelo. Utilizamos tres estadísticas independientes para evaluar cada modelo simulado: el número de alelos y la heterocigosis esperada (obtenidos con BAYESSC), y estimadores de F_{st} (obtenidos con ARLEQUIN). Estas mismas estadísticas sumarias fueron obtenidas para los datos observados con ARLEQUIN. Para evaluar la bondad de ajuste de los datos observados a los datos simulados, se utilizó la verosimilitud empírica de cada estadística sumaria (Richards et al. 2007, Knowles et al. 2009). Primero, se evaluó la proporción 'P' de los valores simulados iguales o mayores que las estadísticas sumarias observadas, y luego se obtuvo un valor de *p* para cada microsatélite, para cada modelo. Los valores de *p* para cada modelo fueron combinados utilizando la aplicación *on-line* METAP (Whitlock 2005), con el fin de obtener las probabilidades finales de cada modelo.

Se empleo el método Bayesiano multilocus implementado en BAYESASS v3.0 (Wilson & Rannala 2003) para estimar las tasas de migración reciente (*m*) entre las unidades demográficas (i.e. clusters obtenidos con STRUCTURE). Este método tiene la particularidad, de realizar menos suposiciones acerca de los datos que los estimadores de tasas de migración

de largo plazo. Por lo tanto, puede ser legítimamente aplicado a poblaciones que están lejos del equilibrio migración/deriva génica (Wilson & Rannala 2003). Esta última observación tiene gran relevancia en aves marinas, debido a la alta tasa de extinción-colonización, típico de la dinámica de las metapoblaciones, a la cual se ajustan las especies que reproducen en colonias (e.g. Oro 2003). Se realizaron numerosas corridas preliminares cortas para ajustar la tasa de aceptación de los principales parámetros (i.e. tasa de migración, coeficiente de endogamia y frecuencias alélicas), y para asegurar una buena mezcla de las cadenas. La convergencia de las cadenas se llevo a cabo verificando los *trace-files* en el programa TRACER v1.4.1 (Rambaut & Drummond 2007). Los parámetros finales fueron obtenidos a partir de tres corridas independientes, utilizando diferentes valores de *random seeds*. Cada corrida consistió de 5×10^7 iteraciones y un periodo de burn-in de 5×10^6, con un intervalo de muestreo de 500 genealogías.

2.3.7 Análisis del ADN mitocondrial

Se empleó DNAsp v4.5.3 (Rozas et al. 2003) para obtener las medidas estándar de diversidad genética. Se realizaron AMOVAs jerárquicas con ARLEQUIN v3.5. En este caso se obtuvo el parámetro Φ_{ct}, comparable con el parámetro F_{ct} previamente descripto; también se obtuvieron distancias pareadas de Φ_{st} entre colonias (no incluyéndose aquellas con $n < 7$), empleando el modelo de sustitución de Kimura 2 Parámetros (K2P). Las distancias genéticas pareadas fueron también utilizadas para realizar test de Mantel siguiendo la misma metodología implementada para los microsatélites (sección 2.3.5), y para construir árboles de neighbor-joining (NJ) utilizando el programa PHYLIP. NETWORK v4.6.1 fue utilizado para obtener redes de haplotípos bajo la aproximación de *median-joining* (MJ) (Bandelt et al. 1999). El modelo de evolución al cual se ajustan nuestras secuencias fue determinado

empleando JMODELTEST v0.1.1 (Posada 2008), utilizando el Criterio de Información Bayesiana (BIC). También se construyeron árboles de *maximun-likelihood* (ML) utilizando PHYML (Guidon & Gascuel 2003), el soporte para los nodos se obtuvo luego de 100 pseudoreplicas de *bootstrap*. Se utilizaron como *outgroups* dos secuencias de Cormorán Imperial obtenidas por nosotros. El paquete BEAUTi/BEAST v1.7.4 (Drummond & Rambaut 2007) fue utilizado para estimar los TMRCA (tiempo al ancestro común mas reciente) para los clados obtenidos en los árboles de ML. Este paquete de programas es generalmente utilizado en el contexto de análisis filogenéticos, sin embargo esta aproximación es también apropiada para estimar los tiempos de divergencia a nivel intraespecífico, cuando las poblaciones muestreadas no están conectadas por flujo génico (Heled & Drummond 2010). Por lo tanto, para estos análisis se utilizaron todos los haplotípos que no estuvieran compartidos entre clados, también se utilizaron secuencias de Cormorán Imperial como outgroups para enraizar los árboles. Las corridas consistieron de 5×10^8 ciclos de MCMC, con un período de *burn-in* de 5×10^7. Se implementó un modelo de reloj molecular estricto, la tasa de sustitución/sitio/millón de años fue obtenida dividiendo la distancia genética promedio entre *Sula sula* y *P. atriceps* + *P. magellanicus* por el tiempo de divergencia calculado para las familias Sulidae/Phalacrocoracidae estimado en 35 millones de años (Morris-Pocock et al. 2011, Patterson et al. 2011). La secuencia de ATP*asa* de *S. sula* utilizada, se obtuvo de Kennedy et al. (2000). Realizamos y promediamos tres corridas independientes usando diferentes '*random- seeds*', para obtener los parámetros finales.

2.4 RESULTADOS

2.4.1 Desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg (H-W) y diversidad genética de microsatélites

No se encontró evidencia de desequilibrio de ligamiento en ninguno de los loci, cuando se realizaron test globales dentro de cada colonia. Se observó que algunos loci se apartaron significativamente del equilibrio de H-W al nivel de clusters, los loci que se desviaron significativamente del equilibrio fueron: PcD2 en Santa Cruz (C2), PcT4 en Chubut (C1), y PcD5 en Chubut y Santa Cruz, en los cluster restantes ningún loci presentó desvíos significativos de H-W. La diversidad genética por colonia puede verse resumida en la Tabla 2.2. Se observó una baja riqueza alélica por colonia, en promedio 2.68, con rangos de entre 2.33 y 3.19. Cuando las colonias se agruparon por regiones, y el tamaño muestral (*g*) fue estandarizado en 20, el norte de Chubut (Punta Arco, Las Charas y Punta Loma) y la región Fueguina (Bahía Ushuaia e Islas Malvinas), mostraron las riquezas alélicas mas altas y también la mayor heterocigosis esperada. Las colonias de estas regiones también mostraron el mayor número de alelos privados: Punta Arco y Las Charas presentaron dos alelos privados cada una y Bahía Ushuaia presentó 4 alelos privados. La heterocigosis observada fue desde 0.36 a 0.73 (promedio = 0.54) y la heterocigosis esperada fue desde 0.48 a 0.76 (promedio = 0.6). La proporción esperada de alelos nulos fue < 7% para todos los loci usados, considerando todas colonias juntas. El número de alelos por locus fue desde 5 a 18. La Tabla 3 muestra la diversidad genética por locus.

Tabla 2.2. Diversidad genética por colonia, incluyendo microsatélites y ADN mitocondrial. Número de individuos analizados por colonia (*n*); valores promedio por colonia de: heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), número de alelos (*Na*) y riqueza alélica (*R*). Número de alelos privados (*Pa*), y coeficiente de endogamia (*Fis*), valore en negrita indican un déficit significativo de heterocigotos al 0.05 luego de ser corregido por B-Y FDR. Diversidad haplotípica (*Hd*) y diversidad nucleotídica (π).

	Diversidad en Microsatélites							Diversidad en ADNmt		
	n	*Ho*	*He*	*Na*	*R*	*Pa*	*Fis*	*n*	*π*	*Hd*
PA	4	0.64	0.67	3.14	2.72	2	0.053	4	0.0007	0.5
CH	10	0.59	0.60	4.14	2.60	2	0.016	4	0.0007	0.5
PL	20	0.55	0.62	4.86	2.65	0	**0.115**	7	0	0
RM	10	0.60	0.60	4.29	2.76	0	-0.004	7	0	0
VE	10	0.61	0.61	4.00	2.62	0	-0.004	7	0	0
PM	8	0.36	0.51	3.00	2.33	0	**0.315**	-	-	-
IE	13	0.49	0.48	3.67	2.36	1	0.012	8	0	0
CB	10	0.40	0.49	3.71	2.43	1	**0.200**	8	0	0
IP	7	0.39	0.52	3.43	2.46	0	**0.272**	-	-	-
UR	5	0.46	0.58	3.00	2.38	0	**0.238**	-	-	-
ML	12	0.66	0.68	4.29	2.88	0	0.017	9	0.0016	0.22
IM	3	0.57	0.76	3.29	3.19	1	0.304	3	0	0
BU	12	0.73	0.70	5.43	3.10	4	-0.036	9	0.0016	0.5
IN	10	0.55	0.63	4.50	3.15	0	0.137	-	-	-
EM	3	0.62	0.58	3.00	2.83	0	-0.083	3	0	0
LL	14	0.56	0.57	3.71	2.54	1	0.021	14	0	0

Tabla 2.3. Diversidad genética por locus. Número de alelos (*Na*), heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*) y frecuencia de alelos nulos (*Fo*).

Locus	Fuente	Tamaño (pb)	Largo rep.	*Na*	*Ho*	*He*	*Fo*
PcD2	Piertney et al. (1998)	198-238	2	18	0.65	0.84	0.069
PcD3	Piertney et al. (1998)	208-232	4	8	0.61	0.72	0.051
PcT4	Piertney et al. (1998)	226-254	4	8	0.67	0.78	0.063
PcD5	Piertney et al. (1998)	209-219	2	6	0.42	0.52	0.034
Cor01	Fike et al. (2009)	180-200	4	7	0.50	0.50	0.009
Cor05	Fike et al. (2009)	254-295	4	5	0.32	0.49	0.058
Cor06	Fike et al. (2009)	159-179	4	6	0.65	0.71	0.04

2.4.2 Diferenciación poblacional basada en microsatélites

Los resultados de los diferentes análisis de agrupamiento Bayesiano, realizados con diferentes programas no fueron del todo consistentes entres sí. BAPS resultó en $K = 5$ (Apéndice 3.a); por su parte los resultados de STRUCTURE fueron algo ambiguos. Para éste

último método existen formas alternativas de determinar la partición más probable, el método de Evanno (ΔK) mostró una distribución bimodal con picos en K = 2 y 4, mientras que Ln Pr (X | K) soportó el valor de K = 4 (ver Apéndice 4.a). La Figura 2.2 muestra todas las particiones de STRUCTURE desde K = 2 a 5. La única diferencia entre las particiones de STRUCTURE K = 4 y BAPS K = 5, es que en esta última se diagnosticó a la colonia de Islas Malvinas como un cluster separado. Dada la evidencia global y el bajo número de individuos muestreados con el contamos para la colonia de Islas Malvinas, preferimos discutir sobre el resultado de STRUCTURE K = 4, en la que esta colonia es incluida en la región Fueguina; en la Figura 2.4c se muestra un 'bar-plot' de los valores-Q para cada individuo para este resultado de agrupamiento Bayesiano. El valor promedio de los valores-Q para cada uno de los clusters diagnosticados fue: Cluster 1 = 0.74, agrupando a las colonias de la provincia de Chubut; Cluster 2 = 0.80, agrupando las colonias de la provincia de Santa Cruz; Cluster 3 = 0.80, agrupando las colonias de la región Fueguina, y Cluster 4 = 0.96, incluyendo la colonia del Océano Pacífico. Las colonias que presentaron el mayor nivel de *admixture* fueron: Punta Loma, Roca Malaspina y Monte León. Las primeras dos, pertenecientes a la costa Atlántica, llamativamente presentaron alto nivel de *admixture* con la colonia de la costa Pacífica; por su parte Roca Malaspina presentó alto nivel de *admixture* con el cluster correspondiente a la provincia de Santa Cruz.

Los clusters diagnosticados fueron testeados con AMOVAs jerárquicas. Donde el índice F_{ct} entre regiones fue 0.082 ($p < 0.001$) y el F_{st} global fue 0.12 ($p < 0.001$). Por su parte, los estimadores de diferenciación genética poblacional fueron todos significativos, los valores globales de F_{st} y R_{st} fueron 0.10 ($p < 0.001$) y 0.14 ($p < 0.001$), respectivamente. El D_{est} global fue 0.115 (Stand. err. 0.001, 95% CI: 0.08 – 0.28). Los valores de las comparaciones de a pares de F_{st} entre colonias fueron desde 0 a 0.29, y los de R_{st} fueron desde 0 a 0.53

(Apéndice 5.a). Los valores de F_{st} de las comparaciones de a pares fueron representados en el árbol de NJ que se muestra en la Figura 2.3. Donde puede verse cierta tendencia de las colonias de Chubut y Santa Cruz a agruparse juntas, y al mismo tiempo a separarse de las colonias del Pacífico y región Fueguina.

Figura 2.2. Particiones de STRUCTURE desde *K* = 2 a 5. Cada barra horizontal representa un individuo. Las barras más gruesas indican la separación entre colonias muestreadas. Los colores representan la probabilidad de un individuo de pertenecer a un determinado cluster (valor-Q).

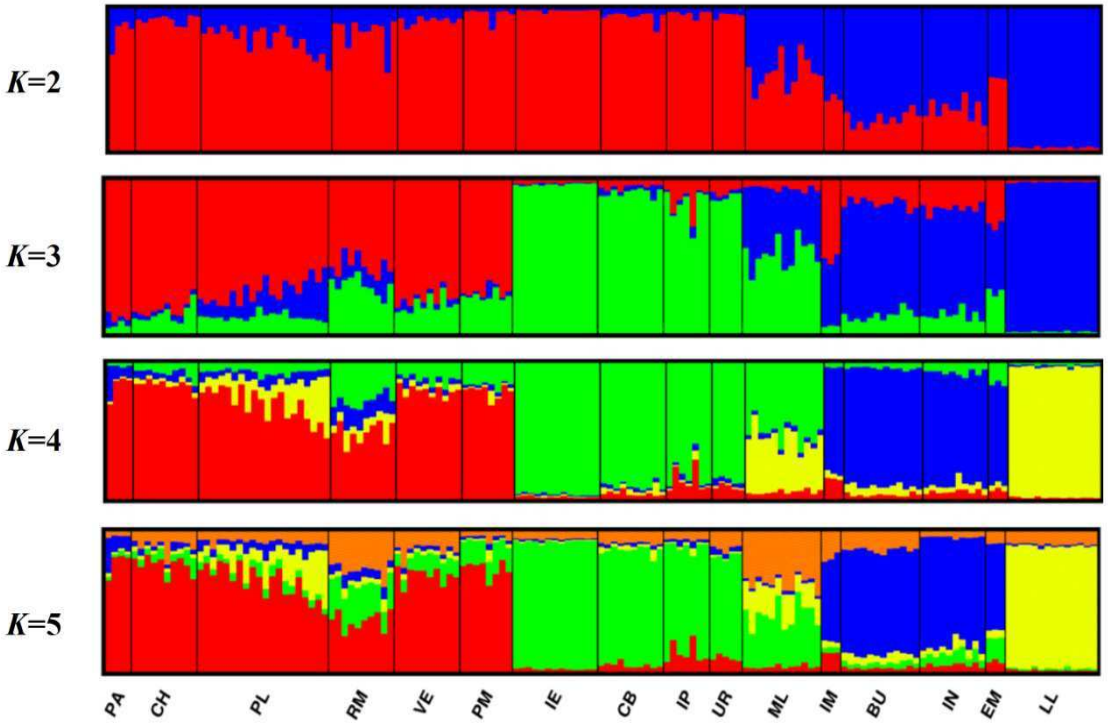


Figura 2.3. Árbol de Neighbor-joining basado en distancias de F_{st}. Para referencia de colonias ver tabla 1.

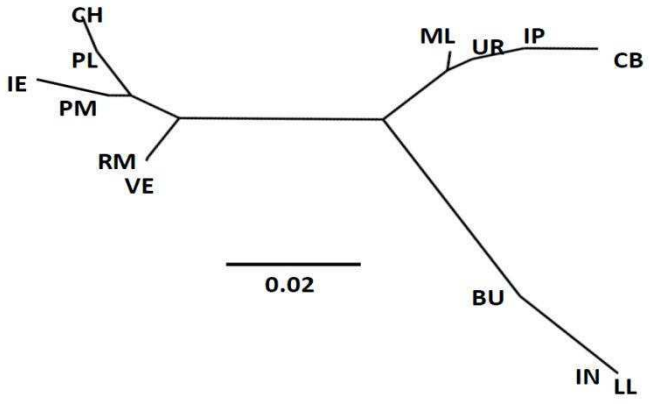
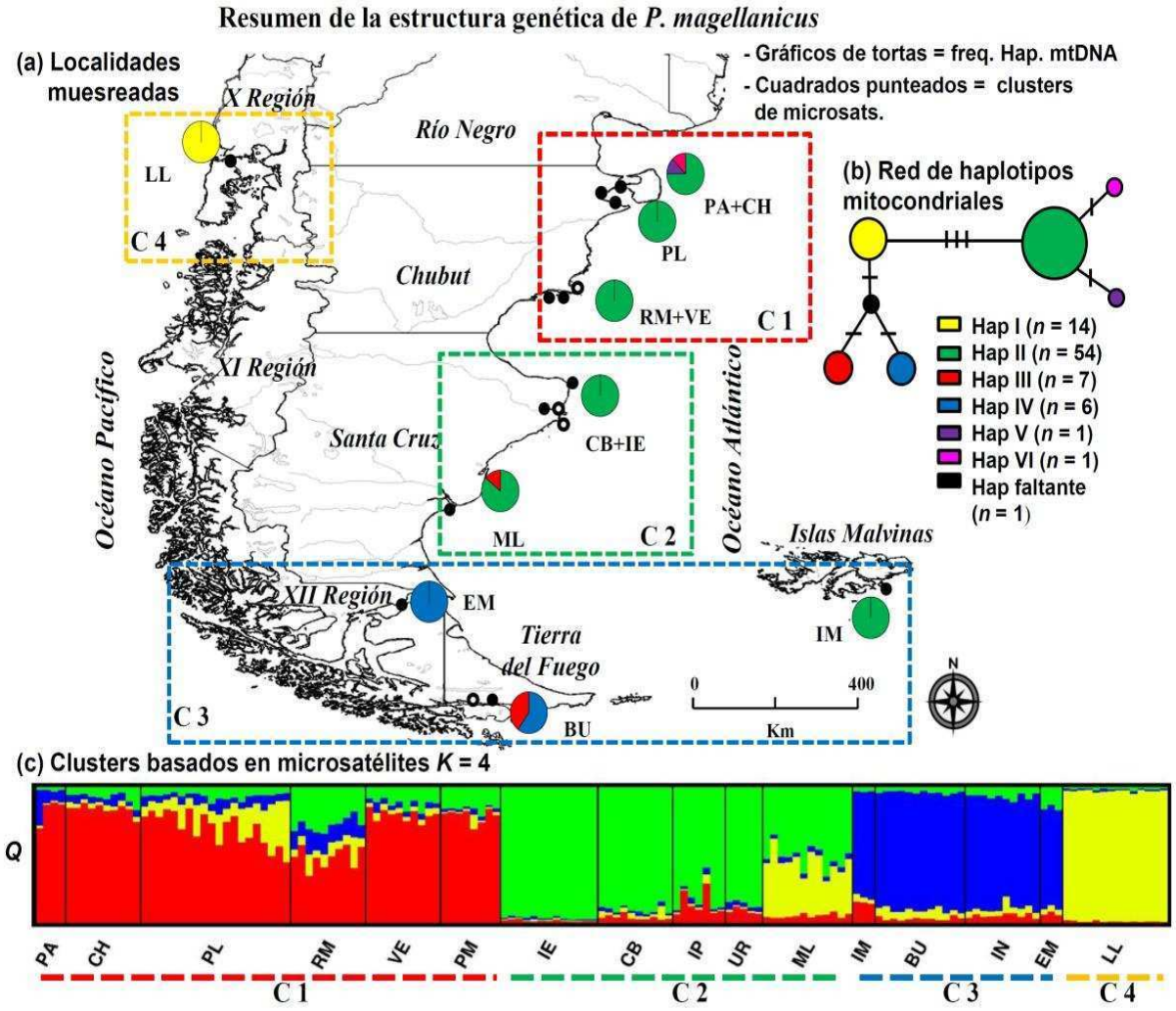


Figura 2.4. Resumen de la estructura genética de *P. magellanicus*. a) Localidades muestreadas. Los círculos rellenos (negros) indican las localidades analizadas para microsatélites y ADNmt, y los círculos vacios indican colonias analizadas solo para microsatélites. b) Red de haplotípos mitocondriales obtenida con NETWORK. Se puede observar la frecuencia haplotípica. Los gráficos de torta indican la proporción de cada haplotípo encontrado en cada colonia. Colonias muy próximas fueron agrupadas para simpleza de la representación. c) Bar-plot de STRUCTURE *K* = 4. Los cuadros punteados sobre el mapa representan a cada cluster.



También se encontró evidencia de aislamiento por distancia. Los test de Mantel indicaron que la correlación entre las matrices de distancia geográfica Euclidiana y las distancias de F_{st} entre colonias fue: r = 0.397 (p = 0.01) (Figura 2.5a). Cuando la distancia

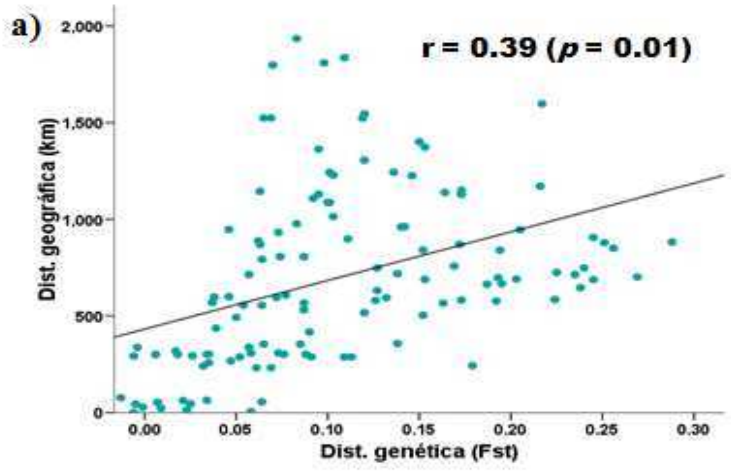
entre las colonias fue corregida por la presencia de la masa continental que separa a la costas Atlántica y Pacífica, la correlación fue aún mayor, r = 0.68 (p = 0.0001) (Figura 2.5b).

2.4.3 Historia demográfica y flujo génico basado en microsatélites

De las cuatro unidades demográficas consideradas, encontramos evidencia de ocurrencia de un cuello de botella reciente en solo una de las poblaciones, correspondiente a la colonia de Llanquihue, en la costa Pacífica (Cluster 4), el test de Wilcoxon resultó en $p <$ 0.05.

El modelo de flujo génico al que se ajustó *P. magellanicus* con mayor probabilidad, fue a un modelo de tipo-n-islas, más precisamente el modelo que permite dos conexiones trans-continentales, pero no permite el flujo génico directo entre Chubut y la región Fueguina (modelo M1) (Figura 2.6). El modelo de *stepping-stone* (M3) quedó en tercer lugar, y el modelo con menor probabilidad resulto ser el de Panmixia (M5). El hecho de que el modelo de flujo génico con mayor probabilidad haya sido el de tipo-n-islas, implica que el flujo génico a través de la masa continental ocurre, y en tasas mayores a las esperadas previamente.

Figura 2.5. Test de Mantel. a) Utilizando matriz de distancias euclidianas entre colonias. b) Matriz de distancias corregidas por la presencia de la masa continental.



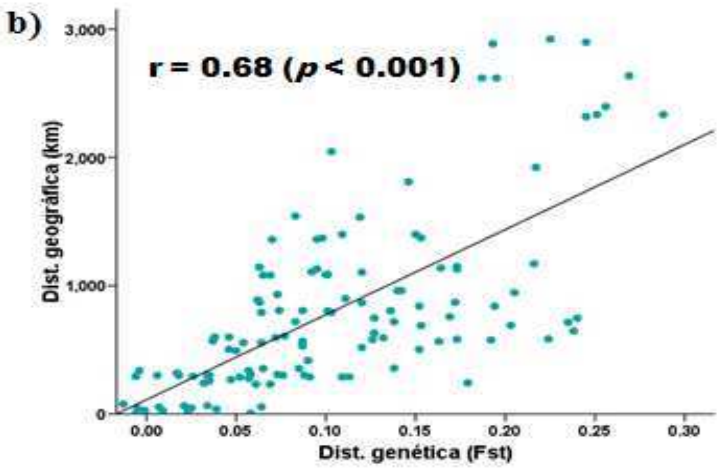
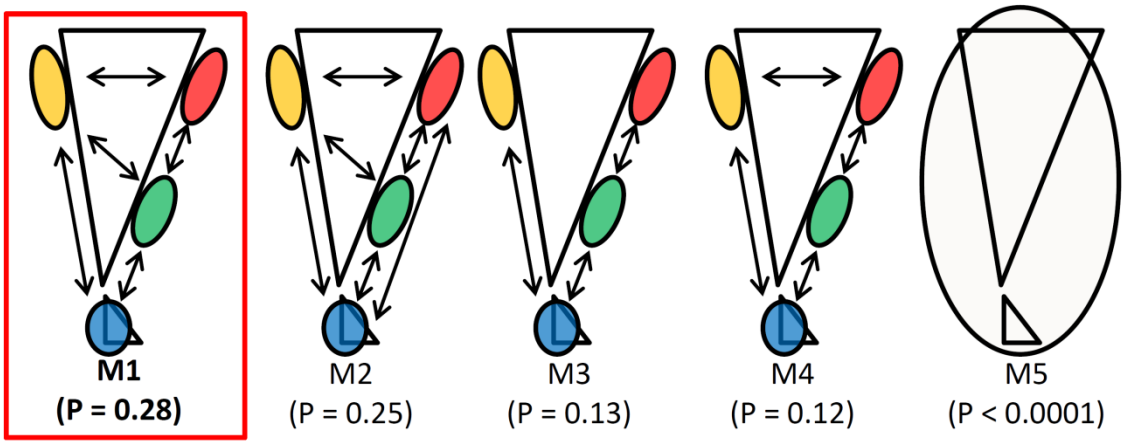


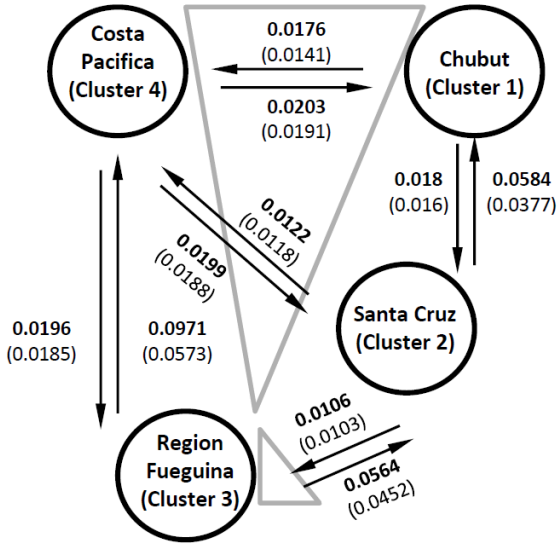
Figura 2.6. Modelos de flujo génico testeados. Debajo de cada modelo se observa la probabilidad (P) obtenida para cada uno. Los colores representan los clusters obtenidos con STRUCTURE, las flechas indican las conexiones de flujo génico. M1, M2 y M4, son los diferentes modelos de tipo-n-islas probados. M3 es el modelo de *stepping-stone* y M5 es el modelo de panmixia. El rectángulo rojo indica el modelo más probable.



Las tasas de migración reciente obtenidas con BAYESASS se muestran en la Figura 2.7. La tasa de migración (*m*) promedio fue de 0.032 ± 0.025 (SD) (CI 95% -0.014 – 0.074), con valores que fueron desde 0.0102 (CI 95%: -0.009 – 0.03) hasta 0.0971 (CI 95%: -0.016 – 0.21). A pesar de que los intervalos de confianza de la mayoría de los valores incluyeron el cero, decidimos discutir los valores medios obtenidos, debido a que junto con la evidencia

obtenida de las simulaciones coalescentes y agrupaciones Bayesianas, permiten identificar ciertos patrones y tendencias. Es posible observar una direccionalidad, en la que el flujo génico se da con mayor intensidad en sentido Pacifico → Atlántico; y desde la región Fueguina hacia las costas Pacífica y Atlántica.

Figura 2.7. Tasas de migración (*m*) obtenidas con BAYESASS. En gris claro se observa una representación esquemática de Patagonia. Los círculos representan las 4 poblaciones y las flechas la dirección del flujo génico. Los valores en negrita corresponden a valor medio de flujo génico y entre paréntesis debajo de cada valor se muestra su desvió estándar (SD).



2.4.4 Resultados de los análisis de ADN mitocondrial

Se observó un bajo nivel de variación genética para este marcador. Esto mismo ha sido previamente reportado en otros estudios involucrando especies de la familia Phalacrocoracidae a nivel intraespecífico, en los cuales se analizaron genes de ADNmt codificantes para proteínas (e.g. Waits et al. 2003, Barlow et al. 2011).

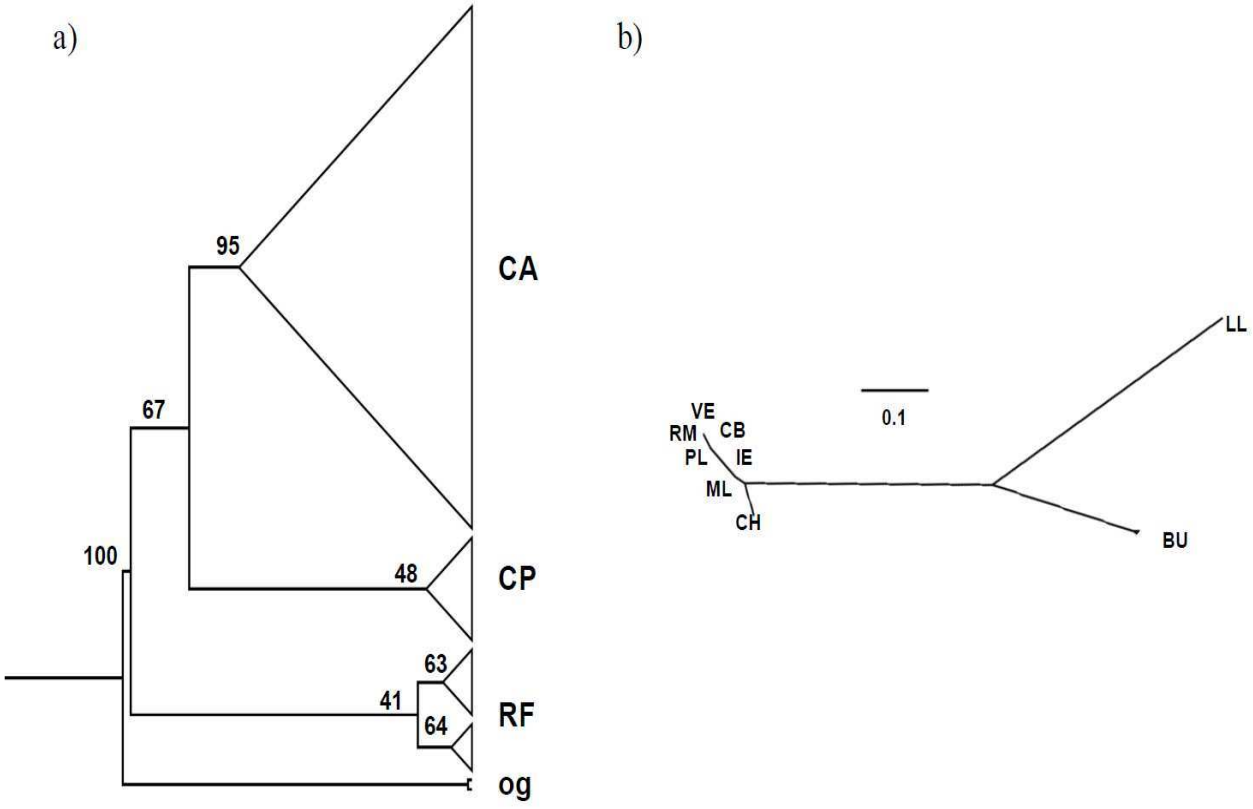
Se encontraron seis (n = 6) haplotípos en total, todos definidos por transiciones. La diversidad haplotípicas promedio (Hd) fue 0.54 y la diversidad nucleotídica promedio (π) fue

0.0029. Las únicas colonias con haplotípos únicos fueron Punta Arco y Las Charas (PA+CH, Figura 2.2). La variación del ADNmt por colonia se muestra en la Tabla 2.2. Los resultados de las AMOVAs, cuando se agrupo las colonias de la costa Pacífica, la costa Atlántica y la región Fueguina fue: $\Phi_{ct} = 0.91$ ($p < 0.01$); y el Φ_{st} global = 0.92 ($p < 0.01$). A diferencia de la agrupación basada en microsatélites, aquí el mayor valor de Φ_{ct} se obtuvo cuando la colonia de Islas Malvinas fue incluida en el grupo costa Atlántica. Las distancias de Φ_{st} estimadas entre pares de colonias se pueden ver en el Apéndice 5.a, estas distancias fueron utilizadas para construir un árbol de NJ, en el cuál se puede observar como las colonias de la costa Atlántica son genéticamente más cercanas entre sí, que con respecto a las colonias de región Fueguina y la costa Pacifica (Fig. 2.8b). De hecho, se observó un solo haplotípo compartido entre regiones, más precisamente un haplotípo de la región Fueguina fue observado en la colonia de Monte León (sur de Santa Cruz, ver Fig. 2.2). También se encontró una correlación significativa entre las matrices de distancia geográfica y de distancia genética pareadas, Φ_{st}. La correlación positiva se observó tanto cuando las distancias geográficas entre colonias fueron Euclidianas, como cuando fueron estas distancias fueron corregidas por presencia de la masa continental, r = 0.49 ($P = 0.013$) y 0.64 ($P < 0.01$) respectivamente.

La red de haplotípos obtenida con NETWORK puede verse en la Figura 2.2b, donde se puede observar que los haplotípos de la costa Atlántica y Pacífica están más cercanamente relacionados entre sí, que con respecto a los haplotípos de la región Fueguina. El árbol de maximum-likelihood obtenido bajo el modelo evolutivo de HKY85 (Hasegawa-Kishino-Yano), mostró esa misma relación genealógica entre los haplotípos. La separación más profunda y con el mayor soporte de bootstrap (100%) se observó en el nodo que separa al clado de la RF de los clados de la CA y CP. Los clados de CA y CP también fueron diferenciados en este análisis, aunque con un soporte de bootstrap menor (67%) (Figura 2.8a).

Se estimó un tiempo de divergencia para los clados RF y CA+CP, de aproximadamente 1 millón de años atrás (HPD: 490,000 – 1,610,000), mientras que los clados de la CA y CP divergieron 643,000 años atrás aproximadamente (HPD: 253,000 – 1,080,000), y los dos clados observados dentro de la región Fueguinas podrían haber divergido ca. 702,000 años atrás (HPD: 280,000 – 1,182,000).

Figura 2.8. a) Árbol de *maximum-likelihood* indicando la relación entre los haplotípos de la costa Atlántica (CA), costa Pacifica (CP) y la región Fueguina (RF), también se muestran los soportes de *bootstrap* de los nodos. b) Árbol de *nighbor-joining* representando la distancia genética Φ_{st} entre colonias.



2.5 DISCUSIÓN

2.5.1 Estructura genética general y modelo de flujo génico

Se esperaba encontrar una clara estructuración genética en esta especie, en la cual pudieran diferenciarse tres clusters genéticos, que se correspondan con las siguientes regiones geográficas: Costa Atlántica (CA), Costa Pacífica (CP) y Región Fueguina (RF). También se esperaba que *P. magellanicus* se ajustara a un modelo de flujo génico de *stepping-stone*.

Se encontró clara evidencia soportando los tres grupos genéticos esperados. Tanto los datos de microsatélites como los de ADNmt soportaron esta distinción. Una excepción con respecto a esta correspondencia entre estructura genética y la distribución geográfica fue la de la colonia de Islas Malvinas, la cual según la evidencia de ADNmt se agrupó en la CA, pero los microsatélites la agruparon con la RF (Figura 2.2). Indicando una relación histórica con la Costa Atlántica, pero un flujo génico reciente con las colonias de la Región Fueguina, este mismo patrón fue encontrado en *P. atriceps* (sección 3.5 del capítulo III). Al mismo tiempo, la evidencia de microsatélites demostró que la CA está constituida por dos subgrupos (discutido más abajo). Los tres grupos principales para los que se encontró evidencia son coincidentes con las diferencias genéticas significativas que había observado Siegel-Causey (1997) para esta especie.

En lo que respecta al modelo de flujo génico, se encontró evidencia de aislamiento por distancia, tanto la evidencia de microsatélites como de ADNmt soportaron esta observación. El hecho de encontrar evidencia de aislamiento por distancia es una prueba indirecta de que esta especie podría ajustarse a un modelo de flujo génico de *stepping-stone*. Sin embargo, se encontró evidencia algo contradictoria, de qué *P. magellanicus* podría seguir un modelo de flujo de génico de tipo-n-islas, en el sentido de que la mayoría de las poblaciones intercambiarían migrantes sin restricciones (Figura 2.6). Esta observación implica que el flujo

génico a través de la masa continental y sobre los Andes puede ocurrir. Esto mismo ha sido observado en otras especies de aves marinas, donde las grandes extensiones de tierra han demostrado constituir efectivas, pero no absolutas, barreras para el flujo génico (e.g. Morris-Pocock et al. 2011, Bicknell et al. 2012). En nuestro caso, a pesar de encontrar diferencias genéticas significativas entre las colonias de la costa Atlántica y la costa Pacífica, otros de nuestros resultados basados en microsatélites arrojaron evidencia de flujo génico directo entre éstas costas. Por ejemplo, los resultados de agrupamiento Bayesiano indicaron que algunas colonias de las costa Atlántica presentaron alta ancestralidad compartida con la colonia del Pacífico, en particular las colonias de Punta Loma (PL, Chubut) y Monte León (ML, Santa Cruz) (Figura 2.2c). Lo que es más, las simulaciones coalescentes indicaron que el modelo de flujo génico al que se ajusta con mayor probabilidad esta especie, es el de tipo-n-islas (Figura 2.5), al mismo tiempo los valores medios de tasas de migración (*m*) estimadas con BAYESASS también mostraron cierta evidencia de flujo génico trans-continental, entre las colonias del Pacifico con las de Chubut y Santa Cruz. Sin embargo este tipo de movimiento no fue soportado por la evidencia obtenida del ADNmt, ya que no se observó ningún haplotípo compartido entre estas costas. De hecho, solo se observó un haplotípo compartido entre las tres principales regiones, fue entre la RF y la CA, en la colonia de Monte León (sur de Santa Cruz), esto sugiere que el flujo génico en esta especie estaría mediado principalmente por machos juveniles. Por machos, porque la mayor evidencia de flujo génico que se observó provino del biparentalmente heredado ADN nuclear, y por juveniles porque estos son los individuos que se ha observado, tienden a abandonar o a alejarse de las colonias con mayor frecuencia durante los periodos post reproductivos (Sapoznikow & Quintana 2008).

Se observó que el flujo génico entre las poblaciones no fue simétrico, basándonos en los valores medios de *m*, obtenidos con BAYESASS, los cuales deben ser considerados con precaución ya que los intervalos de confianza de varios de ellos incluyeron al cero, encontramos cierta direccionalidad en el flujo génico, según el cuál el movimiento de los individuos de esta especie ocurriría con mayor intensidad de oeste a este y de sur a norte. El mismo patrón se observó en *P. atriceps*, por lo tanto la interpretación de este patrón común para las dos especies de interés, se detallará en la sección 3.5 del capítulo III.

2.5.2 Patrones filogeográficos

Se observó una clara estructura filogeográfica en esta especie. En la cual tres grupos recíprocamente monofiléticos fueron evidentes (Figura 2.8a), cada uno de ellos consistentes con cada una de las tres regiones geográficas esperadas (i.e. CA, CP y RF). El quiebre filogeográfico más profundo que se observó, fue el que separó a los haplotípos de la región Fueguina, de los de la costa Atlántica y Pacífica, provocando un quiebre entre el norte y sur (latitudinal). Esto es consistente con un patrón previamente observado en la región, donde todos los otros quiebres filogeográficos importantes observados para otros organismos, como plantas y vertebrados terrestres, también ocurrieron en esta dirección (revisado en Sérsic et al. 2011). En el caso de *P. magellanicus* el quiebre se localizó a la altura del Estrecho de Magallanes. Las razones históricas para este quiebre, también observado en otras especies, han sido adjudicadas a cambios en los niveles del mar que podrían haber afectado a esta región durante los ciclos glaciales ocurridos durante el Cuaternario (Sércic et al. 2011, Ponce et al. 2011). Aunque en nuestro caso éste quiebre fue datado en aproximadamente un millón de años atrás, coincidiendo esto con el GPG (Mercer 1976, Rabassa et al. 2011), el cuál pudo haber promoviendo este evento de vicarianza. La división observada entre haplotípos de la CP

y de la CA, sería para nuestro conocimiento la primera evidencia de un quiebre entre las regiones este y oeste (sentido longitudinal), el mismo fue datado como más reciente, ca. 640,000 años atrás. No podemos adjudicar las causas de este quiebre al levantamiento de la cordillera de los Andes, dado a que este levantamiento ocurrió principalmente durante el Mioceno (7 – 23 millones de años atrás) (Ramos & Ghiglione 2008). En cuanto a la región Fueguina, dos haplotípos diferentes fueron observados allí, cuya divergencia fue estimada en ca. 700,000 años atrás, sugiriendo la posibilidad de numerosos eventos vicariantes dentro de esta región, la cual se sabe fue fuertemente afectada por las glaciaciones durante el Pleistoceno (e.g. Rabassa et al. 2011).

Encontramos señales de expansión reciente de norte a sur, basadas en la distribución de los haplotípos a lo largo de la costa Atlántica. Debido a que dos haplotípos únicos fueron encontrados en el límite norte de la distribución actual de la especie (norte de la provincia de Chubut), el resto de las colonias sobre ésta costa compartieron un único haplotípo mitocondrial.

Por otro lado, nuestros datos respaldaron también la existencia de dos refugios históricos en común para *P. magellanicus* y *P. atriceps*. Localizados: (i) al norte de la distribución de ambas especies a lo largo de la costa Atlántica, y (ii) en la región Fueguina. La evidencia para estos refugios se discute en detalle en el capítulo III.

2.5.3 Taxonomía e implicancias para la conservación

A pesar de que esta especie es relativamente abundante a lo largo de las costas Patagónicas (Frere et al. 2005), y es considerada de 'importancia menor' (i.e. *least concern*) desde el punto de vista de la conservación por *BirdLife International* (2013); consideramos

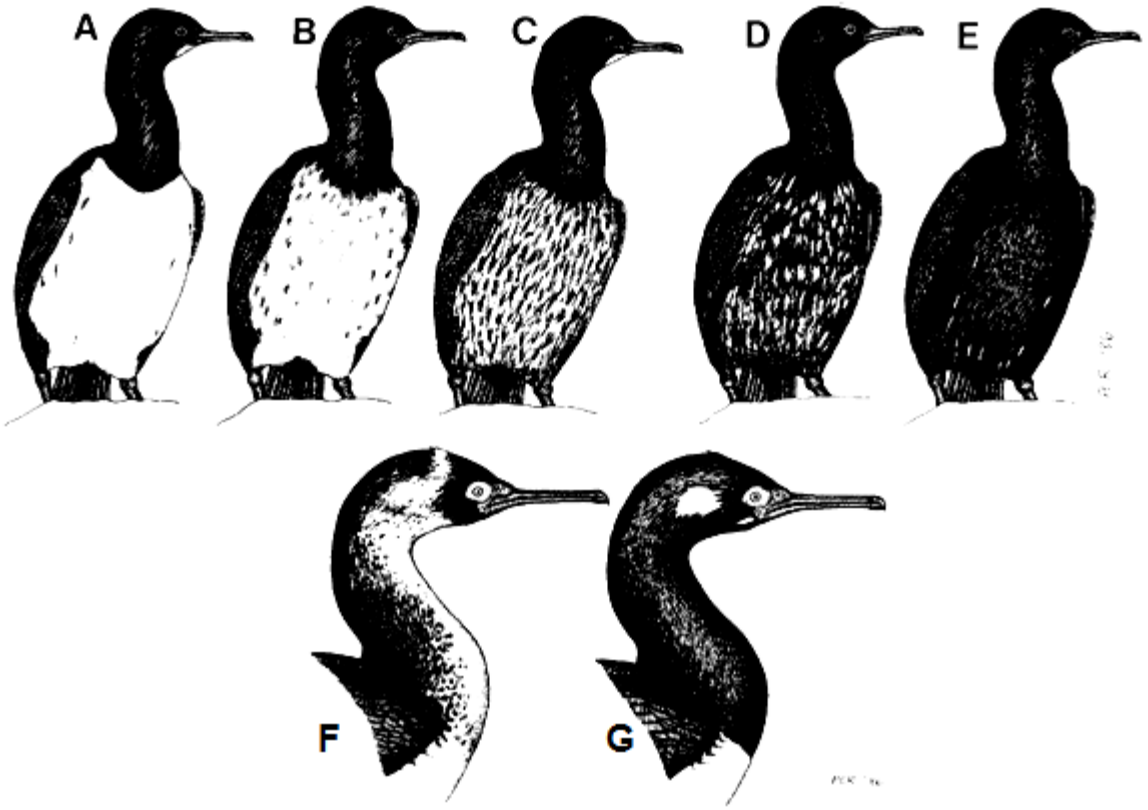
que hay lugar para algunas precauciones, para asegurar la apropiada persistencia de ésta especie.

Las tres regiones principales (AC, FR and PC) que fueron diagnosticadas como genéticamente distintas, coinciden con un polimorfismo de coloración del plumaje en los individuos juveniles. Más precisamente, se describieron cinco categorías de coloración en relación a la proporción de plumas negras y blancas presentes en el pecho de éstos individuos (Rasmussen 1987) (Figura 2.9, desde A-E). En base a lo cual los individuos de la CP presentan un plumaje ventral más blanco (Figura 2.9, A-C) que aquellos de la CA (Figura 2.9 D-E). La RF por su parte, presentó la mayor variabilidad de coloración de plumajes, encontrándose allí juveniles de casi todas la categorías de coloración. Rasmussen (1987) también observó un polimorfismo en la coloración de los adultos, según el cual en la CA hay mayor frecuencia de individuos que presentan cuellos y cabeza con una mayor proporción de plumaje blanco, que en la CP y RF (Figura 2.9, F y G). Estos patrones de variación genética y morfológica coincidentes en el espacio, a lo largo de la distribución de *P. magellanicus*, nos permite inferir la existencia de al menos tres linajes de metapoblaciones evolutivamente independientes (de Queiroz 2007).

En lo que respecta a la conservación, podemos diagnosticar al menos tres unidades evolutivas significativas (ESU, *sensu* Moritz 1994): Costa Pacífica, Región Fueguina y Costa Atlántica. A su vez la CA presentó dos unidades de manejo distintas (MU, *sensu* Moritz 1994), constituidas por las colonias ubicadas en las costas de las provincias de Chubut y Santa Cruz. A pesar de que las costas de estas provincias son adyacentes, la presencia del Golfo San Jorge (de 148 Km de longitud) entre ellas parece ser una efectiva, aunque no absoluta, barrera geográfica para el flujo génico. Esto podría deberse a que en la mayoría de su extensión las costas de este Golfo no presentan el tipo de habitat seleccionado por esta especie para la

nidificación. Es decir, paredes de pendientes pronunciadas, rocosas o de origen sedimentario (Punta et al. 2003, Nelson 2005).

Figura 2.9 Patrones de variación de coloración en *P. magellanicus*. A-E muestran los cinco diferentes patrones de coloración de juveniles. F y G muestran la variación de coloración en adultos (modificado de Rasmussen 1986).



2.5.4 Conclusiones y comentarios finales

Se encontró una fuerte estructura genética y filogeográfica en *P. magellanicus*, esto es acorde con lo esperado previamente, dada la poca movilidad de esta especie, permaneciendo en las cercanías de sus colonias tanto durante los períodos post-reproductivos como durante sus viajes de alimentación. También es consistente con lo propuesto en Friesen et al. (2007a) donde se sugirió que el principal indicador para predecir la presencia o ausencia de estructura genética y filogeográfica en aves marinas es el comportamiento durante los períodos post

reproductivos. Según esta observación, las especies residentes anules, como *P. magellanicus*, son las que tienen mayor probabilidad de estar genética y filogeográficamente estructuradas.

También se observó, que esta especie no sigue un modelo de flujo génico de *stepping-stone*, sino uno de tipo-n-islas según el cual el flujo génico a través de la masa continental y por sobre los Andes es posible. Además se encontró que en esta especie el flujo génico estaría mediado principalmente por machos juveniles.

Finalmente, sugerimos una evaluación más profunda de otros aspectos morfológicos, comportamentales y ecológicos en esta especie, con el fin de clarificar con mayor precisión su taxonomía.

CAPÍTULO III

GENÉTICA DE POBLACIONES Y FILOGEOGRAFÍA DEL CORMORÁN IMPERIAL (*Phalacrocorax atriceps*)

3.1 RESUMEN

Se analizó la estructura genética y filogeográfica del Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*). Ésta es una especie politípica, con numerosas subespecies, que conforman el grupo de los 'cormoranes de ojos azules'. Aquí prestaremos atención a dos de estas subespecies: *P. atriceps atriceps* y *P. atriceps albiventer*, las cuales son endémicas de Patagonia. Con un rango de distribución que abarca las costas de la Patagonia argentina y chilena, incluyendo las Islas Malvinas. Las mismas presentan una tendencia a dispersar durante los períodos post-reproductivos, al mismo tiempo presentan un rango de forrajeo amplio (alejandose hasta 50 Km de sus sitios de nidificación). Se analizaron en total 172 individuos para 8 microsatélites polimórficos, y se obtuvieron 90 secuencias del gen mitocondrial ATP*asa* (657 pb.). Se encontraron diferencias genéticas significativas entre las colonias de las costas Atlántica (CA), costa Pacífica (CP) y región Fueguina (RF), tanto desde la evidencia de microsatélites (F_{ct} = 0.046 p < 0.001) como del ADN mitocondrial (Φ_{ct} = 0.26 p = 0.029). El agrupamiento Bayesiano con STRUCTURE arrojó que el numero de particiones óptimo para esta especie es de cuatro (K = 4), aunque la mayoría de las colonias presentaron un alto nivel de *admixture* y bajos valores de Q. No se encontró evidencia de estructura filogeográfica. Tampoco encontramos evidencia que respalde las subespecies *P. a. atriceps* y *P. a. albiventer*. Sin embargo, si se observó una fuerte diferenciación genética por parte de las colonias de agua dulce. En cuanto a la comparación entre *P. magellanicus* y *P. atriceps* ambas especies presentaron algunos patrones de estructuración genética en común. Sin embargo, conforme a lo esperado en base a las diferentes historias de vida de estas especies, todos los estimadores de diferenciación poblacional (mitocondrial y nuclear) fueron más bajos en *P. atriceps*; como consecuencia de mayores tasas de flujo génico.

3.2 INTRODUCCIÓN

Uno de los principales generadores de estructuración genética para organismos móviles han demostrado ser las barreras geográficas (i.e. "barreras físicas"), tales como las cadenas montañosas o los grandes ríos (e.g. Avise 2000). Este tipo de hitos geográficos han demostrado ser efectivas barreras para el flujo génico, y es sabido que la presencia de estructuración genética es una función inversa del flujo génico (Wright 1931). En el caso de las aves marinas, este tipo de barreras también han demostrado impactar efectivamente en la estructuración genética y filogeográfica de las especies. Entre las principales barreras físicas que afectan al grupo de las aves marinas se han identificado a las grandes extensiones de tierra (e.g. continentes) y a las masas de hielo (e.g. glaciares), ya sean históricas o contemporáneas (Friesen et al. 2007a). Un ejemplo claro de una extensión de tierra actuando como barrera física lo comprende el Istmo de Panamá, el cual a pesar de ser tan angosto, ha probado actuar como una efectiva barrera para el flujo génico en ciertas especies de aves marinas (e.g. *Sula dactylatra*, Steeves et al. 2005).

Sin embargo, lo que resulta llamativo dentro de este particular grupo de aves, es que a pesar de su alta movilidad y gran capacidad para volar largas distancias, muchas especies de aves marinas han demostrado estar genética y filogeográficamente estructuradas, aún en ausencia de barreras físicas evidentes (ver Friesen et al. 2007a, b). Estas observaciones llevaron a la busqueda de fuerzas alternativas como potencial explicación para el moldeando las trayectorias evolutivas dentro de este grupo. Ha sido demostrado, que factores inherentes a la ecología de las especies y a sus historias de vida también conocidas como "barreras no-físicas", como ya fue mencionado, tienen gran influencia en las trayectorias evolutivas de la

mayoría de las especies pertenecientes al grupo de las aves marinas (e.g. Burg & Croxall 2004, Steeves et al. 2005, Morris-Pocock et al. 2008).

En este capítulo analizaremos la estructura genética del Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*), la cual es una especie politípica que presenta al menos seis subespecies, definidas en base a diferencias en su patrón de coloración, que conforman lo se conoce como el grupo de los 'cormoranes de ojos azules' (Nelson 2005). En este caso prestaremos atención a dos de estas subespecies: *P. atriceps atriceps* y *P. atriceps albiventer*. A pesar de que no existen estudios taxonómicos profundos que incluyan a todas las subespecies de *P. atriceps,* los autores coinciden en que *P. a. atriceps* y *P. a. albiventer* son endémicas de Patagonia, mientras que el resto de las subespecies son endémicas de diferentes islas distribuidas circumpolarmente en el hemisferio sur (Orta 1992, Nelson 2005). A las subespecies de interés aquí, se las puede observar reproduciendo en simpatría a lo largo de las costas de la Patagonia argentina (Chubut, Santa Cruz, Tierra del Fuego e Islas Malvinas) y chilena (Regiones X, XI y XII) (ver Figura 2.1, capítulo II). La principal diferencia entre ellas radica en su patrón de coloración, según el cual *P. a. atriceps* presenta mejillas blancas y una marcada barra alar blanca, mientras que *P. a. albiventer* presenta mejillas negras y ausencia de la barra alar (Rasmussen 1991, para fotos ver Figura 1.2). Aunque su distribución es prácticamente simpátrica, existe cierto grado de segregación (Rasmussen 1991). Sin embargo, no se ha encontrado ninguna otra fuente de evidencia, además de la coloración, que soporte el rango de subespecie de las mismas, ni la evidencia morfológica (Devillers & Terschuren 1978, Rasmussen 1991), ni la comportamental (Siegel-Causey 1986) ni la molecular (aloenzimas) (Rasmussen 1991). Por lo tanto en este trabajo nos referiremos a *P. a. atriceps* y *P. a. albiventer* con su nombre nominal, *P. atriceps,* o con el nombre común de Cormorán Imperial (Rasmussen 1991, Remsen et al. 2012).

P. atriceps presenta un período reproductivo en el que los individuos se agrupan en colonias para reproducir (Primavera-Verano), y un período post-reproductivo (Otoño-Invierno). En relación a esto último, datos preliminares observacionales y de marcaje-recaptura han demostrado, que tanto adultos como juveniles de esta especie, tienden a abandonar sus colonias durante los periodos post-reproductivos (Punta et al. 2003, Harris et al.2013, Svagelj & Quintana com. pers.), con una tendencia a moverse hacia el norte de su distribución reproductiva, pero sin tener un lugar fijo de invernada (Nelson 2005, Svagelj & Quintana com. pers.) (Figura 2.1, Capitulo II). En base a este comportamiento, se puede catalogar a *P. atriceps* como una especie dispersiva (ver Friesen et al. 2007a). Por otro lado, en lo que respecta a los hábitos de forrajeo, posee un amplio campo de acción en al mar, alejándose considerablemente de sus colonias para la alimentación (Quintana et al. 2011, Harris et al. 2012). Aunque también se ha observado, que los hábitos de forrajeo puede variar dependiendo de la disponibilidad de alimento y de la localización geográfica de la colonia (Sapoznikow & Quintana 2003).

Los estudios de biogeografía previamente realizados en esta especie (Rasmussen 1991, 1994), en los que se utilizó como evidencia molecular aloenzimas, no mostraron diferencias genéticas significativas a lo largo de su distribución. Aunque si se observó cierta variación en cuanto a caracteres morfológicos. Por ejemplo, las poblaciones correspondientes a la X Región de Chile, sobre el Pacífico, mostraron una mayor longitud del culmen que el resto de la distribución. Además, la población de Lago Yehuín mostró tener un tamaño corporal promedio, menor al del resto de sus con-específicos, esta colonia también presentó diferencias en cuanto a sus glándulas nasales, las cuales resultaron significativamente más pequeñas. Según las observaciones realizadas por Rasmussen 1994, *P. atriceps* fue relativamente poco afectada por los numerosos cambios climatológicos que sufrió la región Patagónica durante el

Pleistoceno, producto de numerosos ciclos glaciales y de modificaciones en los niveles del mar (Rabassa & Clapperton 1993, Rabassa et al. 2005 y Ponce et al. 2011). Sin embargo, *P. magellanicus*, que es su especie hermana y presenta una distribución prácticamente solapada a la de *P. atriceps*, presentó diferencias genéticas muy claras entre las colonias de las costa Atlántica, costa Pacífica y región Fueguina (Siegel-Causey 1997, capítulo II de esta tesis).

Las hipótesis iniciales son que esta especie presentará una baja o nula estructura genética, como consecuencia de altos niveles de flujo génico. En caso de existir diferencias genéticas significativas, estas deberían observarse entre (i) costa Atlántica (Chubut y Santa Cruz), región Fueguina (Tierra del Fuego, Estrecho de Magallanes e Islas Malvinas) y costa Pacífica (X Región, incluyendo los Nahuel Huapí y Vintter). (ii) También se espera que esta especie se ajuste a un modelo de flujo génico de *stepping-stone*, siguiendo las líneas de la costa. (iii) Desde el punto de vista filogeográfico se espera una escasa o nula estructura filogeográfica, como consecuencia de altos valores de flujo génico. (iv) Aunque si las subespecies *P. atriceps atriceps* y *P. atriceps albiventer* son entidades biológicas, se espera que formen grupos recíprocamente monofiléticos separados. (v) Finalmente, si la barreras no-físicas son importantes en el moldeado de la estructura genética de las aves marinas se espera, desde el punto de vista comparativo, que *P. atriceps* presente patrones de estructuración genética y filogeográfica más débiles que los observados en *P. magellanicus*.

3.3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.3.1 Muestreo

El esquema de muestreo abarcó gran parte del rango de distribución de esta especie. Las muestras utilizadas fueron de sangre o de músculo pectoral, en ambos casos conservadas en etanol al 96%. Las muestras de sangre se obtuvieron de la vena yugular de individuos

adultos, muestreándose un individuo por nido para evitar muestrear parientes. Los individuos muestreados fueron marcados temporalmente con tinta para evitar ser re-muestreados. Las muestras de sangre obtenidas se encuentran preservadas en la colección de tejidos de la División de Ornitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN-Or-ct). Las muestras de músculo fueron cedidas en préstamo por el museo de Historia Natural de Kansas (KUNHM), y el Museo Americano de Historia Natural (AMNH). Las muestras prestadas por el KUNHM fueron también utilizadas para un trabajo de biogeografía que involucró análisis genéticos (Rasmussen 1991, 1994). En el Apéndice 1.b se muestra un detalle de todas las muestras utilizadas.

3.3.2 Extracción de ADN y genotipificación

Las extracciones de ADN fueron realizas siguiendo el método propuesto por Ivanova et al. (2006), adaptado para columnas individuales (Epoch Life Sciences, Missouri City, TX, USA). Se amplificaron con éxito 12 microsatélites: PcT1, PcD2, PcT3, PcT4, PcD5, PcD6 (originalmente desarrollados para *Phalacrocorax carbo* por Piertney et al. 1998); y Cor01, Cor05, CoR06, Cor30, Cor43 and Cor45 (originalmente desarrollados para *Phalacrocorax auritus* por Fike et al. 2009). A pesar de que todos los marcadores fueron correctamente amplificados, algunos de ellos fueron descartados para los análisis posteriores por diferentes motivos. PcT1 fue descartado debido a que cada individuo presentó alelos diferentes, tornándose no informativo por no poder identificar con certeza los alelos para éste locus. Además un grupo de marcadores fue descartado por no presentar ningún tipo de variación entre individuos (i.e. monomórficos): Cor01, Cor30 and Cor45. En total 172 individuos fueron genotipificados para ocho microsatélites. En la Tabla 3.1 se muestra la cantidad de individuos genotipificados por colonia, y un detalle de las localidades muestreadas. Las

condiciones de las reacciones de PCR y de genotipificación fueron idénticas a las descriptas en la sección 2.3.2 del capítulo II.

Tabla 3.1. Detalles de las localidades muestreadas para *P. atriceps*. El *n* (tamaño muestral) hace referencia al número de individuos analizados para cada tipo de marcador en cada colonia.

Grupo	Provincia	Localidad	Abrev.	Lat.	Long.	*n* microsats	*n* ATP*ase*
Costa Atlántica	Chubut	Punta León	PL	43.03	64.28	15	10
	Chubut	Roca Malaspina	RM	45.18	66.51	16	10
	Chubut	Puerto Melo	PM	45.05	65.84	8	-
	Chubut	Isla Arce	IA	45.00	65.50	14	-
	Santa Cruz	Isla Chata	CH	47.93	65.73	10	6
	Santa Cruz	Bahía Oso Marino	BO	47.91	65.78	8	-
	Santa Cruz	Roca Foca	RF	47.73	65.83	9	-
	Santa Cruz	Pico Quebrado	PQ	50.25	68.63	9	8
	Santa Cruz	Monte León	ML	50.33	68.86	5	-
	Is. Malvinas	Is. Lively	IM	52.02	58.46	2	2
	Is. Malvinas	Is. Nueva	IM	51.71	61.28	9	6
Región Fueguina	Tierra del Fuego	Isla Becasses	BE	54.95	67.00	11	11
	XII Región	Isla Navarino	IN	54.93	67.65	7	-
	Tierra del Fuego	Isla Bridges	IB	54.86	68.23	6	-
	Tierra del Fuego	Lago Yehuín	YE	54.41	67.70	14	12
	XII Región	Punta Arenas	EM	52.47	69.57	3	3
Costa Pacífica	X Región	Llanquihue	LL	41.80	76.66	15	11
	Chubut	Lago Vintter	LV	43.93	71.60	4	4
	Rio Negro	Lago Nahuel Huapí	NH	40.98	71.50	7	7

3.3.3 Amplificación del ADN mitocondrial

Se obtuvieron secuencias parciales (657 pares de base) de las subunidades seis y ocho del gen de la ATP sintetasa (ATP*asa*). Se secuenciaron 90 individuos, el detalle de la cantidad de individuos secuenciados se puede ver también en la Tabla 3.1. Este marcador ha sido ampliamente utilizado en estudios genéticos dentro de la familia Phalacrocoracidae (e.g. Kennedy et al. 2000). Los *primers* utilizados y las condiciones (i.e. cócteles y temperaturas) de las reacciones de PCR y secuenciación son idénticos a los descriptos en la sección 2.3.3 del capítulo II.

3.3.4 Variación genética de microsatélites

Se realizaron tests para evaluar la existencia de desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), también se estimó la heterocigosidad observada (Ho), la heterocigosidad esperada (He) y el número de alelos; utilizando el programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer 2010); esto se realizó para cada locus, y debido al bajo *n* muestral de algunas colonias, se realizó al nivel cada cluster obtenido con STRUCTURE, sobre todo para tener mas poder estadístico. La frecuencia de alelos nulos fue estimada con el programa FREENA (Chapuis & Stoup 2007). Algunas colonias presentaron tamaños de muestreo muy bajos (< 4) como Punta Arenas, éstas fueron incluidas como unidades discretas y separadas dependiendo el análisis, por tratarse de localidades clave para la distribución de la especie, no obstante los valores de significancia para estos casos deben ser considerados con precaución. En relación a esto, las muestras de las dos colonias de Islas Malvinas (Isla Liveley e Isla Nueva), fueron unificadas y analizadas como una única localidad (Islas Malvinas, IM). Se evaluó el desequilibrio de ligamiento entre los marcadores utilizados y se estimo el coeficiente de endogamia (F_{is}), para cada colonia, empleando GENEPOP v4.0 (Rousset 2009). El programa GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006) fue utilizado para obtener el número de alelos privados de cada colonia. Los niveles de significancia fueron ajustados para múltiples comparaciones con el método de Benjamini- Yekuteli (Benajamini & Yekuteli 2001) modificado para el descubrimiento de tasa de falsos (B-Y FDR). El método fue aplicado siguiendo las recomendaciones de Narum (2006). ADZE (Szpiech et al. 2008) fue utilizado para cuantificar la riqueza alélica estandarizando los tamaños muestréales, estos valores estandarizados se simbolizan con la letra '*g*'.

3.3.5 Diferenciación poblacional

Utilizamos métodos de análisis de agrupamiento Bayesianos para estimar el número más probable de clusters genéticos (*K*) subyacentes a nuestra especie de interés. Para esto empleamos dos programas diferentes: BAPS v5.3 (Coreander et al. 2008), y STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003). Para más detalles de estas metodologías ver sección 2.3.5 del capítulo II. Las corridas de análisis llevadas a cabo en BAPS asumieron un valor de K_{max} = 20, bajo el modo: *mixture analysis*, *spatial clustering of groups of individuals*. Las corridas analíticas de STRUCTURE fueron realizadas en el modo: *admixture analysis*, usando las localidades de muestreo como *priors* (Hubisz et al. 2009) y asumiendo que las frecuencias alélicas se encuentran correlacionadas (recomendado por Falush et al. 2003). Se realizaron corridas preliminares cortas, testeando valores de K = 1 hasta 18 (número de colonias muestreadas), los valores de $K > 10$ mostraron muy baja probabilidad a *posteriori*. Los resultados finales se obtuvieron luego de realizar 20 corridas independientes, evaluando desde K = 1 a K = 9; cada corrida consistió de 100,000 ciclos *burn-in* y 300,000 ciclos de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC). La aplicación disponible *on-line* STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012) fue utilizada para detectar el número de clusters más probable por medio del método de Evanno (ΔK). La probabilidad de cada individuo de pertenecer a un cluster (i.e. valores-Q) de las 20 corridas, para las particiones desde K = 2 a K = 5, fueron promediadas usando CLUMPP v1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) y editadas como imágenes con el programa DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004).

Se obtuvieron los estimadores tradicionales de diferenciación poblacional a nivel global y en comparaciones pareadas entre colonias F_{st} (Weir & Cockerman 1984) y R_{st} (Slatkin 1995), los mismos fueron estimados con MSATANALYZER (Dieringer et al. 2003) y RSTCALC (Goodman 1997) respectivamente (descartándose colonis con $n < 7$ para las

comparaciones pareadas). Los valores de *p* fueron obtenidos en ambos casos utilizando 10,000 permutaciones, y corregidos para múltiples comparaciones con el método BY-FDR (ver sección 2.3.5 para más detalles metodológicos sobre estos estimadores). También se obtuvo D_{est}, el cual es un estimador relativo de la diferenciación poblacional, que permite escalar por tamaño muestral y número total de alelos (Jost 2008), para eso se utilizó la aplicación on-line SMOGD (Crawford 2010). Los valores pareados de F_{st} fueron utilizados para construir árboles de UPGMA y neighbor-joining (NJ), utilizando PHYLIP 3.6 (Felsenstein 2005). Las AMOVAs jerárquicas fueron realizadas con ARLEQUIN v3.5, en particular estimamos el valor de F_{ct} (ver sección 2.3.5 del capítulo II para más detalle). Se buscaron diferencias significativas entre los grupos: costa Atlántica (AC), región Fueguina (FR), y la costa Pacífica (PC), ver Tabla 1 para ver a qué grupo corresponde cada colonia. Las colonias Lagos Vintter y Nahuel Huapí fueron incluidas en la Costa Pacífica por proximidad geográfica. La colonia de Isla Navarino no fue utilizada en las AMOVAs debido a que presentó muchos datos faltantes.

Se realizaron tests de Mantel con el programa GENALEX v6, con el fin de evaluar la existencia de aislamiento por distancia (ver sección 2.3.5 para mas detalles). Los valores de significancia para estos test fueron obtenidos luego de 10,000 permutaciones. Para estos análisis se implementaron dos aproximaciones diferentes: (i) considerando distancias Euclidianas entre colonias, y (ii) corrigiendo la distancia entre las colonias como si estas estuviesen distribuidas a lo largo de una línea recta. El contraste de los resultados obtenidos para cada una de estas aproximaciones, permitirá evaluar el rol de la masa continental que separa a los océanos Atlántico y Pacífico como barrera física (geográfica) para el flujo génico.

3.3.6 Historia demográfica. Modelo e intensidad del flujo génico

Se evaluó la ocurrencia de reducciones en el tamaño poblacional efectivo con el programa BOTTLENECK v1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996) (para más detalle ver sección 2.3.6). Este test fue realizado sobre cada uno de los clusters diagnosticados por STRUCTURE: Costa Atlántica (C1), Región Fueguina (C2), Lago Yehuín (C3) y Costa Pacífica (C4). Estos clusters también se utilizaron para determinar el modelo de flujo génico y las tasas de migración reciente. Para una referencia gráfica de los clusters ver la Figura 3.1.

Se utilizó una aproximación de modelado basado en simulaciones coalescentes, para evaluar el ajuste de nuestros datos de microsatélites a los diferentes modelos de flujo génico. Los modelos evaluados fueron: (i) un modelo en el que el flujo génico ocurre entre poblaciones adyacentes siguiendo las costas, acorde al modelo de *stepping-stone* (Kimura & Weis 1964) sin asumir migración trans-continental, (ii) un modelo en el cual el flujo génico ocurre en una forma de tipo-n-islas (Wright 1942) entre todas las poblaciones, y (iii) también se evaluó la posibilidad de panmixia, haciendo colapsar todas las poblaciones en una única población en la primera generación. La Figura 3.5 muestra una representación esquemática de todos los modelos evaluados. El resto de los detalles de esta metodología fueron idénticos a los descriptos en la sección 2.3.6, con dos salvedades. La primera es que aquí se evaluó un modelo de 3 poblaciones, no incluyéndose a las colonias de agua dulce (i.e. Lagos Yehuín, Nahuel Huapí y Vintter) en los análisis; y la segunda es que el marcador PcD6 no fue utilizado en estos análisis, dado que el mismo rechazó todos los modelos por igual, disminuyendo las probabilidades finales para cada modelo.

Se utilizó el método Bayesiano multilocus implementado en BAYESASS v3.0 (Wilson & Rannala 2003) para estimar las tasas de migración reciente (*m*) entre nuestras poblaciones (i.e. clusters obtenidos con STRUCTURE). Las consideraciones de esta

metodología y los parámetros utilizados para los análisis fueron idénticos a los descriptos en la sección 2.3.6. Con la diferencia de que aquí se realizaron dos análisis por separado, uno incluyendo a las colonias de agua dulce y otro excluyéndolas; por lo tanto el primero de estos análisis contó con cuatro poblaciones y el segundo con tres poblaciones.

3.3.7 Análisis de ADN mitocondrial

Se empleó DNAsp v4.5.3 (Rozas et al. 2003) para obtener las medidas estándar de diversidad genética. También se realizaron AMOVAs jerárquicas con ARLEQUIN v3.5 (Excoffier et al. 2005), con las mismas agrupaciones utilizadas para los análisis de microsatélites. Se obtuvo el parámetro Φ_{ct}, comparable con el parámetro F_{ct} previamente descripto (sección 2.3.5), y las distancias pareadas Φ_{st} entre colonias, corrigiendo las distancias con el modelo de sustitución de Kimura 2 Parámetros (K2P). Estas distancias genéticas fueron también utilizadas para realizar test de Mantel y para construir árboles de neighbor-joining (NJ), de la mima forma que se llevó a cabo con los microsatélites. NETWORK v4.6.1 (http://www.fluxus-engineering.com) fue utilizado para obtener redes de haplotípos bajo la aproximación de *median-joining* (MJ) (Bandelt et al. 1999). El modelo de evolución al cual se ajustaron nuestras secuencias fue determinado empleando JMODELTEST v0.1.1 (Posada 2008), utilizando el Criterio de Información Bayesiana (BIC). Se construyeron árboles de *maximum-likelihood* (ML) utilizando PHYML (Guidon & Gascuel 2003), el soporte para los nodos se obtuvo con 100 pseudoreplicas de *bootstrap*. Se utilizaron como outgroups dos secuencias de Cormorán Imperial obtenidas para éste trabajo.

3.4 RESULTADOS

3.4.1 Desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética de microsatélites

Un solo locus se desvió significativamente del equilibrio de Hardy-Weinberg, luego de realizar las correcciones para comparaciones múltiples (BY FDR), fue el Cor43 en la costa Pacífica (Apéndice 2.b). En esta especie el locus PcD6 presentó únicamente dos alelos, uno muy común a nivel global (i.e. 190), y el otro más raro (i.e. 192) (ver Tabla 3.3). Decidimos incluir a éste locus en la mayoría de los análisis, debido a que algunas colonias presentaron alta frecuencia del alelo raro (i.e. Lago Yehuín y Llanquihue), aunque en la mayoría de las colonias este resultó ser monomórfico. La riqueza alélica, por colonia, de *P. atriceps* fue mayor a la observada en *P. magellanicus*, fue desde 2.96 hasta 4.25, con un promedio por colonia de 3.61 (Tabla 3.2). Los valores más altos de riqueza alélicas y de heterocigosis esperada se observaron en la colonias de Islas Malvinas e Isla Becasses (Tabla 3.2), este patrón se mantuvo aún luego de realizar el análisis estandarizando de los tamaños muéstrales (g = 20). La frecuencia de alelos nulos promedio fue estimada en < 4% para todos los loci analizados, y el número de alelos observados por locus fue de 2 a 21. La Tabla 3.3 muestra el detalle de la diversidad genética por locus.

Tabla 3.2. Diversidad genética por colonia. Incluyendo microsatélites y ADN mitocondrial. Número de individuos analizados por colonia (*n*), valores promedio por colonia de heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), número de alelos (*Na*) y riqueza alélica (*R*). Número de alelos privados (*Pa*), y coeficiente de endogamia (*Fis*), valores en negrita indican un déficit significativo de heterocigotos al 0.05 luego de ser corregido por B-Y FDR. Diversidad haplotípica (*Hd*) y diversidad nucleotídica (π).

	Diversidad de Microsatelélites							Diversidad de ADNmt		
	n	*Ho*	*He*	*Na*	*R*	*Pa*	*Fis*	*n*	*π*	*Hd*
PL	15	0.73	0.72	6.86	3.55	0	-0.015	10	0.0021	0.71
RM	16	0.77	0.79	7.57	3.86	1	0.029	10	0.0009	0.2
PM	8	0.76	0.78	6.14	3.88	0	0.028	-	-	-
IA	14	0.67	0.76	6.71	3.69	2	0.111	-	-	-
IC	10	0.71	0.73	6.57	3.66	3	0.023	6	0.0023	0.73
BO	8	0.80	0.74	6.14	3.72	0	-0.088	-	-	-
RF	9	0.62	0.72	6.29	3.58	0	**0.143**	-	-	-
PQ	9	0.65	0.71	5.57	3.48	0	0.083	8	0.0024	0.75
ML	5	0.73	0.70	4.14	3.33	0	-0.039	-	-	-
BE	11	0.69	0.80	7.86	4.06	2	**0.15**	11	0.0005	0.32
NA	7	0.68	0.77	6.00	3.88	0	0.133	-	-	-
BR	6	0.69	0.69	5.13	3.54	1	0.009	-	-	-
IM	12	0.87	0.84	8.57	4.25	2	-0.03	8	0.0003	0.25
YE	14	0.55	0.61	5.50	2.96	3	0.088	12	0	0
EM	3	0.76	0.70	3.43	3.43	0	-0.103	3	0.002	0.66
LL	15	0.68	0.71	7.13	3.60	1	0.041	11	0	0
LV	4	0.75	0.73	4.00	3.52	1	-0.033	4	0	0
NH	7	0.73	0.68	4.25	3.12	0	-0.086	7	0.0017	0.57

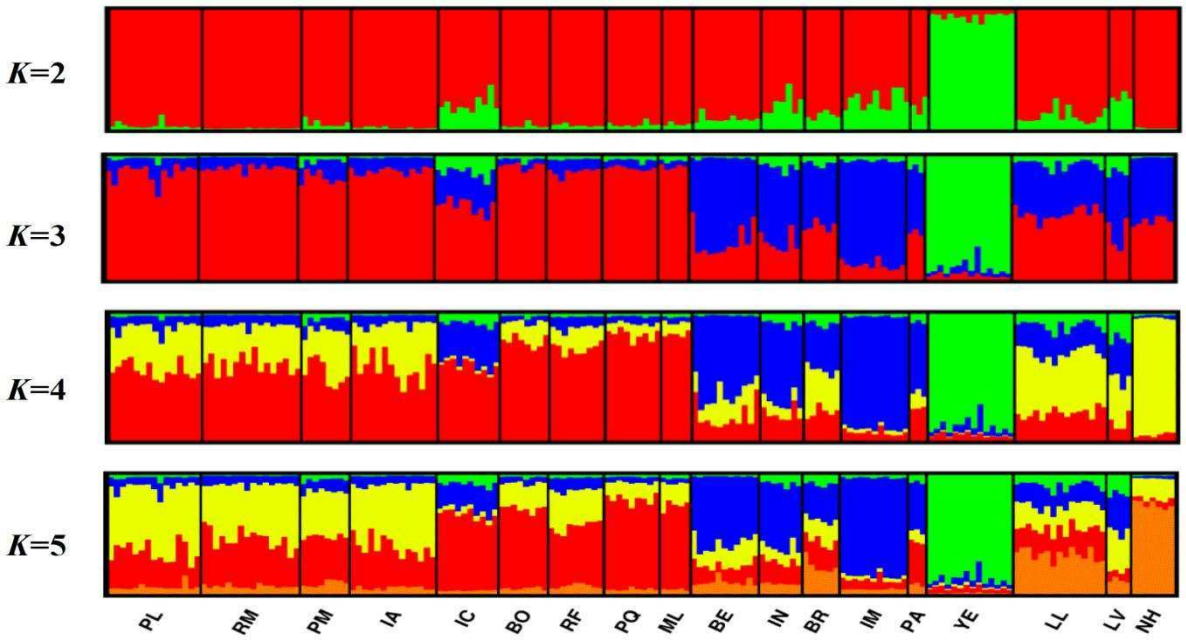
Tabla 3.3. Diversidad genética por locus. Heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), número de alelos (*Na*) y frecuencia de alelos nulos (*Fo*).

Locus	Fuente	Rango de tamaño	Long. de rep.	*Na*	*Ho*	*He*	*Fo*
PcD2	Piertney et al. (1998)	204-226	2	12	0.78	0.86	0.048
PcD3	Piertney et al. (1998)	208-260	4	16	0.80	0.85	0.027
PcT4	Piertney et al. (1998)	214-278	4	17	0.86	0.91	0.027
PcD5	Piertney et al. (1998)	209-223	2	8	0.41	0.46	0.058
PcD6	Piertney et al. (1998)	190-192	2	2	0.03	0.06	0.277
Cor05	Fike et al. (2009)	253-305	4	21	0.87	0.91	0.022
Cor06	Fike et al. (2009)	149-187	4	12	0.77	0.80	0.019
Cor43	Fike et al. (2009)	389-407	2	9	0.59	0.68	0.081

3.4.2 Diferenciación poblacional

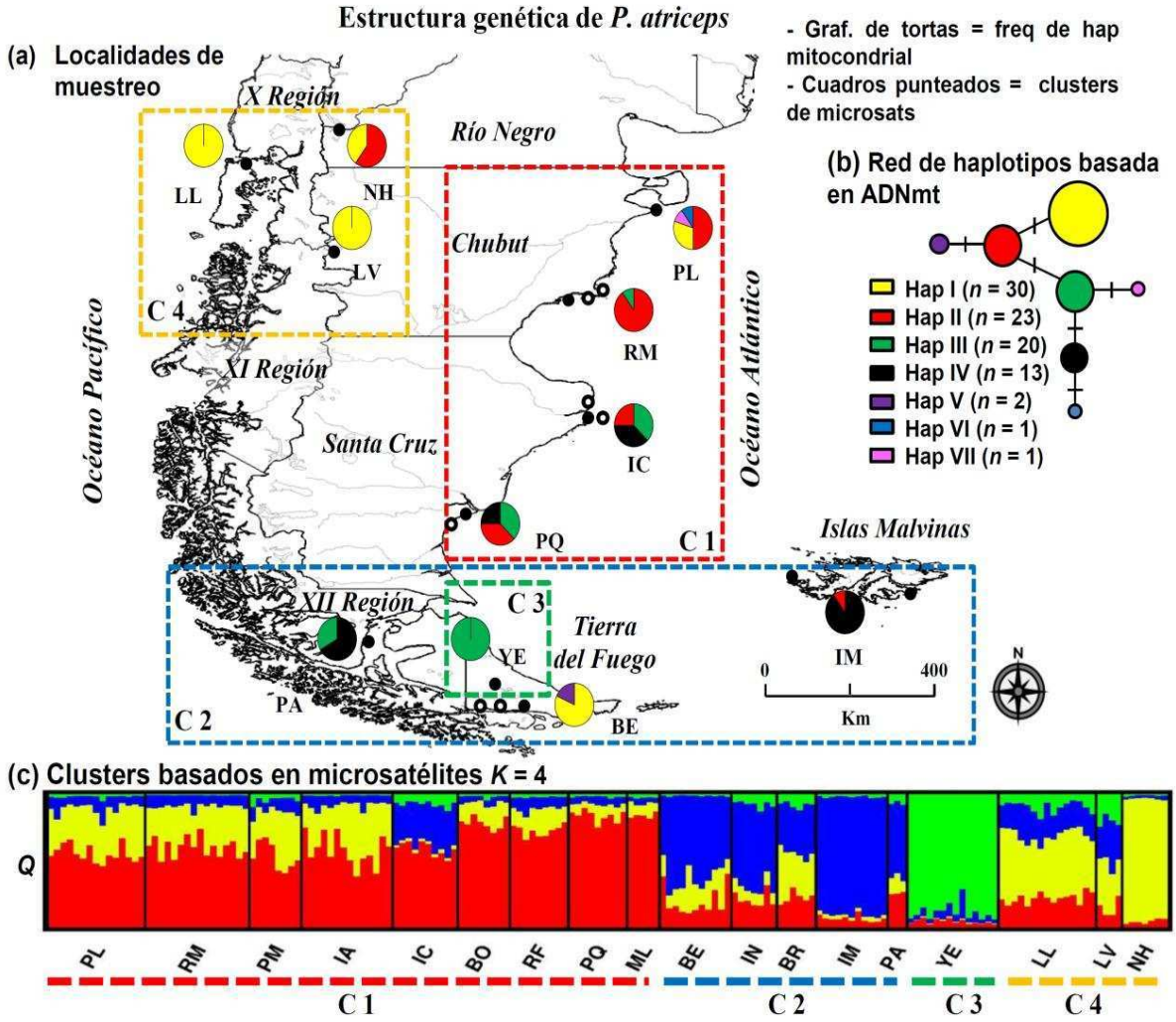
Los análisis de agrupamiento Bayesiano resultaron algo ambiguos, al igual que lo observado para *P. magellanicus*. El programa BAPS sugirió que la partición óptima es de K = 2, separando únicamente a la colonia de Lago Yehuín del resto (Apéndice 3.b). STRUCTURE también mostró cierta ambigüedad entre ΔK y Ln Pr(X | K), el primero de estos mostró una distribución bimodal con picos en 2 y 4, mientras que Ln Pr(X | K) soportó a K = 4 (ver Apéndice 4.b). En la Figura 3.1 se muestran todas las particiones de STRUCTURE desde K = 2 a 5. Cuando las colonias ubicadas en lagos fueron excluidas de los análisis, BAPS soportó un valor de K = 1 y STRUCTURE mostró un valor de K = 2, respaldado tanto por ΔK como por Ln Pr(X | K), en el que un cluster estuvo formado por las colonias de la costa Atlántica y el otro estuvo constituido por las colonias de la región Fueguina y costa Pacífica. En la Figura 3.2c, se muestra el resultado de STRUCTURE para un valor de K = 4, incluyendo todas las colonias muestreadas, ya que esta partición estuvo respaldad por ΔK y Ln Pr(X | K). Los valores promedio de Q (i.e. probabilidad de un individuo de pertenecer a un cluster) para estos cuatro clusters fueron: Cluster 1= 0.67, incluyendo todas las colonias de la costa Atlántica; Cluster 2 = 0.60, agrupó todas las colonias de la región Fueguina; Cluster 3 = 0.88, incluyó solo a la colonia de Lago Yehuín y Cluster 4 = 0.57, agrupó a las colonias de la costa Pacífica. La mayoría de estos clusters presentaron altos niveles de admixture, excepto por el cluster 3.

Figura 3.1. Particiones de STRUCTURE desde *K* = 2 a 5



Los clusters obtenidos fueron testeados con AMOVAs, la proporción de la varianza explicada por diferencias entre los grupos testeados, es decir costa Atlántica, costa Pacífica y región Fueguina, incluyendo las colonias de agua dulce fue, F_{ct} = 0.046 (p < 0.01) y el F_{st} global fue 0.047 (p < 0.01); cuando las colonias de agua dulce fueron excluidas F_{ct} fue de 0.021 (p < 0.01) y el F_{st} global disminuyó a 0.012 (p = 0.24).

Figura 3.2. Resumen de la estructura genética de *P. atriceps*. a) Localidades muestreadas. Los círculos rellenos (negros) indican las localidades analizadas para microsatélites y ADNmt, y los círculos vacios indican colonias analizadas solo para microsatélites. b) Red de haplotípos mitocondriales obtenida con NETWORK, y la frecuencia de cada haplotípo. Los gráficos de torta indican la proporción de cada haplotípo encontrado en cada colonia. c) Bar-plot de STRUCTURE *K* = 4. Los cuadros punteados sobre el mapa representan a cada cluster obtenido.



Los estimadores clásicos de diferenciación poblacional, de F_{st} y R_{st} fueron de 0.048 ($P < 0.01$) and 0.06 ($P < 0.01$) respectivamente. El valor global de D_{est} fue de 0.108 (Stand. err. 0.002, 95% CI: 0.01 – 0.14). Cuando las colonias de agua dulce fueron excluidas del análisis

todos estos valores disminuyeron prácticamente a la mitad. La Tabla 3.4 muestra, de forma comparativa, todos los valores de los estimadores de diferenciación poblacional global obtenidos para *P. atriceps* con y sin lagos, y para *P. magellanicus*.

Tabla 3.4. Valores globales de estimadores de diferenciación genética poblacional de *P. magellanicus* y *P. atriceps.* Para esta última se muestran los tratamientos con y sin colonias de agua dulce

	Estimadores de diferenciación poblacional						
	Agrupamiento Bayesiano			Estimadores Clásicos			
Especies	- log ‡ (BAPS)	Δ *K* ‡ (STRUCTURE)	Ln *Pr*(X | K) ‡ (STRUCTURE)	F_{st} ‡	R_{st} ‡	D_{est} ‡	Φ_{st} †
P. magellanicus	5	2 / 4	4	**0.10**	**0.14**	0.112	**0.92**
P. atriceps	2	2 / 4	4	**0.048**	**0.06**	0.108	**0.56**
P. atriceps (sin lagos)	1	2	2	**0.024**	**0.031**	0.05	**0.49**

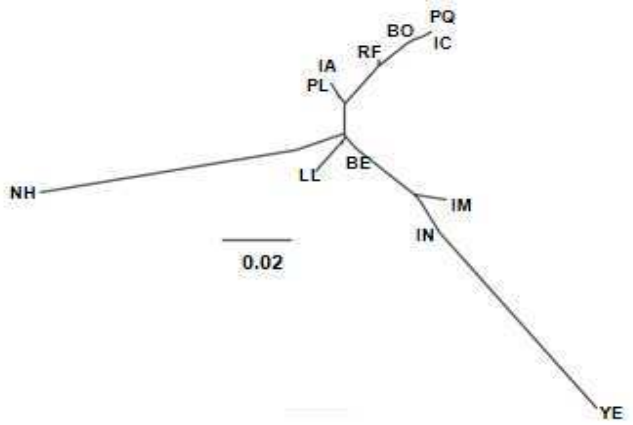
‡ Basados en microsatélites. † Basados en ADNmt.

Los métodos de agrupamiento Bayesiano muestran la partición óptima obtenida con cada método

Los valores en negrita indican significancia al nivel de $P < 0.001$

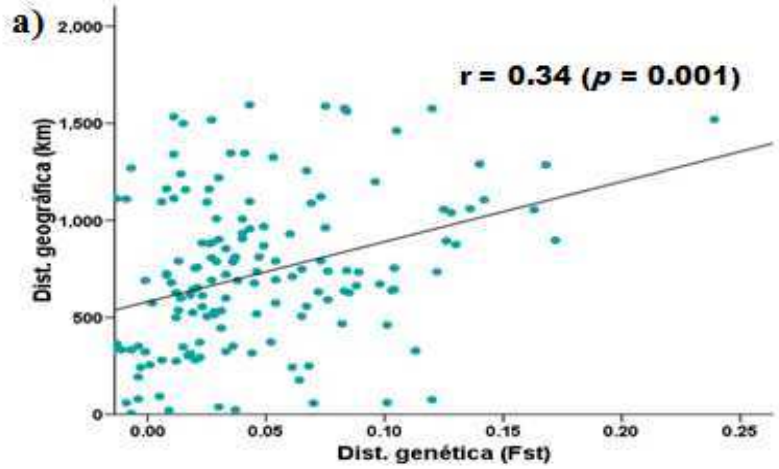
Los valores de las comparaciones pareadas de F_{st} fueron desde 0 a 0.24 los de R_{st} fueron de 0 a 0.20. Tanto en *P. atriceps* como en *P. magellanicus* se observó que un mayor número de valores de R_{st} fueron no significativos en comparación con F_{st}, luego de realizar las correcciones por comparaciones múltiples B-Y FDR (Apéndice 5.b). Esto no es del todo sorprendente, debido a que Balloux & Goudet (2002) demostraron que F_{st} es mejor estimador de la diferenciación poblacional que $R_{st,}$ sobre todo en aquellos casos en los que se cuenta con bajos tamaños muestrales y cuando la diferenciación poblacional es moderada. El árbol no-enraizado de neighbor-joining basado en distancias de F_{st} muestra la clara diferenciación de las colonias de agua dulce, Nahuel Huapí y Yehuín (Figura 3.3).

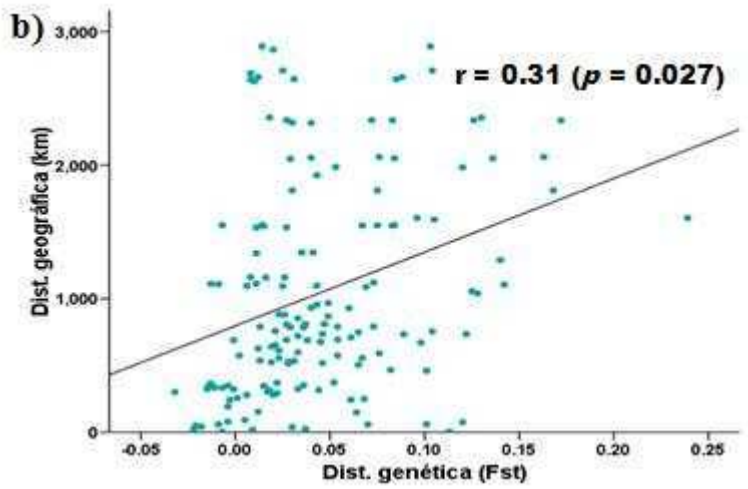
Figura 3.3. Árbol no-enraizado de neighbor-joining basado en distancias de F_{st}



Los test de Mantel arrojaron evidencia de aislamiento por distancia en esta especie. Sin embargo, no se observó ningún efecto de la masa continental sobre el grado de diferenciación genética. Debido a que los valores de las correlaciones fueron muy similares, tanto cuando se utilizaron las distancias geográfica Euclidianas entre colonias: r = 0.34 (p = 0.001); como cuando se utilizaron las distancias corregidas, suponiendo que las colonias se distribuyen en línea recta a lo largo de la costa: r = 0.31 (p = 0.027) (Figura 3.4).

Figura 3.4. Mantel test, mostrando la correlación entre las matrices de distancia geográfica (Km) y distancia genética (Fst). a) Utilizando una matriz de distancias geográficas euclidianas. b) Utilizando una matriz de distancias geográficas corregidas.





3.4.3 Historia demográfica y flujo génico basado en microsatélites

No se encontró evidencia de que ninguna de las unidades demográficas consideradas aquí (i.e. clusters obtenidos con STRUCTURE) haya sufrido un cuello de botella reciente, el test de Wilcoxon resultó en todos los casos en valores de $p > 0.05$.

Esta especie se ajustó con mayor probabilidad, al modelo de flujo génico de tipo-n-islas (M1) (Figura 3.5). El modelo de *stepping-stone* (M2) quedó en segundo lugar, y el modelo con menor probabilidad resultó ser el de panmixia (M3). El hecho de que el modelo de flujo génico con mayor probabilidad haya sido el de tipo-n-islas, implica que el flujo génico a través de la masa continental y por sobre los Andes ocurre, y en tasas mayores a las esperadas previamente. Evidencia de esto también fue encontrada en *P. magellanicus*.

Las tasa de migración (*m*) promedio, cuando las colonias de agua dulce fueron excluidas de los análisis, resulto ser: 0.105 (CI 95% 0.07 – 0.14), con valores que fueron desde 0.0058 (CI 95% -0.0053 – 0.016) a 0.287 (CI 95% 0.238 – 0.337); y cuando las colonias de agua dulce fueron incluidas la tasa de migración promedio disminuyó a 0.056 (CI 95% 0.021 – 0.091). Esto último se debió principalmente, a las bajas tasas de migración que la colonia de Lago Yehuín mostró con el resto de las poblaciones. Se consideraron a los

resultados sin las colonias de agua dulce como más representativas de la población global de *P. atriceps*, son estos resultados lo que se muestran en la Figura 3.6, y son los que usaremos para realizar las comparaciones con *P. magellanicus* (cabe recordar que ésta última no presenta colonias de agua dulce). A pesar de la diferencia en magnitud de *m* entre éstas dos especies, ambas mostraron dos patrones de fuente-sumidero en común: (i) La costa Pacífica actuaría como fuente de la costa Atlántica, y (ii) la región Fueguina actuaría como fuente de las costas Atlántica y Pacífica (ver Figura 2.7 del capítulo II y Figura 3.6).

Figura 3.5. Modelos de flujo génico testeados. Debajo de cada modelo se observa la probabilidad final (P) obtenida para cada modelo. Los colores representan los clusters obtenidos con STRUCTURE, las flechas indican las conexiones de flujo génico. M1es el modelo de tipo-n-islas. M2 es el modelo de *stepping-stone* y M3 es el modelo de Panmixia. El rectángulo rojo indica el modelo más probable.

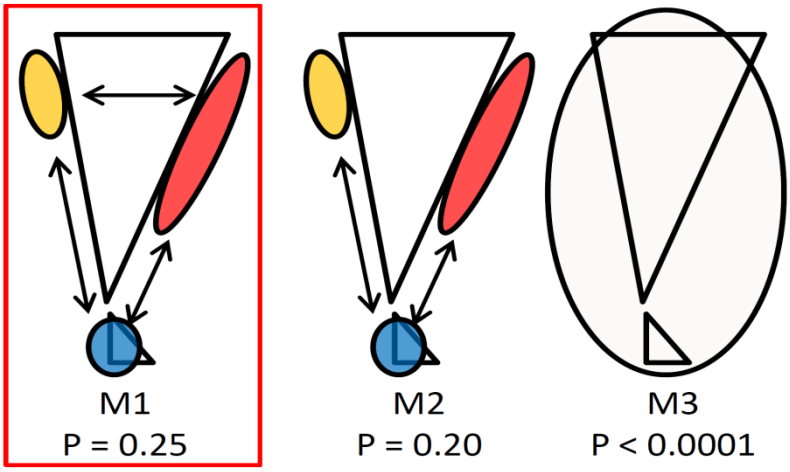
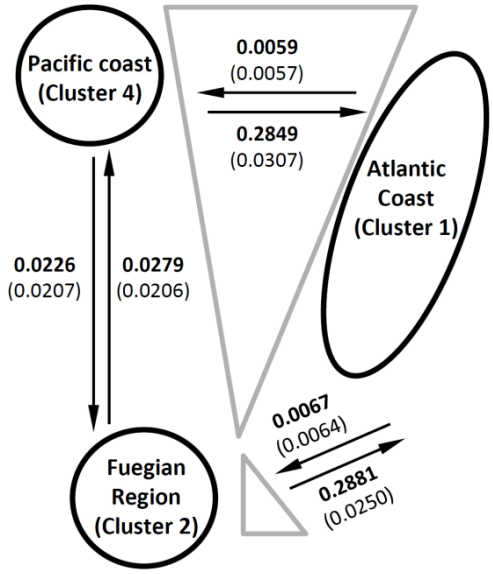


Figura 3.6. Tasas de migración (*m*) obtenidas con BAYESASS. En gris claro se observa una representación esquemática de Patagonia. Los círculos representan las 3 poblaciones y las flechas la dirección del flujo génico. Los valores en negrita corresponden a valor medio de flujo génico y entre paréntesis, debajo de cada valor se muestra su desvió estándar (SD).



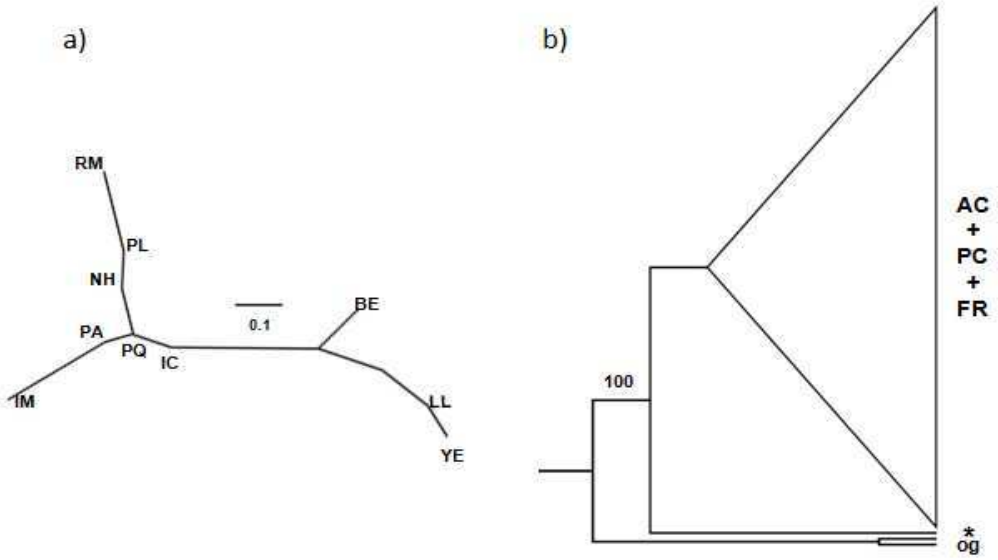
3.4.4 Resultados de los análisis de ADN mitocondrial

Se observó un bajo nivel de variación genética para este marcador. Esto mismo ha sido previamente reportado en otros estudios en los que se analizaron miembros de la familia Phalacrocoracidae a nivel intraespecífico, en los cuales se analizaron genes de ADNmt codificantes para proteínas (e.g. Waits et al. 2003, Barlow et al. 2011).

Se encontraron 7 haplotípos, todos ellos defirieron en un solo paso mutacional entre sí (transiciones). La diversidad haplotípicas total (Hd) fue 0.76 y la variación nucleotídica total (π) fue 0.002. Las colonias que mostraron la mayor diversidad haplotípicas fueron Punta León (0.71), Isla Chata (0.73) y Pico Quebrado (0.75). La colonia de Punta León presentó dos haplotípos exclusicvos, y la colonia de Isla Becasses también presentó dos haplotípos no observados en otras colonias. Los resultados de las AMOVAs indicaron que una proporción

significativa de la varianza genética puede ser explicada por diferencias observadas entre la costa Atlántica, región Fueguina y costa Pacífica $\Phi_{ct} = 0.26$ ($p < 0.05$) y $\Phi_{st} = 0.56$ ($p < 0.01$), cuando las colonias de agua dulce fueron excluidas del análisis: $\Phi_{ct} = 0.28$ ($p = 0.06$) y $\Phi_{st} = 0.49$ ($p < 0.01$). Es importante mencionar que de Φ_{ct} mas altos se obtuvieron cuando las colonias de Islas Malvinas fueron incluidas en la costa Atlántica, y no en la región Fueguina, como se observó en los agrupamientos basados en microsatélites. Los test de Mantel para este marcador no mostraron relaciones significativas entre las matrices de distancia geográfica y genética, ni cuando se utilizaron las distancias geográficas Euclidianas, ni las corregidas, r = 0.019 ($p = 0.09$) and r = 0.061 ($p = 0.35$), respectivamente. Tampoco las redes de haplotípos obtenidas por median-joining (Figura 3.2b) ni los árboles de maximum-likelihood, mostraron alguna evidencia de estructura filogeográfica en esta especie; como así tampoco los arboles de neighbor-joining obtenidos a partir de las distancias de Φ_{st} entre pares de colonias (figura 3.8b). En los árboles de maximum-likelihood los haplotípos de las Costa Atlántica, Región Fueguina y Costa Pacífica aparecieron como una politomia no resuelta, solo un haplotípo de la colonia de Punta de León difirió del resto (Figura 3.8a). Todo esto resultó bastante diferente a lo observado en su especie hermana *P. magellanicus*, en la cual encontramos claras evidencias de estructuración filogeográfica (sección 2.4.4 del capítulo II).

Figura 3.7. a) Árbol de Neighbor-joining representando las distancias de Φ_{st} entre pares de colonias. b) Árbol de Maximum-likelihood mostrando la relación entre los haplotípos de la costa Atlántica (CA), región Fueguina (RF) y costa Pacífica (CP). El asterisco (*) indica un haplotípo único de Punta León y el outgroup se indica con (og).



3.5 DISCUSIÓN

3.5.1 Estructuración genética y flujo génico en *P. atriceps.* Aspectos en común con *P. magellanicus*

Se esperába encontrar una débil o nula estructuración genética. En caso de haber diferencias genéticas significativas, esperábamos encontrarlas entre las colonias de la costa Atlántica (CA), región Fueguina (RF) y costa Pacífica (CP). En cuanto al modelo de flujo génico, esperábamos que se ajuste a un modelo de *stepping-stone*, siguiendo las líneas de la costa, sin esperar encontrar evidencia de flujo génico a través de la extensión de masa continental que separa las costas Atlántica y Pacífica.

Conforme a lo esperado se encontró una débil estructuración genética en *P. atriceps*, sobre todo si se compara con su especies hermana *P. magellanicus* (discutido más abajo). Sin

embargo, se encontró evidencia de la existencia de los tres grupos genéticos hipotetizados, ya que se encontraron diferencias significativas coincidentes con las tres mencionadas regiones geográficas, esto fue respaldado por los análisis de AMOVAs y por los agrupamiento Bayesianos (Figura 3.2c).

Con respecto al modelo de flujo génico al que se ajusta *P. atriceps*, a pesar de que los datos de microsatélites mostraron evidencia de aislamiento por distancia, lo cual sería evidencia de que esta especie se ajusta a un modelo de *stepping-stone*, según el cual la conexión entre colonias ocurriría siguiendo la línea de las costas marinas. Por otro lado, y en sentido opuesto, otros resultados obtenidos, tanto de microsatélites como de ADNmt, sugieren que *P. atriceps* sigue un modelo de flujo génico de tipo-n-islas, en el que todas las poblaciones pueden intercambiar migrantes entre sí sin mayores restricciones. Esto implica que el flujo génico entre las colonias de la costa Atlántica y Pacifica podria ocurrir de forma directa.

La mencionada estructura genética global, en la que la que se pueden distinguir tres regiones: CA, CP y RF, fue observada tanto en *P. atriceps* como en *P. magellanicus*, con algunas salvedades para cada una. Un punto en común en cuanto a estas salvedades, fue el relacionado con las colonias de las Islas Malvinas, las cuales en ambos casos fueron agrupadas con la CA en base a los datos de ADNmt, sin embargo los microsatélites las agruparon con la RF. Esto sugiere una relación histórica de las colonias de Islas Malvinas con la CA, pero una mayor tasa de flujo génico reciente con la RF. Otro punto a destacar con respecto a esta estructura general, observada solo en *P. atriceps*, estuvo relacionada con que el Lago Yehuín resultó ser un cluster genético diferenciado del resto (la relación de las colonias de agua dulce con las marinas se discutirá más abajo). En cuanto a *P. magellanicus* se encontró evidencia desde los microsatélites de que la costa Atlántica estaría constituida por

dos subgrupos, correspondientes a las provincias de Chubut y Santa Cruz (discutido en detalle en el capítulo II).

Con respecto al modelo de flujo génico al cual se ajustan *P. atriceps* y *P. magellanicus*, la evidencia resultó algo contradictoria en ambas. A pesar de que las dos presentaron evidencia de aislamiento por distancia, se encontró evidencia que respaldó el hecho de que estas especies se ajustan a un modelo de tipo-n-islas. Este resultado implica que el flujo génico a través de la masa continental y por sobre los Andes ocurriría. Esto ya ha sido observado en otras especies de aves marinas, donde extensiones de tierra similares han demostrado ser barreras efectivas, pero no absolutas para el flujo génico (e.g. Morris-Pocock et al. 2011, Bicknell et al. 2012). En nuestro caso, a pesar de encontrar diferencias genéticas significativas entre las colonias de las costas Atlántica y Pacífica, tanto en *P. atriceps* como en *P. magellanicus*, otras fuentes de evidencia independientes relacionados a análisis basados en microsatélites, mostraron que el flujo génico directo entre costas podria ocurrir. Por ejemplo, los análisis de agrupamiento Bayesiano, los cuales mostraron que las colonias de la CA tienen un alto grado de ancestralidad común con las colonias de la CP (ver Figuras 2.2c y 3.2c). Por su parte, las simulaciones coalescentes indicaron que el modelo de flujo génico con mayor probabilidad es el de tipo-n-islas (Figuras 2.6 y 3.5). Al mismo tiempo las tasas de migración reciente (*m*) también respaldaron este patrón, sobre todo en *P. atriceps* (Figuras 2.8 y 3.7). Estas evidencias fueron comunes a *P. magellanicus* y *P. atriceps*, en el caso de esta última especie, el patrón también fue respaldado por la evidencia de ADNmt, dado que se pueden observar que los haplotípos I y II son compartidos entre ambas costas (Figura 3.2). Por otro lado, en *P. atriceps* el efecto de la masa continental como barrera al flujo génico resultó ser menor, ya que aquí no se observaron diferencias entre los test de mantel cuando se utilizaron las distancias geográficas Euclidianas y las distancias geográficas corregidas. Por lo

tanto, a pesar de que para ambas especies la masa continental no resultó un barrera absoluta al flujo génico, está claro que el efecto que ésta tiene sobre *P. magellanicus* es mucho más fuerte que el que tiene sobre *P. atriceps*, debido a que en la primera si se observó una clara diferencia entre los test de Mantel al utilizarse las distancias Euclidianas y las corregidas (ver sección 2.4.2 y Figura 2.5).

Otro punto en común entre ambas especies, aunque mas claro en *P. atriceps*, es que presentaron patrones similares de relación fuente-sumidero entre las poblaciones, según los cuales, (i) la costa Pacífica actuaría como fuente de las colonias de la costa Atlántica, y (ii) la región Fueguina actuaría como fuente de las costas Atlántica y Pacifica. El primero de estos patrones, en el que el flujo génico ocurriría de oeste a este, podría explicarse por la particular topografía que presenta el suroeste Patagónico, donde se observan numerosos fiordos y canales que introgresan en el continente (Coronato et al. 2008), lo cual podría facilitar el acceso de las aves marinas (fuertes voladores y dependientes de cuerpos de agua) a los lagos Andinos, y luego a los grandes ríos que cruzan la Patagonia fluyendo de oeste a este (e.g. Ríos Chubut y Santa Cruz). Otro aspecto a considerar es la dirección prevalente de los vientos en esta misma dirección (Gaiero 2007). Todos estos factores en conjunto facilitarían el movimiento dispersivo desde el Pacífico hacia el Atlántico. Existen algunos reportes de individuos de *P. atriceps* observados en el medio del continente lejos de las costas (Svagelj & Quintana, com. pers.), aunque no se encontraron reportes similares para *P. magellanicus*. El movimiento de oeste a este, incluso por encima de los altos Andes (i.e. provincias de Mendoza y San Juan), ya fue reportado en otras especies de aves, por ejemplo en el pelicano peruano, *Pelecanus thagus* (Elías 2008) y también en los loros barranqueros, *Cyanoliseus patagonus* (Masello et al. 2011). Por otro lado, el patrón de movimiento de sur a norte, resulta más fácil de explicar, dada la tendencia de estas aves a moverse hacia bajas latitudes durante

los períodos post-reproductivos (Orta 1992, Nelson 2005), esto último incrementaría las chances de individuos de altas latitudes de ser reclutados para reproducir en colonias de bajas latitudes. Reportes recientes de aves anilladas en la colonia de Punta León (Chubut) muestran que estos cormoranes pueden alejarse por más de 300 km de su sitio de nificación durante la etapa invernal F Quintana y W. Svagelj datos inéditos). Datos provenientes de sensores de temperatura del agua colocados en individuos reproductores tambien indican un amplio rango de dispersión de los individuos durante la etapa no reproductiva (Harris et al. 2013).

3.5.2 Patrones contrastantes de diferenciación poblacional entre *P. atriceps y P. magellanicus*

A pesar de los mencionados aspectos en común, en cuanto a la estructuración genética de estas especies, también como era esperado se encontraron varias diferencias. Como se mencionó previamente todos los estimadores globales de diferenciación genética poblacional fueron significativos en ambas especies, sin embargo resultaron siempre más bajos en *P. atriceps* que en *P. magellanicus* (Tabla 3.4). Hasta el momento, solo tres estudios realizados en especies de Phalacrocoracidae han reportado valores de F_{st} globales basados en microsatélites: *P. auritus*, F_{st} = 0.05 (Mercer 2008), *P. aristotelis*, F_{st} = 0.055 (Barlow et al. 2011) y *P. harrisii*, F_{st} = 0.097 (Duffie et al. 2009). En comparación con estas tres, *P. atriceps* presentó el valor más bajo de F_{st} (0.048) y *P. magellanicus* el más alto (0.10). A pesar de que no es recomendable comprar valores de F_{st} provenientes de diferentes estudios (Jost 2008, Meirmans & Hedrick 2011), éste es todavía el estimador de diferenciación genética poblacional más frecuentemente reportado, y ésta comparación sirve para ilustrar los patrones contrastantes de estructuración entre nuestras especies de interés.

En lo que respecta a los resultados de agrupamiento Bayesiano obtenidos con STRUCTURE, a pesar de que ambas especies presentaron un número equivalente de clusters, las diferencias radicaron en el patrón de *admixture*, es decir en la probabilidad de cada individuo de pertenecer a un cluster, con *P. atriceps* mostrando valores promedio de Q más bajos que *P. magellanicus*. Los bajos valores-Q y por ende altos niveles de *admixture* están relacionados a altas tasas de flujo génico, y esto fue lo que se observó en *P. atriceps*. A su vez, en ambas especies encontramos cierta ambigüedad entre las diferentes metodologías para estimar el valor óptimo de clusters genéticos. Para el caso de STRUCTURE, se ha demostrado que el método de Evanno (ΔK) es más preciso cuando la diferenciación poblacional es fuerte, mientras que Ln $Pr(X \mid K)$ es más útil cuando la diferenciación es débil (Waples & Gaggiotti 2006). Por lo tanto, la decisión más acertada es la de utilizar las mayor cantidad de líneas de evidencia posible para estimar la verdadera naturaleza de la estructura genética en poblaciones salvajes (Evanno et al. 2005, Latch et al. 2006). En este caso ΔK y Ln $Pr(X \mid K)$ respaldaron la existencia de cuatro clusters genéticos, y esas fueron las particiones que se consideraron representativas para ambas especies (Figuras 2.3c y 3.2c).

Otro aspecto en el que estas especies divergieron marcadamente está relacionado con la estructura filogeográfica, donde *P. atriceps* no presentó ningún tipo de estructuración, debido a que ni las redes de haplotípos mitocondriales (Figura 3.2b), ni los árboles de *maximum-likelihood* (Figura 3.8b) mostraron evidencia de esto. Todo lo contrario ocurrió en *P. magellanicus*, donde encontramos una clara estructuración filogeográfica en la que grupos de haplotípos recíprocamente monofiléticos coincidieron con regiones geográficas discretas (i.e. CA, CP y RF) (ver Figura 2.8a, y sección 2.5.2 del capítulo II).

Estos patrones de estructuración genética contrastantes, son consistentes con las historias de vida de estas dos especies. La fuerte estructura observada en *P. magellanicus*,

tanto desde la evidencia de microsatélites como del ADNmt, parece reflejar la tendencia general a permanecer en las cercanias de sus colonias por parte de los individuos de esta especie durante los períodos post-reproductivos (Punta et al. 2003, Sapoznikow & Quintana 2008) y durante los viajes de forrajeo (Quintana 1999, Quintana 2001, Sapoznikow & Quintana 2003). El limitado flujo génico que existe en *P. magellanicus* podría estar mediado por machos juveniles, debido a la prácticamente nula evidencia de haplotípos mitocondriales compartidos que observamos entre los tres principales clusters genéticos (Figura 2.2), y porque se ha observado que los individuos juveniles son los que tienen mayor tendencia a abandonar las colonias (Sapoznikow & Quintana 2008). En el caso de *P. atriceps*, su tendencia a alejarse de las colonias durante los viajes de forrajeo (Sapoznikow & Quintana 2003) y la marcada tendencia a abandonar las colonias durante los períodos post-reproductivos (Rasmussen 1994, Punta et al. 2003, Svagelj & Quintana com. pers.) resultan una explicación bastante probable para los elevados niveles de flujo génico y para la débil estructura genética observada.

Debido a que la consecuencias de la dispersión post-reproductiva y el amplio campo de acción en el mar durante los viajes de forrajeo, sería la de incrementar las chances de los individuos de ser reclutados para reproducir en colonias diferentes a las natales, resulta un poco difícil determinar cuál de estos es el mayor responsable de generar las diferencias observadas aquí. Sin embargo, Friesen et al. (2007a) demostraron que la distribución durante los periodos post-reproductivos es el factor más influyente, y con mayor poder de predicción de la presencia de estructura genética y filogeográfica en otros taxa de aves marinas. Además se ha observado que el comportamiento de forrajeo, principalmente en *P. atriceps*, puede variar mucho dependiendo de la disponibilidad de alimento y de la ubicación de la colonia (Sapoznikow & Quintana 2003). Todo esto nos da la pauta de que la distribución durante los

periodos pos-reproductivos es el principal responsable de las diferencias observadas entre las especies aquí analizadas.

Es importante remarcar que el comportamiento dispersivo observado en *P. atriceps* podría tener consecuencias genéticas contrastantes. Por ejemplo, las colonias localizadas en lagos, representan una gran proporción de la diferenciación genética entre colonias (Tabla 3.4.), aunque constituyen al mismo tiempo un muy pequeño porcentaje de la población global, la cual es principalmente marina (Orta 1992, Nelson 2005). Por lo tanto, la dispersión y el concomitante flujo génico, tenderían a homogeneizar la variación genética en los rangos de distancia cortos. Sin embargo cuando analizamos la distribución global, este comportamiento estaría promoviendo la posibilidad de colonizar nuevos ambientes, resultando en una mayor diversificación genética. Este tipo de conclusiones, dependiente de la escala de análisis, han sido previamente propuestas para aves Paseriformes (Burney & Brumfield 2009).

3.5.3 Observaciones filogeográficas en *P. atriceps*. Patrones comunes con *P. magellanicus*

Como se mencionó previamente, *P. atriceps* no mostró ningún tipo de estructuración filogeográfica. Sin embargo, si presentó evidencia de refugios históricos, los cuales coinciden con los observados en *P. magellanicus*. Nuestros datos respaldaron la existencia de al menos dos refugios para estas especies. (i) Un refugio localizado en el noreste Patagónico, como era esperado, coincidente con el límite norte de la distribución actual de estas especies en la costa Atlántica. La presencia de haplotípos exclusivos de ADNmt es una de las señales de que esta región habría actuado como refugio, en el caso de *P. magellanicus* esta observación estuvo respaldada además por la evidencia de microsatélites (altos niveles de riqueza alélica y heterocigosis esperada). (ii) La región Fueguina también parece haber actuado como sitio de

persistencia durante las glaciaciones ocurridas en el Pleistoceno; por ejemplo las colonias de Tierras del Fuego y las Islas Malvinas presentaron la mayor riqueza alélica y la mayor heterocigosidad esperada, en relación al resto de las colonias, consistentes con evidencia de refugio. Estas mismas regiones Patagónicas ya habían sido reportadas como zonas de refugio, tanto para plantas como para vertebrados terrestres (revisado en Sérsic et al. 2011). Esto tiene sentido si se considera la evidencia Paleoclimatológica, según la cual las tierras bajas del noreste Patagónico permanecieron libres de hielos glaciales, apareciendo también como una de las regiones más estables y menos afectada por los intensos cambios climatológicos que afectaron a la Patagonia durante el Pleistoceno (Clapperton 1993, Rabassa et al. 2005). También existe evidencia de que la región este de la Isla de Tierra del Fuego permaneció libre de hielos glaciales durante el mismo período (Rabassa et al. 2011). Por lo tanto parece razonable que muchos organismos, incluyendo a estas dos especies de cormoranes, hayan usado estas dos áreas como refugios.

3.5.4 Conservación e implicancias taxonómicas para *P. atriceps*

Los datos de microsatélites sugirieron una fuerte diferenciación genética para dos de las tres colonias de agua dulce analizadas (i.e. Lagos Nahuel Huapí y Yehuín), como puede observarse en el árbol de *neighbor-joining* basado en distancias de F_{st} (Figura 3.4). En el caso de Lago Yehuín esta diferenciación también fue evidente en los análisis de agrupamiento Bayesiano (Figura 3.2c). Se ha reportado que los individuos de esta colonia, presentan también una clara diferenciación morfológica con respecto a sus con-específicos. En particular, presentan tamaños corporales y glándulas nasales significativamente más pequeñas, sugiriendo esto adaptación fisiológica a la vida de agua dulce (Rasmussen 1994). A pesar de que se desconoce el estado demográfico de esta colonia, nuestros datos genéticos

sugieren que ningún cuello de botella ha afectado a esta población en el corto plazo. Por su parte, los individuos del lago Nahuel Huapí también presentan diferencias con respecto a las poblaciones marinas, se ha observado que estos individuos anidan en riscos, en lugar de hacerlo sobre las habituales superficies planas (Rasmussen 1994). También se ha reportado que prefieren alimentarse de crustáceos, dejando a los peces como presa secundaria (Casaux et al. 2010); opuesto a lo que ocurre en las poblaciones marinas donde los peces son el ítem de alimentación principal, y los crustáceos el secundario (Bulgarella et al. 2008, Yorio et al. 2010). La situación demográfica de esta colonia es mejor conocida, y ha sido observada como localmente en peligro de extinción (Casaux et al. 2010). La aparente adaptación a los ambientes de agua dulce, la diferenciación en marcadores de ADN neutrales (i.e. microsatélites) y su distribución altamente restringida, podrían estar reflejando cierta segregación y aislamiento genético de las poblaciones de agua dulce con respecto a las marinas. A partir de estas observaciones se sugerie que estas dos colonias de agua dulce sean consideradas como diferentes unidades de manejo, independientes del resto de la especie (*sensu* Moritz 1994). En el caso de la colonia de lago Yehuín, la evidencia morfológica, ecológica y genética, sugiere que esta población sea considerada como un linaje evolutivo independiente (de Queiroz 2007), nuestros resultados además respaldan la propuesta hecha por Rasmussen (1994), de considerar a esta población como una subespecie diferente.

Por otro lado, no encontramos evidencia que respalde el status taxonómico de subespecies para *P. atriceps atriceps* y *P. atriceps albiventer*, las mismas se distribuyen casi simpátricamente a lo largo de las costas patagónicas, aunque existe cierta segregación, según la cual *P. a. albiventer* es más frecuente en la costa Pacífica, costa de Santa Cruz y región Fueguina, siendo *P. a. atriceps* más frecuente en la costa de Chubut (Rasmussen 1991), sin embargo la evidencia genética, de ADN nuclear y mitocondrial, no reflejó esta supuesta

segregación. Además, en la mayoría de las colonias puede observarse a ambas variantes reproduciendo juntas, e incluso formando parejas "hibridas" (Rasmussen 1991, 1994), los datos comportamentales (Siegel-Causey 1986) y morfológicos (Rasmussen 1991, 1994) tampoco respaldaron esta distinción. Tampoco se encontró evidencia que respalde a las colonias de Islas Malvinas como una subespecie diferente, como había sido propuesto por Devillers & Terschuren (1978). Aunque éstas últimas si mostraron evidencia de diferenciación genética basada en las comparaciones pareadas de F_{st} (Apéndice 5.b); ninguna de las subespecies emergió como un grupo monofilético, ni tampoco como un cluster diferente en los análisis de agrupamiento Bayesiano. En resumen, los resultados aquí presentados son coincidentes con los de Rasmussen (1994) y sugieren que todas éstas comprenden simples variaciones de color de *P. atriceps*.

3.5.5 Conclusiones y comentarios finales

Encontramos evidencia de una relativamente débil estructuración genética en *P. atriceps,* encontrándose diferenciación genética significativa entre las CA, RF y CP. Se demostró que *P. a. atriceps* y *P. a. albiventer*, son simples variantes de coloración de *P. atriceps,* en acuerdo con los estudios previos. Por otro lado, encontramos que las colonias de agua dulce presenten una fuerte divergencia genética con respecto a las colonias marinas, coincidiendo además con la presencia de diferencias a nivel morfológico y ecológico. En particular recomendamos, coincidiendo con Rasmussen (1994), que la población de Lago Yehuín sea considerada como una subespecie diferente.

Desde el punto de vista comparativo se observó que *P. atriceps* y *P. magellanicus* presentaron patrones genéticos en común, como por ejemplo las tres regiones previamente mencionadas. También se observó que ambas siguen un modelo de flujo génico de tipo-n-

islas y serian capaces de dispersar por encima de los Andes y a través de la masa continental. Por lo tanto, ésta gran extensión de tierra constituye para ellas una barrera efectiva, pero no absoluta para el flujo génico.

Sin embargo, y como era esperado, *P. atriceps* y *P. magellanicus* también presentaron patrones contrastantes. Como se puede ver en el presente análisis comparativo, en el que se estudiaron dos especies hermanas de cormoranes, ampliamente co-distribuidas, y por lo tanto coincidiendo en espacio y tiempo, se puede observar que a pesar de haber sido afectadas por los mismos eventos geológicos, sus patrones de estructuración genética son bastante distintos y los patrones de estructuración filogeográfica totalmente opuestos. Sus historias de vida contrastantes, con una mayor tendencia a la dispersión post-reproductiva en *P. atriceps*, en comparación con *P. magellanicus*, sería el factor responsable de generar las diferencias observadas.

CAPITULO IV

RELACIÓN TAXONÓMICA Y DEMOGRÁFICA ENTRE EL CORMORÁN ANTÁRTICO (*Phalacrocorax bransfieldensis*) Y EL IMPERIAL (*P. atriceps*)

4.1 RESUMEN

El Cormorán Imperial (*Phalacrocorax atriceps*) es una especie politípica que presenta al menos seis subespecies, que conforman el grupo de los 'cormoranes de ojos azules'. La mayoría de estas subespecies están definidas en base a variaciones en el patrón de coloración y se encuentran confinadas a pequeñas islas distribuidas circumpolarmente en el hemisferio sur. Aquí se prestará atención a una de éstas subespecies, *Phalacrocorax* [*atriceps*] *bransfieldensis* (Cormorán Antártico), cuya distribución se restringe a la Península Antártica e Islas Shetland del Sur. Su restringida distribución, sumada a varias particularidades morfológicas y comportamentales, provocaron cierta controversia con respecto a su status taxonómico, proponinedose que esta sea considerada una especie diferente, de hecho en la actualidad el nombre aceptado y más utilizado para referirse al Cormorán Imperial es el de *Phalacrocorax bransfieldensis*, y éste es el nombre que utilizaremos aquí. Se analizó la relación taxonómica y demográfica entre *P. bransfieldensis* y *P. atriceps* desde el punto de vista de la genética de poblaciones y la filogeografía, utilizando evidencia de ADN nuclear (8 microsatélites) y de ADN mitocondrial (ATP*asa*, 657 pb.). Se obtuvieron muestras de sangre de doce individuos (n = 12) de Cormorán Antártico. Las muestras fueron obtenidas en una colonia localizada en la Isla Nelson (62° 18'S, 59° 03'O), la cual pertenece al archipiélago de las Islas Shetland del Sur. Los análisis de agrupamiento Bayesiano identificaron a estos individuos como un cluster diferenciado, separándolo del resto de las colonias muestreadas de *P. atriceps*. Esto fue soportado por los altos y significativos valores de F_{st} y R_{st} pareados, y los análisis de AMOVA. La evidencia de ADN mitocondrial mostró que *P. bransfieldensis* posee un haplotípo único, no encontrado en *P. atriceps*, que se diferencia por una mutación de tipo transversional. La evidencia genética recopilada en éste trabajo, sumada a la evidencia morfológica y ecológica, y a su distribución sumamente restringida, sugiere que *P. bransfieldensis* es una unidad demográfica y evolutivamente independiente de *P. atriceps*.

4.2 INTRODUCCIÓN

La región Antártica es considerada la región más hostil del planeta para la subsistencia de la vida. Constituye la región más ventosa y fría del mundo; conteniendo al mismo tiempo la capa de hielo más extensa y gruesa del planeta, la cual cubre más del 97 % de su superficie (Bargagli 2005). Esta región se encuentra incluida casi en su totalidad dentro del Círculo Polar Antártico, con la única excepción de la Península Antártica (Bargagli 2005). Por estar por fuera del Círculo Polar y a más baja latitud, las condiciones climáticas de esta Península, y de las islas que la circundan (e.g. Islas Shetland del Sur) son más benévolas para la vida y menos extremas que en el resto de la región (Bargagli 2005).

Se estima que la separación entre el continente Antártico y América del Sur comenzó hace ca. 41 millones de años (Scher & Martin 2006), y se completó con la formación y profundización del pasaje de Drake hace 33,4 millones de años atrás (Livermore et al. 2005). Debido a esta abrupta separación, es que la diversificación de las especies distribuidas a lo largo del hemisferio sur ha sido explicada mayormente en el marco de eventos de vicarianza coincidentes con este evento. Sin embargo, el fenómeno de dispersión ha entrado fuertemente en la discusión, como explicación alternativa para algunos de los patrones de diversificación observados a lo largo de la región Antártica (Rogers et al. 2012). La implementación de herramientas moleculares ha sido de gran ayuda para poder distinguir con mayor precisión cuál de estas fuerzas está actuando en cada caso en particular.

Aquí se tratará de determinar cuál es la relación taxonómica y demográfica entre *Phalacrocorax bransfieldensis* (Cormorán Antártico) y *Phalacrocorax atriceps* (Cormorán Imperial). Como ha sido mencionado previamente, *P. atriceps* es una especie politípica con al menos seis subespecies que conforman el grupo de los 'cormoranes de ojos azules' (Murphy 1936, Orta 1992, Nelson 2005). En este caso prestaremos atención a la relación entre las

subespecies Patagónicas del Cormorán Imperial (*P. atriceps atriceps* y *P. a. albiventer*), y el Cormorán Antártico (*P. bransfieldensis*). Nos referiremos a las subespecies patagónicas con su nombre nominal, *P. atriceps* (Rasmussen 1991, 1994, ver capítulo III de ésta tesis).

En lo que respecta a *P. bransfieldensis*, la misma presenta una distribución restringida a la península Antártica y a las Islas Shetland del Sur. A pesar de su acotada distribución geográfica, se puede decir que es relativamente abundante, presentando ca. 10,000 parejas reproductivas (Nelson 2005). El Cormorán Antártico presenta varias particularidades morfológicas y de comportamiento que fueron las que llevaron a su distinción. Desde la morfología, las medidas morfométricas (i.e. largos de cola, tarso, pico y ala) sugieren que los individuos antárticos presentan un tamaño corporal promedio más grande que los patagónicos (i.e. *P. atriceps*) (Siegel-Causey & Lafevre 1989, Casaux & Baroni 2010), y que presentan glándulas nasales más prominentes (Nelson 2005). También se ha encontrado evidencia osteológica soportando esta distinción, más precisamente Siegel-Causey & Lafevre (1989) describieron cinco caracteres osteológicos (craneales) que diferencian al Cormorán Antártico del Imperial. Además se han observado numerosas diferencias desde el punto de vista comportamental, en lo que respecta al cortejo, al mantenimiento de lazos de pareja y al uso del tiempo (Bernstein & Maxson 1982a, 1982b, Siegel-Causey 1986).

Existe cierta controversia en lo que respecta al rango taxonómico y a la denominación del Cormorán Antártico. A pesar de que Murphy (1936) la nombró como *Phalacrocorax* [*atriceps*] *bransfieldensis,* considerándola una subespecie de *P. atriceps*. Posteriormente algunos autores (e.g. Siegel-Causey & Lafevre 1989), propusieron que se la considere como una especie diferente, basandose en las evidencias mencionadas. Actualmente la mayoría de los autores se refieren al Cormorán Antártico con el nombre de *Phalacrocorax bransfieldensis* (e.g. Orta 1992, Nelson 2005, Remsen et al. 2012), y éste es el nombre aquí utilizado.

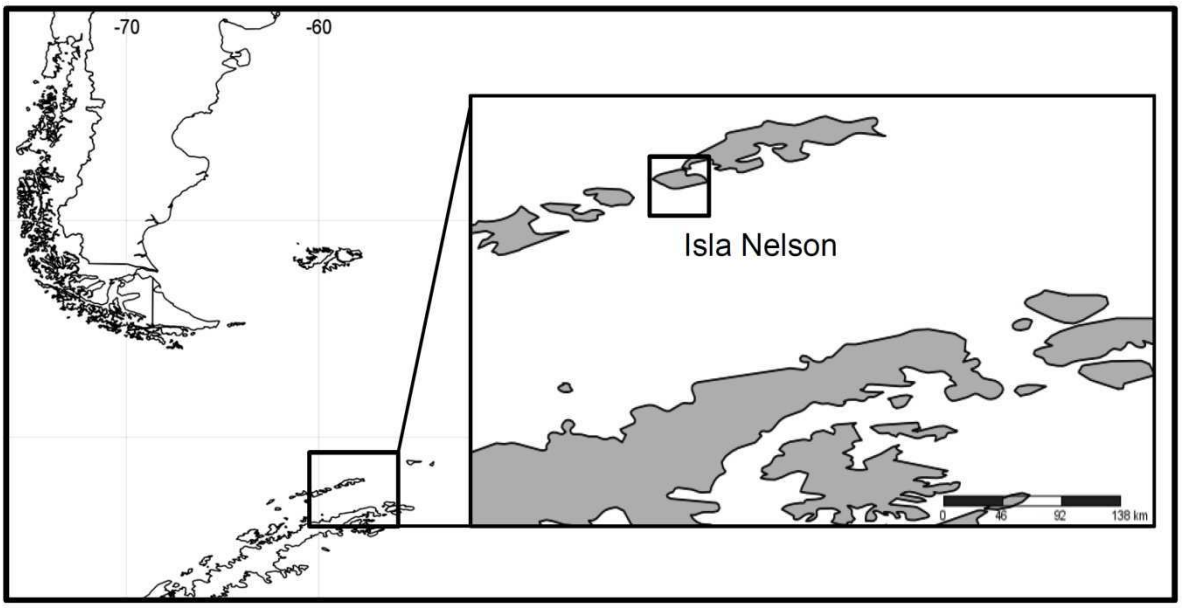
El obejtivo de este capitulo será el de esclarecer las relaciones taxonomicas y demogràficas entre *P. bransfieldensis* y *P. atriceps*. En caso de que *P. bransfieldensis* sea una unidad evolutiva y demográficamente independiente esperamos encontrar, desde el punto de vista de la genética de poblaciones que: (i) aparezca como un cluster diferenciado en los análisis de agrupamiento Bayesianos, (ii) con valores de estimadores de diferenciación poblacional altos y significativos, (iii) acompañado de bajos o nulos niveles de flujo génico. Desde el punto de vista filogeográfico (iv) se espera que los individuos de *P. bransfieldensis* aparezcan como un grupo monofilético. En caso de existir alguna diferenciación genética entre éstas, intentaremos determinar si la misma es producto de un evento de vicarianza producto de la separación de los continentes Antártico y Sud Americano, o si se trató de un proceso de dispersión posterior a dicho evento

4.3 MATERIALES Y METODOS

4.3.1 Muestreo

Se muestrearon doce individuos (n = 12) de *Phalacrocorax bransfieldensis*, durante la temporada reproductiva 2009-2010, entre los meses de Diciembre y Enero. Los individuos fueron muestreados en la Isla Nelson (62° 18'S, 59° 03'O), la cual es una de las Islas Shetland del Sur (Figura 4.1). Se obtuvieron muestras de sangre de la vena braquial de individuos adultos, se muestreó un individuo por nido. Las muestras fueron preservadas en etanol 96%, las mismas se encuentran preservadas actualmente a la colección de tejidos de la División de Ornitología del Museo Argentino de Ciencias Naturales (MACN-or-ct). El detalle de las muestras obtenidas puede verse en el Apéndice 1.b.

Figura 4.1. Ubicación geográfica de Isla Nelson, Islas Shetland del Sur.



4.3.2 Extracción de ADN y genotipificación

Las extracciones de ADN fueron realizas siguiendo el método propuesto por Ivanova et al. (2006), adaptado para columnas individuales (Epoch Life Sciences, Missouri City, TX, USA). Se amplificaron con éxito ocho microsatélites: PcD2, PcT3, PcT4, PcD5, PcD6 (originalmente desarrollados para *Phalacrocorax carbo* por Piertney et al. 1998); y Cor01, Cor05 y Cor43 (originalmente desarrollados para *Phalacrocorax auritus* por Fike et al. 2009). Estos mismos marcadores probaron ser altamente informativos para *P. atriceps* (ver capítulo III). En total 12 individuos fueron genotipificados para estos ocho microsatélites. Para más detalles acerca de la amplificación de los microsatélites ver sección 2.3.2 del capítulo II.

4.3.3 Amplificación del ADN mitocondrial

Se obtuvieron secuencias parciales (657 pares de base) de las subunidades seis y ocho del gen de la ATP sintetasa (ATP*asa*). Se obtuvo la secuencia de este gen para un total de 10 individuos. Este marcador ha sido ampliamente utilizado en estudios genéticos dentro de la

familia Phalacrocoracidae (e.g. Kennedy et al. 2000). Los primers y reacciones de PCR fueron idénticas a las descriptas en la sección 2.3.3 del capítulo II.

4.3.4 Variación genética de Microsatélites

Se realizaron test para evaluar la existencia de desvíos del equilibrio de Hardy-Weinberg (HW), también estimamos la heterocigosidad observada (Ho), la heterocigosidad esperada (He) y el número de alelos; esto se realizó para cada locus y para toda la colonia, utilizando el programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer 2010). La frecuencia de alelos nulos fue estimada con el programa FREENA (Chapuis & Stoup 2007). El programa GENALEX v6 (Peakall & Smouse 2006) se utilizó para obtener el número y la frecuencia de alelos privados, de la colonia de Isla Nelson, con respecto a las colonias de *P. atriceps*. Los niveles de significancia fueron ajustados para múltiples comparaciones con el método de Benjamini - Yekuteli (Benajamini & Yekuteli 2001) modificado para el descubrimiento de tasa de falsos (B-Y FDR). El método fue aplicado siguiendo las recomendaciones de Narum (2006). Es importante mencionar que la colonia de Isla Nelson (*P. bransfieldensis*) fue considerado como una colonia mas de *P. atriceps* para estos análisis, por lo que las correcciones para comparaciones múltiples fueron aplicadas para un total de diecinueve (n = 19) colonias.

4.3.5 Diferenciación poblacional

Se utilizaron métodos de análisis de agrupamiento Bayesianos para estimar el número más probable de clusters genéticos (*K*) subyacentes a *P. atriceps*, cuando fueron incluidas las muestras de *P. bransfieldensis* (Isla Nelson, AN), con el fin de determinar si estas emergían como un cluster diferenciado. Se emplearon dos programas diferentes: BAPS v5.3 (Coreander et al. 2008), y STRUCTURE v2.3.3 (Pritchard et al. 2000, Falush et al. 2003) (para mas

detalles acerca de estas metodologías, y detalles de las corridas analíticas ver sección 2.3.5). Para el caso de STRUCTURE se realizaron corridas preliminares cortas, testeando valores de K = 1 hasta 19 (numero de colonias muestreadas), los valores de K > 10 mostraron muy baja probabilidad a posteriori. Los resultados finales se obtuvieron luego de realizar 20 corridas independientes, evaluando desde K = 1 a K = 9; cada corrida consistió de 100,000 ciclos *burn-in* y 300,000 ciclos de Monte Carlo vía cadenas de Markov (MCMC). La aplicación disponible on-line STRUCTURE HARVESTER (Earl & vonHoldt 2012) fue utilizada para detectar el número de clusters más probable por medio del método de Evanno (ΔK). La probabilidad de cada individuo de pertenecer a un cluster (i.e. valores Q) de las 20 corridas, para las particiones desde K = 3 a K = 6, fueron promediadas usando CLUMPP v1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007) y editadas como imágenes con el programa DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004).

Se obtuvieron los estimadores tradicionales de diferenciación poblacional a nivel global y a nivel de comparaciones pareadas entre colonias, F_{st} (Weir & Cockerman 1984) y R_{st} (Slatkin 1995), los mismos fueron obtenidos con MSATANALYZER (Dieringer et al. 2003) y ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer 2010) respectivamente. Los valores de *p* fueron obtenidos en ambos casos utilizando 10000 permutaciones, y los valores de significancia fueron corregidos para múltiples comparaciones con el método BY-FDR (para más detalles sobre estos estimadores ver sección 2.3.5). Los valores de comparaciones pareadas de F_{st} fueron utilizados para construir árboles de UPGMA y NJ, utilizando PHYLIP 3.6 (Felsenstein 2005). Se realizaron AMOVAs jerárquicas con ARLEQUIN v3.5 (ver sección 2.3.5). En particular, se buscaron diferencias significativas entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis*.

4.3.6 Historia demográfica. Modelo e intensidad del flujo génico

Se evaluó la ocurrencia de reducciones en el tamaño poblacional efectivo utilizando el programa BOTTLENECK v1.2.02 (Cornuet & Luikart 1996). Utilizándose como herramientas estadísticas el test de Wilcoxon, el *'Sign test'* y el cambio de la moda (*'mode shift'*) para detectar el exceso significativo de heterocigotos. Esto último es una de las señales de la ocurrencia de un cuello de botella reciente. Empleamos un modelo mutacional de dos fases (TPM), el cual asume un 95% del modelo mutacional de 'stepwise' y un 5% del modelo de múltiples-pasos (recomendado por Piry et al. 1999), se realizaron 100,000 iteraciones para obtener los valores de significancia.

Se utilizó el método Bayesiano multilocus implementado en BAYESASS v3.0 (Wilson & Rannala 2003) para estimar las tasas de migración reciente (*m*) entre *P. bransfieldensis* y las tres principales unidades demográficas de *P. atriceps* (i.e. costa Atlántica, costa Pacífica y región Fueguina). Los detalles de esta metodología y los parámetros utilizados para los análisis fueron idénticos a los descriptos en la sección 2.3.6 del capítulo II.

4.3.7 Análisis de ADN mitocondrial

Se utilizó DNAsp v4.5.3 (Rozas et al. 2003) para obtener las medidas estándar de diversidad genética. También se realizaron AMOVAs jerárquicas con ARLEQUIN v3.5, buscándose diferencias significativas entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis*. Se obtuvo el parámetro Φ_{ct}, comparable con el parámetro F_{ct} previamente descripto, y las distancias pareadas Φ_{st} entre colonias, empleando el modelo de sustitución de Kimura 2 Parámetros (K2P). Las distancias genéticas obtenidas fueron utilizadas para construir árboles de neighbor-joining (NJ) y UPGMA, de la misma forma que se hizo con los microsatélites.

NETWORK v4.6.1 (http://www.fluxus-engineering.com) fue utilizado para obtener redes de haplotípos bajo la aproximación de median-joining (MJ) (Bandelt et al. 1999). El modelo de evolución al cual se ajustan nuestras secuencias fue determinado empleando JMODELTEST v0.1.1 (Posada 2008), utilizando el Criterio de Información Bayesiana (BIC). Se construyeron árboles de *maximun-likelihood* (ML) utilizando PHYML (Guidon & Gascuel 2003), con el fin de determinar las relaciones genealógicas entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis* el soporte para los nodos se obtuvo por medio de 100 pseudoreplicas de bootstrap. Se utilizaron como 'outgroups' dos secuencias de *P. magellanicus* obtenidas por nosotros.

4.4 RESULTADOS

4.4.1 Desequilibrio de ligamiento, equilibrio de Hardy-Weinberg y diversidad genética de microsatélites

Luego de las correcciones por comparaciones múltiples, con el método de B-Y FDR, se observó que un solo locus se desvió del equilibrio de Hardy-Weinberg en esta colonia, fue el PcD5 (Apéndice 2.b). Además dos loci resultaron monomórficos: PcD6 y Cor43. PcD6 presentó únicamente el alelo '190', esto mismo fue observado en la mayoría de las colonias de *P. atriceps*. En cuanto a Cor43, el mismo presentó únicamente el alelo '397'. La riqueza alélicas promedio de esta colonia fue 3.30. La Tabla 4.1 muestra un resumen de la diversidad genética promedio observada en esta colonia. El aspecto más llamativo de esta colonia fue la gran cantidad de alelos privados que presentó, ocho en total (n = 8), dos para el locus PcT3, tres para PcT4 y tres para Cor06. El bajo valor de heterocigosis promedio observada para esta colonia puede deberse a que dos loci resultaron monomórficos. Esta colonia se ubicó cuarta en relación a la riqueza alélica promedio, cuando se comparó con las colonias de *P. atriceps*, una vez realizada la estandarización de los tamaños muestrales (g = 20). La frecuencia de

alelos nulos promedio para todos los loci analizados aquí fue estimada en < 5%, y el número de alelos observados por locus abarcó un rango de uno a 15. La tabla 4.2 muestra el detalle de la diversidad genética por locus para la colonia de Isla Nelson.

Tabla 4.1. Diversidad genética de la colonia Isla Nelson. Incluyendo microsatélites y ADN mitocondrial. Número de individuos analizados por colonia (n), valores promedio por colonia de heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), número de alelos (*Na*) y riqueza alélica (*R*). Número de alelos privados (*Pa*), y coeficiente de endogamia (*Fis*), valore en negrita indican un déficit significativo de heterocigotos al 0.05 luego de ser corregido por B-Y FDR.

Diversidad de Microsatélites							
	N	*Ho*	*He*	*Na*	*A*	*Pa*	*Fis*
Isla Nelson (AN)	12	0.51	0.59	6.62	3.30	8	**0.13**

Tabla 4.2. Diversidad genética por locus. Heterocigosis observada (*Ho*), heterocigosis esperada (*He*), número de alelos (*Na*) y frecuencia de alelos nulos (*Fo*).

Locus	Fuente	Tamaño (pb.)	Long. rep.	*Na*	*Ho*	*He*	*Fo*
PcD2	Piertney et al. (1998)	204-226	2	3	0.50	0.40	0.00
PcT3	Piertney et al. (1998)	208-260	4	12	0.81	0.93	0.00
PcT4	Piertney et al. (1998)	214-278	4	15	0.91	0.96	0.00
PcD5	Piertney et al. (1998)	209-223	2	3	0.18	0.65	0.28
PcD6	Piertney et al. (1998)	190	-	1	-	-	0.001
Cor05	Fike et al. (2009)	253-305	4	10	0.91	0.89	0.00
Cor06	Fike et al. (2009)	149-187	4	8	0.75	0.86	0.07
Cor43	Fike et al. (2009)	397	-	1	-	-	0.001

4.4.2 Diferenciación poblacional

Los análisis de agrupamiento Bayesiano resultaron ambiguos. El programa BAPS fue consistente en sugerir una partición óptima de $K = 3$, separando a las colonias de Lago Yehuín e Isla Nelson (i.e. *P. bransfieldensis*) del resto de las colonias (Apéndice 3.c). Los resultados de STRUCTURE mostraron cierta ambigüedad entre ΔK y Ln $Pr(X \mid K)$ (ver Apéndice 4.c).

El método de Evanno (ΔK) presentó una distribución bimodal con picos en K = 3 y 6, mientras que Ln Pr(X | K) soportó K = 6. Con respecto a la partición K = 6, respaldada por Ln Pr(X | K) (Figura 4.2), una gran cantidad de individuos presentaron valores muy bajos de Q (< 0.5), haciendo altamente imprecisa su asignación a algún cluster. Por eso es que nos inclinamos por la partición K = 3, soportada por BAPS y ΔK de STRUCTURE (Figura 4.3c). Los valores promedio de Q para estos tres clusters fueron: Cluster 1, Q = 0.82, incluyendo todas las colonias de *P. atriceps*, con excepción de Lago Yehuín, la cual fue asignada al Cluster 2 (Q = 0.91). La colonia de Isla Nelson (i.e. *P. bransfieldensis*) fue asignada al Cluster 3, Q = 0.96. El mayor nivel de *admixture* lo presentaron las colonias de la región Fueguina, especialmente con las colonias de Islas Malvinas.

La relación entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis* se analizó también por medio de AMOVAs, el valor de F_{ct} entre estas resultó ser de 0.13 ($p < 0.001$).

Los estimadores clásicos de diferenciación poblacional para las comparaciones pareadas entre la colonia de Isla Nelson y el resto de las colonias de *P. atriceps* fueron todos significativos. Los valores de F_{st} fueron desde 0.1 ($p < 0.001$) hasta 0.28 ($p < 0.001$), con un promedio de 0.18 y los de R_{st} fueron desde 0.44 ($p < 0.001$) hasta 0.64 ($p < 0.001$), con un promedio de 0.56. Estas distancias fueron representadas gráficamente mediante árboles no enraizados de UPGMA *y neighbor-joining* (NJ). Los árboles de NJ y UPGMA resultaron muy similares entre sí, por lo que en la figura solo se muestran los de UPGMA (Figura 4.4). En todos los árboles se puede observar la clara diferenciación entre la colonia de Isla Nelson (AN) y el resto de las colonias de *P. atriceps.*

Figura 4.2. Particiones de STRUCTURE de *K* = 3 a 6. El color azul representa a la colonia de Isla Nelson (AN)

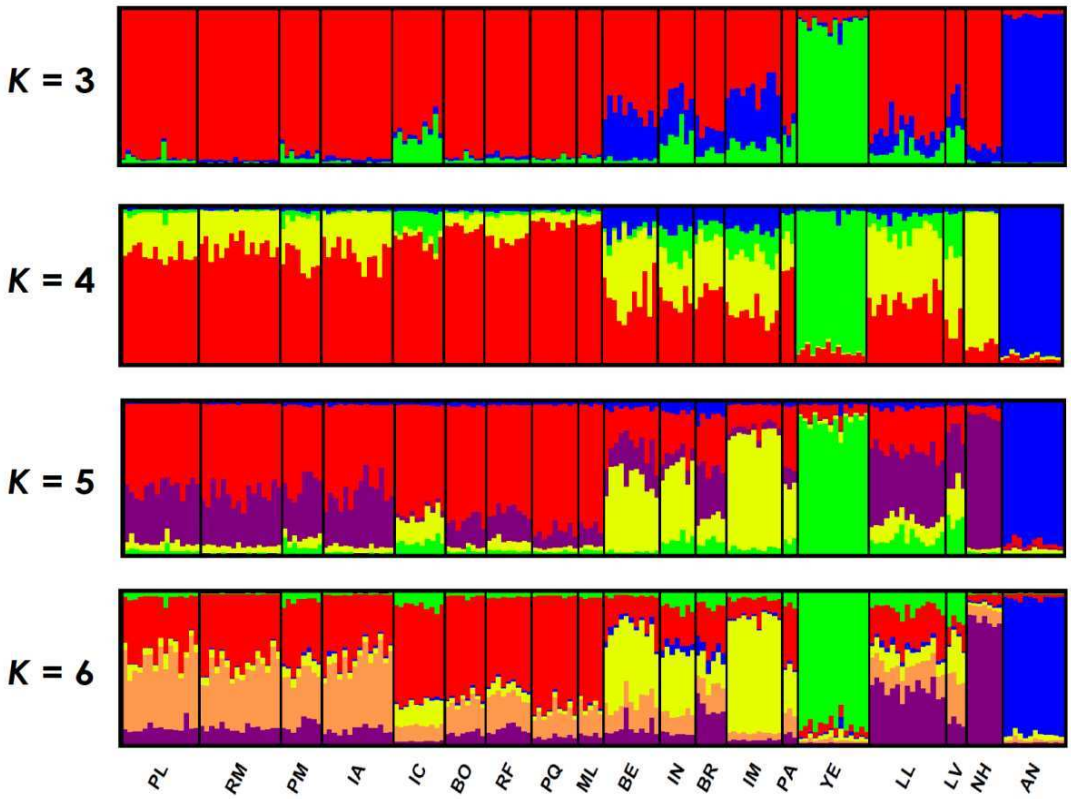


Figura 4.3. Resumen de la relación genética de *P. atriceps y P. bransfieldensis.* a) Mapa mostrando la correspondencia geográfica de los dos principales clusters encontrados. El círculo relleno (negro) indica la ubicación de la colonia de *P. bransfieldensis* muestreada y el gráfico de tortas muestra la distribución del Hap. VIII correspondiente a *P. bransfieldensis*. b) Frecuencia, y red de haplotípos mitocondriales obtenida con NETWORK. c) Bar-plot de STRUCTURE *K* = 3, mostrando la separación entre *P. atriceps* (rojo) y *P. bransfieldensis* (azul); también se indican las diferentes regiones dentro de *P. atriceps*. Los cuadros punteados sobre el mapa representan los tres principales clusters.

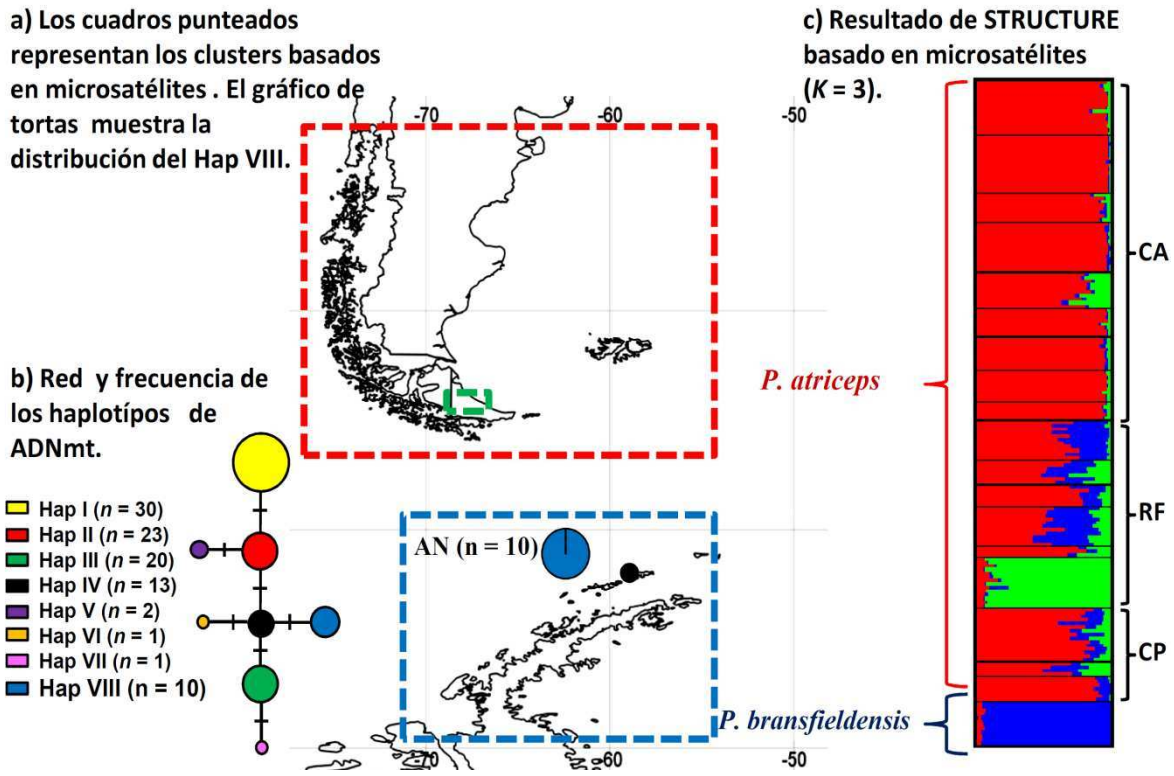
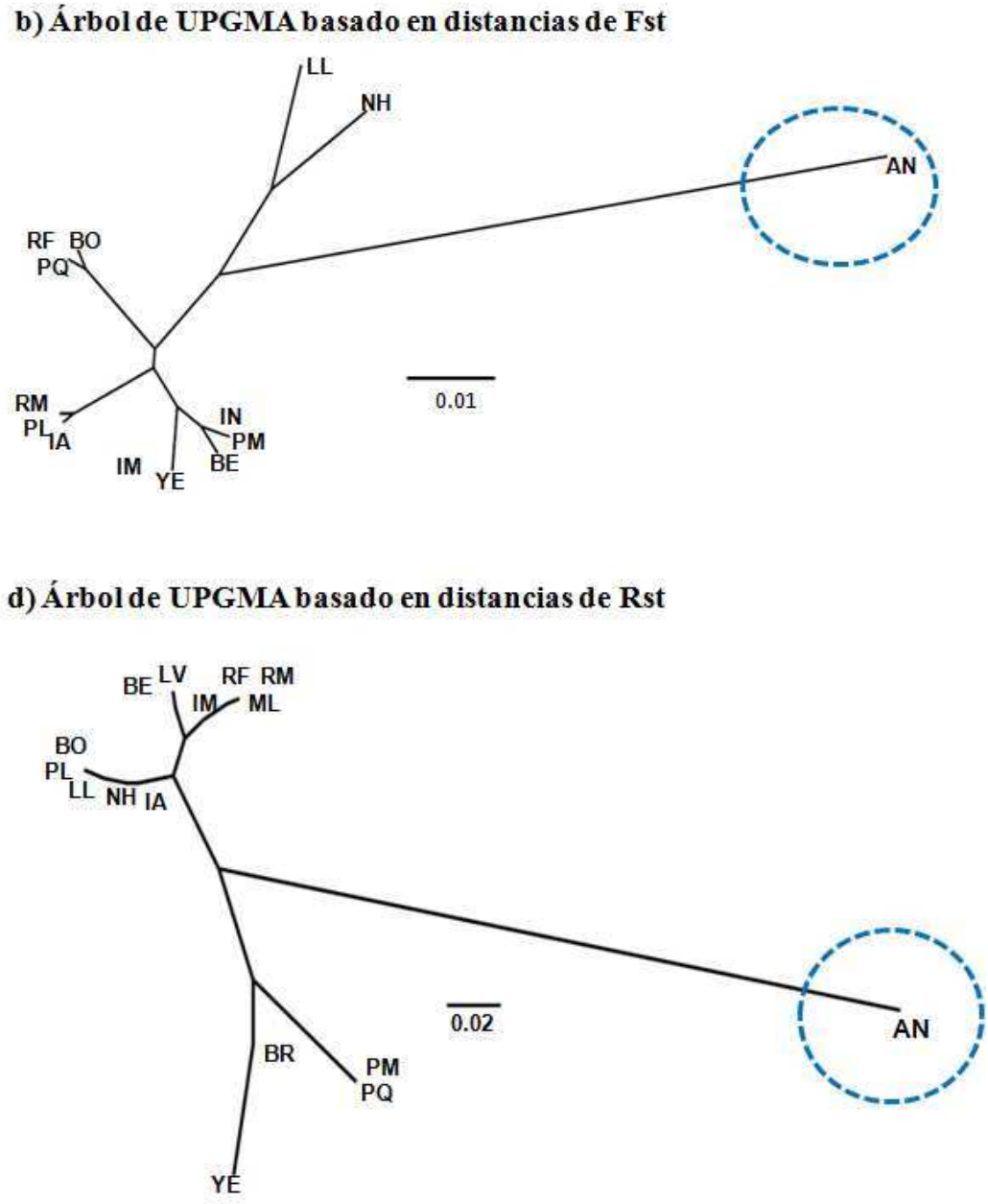


Figura 4.4. Arboles de UPGMA basado en distancias de F_{st} y R_{st}. El circulo punteado azul señala a la colonia de Isla Nelson (AN).



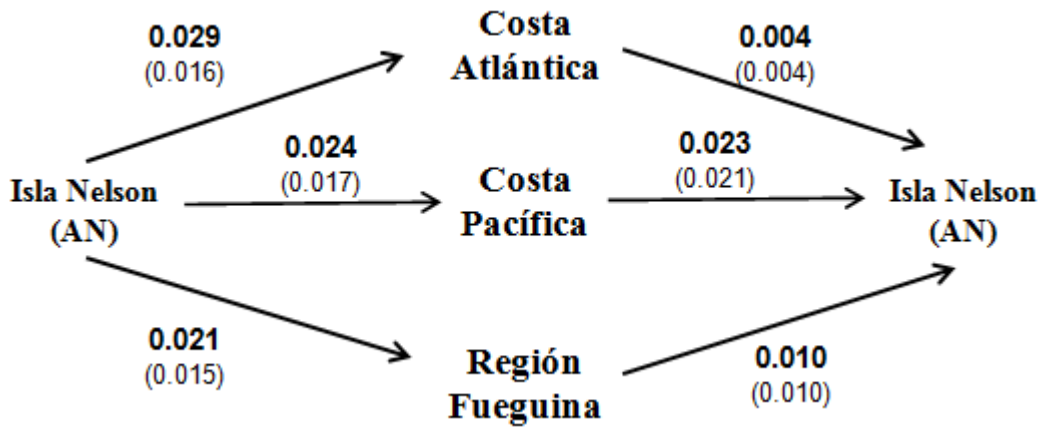
4.4.3 Historia demográfica y flujo génico basado en microsatélites

No se encontró evidencia de que la colonia de Isla Nelson haya sufrido un cuello de botella reciente, todos los test realizados con BOTTLENECK rechazaron la existencia de un exceso significativo de heterocigotos, el test de Wilcoxon resultó en $p > 0.05$, y el 'Sign test'

también resultó $p > 0.05$. Los valores de $p > 0.05$ rechazan la hipótesis nula (i.e. exceso de heterocigotos). El test de 'Shift mode' resultó en forma de L, lo que también es indicio de ausencia de cuellos de botella.

Las tasas de migración obtenidas con BAYESASS fueron bajas, y la mayoría de los estimadores incluyeron al cero en su intervalo de confianza. Sin embargo, la tasa de migración media desde la colonia de Isla Nelson hacia las tres principales unidades demográficas de *P. atriceps,* fueron en promedio mayores (m = 0.025, CI 95% 0.001 – 0.054) que las tasas de migración media en el sentido opuesto (m = 0.014, CI 95% -0.011 – 0.039).

Figura 4.5. Patrón de flujo génico entre *P. bransfieldensis* (Isla Nelson, AN) y las tres principales unidades demográficas de *P. atriceps*. En negrita se muestra el valor medio de *m,* debajo de cada valor de *m,* y entre paréntesis se muestra el desvío estándar.

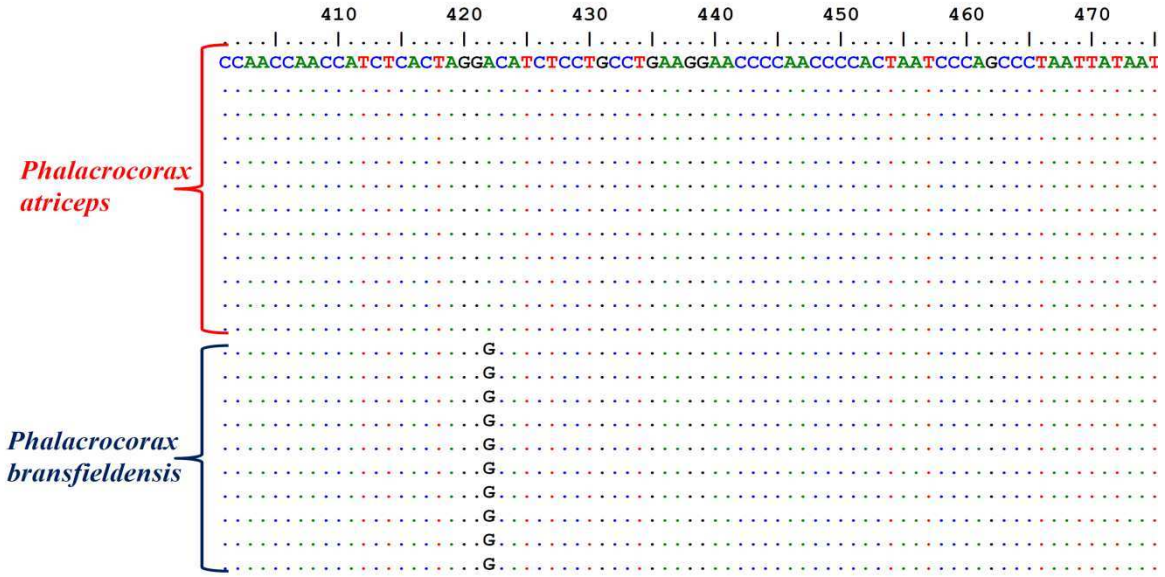


4.4.4 Resultados de los análisis de ADN mitocondrial

Se observó un bajo nivel de variación genética para este marcador. Esto mismo ha sido previamente reportado en otros estudios en los cuales se analizaron especies de la familia Phalacrocoracidae a nivel intraespecífico, en los cuales se analizaron genes de ADNmt codificantes para proteínas (e.g. Waits et al. 2003, Barlow et al. 2011).

Se encontró que los diez individuos muestreados en la colonia de Isla Nelson (AN) compartieron un mismo haplotípo, el cual no fue encontrado en *P. atriceps*. El haplotípo de *P. bransfieldensis* difirió de *P. atriceps* en una mutación de tipo transversional, más precisamente una Guanina (G) reemplaza a un Adenina (A) en la posición 422 de la secuencia de la ATP*asa* (Figura 4.6). Debido a que todos los individuos de Islas Nelson compartieron el mismo haplotípo, la diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (Hd) para esta colonia fue de cero.

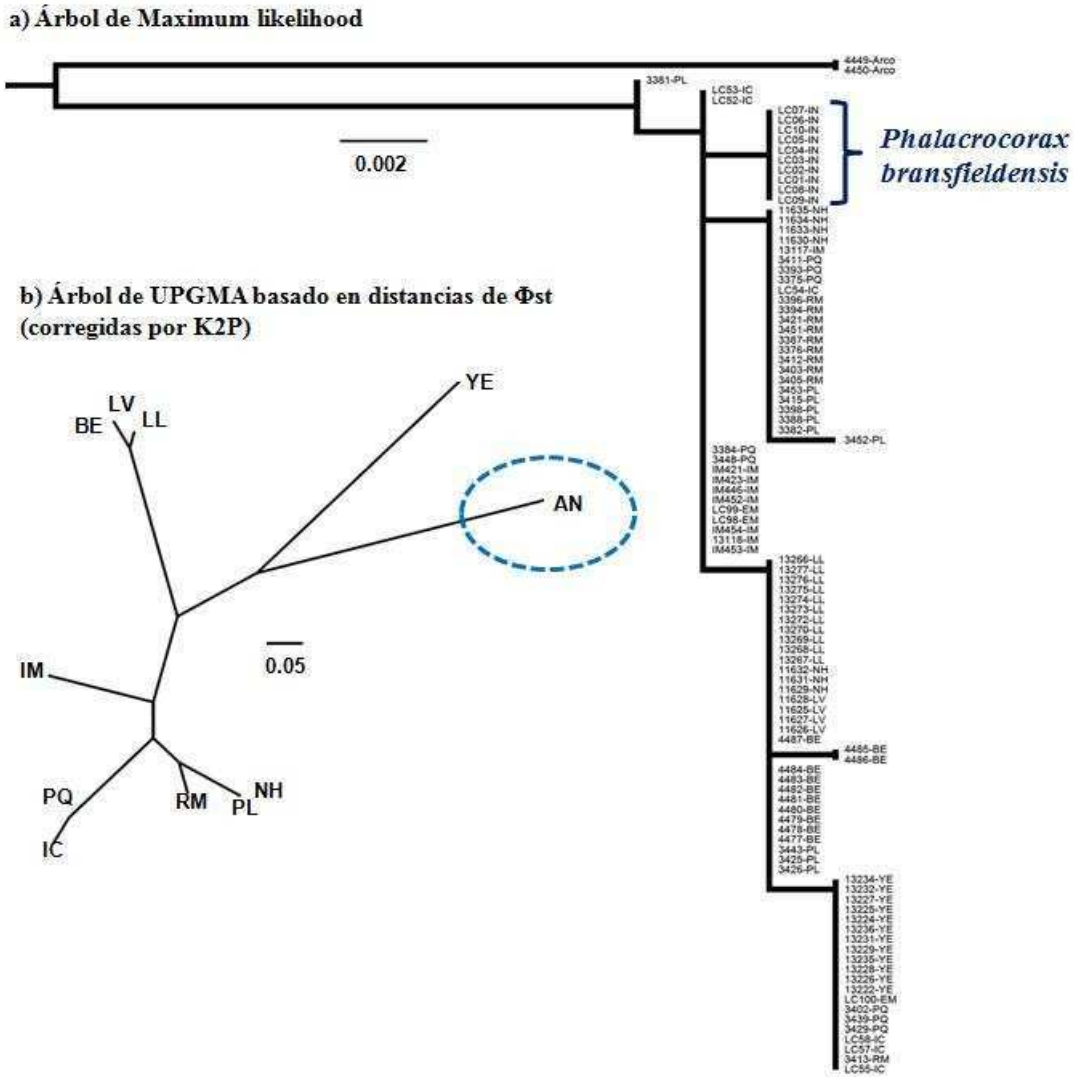
Figura 4.6. Mutación puntual (tranversión) que diferencia a *P. bransfieldensis* de *P. atriceps*



Por su parte, los resultados de AMOVAs indicaron que una porción significativa de la varianza genética total es explicada por las diferencias observadas entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis* Φ_{ct} = 0.43 ($p < 0.05$) y Φ_{st} = 0.75 ($p < 0.001$). Cuando se realizaron las comparaciones pareadas entre la colonia de Isla Nelson y el resto de las colonias de *P. atriceps*, los valores de Φst fueron de 0.65 a 1, con un promedio de 0.84 (figura 4.7b). Todos estos estimadores resultaron significativos luego de las correcciones por comparaciones múltiples (BY-FDR) (Apéndice 5b).

La red de haplotípos obtenida con NETWORK (Figura 4.2b), muestra como el haplotípo VIII (azul) correspondiente a *P. bransfieldensis* se separa del resto por un solo paso mutacional. También en la Figura 4.2 puede observarse como éste se distribuye únicamente en la colonia de Isla Nelson. Cuando se realizaron los árboles de *maximum-likelihood*, se observó que éstos haplotípos aparecieron como un grupo monofilético, pero no separado de *P. atriceps*, sino que incluido dentro de ésta última. La distancia promedio entre las secuencias de *P. bransfieldensis* y *P. atriceps*, fue de 0.0033% (corregido por K2P).

Figura 4.7. a) Árbol de *maximum likelihood*, donde se señala a los individuos de *P. bransfieldensis*. b) Árbol de UPGMA basado en distancias de Φst, el círculo punteado indica la colonia de Isla Nelson (AN).



4.5 DISCUSIÓN

4.5.1 Relación taxonómica y demográfica entre *P. bransfieldensis* y *P. atriceps*

El Cormorán Antártico fue descripto inicialmente por Murphy (1936) como una subespecie de *P. atriceps*, recibiendo el nombre de: *Phalacrocorax* [*atriceps*] *bransfieldensis*, basándose principalmente en la similitud de los patrones de coloración entre ellas (ver Figuras 1.2 y 1.3). Sin embargo, estudios posteriores brindaron nueva evidencia, proveninete de diversas fuentes (i.e. morfometría, osteología y comportamental), que provocó que varios autores propongan al Cormorán Antártico como una especie diferente (e.g. Siegel-Causey & Lafevre 1989), nombrándola *Phalacrocorax bransfieldensis*, de hecho este es el nombre científico actualmente aceptado y utilizado para el Cormorán Antártico (Orta 1992, Nelson 2005, Remsen 2012).

A pesar de que toda esta evidencia compilada parece suficiente para catalogar a *Phalacrocorax atriceps* y *P. bransfieldensis* como especies diferentes, y de hecho las mismas aparecen como especies diferentes en las filogenias basadas en datos morfológicos (Siegel-Causey 1988, Holland et al. 2010); la evidencia molecular, cuando se considera a todas las especies de Phalacrocoracidae, no resuelve su separación y las mismas aparecen en forma de una politomia (Holland et al. 2010).

La evidencia encontrada aquí muestra una clara diferenciación, desde el punto de la genética de poblaciones, entre el Cormorán Antártico y el Imperial. Los individuos de la colonia de Isla Nelson emergieron como un cluster diferenciado en los análisis de agrupamiento Bayesiano (BAPS y STRUCTURE) basados en ADN nuclear (microsatélites). A pesar de que se observó cierta inconsistencia a la hora de determinar cuál era la partición global óptima, en todas ellas la colonia de Isla Nelson (AN) apareció como un cluster diferenciado (ver Figura 4.2, y también Apéndice 4.c). Los doce individuos muestreados en

dicha colonia presentaron una alta probabilidad de pertenencia al cluster asignado (valor Q promedio = 0.96). Al mismo tiempo todos los estimadores de diferenciación poblacional basados en datos nucleares y mitocondriales (F_{st}, R_{st} y Φ_{st}) cuando se realizaron las comparaciones pareadas, resultaron altos y significativos (Figura 4.4, y Apéndice 5b). Todo esto refleja una clara independencia demográfica entre estos taxa, en lo que respecta tanto a las frecuencias alélicas, como las haplotípicas (Hedrick 1999).

Por otro lado, encontramos cierta evidencia de flujo de génico reciente entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis*, los valores medios de *m* obtenidos con BAYESASS, junto con el patrón de *admixture* reflejado en los agrupamientos Bayesianos (STRUCTURE). Sugieren que el patrón que parece emerger, es el de una mayor intensidad del flujo génico desde la Isla Nelson (*P. bransfieldensis*) hacia las tres unidades demográficas de *P. atriceps*, que en el sentido contrario (Figuras 4.3 y 4.5). Es decir que el flujo génico ocurriría de sur a norte, lo cual es consistente con datos observacionales, paleontológicos y de anillado-recaptura, en los que se ha reportado una tendencia de *P. bransfieldensis* a desplazarse hacia bajas latitudes, especialmente durante los períodos post-reproductivos (Orta 1992). Siegel-Causey & Lavefre (1989) reportaron restos fósiles de *P. bransfieldensis* en las costas de la Isla Grande de Tierra del Fuego, datados en ca. 6,100 años de antigüedad. Lo que es más, un individuo de *P. bransfieldensis* anillado en Isla Nelson fue encontrado en las costas de Brasil (Lima et al. 2001). Esta tendencia por desplazarse hacia el norte durante los períodos post-reproductivos, aumentaría las chances de individuos nacidos en la Península Antártica o Islas Shetland, de ser reclutados para reproducir en colonias Patagónicas, principalmente de la región Fueguina, debido a que esta es la región que presento mayor nivel de *admixture* con el cluster de Isla Nelson (AN) (Figura 4.3). El hecho de que la evidencia de flujo génico provino solo del biparentalmente heredado ADN nuclear (microsatélites), sugiere que el flujo génico estaría

mediado principalmente por machos, dado que al haplotípo mitocondrial de *P. bransfieldensis* no fue encontrado en ninguna colonia de *P. atriceps*. Evidencia genética de esta tendencia a moverse de sur a norte durante los periodos post-reproductivos, también fue observada en *P. magellanicus* y en *P. atriceps* (capítulos II y III respectivamente).

En lo que respecta a la historia demográfica de *P. bransfieldensis*, no se encontró evidencia de que ésta haya sufrido una disminución reciente del tamaño poblacional efectivo (i.e. cuello de botella). Al mismo tiempo, varios autores coinciden en que, a pesar de su distribución restringida, esta es una especie abundante en la región Antártica, con ca. 10,000 parejas reproductivas (Orta 1992, Nelson 2005).

4.5.2 Observaciones filogeográficas

La evidencia de ADN mitocondrial nos permitió identificar a *P. bransfieldensis* como un grupo monofilético, pero no separado de *P. atriceps* (Figura 4.7a). En un trabajo previo realizado por Holland et al. (2010), en el que se realizó una filogenia basada en evidencia molecular (i.e. genes de ATP*asa* y 12S), en la que se incluyó a la mayoría de las especies de la familia Phalacrocoracidae, tampoco fue posible diferenciar entre estos taxa. Sin embargo, aquí encontramos que todos los individuos de *P. bransfieldensis* comparten un mismo haplotípo, no encontrado en ninguna colonia *P. atriceps* (Figura 4.3), difiriendo de los de *P. atriceps* por una mutación puntual, más precisamente una transversión (Figura 4.6). Esta transversión sería el caracter diagnóstico que permite diferenciar entre estos taxa.

Dada la baja divergencia observada entre las secuencias del Cormorán Antártico y el Imperial (0.0033%), no podemos datar con precisión cuando ocurrió su separación. Aunque resulta claro, que no se puede adjudicar su separación a un evento de vicarianza, producto de la separación de los continentes antártico y sudamericano. Se sabe que éste proceso se

completó hace ca. 33,5 - 41 millones de años atrás (Kunht 2004, Livermore 2005, Scher & Martin 2006), por lo tanto de haber sido este el causante de la separación de los taxa en cuestión, la divergencia genética entre ellos debería ser mucho mayor. El origen de *P. bransfieldensis* parece ser el producto de una colonización post-gondwanica, relativamente reciente, de la región Antártica. Existen numerosos ejemplos, provenientes de otros taxa, en los que se ha observado este patrón de colonización (e.g. Ritz et al. 2008, Fraser et al. 2009).

Las aves marinas en general tienen una gran capacidad para volar largas distancias. Por lo que los ca. 900 Km de mar, que separan al archipiélago de Cabo de Hornos (distribución más austral de *P. atriceps*, Ibarra et al. 2010), de la Península Antártica, no parece constituir una barrera (geográfica) significativa, teniendo en cuenta que como se demostró en el capítulo III, el Cormorán Imperial sería capaz de desplazarse distancias similares por ambientes más hostiles, como lo es la masa continental que separa las costas Atlántica y Pacífica en Patagonia. Además hay que considerar el comportamiento dispersivo durante los periodos post-reproductivos, y el amplio campo de acción en el mar durante los viajes de forrajeo por parte de ésta especie (Punta et al. 2003, Sapoznikow & Quintana 2003, Quintana et al. 2011, Harris et al. 2012). Todos estos factores en conjunto facilitarían este evento de colonización de *P. atriceps* sobre la región Antártica.

4.5.3 Conclusiones y comentarios finales

Encontramos evidencia genética (de ADN nuclear y mitocondrial) que identifica a *P. bransfieldensis* como una unidad demográfica y evolutivamente independiente de *P. atriceps*, lo que concuerda con la evidencia morfología y comportamental previamente reportada. El origen de *P. bransfieldensis* parece ser producto de una colonización relativamente reciente de

la región Antártica (i.e. post-gondwanica) por parte de *P. atriceps*, y de un posterior aislamiento como consecuencia de la distancia y de las presiones de selección diferenciales.

La evidencia aportada por el ADNmt presentó bajo soporte estadístico como para respaldar con firmeza el status de especie de *P. bransfieldensis* desde la perspectiva del concepto filogenético de especie (e.g. Donoghue 1985), ya que no fue posible separarla de *P. atriceps*. Sin embargo, la presencia de un caracter diagnóstico en las secuencias de *P. bransfieldensis*, junto con la clara diferenciación genética e independencia demográfica encotradas aquí, sumada las mencionadas diferencies morfologicas y ecologicas, nos permiten afirmar que ésta es una especie diferenciada de *P. atriceps*. Constituyendo un linaje evolutivo independiente, encontrándose quizás en las primeras fases del proceso de especiación, y por eso es que las mismas no aparecen como clados separados (de Queiroz 2007). Es importante recordar que las muestras de *P. bransfieldensis* analizadas aquí provienen de una única colonia, por lo tanto estos resultados deben tomarse con cierta precaución, y otras colonias deberían ser analizadas.

En lo referente a la conservación, podemos decir con certeza qué *P. bransfieldensis* constituye una unidad evolutiva significativa (ESU, *sensu* Mortiz 1994), diferente de *P. atriceps*. Esto debe ser fuertemente tenido en cuenta a la hora de tomar decisiones de manejo que involucren a estos taxa, con el fin de asegurar su correcta persistencia en tiempo.

CAPITULO V

AUSENCIA DE PATERNIDAD EXTRA PAREJA Y PARASITÍSMO DE CRÍA EN EL CORMORÁN IMPERIAL (*Phalacrocorax atriceps*)

5.1 RESUMEN

Dos de los mecanismos de reproducción alternativa mejor estudiados en aves son la paternidad extra-pareja (PEP) y el parasitismo intraespecífico de cría (PIC). Ambos son muy comunes entre de las aves paseriformes, siendo prácticamente inexistentes dentro del grupo de las aves marinas. Sorprendentemente, y contrario al patrón general observado en aves marinas, las tasas de PEP de las dos especies de cormoranes (Aves: Phalacrocoracidae) estudiadas hasta el momento resultaron ser relativamente elevadas. En este trabajo se evaluó la existencia de eventos de PEP y PIC en el cormorán imperial *Phalacrocorax atriceps*, un ave marina colonial, de tamaño mediano y socialmente monogámica. Para esto se determinó la relación de filiación de 110 pichones, pertenecientes a 37 nidadas; empleando cuatro microsatélites altamente polimórficos. El muestreo se llevó a cabo en una colonia ubicada en la localidad de Punta León (Chubut), durante dos temporadas reproductivas consecutivas, correspondientes a los años 2004 y 2005. No se encontraron evidencias de eventos de PEP ni de PIC. Nuestros resultados de PEP no concuerdan con los dos antecedentes previos para la familia, probablemente como consecuencia de diferencias comportamentales. A diferencia de lo observado en las dos especies previamente estudiadas, en el Cormorán Imperial no se ha observado que los machos soliciten copulas durante la ausencia de su pareja social, ni que las hembras busquen activamente copulas extra-pareja.

5.2 INTRODUCCIÓN

En los últimos 20 años, con el advenimiento de las técnicas moleculares, ha habido una revolución en lo que respecta a nuestro entendimiento de los sistemas de apareamiento y estrategias reproductivas dentro del grupo de las aves. El cambio más drástico, ha sido la distinción entre lo que se conoce como monogamia social (i.e. asociación entre un macho y una hembra con el propósito de reproducir) y monogamia genética (i.e. relación de apareamiento exclusiva entre un macho y una hembra). Mientras que la monogamia social es común entre las aves (Lack 1968), la monogamia genética es mucho menos frecuente (Griffith et al. 2002). De hecho, la verdadera monogamia genética ha sido encontrada en menos del 25% del total de las aves socialmente monogamias que han sido estudiadas (Griffith et al. 2002).

La paternidad extra pareja (PEP) y el parasitismo intraespecífico de cría (PIC) son dos de las estrategia reproductivas alternativas mejor estudiadas. PEP hace referencia a la situación en la que los pichones son engendrados por machos distintos al compañero social de la hembra (Ligon 1999), mientras que el PIC ocurre cuando la hembra pone sus huevos en el nido de otro individuo de la misma especie, sin invertir en la incubación y/o en el cuidado de los pichones (Yom-Tov 1980). Hasta el momento, factores ecológicos contemporáneos como la densidad de individuos reproductores y la sincronización en la reproducción habían sido considerados como los principales factores de la variación en los niveles de PEP y PIC entre diferentes especies (Møller & Birkhead 1993; Stutchbury & Morton 1995; Westneat & Sherman 1997; Weatherhead & Yezerinac 1998). Sin embargo, Arnold & Owens (2002) demostraron que, aunque los factores ecológicos pueden explicar la existencia de éstas diferencias entre especies cercanamente emparentadas o entre diferentes poblaciones de la misma especie, más de la mitad de la variación interespecífica en las tasas de PEP y PIC es

atribuible a la variación entre los niveles taxonómicos por encima de familia, probablemente debido a contrastes fundamentales características de las historias de vida y modos de cuidado parental que existen en estos nodos profundos en la filogenia de la clase Aves. (Owens & Bennet 1995).

Mientras que la PEP ha demostrado ser común en Paseriformes (el 86% de las especies de este orden estudiadas hasta el momento contienen pichones extra-pareja; Griffith et al. 2002), este fenómeno ha demostrado ser bastante infrecuente dentro de las aves marinas. En general, los linajes que muestran bajas tasas de PEP son aquellos con cuidado parental intensivo por parte de los machos, baja tasa de mortalidad anual, largos tiempos de vida (Arnold & Owens 2002). Dada la particular historia de vida de las aves marinas (e.g. extensor cuidado parental, baja mortalidad anual de adultos), no es extraño que la mayoría de los estudios realizados dentro de este grupo hayan reportado bajas o nulas tasas de PEP (Dearborn et al. 2001; Baumgarten et al. 2001; Lifjeld et al. 2005; Anderson & Boag 2006; Anker-Nilssen et al. 2008, 2010; pero ver Huyvaert et al. 2000; Ležalová-Piálková 2011). Por otro lado, el PIC ha sido reportado para 234 especies de aves (Yom-Tov 2001). Sin embargo, el estudio de las causas subyacentes a la variación interespecífica de la tasas de PIC ha recibido menos atención que la PEP (Yom-Tov 2001; Arnold & Owens 2002). El PIC parece ser más frecuente en especies precociales que en las altriciales, esto implica que el costo de cuidar pichones no emparentados sería menor en los primeros que en los segundos (Yom-Tov 2001).

La familia Phalacrocoracidae (orden: Pelecaniformes) está compuesta por 39 especies y pertenece al grupo ecológico de las aves marinas (Orta 1992; Nelson 2005). Como la mayoría de los miembros de esta grupo, los cormoranes se caracterizan por una relativamente larga expectativa de vida (promedio de 10 – 15 años), baja tasa de mortalidad anual de adultos

(10 – 15%) y por ser socialmente monogámicos con un fuerte rol de los machos en el cuidado de las crías (Orta 1992; Nelson 2005). Intrigantemente, y contrario a lo esperado, en base estos aspectos de su historia de vida, las especies de Phalacrocoracidae estudiadas hasta el momento han mostrado de moderados a altos niveles de PEP dentro de sus nidadas (~13 - 16%; Graves et al. 1992, 1993; Piertney et al. 2003). Basándose en esos estudios, Piertney et al. (2003) sugirió que la PEP podría ser relativamente común entre los cormoranes, y más frecuente que en el resto de las especies de aves marinas. Los reportes de PIC son menores dentro de éste grupo. Graves et al. (1992) reportaron que uno de los pichones del Cormorán Europeo *Phalacrocorax aristotelis* muestreado en su estudio no era descendiente de ninguno de los miembros los padres sociales, a pesar de que los autores no pudieron asignar su origen con certeza. Además de esto, no conocemos otro estudio que haya investigado el PIC en Cormoranes.

Aquí reportaremos nuestros descubrimientos acerca de un estudio de parentesco en el Cormorán Imperial *Phalacrocorax atriceps*. El Cormorán Imperial es un ave marina colonial de tamaño mediano que habita en el sur de Sud (Orta 1992; Nelson 2005). A pesar de que no hay diferencias obvias entre sexos en apariencia y ornamentación, los machos son más grandes y pesados que las hembras (machos: 2317 g, hembras: 1966 g; Svagelj & Quintana 2007). Ésta es una especie socialmente monogámica y tienen una sola nidada al año (Svagelj & Quintana 2011a); las puestas están compuestas por tres huevos, ambos padres comparten la incubación de los huevos por ca. 29 días (Malacalza & Navas 1996; Svagelj & Quintana 2011a, b). una vez que los pichones nacen, ambos padres tienen un rol activo en el cuidado y alimentación de las crías por más de tres meses (Svagelj 2009; Svagelj & Quintana, com. pers.). Dadas estas características, esperamos bajas o nulas tasas de PEP y PIC; sin embargo,

los datos previamente reportados para especies emparentadas sugieren que encontrar indicios de PEP no sería del todo inesperado.

5.3 MATERIALES Y MÉTODOS

5.3.1 Área de estudio

El estudio se llevó a cabo en la colonia de Cormoranes Imperiales de Punta León (43º05´S, 64º30´O), Chubut, Argentina. Esta colonia está localizada sobre un área plana y elíptica, de 130 m de largo aproximadamente por 15 m de ancho, con los nidos distribuyéndose uniformemente con una densidad de ca. 2 nidos m^{-2} (Yorio et al. 1994; Svagelj & Quintana 2011a). Durante las temporadas de 2004 y 2005, la población reproductiva del Cormorán Imperial en esta colonia fue de un total de 3,200-3,300 parejas reproductivas (Svagelj 2009; Svagelj & Quintana, com. pers.).

5.3.2 Muestreo y genotipificado

El muestreo se llevó a cabo durante dos temporadas reproductivas consecutivas, 2004 y 2005. Se muestrearon un total de 37 familia, 27 en el 2004 y 10 en el 2005. Cada familia muestreada estuvo conformada por un padre social, una madre social y tres pichones, sumando un total de 185 individuos. Todos los adultos fueron sexados aplicando una función discriminante sobre sus medidas corporales (profundidad del pico y largo del tarso), y en base a sus vocalizaciones durante los cortejos y defensas del nido (Svagelj & Quintana 2007). Todos los adultos muestreados aquí fueron marcados con anillos plásticos y de aluminio, como parte de un estudio a largo plazo de inversión parental, permitiéndonos seguir el comportamiento de los adultos a lo largo de diferentes temporadas reproductivas. Por lo tanto, no hay dudas acerca de la identidad del padre social y la madre social de cada nido. El

genotipificados se realizó sobre muestras de sangre tomadas de la vena yugular o braquial de los individuos. Las muestras del 2004 (n = 135) fueron preservadas en buffer de lisis (Tris 0.1 M, NaCl 0.1 M, EDTA 50 mM, SDS 1%, pH 8), y las muestras del 2005 (n = 50) fueron preservadas en papel de filtro común (ver Quintana et al. 2008). Sin importar el método de preservación de las muestras, todas las extracciones de ADN fueron llevadas a cabo con el método propuesto por Ivanova et al. (2006) adaptado para columnas individuales (Epoch Life Sciences, Missouri City, TX). Una de las 37 familias estuvo incompleta, ya que descartamos a uno de los pichones por presentar un genotipo aberrante (i.e. alelos no encontrados en otros individuos), se adjudicó este fenómeno a que el ADN se había degradado. Por lo tanto el estudio contó con 110 pichones.

Se genotipificó a todos los individuos para cuatro microsatélites altamente polimórficos (PcD2, PcT3, PcT4 y PcD5), originalmente desarrollados para el Gran Cormorán *Phalacrocorax carbo* (Piertney et al. 1998). La metodología empleada para la amplificación de estos microsatélites fue idéntica a la descripta en la sección 2.3.2 del capítulo II de esta tesis.

5.3.3 Análisis de parentesco

La estadísticas sumarias de los marcadores polimórficos y las frecuencias alélicas fueron estimadas con el programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). En todos los casos los padres sociales fueron confirmados como los padres genéticos, si el genotipo multilocus de la cría era consistente con la herencia Mendeliana parental en los cuatro loci considerados aquí. En aquellos casos en los que se observó una falta de coincidencia en algún locus, se calculó la probabilidad acumulada de parecido (P_{RCum}). Este método permite discriminar entre la posibilidad de parentesco verdadero y la de compartir alelos por azar,

basándose en las frecuencias poblacionales de los alelos compartidos por los dos individuos de interés (Ibarguchi et al. 2004). Se calcularon los intervalos de confianza del 95% de la PEP y el PIC, basándonos en la distribución binomial, siguiendo Sokal & Rohlf (2009).

5.4 RESULTADOS

Todos los marcadores mostraron patrones de herencia consistentes con las expectativas Mendelianas, no encontrándose evidencias de desequilibrio de ligamiento. A pesar de contar con solo 4 marcadores, nuestra habilidad para asignar parentesco fue alta, con una probabilidad combinada de no-exclusión para el primer padre o 'parental conocido' (en este caso la madre) de 0.060, y para el segundo padre o 'parental desconocido' (en este caso el padre) 0.012. A pesar de que los marcadores utilizados fueron desarrollados para un congénere, mostraron ser altamente variables dentro de nuestra especie de interés, con un número medio de alelos de 11.5 y una heterocigosidad observada promedio de 0.784. La probabilidad estimada de alelos nulos estuvo por debajo del máximo recomendado para este tipo de estudios, que es 0.05, por lo tanto todos los marcadores fueron empleados en el análisis (Tabla 1).

En todos los casos, los padres sociales fueron confirmados como los padres genéticos. En cada locus, y en los cuatro loci considerados aquí, la descendencia mostró un alelo heredado del padre y otro alelo heredado de la madre. Esto se cumplió para todos, menos para tres pares de padre-hijo, pertenecientes a diferentes familias, en cada uno de esos casos se observó un solo locus presentando 'mismatch'. Además, en los mencionados casos, la probabilidad acumulada de semejanza (P_{RCum}) fue extremadamente baja: 3.3×10^{-3} para un par madre-hijo, y 6.6×10^{-5} y 1.6×10^{-6} para dos pares de padre-hijo. Debido a que la probabilidad de que los alelos restantes sean compartidas solo por azar fueron muy bajas,

decidimos considerarlos como verdaderos parientes, contemplando la posibilidad de alelos nulos o de mutaciones puntuales como posibles explicaciones alternativas (ver discusión). Por lo tanto concluimos que no hay evidencia de PEP o de PIC para ninguno de los 110 pichones de Cormorán Imperial analizados aquí. El límite superior del intervalo de confianza del 95% tanto para la PEP como para el PIC fue estimado en 3.3% para los pichones (n = 110) y en 8.4% para las nidadas (n = 37).

Tabla 1. Estadísticas sumarias para los cuatro microsatélites utilizados en los análisis de parentesco del Cormorán Imperial *Phalacrocorax atriceps*. Los nombres de los microsatélites aparecen según Piertney et al. (1998). Los valores están basados en los genotipos de los 74 padres analizados, y calculados utilizando CERVUS v3.0.3 (Kalinowski et al. 2007). *Na*, numero de alelos; *He*, heterocigosidad esperada; *H*o, heterocigosidad observada; F_o, frecuencia estimada de alelos nulos; *NE-1P* probabilidad de no-exclusión del primer padre (conocido); *NE-2P* probabilidad de no-exclusión del segundo padre (desconocido).

Locus	*Na*	Tamaño (bp)	*He*	*Ho*	F_o	*NE- 1P*	*NE-2P*
PcD 2	10	204-230	0.844	0.792	0.031	0.487	0.319
PcT 3	14	212-264	0.858	0.863	-0.006	0.459	0.295
PcT 4	15	218-282	0.915	0.932	-0.014	0.314	0.186
PcD 5	7	209-223	0.499	0.459	0.034	0.863	0.700

5.5 DISCUSIÓN

Se realizó un análisis de parentesco en el Cormorán imperial, no encontrándose evidencia ni de PEP, ni de PIC. Esto no significa que este fenómeno no ocurra en esta especie, debido a que se ha demostrado la existencia de una fuerte correlación entre el tamaño de muestra, la estimación del error y los intervalos de confianza (Griffith et al. 2002). Sin embargo, si asumimos que nuestra muestra proviene de una población homogénea, la

verdadera tasa de PEP y de PIC para el Cormorán imperial en la colonia de Punta León es muy baja, y no excedería el 3.3% por pichón.

En los tres casos donde se observaron 'mismatch', la relación de parentesco fue confirmada basándonos en los bajos valores de P_{RCum}. Para el par madre-cría, encontramos evidencia de una mutación puntual en el locus PcT4. Debido a que ambos padres y el pichón fueron heterocigotos, mostrando el pichón un alelo nuevo no encontrado en ninguno de los potenciales padres, este alelo resultó ser una repetición más corta que el alelo observado en la madre, consistente con el proceso de mutación por deslizamiento de la polimerasa (Ellegren 2000). Para los dos pares padre-cría, el 'mismatch' ocurrió en los loci PcD2 y PcT4. Esto pudo haber sido causado por la presencia de un alelo nulo, dado que los potenciales padres fueron homocigotas para los loci que presentaron 'mismatch'.

Nuestros resultados contrastan con los dos estudios previamente realizados en otras especies de cormoranes. Usando minisatélites hipervariables de ADN para estimar la tasa de PEP, Graves et al. (1993) encontraron que el 9.3% (15/161) de los pichones de Cormorán Europeo eran producto de PEP, mientras que el 12.6 % (11/87) de las nidadas incluyeron al menos un pichón con PEP. Empleando microsatélites de ADN, en Piertney et al. (2003) se analizó la frecuencia de PEP en el Gran Cormorán, encontrando que el 16.1% (10/62) de las nidadas presentaron pichones por extra-pareja. Claramente, el caso de los Cormoranes Imperiales de la colonia de Punta León, contrasta con el de estas dos especies, y no respaldan la predicción hecha por Piertney et al. (2003) de que la PEP sería relativamente común en el grupo de los cormoranes.

Sin embargo nuestros resultados de ausencia de PEP en el Cormorán Imperial, son consistentes con lo observado en la mayoría de las especies de aves marinas, donde lo más común es encontrar nulas o muy bajas tasas de PEP (ver Griffith et al. 2002 para una revisión;

pero ver Huyvaert et al. 2000 y Ležalová-Piálková 2011). Lo que es más, nuestros resultados también son acordes a lo encontrado en otras especies de Pelecaniformes, cercanamente emparentadas a los cormoranes (Hackett et al. 2008). PEP por cría: *Sula dactylatra* = 0%, Baumgarten et al. (2001); *Sula granti* = 0%, Anderson & Boag (2006); *Sula sula* = 0%, Baião & Parker (2009); *Fregata minor* = 1%, Dearborn et al. (2001).

Con respecto a los eventos de PIC, los mismos no han sido reportados para ninguna de las especies de Pelecaniformes estudiadas hasta el momento (Yom-Tov 2001), con excepción del caso previamente mencionado en el Cormorán Europeo (Graves et al. 1992). Dado que los Pelecaniformes son aves altriciales (Nelson 2005), el hecho de que no hayamos encontrado eventos de PIC en el Cormorán Imperial respalda la noción de que las tasas de PIC son más bajas en las especies altriciales que en las precociales (Yom-Tov 1980, 2001).

La variación en la frecuencia de eventos de PEP depende de los costos y beneficios relativos, acumulados por machos y hembras (Westneat et al. 1990; Birkhead & Møller 1992; Petrie & Kempenaers 1998; Griffith et al. 2002; Westneat & Stewart 2003). Las hembras involucradas en cópulas por fuera de la pareja se podría beneficiar directamente (e.g. aseguramiento de la fertilidad) o indirectamente (e.g. por medio de beneficio genéticos para su descendencia) (revisado en Westneat et al. 1990; Birkhead & Møller 1992; Petrie & Kempenaers 1998; Petrie et al. 1998). Sin embargo, si los machos toman represalias reduciendo el cuidado parental en respuesta a una baja certeza de paternidad, y si las hembras no pueden compensar esa perdida, entonces esas hembras tienen menos chances de verse involucradas en cópulas por fuera de la pareja (Mulder et al. 1994; Gowaty 1996; Møller 2000; Arnold & Owens 2002). Por lo tanto, se ha postulado la existencia de una relación entre el cuidado parental y la frecuencia de PEP (Gowaty 1996). En el Cormorán Imperial, la ausencia de PEP podría ser consecuencia de los altos costos que podrían sufrir las hembras

ante una represalia por parte de su compañero social, por involucrarse en copulas por fuera de la pareja (e.g. reducción del cuidado parental, abandono del nido o divorcio). Dado que en esta especie ambos sexos tienen un rol activo en la incubación de los huevos, defensa del nido y alimentación de los pichones por más de tres meses (Svagelj 2009; Svagelj & Quintana, com. pers.), nosotros pensamos que el costo de abandonar el nido o la reducción en el cuidado parental por parte del macho sería demasiado alto para las hembras de Cormorán Imperial.

También se ha predicho, una correlación positiva entre la tasa de mortalidad en adultos y la frecuencia de PEP entre diferentes especies, debido a que los machos tendría mayores probabilidades de abandonar a sus parejas o reducir el cuidado parental en respuesta a una baja certeza de paternidad, en aquellos casos en los que existe alta probabilidad de muerte, y por lo tanto bajas oportunidades de reproducciones futuras (Wink & Dyrcz 1999; Mauck et al. 1999). Wink & Dyrcz (1999) y Arnold & Owens (2002) encontraron una relación positiva entre la PEP y la tasa de mortalidad de adultos entre especies de aves. Datos preliminares de nuestra población anillada de Punta León muestran que la probabilidad de supervivencia anual es ca. 0.9 (Svagelj & Quintana, com. pers.), implicando esto que los machos con poca certeza de paternidad no estarían restringidos en este sentido.

En resumen, tanto el cuidado parental intensivo y la alta tasa de supervivencia anual son dos de los predictores mas importantes de la variación en las tasas de PEP cuando se compra entre los principales linajes de aves (Arnold and Owens 2002). Sin embargo, estos aspectos no explicarían el contraste entre el Cormorán Imperial y las otras dos especies de Phalacrocoracidae analizadas hasta el momento, dado a que éstas están cercanamente emparentadas y como es esperado son muy parecidas en relación a estos dos aspectos (Nelson 2005). Una posible explicación para las diferencias observadas entre ellas, podrían estar relacionada a diferencias en los comportamientos de cortejo y copulación, probablemente

influenciados por los beneficios ecológicos y genéticos inmediatos de emplear estrategias reproductivas alternativas (Arnold & Owens 2002). En el Gran Cormorán, los machos han sido observados copulando con diferentes hembras en el mismo nido, y las hembras han sido observadas moviéndose entre los machos que están establecidos en otros nidos (Kortlandt 1995). De igual forma la mayoría de la cópulas por fuera de la pareja observadas en el Cormorán Europeo se produjeron en los nidos de los machos, donde la hembras respondieron a los despliegues de solicitud de copula por parte de los machos (Graves et al. 1993). A pesar de que no contamos con datos específicos acerca de estos comportamientos en el Cormorán Imperial, nuestras observaciones preliminares sugieren que los despliegues de solicitud de cópulas por parte del macho, y búsqueda activa por parte de las hembras de cópulas por fuera de la pareja, no son tan comunes como lo son en otras especies de la familia (W.S. Svagelj, observación personal). Por lo que estudios de campo detallados evaluando la existencia y la circunstancias que subyacen a estos comportamientos en el Cormorán Imperial son necesarios.

CAPÍTULO VI

DISCUSIÓN FINAL

6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Se abordó el estudio de diversos aspectos de la biología de dos especies hermanas de cormoranes endémicas de Patagonia: *Phalacrocorax magellanicus* y *Phalacrocorax atriceps*. Se hizo uso de herramientas moleculares y de las diversas metodologías de análisis que existentes para este tipo de datos, con el fin de responder a muestras preguntas de interés. El hecho de que exista gran cantidad de bibliografia relacionada a las historias de vida y ecología de *P. magellanicus* y *P. atriceps* (e.g. Quintana 2001, Sapoznikow & Quintana 2003, Punta et al. 2003, Frere et al. 2005, Yorio et al. 2005, Frere et al. 2008, Sapoznikow & Quintana 2008, Quintana et al. 2011, Harris et al 2012, etc.), hace mas fácil la interpretación de nuestros resultados obtenidos desde la perspectiva de la genética molecular, dándole mayor sustento a nuestros hallazgos e interpretaciones. Hay que reconocer que la mayor parte de esa biblografia se basa en estudios realizados en la distribución Atlántica, y que hacen falta estudios similares a lo largo de la distribución Pacífica de estas espcies.

Entre otras cosas, se encontró que las diferencias observadas en lo que respecta a los viajes de forrajeo, y principalmente en lo que concierne al comportamiento durante los períodos post-reproductivos, afecta a la estructuración genética y filogeográfica de estas especies. Se sabe por estudios anteriores, realizados en otros taxa de aves marinas (revisado en Friesen et al. 2007a), que los dos aspectos mencionados, especialmente la distribución post-reproductiva, juegan un rol fundamental en la estructuración genética dentro de este

grupo. Nuestros resultados, interpretados a la luz de los conocimientos ecológicos (e.g. Sapoznikow & Quintana 2003, Punta et al. 2003, Sapoznikow & Quintana 2008), nos permitieron determinar que éstos factores, al igual que en el resto de las aves marinas, tienen una clara incidencia en la estructuración genética de estas especies de cormoranes. A pesar de que las dos especies mostraron diferencias genéticas significativas entre las tres principales regiones propuestas: costa Atlántica, costa Pacífica y región Fueguina. Todos los estimadores de diferenciación poblacional, tanto mitocondriales como nucleares, fueron más altos en *P. magellanicus* que en *P. atriceps* (Tabla 3.4 del capítulo III). La diferencia más drástica entre estas especies estuvo relacionada con la estructuración filogeográfica, la cual resultó bien clara en *P. magellanicus* y totalmente ausente en *P. atriceps*. Todo esto nos da la pauta, de que lo sugerido por las diferencias ecológicas entre estas especies, se condice con nuestros resultados obtenidos desde la aproximación de la genética molecular.

Las diferencias a nivel de estructuración genética estuvieron acompañadas por diferencias en las tasas de migración (*m*), las cuales como era esperado fueron mayores en *P. atriceps*. Es decir que el amplio campo de acción en el mar durante los viajes de forrajeo y la tendencia a dispersar durante los períodos post-reproductivos de esta especie, se traduce en altos niveles de flujo génico, reflejándose esto en una relativamente débil estructuración genética. Un aspecto interesante y llamativo que surge de nuestros resultados, tiene que ver con el hecho de que las dos especies analizadas son capaces dispersar por sobre los Andes y a través de la masa continental que separa a las costas Atlántica y Pacífica. Esto resulta contrario a lo previamente esperado, dada la gran dependencia que estas especies tienen por los ambientes marinos. Sin embargo, fenómenos similares ya habían sido observados en otras especies de aves marinas (e.g. Morris-Pocock et al. 2011, Bicknell et al. 2012), donde barreras

geográficas similares actúan como efectivos, pero no absolutos, impedimentos para el flujo génico.

En lo que respecta a *P. atriceps*, es importante aclarar que a pesar de que ésta mostró una estructuración genética global más débil que la encontrada en *P. magellanicus*, al mismo tiempo la estructuración encontrada fue mayor a la previamente esperada. Se encontraron cuatro clusters genéticos ($K = 4$), producto de los análisis de agrupamiento Beyesiano basados en microsatélites; también se encontraron diferencias genéticas significativas a nivel de ADN nuclear y mitocondrial entre las costas Atlántica, Pacífica y región Fueguina. Proponemos como explicación para este hallazgo, el hecho de que el comportamiento dispersivo que caracteriza a éste especie, tiene un efecto dual sobre la estructuración genética, dependiendo del rango de distribución considerado. Al parecer, el comportamiento dispersivo de *P. atriceps* provocaría una homogeneización de la variabilidad genética cuando se considera un rango de distribución restringido (e.g. solo la distribución marina patagónica, ver Tabla 3.4 del capítulo III). Sin embargo, cuando se consideran rangos de distribución más amplios, se encuentran patrones de diversificación llamativos. Este efecto contrastante de la dispersión con respecto a la diversificación genética, dependiente de las escala geográfica considerada, también fue observado en Passeriformes (Burney & Brumfield 2009). En el caso de *P. atriceps*, cuando se incluyeron a las colonias de agua dulce en los análisis genéticos, se observó un marcado incremento en los estimadores de diferenciación entre poblaciones (ver Tabla 3.4), a pesar de que estas poblaciones constituyen una proporción mínima de la población global de *P. atriceps*, la cual es esencialmente marina. Estas colonias parecen conformar linajes evolutivos independientes, prácticamente aislados de las poblaciones marinas, lo cual se ve sustentado no solo por la evidencia genética aportada aquí (capítulo III), sino también por diferencias a nivel morfológico y ecológico por parte de estas poblaciones

(Rasmussen 1994, Casaux et al. 2010). Si se expande aún más el rango de distribución considerado, surge el hecho de la gran cantidad de subespecies que presenta *P. atriceps*, al menos seis, las cuales conforman el grupo de los 'cormoranes de ojos azules' (Murphy 1936, Nelson 2005). Aquí pudimos estudiar la relación existente entre *P. atriceps* y una de estas subespecies, *Phalacrocorax bransfieldensis*. Encontramos que *P. bransfieldensis*, en acuerdo con la evidencia morfológica y ecológica (Siegel-Causey 1986, Siegel-Causey & Lafevre 1989, Casaux & Baroni 2000), presenta una clara independencia demográfica y constituye unidad evolutiva independiente de *P. atriceps*, sustentado tanto por los datos de ADN nuclear como mitocondrial (capítulo IV). Es evidente que la gran capacidad dispersiva, con ayuda de la alta plasticidad fenotípica y genotípica, otorgan a *P. atriceps* la posibilidad de colonizar y adaptarse a nuevos ambientes (e.g. cuerpos de agua dulce, Antártida, etc.), generando así nuevos e independientes linajes evolutivos, que transcurridos el tiempo necesario podrian transformase nuevas especies (de Queiroz 2007).

Por otro lado, en lo que respecta a la biología reproductiva de *P. atriceps*, se sabe, a partir de estudios preliminares de marcado y recaptura realizados principalmente en la colonia de Punta León, de la tendencia de los individuos adultos de ésta especie, por volver a sus colonia reproductivas año tras año, incluso se ha observado que tienden a ocupar el mismo nido y a repetir parejas reproductivas (Svagelj & Quintana com. pers.). La fidelidad al sitio y a la pareja entre temporadas reproductivas puede aportar numerosos beneficios, sobre todo en especies longevas como lo son las aves marinas y los cormoranes en particular. Algunos ejemplos de estos beneficios son: mejorar la coordinación entre machos y hembras para la incubación de huevos y alimentación de las crías (Choudhury 1995), y aumentar el conocimiento del territorio con el fin de explotarlo mejor año tras año (Hinde 1956, Greenwood & Harvey 1982). En este trabajo pudimos demostrar la existencia de una alta

correspondencia entre la monogamia social y la monogamia genética en *P. atriceps* (capítulo V). Lo que brindaría evidencia de la existencia de beneficios reales por volver a la misma colonia, al mismo nido y repetir pareja entre temporadas, sobre todo en aquellos individuos adultos que han sido exitosos en temporadas reproductivas anteriores. El caso de los individuos juveniles o recién independizados es diferente, ya que el porcentaje de recaptura de estos, es generalmente mucho menor que el de adultos (Svagelj & Quintana datos no publicados). A los juveniles se los ha reportado en colonias que se encuentran alejadas por cientos de kilometro de las colonias natales (Svagelj & Quintana datos no publicados). Esto quiere decir que la dispersión post-reproductiva estaría incrementado las probabilidades, principalmente de los individuos juveniles, de ser reclutados para reproducir en colonias diferentes a las natales, lo cual se traduciría en los relativamente altos niveles de flujo génico, y en la débil estructuración genética observada en *P. atriceps*.

6.2 IMPORTANCIA Y APORTES DE NUESTRO ESTUDIO

Las aves marinas constituyen un grupo de gran relevancia desde lo ecológico, lo geográfico e incluso en algunos casos desde lo económico. Sin embargo, es un grupo que se encuentra relativamente sub-representado en lo que respecta a estudios genético-evolutivos, sobre todo en la región más austral del Neotrópico, de hecho de las 17 especies que nidifican en las costas argentinas, solo tres de ellas: Skua, *Catharacta spp.* (Ritz et al. 2008), Petrel Gigante, *Macronectes spp.* (Techow et al. 2010) y Pingüino de Magallanes, *Spheniscus magellanicus* (Bouzat et al. 2009), habían sido incluidas en estudios de genética de poblaciones y/o filogeográficos en los que se emplearon herramientas moleculares modernas. En el presente trabajo se aporta información de gran valía para el entendimiento de los procesos evolutivos (históricos y contemporáneos) que afectan a la estructuración genética y

filogeográfica de las aves marinas, y que en última instancia podrían derivar y afectar al proceso de especiación de los miembros de este grupo de aves. En particular, se aportó nueva evidencia acerca del efecto de las historias de vida y características ecológicas de las especies sobre las trayectorias evolutivas.

Por otro lado, de nuestro trabajo se desprende conocimiento que puede ser de gran valia a la hora de pensar en mediadas de manejo y conservación que involucren a estas especies. Debido a que la diversidad genética es uno de los niveles de biodiversidad a conservar, junto con las especies y ecosistemas, según la *Imternational Union for Conservation of Nature* (IUCN) (McNeely et al. 1990). Incluso, varios autores han propuesto que las poblaciones genéticamente diferenciadas deberían ser el foco de los proyectos de conservación (Hughes et al. 1997; Hobbs & Mooney 1998). Sin tener intención de entrar en el conflicto de que es importante conservar y que no lo es, varias cuestiones surgen de este trabajo que resultan de suma importancia al respecto.

A pesar de que las dos especies aquí consideradas no presentan ningún tipo de riesgo desde la conservación por *Birdlife International* (2013). Consideramos que el hecho de dar a conocer como se distribuye la variabilidad genética de estas especies en el espacio, y los patrones encontrados, tanto en lo que se refiere la variabilidad genética intraespecífica de *P. magellanicus* y *P. atriceps*, como el hecho de brindar evidencia acerca de la relación taxonómica y demográfica entre esta última y *P. bransfieldensis*, son hallazgos de gran relevancia en lo que respecta a la conservación. Por ejemplo, *P. atriceps* es una de las especies más abundantes de la costa argentina, con ca. 55,000 parejas reproductivas (Frere et al. 2005). Sin embargo, el hecho de haber encontrado diferencias genéticas tan marcadas entre las abundantes poblaciones marinas y las más escasas poblaciones de agua dulce, hace que estas últimas sean vistas de otra manera desde el punto de vista de la conservación,

especialmente porque al menos una de ellas (i.e. Lago Nahuel Huapí), ya ha sido reportada como localmente en peligro de extinción (Casaux et al. 2010). Por otro lado, el hecho de haber demostrado la independencia demográfica entre *P. atriceps* y *P. bransfieldensis* también es sumamente importante desde ésta perspectiva.

En el caso de *P. magellanicus*, la misma es mucho menos abundante que *P. atriceps* a lo largo de las costas argentinas, con ca. 7,000 parejas reproductivas (Frere et al. 2005). Además la forma en la que están constituidas y distribuidas sus colonias (varias colonias conformadas por pocas parejas reproductivas) (Frere et al. 2005, ver Figura 1.1), y las marcadas diferencias genéticas encontradas entre regiones geográficas muy próximas (e.g. entre las colonias de las provincias de Chubut y Santa Cruz), sugieren prestar particular atención a ésta especie, considerando de forma diferenciada a cada una de las unidades evolutivas y de manejo descriptas en el capítulo II (Figura 2.4). Dichas unidades difieren no solo desde lo genético, sino también desde lo morfológico, en lo que respecta a los patrones de coloración (Figura 2.9), por lo tanto la preservación de cada una de estas unidades cobra mayor importancia a la hora de pensar en mediadas para asegurar la correcta subsitencia de ésta especie.

La particular forma de vida que tienen las aves marinas en general, hace que su hábitat esté dividido en tres componentes primarios: (1) hábitat de nidificación, (2) hábitat de forrajeo durante los periodos reproductivos y (3) hábitat en el mar durante los periodos post-reproductivos, esto hace mucho más complejas las medidas a tomar para preservar correctamente a las especies de este grupo (Boersma & Parrish 1998). Cada uno de estos componentes se ve continuamente afectado y amenazado por las diversas actividades antrópicas (e.g. explotación guanera, eco-turismo, pesquería, etc) (Boersma et al. 2002). Por ello es que resulta fundamental prestar atención al tipo de información aquí brindada, a la

hora de elaborar planes de manejo que involucren áreas en las que se encuentren estas especies. Es importante mencionar que muchas de las colonias de las cuales se obtuvieron muestras para este estudio pertenecen ya a espacios protegidos, de diferentes categorías: áreas protegidas provinciales (e.g. Punta León y Punta loma), reservas naturales (e.g. Bahía Uruguay, Roca Foca, Isla Elena, Lago Yehuín) e incluso parques nacionales (e.g. Roca Malaspina, Vernaci Este, Puerto Melo, Monte León, Lago Nahuel Huapí).

Por todo esto, mas allá de los aportes netamente científicos, es que consideramos que la información aquí brindada es de gran importancia desde el punto de vista de la conservación, ya que lo que hace es dar más valor y fundamentación para la existencia de estas áreas protegidas, las cuales resultan imprescindibles para la correcta preservación de éstas y muchas otras especies.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DE LOS CAPITULOS I, II, III, IV y VI

Abbott CL, Double MC, Trueman JW, Robinson A, Cockburn A (2005). An unusual source of apparent mitochondrial heteroplasmy: duplicate mitochondrial control regions in *Thalassarche albatrosses*. *Molecular Ecology*, **14**, 3605-3613.

Anderson CN, Ramakrishnan U, Chan YL, Hadly EA (2005). Serial SimCoal: a population genetics model for data from multiple populations and points in time. *Bioinformatics*, **21**, 1733-1734.

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. Pp 1-35.

Balloux F, Goudet J (2002). Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology*, **11**, 771-783.

Balloux F, Lugon-Moulin N (2002). The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, **11**, 155-165.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48

Bargagli R (2004). *Antarctic ecosystems: environmental contamination, climate change, and human impact*. Springer, **175**.

Barlow EJ, Daunt F, Wanless S, Alvarez D, Reid JM, Cavers S (2011). Weak large-scale population genetic structure in a philopatric seabird, the European Shag *Phalacrocorax aristotelis*. *Ibis*, **153**, 768-778.

Benjamini Y, Yekutieli D (2001). The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. *Annals of statistics*, **29**, 1165-1188.

Bernstein NP, Maxson SJ (1982a). Behaviour of the Antarctic Blue-eyed Shag Phalacrocorax *atriceps bransfieldensis*. *Notornis*, **29**, 197-207

Bernstein NP, Maxson SJ (1982b). Absence of wing-spreading behavior in the Antarctic Blue-eyed Shag (*Phalacrocorax atriceps bransfieldensis*). *The Auk*, **99**, 588-589.

Bicknell A, Knight ME, Bilton D, Reid JB, Burke T, Votier SC (2012). Population genetic structure and long-distance dispersal among seabird populations: Implications for colony persistence. *Molecular Ecology*, **21**, 2863–2876.

Birdlife International (2013). Species factsheet: *Phalacrocorax atriceps*. Available at http://www.birdlife.org/datazone/speciesfactsheet.php?id=3685

Birdlife International (2013). Species factsheet: *Phalacrocorax magellanicus*. Available at http://www.birdlife.org/datazone/speciesfactsheet.php?id=3694

Boersma PD, Parrish JK (1998). Threats to seabirds: Research, education, and societal approaches to conservation. *Avian Conservation: Research and Management*. Island Press, Washington, D.C, Pp. 237–259.

Bouzat JL, Walker BG, Boersma PD (2009). Regional genetic structure in the Magellanic penguin (*Spheniscus magellanicus*) suggests metapopulation dynamics. *The Auk*, ***126***, 326-334.

Bulgarella M, Pizarro LC, Quintana F, Sapoznikow A, Gosztonyi A, Kuba L (2008). Diet of imperial cormorants (*Phalacrocorax atriceps*) and Rock shags (*P. magellanicus*) breeding sympatrically in Patagonia, Argentina. *Ornitologia Neotropical*, **19**, 553-563.

Burg TM, Croxall JP (2004). Global population structure and taxonomy of the wandering albatross species complex. *Molecular Ecology*, **13**, 2345-2355.

Burney CW, Brumfield RT (2009). Ecology predicts levels of genetic differentiation in Neotropical birds. *The American Naturalist*, **174**, 358-368.

Calderón L, Svagelj WS, Quintana F, Lougheed SC, Tubaro PL (2012). No evidence of extra-pair paternity or intraspecific brood parasitism in the Imperial Shag Phalacrocorax atriceps. *Journal of Ornithology*, **153**, 399-404.

Casaux R, Baroni A (2000). Sexual size dimorphism in the Antarctic Shag. *Waterbirds*, **23**, 489-493.

Casaux R, Bertolin ML, Tartara MA, Alarcón P, Porro G (2010). The unexpected diet of breeding Imperial Shags (*Phalacrocorax atriceps*) at the Nahuel Huapí Lake, Patagonia: implications on population trends. *Ornitologia Neotropical*, **21**, 457-462.

Chapuis MP, Estoup A (2007). Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, **24**, 621-631.

Choudhury S (1995). Divorce in birds: a review of the hypotheses. *Animal Bahaviour*, **50**, 413–429

Clapperton C (1993). Nature and environmental changes in South America at the Late Glacial Maximum. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **101,** 189–208.

Corander J, Sirén J, Arjas E (2008). Bayesian spatial modeling of genetic population structure. *Computational Statistics*, **23**, 111-129.

Cornuet JM, Luikart G (1996). Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, **144**, 2001-2014.

Coronato AM, Coronato F, Mazzoni E, Vázquez M (2008). The physical geography of Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Sciences*, **11**, 13-55.

Coyne JA, Orr HA (2004). Speciation. Sinauer Associates. Sunderland, MA.

Crawford NG (2009). SMOGD: software for the measurement of genetic diversity. *Molecular Ecology Resources*, **10**, 556-557.

Cursach JA, Simeone A, Matus R, Soto O, Schlatter R, Tobar C, Ojeda J (2010). Distribución reproductiva del cormorán imperial (Phalacrocorax atriceps) en Chile. Boletín Chileno de Ornitología, Chile, **16**, 9-16.

De Queiroz K (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, **56**, 879-886.

Devillers P, Terschuren JA (1978). Relationships between the blue-eyed shags of South America. *Gerfaut*, **68**, 53-86.

Dieringer D, Schlötterer C (2003). Microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, **3**, 167-169.

Donoghue, M. J. 1985. A critique of the biological species concept and recommendations for a phylogenetic alternative. *Bryologist*, **88**,172–181.

Drummond AJ, Rambaut A (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* **7**, 214.

Duffie CV, Glenn TC, Vargas FH, Parker PG (2009). Genetic structure within and between island populations of the flightless cormorant (*Phalacrocorax harrisi*). *Molecular Ecology*, **18**, 2103-2111.

Earl DA, vonHoldt BM (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, **4**, 359-361.

Elías A (2008). Nuevo registro del pelícano pardo (*Pelecanus thagus*) en la Argentina. *Nuestras Aves*, **53**, 48.

Estoup A, Jarne P, Cornuet, JM (2002). Homoplasy and mutation model at microsatellite loci and their consequences for population genetics analysis. *Molecular Ecology*, **9**, 1591-1604.

Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**, 2611-2620.

Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-49.1

Excoffier L, Novembre J, Schneider S (2000). SIMCOAL: a general coalescent program for the simulation of molecular data in interconnected populations with arbitrary demography. *Journal of Heredity*, **91**, 506-509.

Excoffier L, Lischer HE (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.

Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2003). Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567-1587.

Felsenstein J (2005). PHYLIP: Phylogenetic inference program, version 3.6. University of Washington, Seattle.

Fike JA, DeVault TL, Rhodes OE (2009). Identification of 24 polymorphic microsatellite markers for the double-crested cormorant (*Phalacrocorax auritus*). *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1183-1185.

Fraser CI, Nikula R, Spencer HG, Waters JM (2009). Kelp genes reveal effects of subantarctic sea ice during the Last Glacial Maximum. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **106**, 3249-3253.

Frere E, Quintana F, Gandini P (2005). Cormorants of the Patagonian coast: population status, ecology and conservation. *El Hornero Revista de Ornitologia Neotropical*, **20**, 35-52.

Frere E, Quintana F, Gandini P, Wilson RP (2008). Foraging behaviour and habitat partitioning of two sympatric cormorants in Patagonia, Argentina. *Ibis*, **150**, 558-564.

Friesen VL, Burg TM, McCoy KD (2007a). Mechanisms of population differentiation in seabirds. *Molecular Ecology*, **16**, 1765-1785.

Friesen VL, Smith AL, Gomez-Diaz E, Bolton M, Furness RW, González-Solís J, & Monteiro LR (2007b). Sympatric speciation by allochrony in a seabird. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **104**, 18589-18594

Gaiero DM (2007). Dust provenance in Antarctic ice during glacial periods: From where in southern South America?. *Geophysical Research Letters*, **34**, L17707.

Goodman SJ (1997). RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. *Molecular Ecology*, **6**, 881-885.

Greenwood PJ, Harvey PH (1982). The natal and breeding dispersal of birds. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **13**, 1–21.

Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA (2002). Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, **11**, 2195–2212.

Guindon S, Gascuel O (2003). PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, **52**, 696-704

Harris S, Quintana F, Rey AR (2012). Prey Search Behavior of the Imperial cormorant (*Phalacrocorax atriceps*) during the Breeding Season at Punta León, Argentina. *Waterbirds*, **35**, 312-323.

Harris S, Raya Rey A, Phillips R, Quintana F (2013). Sexual segregation in timing of foraging by imperial shags (*Phalacrocorax atriceps*): is it always ladies first? *Marine Biology* DOI 10.1007/s00227-013-2177-9.

Hamer KC, Schreiber EA, Burger J (2002). Breeding biology, life histories, and life history–environment interactions in seabirds. In: *Biology of Marine Birds* (eds Schreiber EA, Burger J), pp. 217 – 261. CRC Press, Boca Raton, Florida.

Hedrick PW (1999). Perspective: highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, **53**, 313–318.

Hinde RA (1956). The biological significance of the territories in birds. *Ibis*, **98**, 340–369.

Hobbs RJ, Mooney HA (1998). Broadening the extinction debate: population deletions and additions in California and Western Australia. *Conservation Biology*, **12**, 271–283.

Holland BR, Spencer HG, Worthy TH, Kennedy M (2010). Identifying cliques of convergent characters: concerted evolution in the cormorants and shags. *Systematic Biology*, **59**, 433-445.

Hubisz MJ, Falush D, Stephens M, Pritchard JK (2009). Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1322-1332.

Hughes JB, Daily GC, Ehrlich PR (1997). Population diversity: its extent and extinction. *Science*, **278**, 689–692

Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PD (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 998-1002.

Jakobsson M, Rosenberg NA (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801-1806.

Jost LOU (2008). GST and its relatives do not measure differentiation. *Molecular Ecology*, **17**, 4015-4026.

Kennedy M, Gray RD, Spencer HG (2000). The phylogenetic relationships of the shags and cormorants: can sequence data resolve a disagreement between behavior and morphology?. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **17**, 345-359.

Kimura M, Weiss GH (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, **49**, 561.

Knowles LL (2009). Statistical phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **40**, 593-612

Kuhnt W, Holburn A, Hall R, Zuvela M, Käse R (2004). Neogene history of The Indonesian flow through. In: Continent–ocean interactions within East Asian marginal seas. *Geophysical Monograph* **149**, American Geophysical Union, 252–282.

Latch EK, Dharmarajan G, Glaubitz JC, Rhodes OE (2006). Relative performance of Bayesian clustering software for inferring population substructure and individual assignment at low levels of population differentiation. *Conservation Genetics*, **7**, 295-302.

Lima PC, Grantsau R, Lima R, Santos SS (2002). Notas sobre os registros brasileiros de *Calonectris edwardsii* (Oustalet, 1883) e *Pelagodroma marina hypoleuca* (Moquin-Tandon, 1841) e primeiro registro de *Phalacrocorax bransfieldensis*. *Ararajuba*, **10**, 263-265

Livermore R, Nankivell A, Eagles G, Morris P (2005). Paleogene opening of Drake's Passage. *Earth and Planetary Science Letters*, **236**, 459–470.

Masello JF, Quillfeldt P, Munimanda, GK, Klauke N, Segelbacher G, Schaefer HM, Faillá M, Cortés M, Moodley Y (2011). The high Andes, gene flow and a stable hybrid zone shape the genetic structure of a wide-ranging South American parrot. *Frontiers in Zoology*, **8**, 16.

McNeely JA, Miller KR, Reid WV, Mittermeier RA, Werner TB (1990). Conserving the world's biological diversity. IUCN, World Resources Institute, Conservation International, WWF-US, and the World Bank, Washington, DC.

Meirmans PG, Hedrick PW (2011). Assessing population structure: FST and related measures. *Molecular Ecology Resources*, **11**, 5-18.

Mercer JH (1976). Glacial history of southernmost South America. *Quaternary Research*, **6**, 125-166.

Mercer DM (2008). Phylogeography and Population Genetic Structure of Double-crested Cormorants (*Phalacrocorax auritus*). A Thesis submitted to the Oregon State University, pag. 22

Moritz C (1994). Defining Evolutionarily Significant Units for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375.

Morris-Pocock JA, Taylor SA, Birt TP, Damus M, Piatt JF, Warheit KI, Friesen VL (2008). Population genetic structure in Atlantic and Pacific Ocean common murres (*Uria aalge*): natural replicate tests of post-Pleistocene evolution. *Molecular Ecology*, **17**, 4859-4873.

Morris-Pocock JA, Taylor SA, Birt, TP, Friesen VL (2010). Concerted evolution of duplicated mitochondrial control regions in three related seabird species. *BMC Evolutionary Biology*, **10**, 14.

Morris-Pocock JA, Anderson DJ, Friesen VL (2011). Mechanisms of global diversification in the brown booby (*Sula leucogaster*) revealed by uniting statistical phylogeographic and multilocus phylogenetic methods. *Molecular Ecology*, **20**, 2835-2850.

Murphy RC (1936). Oceanic birds of South America: a study of species of the related coasts and seas, including the American quadrant of Antarctica, based upon the Brewster-Sanford collection in the American Museum of Natural History. *Macmillan Co,* **2**, pag. 878-881.

Narum SR (2006). Beyond Bonferroni: less conservative analyses for conservation genetics. *Conservation Genetics*, **7**, 783-787.

Neilan BA, Wilton AN, Jacobs D (1997). A universal procedure for primer labelling of amplicons. *Nucleic Acids Research*, **25**, 2938-2939.

Nelson JB (2005). *Pelicans, Cormorants, and their Relatives: The Pelecaniformes (Bird Families of the World).* Oxford University Press, NY, New York.

Neigel JE, Avise JC (1986) Phylogenetic relationships of mitochondrial DNA under various demographic models of speciation. In: *Evolutionary Processes and Theory* (eds Karlin S, Nevo E), pp. 515 – 535. Academic Press, New York.

Oro D (2003). Managing seabird metapopulations in the Mediterranean: constraints and challenges. *Scientia Marina*, **67**, 13-22.

Orta J (1992). Family Phalacrocoracidae (Cormorants). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (eds) Handbook of the birds of the world, vol **1**. Lynx, Barcelona, pp 326–353.

Patterson SA, Morris-Pocock JA, Friesen VL (2011). A multilocus phylogeny of the Sulidae (Aves: Pelecaniformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **58**, 181-191.

Peakall ROD, Smouse PE (2005). GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.

Phillimore AB, Freckleton RP, Orme CDL, Owens IP (2006). Ecology predicts large-scale patterns of phylogenetic diversification in birds. *The American Naturalist*, **168**, 220-229.

Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998). Highly polymorphic microsatellite markers in the great cormorant Phalacrocorax carbo. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 138-140.

Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999). BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, **90**, 502-503.

Ponce JF, Rabassa J, Coronato A, Borromei A (2011). Palaeogeographical evolution of the Atlantic coast of Pampa and Patagonia from the last glacial maximum to the Middle Holocene. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 363-379.

Posada D (2008). JMODELTEST: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, **25**, 1253-1256.

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945–959.

Punta G, Saravia J (1993). Distribución, abundancia y aspectos de la biología reproductiva del Cormorán Cuello Negro *Phalacrocorax magellanicus* en la Provincia del Chubut, Argentina. *Hornero*, **13**, 295-298.

Punta G, Yorio P, Herrera G (2003). Temporal patterns in the diet and food partitioning in Imperial Cormorants (*Phalacrocorax atriceps*) and Rock Shags (*P. magellanicus*) breeding at Bahía Bustamante, Argentina. *The Wilson Bulletin*, **115**, 307-315.

Quintana, F. 1999. Diving behavior of Rock Shags at a Patagonian colony of Argentina. *Waterbirds*, **22**, 466-471.

Quintana F (2001). Foraging behaviour and feeding locations of Rock shags *Phalacrocorax magellanicus* from a colony in Patagonia, Argentina. *Ibis*, **143**, 547-553.

Quintana F, Wilson R, Dell'Arciprete P, Shepard E, Laich AG (2011). Women from Venus, men from Mars: inter-sex foraging differences in the imperial cormorant *Phalacrocorax atriceps* a colonial seabird. *Oikos*, **120**, 350-358.

Rabassa J, Clapperton CM (1990). Quaternary glaciations of the southern Andes. *Quaternary Science Reviews*, **9**, 153-174.

Rabassa J, Coronato A, Salemme M (2005). Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean Region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences*, **20,** 81-103.

Rabassa J, Coronato A, Martínez O (2011). Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: An updated review. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 316-335.

Rambaut A, Drummond AJ (2007) Tracer v1.4, Available from http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer.

Ramos VA, Ghiglione MC (2008). Tectonic evolution of the Patagonian Andes. *Developments in Quaternary Sciences*, **11**, 57-71.

Rasmussen PC (1987). Molts of the Rock Shag and new interpretations of the plumage sequence. *Condor*, **89**, 760-766.

Rasmussen PC (1991). Relationships between coastal South American King and Blue-eyed shags. *Condor*, **93**, 825-839.

Rasmussen PC (1994). Geographic variation in morphology and allozymes of South American Imperial shags. *The Auk*, **111**, 143-161.

Remsen Jr. JV, *et al*. Consulted: December (2012). A classification of the bird species of South America. *American Ornithologists Union*. http://www. museum. lsu. edu/~ Remsen/SACCBaseline. html.

Richards CL, Carstens BC, Knowles L (2007). Distribution modelling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographical hypotheses. *Journal of Biogeography*, **34**, 1833-1845.

Ritz MS, Millar C, Miller GD, Phillips RA, Ryan, et al. (2008). Phylogeography of the southern skua complex-rapid colonization of the southern hemisphere during a glacial period and reticulate evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, **49**, 292-303.

Rosenberg NA (2003). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 137-138.

Rousset F (2008). GENEPOP'007: a complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 103-106.

Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003). DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496-2497.

Sapoznikow A, Quintana F (2003). Foraging behavior and feeding locations of Imperial Cormorants and Rock Shags breeding sympatrically in Patagonia, Argentina. *Waterbirds*, **26**, 184-191.

Sapoznikow A, Quintana F (2008). Colony and nest site fidelity of the Rock shag (*Phalacrocorax magellanicus*). *Journal of Ornithology*, **149**, 639-642.

Scher HD, Martin EE (2006). Timing and climatic consequences of the opening of Drake Passage. *Science*, **312**, 428–430.

Sérsic AN, Cosacov A, Cocucci AA, Johnson LA, Pozner R, Avila LJ, Sites Jr JW, Morando M (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**, 475-494.

Siegel-Causey D (1986). The courtship behavior and mixed-species pairing of King and Imperial Blue-eyed Shags (*Phalacrocorax albiventer* and *P. atriceps*). *The Wilson Bulletin*, **98**, 571-580.

Siegel-Causey D, Lefevre C (1989). Holocene records of the Antarctic Shag (Phalacrocorax [Notocarbo] bransfieldensis) in Fuegian waters. *Condor*, **91**, 408-415.

Siegel-Causey D (1997). Molecular variation and biogeography of Rock shags. *Condor*, **99**, 139-150.

Sinnott RW (1984). Virtues of the Haversine. *Sky and Telescope*, **68**, 159.

Slatkin M (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457-462.

Steeves TE, Anderson DJ, Friesen VL (2005). A role for nonphysical barriers to gene flow in the diversification of a highly vagile seabird, the masked booby (*Sula dactylatra*). *Molecular Ecology*, **14**, 3877-3887.

Szpiech ZA, Jakobsson M, Rosenberg NA (2008). ADZE: a rarefaction approach for counting alleles private to combinations of populations. *Bioinformatics*, **24**, 2498-2504.

Techow NMSM, et al. (2010) Speciation and phylogeography of giant petrels *Macronectes*. *Molecular phylogenetics and evolution*, **54**, 472-487.

Waits JL, Avery ML, Tobin ME, Leberg PL (2003). Low mitochondrial DNA variation in double-crested cormorants in Eastern North America. *Waterbirds*, **26**, 196-200.

Waples RS, Gaggiotti O (2006). Invited review: What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology*, **15**, 1419-1439.

Weir BS, Cockerham CC (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.

Whitlock MC (2005). Combining probability from independent tests: the weighted Z-method is superior to Fisher's approach. *Journal of Evolutionary Biology*, **18**, 1368-1373.

Wilson GA, Rannala B (2003). Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics*, **163**, 1177-1191.

Wright S (1943). Isolation by distance. *Genetics*, **28**, 114.

Wright S (1931). Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.

Yorio P, Copello S, Kuba L, Gosztonyi A, Quintana F (2010). Diet of Imperial cormorants *Phalacrocorax atriceps* Breeding at Central Patagonia, Argentina. *Waterbirds*, **33**, 70-78.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS DEL CAPITULO V

Anderson DJ, Boag PT (2006). No extra-pair fertilization observed in Nazca Booby (*Sula granti*) broods. *Wilson Journal of Ornithololology*, **118**, 244–247.

Anker-Nilssen T, Kleven O, Aarvak T, Lifjeld JT (2008) No evidence of extra-pair paternity in the Atlantic Puffin *Fratercula arctica*. *Ibis*, **150**, 619–622.

Anker-Nilssen T, Kleven O, Aarvak T, Lifjeld JT (2010). Low or no occurrence of extra-pair paternity in the Black Guillemot *Cepphus grylle*. *Journal of Ornithology*, **151**, 247–250.

Arnold KE, Owens IPF (2002). Extra-pair paternity and egg dumping in birds: life history, parental care and the risk of retaliation. *Proceedings of the Royal Society of Biology* , **269**, 1263–1269.

Baião PC, Parker PG (2009). No evidence of extra-pair fertilization in Red-footed Boobies (*Sula sula*). *Waterbirds*, **32**, 179–182.

Baumgarten MM, Kohlrausch AB, Miyaki CY, Ochotorena de Freitas TR, Mellender de Araújo A (2001) DNA fingerprinting and parentage in Masked (*Sula dactylatra*) and Brown (*S. leucogaster*) boobies. *Ornitología Neotropical* **12**:319–326.

Birkhead TR, Møller AP (1992). Sperm competition in birds: evolutionary causes and consequences. Academic Press, San Diego.

Dearborn DC, Anders AD, Parker PG (2001). Sexual dimorphism, extrapair fertilizations, and operational sex ratio in Great Frigatebirds (*Fregata minor*). *Behavioral Ecolology*, **12**, 746–752.

Ellegren H (2000). Microsatellite mutation in the germline: implications for evolutionary inference. *Trends in Genetics*, **16**, 551–558.

Gowaty PA (1996). Battle of the sexes and origins of monogamy. In: Black JM (ed) Partnerships in birds: the study of monogamy. Oxford University Press, Oxford, pp 21–52.

Graves J, Hay R, Scallan M, Rowe S (1992). Extra-pair paternity in the shag, *Phalacrocorax aristotelis*, as determined by DNA fingerprinting. *Journal of Zoology*, **226**, 399–408.

Graves J, Ortega-Ruano J, Slater PJB (1993). Extra-pair copulations and paternity in shags: do females choose better males? *Proceedings of the Royal Society of Biology*, **253**, 3–7.

Griffith SC, Owens IPF, Thuman KA (2002). Extra pair paternity in birds: a review of interspecific variation and adaptive function. *Molecular Ecology*, **11**, 2195–2212.

Hackett SJ, Kimball RT, Reddy S, Bowie RCK, Braun EL, Braun MJ, Chojnowski JL, Cox A, Han K, Harshman J, Huddleston GJ, Marks BD, Miglia KJ, Moore WS, Sheldon FH, Steadman DW, Witt CC, Tamaki Y (2008) A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, **320**, 1763–1768.

Huyvaert KP, Anderson DJ, Jones TC, Duan W, Parker PG (2000). Extra-pair paternity in Waved Albatrosses. *Molecular Ecology*, **9**, 1415–1419.

Ibarguchi G, Gissing GJ, Gaston AJ, Boag PT, Friesen VL (2004). Male-biased mutation rates and the overestimation of extrapair paternity: problem, solution, and illustration using Thick-billed Murres (*Uria lomvia*, Alcidae). *Journal of Heredity*, **95**, 209–216.

Ivanova NV, Dewaard JR, Hebert PDN (2006). An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 998–1002.

Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, **16**, 1099–1106.

Kortlandt A (1995). Patterns of pair-formation and nest-building in the European Cormorant *Phalacrocorax carbo sinesis*. *Ardea*, **83**, 11–25.

Lack D (1968) Ecological adaptations for breeding in birds. Methuen, London.

Ležalová-Piálková R (2011). Molecular evidence for extra-pair paternity and intraspecific brood parasitism in the Black-headed Gull. *Journal of Ornithology*, **152**, 291–295.

Ligon JD (1999) The evolution of avian breeding systems. Oxford University Press, Oxford.

Lijfeld JT, Harding AMA, Mehlum F, Oigarden T (2005). No evidence of extra-pair paternity in the Little Auk *Alle alle*. *Journal of Avian Biology*, **36**, 484–487.

Malacalza VE, Navas JR (1996). Biología y ecología reproductiva de *Phalacrocorax albiventer* (Aves: Phalacrocoracidae) en Punta León, Chubut, Argentina. *Ornitologia Neotropical*, **7**, 53–61.

Mauck RA, Marschall EA, Parker PG (1999) Adult survival and imperfect assessment of parentage: effects on male parenting decisions. *American Naturalist*, **154**, 99–109.

Møller AP (2000). Male parental care, female reproductive success and extra-pair paternity. *Behavioral Ecology*, **11**, 161–168.

Møller AP, Birkhead TR (1993) Cuckoldry and sociality: a comparative study of birds. *American Naturalist*, **142**, 118–140.

Mulder RA, Dunn PO, Cockburn RA, Lazenby-Cohen KA, Howell MJ (1994). Helpers liberate female fairy-wrens from constraints on extra-pair mate choice. *Proceedings of the Royal Society of Biology,* **255**, 223–229.

Neilan BA, Wilton AN, Jacobs D (1997). A universal procedure for primer labelling of amplicons. *Nucleic Acids Research*, **25**, 2938–2939.

Nelson JB (2005). Pelicans, cormorants and their relatives. The Pelecaniformes. Oxford University Press, Oxford.

Orta J (1992) Family Phalacrocoracidae (Cormorants). In: del Hoyo J, Elliott A, Sargatal J (eds) Handbook of the birds of the world, Vol. 1. Lynx Edicions, Barcelona, pp 326–353.

Owens IPF, Bennett PM (1995). Ancient ecological diversification explains life-history variation among living birds. *Proceedings of the Royal Society of Biology,* **261**, 227–232.

Petrie M, Doums C, Møller AP (1998). The degree of extra-pair paternity increases with genetic variability. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**, 9390–9395.

Petrie M, Kempenaers B (1998). Extra-pair paternity in birds: explaining variation between species and populations. *Trends in Ecological Evolution,* **13**, 52–58.

Piertney SB, Carss DN, Goostrey A (2003). Population variation in the frequency of extra-pair paternity in the Great Cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Vogelwelt*, **124**, 149–155.

Piertney SB, Goostrey A, Dallas JF, Carss DN (1998). Highly polymorphic microsatellite markers in the Great Cormorant *Phalacrocorax carbo*. *Molecular Ecology*, **7**, 138–140.

Quintana F, López G, Somoza G (2008). A cheap and quick method for DNA-based sexing of birds. *Waterbirds,* **31**, 485–488.

Rogers AD, Johnston NM, Murphy EJ, Clarke A (2012). Antarctic ecosystems: an extreme environment in a changing world. *Wiley-Blackwell,* **14**, 418-454.

Sokal RR, Rohlf FJ (2009). Introduction to biostatistics 2nd ed. Dover Publications, New York.

Stutchbury BJ, Morton ES (1995). The effect of breeding synchrony on extra-pair mating systems in songbirds. *Behaviour*, **132**, 675–690.

Svagelj WS (2009). Breeding ecology of dimorphic seabirds in relation to parental investment and brood sex ratio theories. Ph.D. Thesis, University of Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina [in Spanish]

Svagelj WS, Quintana F (2007). Sexual size dimorphism and sex determination by morphometric measurements in breeding Imperial Shags (*Phalacrocorax atriceps*). *Waterbirds,* **30**, 97–102.

Svagelj WS, Quintana F (2011a). Breeding performance of the Imperial Shag (*Phalacrocorax atriceps*) in relation to year, laying date and nest location. *Emu* **111**, in press

Svagelj WS, Quintana F (2011b). Egg-size variation in the Imperial Shag: on the importance of individual effects. *Condor,* **113**, in press.

Weatherhead PJ, Yezerinac SM (1998). Breeding synchrony and extra-pair mating in birds. *Behavioral Ecolology and Sociobiology*, **43**, 217–219.

Westneat DF, Sherman PW (1997). Density and extra-pair fertilizations in birds: a comparative analysis. *Behavioral Ecolology and Sociobiology*, **41**, 205–215.

Westneat DF, Sherman PW, Morton ML (1990). The ecology and evolution of extra-pair copulations in birds. *Current Ornithology*, **7**, 331–369.

Westneat DF, Stewart IRK (2003). Extra-pair paternity in birds: causes, correlates, and conflict. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **34**, 365–396.

Wink M, Dyrcz A (1999). Mating systems in birds: a review of molecular studies. *Acta Ornitologica*, **34**, 91–109.

Yom-Tov Y (1980) Intraspecific brood parasitism in birds. *Biological Review*, **55**, 93–108.

Yom-Tov Y (2001) An updated list and some comments on the occurrence of intraspecific nest parasitism in birds. *Ibis*, **143**, 133–143.

Yorio P, Quintana F, Campagna C, Harris G (1994) Diversidad, abundancia y dinámica espacio-temporal de la colonia mixta de aves marinas en Punta León, Patagonia. *Ornitologia Neotropical*, **5**, 69–73.

								Microsatélites							ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**Cor01**	**Cor05**	**Cor06**	**ATPase**
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4453**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4454**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4455**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4456**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4457**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4458**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4459**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4460**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	-	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4461**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4462**	Arg	Chubut	La Charas (CH)	42,5	64,5	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4449**	Arg	Chubut	Punta Arco (PA)	42,7	64,98	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4450**	Arg	Chubut	Punta Arco (PA)	42,7	64,98	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4451**	Arg	Chubut	Punta Arco (PA)	42,7	64,98	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4452**	Arg	Chubut	Punta Arco (PA)	42,7	64,98	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4409**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	-	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4410**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4411**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4412**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4413**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4414**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4415**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4416**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4417**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4418**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4419**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4420**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4421**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4422**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4423**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4424**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4425**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	-	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4426**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-

Apéndice 1.a. Detalle de todas las muestras utilizadas en los análisis de *P. magellanicus*.

Abreviaciones: Arg = Argentina, Chi = Chile, Sang = Sangre, Musc = Músculo.

								Microsatélites							ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**Cor01**	**Cor05**	**Cor06**	**ATPase**
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4427**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4428**	Arg	Chubut	Punta Loma (PL)	42,81	64,88	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 3386**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	-	-	-	-	-	-	-	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4429**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4430**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4431**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4432**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4433**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4434**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4435**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4436**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4437**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4438**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4439**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4440**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4441**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4442**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4443**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4444**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4445**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4446**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4447**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 4448**	Arg	Chubut	Vernaci Este (VE)	45,18	66,48	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11445**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11446**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11447**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11448**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11449**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11450**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11451**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11452**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6595**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√

								Microsatélites							ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**Cor01**	**Cor05**	**Cor06**	**ATPase**
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6596**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6597**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6598**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6599**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6601**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6602**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6603**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6604**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6605**	Arg	Santa Cruz	Cabo Blanco (CB)	47,2	65,75	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11459**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Musc	-	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11460**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11464**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6445**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6581**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6582**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6583**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6584**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6585**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6586**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6587**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6588**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	-	√	√	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6589**	Arg	Santa Cruz	Isla Elena (IE)	47,75	65,93	Sang	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11462**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11463**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11465**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11466**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11467**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11468**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11469**	Arg	Santa Cruz	Isla Pingüino (IP)	47,9	65,71	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11472**	Arg	Santa Cruz	Bahia Uruguay (UR)	47,64	66,01	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11473**	Arg	Santa Cruz	Bahia Uruguay (UR)	47,64	66,01	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11474**	Arg	Santa Cruz	Bahia Uruguay (UR)	47,64	66,01	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-

								Microsatélites							ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**Cor01**	**Cor05**	**Cor06**	**ATPase**
P. magellanicus	**KUNHM 11475**	Arg	Santa Cruz	Bahia Uruguay (UR)	47,64	66,01	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11476**	Arg	Santa Cruz	Bahia Uruguay (UR)	47,64	66,01	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11500**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11501**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11502**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11503**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11504**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	-	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11505**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11506**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11507**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11508**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11509**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11510**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11511**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,88	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11436**	Arg	-	Is. Malvinas, Is. Liveley (IM)	52,02	58,46	Musc	√	√	√	√	-	√	-	√
P. magellanicus	**KUNHM 11437**	Arg	-	Is. Malvinas, Is. Liveley (IM)	52,02	58,46	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11438**	Arg	-	Is. Malvinas, Is. Liveley (IM)	52,02	58,46	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11480**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11481**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11482**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11483**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11484**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11485**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11486**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	-	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11487**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11488**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11489**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11490**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**KUNHM 11492**	Arg	T. del Fuego	Bahia Usuhia (BU)	54,84	68,25	Musc	√	√	√	√	√	√	√	-
P. magellanicus	**AMNH 3192**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3193**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3194**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-

								Microsatélites							ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**Cor01**	**Cor05**	**Cor06**	**ATPase**
P. magellanicus	**AMNH 3195**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3198**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3199**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3200**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3201**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3209**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**AMNH 3230**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	-	-	-	-
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6398**	Chi	XII Región	Est. de Maga. (EM)	52,47	69,57	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6399**	Chi	XII Región	Est. de Maga. (EM)	52,47	69,57	Sang	√	√	√	-	√	√	√	√
P. magellanicus	**MACN-Or-ct 6400**	Chi	XII Región	Est. de Maga. (EM)	52,47	69,57	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11606**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11607**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11608**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11609**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11610**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11552**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11553**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11603**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11604**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11605**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11555**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11556**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11557**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√
P. magellanicus	**KUNHM 11558**	Chi	X Región	Is. Chiloe, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√

								Microsatélites								ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**PcD6**	**Cor05**	**Cor06**	**Cor43**	**ATP*asa***
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3453**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3426**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3382**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	-	-	-	-	-	-	-	-	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3398**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3452**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3443**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3425**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3381**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3388**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	-	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3415**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3445**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3444**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3435**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3436**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3427**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3418**	Arg	Chubut	Punta Leon (PL)	43,03	64,28	Sang	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3451**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3405**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3396**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3387**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3413**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3403**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3376**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3394**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3412**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3421**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3450**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3441**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3423**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3414**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3432**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3378**	Arg	Chubut	Roca Malaspina (RM)	45,18	66,51	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-

Apéndice 1.b. Detalle de todas las muestras utilizadas en los análisis de *P. atriceps y P. bransfieldensis*. Abreviaciones: Arg = Argentina, Chi = Chile, Sang = Sangre, Musc = Músculo.

								Microsatélites								ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**PcD6**	**Cor05**	**Cor06**	**Cor43**	**ATP*asa***
P. atriceps	**KUNHM 13082**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	-	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13083**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13084**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13085**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13086**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13087**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13088**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13089**	Arg	Chubut	Puerto Melo (PM)	45,05	65,84	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4463**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4464**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4465**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	-	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4466**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4467**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	-	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4468**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	-	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4469**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4470**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4471**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4472**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4473**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4474**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4475**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4476**	Arg	Chubut	Isla Arce (IA)	45,00	65,50	Sang	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6610**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6611**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6612**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6613**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6614**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6615**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6616**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6617**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6618**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6619**	Arg	Santa Cruz	Isla Chata (CH)	47,93	65,73	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-

								Microsatélites								ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**PcD6**	**Cor05**	**Cor06**	**Cor43**	**ATP*asa***
P. atriceps	**KUNHM 13108**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13109**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13110**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13111**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13113**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13114**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13115**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13116**	Arg	Santa Cruz	Ba. Oso Marino (BO)	47,91	65,78	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13148**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13149**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13150**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13151**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13152**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13096**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13097**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13099**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13100**	Arg	Santa Cruz	Roca Foca (RF)	47,73	65,83	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3375**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	-	-	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3439**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3448**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3384**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3393**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	-	-	-	-	-	-	-	-	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3377**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3402**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3411**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3420**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	-	√	-	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 3429**	Arg	Santa Cruz	Pico Quebrado (PQ)	50,25	68,63	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13248**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,86	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13249**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,86	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13250**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,86	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13251**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,86	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13455**	Arg	Santa Cruz	Monte Leon (ML)	50,33	68,86	Musc	√	√	√	-	√	√	√	√	-

								Microsatélites								ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**PcD6**	**Cor05**	**Cor06**	**Cor43**	**ATP*asa***
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4477**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4478**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4479**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4480**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4481**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4482**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4483**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4484**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4485**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4486**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 4487**	Arg	T. del Fuego	Isla Becasses (IB)	54,95	67	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**AMNH 3202**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**AMNH 3203**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**AMNH 3204**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**AMNH 3205**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**AMNH 3215**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**AMNH 3216**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	-	-	-	-
P. atriceps	**AMNH 3229**	Chi	XII Región	Puerto Williams (IN)	54,93	67,65	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13119**	Arg	T. del Fuego	Isla Bridges (IB)	54,86	68,23	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13120**	Arg	T. del Fuego	Isla Bridges (IB)	54,86	68,23	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13121**	Arg	T. del Fuego	Isla Bridges (IB)	54,86	68,23	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13122**	Arg	T. del Fuego	Isla Bridges (IB)	54,86	68,23	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13123**	Arg	T. del Fuego	Isla Bridges (IB)	54,86	68,23	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13124**	Arg	T. del Fuego	Isla Bridges (IB)	54,86	68,23	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13117**	-	-	Is. Malvinas, Is Liveley (IM)	52,02	58,46	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13118**	-	-	Is. Malvinas, Is Liveley (IM)	52,02	58,46	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**IM423**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**IM446**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**IM452**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**IM453**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	-	√	-	-	-	√	√	-	√
P. atriceps	**IM454**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	-	-	-	-	-	-	-	-	√
P. atriceps	**IM455**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√

								Microsatélites								ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**PcD6**	**Cor05**	**Cor06**	**Cor43**	**ATP*asa***
P. atriceps	**IM456**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**IM457**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**IM460**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**IM462**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**IM463**	-	-	Is. Malvinas, Is. New (IM)	51,71	61,28	Sang	-	-	√	-	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13224**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. atriceps	**KUNHM 13225**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13227**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13232**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13234**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13235**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13236**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13222**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13226**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13228**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13229**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13231**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13233**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13237**	Arg	T. del Fuego	Lago Yehuin (YE)	54,41	67,7	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6442**	Chi	XII Región	Est. de Magallanes (EM)	52,47	69,57	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6443**	Chi	XII Región	Est. de Magallanes (EM)	52,47	69,57	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**MACN-Or-ct 6444**	Chi	XII Región	Est. de Magallanes (EM)	52,47	69,57	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13266**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13267**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13268**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13269**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13270**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13271**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13272**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	-	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13273**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	-	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13274**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13275**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√

								Microsatélites								ADNmt
Especie	**Nro Catalogo**	País	Prov.	Localidad	Lat	Long	Muestra	**PcD2**	**PcT3**	**PcT4**	**PcD5**	**PcD6**	**Cor05**	**Cor06**	**Cor43**	**ATP*asa***
P. atriceps	**KUNHM 13276**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13277**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13278**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 13279**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11619**	Chi	X Región	Is. Chiloé, Llanquihue (LL)	41,8	76,66	Musc	-	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11625**	Arg	Chubut	Lago Vintter (LV)	43,93	71,6	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11626**	Arg	Chubut	Lago Vintter (LV)	43,93	71,6	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11627**	Arg	Chubut	Lago Vintter (LV)	43,93	71,6	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11628**	Arg	Chubut	Lago Vintter (LV)	43,93	71,6	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11629**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11630**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11631**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11632**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11633**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11634**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. atriceps	**KUNHM 11635**	Arg	Rio Negro	L. Nahuel Huapi (NH)	40,98	71,5	Musc	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5775**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	-	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5776**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5777**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5778**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5779**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5780**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5781**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5782**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5783**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5784**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	√
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5785**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	√	√	√	√	√	-
P. bransfieldensis	**MACN-Or-ct 5786**	Arg	Antártida	Is. Shetland, Is. Nelson (AN)	62,18	58,47	Sang	√	√	√	-	√	√	√	√	-

Apéndice 2.b. Estadísticas sumarias por cluster obtenido con STRUCTURE para *P. magellanicus*. CH: Chubut, SC: Santa Cruz, RF: Region Fueguina, CP: Costa Pacífica. n, numero de individuos analizados, *Na*, numero de alelos, *Ho* Heterocigosis observada; *He*, heterocigosis esperada p-val, valor de significancia para el equilibrio de H-W. Los valores en negrita indican desvios significativos del equilibrio de HW ($p < 0.01$ corregido por B-Y FDR).

	PcD2					**PcT3**					**PcT4**					**PcD5**				
	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p
CH	61	13	0.78	0.82	0.006	62	7	0.58	0.62	0.06	62	6	**0.53**	**0.70**	**0.00002**	61	6	**0.57**	**0.61**	**0**
SC	46	7	**0.5**	**0.76**	**0.0007**	47	6	0.55	0.73	0.006	46	6	0.67	0.77	0.25	44	3	**0.20**	**0.33**	**0.0007**
RF	18	13	0.94	0.91	0.42	18	6	0.72	0.76	0.71	17	8	0.94	0.85	0.71	15	4	0.46	0.62	0.005
CP	14	3	0.42	0.51	0.05	14	6	0.64	0.79	0.06	14	6	0.78	0.83	0.14	14	3	0.70	0.57	0.52

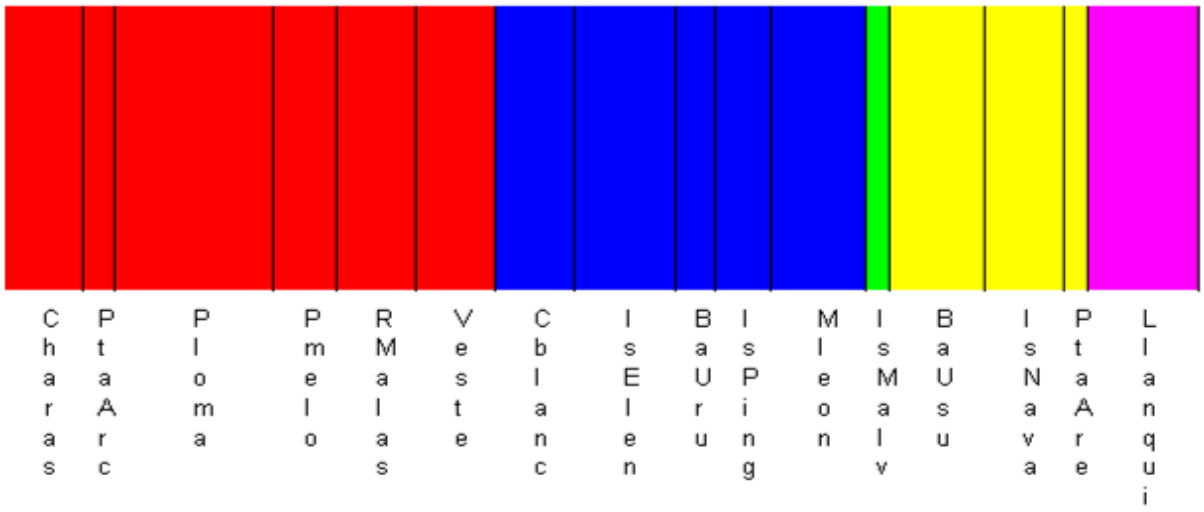
	Cor05					**Cor06**					**Cor43**				
	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p
CH	61	5	0.45	0.47	0.79	62	2	0.25	0.31	0.21	62	6	0.69	0.72	0.61
SC	46	6	0.43	0.40	0.88	47	4	0.44	0.41	1	47	5	0.63	0.64	0.16
RF	17	6	0.70	0.72	0.47	18	4	0.50	0.54	1	17	4	0.52	0.63	0.24
CP	14	3	0.64	0.52	0.72	14	1	-	-	-	14	4	0.71	0.75	0.57

Apéndice 2.b. Estadísticas sumarias por cluster obtenido con STRUCTURE para *P. atriceps* y *P. brasfieldensis* (AN) CA: Costa Atlantica, RF: Región Fueguina, CP: Costa Pacífica, YE: Yehuin, AN (Isla Nelson, Antártida). n, número de individuos analizados , *Na*, numero de alelos, *Ho* Heterocigosis observada; *He*, heterocigosis esperada p-val, valor de significancia para el equilibrio de H-W. Los valores en negrita indican desvios significativos del equilibrio de HW ($p < 0.01$ corregido por B-Y FDR).

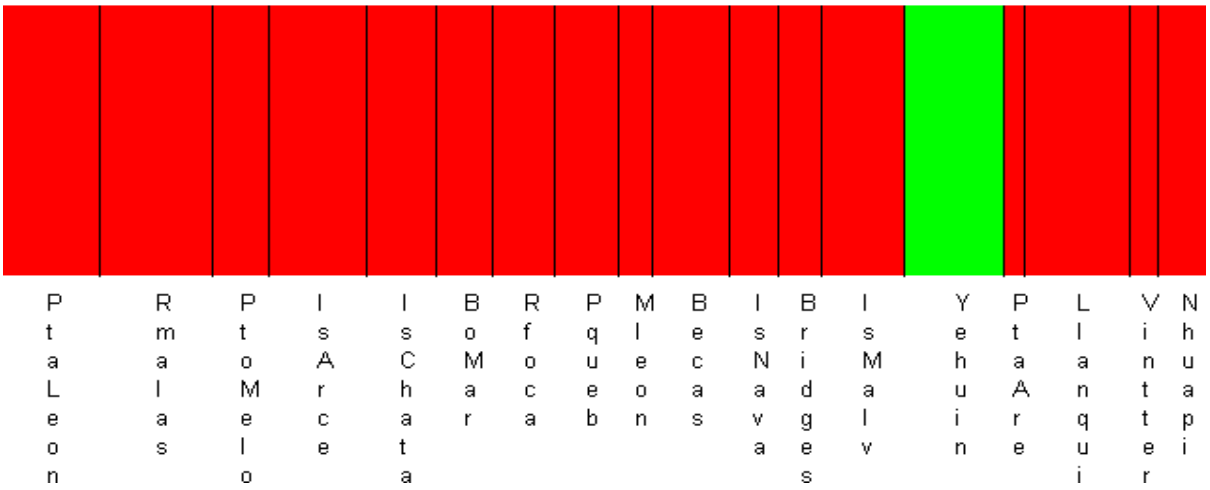
	PcD2					**PcT3**					**PcT4**					**PcD5**				
	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p
CA	92	10	0.79	0.81	0.083	94	13	0.87	0.80	0.40	93	16	0.80	0.87	0.034	86	6	0.21	0.20	0.10
RF	37	11	0.81	0.87	0.11	37	12	0.81	0.84	0.59	38	16	0.84	0.92	0.008	37	8	0.45	0.54	0.08
CP	25	8	0.76	0.81	0.34	26	11	0.88	0.86	0.65	26	13	0.96	0.88	0.96	24	6	0.54	0.53	0.96
YE	14	8	0.64	0.69	0.35	14	8	0.78	0.82	0.27	14	8	0.85	0.84	0.77	14	2	0.50	0.45	1
AN	12	3	0.50	0.40	1	12	12	0.81	0.93	0.07	12	15	0.91	0.96	0.11	12	3	0.18	0.65	0.003

	PcD6					**Cor05**					**Cor06**					**Cor43**				
	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p	n	Na	Ho	He	p
CA	90	1	-	-	-	90	12	1	0.90	0.44	89	9	0.79	0.79	0.36	90	4	0.86	0.72	0.10
RF	38	2	0.02	0.02	-	31	14	0.87	0.91	0.42	31	9	0.90	0.82	0.54	31	9	0.67	0.73	0.31
CP	26	2	0.11	0.17	0.19	26	11	0.88	0.88	0.46	25	7	0.72	0.78	0.36	26	5	**0.61**	**0.74**	**0.001**
YE	13	2	0.15	0.36	0.07	14	8	0.85	0.82	0.59	14	5	0.50	0.58	0.29	14	2	0.14	0.25	0.21
AN	12	1	-	-	-	12	10	0.91	0.89	0.39	12	8	0.75	0.86	0.03	12	1	-	-	-

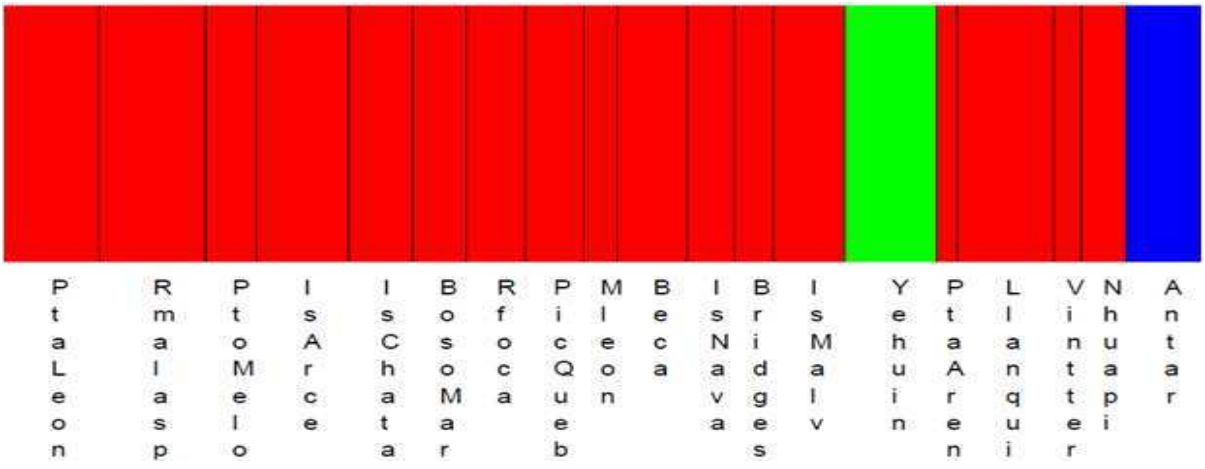
Apéndice 3.a. Partición más probable obtenida para *P. magellanicus* con el programa BAPS (*K* = 5).



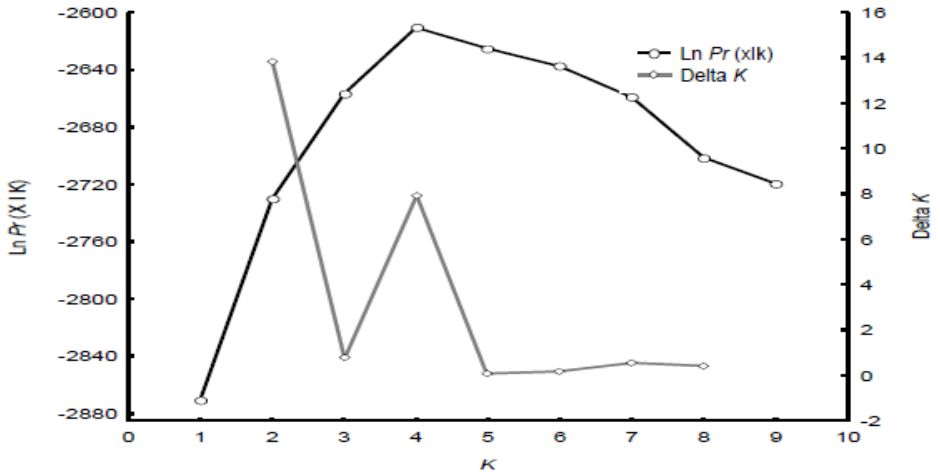
Apéndice 3.b. Partición más probable obtenida para *P. atriceps* con el programa BAPS (*K* = 2).



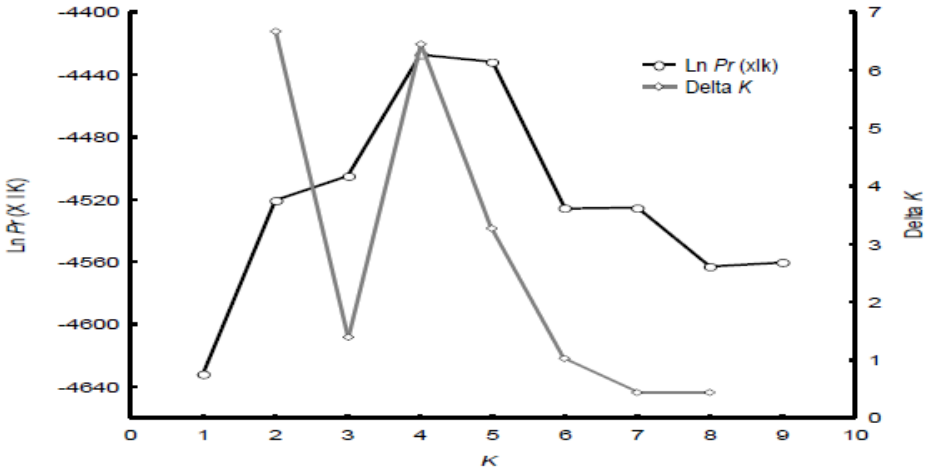
Apéndice 3.c. Partición más probable obtenida para *P. atriceps* + *P. bransfieldensis* (Antar) con BAPS (*K* = 3).



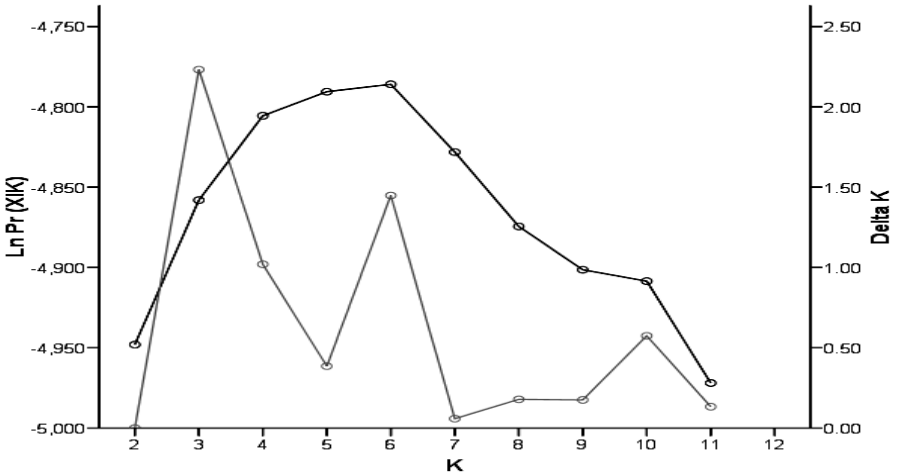
Apéndice 4.a. Delta *K* (Δ*K*) y Ln *Pr* (x|k) para *P. magellanicus*, de *K* = 1 a 9.



Apéndice 4.b. Delta *K* (Δ*K*) y Ln *Pr* (x|k) para *P. atriceps*, de *K* = 1 a 9.



Apéndice 5.c. Delta *K* (Δ*K*) y Ln *Pr*(x|k) para *P. atriceps*, incluyendo P. bransfieldensis, desde *K* = 2 a *K* = 12



Apéndice 5.a. Comparaciones entre pares de colonias de estimadores de diferenciación poblacional. Por encima de la diagonal: valores de Fst y entre paréntesis valores de Rst, por debajo de la diagonal: valores de Φst. Valores en negrita indican significancia al 0.05 y los asteriscos indican valores q fueron significativos al 0.01, luego de las correcciones por comparaciones múltiples (BY FDR).

	CH	**PL**	**RM**	**VE**	**PM**	**IE**	**CB**	**IP**	**UR**	**ML**	**BU**	**IN**	**LL**
CH		0.03 (0.02)	**0.06** (0.07)	0 (0.03)	0.02 (0.07)	**0.13*** **(0.28*)**	**0.08*** **(0.16)**	**0.08** (0.14)	**0.07** (0.19)	**0.07*** (0.13)	**0.11*** **(0.21*)**	**0.15*** (0.24)	**0.22*** **(0.32*)**
PL	0.15		0.03 (0.01)	0 (0)	0.03 (0.04)	**0.06*** **(0.23*)**	**0.05** **(0.11)**	0.04 (0.07)	0.05 (0.15)	**0.06*** (0.04)	**0.07*** **(0.11)**	**0.09*** (0.16)	**0.19*** **(0.25*)**
RM	0.15	0		0 (0)	0.06 (0.10)	**0.11*** (0.13)	**0.07** (0.04)	**0.07** (0.02)	**0.11*** (0.13)	0.04 (0.05)	**0.07*** (0.11)	**0.10*** (0.01)	**0.19*** **(0.30*)**
VE	0.15	0	0		0.01 (0.04)	**0.09*** **(0.17)**	**0.06** (0.06)	0.06 (0.03)	0.05 (0.11)	0.05 (0.04)	**0.06*** **(0.11)**	**0.10*** (0.07)	**0.20*** **(0.29*)**
PM	-	-	-	-		**0.08** **(0.32*)**	0.03 (0.17)	0.02 (0.11)	0.03 (0.11)	**0.12*** (0.10)	**0.12*** **(0.20)**	**0.09*** (0.41)	**0.27*** **(0.37*)**
IE	0.19	0	0	0	-		0.02 (0.05)	0.01 (0.03)	0.06 (0.10)	**0.14*** (0.10)	**0.14*** **(0.29*)**	**0.07** (0.40)	**0.29*** **(0.53*)**
CB	0.19	0	0	0	-	0		0 (0)	0.03 (0.06)	**0.09*** (0.03)	**0.12*** **(0.16)**	0.06 (0.12)	**0.25*** (0.09)
IP	-	-	-	-	-	-	-		0 (0)	**0.08*** (0.03)	**0.10*** **(0.20*)**	0.06 (0.02)	**0.25*** **(0.43*)**
UR	-	-	-	-	-	-	-	-		0.07 (0.08)	**0.10** **(0.29*)**	0.09 (0.07)	**0.25*** **(0.51*)**
ML	0	0	0	0	-	0	0	-	-		**0.05** (0.07)	**0.12*** (0)	**0.10*** **(0.22*)**
BU	**0.82***	**0.88***	**0.88***	**0.88***	-	**0.88***	**0.88***	-	-	**0.76***		0.04 (0)	**0.08*** (0.06)
IN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		**0.12*** **(0.37)**
LL	**0.97***	**1***	**1***	**1***	-	**1***	**1***	-	-	**0.85***	**0.78***	-	

Apéndice 5.a. Comparaciones entre pares de colonias de estimadores de diferenciación poblacional, el color celeste indica la colonia de Isla Nelson (*P. bransfieldensis*). Por encima de la diagonal: valores de Fst y entre paréntesis valores de Rst, por debajo de la diagonal: valores de Φst. Valores en negrita indican significancia al 0.05 y los asteriscos indican valores q fueron significativos al 0.01, luego de las correcciones por comparaciones múltiples (BY FDR).

	PL	**RM**	**PM**	**IA**	**IC**	**BO**	**RF**	**PQ**	**BE**	**IN**	**IM**	**YE**	**LL**	**NH**	**AN**
PL	-	0.01 (0.03)	0 (0)	0 (0)	**0.07*** (0.01)	0.02 (0.01)	0.01 (0.02)	**0.05*** (0.01)	0.01 **(0.10)**	0.04 (0.06)	**0.07*** (0.02)	**0.14*** **(0.14)**	0.02 (0.02)	**0.10*** **(0.16)**	**0.19*** **(0.63)***
RM	0.06	-	0 (0.01)	0 (0.06)	**0.04*** (0.02)	0.02 (0)	0.02 (0)	**0.03** (0.05)	0.01 (0.07)	0.04 (0.03)	**0.04*** (0.06)	**0.13*** **(0.14)**	0.01 (0.02)	**0.08*** (0.08)	**0.17*** **(0.55)***
PM	-	-	-	0 (0)	0.03 (0)	0 (0)	0.02 (0.04)	0.01 (0.01)	0 (0.11)	0.01 (0.04)	**0.04*** (0.06)	**0.12*** (0.10)	0.01 (0.02)	**0.09*** (0.10)	**0.15*** **(0.60)***
IA	-	-	-	-	**0.05*** (0.01)	0.02 (0.02)	**0.04** (0.06)	**0.05** (0.09)	0.02 (**0.13**)	0.01 (0.02)	**0.05*** (0.03)	**0.14*** (**0.16**)	0.01 (0.03)	**0.10*** (0.15)	**0.15*** **(0.57)***
IC	0.17	0.44	-	-	-	0 (0)	0.04 (0.01)	0 (0.01)	**0.04** (0.04)	0.01 (0)	**0.04*** (0)	**0.09*** (0.14)	**0.04*** (0.02)	**0.17*** (0.15)	**0.22*** **(0.54)***
BO	-	-	-	-	-	-	0.01 (0)	0 (0.07)	0.03 (0.05)	**0.07** (0.10)	**0.05*** (0.02)	**0.12*** (**0.18**)	0.03 (0)	**0.13*** (0.09)	**0.19*** **(0.57)***
RF	-	-	-	-	-	-	-	0.01 (0.05)	0.03 (0.03)	0.05 (0.05)	**0.06*** (0.03)	**0.10*** (**0.16**)	0.03 (0.01)	**0.13*** (0.10)	**0.20*** **(0.47)***
PQ	0.03	0.23	-	-	0	-	-	-	0.03 (0.10)	0.02 (0.01)	**0.04*** (0.04)	**0.08*** (0.11)	**0.04*** (0.07)	**0.16*** (**0.20**)	**0.22*** **(0.63)***
BE	**0.50***	**0.78***	-	-	**0.39***	-	-	**0.42***	-	0 (0.10)	0.02 (0.01)	**0.12*** (**0.17**)	0.01 (0.03)	**0.07*** (0.16)	**0.13*** **(0.52)***
IN	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 (0)	**0.07*** (0)	0.03 (0.04)	**0.08*** (0.14)	**0.10*** -
IM	0.21	**0.56**	-	-	0.33	-	-	0.20	**0.78***	-	-	**0.09*** (**0.14**)	**0.04*** (0.04)	**0.12*** (**0.17**)	**0.17*** **(0.44)***
YE	**0.74***	**0.90***	-	-	0.49	-	-	**0.58**	**0.87***	-	**0.95***	-	**0.10*** (**0.11**)	**0.24*** (0.12)	**0.28*** **(0.57)***
LL	**0.55***	**0.85***	-	-	**0.47***	-	-	**0.47**	0.10	-	**0.90***	**1***	-	**0.06*** (0.04)	**0.14*** **(0.55)***
NH	0	0.13	-	-	0.14	-	-	0	**0.49**	-	0.31	**0.80***	0.58	-	**0.18*** **(0.59)***
AN	**0.66***	**0.85***	-	-	**0.72***	-	-	**0.65***	**0.92***	-	**0.90***	**1***	**1***	**0.76***	-