

UCH-FC
MAG-EBE
Q59
C.1

**LA COMPLEJA HISTORIA DE LA SUBFAMILIA
Trichomycterinae COMO MODELO PARA LA
DISPERSIÓN Y DISTRIBUCIÓN DE FAUNA
ÍCTICA EN CHILE**

Tesis

**Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De**

**Magíster en Ciencias Biológicas
con Mención en Ecología Y Biología Evolutiva**

Facultad De Ciencias

Por

Claudio A. Quezada Romegialli

Marzo, 2010

**Director de Tesis Dr. David Véliz Baeza
Co Director de Tesis Mg. Irma Vila Pinto**



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Claudio Andrés Quezada Romegialli

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

.....

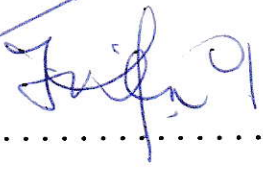
Director de Tesis:

Dr. David Véliz Baeza



Co-Director de Tesis

Mg. Irma Vila Pinto

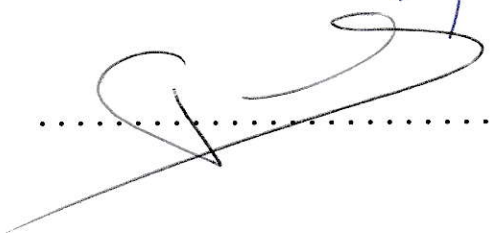


Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Gloria Arratia



Dr. Elie Poulin





Resumen biográfico

Claudio Quezada Romegialli es Ingeniero Ambiental de la Universidad de Valparaíso, ex sede Valparaíso de la Universidad de Chile. Cursó sus estudios medios en Viña del Mar y Santiago. Sus estudios primarios fueron cursados en Santiago y Chuquicamata.

La genealogía académica de Claudio se inició a su llegada a la Universidad de Chile a principios de 2008, junto a David Véliz e Irma Vila. Durante el año 2009, Claudio visitó a Gloria Arratia en la División de Peces del Instituto de Biodiversidad, The Kansas University, EEUU. Claudio fue becario CONICYT durante el curso de esta maestría.

Los intereses de Claudio están enfocados en comprender la estructura y funcionamiento de los sistemas acuáticos con el objeto de conservarlos.





Agradecimientos

En primer lugar esta tesis no se hubiera realizado sin el excepcional apoyo de mi director, David Véliz. Iguales agradecimientos merece Irma Vila, por sus sabios consejos durante mi corta permanencia en el Laboratorio de Limnología. También deseo expresar mi profunda gratitud a Gloria Arratia, quien fue un gran apoyo durante mi estadía en Lawrence, Kansas, y durante el transcurso de esta tesis. Igualmente a Elie Poulin, y a Mauricio Canals, integrantes de la comisión de evaluación de esta tesis.

No puedo dejar de agradecer a los chicos y chicas de los Laboratorios de Limnología y de Ecología Molecular, y a Martita. Agradezco también a Mabel Fuentes quien realizó todo el trabajo práctico correspondiente a los AFLP y Marcela Espinoza quien realizó prácticamente todas las extracciones de ADN.

Especiales agradecimientos merece Lorena Poblete, (la mejor) ayudante de terreno y un gran apoyo en buena parte de esta tesis. A todos aquellos que colaboraron con muestras y en terreno: Pato Acuña, Nacho Tobar, Negro Riveros, Marco Estrada, Evelyn Olgún, Roberto Quispe, Hernán Ortega y sin duda, muchos otros que olvido en este momento. También agradezco enormemente a Kathryn Mickle, Edward Wiley, Matt Davis y Hans-Peter Schultze de la división de peces en la Universidad de Kansas, por sus interesantes comentarios que encaminaron la parte final de esta tesis.

Esta tesis fue financiada por el proyecto FONDECYT 11060496 (David Véliz), Basal PFB 023, Contrato ICM-P05-002. Agradezco al Departamento de Postgrado y Postítulo de la Vicerrectoría de Asuntos Académicos por financiar la pasantía en la Universidad de Kansas, EEUU, y a CONICYT por la beca de maestría.



Índice General

Resumen biográfico	iii
Agradecimientos	iv
Índice General.....	v
Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras	viii
Resumen	xi
Abstract.....	xii
Introducción General	1
Capítulo I Filogenia preliminar de <i>Trichomycterus</i>	4
Filogenia del género <i>Trichomycterus</i> Valenciennes, 1833 en Chile	5
Introducción.....	5
Contexto geológico.....	6
Hipótesis filogenéticas.....	8
Materiales y métodos.....	9
Muestras.....	9
Extracción de ADN, amplificación y secuenciación.....	10
Reconstrucción filogenética	11
Análisis estadístico	13
Estimación del ancestro común más reciente	13
Resultados.....	14
Análisis de genes por separado.....	14
Análisis combinado de genes	15
Rango Altoandino.....	16
Chile centro sur.....	17
Estimación del ancestro común más reciente	18
Discusión	18
Selección y combinación de genes	18
Rango Altoandino.....	19
Chile centro sur.....	20
Contexto geológico.....	23
Integración con la diversificación de ictiofauna.....	25



Capítulo II Genética de poblaciones y morfología.....	41
Genética de poblaciones y aspectos morfológicos: ¿es válido <i>Trichomycterus maculatus</i> Valenciennes, 1846?.....	41
Introducción.....	41
Materiales y métodos.....	44
Selección de individuos.....	44
Extracción de ADN, secuenciación y genotipado.....	45
Secuenciación y asignación de individuos.....	46
Análisis estadísticos.....	47
Análisis morfológicos.....	48
Resultados.....	49
Asignación de individuos.....	49
Secuenciación de la región control.....	50
Análisis de similaridad.....	50
Análisis morfológico.....	50
Discusión.....	51
¿Especies, sub-especies o poblaciones locales?.....	53
Conectividad entre poblaciones y conservación.....	55
Discusión y conclusiones finales.....	66
Bibliografía.....	69



Índice de Tablas

Tabla I-1 Lista de haplotipos, según gen secuenciado, indicando especies, individuos, vertiente y cuencas respectivas.	35
Tabla I-2 Distancia genética intra e inter clados de la Región Altoandina, según análisis restringido CIT+COI+DLoop (1471 caracteres), y corregidas por el modelo Kimura de 2 parámetros.	40
Tabla II-1 Cuadro comparativo de la asignación individual entre STRUCTURE y FLOCK, considerando aquellos individuos con valores de asignación intermedios.	64
Tabla II-2 Pruebas pareadas del análisis de similaridad para las localidades muestreadas en el río Maipo.	65



Índice de Figuras

- Figura I-1** Topología de la hipótesis filogenética basada en el gen CITB y según tres métodos de inferencia: A) parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en línea gruesa las disconformidades de acuerdo a la métrica Robinson-Foulds. 28
- Figura I-2** Topología de la hipótesis filogenética basada en el gen COI y según tres métodos de inferencia: A) parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en línea gruesa las disconformidades de acuerdo a la métrica Robinson-Foulds 29
- Figura I-3** Cuadro comparativo de la topología del set combinado a partir de tres metodologías de inferencia: A) máxima parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en línea gruesa las disconformidades. 30
- Figura I-4** Cuadro comparativo de la topología y soporte del set CITB+COI+DLoop en el Rango Altoandino a partir de tres metodologías de inferencia: A) máxima parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en rojo las disconformidades. La Figura D muestra además las longitudes de las ramas según inferencia bayesiana. . 31
- Figura I-5** Hipótesis filogenética desarrollada en MrBayes, con el set de datos CITB+COI. Los valores de soporte corresponden a bootstrap MP / bootstrap MV / probabilidad a posteriori. Sólo se indica el soporte para los nodos que coincidieron en las tres metodologías. El *

indicado en algunos nodos MV indica que dicho método no resolvió el nodo de la misma forma que los demás métodos (ver Figura I-3). 32

Figura I- 6 Ubicación de la Cordillera Incaica (verde) y Cuenca de Abanico (violeta) de acuerdo a Charrier y col. (2007). Se indica con flechas la ubicación de ambos paleorelieves. 33

Figura I- 7 Mapa con la distribución de los haplotipos considerados en el estudio. 34

Figura II-1 Ubicación de localidades de muestreo en los ríos Aconcagua y Maipo. Río Aconcagua: A1 = LlayLlay, A2 = Panquehue, A3 = Pocuro; río Maipo: M1 = Puangue, M2 = Isla de Maipo, M3 = Angostura. 57

Figura II-2 Gráficos para la inferencia apropiada de grupos genéticos (K) para structure, en función del método de Evanno y col. (2005). A. Se indica ΔK promedio respecto a K considerando las tres especies putativas. B. Se indica ΔK promedio respecto a K considerando sólo los individuos en el río Maipo. En ambas figuras se infiere que existen K = 2 grupos genéticos. 58

Figura II-3 A. Proporción de asignación individual según structure (K=2), la línea punteada indica el nivel 0,5 de admixtura, y el color indica la pertenencia: gris oscuro = grupo A, gris claro = grupo B. Se indica con * aquellos individuos que fueron asignados con prob. <95%. B. Proporción de individuos asignados a cada grupo genético según flock (K=2), valores negativos indica asignación al grupo A, y valores positivos indica asignación al grupo

B; la línea punteada indica el valor 0. Los individuos están ordenados de tal forma que coinciden verticalmente en ambas figuras. 59

Figura II-4 Red de haplotipos construída con las secuencias de la región control. Cada círculo corresponde a un haplotipo, el tamaño es proporcional a la frecuencia. Los colores se asignaron de acuerdo a los genotipos: color blanco grupo A, negro grupo B, gris grupo C. Se indica además con números el haplotipo correspondiente a los individuos de la Tabla II-1. 60

Figura II-5 Escalamiento no métrico multidimensional (stress mínimo 0,09) de los individuos genotipados. Cuadrados corresponde al grupo A (río Maipo), triángulos verdes corresponde al grupo B (río Maipo) y triángulos azules corresponde al grupo C (río Aconcagua). 61

Figura II-6 Escalamiento no métrico multidimensional de los individuos genotipados en el río Maipo, según localidad de muestreo. 61

Figura II-7 Análisis de componentes principales con los caracteres morfométricos externos como variables. Triángulo azul corresponde al grupo A (río Maipo), triángulo verde corresponde al grupo B (río Maipo), y cuadrado corresponde al grupo C (río Aconcagua). 62

Figura II-8 Matriz de diagramas de dispersión de las variables morfométricas. Las cruces corresponden al grupo genético A (río Maipo), los triángulos al grupo genético B (río Maipo), y los círculos corresponden al grupo C (río Aconcagua). 63



Resumen

La fauna íctica en Chile es un complejo ensamble de peces que ha sido moldeado en conjunto a la evolución geológica del territorio, probablemente durante los últimos 30 millones de años. Para comprender el contexto de diversificación de la ictiofauna, se utilizó como modelo a la subfamilia Trichomycterinae, un grupo de peces del Orden Siluriformes que está presente a lo largo de todo Chile. A través de la filogenia molecular de este grupo se reconstruye la historia de colonización y dispersión de fauna íctica desde el Mioceno medio. Se encuentra evidencia molecular que soporta una hipótesis morfológica recientemente propuesta, indicando que el género *Trichomycterus* sería polifilético. El grupo de especies del Rango Altoandino estaría emparentado a la fauna Andina y Neotropical, en cambio el grupo de especies de Chile centro sur formaría un grupo independiente. Un resultado destacable es el hallazgo de dos clados mitocondriales, que coexisten en el río Maipo. Debido a la posible existencia de una especie anteriormente sinonimizada, se pone a prueba la hipótesis de aislamiento reproductivo y diagnosis morfológica. Se encuentra que entre los ríos Aconcagua y Maipo existirían 3 agrupamientos genéticos, uno de ellos diagnosticable en base al sistema de la línea lateral. El tercer grupo no sería diagnosticable en base a este carácter, sin embargo, el análisis multivariado de los caracteres externos sugiere una diferenciación incipiente. Se concluye que es correcta la revalidación de *Trichomycterus maculatus* Valenciennes y se designa temporalmente a la población del río Aconcagua como *Trichomycterus sp grp spp maculatus*, hasta realizar una descripción formal de *T. maculatus* y la comparación morfológica necesaria.

Abstract

Ichthyological fauna in Chile is a complex assembly of fishes that has been developed together with the geological evolution of the environment, probably during the last 30 millions of years. To understand the context of diversification of ichthyofauna, the Trichomycterinae subfamily, a group of fishes of the Siluriformes Order was used as a model. Through molecular phylogeny, the history of colonization and dispersion of ichthyofauna was reconstructed since middle Miocene. A molecular evidence was found that support a morphological hypothesis which indicate that *Trichomycterus* genus would be polyphyletic. The group of species of the High Andean Range would be more closely related to Andean and Neotropical fauna, in turn the group of species of central-south Chile would be an independent group. A remarkable finding is the existence of two mitochondrial clades, that coexists in Maipo River. Due to the possible existence of a species formerly synonymized, the hypothesis of reproductive isolation and morphological diagnosis was tested. It is found that between Aconcagua and Maipo rivers would exist three genetic groups, one of them morphologically distinguishable based upon the lateralis system. The third group would not be distinguishable based on this character, but multivariate analysis of external characters suggests that it would be starting to differentiate from the other groups. It is concluded that it is correct the renewal of *Trichomycterus maculatus* Valenciennes, and the population of Aconcagua River it is designated temporally as *Trichomycterus sp grp spp maculatus*, until a formal description of *T. maculatus* and the necessary comparation would be done.

Introducción General

La ictiofauna de aguas continentales en Chile se caracteriza por ser poco diversa, presentar pequeños tamaños corporales y alto endemismo, retener caracteres primitivos y estar adaptada a ríos de alta pendiente y caudal fluctuante (Vila *et al.* 1999, Dyer 2000b). Las características hidrológicas y barreras biogeográficas (Desierto de Atacama, Océano Pacífico), serían las razones que expliquen la distribución restringida de los taxa (Vila *et al.* 1999), en conjunto al efecto que la Cordillera de Los Andes habría tenido sobre la fauna íctica (Lundberg *et al.* 1998, Vila *et al.* 1999, Dyer 2000b, Habit & Victoriano 2005). Algunos autores han mencionado “las cuencas no están conectadas probablemente desde la formación del macizo andino” (Pardo 2002), en tanto que otros trabajos se refieren a un evento inicial de elevación en el Mioceno, dejando una laguna cronológica de 21 millones de años para referirse posteriormente a las glaciaciones del Pleistoceno (Ruzzante *et al.* 2006). Aún más, Unmack y col. (2009b) afirmaron que “la Cordillera de Los Andes se formó en el Terciario”, y “como resultado de la naturaleza topográfica de esta área, muchos de los ríos son cortos y fluyen de este a oeste”, sin mencionar una sola referencia. Por el contrario, existe considerable evidencia geológica y suficiente avance en los últimos años (e.g. Ramos *et al.* 1996, Gregory-Wodzicki 2000, Charrier *et al.* 2002, Giambiagi *et al.* 2003, Hartley 2003, Charrier *et al.* 2005, Charrier *et al.* 2007, Charrier & Farías 2008, Farías *et al.* 2008, Garziona *et al.* 2008, Charrier *et al.* 2009, entre otros) para contextualizar correctamente la evolución hidrológica en esta porción – olvidada de facto o por omisión– de América del Sur.

La familia Trichomycteridae corresponde a un grupo de más de 200 especies

descritas en todo Sudamérica (de Pinna 1998), su carácter monofilético está bien corroborado (de Pinna 1998, de Pinna & Wosiacki 2003) y se reconoce a la familia Nematogenyidae como grupo hermano (Arratia 1992, de Pinna 1998). Se ha mencionado, de acuerdo a caracteres morfológicos que “una clasificación que refleje la real complejidad de la familia requerirá el reconocimiento de varias nuevas subfamilias y géneros” (de Pinna & Wosiacki 2003), lo que manifiesta la necesidad de efectuar una revisión a nivel de especies dentro de los tricomictéridos (de Pinna 1998). Uno de los grupos en el cual las relaciones aún no logran ser elucidadas corresponde a la subfamilia Trichomycterinae, y en particular al género *Trichomycterus* Valenciennes (de Pinna 1998). Este género resulta un grupo “basurero” pues, al no estar diagnosticado por ninguna sinapomorfía, cualquier nueva especie que no pueda ser asignada a alguna de las demás subfamilias, o al resto de los géneros dentro de Trichomycterinae, se establece por defecto a *Trichomycterus* (de Pinna 1998, Wosiacki & de Pinna 2008a).

A pesar de esta problemática, estos taxa exhiben interés sistemático (Arratia 1992, Arratia & Huaquin 1995), evolutivo (Fernández & Schaefer 2009) y ciertamente pueden ser muy informativos en aspectos biogeográficos (de Pinna 1998), pero antes de poner a prueba este tipo de hipótesis (i.e. Unmack *et al.* 2009b), debemos conocer muy bien la diversidad específica, y el marco filogenético en el que ellas se encuentran. Este razonamiento es particularmente apropiado para la realidad chilena, donde no tenemos certeza de la cantidad real de especies ("alrededor de 44 especies" mencionan Habit y col. 2006) y existen nuevos registros de *Trichomycterus* Valenciennes (Siluriformes, Trichomycteridae) en la Región Altoandina (obs. pers.). Además, urgen trabajos filogenéticos y de revisión de especies en trichomictéridos (de Pinna 1998, Dyer 2000b)

y en conjunto a ciertos trabajos que carecen de una identificación específica apropiada (e.g. Unmack *et al.* 2009a) sólo se agrega confusión al listado y distribución de fauna íctica continental.

En virtud de los antecedentes expuestos, el objetivo general de esta tesis es inferir la historia evolutiva de los bagres de la subfamilia Trichomycterinae, como modelo para la diversificación de ictiofauna en Chile. Para ello, se han desarrollado dos capítulos:

- (i) El primer capítulo trata acerca de la filogenia molecular del género *Trichomycterus*, describiendo y discutiendo el posible efecto que los cambios geológicos e hidrológicos han tenido sobre la ictiofauna. Uno de los principales hallazgos se refiere a la identificación de dos clados del putativo *Trichomycterus areolatus* Valenciennes en el río Maipo, lo que da pie al segundo capítulo;
- (ii) El segundo capítulo plantea la pregunta ¿Es válido *Trichomycterus maculatus* Valenciennes? y trata sobre aspectos operativos en la delimitación de especies, utilizando diversas metodologías y criterios, además de discutir aspectos de conservación.

Capítulo I Filogenia preliminar de *Trichomycterus*

Filogenia del género *Trichomycterus* Valenciennes, 1833 en Chile

Introducción

Tanto a nivel de Familia, como de Género, el Orden Siluriformes corresponde al grupo de peces más numeroso en Chile (Habit *et al.* 2006, Vila *et al.* 2006), y se distribuye desde el extremo norte hasta la Patagonia (Arratia 1983c, Zama & Cárdenas 1984). Dentro de este grupo, la subfamilia Trichomycterinae está representada por tres géneros: *Trichomycterus* Valenciennes, *Hatcheria* Eigenmann y *Bullockia* Arratia *et al.* (Arratia 1990). Dentro del género *Trichomycterus*, *Trichomycterus areolatus* Valenciennes es la especie con más amplia distribución encontrándose desde el río Limarí hasta Chiloé (Dyer 2000b). En contraste, *Trichomycterus chiltoni* Eigenmann está restringido a la cuenca de los ríos Bío-Bío y Andalién (Dyer 2000b), donde coexiste con *T. areolatus* (Scott *et al.* 2007). En el Rango Altoandino (18°-26° Latitud Sur en territorio Chileno) se encuentran 3 especies de tricomicterines: *Trichomycterus laucaensis* Arratia y *Trichomycterus chungaraensis* Arratia restringidos al río Lauca y lago Chungará respectivamente, y *Trichomycterus rivulatus* Valenciennes que posee una distribución más amplia (Arratia 1983c). Los restantes tricomicterines corresponden a representantes de géneros monoespecíficos; *Hatcheria macraei* (Girard) está distribuido en los cauces de Chiloé y Aysén que fluyen al Pacífico y la Patagonia Argentina, en tanto que *Bullockia maldonadoi* (Eigenmann) se distribuye de forma fragmentada entre los ríos Maule e Imperial (Dyer 2000b).

El énfasis dado al endemismo característico (Arratia 1983c, Arratia 1998), las potenciales implicancias biogeográficas de tricomicteridos (de Pinna 1998) y la

presencia de un fósil de *Nematogenys* en Chile (Rubilar 1994, Azpelicueta & Rubilar 1998), podrían ser muy útiles como argumentos complementarios para describir la historia de la distribución geográfica de peces en Chile. Además, dado que existe la necesidad de una revisión específica de *Trichomycterus* (de Pinna 1998) en toda Sudamérica, y particularmente en Chile urge un estudio filogenético de tricomicterines (Dyer 2000b), la reconstrucción filogenética de este grupo de especies puede ayudar a entender aspectos distribucionales, evolutivos y de diversificación de fauna en el país.

Contexto geológico

Se ha asociado un patrón de divergencia Este-Oeste para los caraciformes del género *Cheirodon* Girard (Caraciformes, Cheirodontinae) y los ateriniformes *Basilichthys* Girard y *Odonthestes* Evermann & Kendall (Ateriniformes, Aterinopsidae), lo que sugiere la importancia de la Cordillera de los Andes como principal evento de vicarianza (Dyer 2000b). Sin embargo, el levantamiento de Los Andes debe considerarse como un proceso temporalmente extenso y no asociado únicamente a un evento particular durante el Mioceno (Lundberg *et al.* 1998, Gregory-Wodzicki 2000).

El orógeno Andino en Chile plantea la presencia de diversas fases y la conformación y quiebre de varias paleocuecas (Charrier *et al.* 2007, Charrier & Farías 2008, Charrier *et al.* 2009), que en conjunto al gradiente climático establecieron las unidades geomorfológicas actuales (Farías *et al.* 2008). Considerando que la fauna Neotropical durante el Mioceno era esencialmente moderna en un amplio rango taxonómico (Arratia 1982, Rubilar 1994, Azpelicueta & Rubilar 1998, Lundberg *et al.* 1998), se puede contextualizar diversos eventos entre la zona norte y centro de Chile que

podieron haber influido en la dispersión de la fauna íctica.

La evolución tectónica y paleogeográfica de Chile se divide fundamentalmente en dos grandes sectores, que tuvieron una evolución geomorfológica independiente (Charrier *et al.* 2007, Charrier *et al.* 2009): i) al norte de 27° LS y ii) al sur de 27° LS.

El Rango Altoandino corresponde actualmente a una serie de cuencas endorreicas que forman parte del Plateau Andino, cuyo característico drenaje interno se estableció probablemente en torno al Mioceno medio (Vandervoort *et al.* 1995). Se ha postulado un levantamiento diferencial entre el Altiplano (14° - 21° LS) y la Puna (21° - 26° LS), elevándose el primero a partir de unos 25 millones de años (Ma) y el segundo desde unos 20 a 15 Ma atrás (Allmendinger *et al.* 1997), pero existe cierto consenso en que el levantamiento más importante del Altiplano ocurrió en los últimos 10 Ma (Gregory-Wodzicki 2000, Charrier *et al.* 2005, Charrier *et al.* 2007, Garziona *et al.* 2008). A escala geológica, la transición de aridez a hiper aridez en el desierto de Atacama probablemente durante el Mioceno (Dunai *et al.* 2005) sería también una de las características condicionantes para la biota en esta área. Durante el Cuaternario, diversos paleolagos (Chepstow-Lusty *et al.* 2005) y volcanismo reciente (Clavero *et al.* 2004) habrían terminado de moldear las diversas poblaciones de *Trichomycterus* presentes en el área, probablemente en conjunto al enigmático grupo de las *Orestias* Valenciennes (Cyprinodontiformes, Cyprinodontidae) (Lüssen *et al.* 2003).

Para Chile centro sur, se ha estimado que la orogenia moderna comenzó en el Mioceno tardío como resultado de la inversión tectónica de la cuenca de Abanico (28° a 39° LS) (Charrier *et al.* 2002, Charrier *et al.* 2007, Flynn *et al.* 2008, Charrier *et al.* 2009). Esta cuenca extensional correspondió a un paleoambiente lacustre y fluvial

(Suarez & Emparan 1995) ubicado entre el Eoceno superior al Mioceno inferior y que se desarrolló en sentido NNE-SSW en lo que actualmente corresponde a una porción de la Cordillera de Los Andes (Charrier *et al.* 2007, Charrier *et al.* 2009). El levantamiento secuencial de la Cordillera Frontal datado entre 12 a 7 Ma a los 33° LS (Giambiagi & Ramos 2002), habría establecido la divisoria de aguas Pacífico/Atlántico e iniciado la incisión fluvial en ríos de Chile entre los 8,5 y 4 Ma (Charrier *et al.* 2009); finalmente, las unidades morfoestructurales presentes en la actualidad se habrían delineado por erosión (R. Charrier, M. Farías comm. pers).

Así, fenómenos a gran escala como la elevación de Los Andes, cambios de dirección en los cursos fluviales y captura de drenajes, es posible que correspondan a los mecanismos a través de los cuales ha ocurrido la diversificación de ictiofauna (Lundberg 1998), por lo tanto, es necesario que sean descritos y contextualizados.

Hipótesis filogenéticas

Los principales obstáculos dentro de la sistemática de *Trichomycterus* se refieren a la naturaleza para o polifilética del grupo, la compleja y larga historia taxonómica, y la impresionante e incompleta diversidad de especies (de Pinna 1998), lo que unido a nuevos registros (obs. pers.) y marcado endemismo (Arratia 1983c, Arratia 1998), complica aún más la situación a nivel nacional. En su tesis doctoral, Wosiacki (2002 en Sato 2007) reconoce un clado formado por *T. areolatus*, *T. chiltoni*, *B. maldonadoi* y *H. macraei*, además de otros 69 grupos, enfatizando el carácter polifilético de la subfamilia.

Si bien distintos autores han evaluado con marcadores moleculares las hipótesis derivadas de trabajos morfológicos con siluriformes (Hardman 2005, Sullivan *et al.*

2006) y ciertos tricomicteridos (Sato 2007, Fernández & Schaefer 2009), a la fecha no hay trabajos que realicen una extensiva revisión de tricomicterines. Por lo tanto, como primer paso en este ámbito, el objetivo de este capítulo es poner a prueba la hipótesis filogenética basada en caracteres morfológicos de Wosiacki (2002 en Sato 2007) y describir el contexto de diversificación de los tricomicteridos en Chile considerando aspectos geológicos.

Materiales y métodos

Muestras

Se obtuvieron aproximadamente 170 individuos procedentes de diversas localidades en Chile (Tabla I-1), secuenciando entre 3 a 8 individuos por localidad. Se consideró la obtención de individuos de *Bullockia maldonadoi*, *Hatcheria macraei*, *Trichomycterus chiltoni* y diversas muestras de *Trichomycterus areolatus* incluyendo parte de la distribución descrita. Para el Rango Altoandino se obtuvieron muestras de *Trichomycterus laucaensis*, *Trichomycterus chungaraensis*, *Trichomycterus aff rivulatus* y se incorporaron 3 localidades de las que no se tenía registro de la existencia de poblaciones de *Trichomycterus* en Chile: los ríos Lluta y Caquena y el bofedal de Colpa. Como outgroup se incorporaron individuos de *Trichomycterus punctulatus* Valenciennes, *Trichomycterus quechuorum* Steindachner, *Trichomycterus rivulatus* de la cuenca del Titicaca (río Antauta), y diversos tricomicteridos no identificados de cabeceras del río Amazonas en Perú. Para enraizar todos los análisis se utilizó secuencias de ADN de individuos de *Nematogenys inermis*.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN fue extraído de tejidos y/o aletas preservadas en alcohol al 95% utilizando el método de sales (Aljanabi & Martinez 1997) y conservado a -20° C en 50 µl de agua destilada ultrapura hasta los análisis. Para amplificar el gen Citocromo B (CITB) se utilizaron los primer L14841 (5'-AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA-3') y H15149 (5'-AAA CTG CAG CCC CTC AGA ATG ATA TTT GTC CTC A-3') (Kocher *et al.* 1989), secuenciando únicamente en dirección 5'-3'. Para amplificar el gen Citocromo C Oxidasa I (COI) se utilizaron 4 combinaciones de los primers descritos por Ward y col. (2005), secuenciando bidireccionalmente sólo aquellas que amplificaron de forma exitosa (verificadas en un gel de agarosa al 2%). Para amplificar la región control se utilizaron los primers 5'-CCT AAC TCC CAA AGC TAG GAT-3' y 5'-TGC GGA TAC TTG CAT GTA TAA-3' diseñados por E. Poulin (comm. pers.). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 25 µl, con 50 µg de ADN, 0,1 U/µl de ADN Taq polimerasa (Invitrogen), 5 pmol de cada primer, 3,2 ηM de MgCl₂, 1x de buffer de reacción y 0,2 U/µl de dNTP. Las condiciones de amplificación para CITB fueron de 93° C por 1 minuto (min.), 35 ciclos de 93° C por 30 segundos (s.), 50° C por 1 min. y 72° C por 1 min., con una extensión final de 72° C por 10 min. La amplificación de COI se realizó a 94° C por 2 min., 35 ciclos de 94° C por 30 s., 52° C por 40 s. y 72° C por 1 min., con una extensión final de 72° C por 10 min. Los ciclos de amplificación para la región control fueron: 94° C por 3 min. seguidos por 30 ciclos de 94° C por 30 s., 60° C por 90 s. y 72° C por 90 s., con una elongación final a 72° C por 10 min. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a MacroGen Inc. (www.macrogen.com).

Reconstrucción filogenética

Las secuencias resultantes fueron alineadas y verificadas manualmente en el programa Proseq 2.9 (Filatov 2002). Los análisis de máxima parsimonia (MP) fueron realizados en el software PAUP* 4.0b10 (Swofford 2000) utilizando el algoritmo heurístico de búsqueda con 100 réplicas de inclusión al azar de los taxa y el método TBR para permutar las ramas. El soporte de la topología resultante fue evaluado a través de 1000 réplicas de bootstrap con las mismas condiciones anteriores de búsqueda, pero utilizando 10 réplicas de inclusión al azar de los taxa. Para los análisis de máxima verosimilitud (MV) y bayesianos (BA) se escogió el mejor modelo evolutivo en el software ModelTest v3.7 (Posada & Crandall 1998) según el criterio Akaike de información (AIC). El análisis de MV se realizó en el software Garli v1.0 (Zwickl 2006) con 25 corridas independientes para evaluar que los valores de log-likelihood y la topología no estuvieran atrapadas en óptimos locales. El soporte fue evaluado con 100 réplicas y generando 5 corridas independientes por réplica. Tanto para MP y MV el árbol de consenso estricto fue construido con SumTrees (Sukumaran & Holder 2009). Los análisis BA fueron realizados en MrBayes v3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001) con 2 corridas independientes de 5×10^6 generaciones cada uno, muestreando cada 100 generaciones, y descartando el 25% inicial como burn-in. La convergencia fue evaluada visualizando los valores log-likelihood respecto a la generación de muestreo, en conjunto con la obtención de valores menores a 0,01 de la desviación estándar de las frecuencias divididas (Ronquist *et al.* 2009). Las tres metodologías de reconstrucción filogenética fueron realizadas utilizando cada gen por separado, con el objeto de comparar entre metodologías y genes, la resolución ofrecida para el ingroup. Las

comparaciones topológicas entre árboles fueron realizadas en el software TreeJuxtaposer 2.1 (Slack & Munzner 2007), que utiliza un algoritmo generalizado de la métrica Robinson-Foulds (Robinson & Foulds 1981) para identificar discordancias estructurales.

Adicionalmente se realizó un análisis combinado de genes dado que algunos individuos compartían el mismo haplotipo en un gen, pero diferían en el otro, y viceversa. Esta particularidad amplía la cantidad de haplotipos incluidos en el análisis, además de otorgar mayor soporte a los clados (ver resultados). Sobre la topología que entrega MrBayes se adoptaron los valores de soporte de los otros métodos, ya que el esquema de evolución independiente por partición utilizado en este software¹ permite una mejor estimación de la longitud de las ramas (Marshall *et al.* 2006), sin embargo, sólo se discute aquellos clados que coincidieron en las tres metodologías. En todos los análisis combinados la homogeneidad de las particiones fue evaluada con la prueba ILD (Farris *et al.* 1995) en PAUP* (Swofford 2000).

Finalmente, debido a la condición exploratoria del estudio en el Rango Alto Andino y la existencia de politomías en todos los análisis (ver resultados), se decidió secuenciar además un fragmento de la región control (DLoop) e incluirlo en un análisis restringido utilizando a *T. punctulatus* como outgroup². Se utilizó 1×10^6 generaciones para BA, manteniendo las mismas condiciones para el resto de las metodologías de inferencia filogenética.

¹ Comandos: unlink statefreq=(all) revmat=(all) shape=(all) pinvar=(all); prset applyto=(all) ratepr=variable;

² La misma estrategia se intentó utilizar en Chile central, sin embargo, no fue posible secuenciar los individuos de *H. macraei* para la región control.

Análisis estadístico

La hipótesis morfológica de Wosiacki (2002 en Sato 2007) fue evaluada considerando la monofilia del género *Trichomycterus* con los caracteres moleculares combinados, es decir, si la topología (*Nematogenys* + (*Bullockia* + *Hatcheria* + (*Trichomycterus*)) no es un descriptor significativamente mejor que la topología entregada por cada uno de los métodos de inferencia filogenética, habrían argumentos moleculares en la misma línea que la hipótesis morfológica. Para MP se utilizó la prueba de Wilcoxon de rangos (Templeton 1983) en PAUP* (Swofford 2000) y para MV se utilizó la prueba AU (Shimodaira 2002) en el software CONSEL (Shimodaira & Hasegawa 2002). Para BA se evaluó la fracción de árboles que contenían la restricción topológica respecto del total de árboles muestreados en MrBayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001); esta frecuencia fue interpretada como la probabilidad *a posteriori* de la monofilia del género *Trichomycterus*.

Estimación del ancestro común más reciente

Finalmente, para estimar la divergencia entre los haplotipos del set de datos combinado y la relación con el contexto geológico se realizó un análisis bayesiano en el software BEAST v1.5.3 (Drummond & Rambaut 2007) en el cluster BioHPC de la Universidad de Cornell, EEUU (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu>). Se utilizó un modelo relajado de reloj molecular log-normal no correlacionado, tamaño poblacional constante y 4 categorías gamma para los modelos GTR+I+G (CITB) y HKY+G (COI) seleccionados por MrModeltest (Nylander 2004) según el criterio Akaike de información. Se definió un proceso Yule de especiación como modificador del árbol

inicial. La convergencia fue evaluada en Tracer (Rambaut & Drummond 2003) y se utilizaron cinco réplicas independientes de 7×10^7 generaciones (muestreando cada 1000 de ellas); posteriormente fueron combinadas manualmente y se generó el árbol filogenético en TreeAnnotator (Drummond & Rambaut 2007) descartando el 40% inicial como burnin. Para calibrar la hipótesis filogenética, se utilizó a †*Nematogenys cuivi* Azpelicueta & Rubilar para establecer la edad del nodo (*Nematogenys*, ingroup) (Azpelicueta & Rubilar 1998). De acuerdo a una estimación estratigráfica, el fósil tendría una edad miocena, de 15 ± 2 Ma (Suarez & Emparan 1995, Flynn *et al.* 2008).

Resultados

Análisis de genes por separado

Un total de 484 pares de bases (pb) fueron secuenciados para el gen CITB, con 43 haplotipos entre 125 de los 172 individuos analizados. Del total de caracteres 324 fueron constantes, 146 fueron parsimoniosamente informativos y 14 variables pero no informativos. El método MP entregó 24 árboles igualmente parsimoniosos de longitud 301, CI = 0,6844, RI = 0,9180; el árbol de consenso estricto se muestra en la figura I-1.A. Tanto para el árbol MP (Figura I-1.A) como de MV (Figura I-1.B) se genera una politomía basal en el ingroup, aunque muy bien soportada. En cambio, el análisis BA (Figura I-1.C) resuelve con muy alto soporte un clado asociado a los tricomicteridos del Rango Alto Andino y otro asociado a Chile centro-sur. En general las topologías coinciden en los clados interiores, sin embargo, la posición de *T. punctulatus*, *H. macraei* y el individuo de Valdivia difieren entre los métodos.

Para el gen COI, un total de 548 pb fueron secuenciados; existiendo 44

haplotipos para 103 de los 172 individuos analizados. Un total de 376 caracteres fueron constantes, 16 variables pero no informativos, y 156 caracteres parsimoniosamente informativos. El método MP entregó 314 árboles igualmente parsimoniosos con una longitud de 294 pasos, CI = 0,7551 y RI = 0,9264; el árbol de consenso estricto se muestra en la Figura I-2.A. Los resultados de MP (Figura I-2.A), MV (Figura I-2.B) y BA (Figura I-2.C) separan el clado asociado al Altiplano del que corresponde al resto de Chile, con muy alto soporte. Tanto el árbol de MP (Figura I-2.A) y MV (Figura I-2.B) no resuelven la posición de *H. macraei*, y los tres métodos fallan al resolver el clado de *Bullockia* (río Bío-Bío) + *Trichomycterus* de los ríos Maipo, Aconcagua, Limarí y Choapa.

Análisis combinado de genes

El set combinado de genes para análisis filogenéticos consistió de 52 secuencias con 1032 caracteres (COI = 548 caracteres, CITB = 484 caracteres), 703 de ellos constantes, 308 parsimoniosamente informativos y 21 caracteres variables no informativos. La prueba de homogeneidad ILD fue no significativa ($p = 0,32$), lo que indica que no hay señal de conflicto entre las 2 particiones. El modelo evolutivo seleccionado fue GTR+I+G (AIC = 8809,2068; $-\ln L = 4292,6034$) tanto para el set combinado, para CITB (AIC = 4140,8828; $-\ln L = 2060,4414$) y para COI (AIC = 4324,6694; $-\ln L = 2152,3347$).

El análisis de MP con el set de datos combinado entregó 396 árboles igualmente parsimoniosos de 587 pasos, CI = 0,7074 y RI = 0,9389; la topología del árbol de consenso estricto se muestra en la figura I-3.A. El análisis de MV en GARLI muestra

que las réplicas resultaron en 25 árboles con topología idéntica, todos con un valor LnL de -4289,8165 (Figura I-3.B). La topología del árbol de consenso de BA se muestra en la figura I-3.C.

La topología de los tres métodos no difiere sustancialmente, encontrando alto soporte en el nodo principal del *ingroup* que separa a los haplotipos de *Trichomycterus* del Rango Altoandino del resto de individuos en Chile (Figuras I-3, I-5 y I-7). En consecuencia, la monofilia del género *Trichomycterus* es rechazada tanto por parsimonia ($\delta_{\text{pasos}} = 37$, $p < 0,0001$), verosimilitud ($\text{Ln}l = 4328,009$; $\delta_{\text{Ln}l} = 38,2$; $p < 0,0004$) y criterios bayesianos (0/75002 árboles, $p < 0,0001$), debido a la inclusión de los géneros *Bullockia* y *Hatcheria* entre haplotipos del género *Trichomycterus* procedentes de Chile centro sur (Figuras I-3, I-5 y I-7).

Rango Altoandino

En general individuos de distintas especies, e incluso de localidades distantes, compartieron haplotipos de ambos genes (Tabla I-1). Para la región control los 2 individuos de *T. quechuorum* y los 3 de *T. laucaensis* compartieron sus haplotipos, respectivamente. Utilizando el set de datos CITB+COI, las relaciones de los haplotipos del Rango Altoandino no fueron resueltas totalmente por ninguno de los métodos. Se encontraron disconformidades en la posición de ciertos grupos (Figura I-3, en rojo) y diversas politomías; sin embargo, también se observó alto soporte en clados interiores (Figura I-5). Los grupos identificados corresponden a (i) *T. quechuorum* (vertiente Pacífico) con tricomicteridos no identificados de Cuzco y el Amazonas (vertiente Atlántico); (ii) *T. laucaensis* (río Lauca y bofedal de Parinacota); y (iii) *T. aff rivulatus*

del Rango Altoandino en Chile, incluyendo este último idénticas secuencias en los individuos 0864B (salar de Huasco) y 16 (río Vilcanota, cuenca del Amazonas). En todos los análisis *T. aff rivulatus* de Chile es resuelto con alto soporte como grupo hermano del resto de los haplotipos analizados (Figuras I-3 y I-5).

El análisis restringido (CITB+COI+DLoop) consistió en 20 haplotipos con 1471 caracteres, 1285 constantes, 17 variables no informativos y 169 caracteres parsimoniosamente informativos. El análisis MP entregó 192 árboles igualmente parsimoniosos de 223 pasos, CI = 0,883 y RI = 0,945. El análisis MV entregó idénticos resultados en las 25 réplicas, todos con un valor LnL de -3160,8777. Los árboles de consenso y las diferencias estructurales se muestran en la Figura I-4.A, B y C; la topología con longitudes de las ramas según análisis BA se muestra en la Figura 1-4.D.

El análisis indica que sólo MP y BA resuelven con el máximo soporte a *T. aff rivulatus* como grupo hermano del resto de haplotipos (Figura I-4 A y C); MV lo mantiene en una politomía muy bien soportada junto a los clados *T. laucaensis*, Cuzco+Amazonas+*T. quechuorum* y Colpa+Umaqui (Figura I-4 B). Dentro del grupo *T. aff rivulatus* sólo BA resuelve a *Trichomycterus* sp.16 como grupo hermano del resto de haplotipos (Figura I-4 C y D). Las distancias genéticas intra e inter clados, corregidas por el modelo Kimura de 2 parámetros se indican en la Tabla I-2.

Chile centro sur

Los tres métodos de inferencia con el set combinado CITB+COI entregaron un alto soporte al clado formado por *T. areolatus* + *T. chiltoni* + *Bullockia* + *Hatcheria* (Figura I-5). Dentro de este grupo se distingue fundamentalmente un clado Norte: un

linaje asociado al río Maipo, y otro asociado a los ríos Aconcagua, Limarí y Choapa, que forman en conjunto una politomía con los individuos de *Bullockia* (Figura I-5, I-7); además se reconoce otro grupo que corresponde al clado Sur: el resto de los haplotipos de *T. areolatus* (con *T. chiltoni* dentro) + *H. macraei*. Esta última especie fue sólo resuelta en MP y BA (Figura I-5, Figura I-4 en rojo), encontrándose en una politomía basal para MV. En general, las relaciones no están resueltas entre los grupos internos dentro de los dos clados principales, sin embargo, hay linajes internos bien soportados que coexisten en simpatria (Figura I-5): el clado A (río Maipo) junto al clado B (ríos Maipo a Mataquito) y haplotipos de este último coexisten junto al clado C (Mataquito a BíoBío). Es interesante notar que *T. chiltoni* en todos los análisis aparece dentro del clado C (Figura I-5, I-7).

Estimación del ancestro común más reciente

Los análisis bayesianos para datar la hipótesis filogenética estiman una edad para todo el ingroup de 10,5 Ma (límites del 95% de confianza entre [15,4 ; 5,6] Ma). El grupo de peces del Rango Altoandino habría divergido de *T. punctulatus* hace 7,4 Ma (95% [11,7 ; 3,5] Ma), en tanto que en Chile centro sur, el clado Norte se habría separado del clado Sur hace ~ 5,2 Ma (95% [8,5 ; 2,25] Ma).

Discusión

Selección y combinación de genes

En los pocos trabajos de sistemática molecular dentro de los tricomicteridos (Sato 2007, Fernández & Schaefer 2009), la problemática de ausencia de sinapomorfías

(Arratia 1990, de Pinna 1998) ha sido abordada con la estrategia de utilizar variados marcadores moleculares con el objeto de dilucidar aquellos aspectos que han resultado complejos para la morfología. Para los individuos en este estudio (Figuras I-1 y I-2), no es novedad que distintos métodos de inferencia filogenética utilizando un solo gen del ADN mitocondrial entreguen resultados dispares dentro de los grupos de interés. Sato (2007) ya había explorado dicha problemática utilizando los genes COI, 12S e incluso, incorporando diversos genes y completando 13568 pb; en tanto que Fernández & Schaefer (2009) utilizaron además genes nucleares, contabilizando 2325 pb para análisis. Los resultados del presente estudio sugieren que la selección de los genes tiene implicancias en la resolución de los clados: por ejemplo, el gen CITB entrega numerosas politomías (Figura I-1), en cambio el gen COI (Figura I-2) resuelve algunas de éstas; además el método de inferencia parece tener un efecto en la resolución de los clados. A pesar de ser ampliamente utilizado (Johns & Avise 1998), el gen CITB es informativo de relaciones de 10 a 15 Ma de antigüedad, o incluso mayores (Hardman 2005). Por esta razón, es conveniente complementar el análisis de CITB a lo menos con otro gen más variable (e.g. Vergara *et al.* 2008, Torrico *et al.* 2009), en particular cuando se trate de grupos problemáticos (Arratia 1990, de Pinna 1998) o que se omita el contexto temporal de diversificación (Unmack *et al.* 2009b).

Rango Altoandino

La incorporación de un tercer gen para el grupo de peces del Rango Altoandino (Figuras I-3 y I-4), parece no agregar suficiente información para resolver los clados. Incluso, se observa poca variabilidad intra e inter grupos (Tabla I-2), lo que dificulta aún

más la posibilidad de establecer una hipótesis filogenética robusta. Comparativamente, entre *T. aff rivulatus* y *T. laucaensis* hay menos distancia genética (Tabla I-2) que la existente entre los clados A y B de *T. areolatus* que coexisten en el río Maipo (resultados no mostrados). En la misma línea, el clado Colpa + Umaqui se diferencia tan sólo en un 1 % de *T. laucaensis* y del clado *T. quechuorum* + Cuzco, pero posee características autapomórficas de la piel que podrían corresponder a una nueva especie (G. Arratia, comm. pers.). Aún más, el nuevo registro del río Lluta también posee características que indican una diferenciación morfológica, pero su genotipo es virtualmente idéntico a los demás individuos de *T. aff rivulatus*.

Sin duda, los peces de la Región Altoandina son un complejo grupo de especies y la sistemática y filogenia debe abordarse con la inclusión de aspectos morfológicos, un muestreo ampliado y marcadores moleculares más variables.

Chile centro sur

La estructura filogenética observada en esta zona indica que las relaciones entre las especies descritas en base a morfología no siempre presentan diferencias genéticas claras.

Por un lado, *T. chiltoni* (*T. chiltoni*_0942 en Figura I-5), no es resuelta como entidad monofilética en ninguno de los análisis. Observando una red de haplotipos de la región control (resultados no mostrados), este individuo tiene similar distancia (en pasos mutacionales) al clado C de *T. areolatus* que el observado en *B. maldonadoi* respecto al linaje Aconcagua-Limari-Choapa del clado Norte de *T. areolatus*. Debido a esto, se requiere mayor esfuerzo de muestreo para definir la relación de *T. chiltoni* con el resto

de especies en Chile centro sur, pero es posible una relación cercana al clado C de *T. areolatus* (Figura I-5).

De forma interesante, dentro del amplio rango geográfico en el que se distribuye *T. areolatus* se observa grandes diferencias genéticas, lo que podría indicar que esta especie corresponde a un grupo polifilético. Se observa un gran quiebre: (i) una tricotomía muy bien soportada de *T. areolatus* en los ríos Maipo, Aconcagua hacia el norte, y *B. maldonadoi* + *Bullockia* sp., siendo esta última una potencial nueva especie (morfológica) del género *Bullockia* (G. Arratia, comm. pers.); y (ii) un linaje de *T. areolatus* asociado a los cauces del río Maipo hacia el sur, cuyo grupo hermano es *H. macraei* (Figura I-5). En contraposición a los resultados de este trabajo, Unmack y col. (2009b) realizaron cuestionamientos taxonómicos sobre *H. macraei* e hipotetizan que pudieron haber ocurrido eventos de introgresión de *T. areolatus* sobre *Hatcheria* debido a la existencia de politomías en su inferencia filogeográfica. Sin embargo, Unmack y col. (2009b) realizaron sus conclusiones únicamente en base al gen CITB, desconociendo la problemática del grupo y enraizando sus secuencias en *B. maldonadoi*, sin justificación aparente. Una cuidadosa reexaminación de la hipótesis filogeográfica de Unmack y col. (2009b) reafirma los resultados de este trabajo pues se observa: (i) el profundo quiebre dentro de *T. areolatus*, (ii) que los linajes del río Maipo hacia el norte están asociados a *Bullockia*, (iii) superposición de dos linajes de ADN mitocondrial en el río Maipo, y (iv) la existencia de politomías de *H. macraei* e individuos de *T. areolatus* de Valdivia cuando se utiliza únicamente el gen CITB y el método de máxima verosimilitud. Los resultados de este estudio y otros trabajos (Sato 2007, Fernández & Schaefer 2009) sugieren fuertemente que un solo gen mitocondrial es insuficiente para

realizar conclusiones dentro del complejo grupo de los tricomicteridos. Además, el marco temporal inferido por el gen CITB (Hardman 2005) puede no ser apropiado para relacionarlo al efecto que las glaciaciones han tenido en la fauna. Por lo tanto, dado los resultados del presente trabajo, es necesario mirar con cautela el marco temporal, el contexto y las conclusiones esbozadas por Unmack y col. (2009b)

En Chile centro sur los resultados de este estudio respaldan la hipótesis morfológica de Wosiacki (2002 en Sato 2007) e indican que *T. chiltoni* y *T. areolatus* son efectivamente más cercanos a *Hatcheria* y *Bullockia* que a otros tricomicterines, por lo que requeriría remover a estas especies del género *Trichomycterus*, creando uno nuevo para albergarlas (como *Ituglanis*: Costa & Bockmann 1993). Desde un punto de vista biológico los linajes mitocondriales que coexisten en el río Maipo podrían corresponder a la misma especie (sensu Mayr en de Queiroz 2005a) y ser producto de un contacto secundario, pero a la vez se abre la posibilidad de que correspondan a poblaciones que permanecen en aislamiento reproductivo, lo que complicaría aún más la taxonomía. De probarse esta hipótesis, sería posible reconocer la crítica existencia de *Trichomycterus maculatus* Valenciennes, especie sinonimizada por Arratia & Chang (1975) debido a que resulta indistinguible de *T. areolatus* en base a la osteología, caracteres morfométricos y manchas corporales (Duarte *et al.* 1971, Arratia & Chang 1975). Para dilucidar esta hipótesis se debe incluir aspectos morfológicos no considerados previamente y evaluar de forma directa o indirecta el aislamiento reproductivo.

Contexto geológico

Considerable avance ha habido en las últimas dos décadas en el conocimiento de la evolución tectonoestratigráfica de la orogenia Andina en Chile, resumidas fundamentalmente por Charrier y col. (Charrier *et al.* 2007, Charrier & Farías 2008, Charrier *et al.* 2009). El modelo geológico para contextualizar la diversificación de ictiofauna dulceacuícola en Chile podría remontarse incluso hasta antes de 112 Ma, si se considera a la superfamilia Loricarioidea (Nematogenyidae, Trichomycteridae, Callichthyidae, Scoloplacidae, Astroblepidae y Loricariidae) como grupo hermano de los amfilidos africanos (de Pinna 1998, Lundberg 1998, Britto 2003). Sin embargo, un criterio parsimonioso sugiere remontarse desde la realidad actual de “ríos cortos, de alta pendiente y con cuencas que no presentan conexión hidrológica” (Vila *et al.* 1999) hasta un eventual escenario de conexión entre paleoambientes. Dada además la evidencia fósil más antigua de la ictiofauna extante en Chile (percíctidos: Arratia 1982, Arratia & Cione 1996), el marco temporal se describirá desde el Eoceno.

Desde el cretácico superior se desarrolló a lo largo del margen continental de América del Sur un arco magmático con orientación NNE-SSW que se extendió desde el sur del Perú hasta la región central de Chile y Argentina (Charrier *et al.* 2007). Desde el Paleoceno y hasta el Eoceno medio se habría formado un importante relieve (Cordillera Incaica) aprox. con la misma ubicación y orientación que el arco, que debió haber determinado la divisoria de aguas (Charrier *et al.* 2009). Posteriormente, al norte de ~27° LS la actividad magmática se concentró en la parte oriental de la Precordillera chilena y el Altiplano, siendo bordeada al este por un sistema de cuenca de retroarco ubicada en el Altiplano-Puna (Charrier *et al.* 2009). Al sur de ~27° LS la actividad

magmática se desarrolló en una amplia cuenca extensional de intra-arco ubicada en el flanco oriental de la Cordillera Incaica (cuenca de Abanico: Charrier *et al.* 2007), y es probable que producto de la erosión, la divisoria de aguas se haya desplazado al dominio del arco (Charrier *et al.* 2009). Desde el Oligoceno Superior/Mioceno Inferior al Mioceno Superior temprano se inició un período de deformación compresiva que generó un bloque elevado denominado Cordón de Chapiquiña-Belén (Charrier *et al.* 2005) y que rejuveneció el relieve Incaico al norte de $\sim 27^\circ$ LS (Charrier *et al.* 2009). Remanentes de este bloque hacia el sur podrían corresponder a la Sierra de Moreno y a la Cordillera de Domeyko (Charrier *et al.* 2009). Este bloque elevado determinó condiciones geomorfológicas que favorecieron la aridez y rápido drenaje de las lluvias en el flanco occidental (Charrier *et al.* 1999), en tanto que el sector oriental fue considerablemente más húmedo (Charrier *et al.* 2005). Al sur de $\sim 27^\circ$ LS el evento compresivo generó la inversión tectónica de la cuenca de Abanico, que se prolongó hasta el Mioceno inferior (Charrier *et al.* 2009).

La configuración esencialmente moderna de las unidades morfoestructurales se alcanzó a partir de esta época. Al norte de $\sim 27^\circ$ LS la actividad en la zona de fallas de Atacama elevó la parte oeste de la Cordillera de la Costa creando cuencas sedimentarias cerradas hacia el este (Charrier *et al.* 2007) y un pulso de elevación del Rango Andino particularmente rápido se inició a partir de ~ 10 Ma en el borde occidental de la meseta Altiplánica (Charrier *et al.* 2007, Charrier *et al.* 2009). A pesar del extraordinario relieve en esta zona, es muy poco lo que se conoce de los procesos tectónicos y climáticos recientes que terminaron por delinear las cuencas (Charrier *et al.* 2009). Al sur de $\sim 27^\circ$ LS, en cambio, se tienen mayores antecedentes: el período de deformación compresiva

generó el desarrollo de la faja plegada y corrida (actual Cordillera de los Andes), y finalizó con el alzamiento de la Cordillera Frontal (~ 8,5 Ma: Ramos *et al.* 1996, Giambiagi *et al.* 2003), estableciendo una divisoria de aguas previa al alzamiento de Los Andes. La elevación final de las morfoestructuras actuales (Cordillera de la Costa, Depresión Central y Precordillera) fue probablemente contemporánea a la deformación en la Cordillera de Los Andes en Chile central y se estima que se inició en torno a ~10 – 4 Ma (edad central 7.6 Ma) (Farías *et al.* 2008). Farías y col. (2008) proponen el inicio de la incisión fluvial en respuesta al alzamiento, progresando lentamente para llegar a la Cordillera de Los Andes ~ 2 a 6 Ma después. En el avance hacia el este, los ríos debieron atravesar distintas franjas de rocas intrusivas (Farías *et al.* 2008) y es posible que hayan generado una conexión temporal entre cuencas en las Angosturas que, de haber ocurrido, habrían sido contemporáneas de norte a sur (R. Charrier, M. Farías, comm. pers.). Finalmente, la topografía característica en esta área (Valles Transversales al norte de 33° LS, Depresión Central al sur de 33° LS) es muy probable que se deba a un control climático diferencial a lo largo del país (M. Farías, comm. pers.).

Integración con la diversificación de ictiofauna

De acuerdo a los antecedentes expuestos, el desarrollo de la Cordillera Incaica (Figura I-6) en el norte de Chile posiblemente se ha constituido en una barrera infranqueable para el ingreso de ictiofauna desde el este. El posterior desarrollo del cordón de Belén-Chapiquiña, su progresión hacia el sur (Sierra de Moreno y Cordillera de Domeyko), la sucesiva aridez en el flanco oeste del cordón, el desierto de Atacama y las cuencas endorreicas producto de la elevación de la Cordillera de la Costa, explicarían

la ausencia de tricomicterines en el norte de Chile. Los tricomicterines que actualmente residen en la cuenca del Titicaca, más los que habitan en la cuenca Pacífico como *T. quechuorum* (Arequipa, Perú) y el nuevo registro de *T. aff rivulatus* en el río Lluta (Arica) son comparativamente más recientes a *T. punctulatus* y *T. areolatus* (Figura I-5), y apoyarían esta hipótesis. El posterior desarrollo de la cuenca Abanico podría haber facilitado las condiciones de conexión a lo largo de Chile en una franja de unos 70 Km. de ancho y ~1500 Km. de largo (Figura I-6). Interesantemente, la provincia Chilena fue descrita desde el Río Copiapó (27° 30' LS) hasta el Río Toltén (39° LS) (Arratia *et al.* 1983) y mantiene a *N. inermis* como uno de sus componentes endémicos (Arratia *et al.* 1981). El hallazgo de †*N. cuivi* en la formación Cura-Mallín de la cuenca de Abanico (Rubilar 1994, Azpelicueta & Rubilar 1998, Charrier *et al.* 2007) establece una edad mínima para el ancestro común del clado Nematogenyidae + Trichomycteridae. Sin embargo, debido a que los taxa basales de Trichomycteridae se encuentran en la costa este de Brasil (Trichogeninae y Copionodontinae: de Pinna 1998, Ribeiro 2006), y esta familia se distribuye en toda Sudamérica y Panamá (Arratia & Menu-Marque 1981, de Pinna & Wosiacki 2003), una edad Miocena para este clado parece muy improbable. Aún así, la estimación de diversificación según esta edad mínima para el clado *T. areolatus* + *T. chiltoni* + *B. maldonadoi* + *H. macraei* sugiere ~ 8,5 – 2,25 Ma, insinuando la conexión entre cuencas durante/después del alzamiento final de Los Andes, posiblemente mediada a través de las capturas de drenajes presentes en las Angosturas (Farías *et al.* 2008, Charrier *et al.* 2009). El quiebre identificado en *T. areolatus* pudo haberse debido a una extinción en la zona central, quedando relegado un linaje en los ríos Aconcagua y Maipo, y otro linaje asociado al río Valdivia, o incluso

más al sur. Posteriormente el linaje norte de *T. areolatus* se pudo haber dispersado hacia los ríos Limarí y Choapa y *Bullockia* lo hizo hacia el sur; en tanto que el linaje sur de *T. areolatus* se dispersó hacia el norte llegando a colonizar hasta el río Maipo, donde en la actualidad coexisten. *Hatcheria* hizo lo propio y se pudo dispersar hasta llegar a los 30° LS por el lado argentino de Los Andes (Arratia & Menu-Marque 1981, Arratia *et al.* 1983). Si este quiebre en *T. areolatus* se originó en el Mioceno inferior/Plioceno, o lo hizo durante la existencia de la cuenca de Abanico debe ser correlacionado con otros grupos taxonómicos. A este respecto, resulta interesante la distribución del género endémico de Chile *Percilia* Girard (Perciformes: Perciliidae), que habita desde el río Imperial hasta el río Aconcagua (Arratia *et al.* 1981, Arratia 1982, Zunino *et al.* 1999). Un trabajo filogeográfico reciente sugiere el mismo patrón de quiebre que el observado en *T. areolatus* (Ruzzante *et al.* 2006): habría un clado de *P. gillissi* Girard entre los ríos Maipo a Maule y otro clado en los ríos Cruces e Imperial; *P. irwini* Eigenmann se distribuiría entre los ríos Andalién y Bío-bío. En definitiva, un control esencialmente geológico con un componente climático se postula como modelo para la diversificación de ictiofauna en Chile.

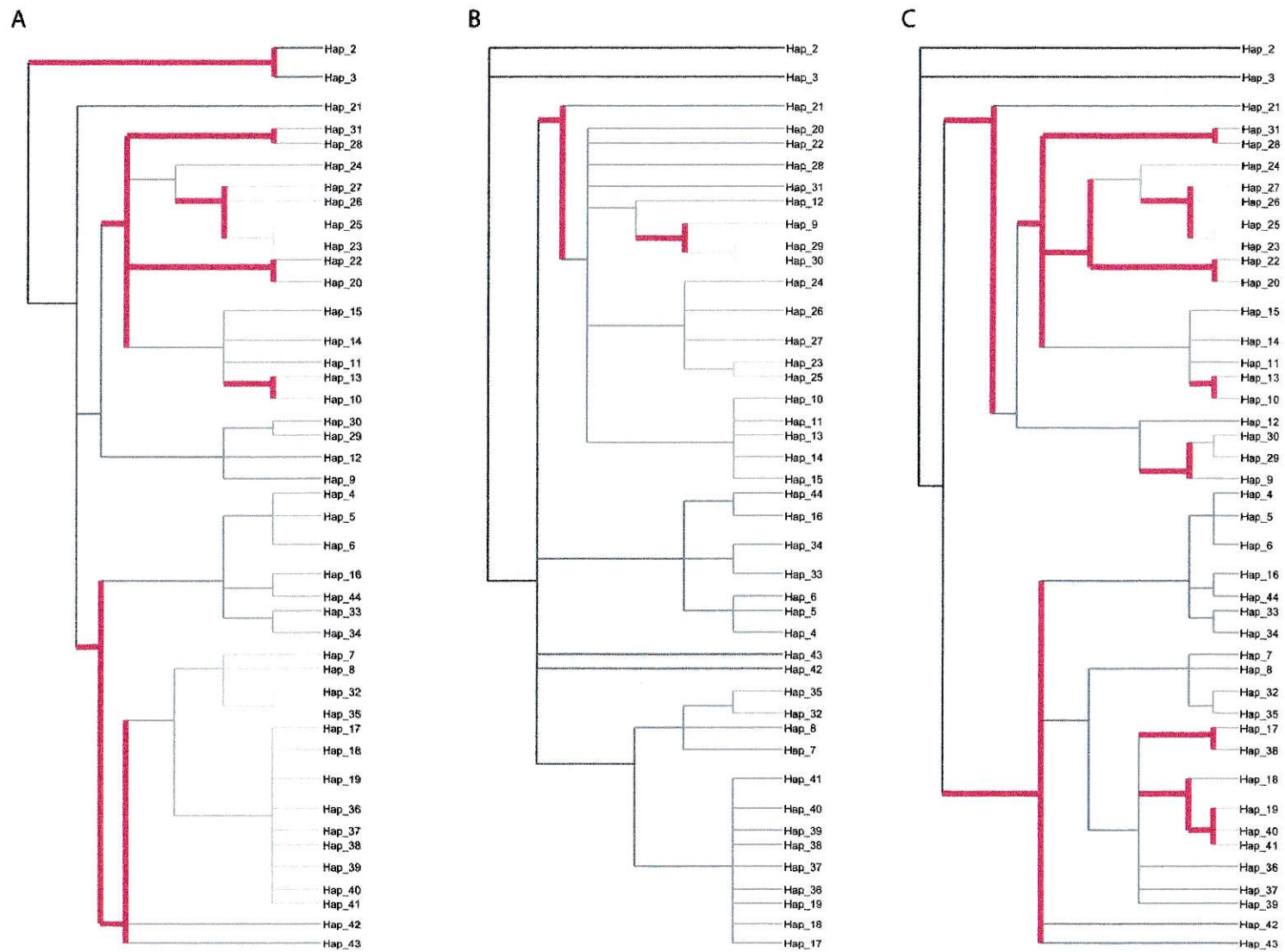


Figura I-1 Topología de la hipótesis filogenética basada en el gen CITB y según tres métodos de inferencia: A) parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en línea gruesa las disconformidades de acuerdo a la métrica Robinson-Foulds.

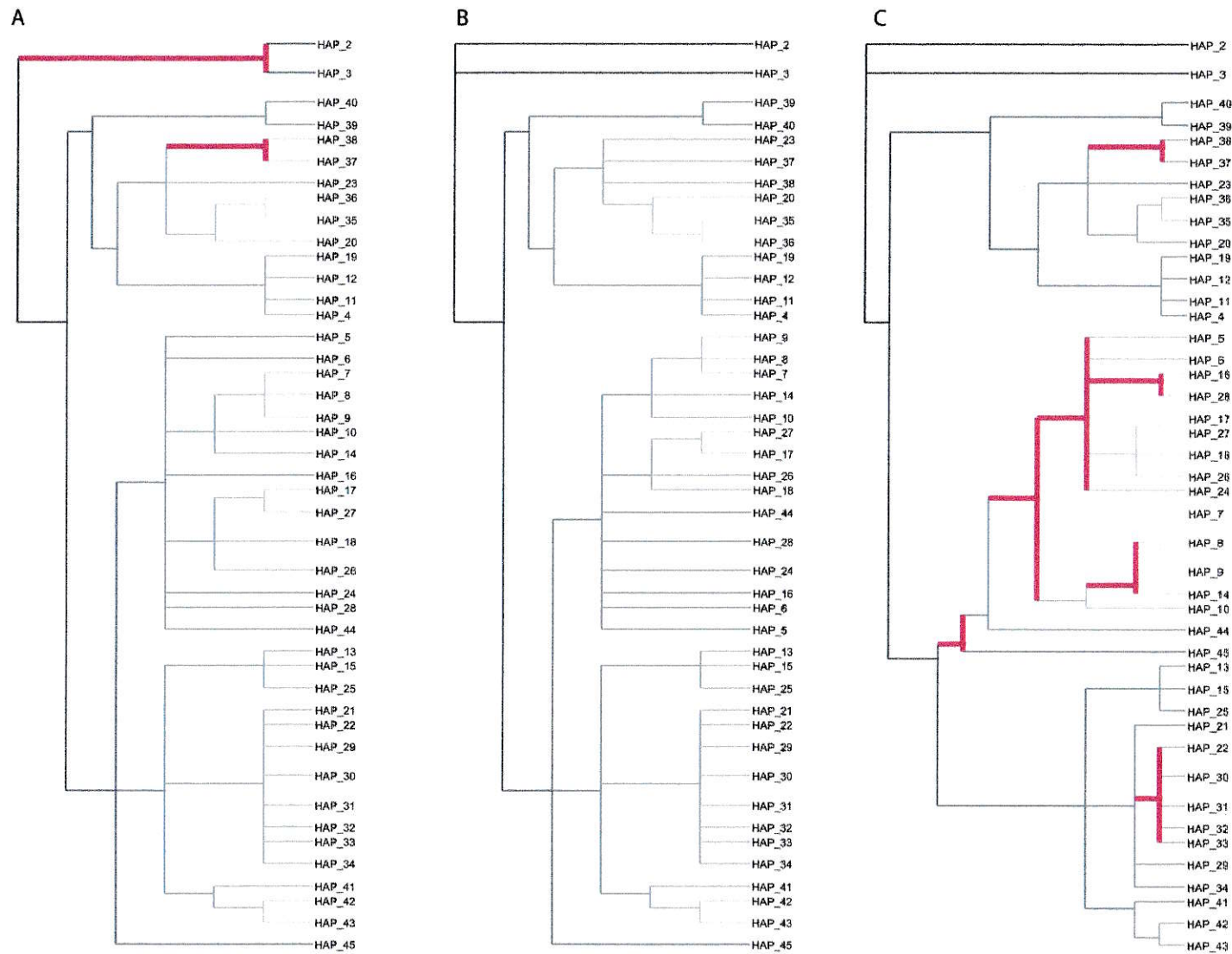


Figura I-2 Topología de la hipótesis filogenética basada en el gen COI y según tres métodos de inferencia: A) parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en línea gruesa las disconformidades de acuerdo a la métrica Robinson-Foulds

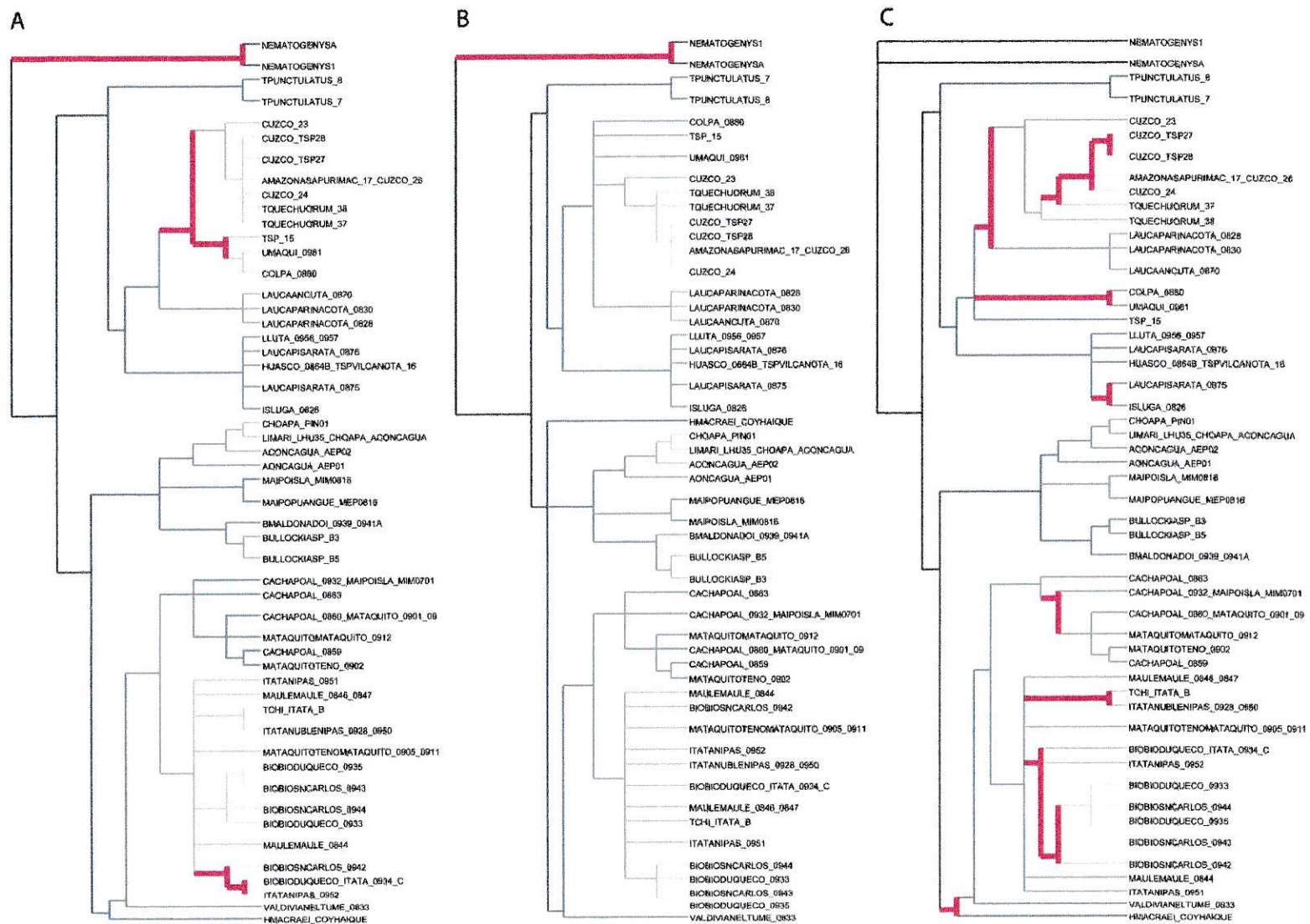


Figura I-3 Cuadro comparativo de la topología del set combinado a partir de tres metodologías de inferencia: A) máxima parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en línea gruesa las disconformidades.

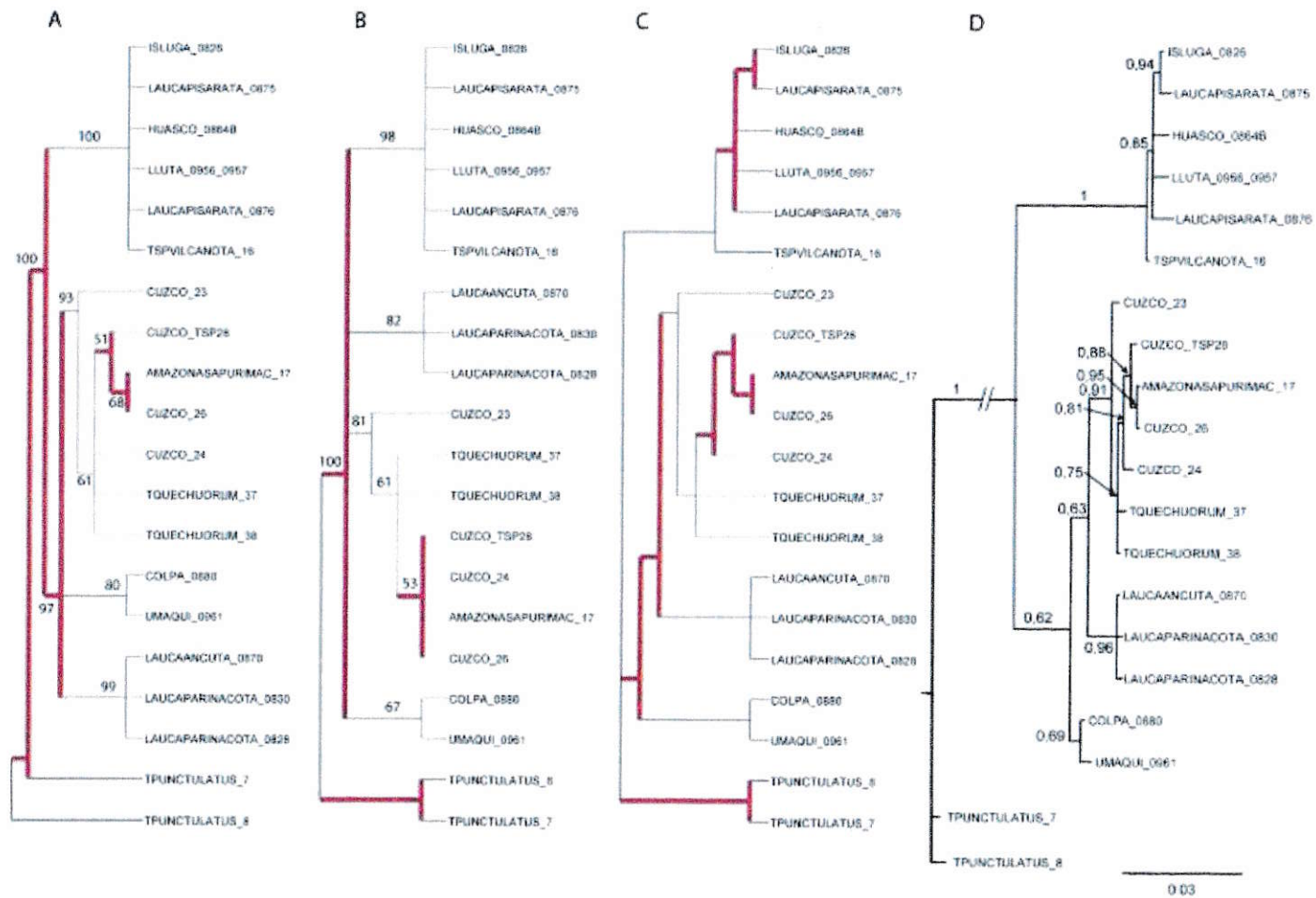


Figura I-4 Cuadro comparativo de la topología y soporte del set CITB+COI+DLoop en el Rango Altoandino a partir de tres metodologías de inferencia: A) máxima parsimonia, B) máxima verosimilitud y C) criterio bayesiano. Se indica en rojo las disconformidades. La Figura D muestra además las longitudes de las ramas según inferencia bayesiana.

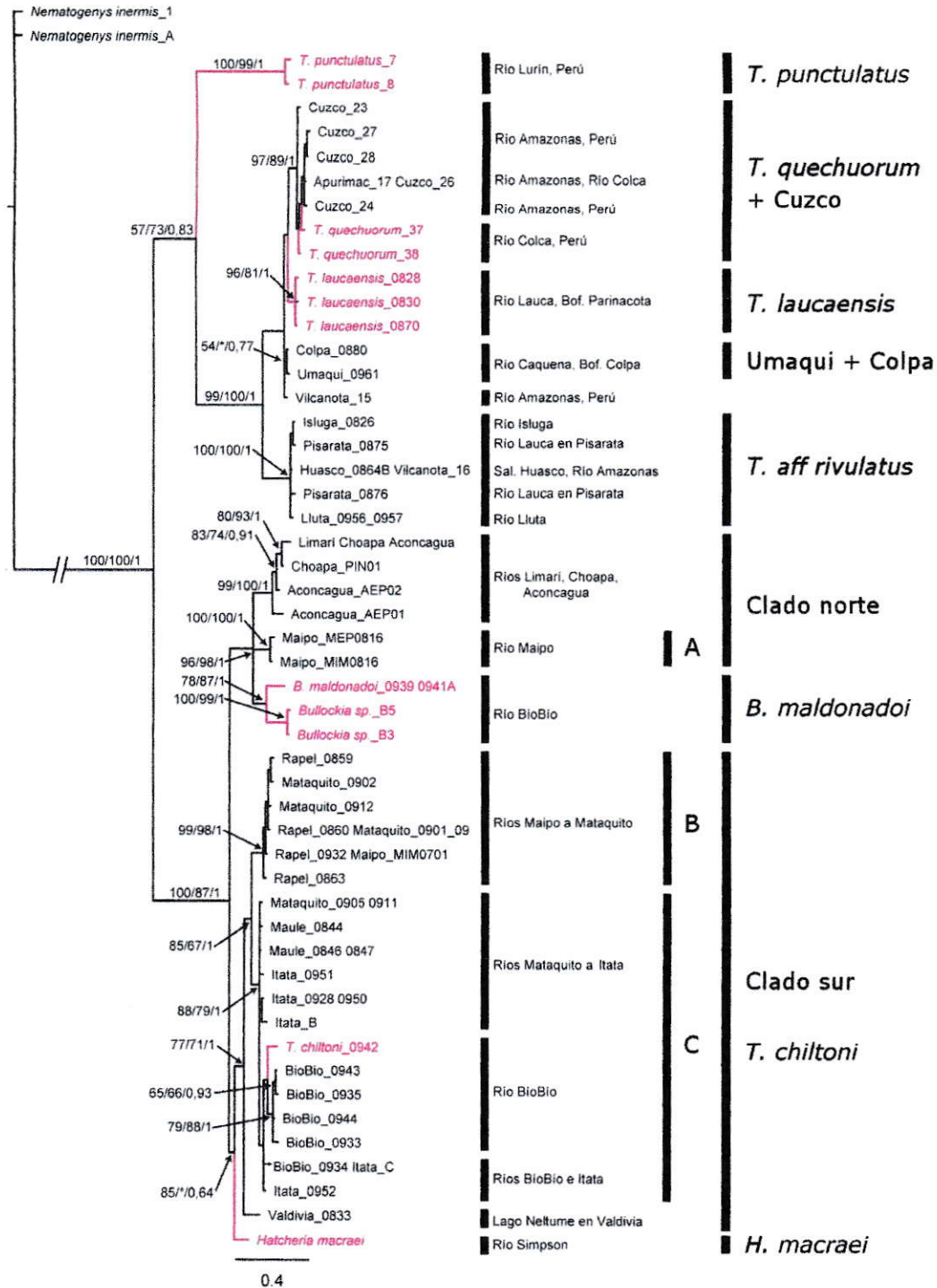


Figura I-5 Hipótesis filogenética desarrollada en MrBayes, con el set de datos CITB+COI. Los valores de soporte corresponden a bootstrap MP / bootstrap MV / probabilidad a posteriori. Sólo se indica el soporte para los nodos que coincidieron en las tres metodologías. El * indicado en algunos nodos MV indica que dicho método no resolvió el nodo de la misma forma que los demás métodos (ver Figura I-3).

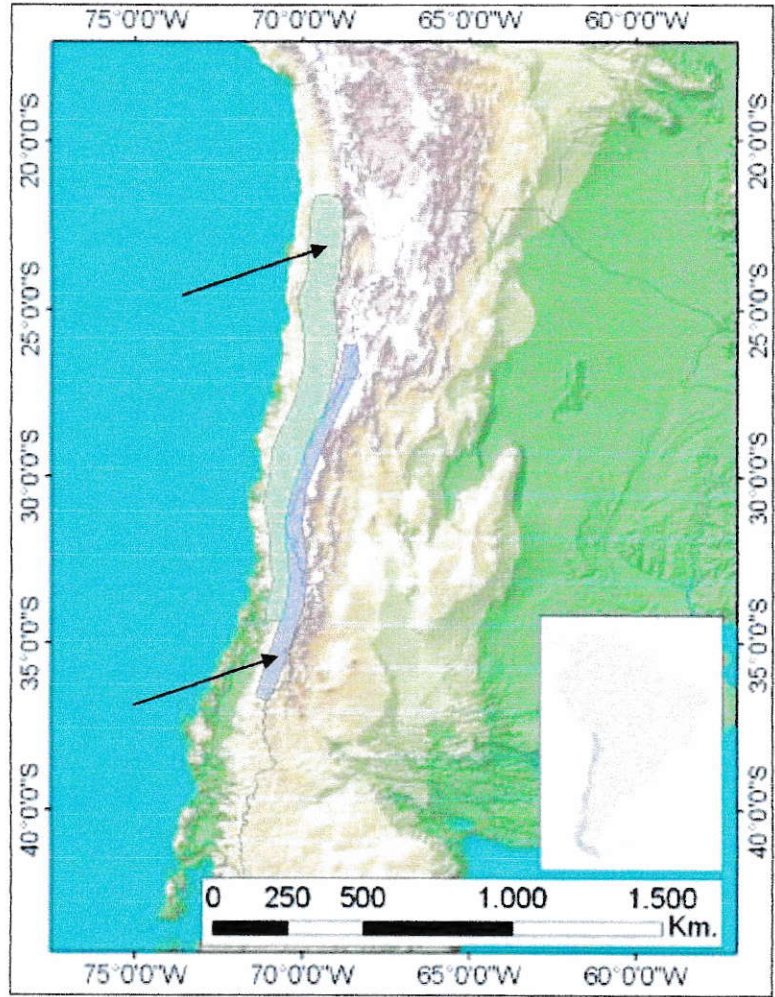


Figura I- 6 Ubicación de la Cordillera Incaica (verde) y Cuenca de Abanico (violeta) de acuerdo a Charrier y col. (2007). Se indica con flechas la ubicación de ambos paleorelieves.

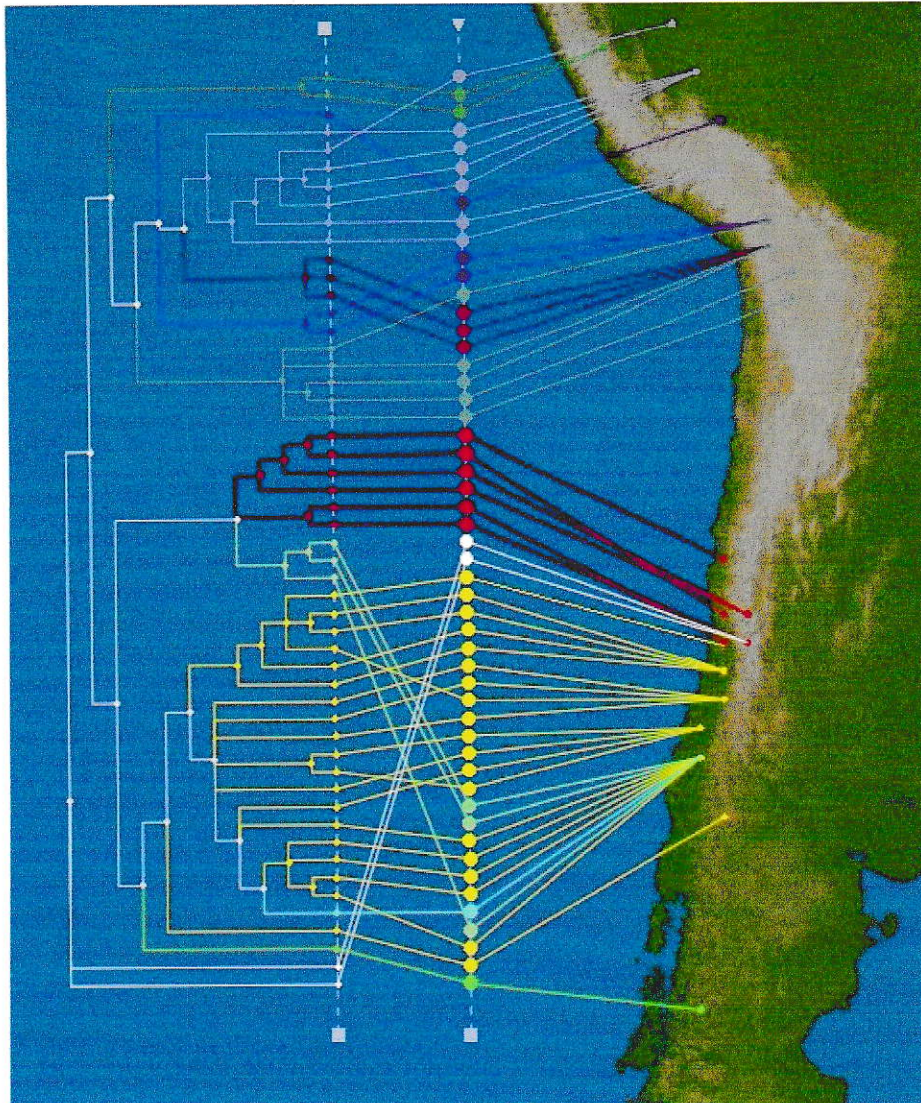


Figura I- 1 Mapa con la distribución de los haplotipos considerados en el estudio.

Se indica: 1) Arriba en verde *T. punctulatus*, morado claro clado *T. quechuorum* + Cuzco, en azul clado Colpa + Umaqui y *Trichomycterus* sp15, morado oscuro *T. laucaensis*, en verde clado *T. aff rivulatus*. 2) Abajo: rojo clado norte de *T. areolatus*, verde *B. maldonadoi*, amarillo clado sur de *T. areolatus*, celeste *T. chiltoni*, verde *H. macraei*. En Blanco y abajo *N. inermis*.

Tabla I-1 Lista de haplotipos, según gen secuenciado, indicando especies, individuos, vertiente y cuencas respectivas.

Gen	Haplotipo	Especies	Individuos	Vertiente	Cuencas
CitB	Hap_2	<i>N. inermis</i>	Ni0801, Ni0802	Pacífico	Maipo
CitB	Hap_3	<i>N. inermis</i>	NiA	Pacífico	Itata
CitB	Hap_4	<i>T. areolatus</i>	AEP01, PIN02	Pacífico	Aconcagua, Choapa
CitB	Hap_5	<i>T. areolatus</i>	AEP02, PIN01	Pacífico	Aconcagua, Choapa
CitB	Hap_6	<i>T. areolatus</i>	CEC29, LCM30, LHU29, LHU35, PIN08, PIN13, PUPB2, PUP803, PUP805	Pacífico	Choapa, Limarí, Pupío
CitB	Hap_7	<i>T. areolatus</i>	MANG01, MIM01, 0860, MIM02, 0932, 0901, 0906, 0907, 0912, MANG07, MANG12	Pacífico	Maipo, Rapel, Mataquito
CitB	Hap_8	<i>T. areolatus</i>	MANG02	Pacífico	Maipo
CitB	Hap_9	<i>Trichomycterus aff. rivulatus</i> , nuevo registro (río Lluta), <i>Trichomycterus</i> sp16	0825, 0826, 0827, 0955, 0956, 0864, 0864B, 0864C, 16, 0957, 0959, 0879	Altiplano, Pacífico, Atlántico	Lauca, Lluta, Isluga, Huasco, Vilcanota
CitB	Hap_10	<i>T. chungaraensis</i> , <i>T. laucaensis</i>	0830, 0834, 0835, 0839, 0840, 0801, 0804, 0805, 0831, 0837, 0865, 0881,	Altiplano	Lauca, Mal Paso
CitB	Hap_11	<i>T. chungaraensis</i>	0838	Altiplano	Mal Paso
CitB	Hap_12	<i>T. laucaensis</i>	0802, 0803, 0806, 0807, 0809, 0810, 0811, 0812, 0829, 0875, 0876	Altiplano	Lauca
CitB	Hap_13	<i>T. laucaensis</i>	0808	Altiplano	Lauca
CitB	Hap_14	<i>T. laucaensis</i>	0828, 0832	Altiplano	Lauca
CitB	Hap_15	<i>T. chungaraensis</i> , <i>T. laucaensis</i>	0836, 0870, 0871	Altiplano	Lauca, Mal Paso
CitB	Hap_16	<i>B. maldonadoi</i>	0939, 0940, 0941A	Pacífico	BíoBío
CitB	Hap_17	<i>T. areolatus</i>	B	Pacífico	Itata
CitB	Hap_18	<i>T. areolatus</i>	C, 0952, 0934	Pacífico	Itata, BíoBío

Gen	Haplotipo	Especies	Individuos	Vertiente	Cuencas
CitB	Hap_19	<i>T. chiltoni</i>	0942	Pacífico	BíoBío
CitB	Hap_20	Nuevo registro (Colpa, Umaqui)	0961, 0880, 0962	Altiplano	Colpa, Caquena
CitB	Hap_21	<i>T. punctulatus</i>	06, 07, 08	Pacífico	Lurín
CitB	Hap_22	<i>Trichomycterus</i> sp15	15	Atlántico	Vilcanota
CitB	Hap_23	<i>Trichomycterus</i> sp17, <i>Trichomycterus</i> spCuzco	17, 25, 26, 27, 28	Atlántico	Casiilo, Cuzco
CitB	Hap_24	<i>Trichomycterus</i> spCuzco	23	Atlántico	Cuzco
CitB	Hap_25	<i>Trichomycterus</i> spCuzco	34	Atlántico	Cuzco
CitB	Hap_26	<i>T. quechuorum</i>	37	Pacífico	Arequipa
CitB	Hap_27	<i>T. quechuorum</i>	38, 40	Pacífico	Arequipa
CitB	Hap_28	<i>T. rivulatus</i>	09	Altiplano	Antauta
CitB	Hap_29	<i>T. rivulatus</i> , <i>T. aff.</i> <i>rivulatus</i>	11, 0878	Altiplano	Lauca, Antauta
CitB	Hap_30	<i>T. rivulatus</i>	12	Altiplano	Antauta
CitB	Hap_31	<i>T. rivulatus</i>	13	Altiplano	Antauta
CitB	Hap_32	<i>T. areolatus</i>	0859	Pacífico	Rapel
CitB	Hap_33	<i>T. areolatus</i>	MEP16	Pacífico	Maipo
CitB	Hap_34	<i>T. areolatus</i>	MIM16	Pacífico	Maipo
CitB	Hap_35	<i>T. areolatus</i>	0902	Pacífico	Mataquito
CitB	Hap_36	<i>T. areolatus</i>	0905, 0911, 0846, 0847	Pacífico	Mataquito, Maule
CitB	Hap_37	<i>T. areolatus</i>	0844	Pacífico	Maule
CitB	Hap_38	<i>T. areolatus</i>	0928, 0950	Pacífico	Itata
CitB	Hap_39	<i>T. areolatus</i>	0951	Pacífico	Itata
CitB	Hap_40	<i>T. areolatus</i>	0933	Pacífico	BíoBío
CitB	Hap_41	<i>T. areolatus</i>	0935, 0943, 0944	Pacífico	BíoBío

Gen	Haplotipo	Especies	Individuos	Vertiente	Cuencas
CitB	Hap_42	<i>T. areolatus</i>	0833	Pacífico	Valdivia
CitB	Hap_43	<i>H. macraei</i>	HAT	Pacífico	Aysén
CitB	Hap_44	<i>Bullockia</i> sp	B7L, B3L, B5L, B4L	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_2	<i>N. inermis</i>	Ni0801	Pacífico	Maipo
COI	Hap_3	<i>N. inermis</i>	NiA	Pacífico	Itata
COI	Hap_4	<i>T. aff rivulatus</i>	0826, 0875	Altiplano	Isluga, Lauca
COI	Hap_5	<i>T. areolatus</i>	0844, 0849, 0850, 0926, 0927, 0928, 0934, 0847, 0945, 0950, B, C, 0846, 0951	Pacífico	Maule, Tomé, Itata, BíoBío
COI	Hap_6	<i>T. areolatus</i>	0851, 0852, 0853	Pacífico	Tomé
COI	Hap_7	<i>T. areolatus</i>	0859, 0931	Pacífico	Rapel
COI	Hap_8	<i>T. areolatus</i>	0860, 0901, 0902, 0906, 0930	Pacífico	Rapel, Mataquito
COI	Hap_9	<i>T. areolatus</i>	0912	Pacífico	Mataquito
COI	Hap_10	<i>T. areolatus</i>	0863	Pacífico	Rapel
COI	Hap_11	<i>T. aff rivulatus</i> , <i>Trichomycterus</i> sp16	0864B, 16	Altiplano, Atlántico	Huasco, Vilcanota
COI	Hap_12	<i>T. aff rivulatus</i>	0876	Altiplano	Lauca
COI	Hap_13	<i>T. areolatus</i>	MEP16	Pacífico	Maipo
COI	Hap_14	<i>T. areolatus</i>	MIM02, 0907, 0932, MANG02, MIM01,	Pacífico	Maipo, Mataquito
COI	Hap_15	<i>T. areolatus</i>	MIM09, 0909, MEP12, MIM16, MIM17	Pacífico	Maipo, Mataquito
COI	Hap_16	<i>T. chiltoni</i>	0942	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_17	<i>T. areolatus</i>	0943	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_18	<i>T. areolatus</i>	0944	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_19	Nuevo registro (Lluta)	0956, 0957	Pacífico	Lluta
COI	Hap_20	<i>Trichomycterus</i> spCuzco, <i>Trichomycterus</i> sp17	17, 23, 24, 26, 38	Atlántico	Casiilo, Cuzco
COI	Hap_21	<i>T. areolatus</i>	ALLAY02	Pacífico	Aconcagua

Gen	Haplotipo	Especies	Individuos	Vertiente	Cuencas
COI	Hap_22	<i>T. areolatus</i>	LHU35, PIN13, PIN13, PIN08, PIN01, CCC27, LCM26, CCC28, LHU13, LHU29, PAN12	Pacífico	Limarí, Choapa, Aconcagua
COI	Hap_23	Nuevo registro (Colpa, Umaqui), <i>Trichomycterus</i> sp15	0880,15, 0963	Altiplano	Caquena, Colpa, Vilcanota
COI	Hap_24	<i>T. areolatus</i>	0905, 0911	Pacífico	Mataquito
COI	Hap_25	<i>T. areolatus</i>	0908	Pacífico	Mataquito
COI	Hap_26	<i>T. areolatus</i>	0933	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_27	<i>T. areolatus</i>	0935	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_28	<i>T. areolatus</i>	0952	Pacífico	Itata
COI	Hap_29	<i>T. areolatus</i>	AEP01, AEP07	Pacífico	Aconcagua
COI	Hap_30	<i>T. areolatus</i>	AEP02	Pacífico	Aconcagua
COI	Hap_31	<i>T. areolatus</i>	ALLAY01	Pacífico	Aconcagua
COI	Hap_32	<i>T. areolatus</i>	ALLAY13	Pacífico	Aconcagua
COI	Hap_33	<i>T. areolatus</i>	ALLAY14	Pacífico	Aconcagua
COI	Hap_34	<i>T. areolatus</i>	ALLAY10	Pacífico	Aconcagua
COI	Hap_35	<i>Trichomycterus</i> spCuzco	27	Atlántico	Cuzco
COI	Hap_36	<i>Trichomycterus</i> spCuzco, <i>T. quechuorum</i>	28, 37	Pacífico, Atlántico	Cuzco, Arequipa
COI	Hap_37	Nuevo registro (Umaqui)	0961	Altiplano	Caquena
COI	Hap_38	<i>T. laucaensis</i> , <i>T. chungaraensis</i>	0828, 0830, 0870, 0872, 0873, 0921, 0918, 0917	Altiplano	Lauca, Mal Paso
COI	Hap_39	<i>T. punctulatus</i>	8	Pacífico	Lurín
COI	Hap_40	<i>T. punctulatus</i>	7	Pacífico	Lurín

Gen	Haplotipo	Especies	Individuos	Vertiente	Cuencas
COI	Hap_41	<i>B. maldonadoi</i>	0941A, 0939	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_42	<i>Bullockia</i> sp	B5	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_43	<i>Bullockia</i> sp	B3	Pacífico	BíoBío
COI	Hap_44	<i>T. areolatus</i>	0833	Pacífico	Valdivia
COI	Hap_45	<i>H. macraei</i>	HAT	Pacífico	Aysén

Tabla I-2 Distancia genética intra e inter clados de la Región Altoandina, según análisis restringido CIT+COI+DLoop (1471 caracteres), y corregidas por el modelo Kimura de 2 parámetros.

	<i>T. aff rivulatus</i>	<i>T. laucaensis</i>	Colpa+Umaqui	<i>T. quechuorum+</i> Cuzco
<i>T. aff rivulatus</i>	0,4 (0,1) %	0,5 %	0,5 %	0,5 %
<i>T. laucaensis</i>	3,6 %	0,1 (0,1) %	0,2 %	0,3 %
Colpa+Umaqui	3,3 %	1,0 %	0,1 (0,1) %	0,2 %
<i>T. quechuorum+</i> Cuzco	4,0 %	1,2 %	1,0 %	0,2 (0,1) %

Bajo la diagonal se indica la distancia inter clados, sobre la diagonal el error estándar; en la diagonal y en negritas, se indica la distancia intra clados y en paréntesis el error estándar.

Capítulo II Genética de poblaciones y morfología

Genética de poblaciones y aspectos morfológicos:

¿es válido *Trichomycterus maculatus* Valenciennes, 1846?

Introducción

Las especies son las unidades fundamentales en ecología, evolución, sistemática y biología de la conservación (Sites Jr & Marshall 2004, de Queiroz 2005a). Desde el amplio campo de la teoría evolutiva, delimitar especies es importante para comprender muchos mecanismos y procesos evolutivos (Sites Jr & Marshall 2003), pero la existencia de diversas definiciones (e.g. Cracraft 1989, Sites Jr & Marshall 2004, de Queiroz 2005a), constituye un problema, debido a la incompatibilidad – a lo menos parcial – entre ellas (de Queiroz 2007). Desde una perspectiva ecosistémica de conservación – considerando especies focales o piedra-angular – (Mills *et al.* 1993, Lambeck 1997) pasando por la explícita mención en la legislación (Rowcliffe *et al.* 2004), se requiere delimitar y reconocer una especie, para proponer eficientes medidas de protección. Incluso, a nivel de taxa individual, los esfuerzos de conservación han apuntado históricamente a conservar las especies como “tipos”, tomando nombres literalmente de guías de campo y sin atender a ningún concepto específico (Sites Jr & Crandall 1997). Por lo tanto, el reto fundamental es ir más allá de un juicio subjetivo, y desarrollar métodos operacionales para delimitar (Sites Jr & Marshall 2004) y evaluar rigurosamente la hipótesis de validez de una especie (Sites Jr & Crandall 1997).

El estudio comparado de secuencias de ADN mitocondrial ($_{MT}ADN$) revolucionó el campo de la filogeografía (Avice *et al.* 1987, Hickerson *et al.* 2010). Como resultado, se han propuesto un gran número de hipótesis biogeográficas (Ogden & Thorpe 2002) e

incluso cuestionamientos taxonómicos (Unmack *et al.* 2009b), pero el uso exclusivo de secuencias de _{MT}ADN es controversial y no recomendado, particularmente cuando se roza la sistemática (Wiens & Penkrot 2002). La utilización complementaria de marcadores moleculares variables y multilocus como son los AFLP (Vos *et al.* 1995), se ha convertido en una novel aplicación a la discriminación taxonómica (Ogden & Thorpe 2002). Ejemplos del uso de AFLP en discriminación taxonómica se cuentan desde bacterias (Avrova *et al.* 2002), plantas (Lara-Cabrera & Spooner 2004), reptiles (Creer *et al.* 2004), mamíferos (Negrini *et al.* 2007), hasta peces (Zhang *et al.* 2004); e incluso existen aplicaciones filogenéticas (Albertson *et al.* 1999, Luo *et al.* 2007). Las razones de su amplio uso radican en su replicabilidad, facilidad de uso y fundamentalmente bajo costo (Luo *et al.* 2007) y aplicado a grupos problemáticos, puede resultar de utilidad inusitada.

La familia Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes) es un ensamble monofilético de especies, fundamentalmente abordados desde una perspectiva filogenética (concepto de especie filogenética: Cracraft 1989) y diagnosticable en base a caracteres morfológicos (Arratia *et al.* 1978, Arratia & Menu-Marque 1981, Arratia 1983a, de Pinna 1998). Por otro lado, la subfamilia Trichomycterinae es un grupo que ha sido desintegrado gradualmente por la exclusión de especies (Costa & Bockmann 1993, de Pinna 1998) y requiere una urgente revisión taxonómica de sus más de 200 especies nominales (de Pinna 1998, de Pinna & Wosiacki 2003). Esta subfamilia incluye al género *Trichomycterus* Valenciennes, grupo en el que se han descrito numerosas especies recientemente (e.g. Castellanos-Morales 2008, Wosiacki & de Pinna 2008b, Fernández & Vari 2009), algunas de ellas con propiedades tan distintivas que pueden ser

fácilmente diagnosticables sin la necesidad de un trabajo poblacional a fina escala (Wosiacki & de Pinna 2008a). Sin embargo, en muchos casos la identificación a nivel específico es imposible (de Pinna 1998), mientras que en otros, el aspecto externo es tan similar, que se podría llegar a confundir especies muy distantes (Arratia 1983c). En estos casos, la adición de nuevos caracteres como secuencias de ADN u otros marcadores moleculares, podrían ayudar en la discriminación de especies.

Chile posee actualmente cinco especies válidas descritas para el género *Trichomycterus* (Eigenmann 1927, Arratia 1983c). *Trichomycterus areolatus* Valenciennes es una de ellas y un trabajo filogenético (Capítulo I) hipotetiza la existencia de *Trichomycterus maculatus* Valenciennes debido a un profundo quiebre filogeográfico y la existencia en simpatria de dos linajes mitocondriales en el río Maipo. Sin embargo, un riguroso trabajo osteológico (Arratia & Chang 1975) y evidencia experimental de cambio en los patrones de coloración de *Trichomycterus* en el río Maipo (Duarte *et al.* 1971, Arratia 1983b), sugieren lo contrario. Esta situación constituye una interesante problemática para ser abordada con metodologías multidisciplinarias, incluyendo aspectos morfológicos, secuenciación del ADN mitocondrial y análisis del ADN nuclear.

Para evaluar la validez de *T. maculatus*, se adoptará la definición propuesta por de Queiroz (2005a, 2005b, 2007), en la que una especie es considerada un segmento de un linaje de metapoblaciones que evolucionan independientemente. Las propiedades secundarias (incompatibilidad reproductiva, diagnosis morfológica, monofilia, cohesión fenotípica, utilización de nichos ecológicos distintos, etc.) son consideradas aspectos contingentes, y que podrían o no adquirirse durante el curso de su existencia (de Queiroz

2007). Esta elección resulta particularmente útil en el caso de los tricomicteridos, pues permite evaluar los límites de las especies desde distintas perspectivas filosóficas (Sites Jr & Marshall 2004). Por ejemplo, valora la coincidencia de aspectos morfológicos y de sistemática molecular (Chile central en Capítulo I, Fernández & Schaefer 2009), pero también reconcilia las autapomorfias diagnósticas (clado Colpa + Umaqui, *T. aff rivulatus* del río Lluta en Capítulo I) con la ausencia de divergencia molecular y/o monofilia para radiaciones recientes (Shaffer & Thomson 2007).

Por lo tanto, el objetivo de este capítulo es evaluar la validez de *T. maculatus*, determinando: (i) la extensión del aislamiento reproductivo utilizando marcadores moleculares nucleares y mitocondriales, y (ii) la diagnosis morfológica con caracteres externos. Si *T. maculatus* corresponde a una especie válida, se deberá observar a lo menos aislamiento reproductivo y/o diferenciación morfológica, respecto a *T. areolatus*.

Materiales y métodos

Selección de individuos

Con el objeto de tener una adecuada representación de los dos linajes mitocondriales identificados en el río Maipo, se utilizó una muestra ampliada de 76 individuos procedentes de las 3 localidades originalmente incorporadas en el análisis filogenético (Figura II-1). Adicionalmente, se utilizaron 82 individuos colectados en 3 localidades del río Aconcagua, con el fin de tener un patrón comparativo para marcadores moleculares y aspectos morfológicos. Estos individuos resultan ideales para contrastar la extensión de la diferenciación genotípica y fenotípica dentro del río Maipo, pues el linaje mitocondrial del río Aconcagua está más emparentado al putativo

normalizando con el método Box-Cox aquellas que mostraban desviación (Legendre & Legendre 1998).

Resultados

Asignación de individuos

El análisis de asignación de individuos entre los 3 linajes mitocondriales indicó la existencia de 2 grupos genéticos según STRUCTURE (Figura II-2.A) y 3 grupos genéticos según FLOCK ($P_{\text{global}} < 0,0001$; R_1 v/s $R_2 < 0,0001$; R_1 v/s $R_3 < 0,0001$; R_2 v/s $R_3 < 0,0001$). La asignación individual no coincidió entre ambos programas (Figuras no mostradas), agrupando todos los individuos del río Aconcagua versus todos los individuos del río Maipo (de acuerdo a STRUCTURE); en tanto que dos grupos se identificaron dentro del río Aconcagua y un solo grupo en el río Maipo, de acuerdo a FLOCK.

Por el contrario, dentro del río Maipo el análisis de genotipo realizado en STRUCTURE sugiere la existencia de dos grupos genéticos, de acuerdo a la metodología de Evanno y col. (2005, Figura II-2.B); misma cantidad de grupos que fue determinada por FLOCK ($K = 2$: $P_{\text{global}} = 0,0009$; R_1 v/s $R_2 = 0,0009$).

Según STRUCTURE, el 88,15% (67/76) de los individuos genotipados fueron asignados con probabilidad $>95\%$ dentro del río Maipo (Figura II-3.A). FLOCK en tanto, asignó 17 individuos al grupo A (22,36%) y 59 individuos al grupo B (77,63%) (Figura II-3.B), siendo -17,58 (SD = 3,47) el promedio de diferencia de verosimilitud para el grupo A, y 18,56 (SD = 4,21) para el grupo B. Los individuos que tuvieron valores de asignación intermedios, se indican en la Tabla II-1.

Análisis morfológicos

Con el objeto de explorar diferencias fenotípicas que podrían corresponder a cada genotipo (ver resultados: grupos genéticos A, B y C), un total de 7 individuos del grupo A del río Maipo, 10 individuos del grupo B del río Maipo y 16 individuos del grupo C (río Aconcagua), fueron fotografiados en vista dorsal, ventral y lateral en una cámara digital de 12 Mpx de resolución. Las imágenes fueron importadas en el software Image Tool 3.0 (Wilcox *et al.* 2002) y medidas con una precisión de 0,01 mm. Se consideró las siguientes medidas: longitudes total, estándar, prepélvica, preanal y predorsal, largo, ancho y altura de la cabeza, altura del cuerpo, base de las aletas anal y dorsal, distancia del ano desde el borde anterior y longitud de la aleta pélvica. Todas las medidas fueron estandarizadas por la longitud estándar. Adicionalmente, los individuos genotipados fueron inspeccionados en la morfología del sistema de la línea lateral de acuerdo a Arratia & Huaquín (1995).

Para evaluar posibles diferencias *a priori* en los caracteres morfométricos se realizó un análisis de componentes principales (ACP) en el software Primer 5.0 (Clarke & Warwick 2001). Dado que no se observó un agrupamiento claro, se seleccionaron aquellas variables que mostraban diferencias significativas ($\alpha \leq 0,05$) en un análisis de varianza de una vía, con la asignación de genotipos como niveles en el software estadístico R (R Development Core Team 2009), realizando nuevamente el ACP con un set de variables reducidas. Se complementó el segundo ACP con la inspección gráfica de las variables selectas en una matriz de diagramas de dispersión. La normalidad de las variables se inspeccionó observando el ajuste de los residuales en un gráfico de comparación de cuantiles en el software R (R Development Core Team 2009),

haplotipos utilizando el algoritmo de unión de la mediana, en el software Network (Bandelt *et al.* 1999), visualizando diferencias en pasos mutacionales y frecuencias de los haplotipos derivados de las secuencias de la región control.

Análisis estadísticos

Dada la gran cantidad de loci AFLP variables y de individuos, se realizó una inspección gráfica de los individuos genotipados a través de un escalamiento no métrico multidimensional en el software Primer 5.0 (Clarke & Warwick 2001) con el objeto de tener una interpretación multivariada de la asignación de individuos hecha por la genética de poblaciones. Se seleccionó este procedimiento con el fin de preservar la relación de ordenación entre los individuos (Legendre & Legendre 1998). Posteriormente, para evaluar diferencias en la composición de los individuos genotipados se realizaron dos análisis de similitud (ANOSIM) de una vía. Se seleccionó a (i) los grupos genéticos y (ii) los grupos genéticos por localidad de muestreo como niveles, evaluando con 9999 permutaciones la significancia ($\alpha = 0,05$), en el mismo software. Ambos análisis se realizaron en una matriz de similitud de Bray-Curtis, y realizando las correcciones de Bonferroni (Rice 1989). El primero de ellos (i) se realizó con los individuos del río Aconcagua, de tal forma de establecer un patrón comparativo para las distancias de los individuos en simpatria (por tanto, que tienen la posibilidad de reproducción mutua), y cuando no coexisten espacialmente; en tanto que el segundo (ii) se realizó únicamente con los individuos del río Maipo, con el objeto de evaluar la diferenciación entre los sitios de muestreo de las especies putativas.

Secuenciación y asignación de individuos

Con el fin de evaluar la hipótesis y extensión del aislamiento reproductivo entre los dos linajes mitocondriales que coexisten en simpatria en el río Maipo, se utilizaron dos pruebas de asignación basados en la composición alélica del conjunto de loci AFLP, que no establecen *a priori* la pertenencia a algún grupo genético (Rosenberg *et al.* 2001, Duchesne & Turgeon 2009). La primera de ellas se realizó en el software STRUCTURE 2.3.3 (Pritchard *et al.* 2000, Falush *et al.* 2003, Falush *et al.* 2007), que implementa un algoritmo Bayesiano de agrupamiento, estimando la fracción del genoma que pertenece a cada grupo genético identificado como probabilidad *a posteriori*. Los análisis de STRUCTURE fueron realizados en el cluster BioHPC de la Universidad de Cornell, EEUU (<http://cbsuapps.tc.cornell.edu>). Para determinar el número apropiado de grupos genéticos (K), se realizaron 12 réplicas independientes desde K=1 hasta K=10 y se siguieron los métodos de Evanno y col. (2005) implementados en la versión web de STRUCTURE HARVESTER 0.56.3 (Earl 2009). Las 12 réplicas del K selecto fueron ponderadas en el software CLUMPP con el algoritmo Large K Greedy (Jakobsson & Rosenberg 2007) y luego graficadas. La segunda estrategia implementada se realizó en el software FLOCK (Duchesne & Turgeon 2009), cuya base lógica difiere tangencialmente del método probabilístico de STRUCTURE. FLOCK utiliza un procedimiento de realocación repetida de la muestra global hasta R submuestras, maximizando la verosimilitud de pertenencia del individuo *i* al grupo R (Duchesne & Turgeon 2009). El análisis se realiza de forma iterativa hasta que la prueba de diferenciación entre grupos no es significativa. Para corroborar los dos linajes mitocondriales encontrados en el río Maipo (ver Capítulo I), se construyó una red de

Trichomycterus maculatus que a *Trichomycterus areolatus* (Capítulo I, Fig I-5).

Extracción de ADN, secuenciación y genotipado

El ADN fue extraído de tejidos y/o aletas preservadas en alcohol al 95% utilizando el método de sales (Aljanabi & Martinez 1997) y conservado a -20° C en 50 µL de agua destilada hasta los análisis. Para la amplificación de AFLP se utilizó el protocolo de Vos y col. (1995), y dos combinaciones de primers selectivos (EcoRI-ACT/MseI-CTT y EcoRI-ACC/ MseI-CTC), con el fluoróforo inserto en el primer MseI. Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Inc. (www.macrogen.com), visualizando los fragmentos en secuenciadores ABI con capilares. Los tamaños de alelos fueron estimados contra el estándar LIZ500 utilizando el software Peak Scanner (Applied Biosystems Inc.). Únicamente los peak claros y consistentes entre 75 y 500 pares de bases fueron utilizados en el análisis, codificando con 1/0 la presencia/ausencia respectiva. Para evitar posibles errores de interpretación, sólo se utilizaron loci con más de 1% y menos de 99% de polimorfismo. Para amplificar la región control se utilizaron los primers 5'-CCT AAC TCC CAA AGC TAG GAT-3' y 5'-TGC GGA TAC TTG CAT GTA TAA-3' diseñados por E. Poulin (comm. pers.). Las reacciones de PCR fueron realizadas en un volumen de 25 µl, con 50 µg de ADN, 0,1 U/µl de ADN Taq polimerasa (Invitrogen), 5 pmol de cada primer, 3,2 ηM de MgCl₂, 1x de buffer de reacción y 0,2 U/µl de dNTP. Las condiciones de amplificación la región control fueron: 94° C por 3 min. seguidos por 30 ciclos de 94° C por 30 s., 60° C por 90 s. y 72° C por 90 s., con una elongación final a 72° C por 10 min. Los productos de PCR fueron enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (www.macrogen.com).

Secuenciación de la región control

La red de haplotipos de las secuencias de la región control se muestra en la Figura II-4. Se destaca un haplogrupo asociado al grupo A (Figura II-2, arriba centro-izquierda), otro haplogrupo asociado al grupo B (Figura II-2, arriba derecha) y un tercer haplogrupo (Figura II-2, abajo) asociado al grupo C. Además se observa que 5 individuos putativamente asignados al grupo A poseen haplotipos asociados al grupo B (Figura II-2, en blanco, arriba derecha).

Análisis de similaridad

El análisis de similaridad global de los individuos genotipados mostró diferencias significativas ($R = 0,914$; $p < 0,0001$), al igual que las pruebas pareadas entre el grupo A *v/s* grupo B ($R = 0,841$; $p < 0,0001$), grupo A *v/s* grupo C ($R = 0,709$; $p < 0,0001$) y grupo B *v/s* grupo C ($R = 0,989$; $p < 0,0001$). Estas diferencias se pueden observar gráficamente en la Figura II-5.

Por otro lado, al realizar el análisis de similaridad considerando los individuos del río Maipo, únicamente el grupo A no presenta diferencias entre las localidades de Puangue e Isla de Maipo, todas las demás localidades de muestreo presentan diferencias entre sí (Figura II-6, Tabla II-2).

Análisis morfológico

La inspección del sistema de la línea lateral para los individuos genotipados, reveló las siguientes diferencias: tanto los individuos del grupo A, como del grupo C, poseen 3 poros en el canal supraorbital (s1, s2, s6), en tanto que los individuos del grupo

B poseen 4 poros en el canal supraorbital (s1, s2, s3 y s6). Los individuos de los tres grupos genéticos mantienen el mismo patrón para el canal infraorbital, preopercular y la línea lateral.

Las variables seleccionadas del total de caracteres morfométricos externos, de acuerdo al análisis de varianza unifactorial (resultados no mostrados), fueron: longitud prepélvica, longitud predorsal, ancho de la cabeza, alto del cuerpo, base de la aleta dorsal, ancho de la cabeza y ancho interorbital. El análisis de componentes principales con estas variables explicó el 74,5% de varianza en sus dos primeros ejes, y se muestra en la Figura II-7.

Finalmente, en la Figura II-8 se indica la matriz de diagramas de dispersión de las variables seleccionadas. En general se observa que la combinación de dos variables no distingue entre grupos genéticos, a pesar de que la combinación de algunas de ellas (ancho del cuerpo, alto de la cabeza, ancho interorbital) las agrupa parcialmente.

Discusión

La integración de herramientas basadas en genética de poblaciones junto a estadística multivariada del presente trabajo permite sugerir fuertemente la existencia de dos grupos genéticos dentro del río Maipo, soportados tanto por la asignación individual bayesiana (Figura II-3.A), la asignación basada en la verosimilitud de pertenencia (Figura II-3.B), las pruebas pareadas de similaridad y la inspección gráfica de la composición de los individuos genotipados (Figura II-5). Aún más, considerando que el patrón de comparación para los individuos genotipados corresponde a la población del río Aconcagua, las pruebas pareadas de similaridad y la inspección gráfica del genotipo

(Figura II-5) también permite sugerir la existencia de un tercer grupo, en base al aislamiento del río Aconcagua. Sin embargo, los resultados de las pruebas de asignación al utilizar las tres especies putativas, no recuperan tres equivalentes grupos genéticos. Esto puede deberse a dos motivos: i) es posible que la mayor heterogeneidad dentro del río Aconcagua enmascare la variabilidad observada dentro del río Maipo, ya que FLOCK determinó 2 grupos genéticos para el río Aconcagua, y la dispersión gráfica (Figura II-5) es considerable. ii) Dado que ni FLOCK, ni STRUCTURE incorporan modelos de mutaciones para AFLP (e.g. Luo *et al.* 2007), ni fueron diseñados para identificar especies, es esperable cierta confusión al respecto. Meudt y col. (2009) también encontraron incongruencias entre especies basadas en morfología y la asignación bayesiana inferida por STRUCTURE y AFLP. Es posible que se pierda resolución en este estudio debido al mal ajuste del modelo supuesto por STRUCTURE y los marcadores dominantes utilizados (Meudt *et al.* 2009). Para ahondar en esto, debe reforzarse el análisis de AFLP con la utilización de inferencia filogenética (Luo *et al.* 2007) u otras medidas de distancia que complementen la asignación genotípica.

La inspección gráfica o análisis cluster del patrón de genotipos basados en AFLP no implica ausencia de flujo génico (Parsons & Shaw 2001). Sin embargo, la asignación de individuos (Figura II-3) sugiere la existencia de flujo génico bidireccional, aunque limitado, entre los grupos genéticos A y B dentro del río Maipo; patrón que es opuesto al observado comparativamente al grupo C del río Aconcagua (tanto STRUCTURE y FLOCK segregan al río Aconcagua del río Maipo). La correlación con el patrón filogeográfico de la región control (Figura II-4) reafirma el amplio aislamiento temporal inferido por otros marcadores mitocondriales para los tres grupos genéticos (Figura I-5 en Capítulo I), pero

también confirma la hibridación sobre el grupo A: 5 individuos poseen haplotipos que están asociados al haplogrupo del grupo genético B. Uno de ellos corresponde al individuo 1-MIM12 (Tabla II-1).

El análisis morfológico pudo evidenciar un carácter externo que puede resultar diagnóstico para los grupos genéticos dentro del río Maipo: la ausencia del poro s3 del canal supraorbital del sistema de la línea lateral (Arratia & Huaquin 1995). La condición de este carácter, sin embargo, no se diferencia del observado en los individuos del grupo C. Los caracteres morfométricos externos también sugieren una diferenciación incipiente (Figura II-7) que sólo es visible al filtrar las variables previamente en un análisis de varianza. La combinación bivariada, por el contrario, no muestra el mismo patrón (Figura II-8), y un análisis basado únicamente en esta inspección gráfica sólo agregaría confusión.

¿Especies, sub-especies o poblaciones locales?

Dada la tradición taxonómica de Trichomycteridae (Eigenmann 1927, Arratia & Chang 1975, Arratia *et al.* 1978, Arratia 1983c, Arratia 1983a, Arratia & Huaquin 1995, Arratia 1998, Castellanos-Morales 2008, Wosiacki & de Pinna 2008b, Fernández & Vari 2009), es necesario tener argumentos muy fuertes para reconocer y validar la existencia de una especie sin utilizar aspectos morfológicos y comparativos. La sola descripción de nuevos taxa sin un correspondiente posicionamiento filogenético (Wosiacki & de Pinna 2008a) podría aumentar la naturaleza para o polifilética de la subfamilia Trichomycterinae (de Pinna 1998); de la misma forma que nuevos registros basados en limitados especímenes y sin una identificación específica apropiada (e.g. Unmack *et al.*

2009a) contribuye a complicar la historia taxonómica del grupo (de Pinna 1998).

Las descripciones originales de *Trichomycterus areolatus* y de *Trichomycterus maculatus* (Cuvier & Valenciennes 1846 pp: 492-493) en el contexto de este trabajo, no indican caracteres útiles para determinar a que especie correspondería cada grupo genético. Sin embargo, Eigenmann & Eigenmann (1890) menciona que *T. areolatus* es de color café claro, con bandas longitudinales púrpura (Eigenmann & Eigenmann 1890). La inspección de los individuos del grupo genético B revela que algunos de ellos poseen este carácter; por lo tanto, el grupo genético B correspondería a *T. areolatus* y el grupo genético A correspondería a *T. maculatus*.

El esquema hipotético *a priori* (Sites Jr & Crandall 1997) expuesto en este trabajo permite evaluar las propiedades secundarias (de Queiroz 2005b, de Queiroz 2007) para reconocer el carácter específico de *T. maculatus*. Los resultados indican un aislamiento reproductivo en la mayoría de los individuos de las especies putativas dentro del río Maipo, sin embargo hay evidencia de hibridación parcial, tanto para ADN nuclear (AFLP) como mitocondrial (región control). Además, la distinción morfológica basada en el canal supraorbital del sistema de la línea lateral permite afirmar, en conjunto a la evidencia genética y las menciones de Eigenmann & Eigenmann (1890), que es correcto revalidar la existencia de *Trichomycterus maculatus*. Sin embargo, es preciso aumentar el tamaño muestral de los caracteres morfométricos externos (Figuras II-7 y II-8) para apoyar el reconocimiento formal de *T. maculatus*. La osteología (Arratia & Chang 1975), por otro lado, debe ser reconsiderada, pues es posible que haya una estructuración geográfica de *T. maculatus* en el río Maipo: sólo 1 individuo de 38 analizados en la localidad de Angostura corresponde a esta especie (resultados no

mostrados), y ésta fue la misma localidad desde donde Arratia & Chang (1975) extrajeron los ejemplares. Además, se reconoce cierta variabilidad osteológica (Arratia 1983a) que podría corresponder a *T. maculatus* (G. Arratia comm. pers.)

De acuerdo a lo sugerido por de Queiroz (2005b, 2007) y otros autores (Wiens & Penkrot 2002), la población del río Aconcagua (grupo genético C) debiera ser reconocido igualmente como una especie que exhibe un tiempo intermedio de aislamiento reproductivo. La divergencia genética (mitocondrial) requiere $\frac{1}{4}$ del tiempo requerido para formar una unidad monofilética respecto a un gen nuclear que esté asociado a la morfología (Wiens & Penkrot 2002 y referencias). Un carácter morfológico tardará entonces 4 veces el tiempo requerido por un haplotipo mitocondrial para ser exclusivo a una especie (Kimura 1983 en Wiens & Penkrot 2002), por lo tanto, la diferenciación genética mitocondrial es en algunos casos, previa a la divergencia morfológica. A pesar de estas sugerencias, en ausencia de un análisis morfológico extensivo que diferencie *T. maculatus* de la población del río Aconcagua, es prudente considerarla momentáneamente como una unidad evolutiva significativa (Crandall *et al.* 2000), parte del grupo de especies *maculatus*: *Trichomycterus sp grp spp maculatus*.

Conectividad entre poblaciones y conservación

Las pruebas pareadas de similaridad (Tabla II-2), en conjunto con la inspección gráfica de los individuos genotipados dentro del río Maipo (Figura II-6) sugiere la existencia de estructuración de las poblaciones de *T. areolatus* y *T. maculatus* dentro del río Maipo. La población de Angostura de *T. areolatus* forma un agrupamiento notorio (Figura II-6), y es confirmado como un grupo genético independiente (Tabla II-2) de las

poblaciones de Isla de Maipo y el estero Puangue. La probable diferenciación de estas dos poblaciones (Tabla II-2) puede deberse a la presencia de individuos híbridos con *T. maculatus* y por lo tanto requiere de otros análisis en virtud del solapamiento gráfico (Figura II-6).

Trichomycterus maculatus, en cambio, parece formar una población homogénea y distribuída principalmente entre el estero Puangue e Isla de Maipo (Figura II-1). Este análisis, en conjunto con el patrón observado en la red de haplotipos (Figura II-2) sugiere que es una especie relictiva, con un rango de distribución limitado y alta diversidad genética. Se requieren análisis adicionales con muestreo más amplio e intensivo para determinar la extensión geográfica de *T. maculatus*. Es muy posible que compita directa o indirectamente con *T. areolatus*, y en conjunto a su baja frecuencia (~1 de cada 5 tricomicteridos) y amenazas de contaminación y alteración hidrológica en el río Maipo (Vila *et al.* 2006), esta especie podría estar en serio peligro de extinción.

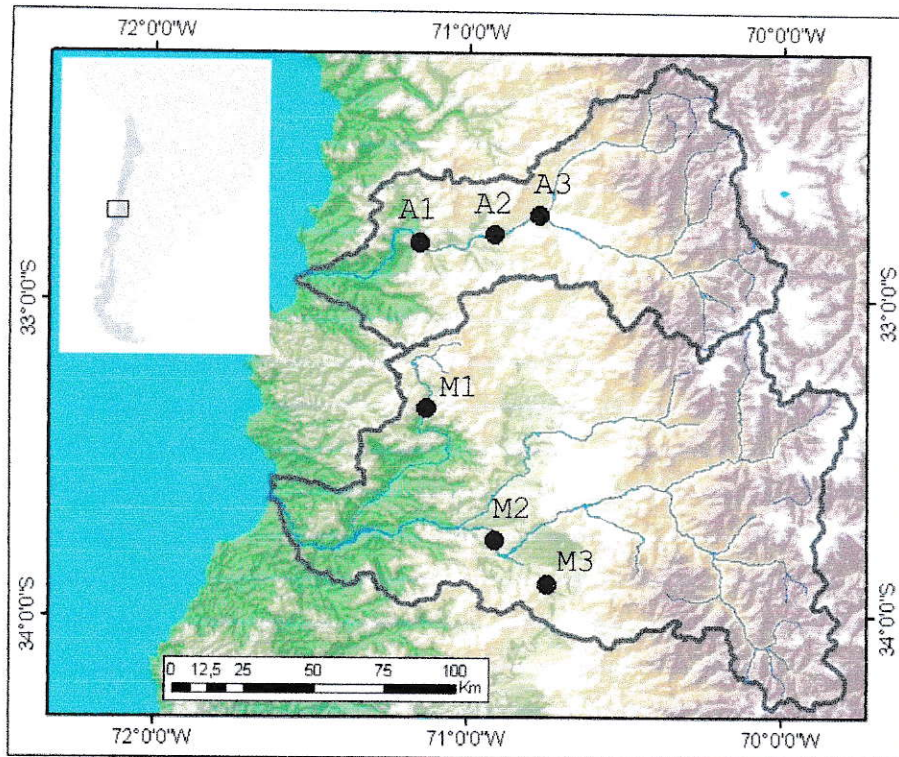


Figura II-1 Ubicación de localidades de muestreo en los ríos Aconcagua y Maipo. Río Aconcagua: A1 = LlayLlay, A2 = Panquehue, A3 = Pocuro; río Maipo: M1 = Puangue, M2 = Isla de Maipo, M3 = Angostura.

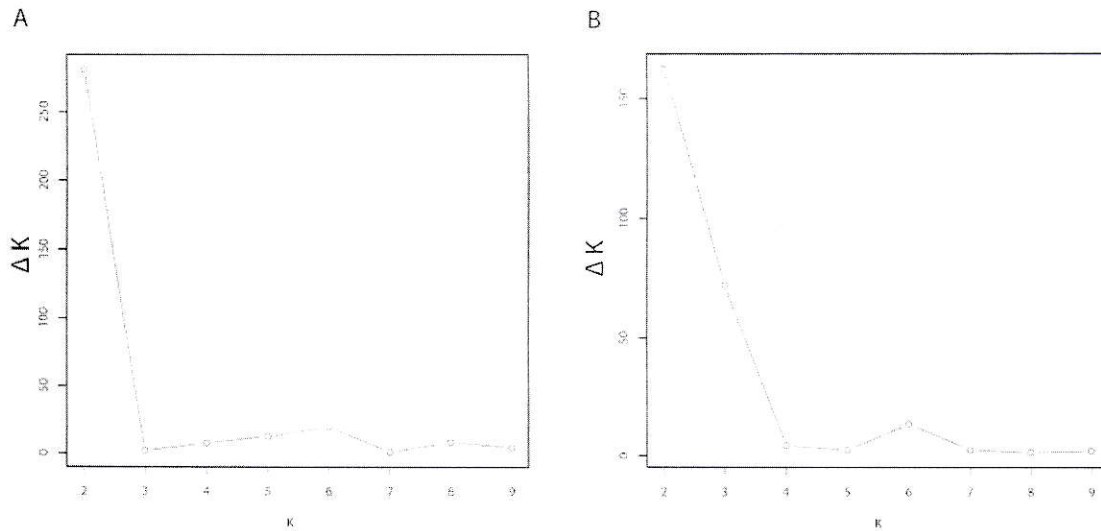


Figura II-2 Gráficos para la inferencia apropiada de grupos genéticos (K) para structure, en función del método de Evanno y col. (2005). A. Se indica ΔK promedio respecto a K considerando las tres especies putativas. B. Se indica ΔK promedio respecto a K considerando sólo los individuos en el río Maipo. En ambas figuras se infiere que existen $K = 2$ grupos genéticos.

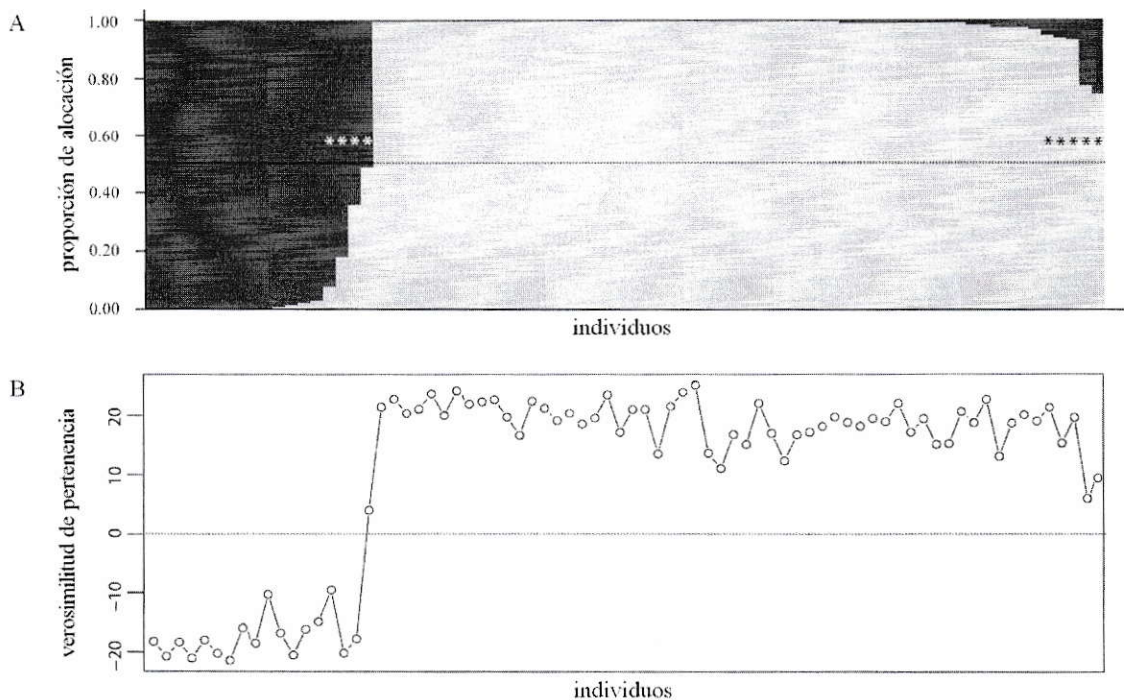


Figura II-3 A. Proporción de asignación individual según structure ($K=2$), la línea punteada indica el nivel 0,5 de admixtura, y el color indica la pertenencia: gris oscuro = grupo A, gris claro = grupo B. Se indica con * aquellos individuos que fueron asignados con prob. $< 95\%$. B. Proporción de individuos asignados a cada grupo genético según flock ($K=2$), valores negativos indica asignación al grupo A, y valores positivos indica asignación al grupo B; la línea punteada indica el valor 0. Los individuos están ordenados de tal forma que coinciden verticalmente en ambas figuras.

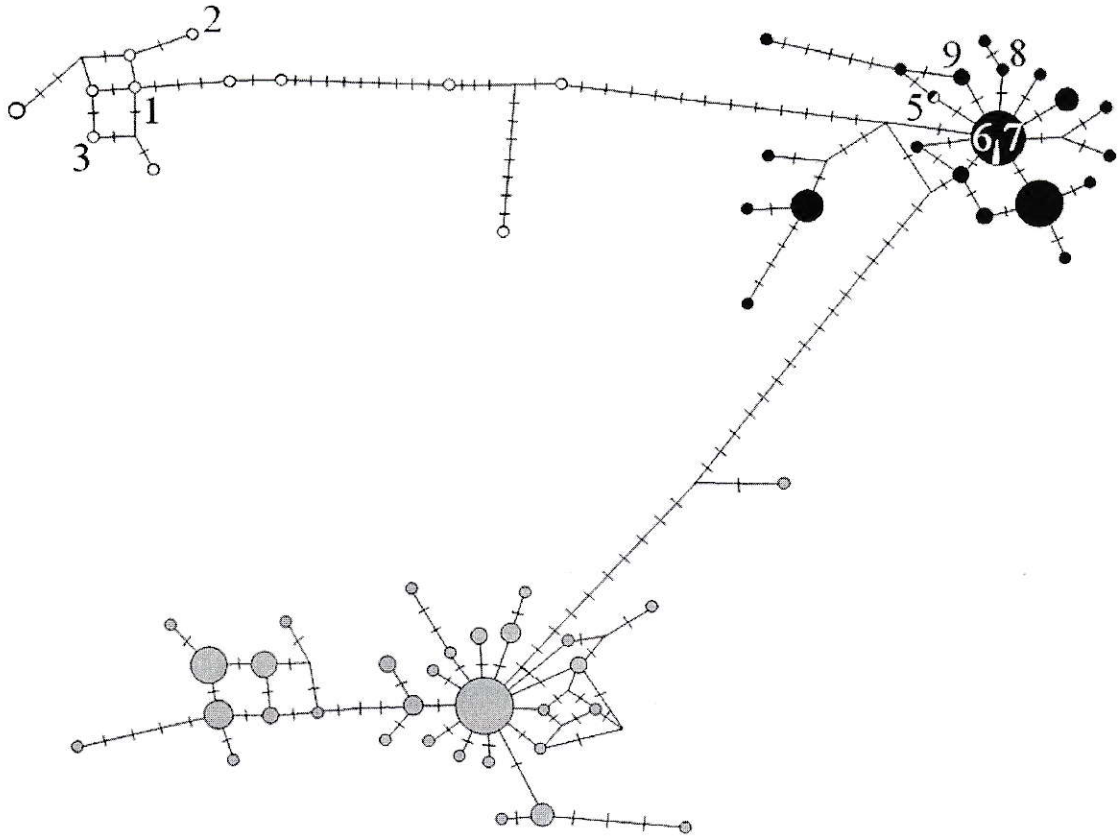


Figura II-4 Red de haplotipos construída con las secuencias de la región control. Cada círculo corresponde a un haplotipo, el tamaño es proporcional a la frecuencia. Los colores se asignaron de acuerdo a los genotipos: color blanco grupo A, negro grupo B, gris grupo C. Se indica además con números el haplotipo correspondiente a los individuos de la Tabla II-1.

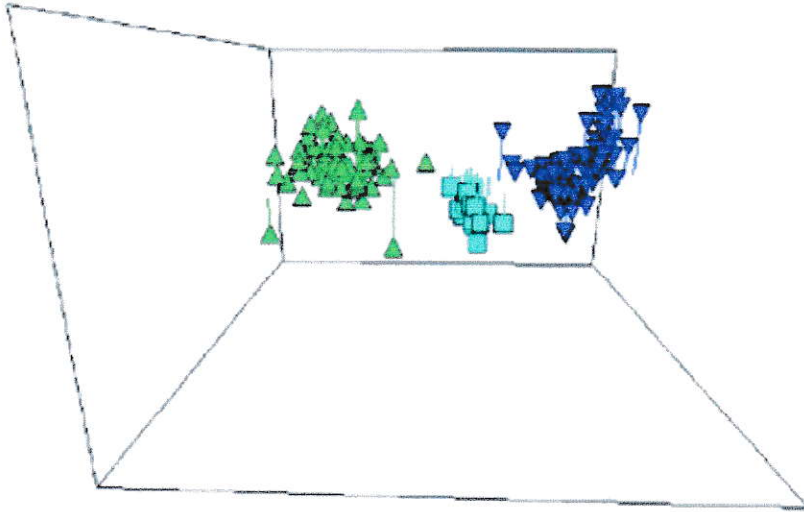


Figura II-5 Escalamiento no métrico multidimensional (stress mínimo 0,09) de los individuos genotipados. Cuadrados corresponde al grupo A (río Maipo), triángulos verdes corresponde al grupo B (río Maipo) y triángulos azules corresponde al grupo C (río Aconcagua).

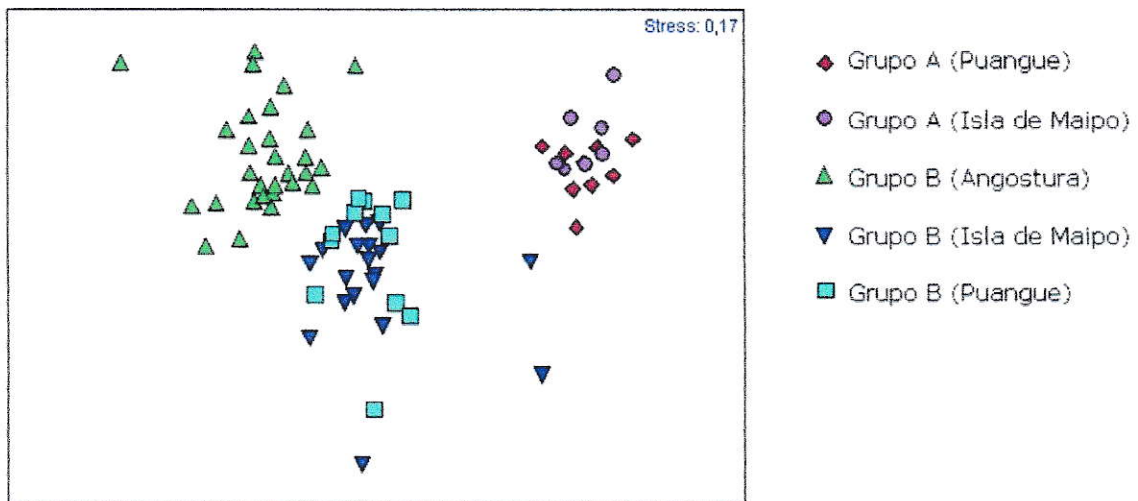


Figura II-6 Escalamiento no métrico multidimensional de los individuos genotipados en el río Maipo, según localidad de muestreo.

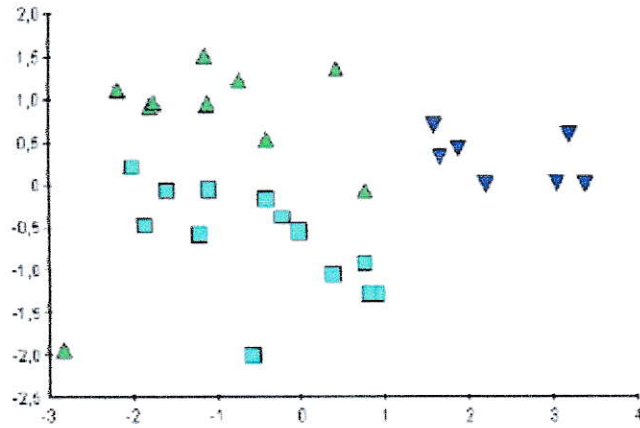


Figura II-7 Análisis de componentes principales con los caracteres morfométricos externos como variables. Triángulo azul corresponde al grupo A (río Maipo), triángulo verde corresponde al grupo B (río Maipo), y cuadrado corresponde al grupo C (río Aconcagua).

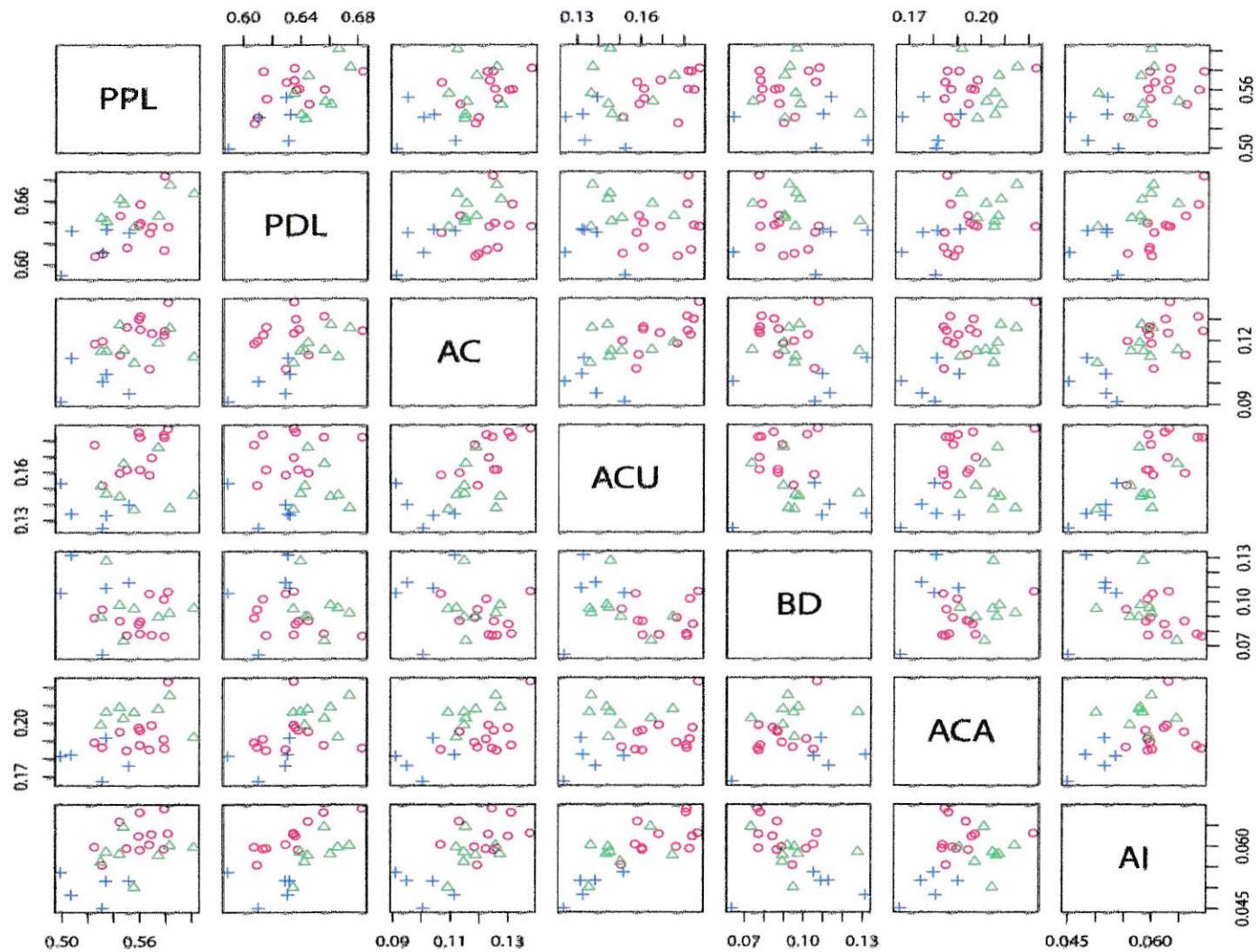


Figura II-8 Matriz de diagramas de dispersión de las variables morfométricas. Las cruces corresponden al grupo genético A (río Maipo), los triángulos al grupo genético B (río Maipo), y los círculos corresponden al grupo C (río Aconcagua).

Tabla II-1 Cuadro comparativo de la asignación individual entre STRUCTURE y FLOCK, considerando aquellos individuos con valores de asignación intermedios.

Individuo	STRUCTURE		FLOCK			
	Grupo A	Grupo B	verosimilitud dentro de		DIFF	Asignación
			Grupo A	Grupo B		
1. RMIM12	91,71%	8,29%	-17,46	-26,95	-9,49	Grupo A
2. RMEP11	81,77%	18,23%	-22,97	-43,16	-20,19	Grupo A
3. RMEP01	63,93%	36,07%	-25,90	-43,71	-17,81	Grupo A
4. RMEP17	51,08%	48,92%	-22,93	-18,93	4,00	Grupo B
5. RMEP07	5,03%	94,97%	-33,84	-12,40	21,45	Grupo B
6. RMEP02	5,85%	94,15%	-45,39	-30,04	15,35	Grupo B
7. RMEP24	6,82%	93,18%	-34,55	-14,89	19,65	Grupo B
8. RMANG29	22,26%	77,74%	-34,22	-28,25	5,97	Grupo B
9. RMIM08	25,59%	74,41%	-26,99	-17,55	9,44	Grupo B

* Para STRUCTURE se indica el porcentaje de asignación a cada grup genético, promediada entre las 12 réplicas para K=2. Para FLOCK se indica la verosimilitud del individuo dentro de cada genotipo asignado; DIFF corresponde a la diferencia de verosimilitud entre ambos grupos genéticos. RMIM = Río Maipo, Isla de Maipo; RMEP = Río Maipo, Estero Puangue; RMANG = Río Maipo, Angostura.

Tabla II-2 Pruebas pareadas del análisis de similaridad para las localidades muestreadas en el río Maipo.

Grupo B	Grupo B			Grupo A	
	Isla de Maipo	Angostura	Puangué	Isla de Maipo	Puangué
Isla de Maipo		0,0001	0,0020	0,0001	0,0001
Angostura	0,59		0,0001	0,0001	0,0001
Puangué	0,231	0,469		0,0002	0,0001
Grupo A					
Isla de Maipo	0,875	0,989	0,955		0,11
Puangué	0,831	0,989	0,959	0,096	

* Valor del estadístico R (ANOSIM) indicado bajo la diagonal, $\alpha \leq$ que los valores de probabilidad indicados sobre la diagonal. Significancia corregida por Bonferroni: $\alpha \leq 0,05/9$ indicada en negritas.

Discusión y conclusiones finales

La fauna de peces en Chile es de increíble singularidad. Desde los diplomístidos y nematogénidos que tienen interés sistemático y evolutivo (Arratia 1992, Arratia & Huaquin 1995), pasando por tricomictéridos que sobreviven en los más adversos ambientes de la Región Altoandina (Arratia 1983c), hasta percíctidos que en algún momento fueron recurso extractivo. La realidad actual, por el contrario, indica que se han introducido al menos 26 especies foráneas (Quezada-Romegialli *et al.* 2009) y que el 93% de la ictiofauna nativa está en peligro de extinción, es vulnerable o está insuficientemente conocida (Habit *et al.* 2006, Vila *et al.* 2006).

El énfasis de este trabajo recalca la singularidad de la fauna nativa y sugiere muy fuertemente que el contexto temporal no está limitado únicamente a las últimas y más estudiadas glaciaciones del cuaternario (Ruzzante *et al.* 2006, Unmack *et al.* 2009b), sino que es muy plausible el modelo geológico planteado en el Capítulo I. El registro fósil da cuenta de una importante diversidad ictiológica entre los 37° a 39° LS durante el Mioceno (Rubilar 1994). Probablemente el clima era más favorable a los serrasálmidos registrados, y la diversidad de percíctidos, caraciformes y nematogénidos era mayor en ese entonces (Arratia 1982, Rubilar 1994, Arratia & Cione 1996). El modelo, no obstante, es grueso en su concepción y requiere ser correlacionado con otros proxies paleoclimáticos y paleogeográficos, para adoptar validez. A la vez que se requiere numerosos trabajos sistemáticos, filogenéticos (Dyer 2000b) y filogeográficos que aporten en este ámbito.

El grupo de especies del Rango Altoandino presenta un desafío particular. En lo

que respecta a Chile, es necesario comparar las poblaciones asignadas a *Trichomycterus aff. rivulatus* a especímenes obtenidos de la localidad tipo de *Trichomycterus rivulatus*, de manera tal de diagnosticar todas las poblaciones existentes. Los tres nuevos registros (poblaciones de los ríos Lluta, Caquena y bofedal de Colpa) corresponderían a nuevas especies, que requieren ser descritos en el futuro próximo.

En Chile centro sur, es necesario realizar una descripción formal de *Trichomycterus areolatus*, *Trichomycterus maculatus* y *Trichomycterus chiltoni*, con el fin de diagnosticar el resto de las poblaciones en esta área y determinar la distribución geográfica de estas especies.

Una conclusión interesante, es la referida a la sistemática de Trichomycterinae: dado que se encontró evidencia molecular de la hipótesis morfológica de Wosiacki (2002 en Sato 2007), resultaría prudente remover a *T. areolatus*, *T. maculatus* y *T. chiltoni* del género *Trichomycterus*, estableciendo al menos 2 géneros nuevos, de acuerdo a la inclusión de *Hatcheria* y *Bullockia* entre este grupo de especies. En el corto o mediano plazo, se requerirá un trabajo comparativo con otras especies emparentadas a este grupo (probablemente de Argentina) para dilucidar este tema.

Una de las conclusiones importantes es la asociada al reconocimiento y validez de las especies. Distintas escuelas abogan por la compatibilidad reproductiva como principal argumento para reconocer el estatus taxonómico de especie (sensu Mayr en de Queiroz 2005a). Para complejizar la discusión filosófica, lo indicado por *Trichomycterus* en el río Maipo sugiere que la hibridación es un fenómeno posible, pero recalca a la vez que sabemos muy poco de aspectos reproductivos de los peces en Chile (Huaquin & Arratia 2010). Por ejemplo, diferencias en estrategias reproductivas en percílid y

tricomictéridos se reconocen para los ríos Maipo e Imperial (Arratia 2003, G. Arratia comm. pers.). Estos hechos, unidos al importante aislamiento temporal y reproductivo, sin duda implican que estamos subvalorando nuestra diversidad íctica, ya sea desde una perspectiva formal de especie (de Queiroz 2005b, de Queiroz 2007), o bien, desde una perspectiva evolutiva de conservación (Crandall *et al.* 2000).

La lista de diversidad íctica ciertamente aumentará con los nuevos registros de *Trichomycterus*, *Orestias*, *Bullockia* y atherinópsidos que llevan años esperando a ser descritos (i.e Dyer 2000a). La pregunta esencial es: ¿Qué conseguimos al describir más especies, si las pocas que ya se han descrito, no gozan de la protección necesaria? El llamado de atención es a las instituciones competentes, que propicien realmente la conservación que se supone está consagrada en la legislación.

Bibliografía

- Albertson, R.C., Markert, J.A., Danley, P.D. & Kocher, T.D. (1999) Phylogeny of a rapidly evolving clade: The cichlid fishes of Lake Malawi, East Africa. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5107-5110.
- Aljanabi, S.M. & Martinez, I. (1997) Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4692-4693.
- Allmendinger, R.W., Jordan, T.E., Kay, S.M. & Isacks, B.L. (1997) The evolution of the Altiplano-Puna Plateau of the Central Andes. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences*, **25**, 74-139.
- Arratia, G. (1982) A review of freshwater percoids from South America (Pisces, Osteichthyes, Perciformes, Percichthyidae, and Perciliidae). *Abhandlungen der Senckenbergischen Naturforschenden Gesellschaft*, **540**, 1-52.
- Arratia, G. (1983a) The caudal skeleton of ostariophysan fishes (Teleostei): Intraspecific variation in Trichomycteridae (Siluriformes). *Journal of Morphology*, **177**, 213-229.
- Arratia, G. (1983b) Preferencias de habitat de peces siluriformes de aguas continentales de Chile (Fam. Diplomystidae y Trichomycteridae). *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **18**, 217-237.
- Arratia, G. (1983c) *Trichomycterus chungaraensis* n. sp. and *Trichomycterus laucaensis* n. sp. (Pisces, Siluriformes, Trichomycteridae) from the high Andean Range. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **18**, 65-87.
- Arratia, G. (1990) The South American Trichomycterinae (Teleostei: Siluriformes), a problematic group. In: G. Peters & R. Hutterer (eds.) *Vertebrates in the tropics*. Bonn: Museum Alexander Koenig.
- Arratia, G. (1992) Development and variation of the suspensorium of primitive catfishes (Teleostei: Ostariophysi) and their phylogenetic relationships. *Bonner Zoologische Monographien*, **32**, 1-140.
- Arratia, G. (1998) *Silvinichthys*, a new genus of trichomycterid catfishes from the Argentinian Andes, with redescription of *Trichomycterus nigricans*. *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, **9**, 347-370.
- Arratia, G. (2003) Family Perciliidae (Southern Basses). In: R.E. Reis, S. Kullander & C.J. Ferraris Jr. (eds.) *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS.
- Arratia, G. & Cione, A. (1996) The record of fossil fishes of southern South America. In: G. Arratia (ed.) *Contributions of southern South America to vertebrate paleontology*. München: F. Pfeil.
- Arratia, G. & Chang, A. (1975) Osteología de *Pygidium aerolatum* Valenciennes 1848 (Peces Siluriformes, Trichomycteridae). *Publicación ocasional del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)*, **18**, 3-12.
- Arratia, G., Chang, A., Menu Marque, S. & Rojas, G. (1978) About *Bullockia* n. gen.,

- and *Trichomycterus mendozensis* n. sp. and revision of the family Trichomycteridae. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, **13**, 157-194.
- Arratia, G. & Huaquin, L. (1995) Morphology of the lateral line system and of the skin of diplomystid and certain primitive loricarioid catfishes and systematics and ecological considerations. *Bonner Zoologische Monographien*, **36**, 1-110.
- Arratia, G. & Menu-Marque, S. (1981) Revision of the freshwater catfishes of the genus *Hatcheria* (Siluriformes, Trichomycteridae) with commentaries on ecology and biogeography. *Zoologisches Anzeiger*, **207**, 88-111.
- Arratia, G., Peñafort, B. & Menu-Marque, S. (1983) Peces de la región sureste de Los Andes y sus probables relaciones biogeográficas actuales. *Deserta*, **7**, 48-108.
- Arratia, G., Rojas, G. & Chang, A. (1981) Géneros de peces de aguas continentales de Chile. *Publicación ocasional del Museo de Historia Natural de Chile*, **4**, 3-108.
- Avise, J., Arnold, J., Ball, R., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J., Reeb, C. & Saunders, N. (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522.
- Avrova, A., Hyman, L., Toth, R. & Toth, I. (2002) Application of amplified fragment length polymorphism fingerprinting for taxonomy and identification of the soft rot bacteria *Erwinia carotovora* and *Erwinia chrysanthemi*. *Applied and Environmental Microbiology*, **68**, 1499.
- Azpelicueta, M. & Rubilar, A. (1998) A Miocene Nematogenys (Teleostei: Siluriformes: Nematogenyidae) from south-central Chile. *Journal of Vertebrate Paleontology*, **18**, 475-483.
- Bandelt, H., Forster, P. & Rohlf, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37.
- Britto, M. (2003) Análise filogenética da ordem Siluriformes com ênfase nas relações da superfamília Loricarioidea (Teleostei: Ostariophysi). Tesis de doctorado no publicada. Instituto de Biociências, Universidade Estadual de São Paulo, São Paulo. 289 pp.
- Castellanos-Morales, C. (2008) *Trichomycterus uisae*: a new species of hypogean catfish (Siluriformes: Trichomycteridae) from the northeastern Andean Cordillera of Colombia. *Neotropical Ichthyology*, **6**, 307-314.
- Clarke, K. & Warwick, R. (2001) Primer-E (5) computer program. *Natural Environmental Research Council, Plymouth*.
- Clavero, J.E., Sparks, S.J., Polanco, E. & Pringle, M.S. (2004) Evolution of *Parinacota* volcano, Central Andes, Northern Chile. *Revista Geológica de Chile*, **31**, 317-347.
- Costa, W. & Bockmann, F. (1993) Un nouveau genre néotropical de la famille des Trichomycteridae (Siluriformes: Loricarioidei). *Revue française d'aquariologie (Nancy)*, **20**, 43-46.
- Cracraft, J. (1989) Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: D. Otte & J. Endler (eds.) *Speciation and its consequences*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.
- Crandall, K., Bininda-Emonds, O., Mace, G. & Wayne, R. (2000) Considering

- evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**, 290-295.
- Creer, S., Thorpe, R., Malhotra, A., Chou, W. & Stenson, A. (2004) The utility of AFLPs for supporting mitochondrial DNA phylogeographical analyses in the Taiwanese bamboo viper, *Trimeresurus stejnegeri*. *Journal of Evolutionary Biology*, **17**, 100-107.
- Cuvier, G. & Valenciennes, A. (1846) *Histoire naturelle des poissons. Tome dix-huitième. Supplément au tome XV*.
- Charrier, R., Baeza, O., Elgueta, S., Flynn, J.J., Gans, P., Kay, S.M., Muñoz, N., Wyss, A.R. & Zurita, E. (2002) Evidence for Cenozoic extensional basin development and tectonic inversion south of the flat-slab segment, southern Central Andes, Chile (33° - 36° S.L.). *Journal of South American Earth Sciences*, **15**, 117-139.
- Charrier, R., Chávez, A., Elgueta, S., Hérail, G., Flynn, J., Croft, D., Wyss, A., Riquelme, R. & García, M. (2005) Rapid tectonic and paleogeographic evolution associated with the development of the Chucal anticline and the Chucal-Lauca Basin in the Altiplano of Arica, northern Chile. *Journal of South American Earth Sciences*, **19**, 35-54.
- Charrier, R. & Fariás, M. (2008) Late Cenozoic evolution in the Chilean Andes. A framework for Andean uplift and morphologic evolution. *The Andes: Challenge for Geosciences. Fourth EGU Alexander von Humboldt International Conference (AvH4)*. Santiago, Chile.
- Charrier, R., Fariás, M. & MaksaeV, V. (2009) Evolución tectónica, paleogeográfica y metalogénica durante el Cenozoico en los Andes de Chile norte y central e implicaciones para las regiones adyacentes de Bolivia y Argentina. In: V. Ramos & A. Folguera (eds.) *XVII Congreso Geológico Argentino*. San Salvador de Jujuy: Sociedad Geológica Argentina.
- Charrier, R., Hérail, G., Flynn, J., Riquelme, R., García, M., Croft, D. & Wyss, A. (1999) Opposite thrust-vergencies in the precordillera and western cordillera in northern Chile and structurally linked Cenozoic paleoenvironmental evolution. *Proceedings of the Fourth International Symposium on Andean Geodynamics (ISAG)*. Göttingen, Germany: Editions IRD.
- Charrier, R., Pinto, L. & Rodríguez, M.P. (2007) Tectonostratigraphic evolution of the Andean Orogen in Chile. In: T. Moreno & W. Gibbons (eds.) *The Geology of Chile*. London: The Geological Society.
- Chepstow-Lusty, A., Bush, M.B., Frogley, M.R., Baker, P.A., Fritz, S.C. & Aronson, J. (2005) Vegetation and climate change on the Bolivian Altiplano between 108,000 and 18,000 yr ago. *Quaternary Research*, **63**, 90-98.
- de Pinna, M.C. & Wosiacki, W. (2003) Family Trichomycteridae. (Pencil of parasitic catfishes). In: R.E. Reis, S.O. Kullander & C.J. Ferraris Jr. (eds.) *Check list of the freshwater fishes of South and Central America*. Porto Alegre, Brazil: EDIPUCRS.
- de Pinna, M.C.C. (1998) Phylogenetic relationships of Neotropical siluriforms (Teleostei: Ostariophysi): historical overview and synthesis of hypotheses. In: L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M. Lucena & C.A.S. Lucena (eds.) *Phylogeny and classification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS.

- de Queiroz, K. (2005a) *Colloquium Paper: Systematics and the Origin of Species: Ernst Mayr and the modern concept of species. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 6600-6607.
- de Queiroz, K. (2005b) Different species problems and their resolution. *BioEssays*, **27**, 1263-1269.
- de Queiroz, K. (2007) Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, **56**, 879-886.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, **7**, 214.
- Duarte, W., Feito, R., Jara, C., Moreno, C. & Orellana, A.E. (1971) Ictiofauna del sistema hidrográfico del río Maipo. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)*, **32**, 227-268.
- Duchesne, P. & Turgeon, J. (2009) FLOCK: a method for quick mapping of admixture without source samples. *Molecular Ecology Resources*, **9**, 1333-1344.
- Dunai, T.J., González, G.A. & Juez-Larré, J. (2005) Oligocene-Miocene age of aridity in the Atacama Desert revealed by exposure dating of erosion-sensitive landforms. *Geology*, **33**, 321-324.
- Dyer, B. (2000a) Revisión sistemática de los pejerreyes de Chile (Teleostei, Atheriniformes). *Estudios Oceanológicos (Chile)*, **19**, 99-127.
- Dyer, B. (2000b) Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos (Chile)*, **19**, 77-98.
- Earl, D. (2009) Structure Harvester. Version 0.5.3. (http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/)
- Eigenmann, C. (1927) The fresh-water fishes of Chile. *Memories of the National Academy of Sciences*, **22**, 1-63.
- Eigenmann, C. & Eigenmann, R. (1890) *A revision of the South American Nematognathi or cat-fishes*: California Academy of Sciences.
- 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.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. (2003) Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, **164**, 1567.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J. (2007) Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 574.
- Farías, M., Charrier, R., Carretier, S., Martinod, J., Fock, A., Campbell, D., Cáceres, J. & Comte, D. (2008) Late Miocene high and rapid surface uplift and its erosional response in the Andes of central Chile (33° - 35°S). *Tectonics*, **27**, TC1005, doi:10.1029/2006TC002046.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. (1995) Testing significance of incongruence. *Cladistics*, **10**, 315-319.
- Fernández, L. & Schaefer, S. (2009) Relationships among the Neotropical Candirus (Trichomycteridae, Siluriformes) and the evolution of parasitism based on analysis of mitochondrial and nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics*

- and Evolution*, **52**, 416-423.
- Fernández, L. & Vari, R.P. (2009) New Species of Trichomycterus from the Andean Cordillera of Argentina (Siluriformes: Trichomycteridae). *Copeia*, 195-202.
- Filatov, D.A. (2002) ProSeq: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 621-624.
- Flynn, J., Charrier, R., Croft, D., Gans, P., Herriott, T., Wertheim, J. & Wyss, A. (2008) Chronologic implications of new Miocene mammals from the Cura-Mallín and Trapa Trapa formations, Laguna del Laja area, south central Chile. *Journal of South American Earth Sciences*, **26**, 412-423.
- Garzzone, C., Hoke, G., Libarkin, J., Withers, S., MacFadden, B., Eiler, J., Ghosh, P. & Mulch, A. (2008) Rise of the Andes. *Science*, **320**, 1304-1307.
- Giambiagi, L.B. & Ramos, V.A. (2002) Structural evolution of the Andes in a transitional zone between flat and normal subduction (33°30' - 33°45'S), Argentina and Chile. *Journal of South American Earth Sciences*, **15**, 101-116.
- Giambiagi, L.B., Ramos, V.A., Godoy, E., Alvarez, P.P. & Orts, S. (2003) Cenozoic deformation and tectonic style of the Andes, between 33° and 34° south latitude. *Tectonics*, **22**, 1041, doi:10.1029/2001TC001354.
- Gregory-Wodzicki, K.M. (2000) Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Geological Society of America Bulletin*, **112**, 1091-1105.
- Habit, E., Dyer, B. & Vila, I. (2006) Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, **70**, 100-113.
- Habit, E. & Victoriano, P. (2005) Peces de agua dulce de la Cordillera de la Costa. In: C. Smith-Ramírez, J. Armesto & C. Valdovinos (eds.) *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- Hardman, M. (2005) The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **37**, 700-720.
- Hartley, A.J. (2003) Andean uplift and climate change. *Journal of the Geological Society, London*, **160**, 7-10.
- Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavender-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L., Victoriano, P.F. & Yoder, A.D. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 291-301.
- Huaquin, L. & Arratia, G. (2010) Evaluación del conocimiento reproductivo en fauna íctica continental de Chile. In: R. Meléndez & E. Poblete (eds.) *X Reunión nacional de Ictiología*. Santiago de Chile, 18-19 de Enero: Asociación Chilena de Ictiología - Universidad Andrés Bello.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics* **17**, 754-755.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, **23**, 1801-1806.
- Johns, G. & Avise, J. (1998) A comparative summary of genetic distances in the

- vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Biology and Evolution*, **15**, 1481-1490.
- Kocher, T., Thomas, W., Meyer, A., Edwards, S., Paabo, S., Villablanca, F. & Wilson, A. (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **86**, 6196-6200.
- Lambeck, R. (1997) Focal species: a multi-species umbrella for nature conservation. *Conservation Biology*, **11**, 849-856.
- Lara-Cabrera, S. & Spooner, D. (2004) Taxonomy of North and Central American diploid wild potato (*Solanum* sect. *Petota*) species: AFLP data. *Plant Systematics and Evolution*, **248**, 129-142.
- Legendre, P. & Legendre, L. (1998) *Numerical ecology*, Amsterdam: Elsevier.
- Lundberg, J.G. (1998) The temporal context for the diversification of Neotropical fishes. In: L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds.) *Phylogeny and Clasification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Lundberg, J.G., Marshall, L.G., Guerrero, J., Horton, B., Malabarba, M.C.S. & Wesselingh, F. (1998) The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical south american rivers. In: L.R. Malabarba, R.E. Reis, R.P. Vari, Z.M.S. Lucena & C.A.S. Lucena (eds.) *Phylogeny and Clasification of Neotropical fishes*. Porto Alegre: EDIPUCRS.
- Luo, R., Hipp, A. & Larget, B. (2007) A Bayesian model of AFLP marker evolution and phylogenetic inference. *Statistical applications in genetics and molecular biology*, **6**, 11.
- Lüssen, A., Falk, T.M. & Villwock, W. (2003) Phylogenetic patterns in populations of Chilean species of the genus *Orestias* (Teleostei: Cyprinodontidae): results of mitochondrial DNA analysis. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **29**, 151-160.
- Marshall, D., Simon, C. & Buckley, T. (2006) Accurate branch length estimation in partitioned Bayesian analyses requires accommodation of among-partition rate variation and attention to branch length priors. *Systematic Biology*, **55**, 993-1003.
- Meudt, H., Lockhart, P. & Bryant, D. (2009) Species delimitation and phylogeny of a New Zealand plant species radiation. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 111.
- Mills, L., Soulé, M. & Doak, D. (1993) The keystone-species concept in ecology and conservation. *Bioscience*, **43**, 219-224.
- Negrini, R., Nijman, I., Milanese, E., Moazami-Goudarzi, K., Williams, J., Erhardt, G., Dunner, S., Rodellar, C., Valentini, A. & Bradley, D. (2007) Differentiation of European cattle by AFLP fingerprinting. *Animal Genetics*, **38**, 60-66.
- Nylander, J. (2004) MrModeltest v2. Program distributed by the author. *Evolutionary Biology Centre, Uppsala University*.
- Ogden, R. & Thorpe, R. (2002) The usefulness of amplified fragment length polymorphism markers for taxon discrimination across graduated fine evolutionary levels in Caribbean *Anolis* lizards. *Molecular Ecology*, **11**, 437-445.
- Pardo, R. (2002) Diferenciación morfológica de poblaciones de *Trichomycterus areolatus* Valenciennes 1846 (Pisces: Siluriformes: Trichomycteridae) de Chile. *Gayana (Concepción)*, **66**, 203-205.

- Parsons, Y. & Shaw, K. (2001) Species boundaries and genetic diversity among Hawaiian crickets of the genus *Laupala* identified using amplified fragment length polymorphism. *Molecular Ecology*, **10**, 1765-1772.
- Posada, D. & Crandall, K.A. (1998) MODELTEST: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics Applications Note*, **14**, 817-818.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959.
- Quezada-Romegialli, C., Vila, I. & Veliz, D. (2009) A new invasive freshwater fish species in central Chile: *Jenynsia multidentata* (Jenyns, 1842) (Cyprinodontiformes: Anablepidae). *Gayana*, **73**, 233-236.
- R Development Core Team (2009) R: A language and environment for statistical computing. Version 2.10.1.
- Rambaut, A. & Drummond, A. (2003) Tracer: a program for analysing results from Bayesian MCMC programs such as BEAST & MrBayes. Oxford, UK. <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/software.html>.
- Ramos, V., Cegarra, M. & Cristallini, E. (1996) Cenozoic tectonics of the High Andes of west-central Argentina (30–36 S latitude). *Tectonophysics*, **259**, 185-200.
- Ribeiro, A. (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 225-246.
- Rice, W. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, **43**, 223-225.
- Robinson, D. & Foulds, L. (1981) Comparison of phylogenetic trees. *Mathematical Biosciences*, **53**, 131-147.
- Ronquist, F., van der Mark, P. & Huelsenbeck, J. (2009) Bayesian phylogenetic analysis using MrBayes - Practice. In: P. Lemey, M. Salemi & A.-M. Vandamme (eds.) *The Phylogenetic Handbook*. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Rosenberg, N., Burke, T., Elo, K., Feldman, M., Freidlin, P., Groenen, M., Hillel, J., Maki-Tanila, A., Tixier-Boichard, M. & Vignal, A. (2001) Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, **159**, 699.
- Rowcliffe, J., de Merode, E. & Cowlshaw, G. (2004) Do wildlife laws work? Species protection and the application of a prey choice model to poaching decisions. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **271**, 2631.
- Rubilar, A. (1994) Diversidad ictiológica en depósitos continentales miocenos de la Formación Cura-Mallín, Chile (37-39 S): implicancias paleográficas. *Revista Geológica de Chile*, **21**, 3-29.
- Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Cussac, V.E., Dalebout, M.L., Seibert, J., Ortubay, S. & Habit, E. (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology*, **15**, 2949-2968.
- Sato, L. (2007) Estudo das relações filogenéticas de Trichomycteridae (Teleostei, Siluriformes) com base em evidências cromossômicas e moleculares. Tesis de Doctorado no publicada. Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, Sao Paulo. 77 pp.
- Scott, S., Pardo, R. & Vila, I. (2007) Trophic niche overlap between two Chilean

- endemic species of *Trichomycterus* (Teleostei: Siluriformes). *Revista Chilena de Historia Natural*, **80**, 341-437.
- Shaffer, H. & Thomson, R. (2007) Delimiting species in recent radiations. *Systematic Biology*, **56**, 896.
- Shimodaira, H. (2002) An approximately unbiased test of phylogenetic tree selection. *Systematic Biology*, **51**, 492-508.
- Shimodaira, H. & Hasegawa, M. (2002) CONSEL: for assessing the confidence of phylogenetic tree selection. *Bioinformatics*, **17**, 1246-1247.
- Sites Jr, J. & Crandall, K. (1997) Testing species boundaries in biodiversity studies. *Conservation Biology*, **11**, 1289-1297.
- Sites Jr, J. & Marshall, J. (2003) Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **18**, 462-470.
- Sites Jr, J. & Marshall, J. (2004) Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, **35**, 199-227.
- Slack, J. & Munzner, T. (2007) TreeJuxtaposer. Version 2.1. (<http://olduvai.sourceforge.net/tj/>)
- Suarez, M. & Emparan, C. (1995) The stratigraphy, geochronology and paleophysiography of a Miocene fresh-water interarc basin, southern Chile. *Journal of South American Earth Sciences*, **8**, 17-31.
- Sukumaran, J. & Holder, M. (2009) SumTrees: Summarization of split support on phylogenetic trees. Version 1.0.2. Part of the DendroPy phylogenetic Computation Library 2.6.1. (<http://packages.python.org/DendroPy/>)
- Sullivan, J., Lundberg, J. & Hardman, M. (2006) A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using *rag1* and *rag2* nuclear gene sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **41**, 636-662.
- Swofford, D.L. (2000) *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*, Version 4.
- Templeton, A. (1983) Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of humans and the apes. *Evolution*, **37**, 221-244.
- Torrico, J.P., Hubert, N., Desmarais, E., Duponchelle, F., Nuñez Rodriguez, J., Montoya-Burgos, J., Garcia Davila, C., Carvajal-Vallejos, F.M., Grajales, A.A., Bonhomme, F. & Renno, J.F. (2009) Molecular phylogeny of the genus *Pseudoplatystoma* (): Biogeographic and evolutionary implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **51**, 588-594.
- Unmack, P., Habit, E. & Johnson, J. (2009a) New records of *Hatcheria macraei* (Siluriformes, Trichomycteridae) from Chilean province. *Gayana*, **73**, 102-110.
- Unmack, P.J., Bennin, A.P., Habit, E.M., Victoriano, P.F. & Johnson, J.B. (2009b) Impact of ocean barriers, topography and glaciation on the phylogeography of the catfish *Trichomycterus areolatus* (Teleostei: Trichomycteridae) in Chile. *Biological Journal of the Linnean Society*, **97**, 876-892.
- Vandervoort, D.S., Jordan, T.E., Zeitler, P.K. & Alonso, R.N. (1995) Chronology of internal drainage development and uplift, southern Puna Plateau, Argentine Central Andes. *Geology*, **23**, 145-148.
- Vergara, J., Azpelicueta, M. & Garcia, G. (2008) Phylogeography of the Neotropical

- catfish *Pimelodus albicans* (Siluriformes: Pimelodidae) from río de la Plata basin, South America, and conservation remarks. *Neotropical Ichthyology*, **6**, 75-85.
- Vila, I., Fuentes, L. & Contreras, M. (1999) Peces límnicos de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural (Chile)*, **48**, 61-75.
- Vila, I., Pardo, R., Dyer, B. & Habit, E. (2006) Peces límnicos: diversidad, origen y estado de conservación. In: I. Vila, A. Veloso, R. Schlatter & C. Ramírez (eds.) *Macrófitas y vertebrados de los sistemas límnicos de Chile*. Santiago de Chile: Editorial Universitaria.
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., Van de Lee, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J. & Kuiper, M. (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407-4414.
- Ward, R.D., Zemlak, T.S., Innes, B.H., Last, P.R. & Hebert, P.D.N. (2005) DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **360**, 1847-1857.
- Wiens, J. & Penkrot, T. (2002) Delimiting species using DNA and morphological variation and discordant species limits in spiny lizards (Sceloporus). *Systematic Biology*, **51**, 69.
- Wilcox, D., Dove, B., McDavid, D. & Greer, D. (2002) Image Tool for Windows.
- Wosiacki, W. & de Pinna, M. (2008a) A new species of the Neotropical catfish genus *Trichomycterus* (Siluriformes: Trichomycteridae) representing a new body shape for the family. *Copeia*, **2008**, 273-278.
- Wosiacki, W. & de Pinna, M. (2008b) *Trichomycterus igobi*, a new catfish species from the rio Iguaçu drainage: the largest head in Trichomycteridae (Siluriformes: Trichomycteridae). *Neotropical Ichthyology*, **6**, 17-23.
- Zama, A. & Cárdenas, E. (1984) Descriptive catalogue of marine and freshwater fishes from the Aysén Region, Southern Chile, with zoogeographical notes on the fish fauna. *Japan International Cooperative Agency (JICA)*, **9**, 1-75.
- Zhang, J., Huang, L. & Huo, H. (2004) Larval identification of *Lutjanus* Bloch in Nansha coral reefs by AFLP molecular method. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **298**, 3-20.
- Zunino, S., Baeza, M., Quiroz, S. & Rivera, R. (1999) Ampliación distribucional de la carmelita *Percilia gillissi* Girard, 1854 (Pisces: Perciliidae). *Anales del Museo de Historia Natural de Valparaíso (Chile)*, **24**, 119-120.
- Zwickl, D. (2006) Genetic algorithm approaches for the phylogenetic analysis of large biological sequence datasets under the maximum likelihood criterion. The University of Texas, Austin. 115 pp.