

UCH-FC  
Doc-EBE.  
V. 473  
C. 1

**EVOLUCIÓN DEL POLIMORFISMO ALAR EN GRIPOPTERYGIDAE  
(INSECTA, PLECOPTERA) Y SU RELACIÓN CON EL AISLAMIENTO  
GEOGRÁFICO.**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

En el cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología Evolutiva



Facultad de Ciencias

Por

**Alejandro Andrés Vera Sánchez**

2014

Director de Tesis: Dr. Marco A. Méndez Torres

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE DOCTORADO

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

ALEJANDRO ANDRÉS VERA SÁNCHEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas, con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 18 de abril 2013.

Director de Tesis:

Dr. Marco Méndez T

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Felipe Hinojosa

Dr. Elie Poulin

Dr. Rodrigo Medel

Dr. Daniel Frías



Four handwritten signatures in blue ink, each written over a horizontal dotted line. The signatures are stylized and difficult to read.

Dedicado a mi esposa e hijos, a mis compañeros y a mis maestros



Nací el 27 de mayo del año 1977, en Santiago de Chile, durante mi infancia deje en evidencia mi pasión naturalista, abandonando los juegos de pelota para explorar la precordillera colindante al lugar donde vivía, durante mis estudios básicos, me interese por visitar y colaborar en el Museo Nacional de Historia Natural (MNHN), donde a regañadientes, fui aceptado en la sección de Entomología para montar insectos, entonces era solo un niño inquieto. En 1995 ingresé a estudiar Pedagogía en Biología y Ciencias Naturales en la UMCE, durante este tránsito participé en varios proyectos de investigación en el MNHN y fui ayudante de merito para zoología (UMCE), además de dictar cursos de zoología en otras universidades. Mi tesis la realice en el estudio de nidificación de *Corynura chloris*, donde fui guiado por la Dra. Fresia Rojas (MNHN). El 2003 ingrese al Magister en Entomología (UMCE), estude durante dos años e inscribí mi tesis sobre la asociación de imagos y ninfas del género *Siphonella*, guiado por el Dr. Ariel Camousseight (MNHN). Entonces mi decisión de dedicarme al estudio de la sistemática y evolución morfológica de insectos “primitivos” ya estaba tomada, así como una profunda vocación a la enseñanza universitaria. El 2004 ingrese como socio titular a la Sociedad Chilena de Entomología y el año 2005 ingrese al programa de Doctorado en Ecología y Biología Evolutiva de la Universidad de Chile, con la convicción de adquirir la formación necesaria para que mi labor fuera un real aporte al estudio de la biodiversidad chilena. En estos momentos soy socio fundador de la Sociedad Chilena de Evolución, vicepresidente de la Sociedad Chilena de Entomología, profesor asistente en la UMCE, Colaborador científico en el MNHN y he publicado más de 25 artículos científicos.

## AGRADECIMIENTOS:

Quisiera agradecer a mis padres y a mi esposa por comprender y apoyar las diversas actividades que han involucrado mis estudios de postgrado, las que han postergado en muchas oportunidades otras ocupaciones familiares.

Quisiera agradecer a mi tutor Dr. Marco A. Méndez por la confianza que a depositado en mí, en las distintas etapas del desarrollo de esta tesis, así como su gestión en la administración de recursos humanos y logísticos para conseguir los datos aún cuando mis becas ya habían expirado. Al equipo del laboratorio GEVOL, quienes siempre me han apoyado tanto en enriquecidas discusiones teóricas como en el trabajo de laboratorio, muy especialmente a Luis Pastenes quien me ha asistido en muchas etapas del trabajo de laboratorio.

Quisiera agradecer al Dr. Ariel Camousseight (MNHN) quien me facilito el acceso a toda la información disponible en el Museo Nacional de Historia Natural, tanto a especímenes como a bibliografía, a la Dra. Fresia Rojas y a Don Mario Elgueta ambos del MNHN quienes siempre me facilitaron el acceso a equipos de la sección de Entomología. Al Dr. Ian MacLellan de Nueva Zelandia y al Dr. Claudio Gilberto Froehlich de Brasil, quienes me enviaron especímenes indispensables para este estudio desde sus localidades de origen. A quienes me contribuyeron con muestras de diversas zonas de Chile Álvaro Zúñiga, Marcos Ferrú, Sergio Rothmann, Marcelo Guerrero, Juan Enrique Barriga y José Mondaca. A los colegas argentinos Dra. María Laura Miserendino y Dr. Pablo Pessacq, quienes me facilitaron especímenes y bibliografía.

Siento que el producto de esta tesis no haya sido visto por los Dres. Ariel Camousseight e Ian MacLellan quienes se mostraban muy interesados, pero que fallecieron antes del término de esta tesis.

Esta Tesis fue financiada parcialmente por la beca de apoyo a tesis otorgada por CONICYT AT-23070183 y por el proyecto MECESUP UMC-0204.

## INDICE DE MATERIAS

	Página
Lista de tablas.....	vii
Lista de figuras.....	viii
Resumen.....	x
Summary.....	xi
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. Marco teórico.....	1
1.2. Hipótesis y objetivos.....	7
1.3. Referencias.....	10
CAPITULO II: SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LA FAMILIA GRIPOPTERYGIDAE (INSECTA: PLECOPTERA) Y LA EVOLUCIÓN DEL POLIMORFISMO ALAR.....	14
2.1. Resumen.....	14
2.2. Introducción.....	15
2.3. Materiales y métodos.....	23
2.4. Resultados.....	27
2.5. Discusión.....	31
2.6. Referencias.....	43
CAPÍTULO III: DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y POLIMORFISMO ALAR DE LIMNOPERLA JAFFUELI (NAVÁS, 1930) (PLECOPTERA, GRIPOPTERYGIDAE).....	48
3.1. Resumen.....	48
3.2. Introducción.....	49
3.3. Materiales y métodos.....	52
3.4. Resultados.....	54

3.5. Discusión.....	58
3.6. Referencias.....	69
<b>CAPÍTULO IV: FILOGEOGRAFÍA DE <i>L. JAFFUELI</i> (PLECOPTERA: GRIPOPTERYGIDAE) Y SU RELACIÓN CON EL POLIMORFISMO ALAR.....</b>	<b>73</b>
4.1. Resumen.....	73
4.2. Introducción.....	74
4.3. Materiales y métodos.....	79
4.4. Resultados.....	82
4.5. Discusión.....	84
4.6. Referencias.....	99
<b>CAPÍTULO V: CONCLUSIONES Y PROYECCIONES.....</b>	<b>106</b>
5.1. Logro de los objetivos e hipótesis abordadas en esta tesis.....	106
5.2. Proyecciones.....	111

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 2.1 Diversidad de especies actuales y de géneros para la Familia Gripopterygidae según su distribución geográfica.....	35
Tabla 2.2. Datos de los especímenes utilizados para la obtención de secuencias.....	36
Tabla 2.3. Referencias de las secuencias descargadas desde GenBank para los genes 16S y H3.....	38
Tabla 2.4. Respaldos estadísticos para los nodos A-G, resultados de cada partición y método de inferencia. ....	38
Tabla 3.1. Número de especímenes medidos para cada población incluida en el estudio morfométrico.....	62
Tabla 3.2. Localidades que presentaron individuos de fenotipo braquíptero.....	64
Tabla 4.1.- Localidades y especímenes analizados de <i>L. jaffueli</i> .....	91
Tabla 4.3.- Grupos de poblaciones clasificadas con diferentes criterios geográficos, para <i>L=Limnoperta</i> .....	93
Tabla 4.4. Resultados de AMOVA para los haplotipos del gen <i>ND2</i> de 17 poblaciones de <i>Limnoperla jaffueli</i> .....	95
Tabla 5.1. Resumen del logro de los objetivos planteados en esta tesis.....	110

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 2.1 Hipótesis filogenéticas obtenida con el método de MP para la partición del gen 16S.....	39
Figura 2.2. Hipótesis filogenética obtenida con el método de IB para la partición de dos genes combinados (16S+H3).....	40
Figura 2.3. Hipótesis filogenética obtenida con el método de ML para la partición de los tres genes combinados (16S+COI+H3).....	41
Figura 2.4. Reconstrucción de los estados ancestrales para la reducción del vuelo en Gripterygidae.....	42
Figura 3.1. Mapa de Chile con los puntos de distribución de las poblaciones incluidas en el estudio morfométrico.....	62
Figura 3.2. Imagos macho de <i>L. jaffueli</i> en vista dorsal, con las mediciones lineales trazadas.....	63
Figura 3.3. Distribución de <i>L. jaffueli</i> , sobre un mapa de cuencas hidrográficas de Chile...65	65
Figura. 3.4. Distribuciones para las frecuencias de las siete variables morfométricas y la razón largo del ala anterior sobre el ancho de la cabeza en <i>L. jaffueli</i> .....	66
Figura. 3.5. Resultados del análisis de componentes principales para las variables morfométricas estudiadas, señalando sexo y polimorfismo alar.....	67
Figura. 3.6. Resultados del análisis de componentes principales para las variables morfométricas estudiadas, señalando las localidades de origen.....	68

Figura. 4.1. Distribución conocida en Chile para *L. jaffueli*. Los puntos de color rojo muestran registros sólo de fenotipos braquípteros, los azules sólo de macrópteros y los verdes señalan poblaciones de fenotipo mixto. El área sombreada indica la superficie cubierta por hielo durante el último máximo glacial.....90

Figura 4.2. Distribución de los 37 haplotipos de *ND2* identificados entre las 20 poblaciones de *L. jaffueli* analizadas.....94

Figura 4.3.- Median-joining (MJ) network de 20 poblaciones de *L. jaffueli* basado sobre secuencias parciales del gen mitocondrial *ND2*.....96

Figura. 4.5.- Árbol de máxima parsimonia para los 37 haplotipos de *ND2* encontrados en 20 poblaciones de *Limnoperla jaffueli*.....98

## RESUMEN

Los insectos del Orden Plecoptera, presentan desarrollo dulceacuícola con imagos terrestres voladores. La condición de vuelo suprimido (áptera o braquíptera) es excepcional. Gripopterygidae presenta géneros con vuelo suprimido en Australia, Nueva Zelanda y Sudamérica. En la región austral de Sudamérica existen cuatro géneros monoespecíficos ápteros, que superponen su distribución con otros seis macrópteros de amplia distribución. Este estudio propuso evolución independiente para el rasgo áptero, y que el mecanismo que condujo a la fijación del carácter no volador habría ocurrido en pequeños refugios aislados con limitado flujo génico, formados durante las continuas perturbaciones glaciales, donde las condiciones desfavorables para los alados permitirían la sobrevivencia de aquellos con vuelo suprimido, explicando la abundancia de especies no voladoras en latitudes australes. Esta hipótesis fue evaluada con un análisis filogenético y el mapeo de los rasgos asociados al desarrollo de las alas para la familia Gripopterygidae. Los resultados confirman que el apterismo habría evolucionado de forma independiente. El mecanismo fue evaluado en la filogeografía de *Limnoperla jaffueli* (Navás), donde el origen de las poblaciones fue relacionado con su condición de fenotipo único (braquípteras o macróptero), estos habrían recolonizado de forma independiente las cuencas australes tras el último máximo glacial, donde las braquípteras derivan de refugios australes a diferencia de las macrópteras. Nuestros resultados muestran una compleja historia en *Limnoperla*, cuestionando su condición monoespecífica, además determinamos que la recolonización ocurrió a partir de múltiples refugios, pero que sin embargo esta habría ocurrido de forma independiente al fenotipo alar, encontrando ambos tipos de poblaciones en un mismo linaje, con lo que esta parte de la hipótesis no se confirma.

## SUMMARY

The insects of the Order Plecoptera have freshwater nymphs and flying terrestrial imagos (macroptera). Flightless (apterous or brachipterous) species are exceptions in this Order. Gripopterygidae has a number of flightless genera distributed in Australia, New Zealand and South America. In South America there are four monospecific apterous genera; other six macropteran genera which are widely distributed are superimposed distributions with of the apterous species.

This study proposed independent evolution for the wingless trait, and that the mechanism leading to the fixation of flightless character occurred in small refuges, isolated with limited gene flow, formed during the continuous glacial perturbations. Here unfavorable conditions for the winged allow the survival of those with suppressed flight, explaining the abundance of flightless species in austral latitudes.

The hypothesis was evaluated with a phylogenetic analysis and mapping of the traits associated with the development of the wings to Gripopterygidae. The results confirm that the wingless condition would have evolved independently. The mechanism was evaluated in a phylogeography of *Limnoperla jaffueli* (Navás), where the origin of the populations was related to their status as unique phenotype (brachypterous or macropterous). These would independently recolonized the austral basins after the last glacial maximum, where brachypterous derived from australs refuges unlike of macropterous. Our results reveal a complex history in *Limnoperla*, questioning its monospecific condition. Is determined that recolonization occurred from multiple refuges, but nevertheless this would have happened independently of the wing phenotype, found both types of population in the same lineage. With this part of the hypothesis is not confirmed.

## CAPITULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

### Marco teórico:

Una de las principales innovaciones de la Clase Insecta ha sido el desarrollo del vuelo, que le ha permitido colonizar casi todos los hábitats y les condujo a una diversificación que actualmente representa cerca de un tercio del total de la diversidad de especies del Reino Animal. De los 31 órdenes actuales sólo tres no presentan alas, el resto pertenece a taxa alados (Pterygota).

Sin embargo, en casi todos los Pterygota ocurren casos de reducción secundaria de alas (CSIRO & Naumann, 1991). El control genético de este polimorfismo, es muy variado (un simple locus, poligenes, plasticidad) (Bilton *et al* 2001, Zera & Denno, 1997), la reducción de alas esta relacionada con múltiples componentes fisiológicos, ecológicos y morfológicos todos de gran importancia evolutiva. Tres son las hipótesis más frecuentemente estudiadas para explicar la perdida del vuelo en Insecta: 1.- La existencia de un compromiso entre la oogénesis y las estructuras del vuelo (músculos y alas) (Jonson, 1969, Crnokrak & Roff. 2002). Otro tipo de compromiso aborda la función termorreguladora de las alas, donde existe un compromiso entre la pérdida de calor y la ausencia de alas (Douglas, 1981, Kingsolver & Koehl, 1994). 2.- La heterogeneidad de hábitat, donde sistemas estables favorecen la permanencia y con ello la incapacidad de volar, mientras que sistemas más dinámicos favorecen el escape (Southwood, 1962, Denno, 2001). 3.- El aislamiento podría generar condiciones que favorezcan la perdida de la capacidad de dispersión ya sea por

ausencia de depredadores o por la reducción de lugar de desarrollo (Darwin, 1872), estos escenarios han sido discutidos por Andersen (1997).

Plecoptera es un Orden de Insecta cuyo desarrollo juvenil ocurre en los cuerpos de agua mientras que los imagos son formas aladas muy breves en su ciclo de vida. Siendo el medio dulceacuícola un hábitat fragmentado incluido en una matriz terrestre, el vuelo es indispensable para establecer el flujo génico y la colonización entre sistemas o cuencas no relacionadas (Roderick, 1996, Bilton *et al*, 2001). Los miembros del orden Plecoptera han sido señalados como voladores poco eficientes, de modo que sus poblaciones tienden a estructurarse según la hidrografía (Schultheis *et al*, 2002). Es así como la variabilidad en la longitud de las alas en especies voladoras afecta la vagilidad y la recolonización de ambientes perturbados, mientras que factores abióticos como el viento pueden explicar procesos a no más de 10km (Malmqvist, 2000). Los casos de especies con pérdida del vuelo son considerados excepcionales y su distribución está frecuentemente restringida. El patrón de distribución de estas especies con escasa capacidad de dispersión puede explicarse a través de eventos históricos como son la captación fluvial, el cambio en el flujo de ríos, cambios en los niveles de cuerpos de agua, entre otros.

Gripopterygidae es una familia presente únicamente en el hemisferio sur, con miembros en Oceanía y América del Sur, su diversificación ha sido relacionada con la fragmentación del supercontinente Gondwana (Zwick, 1973, 2000). En ambos continentes existen casos de apterismo y braquiapterismo con una mayor concentración de casos en las Islas de Nueva Zelandia (McCulloch *et al*. 2009, 2010). La diversidad de Gripopterygidae de Sudamérica presenta cuatro particularidades:

1- Concentra 27 géneros de la familia, lo que corresponde al 52% del total de géneros actuales.

2- La distribución es fundamentalmente andino-patagónica (desde los 32°S). Sólo cuatro géneros están presentes en la región tropical y uno en el altiplano

3- Los géneros andino-patagónicos presentan poca diversidad de especies (sólo tres de los 23 géneros tienen más de dos especies).

4- Su distribución geográfica esta superpuesta en la mayoría de los géneros.

Estas características cuando se han presentando en la flora, han sido interpretadas como indicios de una historia sometida a perturbaciones y de restricciones a zonas de refugio (Villagrán, 1994, Villagrán & Hinojosa, 1997), lo que podría ser interpretado igualmente para estos insectos. Además sugieren buenas capacidades de recolonización y dispersión post-glacial. En este escenario, los taxa con vuelo suprimido corresponden a una excepción, donde cuatro de los cinco géneros monoespecíficos restringidos al extremo austral (48°-54°S, dos de ellos sólo en Islas Falkland) presentan apterismo monomórfico, lo que no es fácil de explicar conocidas las perturbaciones que han sufrido estas latitudes. Por otra parte, existe un único género monoespecífico con polimorfismo macróptero-braquíptero, para ambos sexos *Limnoperla jaffueli* (Navás), que a diferencia de las especies ápteras es de amplia distribución (32°-53°S). Lo más frecuente es que sus poblaciones se presenten con fenotipo 100% macrópteros y se encuentran en todo el rango de distribución latitudinal, sólo para algunas poblaciones de la costa de Chile central existe la condición mixta y en la región austral ocurren poblaciones 100% braquípteras.

La condición áptera de especies y géneros en conjunto con su distribución restringida a la región austral (al sur de Campos de hielo sur), sugiere la existencia de refugios australes

asociados a las continuas perturbaciones de la región, en estas condiciones de aislamiento pudo haber evolucionado el rasgo áptero. En cuanto a las relaciones sistemáticas de los taxa ápteros, el estudio morfológico basado en las genitalias masculinas indica que no estarían emparentados, y se les ha distribuido en dos subfamilias diferentes (Illies, 1963, 1964) por lo que la evolución del rasgo áptero debería interpretarse como un proceso de convergencia evolutiva. Si bien, no han sido resueltas las relaciones filogenéticas entre los géneros con claridad, algunos estudios señalan que las subfamilias no tendrían respaldo filogenético (Thomas *et al*, 2000, Terry & Whiting, 2005, tesis *b*). Un problema de estos análisis corresponde a la escasa cobertura taxonómica de la familia Gripterygidae, y a que éstos no incluyen especies con vuelo suprimido, de modo que las interrogantes planteadas persisten.

Para proponer los mecanismos que han operado en la fijación de los rasgos que suprimen el vuelo en las especies actuales es fundamental poder inferir la condición ancestral de estos rasgos en los linajes (Anderson, 1997). Para lograr inferir distintos escenarios evolutivos se requiere de filogenias robustas que resuelvan la monofilia de los taxa sudamericanos respecto de los de Oceanía, así como la relación que existe entre los linajes que presentan taxa con vuelo suprimido y de este modo responder cuantas veces pudo ocurrir la evolución de estos rasgos en Gripterygidae.

La mayor abundancia de especies con vuelo suprimido en la región austral sugiere una ventaja de esta condición en este escenario por sobre los alados. Sin embargo, en la actualidad muchos taxa voladores presentan la ampliación de sus rangos de distribución hasta el extremo austral de Sudamérica. Es razonable pensar que la sobrevivencia

diferencial a favor de especies con vuelo suprimido durante las perturbaciones glaciales en esta región, representaría una ventaja por sobre las especies voladoras.

Aún cuando el braquipterismo puede tener un origen génico diferente del apterismo, las consecuencias ecológicas de las capacidades de dispersión son las mismas, de modo que una especie polimórfica sería un buen modelo para evaluar el efecto de las perturbaciones glaciales en la supresión del vuelo.

McCulloch *et al.* (2009) enfrentan un problema similar con Gripterygidae de Nueva Zelanda, para lo cual construyen una filogeografía con varias especies de *Zelandoperla* Tillyard. Este género presenta especies con diferente longitud de alas, algunas de ellas han perdido la capacidad de volar. Los autores concluyen que si bien las especies braquípteras están más genéticamente estructuradas que las aladas, algunas especies aladas muestran una estructuración similar, sugiriendo que la pérdida del vuelo puede ocurrir antes que la pérdida de las alas. Sin embargo, los autores basan sus conclusiones en comparaciones interespecíficas y no trabajan con especies polimórficas.

El modelo ideal de especie para evaluar la mantención diferencial de fenotipos voladores y no voladores frente a perturbaciones que produzcan aislamientos debiera cumplir con tres requisitos: 1.- ocupar un amplio rango de distribución más allá del afectado por las perturbaciones glaciales, 2.- ser polimórfica en el desarrollo de las alas y 3.- presentar poblaciones con diferente frecuencia de fenotipos. Estos requisitos los presenta *Limnoperla jaffueli* (Navás), siendo una especie candidata para reconstruir en ella las secuencias de colonización postglacial y de esta forma identificar la existencia de eventuales refugios en zonas perturbadas por glaciaciones. Estas poblaciones australes relictuales, debieran presentar sólo fenotipos braquípteros, habiendo fijado este rasgo en condiciones de aislamiento, en contraste con otras poblaciones monomórficas macrópteras que se

encuentran a la misma latitud, estas no derivarían de refugios glaciales en la zona, sino que vendrían de lugares más al norte, donde no habría ocurrido fijación del rasgo, es así como poblaciones monomórficas braquípteras y macrópteras de latitudes australes próximas, no debieran de constituir un mismo linaje.

Finalmente existen escasos antecedentes que evalúen las capacidades de dispersión post-glacial en Plecoptera, siendo los recientes aportes de McCulloch *et al.* (2009, 2010) en taxa de Nueva Zelandia las referencias más próximas, así como los estudios de la recolonización post-glacial para Norteamérica de otra taxa dulceacuícola como es Megaloptera (Heilveil & Berlocher, 2006).

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS.

Esta tesis esta organizada en cinco capítulos, el primero ha sido una introducción del problema "pérdida del vuelo en Plecoptera Gripopterygidae". El segundo aborda aspectos macroevolutivos relacionados con la sistemática de la familia y el reconocimiento de grupos monofiléticos con fenotipos discretos en cuanto al desarrollo del vuelo. El tercero estudia la condición polimórfica en la morfología de *Limnoperla jaffueli* para relacionar estos estados con la distribución geográfica que presentan. El cuarto trabaja sobre la especie polimórfica *L. jaffueli*, para explorar aspectos microevolutivos mediante filogeografía para identificar la relación entre el polimorfismo alar, y la existencia de refugios australes en condiciones de aislamiento. El capítulo final aborda las repuestas y las limitaciones alcanzadas en el estudio de la reducción del vuelo en Gripopterygidae. A continuación se detallan las hipótesis, objetivos y predicciones que tratarán cada uno de los capítulos señalados anteriormente.

### Objetivo General:

Evaluar si para Gripopterygidae la mayor frecuencia de fenotipos con vuelo suprimido en el extremo austral de Sudamérica, se debe a la fijación de estos rasgos en condiciones de aislamiento geográfico y restricciones al flujo génico provocadas por las continuas perturbaciones glaciales en esta región.

**Hipótesis 1.- El rasgo áptero ha evolucionado independientemente en el extremo austral de Sudamérica.**

Predicción: Las especies ápteras de distribución austral no constituyen un grupo monofilético, presentando en un mismo clado tanto especies ápteras como macrópteras.

Objetivos específicos:

- 1.- Construir una hipótesis filogenética robusta para los géneros de Gripterygidae.
- 2.- Mapear los rasgos macróptero, áptero y polimórfico sobre la filogenia.

**Hipótesis 2.- Condiciones de aislamiento y restricciones al flujo génico conducen a la fijación de fenotipos con vuelo suprimido en Gripterygidae.**

Predicciones:

- a) Se espera que una especie polimórfica como *L. jaffueli* presente un filograma resuelto dadas las restricciones históricas al flujo génico, en localidades sometidas a perturbaciones.
- b) Se espera que la recolonización de una especie polimórfica como *L. jaffueli* sobre una región sometida a perturbaciones glaciales, ocurra a partir de varios refugios.
- c) Se espera que una especie polimórfica como *L. jaffueli* presente zonas de refugio sobre regiones afectadas por perturbaciones glaciales, estas poblaciones sólo presentaran fenotipos braquípteros.

Objetivos específicos:

- 1.- Describir y definir los estados macróptero y braquíptero para *L. jaffueli*.
- 2.- Construir una hipótesis filogeográfica para *L. jaffueli*.
- 3.- Construir una red de haplotipos y relacionarla con la distribución geográfica

Resultados alternativos a las hipótesis planteadas:

1.- Si las especies ápteras australes sudamericanas constituyen un grupo monofilético, la fijación del rasgo podría haber ocurrido muy ancestralmente. Si el clado incluyera especies ápteras de Oceanía el escenario de la fijación habría ocurrido antes de la actual configuración continental. En ambos casos la evolución del rasgo no habría ocurrido independientemente.

2.- Si en la filogeografía de *L. jaffueli*, las poblaciones de fenotipo único braquípteras de distribución austral, resultan ser derivadas desde poblaciones de norte a sur, entonces la fijación del rasgo braquíptero en poblaciones de *L. jaffueli* es un fenómeno reciente de adaptación a condiciones locales durante su recolonización austral, y la existencia de refugios australes no habría facilitado el establecimiento del polimorfismo alar.

**BIBLIOGRAFÍA**

- ANDERSON, N.M. 1997. Phylogenetic test of evolutionary scenarios: the evolution of flightlessness and polymorphism in insects. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*. 173. *The Origin of Biodiversity in Insects: Phylogenetic Tests of Evolutionary Scenarios* (ed. By P. Grandcolas), 91-108.
- BILTON, D.T., J.R. FREELAND & B. OKAMURA. 2001. Dispersal in Freshwater Invertebrates. *Annual Review of Ecology and Systematics*, November 2001, Vol. 32, Pages 159-181.
- CLEMENT, M., D. POSADA & K.A. CRANDALL. 2000. TCS version 1.6 a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* 9:1657-1659.
- CRNOKRAK, P. & D.A. ROFF. 2002. Trade-offs to flight capability in *Gryllus firmus*: the influence of whole-organism respiration rate on fitness. *J. Evol. Biology* 15:388-398.
- CSIRO & I.D. NAUMANN (eds). 1991. *The Insects of Australia*, 2<sup>nd</sup> edn. Carlton, Victoria, Melbourne University Press:1-1137.
- DARWIN, C. 1872. *The Origin of Species*, 6<sup>th</sup> edn. Reprinted By Cromwell-Collier Publ. Co. 1962. New York, The Macmillan Co.:1-512.
- DENNO, R.F. 2001. Reduced flight capability in British virgin Island populations of a wing-dimorphic insect: the role of habitat isolation, persistence, and structure. *Ecological Entomology* 26(1):25-36.
- DRUMMOND, A.J. & A. RAMBAUT 2003. BEAST v1.0, disponible en <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/beast/>
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limit on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- HEILVEIL, J.S. & S.H. BERLOCHER. 2006. Phylogeography of postglacial range expansion in *Nigronia serricornis* Say (Megaloptera: Corydalidae). *Molecular ecology* 15:1627-1641.
- ILLIES, J. 1963. Revision des südamerikanischen Gripopterygidae (Plecoptera). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 36 (3): 145-248.
- ILLIES, J. 1964. Die Plecopteren-Unterfamilie Andiperlinae (Auflösung einer unnatürlichen Negativgruppe nach Remane). *Zool. Anz.* 172(1):37-48.
- JOHNSON, C.G. 1969. *Migration and dispersal of insects by flight*. London, Methuen: 1-763.
- MCCULLOCH, G.A., G.P. WALLIS & J.M. WATERS. 2009. Do insects lose flight before they lose their wings? Population genetic structure in subalpine stoneflies. *Molecular ecology* 18:4073-4087.
- MCCULLOCH, G.A., G.P. WALLIS & J.M. WATERS. 2010. Onset of glaciation drove simultaneous vicariant isolation of alpine insects in New Zealand. *Evolution* 64 (7): 2033-2043.
- MADDISON, W.P. & D.R. MADDISON. 2006. MESQUITE versión 1.12 disponible en <http://mesquiteproject.org/mesquite/mesquite.html>.
- MERRITT, R.W., & K.W. CUMMINS. 1996. *An Introduction to the Aquatic Insects of North America*. pp. 754. Kendall/Hunt Publishing company. Dubuque, Iowa.
- POSADA, D., K.A. CRANDALL & A.R. TEMPLETON. 2000. GEODIS: a program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular ecology* 9:487-488.
- POSADA, D. & K.A. CRANDALL. 1998. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.

- RODERICK G.K. 1996. Geographic Structure of Insect Population: Gene Flow, Phylogeography, and their Uses. *Annu. Rev. Entomol* 41:325-352.
- SIMON, CH., F. FRANCESCO, A. BECKENBACH, B. CRESPI, H. LIU & P. FLOOK. 1994. Evolution, Weighting and Phylogenetic Utility of Mitochondrial Gene Sequences and a Compilation of Conserved Polymerase Chain Reaction Primers. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 87(6):651-701.
- SOUTHWOOD, T.R.E. 1962. Migration of terrestrial arthropods in relation to habitat. *Biological Reviews* 37:171-214.
- SCHULTHEIS, A.S., L.A. WEIGT & A.C. HENDRICKS. 2002. Gene flow, dispersal and nested clade analysis among populations of the stonefly *Peltoperla tarteri* in the southern Appalachians. *Molecular Ecology* 11:317-327.
- SWOFFORD, D.L. 2002. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods), version 4.0b10 Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- TEMPLETON, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology* 7:381-397.
- TEMPLETON, A.R., E. BOERWINKLE, C.F. SING. 1987. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. I. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, 177:343-351.
- THOMPSON, J.D., T.J. GIBSON, F. PLEWNIAK, F. JEANMOUGIN, & D.G. HIGGINS. 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 24:4876-4882.
- TERRY, M. D. & M. F. WHITING. 2005. Mantophasmatodea and phylogeny of the lower neopterous insects. *Cladistics* 21:240-257.

- TERRY, M. D. & M. F. WHITING. Tesis *a*. Phylogeny of the genus *Isogenoides* (Plecoptera: Perlodidae) and the evolution of drumming behavior. *Evolution* (no publicado).
- TERRY, M. D. & M. F. WHITING. Tesis *b*. Phylogenetic systematics of Plecoptera: evidence from morphology and six genes. *Systematic Entomology* (no publicado).
- THOMAS, M.A., K.A. WALSH, M.R. WOLF, B.A. MCPHERON & J.H. MARDEN. 2000. Molecular phylogenetic analysis of evolutionary trends in stonefly wing structure and locomotor behavior. *PNAS* 97(24):13178-13182.
- VILLAGRÁN, C.M. 1994. Quaternary History of the Mediterranean vegetation of Chile. En: *Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile* (MT Kalin, P. Zedler & M. Fox, eds.) Springer, Verlong. Nueva York. Pp:3-20.
- VILLAGRÁN, C.M. & L.F. HINOJOSA. 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica II: análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural* 70:241-267.
- ZERA, A.J. & R.F. DENNO. 1997. Physiology and Ecology of Dispersal Polymorphism in Insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42:207-230.
- ZWICK, P. 1973. *Insecta: Plecoptera Phylogenetisches. System und Katalog Das Tierreich* 94:XXXII + 465.
- ZWICK, P. 2000. Phylogenetic system and Zoogeography of the Plecoptera. *Annual Review of Entomology* 45:709-746.



CAPITULO II:  
SISTEMÁTICA MOLECULAR DE LA FAMILIA GRIPOPTERYGIDAE (INSECTA:  
PLECOPTERA) Y LA EVOLUCIÓN DEL POLIMORFISMO ALAR.

**RESUMEN:**

La familia Gripterygidae se compone aproximadamente de 300 especies y 52 géneros, distribuidos en tres masas continentales: América del Sur, Australia y Nueva Zelandia. Los estudios filogenéticos realizados en Plecoptera, con datos morfológicos y moleculares, cuestionan la monofilia de la familia y sus subfamilias. En concordancia, las recientes síntesis taxonómicas de los Gripterygidae para Sudamérica, consideran insatisfactoria la vigente clasificación, demandando estudios comparativos con un mayor número de taxa. En este estudio realizamos un análisis filogenético para 44 especies y 32 géneros, representando las cinco subfamilias y la mayor parte de los géneros de América del Sur. Nuestra aproximación fue realizada con el marcador nuclear H3 y los marcadores mitocondriales 16S y COI. Los análisis fueron realizados con los métodos de Inferencia Bayesiana, Máxima Parsimonia y Máximo Likelihood. Nuestros resultados nos permiten respaldar la monofilia de Gripterygidae, Dinotoperlinae *sensu lato*, Leptoperlinae *sensu stricto* y Gripteryginae *sensu stricto*, así como discutir las relaciones entre otros linajes. Los fenotipos que han suprimido el vuelo como el ápterismo y el braquípterismo, se presentan con poca frecuencia en el Orden, pero en Gripterygidae se presenta con mayor recurrencia en taxa de distribución austral. La evolución de estos rasgos resulta ser independiente en las taxa aquí estudiadas.

## INTRODUCCIÓN:

La familia Gripopterygidae fue establecida por Enderlein en 1909 conjuntamente con las subfamilias Gripopteryginae y Antarctoperlinae. La clasificación en subfamilias más recientes fue propuesta por McLellan (1977) quien reconoce cinco: Dinotoperlinae (Australia), Zelandoperlinae (Australia, Nueva Zelandia y América del Sur), Leptoperlinae (Australia y América del Sur), Antarctoperlinae (Nueva Zelandia y América del Sur) y Gripopteryginae (América del Sur). La familia actualmente se compone de 278 especies (Tabla 2.1). La distribución de estas taxa presentes únicamente en el hemisferio sur, sugiere que su diversificación ha ocurrido asociada con la fragmentación del supercontinente Gondwana (Zwick 1973, 2000). Especies actuales o fósiles de Gripopterygidae no están presentes en África e India, quienes se separan hace 165–150 MYA del Gondwana. La familia habría evolucionado en América del Sur, Nueva Zelandia, Australia y Antártica quienes permanecen unidas por gran parte del Cretácico tardío, hace 80 MYA inician su fragmentación hasta lograr su actual configuración (Amorim *et al.* 2009). Esta distribución es congruente con las otras tres familias del Suborden Antarctoperlaria (Eusteniidae, Diamphipnoidae y Austroperlidae), quienes se presentan únicamente en América del Sur y/o Oceanía. De estas cuatro familias, Gripopterygidae es la de mayor diversidad con un número creciente de especies que en el censo más reciente se propone en alrededor de 300 especies distribuidas en 55 géneros (Lecci & Froehlich 2011).

La monofilia de Gripopterygidae se soporta en rasgos de su morfología ninfal, las que presentan un ramillete de branquias retráctiles, ubicadas en la membrana supra anal (Zwick 1973, 2000). Esta estructura es posiblemente homóloga al *filum terminale* de otros órdenes de insectos primitivos, pero su modificación con función respiratoria constituye una

apomorfía para la familia (Zwick 2000). Posteriormente Terry & Whiting (en preparación) realizan un análisis que combina los datos morfológicos y los moleculares derivados de seis marcadores (12S, 16S, 18S, 28S, COII y H3). Sus resultados han puesto en duda la monofilia de Gripopterygidae, cuyo clado subordina a las otras tres familias de Antarctoperlaria. Sin embargo, estos resultados son aún cuestionados dado que este estudio tuvo como objetivo resolver las agrupaciones de familias a nivel de todo el orden Plecoptera, incluye a todas las familias y las representa solo con una pequeña muestra, en el caso de Gripopterygidae, esta fue representada sólo por 19 taxa, por otra parte el análisis fue inferido únicamente con el método de Máxima Parsimonia.

Siguiendo a Zwick (2003), Gripopterygidae tiene como grupo hermano a Austroperlidae quienes constituirían la Superfamilia Gripopterygoidea, la que a su vez es grupo hermano de Eusthenioidea quien reúne a Diamphipnoidae + Eustheniidae. Estas cuatro familias representan el Suborden Antarctoperlaria, el que se encuentra bien soportado en todos los estudios filogenéticos realizados (Fochetti & Tierno de Figueroa, 2008).

Dentro de Gripopterygidae se han propuesto varios agrupamientos en subfamilias, los que han sido planteados inicialmente sobre la base de su morfología alar y posteriormente sobre inusuales rasgos como la pérdida de branquias y la reducción del vuelo. Sin embargo los argumentos más robustos se han encontrado en el estudio de la morfología genital, lo que ha llevado a modificar los antiguos agrupamientos.

Illies (1963) publica su revisión de los Gripopterygidae de América del Sur. Este trabajo es considerado fundador y como punto de partida para los estudios de biodiversidad del grupo (Vera & Camousseigh, 2006). En este trabajo se describen la mayor parte de los géneros y especies que conocemos actualmente, y además se establece un sistema de agrupamientos a nivel de cinco subfamilias. En un trabajo anterior, Illies (1958) propone la familia

Abranchioperlidae sobre la base de una ninfa próxima a Gripterygidae pero desprovista de branquias, posteriormente esta es integrada a Gripterygidae como un sinónimo de *Notoperla* en la subfamilia Leptoperlinae, y la pérdida de las branquias se considera como una apomorfía del género. McLellan (1977) redefine la diagnosis de Leptoperlinae al estudiar los géneros presentes en Oceanía, al tiempo que propone la subfamilia Dinotoperlinae para reunir un conjunto de especies Australianas que habían sido ubicadas previamente en Gripteryginae y Paragripteryginae (McLellan 1971). De este modo, ambas subfamilias desaparecen de Australia, resultando Dinotoperlinae y Gripteryginae exclusivas de Australia y América del Sur respectivamente. En esta misma oportunidad, McLellan (1977) propone la subfamilia Zelandoperlinae para un conjunto de especies exclusivas de Nueva Zelandia y para *Notoperlopsis* de América del Sur. Además establece la sinonimia de Paragripteryginae en Gripteryginae. Estos cambios los realiza fundamentalmente sobre el estudio de la morfología genital y del sistema nervioso. El análisis de estos rasgos es impulsado por la reducción de las alas en la mayor parte de las especies Neozelandesas, lo que impide estudiar los tradicionales rasgos de la venación alar. Este problema fue enfrentado en el caso de especies ápteras presentes en el extremo austral de América del Sur donde Aubert (1956) describe *Andiperla willinki* como una especie áptera cuyas ninfas han perdido los ocelos y habitan sobre glaciares. Su inusual conformación de caracteres motiva la proposición de una nueva subfamilia llamada Andiperlinae. En ella se ubica también al género áptero *Apteryoperla* de Nueva Zelandia que habita en altas montañas australes en ambientes empapados de deshielo glaciar. Posteriormente son incluidas en esta subfamilia las especies *Megandiperla kuscheli* Illies 1960 y *Andiperlodes holdgatei* Illies, 1963 ambas del extremo austral de América del Sur. Illies (1964) reexamina los cuatro géneros de Andiperlinae y propone que los rasgos de

diagnosis han covariado, como una respuesta ecológica a las extremas condiciones de viento y lluvia donde se desarrollan, y de esta forma serían resultado de convergencia evolutiva. Andiperlinae es disuelta y los cuatro géneros son reubicados en tres subfamilias preexistentes sobre la base de su morfología genital y ninfal.

La configuración actual de cinco subfamilias sigue vigente, pero ha sido considerada aún insatisfactoria (McLellan & Zwick 2007 y Stark *et al.* 2009). Además se requiere de una revisión de las categorías genéricas dadas para América del Sur, donde existen escasas apomorfias morfológicas y en algunos casos están definidos por una combinación particular de rasgos. Esta postura es parcialmente respaldada por el estudio de Terry & Whiting (en preparación) quienes solo encuentran sustento en una de las cinco subfamilias de Gripopterygidae.

A continuación se indica para la Familia Gripopterygidae la configuración de subfamilias, géneros y número de especies actuales, según su distribución continental (modificada de Stark *et al.* 2009):

**AUSTRALIA: Dinotoperlinae:** *Dinotoperla* Tillyard (35), *Eunotoperla* Tillyard (1), *Illiesoperla* McLellan (12), *Nebiossoperla* McLellan (3), *Trinotoperla* Tillyard (16), *Nescicoperla* Theischinger (1), *Dundundra* Theischinger (1) y *Kirrama* Theischinger (2).

**Leptoperlinae:** *Leptoperla* Newman (28), *Newmanoperla* McLellan (4), *Cardioperla* McLellan (10) y *Riekoperla* McLellan (23).

**NUEVA ZELANDIA: Zelandoperlinae:** *Acroperla* McLellan (5), *Apteryoperla* Wisely (6), *Auklandobius* Enderlein (4), *Holcoperla* McLellan (3), *Megaleptoperla* Tillyard (2), *Nesoperla* Tillyard (3), *Rakiuraperla* McLellan (1), *Rungaperla* McLellan (2), *Taraperla*

McLellan (4) y *Zelandoperla* Tillyard (6). **Antarctoperlinae:** *Vesicaperla* McLellan (7) y *Zelandobius* Tillyard (29).

AMÉRICA DEL SUR: **Zelandoperlinae:** *Notoperlopsis* Illies (1). **Leptoperlinae:** *Notoperla* Enderlein (7) y *Senzilloides* Illies (1). **Antarctoperlinae:** *Antarctoperla* Enderlein (2), *Araucanioperla* Illies (2), *Ceratoperla* Illies (2), *Chilenoperla* Illies (6), *Megandiperla* Illies (1), *Pelurgoperla* Illies (1) y *Plegoperla* Illies (2). **Gripopteryginae:** *Andiperla* Aubert (1), *Andiperlodes* Illies (2), *Aubertoperla* Illies (2), *Claudioperla* Illies (1), *Falklandoperla* McLellan (1), *Gripopteryx* Pictet (17), *Guaranyperla* Froehlich (3), *Limnoperla* Illies (1), *Neopentura* Illies (1), *Paragrypopteryx* Enderlein (11), *Pehuenioperla* Vera (1), *Potamoperla* Illies (1), *Rhithroperla* Illies (2), *Teutoperla* Illies (4), *Tupiperla* Froehlich (14) y *Uncicauda* McLellan & Zwick (2). **Dinotoperlinae:** *Alfonsoperla* McLellan & Zwick (1), recientemente asignada a la subfamilia por (Froehlich 2010).

### **Reducción del vuelo en Gripopterygidae:**

Como ya ha sido señalado, la reducción del vuelo ocurre en gran parte de los taxa de Nueva Zelanda (McLellan, 2006). Los géneros de Zelandoperlinae *Rungaperla*, *Apteryoperla*, *Holcoperla* y *Rakiuraperla* son ápteros. Además en el género *Aucklandobius* sólo *A. complementarius* Enderlein es alada. En los géneros *Zelandoperla* y *Taraperla* sólo *Z. pennulata* McLellan y *T. johnsi* McLellan son micróptera y áptera respectivamente, y en el género *Nesoperla* todas las especies presentan reducción del vuelo y sólo *N. fulvenscens* Tillyard presenta polimorfismo con fenotipos voladores y no voladores. Por otra parte en Antarctoperlinae las especies de *Vesicaperla* son ápteras a excepción de *V. townsendi*

McLellan, que presenta alas vestigiales, y el único *Zelandobius* áptero es *Z. brevicauda* McLellan.

En Sudamérica la reducción del vuelo se da únicamente en algunas taxa, los géneros de Antarctoperlinae: *Megandiperla* y de Griptopteryginae: *Andiperlodes*, *Andiperla* y *Falklandoperla* son ápteros, mientras que la única especie de *Limnoperla*, *L. jaffueli* Navás es polimórfica presentando fenotipos voladores y no voladores. En Zelandoperlinae el macho de *Notoperlopsis femina* Illies es braquíptero y la hembra macróptera (McLellan *et al* 2006). En Leptoperlinae el género *Notoperla* presenta especies con toda las combinaciones de fenotipos alares (Vera, 2011), siendo las hembras macrópteras y los machos micrópteros en *N. fuegiana* (Enderlein), *N. fasciata* McLellan y *N. magnaspina* McLellan. En esta última los machos pueden llegar a ser braquípteros; *N. macdowalli* McLellan & Mercado es áptera, mientras que en *N. archiplatae* (Illies) los machos varían desde ápteros hasta macrópteros, finalmente en *N. tunelina* (Navás) las hembras son braquípteras o macrópteras y los machos son macrópteros.

En Australia al igual que en América del Sur la mayor parte de las especies son macrópteras y unas pocas han reducido el vuelo. Solo dos especies son ápteras *Leptoperla cacuminis* Hynes y *Riekoperla darlingtoni* (Illies), otras ocho son braquípteras: *Leptoperla kallistae* Hynes, *L. varia* Kimmins, *Riekoperla isosceles* Theischinger, *R. cornuta* Theischinger, *R. intermedia* Theischinger, *Dinotoperla hirsuta* McLellan, *D. walkeri* Dean & Clair y *Eunotoperla kershawi* Tillyard (Dean & Clair 2006).

#### Distribución de los taxa.

Cuando se compara la diversidad de especies de Griptopterygidae entre las tres masas continentales donde se presentan, ocurre que en América del Sur la mayor parte de los

géneros son monotípicos o están constituidos únicamente por dos especies, a diferencia de lo que ocurre en Australia y Nueva Zelandia. Este patrón fue descubierto y discutido tempranamente por Illies (1969) y aún cuando se han realizado numerosos aportes taxonómicos desde entonces, la situación no ha cambiado. En general se acepta que las regiones afectadas por las glaciaciones pleistocénicas han perdido gran parte de su biodiversidad, y son los sobrevivientes en refugios los que deben recolonizar las regiones antes cubiertas por el hielo. Sin embargo al observar regiones que sufrieron estos procesos en Europa y Nueva Zelandia, estas se presentan con numerosas especies para cada género a diferencia de América del Sur, desconociéndose los factores pueden haber operado para explicar tal discrepancia (Illies 1969).

En cuanto a la distribución de los taxa en América del Sur, se observan dos conjuntos separados por la diagonal árida sudamericana, en la Región Neotropical principalmente al sur de Brasil se distribuyen *Gripopteryx*, *Paragripopteryx*, *Tupiperla* y *Guaranyperla*. Las restantes especies se ubican en la región biogeográfica Andina (Morrone 1999). En la región Andina únicamente el género *Claudioperla* se distribuye en el altiplano del extremo norte de Chile, en Bolivia, Perú, Ecuador y Colombia. Están ausentes en el norte grande y parte del norte chico, logrando su mayor abundancia y diversidad de especies en Chile Central y Sur entre los 33° y 46° de latitud Sur, un segundo pico de diversidad se encuentra en el extremo austral entre los 48° y 54° de latitud Sur, ocurriendo un reemplazo de las especies presentes en el tramo anterior. Es en este tramo donde se presentan los tres géneros ápteros *Andiperla*, *Andiperlodes* y *Megandiperla*. De este modo resulta una distribución bimodal de la diversidad de Plecoptera en Chile (Camousseigh 2005 y Palma & Figueroa 2009).

En Chile la mayor parte de los géneros superponen total o parcialmente su distribución, pudiendo coexistir en el mismo hábitat, a diferencia de muchas de las taxa de Nueva Zelanda, donde las especies se presentan localmente distribuidas, en particular aquellas que han perdido la capacidad de volar, como las del género *Vesicaperla* (McLellan 1993). Esta situación contrasta con la distribución de los taxa ápteros de Chile, los que presentan amplias distribuciones tal es el caso de *Megandiperla* que se ha encontrado en dos lugares distantes en los archipiélagos al sur de península de Taitao (Lanfranco 1982). Más documentado es el caso de *Andiperla*, cuya distribución ocupa glaciales al norte de Campos de hielo norte (Kohshima 1959), al sur de campos de hielo Sur (Lanfranco 1982) y en la cordillera de Darwin al sur de Tierra del Fuego (Vera *et al.* 2012) ocupando un espacio entre los 47° a 55° de Latitud Sur; recientemente se ha descrito una segunda especie de *Andiperlodes* para la Argentina (Pessaq 2009), con lo que el género presentaría una especie continental en Los Andes Orientales y otra en los archipiélagos del Pacífico. Dada la escasa capacidad de dispersión de los Plecoptera ápteros y las perturbaciones glaciales ocurridas sobre su hábitat, estas distribuciones sólo pueden explicarse tras la sobrevivencia en refugios pleistocénicos, salvo para el caso de *Andiperla*, donde la continuidad glacial pudo ser su medio de dispersión y la actual fragmentación del hielo su aislamiento.

Diversos procesos ocurridos en Gripopterygidae como: la divergencia en el desarrollo de hábitos ninfales terrestres y la reducción del vuelo han sido relacionados con eventos pleistocénicos en varias oportunidades, donde se ha propuesto que el hielo produce relictos aislados que pueden conducir a especiación (Illies 1964, 1968), este escenario favorece rasgos que reducen el vuelo, evitando la fuga desde los escasos lugares aptos para el desarrollo (Lencioni 2004), también se favorecen rasgos que aprovechan la abundancia de

oxígeno disuelto en el agua (pérdida de branquias) y facilitan la búsqueda de alimento en la vegetación circundante (ninfas terrestres) (McLellan 1979). Estos procesos podrían haber hecho converger algunos rasgos en taxa no emparentadas filogenéticamente, o bien haber dado origen a taxa de exclusiva morfología que habrían dispersado y especiado junto a los sucesivos avances y retrocesos glaciales del Pleistoceno. La morfología genital parece apoyar la hipótesis de convergencia, pero no se cuenta con estudios filogenéticos que permitan evaluar estas hipótesis.

Los antecedentes sistemáticos señalados no dan respaldo a los agrupamientos al interior de Gripopterygidae, con lo que un análisis filogenético se hace necesario a fin de entender como se relacionan los taxa que portan fenotipos con reducción del vuelo, si estos constituyen o no grupos monofiléticos y si los grupos han evolucionado independientemente en los continentes que se presentan. En esta oportunidad nuestro objetivo es realizar un análisis filogenético amplio, que incluya la mayor parte de los géneros de Gripopterygidae posibles mediante una aproximación molecular y así explorar las relaciones sistemáticas con los fenotipos que han perdido la capacidad de volar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Muestreo taxonómico (Tabla 2.II y 2.III)

Se estudiaron 37 especies de Gripopterygidae, 2 Austroperlidae, 1 Diamphipnoidae, 1 Eusteniidae y 2 Perlidae, estos últimos fueron utilizados como grupo externo (Tabla 2.II). La muestra de Gripopterygidae incluye a miembros de las cinco subfamilias y representan la mayor parte de los géneros de América del Sur. Para incorporar un mayor número de

Dinotoperlinae de Australia y Zelandoperlinae de Nueva Zelanda, se utilizaron secuencias adicionales descargadas desde Genbank para los marcadores Histona 3 (H3) y la subunidad menor del ribosoma (16S) (Tabla 2.III), el análisis final se realizó con dos taxa como grupo externo y 47 en el grupo interno. De ellas 43 fueron Gripterygidae y cuatro representaron otras familias de Antarctoperlaria, las que se han incluido para verificar la monofilia de Gripterygidae.

### **Extracción de DNA, amplificación y secuenciación**

La extracción de DNA total fue realizada a partir de tejidos del meso y metatórax a los que se les retiraron las alas, patas y tubo digestivo. Se utilizó un método de extracción salina (modificado de Jowett, 1986),

Especímenes museológicos fueron sometidos a pruebas de extracción sin buenos resultados. Por ello la mayor parte de los especímenes estudiados debieron ser colectados durante la ejecución de este estudio y fueron conservados en etanol absoluto. En la tabla 2.II se indican las especies y localidades de los especímenes utilizados para la extracción de DNA y posterior amplificación. Para evitar dificultades en la identificación específica, la totalidad de los especímenes utilizados fueron imagos, de preferencia machos. Los individuos fueron recolectados mediante sacudida del follaje circundante al cuerpo de agua, volteando objetos ribereños o mediante técnicas de crianza de ninfas de último estadio (Vera, 2008). Otros especímenes fijados en etanol fueron conseguidos desde colecciones de especialistas en Nueva Zelanda y Brasil.

Secuencias parciales de dos genes mitocondriales y un gen nuclear fueron amplificadas por medio de PCR. Para los genes mitocondriales rDNA 16S y COI se utilizaron los primers 5'-CGCCTGTTTATCAAAAACAT-3' y 5'-CTCCGGTTTGAAGCTCAGATC-3' (Palumbi

*et al.*,1991), 5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3' y 5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3' (Folmer *et al.*, 1994), respectivamente. Para el gen nuclear H3 los primers utilizados fueron H3-AF 5'-ATGGCTCGTACCAAGCAGACVGC-3' and H3-AR 5'-ATATCCTTRGGCATRATRGTGAC-3' (Colgan *et al.*, 1998).

Las concentraciones finales para la PCR fueron: 1X amplificación buffer, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15mM para cada dNTP, 0.2μM, de cada primer para 16S (0.15μM de cada primer para COI) 1U de *Taq* polymerase y 0.1 μg de DNA templado. La amplificación de 16S se realizó con el siguiente ciclo de temperaturas: 3 min de desnaturalización inicial a 94° C, seguidos por 38 ciclos de 30 sec de desnaturalización a 94° C, 1 min de alineamiento a 50° C y 1 min de extensión a 72° C, finaliza con 10 min a 72° C. La amplificación de COI utilizó 40 ciclos de 30 sec de desnaturalización a 94° C, 1 min de alineamiento a 48° C y 1 min de extensión a 72° C, finaliza con 10 min a 72° C. La amplificación de H3 utilizó 35 ciclos de 30 sec de desnaturalización a 94° C, 30 sec de alineamiento a 47° C y 30 sec de extensión a 72° C, finaliza con 10 min a 72° C. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa 1% (p/v) y enviados a secuenciar a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea).

### **Alineamiento y análisis filogenético**

Los alineamientos fueron realizados con CLUSTAL W (Thompson *et al.* 1994) en BIOEDIT v7.0.5.2 (Hall, 1999). Para 16S rDNA utilizamos el *Multiple Alignment Mode* seguido por edición manual. Para COI y H3 tanto el alineamiento como la edición fueron realizados manualmente.

El análisis filogenético fue realizado utilizando las siguientes particiones: cada gen por separado, la combinación de H3 con 16S, de COI con 16S y los tres genes combinados (evidencia total). Las taxa con secuencias compatibles disponibles en GenBank, únicamente aportan con los genes 16S y H3 y fueron incorporados en cuatro de las seis particiones, de modo que en el análisis de evidencia total las taxa complementarias fueron codificadas con el signo “?” y consideradas como missing para COI. Cada partición fue analizada con los siguientes métodos de inferencia filogenética: 1) Máxima Parsimonia (MP) utilizando el programa PAUP\* v4.0b10 (Swofford, 2002), se realizó búsqueda heurística con adición aleatoria de secuencias y el algoritmo TBR (tree bisection and reconnection). Todos los caracteres fueron tratados con igual peso y los indels tratados como missing. 2) Maximum Likelihood (ML) fue realizado utilizando el programa PAUP\* v4.0b10. El modelo de sustitución nucleotídica más apropiado fue estimado con el programa JMODELTEST 0.1.1 (Posada & Crandall, 2008). El modelo seleccionado para todos los análisis fue el modelo general de tiempo reversible con sitios invariables y distribución gamma (GTR+I+G). El soporte estadístico para los nodos en MP y ML fue evaluado con el método de bootstrap (Felsenstein, 1985), usando 1000 pseudoréplicas. 3) para Inferencia Bayesiana (IB) las relaciones filogenéticas fueron inferidas utilizando el programa Mr.Bayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Probabilidades *a posteriori* fueron estimadas desde una muestra de árboles construidos con simulaciones de Monte Carlo con cadenas de Markov. Cuatro cadenas fueron corridas al menos 10 millones de generaciones cada una, muestreando cada 1000 generaciones y eliminando el 10% de las muestras como Burn-in.

La evolución de la reducción del vuelo fue estimada por el método de mapeo filogenético usando ML y el modelo de evolución MKI reconstruidos en el programa Mesquite (Maddison & Maddison, 2003). Los estados ancestrales de los caracteres fueron

optimizados sobre la filogenia obtenida para la partición 16S+H3 utilizando el método de ML. La codificación del carácter fue macróptera = 0, áptera = 1 y braquíptera = 2.

## RESULTADOS

### Secuencias

Los alineamientos de secuencias utilizados para los genes H3, 16S y COI resultaron en 241pb, 538pb y 613pb respectivamente. Las secuencias de H3 y 16S disponibles en Gen Bank proceden del estudio de Terry & Whiting (en preparación) y no se encuentran para todas las taxa que estudiaron. Por ello se incluyó sólo a las que presentan ambas secuencias. Además en su estudio no se indica el origen del material, lo que puede llevar a identificaciones erradas cuando se trata de ninfas. Es así como muchas de las especies sólo están identificadas a nivel de género, aún cuando varios de ellos son monoespecíficos. Un ejemplo de ello es que para H3 la secuencia de *Pelurgoperla* es idéntica a la de *Antarctoperla*, en circunstancias que nuestras amplificaciones muestran que ambos difieren. Por este motivo cuando nos fue posible evitamos utilizar otras secuencias desde la base de datos.

### Análisis filogenético

En cuanto a la monofilia de Gripopterygidae, los análisis de MP para todas las particiones, no recuperan a Gripopterygidae como un grupo monofilético, resultando en una topología que subordina los integrantes de las otras familias de Antarctoperlinae (Fig. 2.1a). Sin embargo estos nodos no presentan respaldo estadístico. Un resultado similar se observa en

el análisis de IB para los genes COI e H3 cuando se toman individualmente. Por otra parte los análisis de ML e IB para todas las restantes particiones si recuperan la familia Gripterygidae como un linaje y presentan respaldo estadístico (Tabla 2.IV, clado G). Además ubican a Austroperlidae como su grupo hermano. Posteriormente se implementó una búsqueda heurística con MP que forzó la monofilia de Gripterygidae, resultando topologías similares a las obtenidas con los otros análisis (Fig. 1b).

Dentro de Gripterygidae, cuando se analizan los genes de forma independiente el gen 16S es el que mejor resuelve con todos los métodos de inferencia, mientras que los marcadores COI e H3 recuperan árboles con politomías en los nodos basales. Los análisis de MP no resultaron en hipótesis únicas, y el menor número de árboles se obtuvo con COI, sólo dos árboles igualmente parsimoniosos con 2646 pasos (CI= 0.1878, IR=0.3227) para 243 caracteres igualmente parsimoniosos. Estos árboles con escasa resolución se asemejan a los resultados de H3. Sin embargo el gen 16S aplicado *constraints*, resulto en 14 árboles igualmente parsimoniosos con 944 pasos (CI=0.3729, RI=0.5294) y 149 caracteres informativos para parsimonia. En este caso la topología se resuelve mejor y todos los cambios topológicos que distinguen estos 14 árboles ocurren dentro del clado E (se define más adelante). Los análisis de ML e IB resuelven árboles únicos, pero con abundantes politomías para cada gen.

Los análisis de particiones combinadas mejoran los resultados, tanto en la topología como en los respaldos estadísticos. La combinación de 16S+H3 (Fig. 2) así como la de los tres genes (Fig. 3) resultan en topologías similares, las que difieren en las relaciones al interior del clado E y en la resolución de los nodos basales al interior de Gripterygidae. Los análisis de IB muestran una politomía en los nodos basales, la que varía en el número de

linajes involucrados en ella, según sea la combinación de genes utilizados. Los resultados de ML son los de mayor resolución.

En cuanto a los géneros que fueron representados con más de una especie, los resultados son similares en todos los análisis que tuvieron resolución, y muestran que cada uno de los siete géneros *Araucanioperla*, *Aubertoperla*, *Dinotoperla*, *Teutoperla*, *Zelandobius*, *Vesicaperla* y *Notoperla* se presenta como un único linaje con respaldo estadístico, mientras que los géneros *Chilenoperla* y *Pelurgoperla* no presentan este respaldo y muestran una única configuración topológica, en donde *Pelurgoperla personata* se incluye en *Chilenoperla* como grupo hermano de *Chilenoperla elongata*, mientras que *Chilenoperla puerilis* se distancia del género *Chilenoperla* y se ubica como grupo hermano de *Pehuenioperla llaima*, recuperándose el clado (*Antarctoperla michaelsoni* (*Ch. puerilis* + *P. llaima*)) de forma independiente del clado (*Ch. puelche* (*P. personata* + *Ch. elongata*)).

La descripción topológica de las relaciones entre géneros se realiza sobre la hipótesis de ML obtenida con la partición de evidencia total, ya que fue la que obtuvo una mayor resolución y respaldos (Fig. 2.3). Se reconocen los clados A: (*Ch. puelche* + (*Pelurgoperla* + *Ch. elongata*)), B: (*Antarctoperla* + (*Ch. puerilis* + *Pehuenioperla*)), C: (*Ceratoperla* + *Araucanioperla*), D: (*Alfonsoperla* + *Aubertoperla* + (*Illiesoperla* + *Dinotoperla*)), a este clado se le ha llamado Dinotoperlinae *sensu lato*, E: incluye 11 géneros de Gripteryginae exceptuando *Aubertoperla* y *Neopentura*, a este clado se le ha llamado Gripteryginae *sensu stricto*, F: (*Riekoperla* + (*Senzilloides* + *Notoperla*)), a este grupo se le ha llamado Leptoperlinae *sensu strictus*. Los valores de soporte estadístico para los clados señalados en cada análisis y partición se muestran en la tabla 2.IV. Las restantes

relaciones genéricas así como las relaciones entre los clados ya señalados no muestran una topología estable en los diversos análisis así como escasos soportes estadísticos. Los análisis de IB para cada partición, reflejan esta falta de resolución colapsando los nodos a ese nivel y generando politomías entre los clados A-F y los restantes géneros.

Las subfamilias como están actualmente configuradas no encuentran respaldo en ninguno de los análisis, sin embargo existen clados que se aproximan a ellas, en las figuras 2.1, 2.2 y 2.3 se han coloreado las ramas de acuerdo a la subfamilia asignada a cada especie. El clado F reúne a los Leptoperlinae salvo por *Newmanoperla*, la que en ningún análisis se incluyó en este clado. El clado D reúne a los Dinotoperlinae y a *Aubertoperla*, esta última en muchos análisis resulta grupo hermano de *Alfonsoperla*. El clado E como ya fue indicado reúne a casi todos los Gripopteryginae. Sin embargo las relaciones en su interior varían en los diversos análisis. Las relaciones más estables son la ubicación de *Andiperla* como grupo hermano de los restantes géneros y a la asociación de los cuatro géneros neotropicales *Paragripopteryx*, *Gripopteryx*, *Guaranyperla* y *Tupiperla*. Zelandoperlinae se encuentra disperso en todos los árboles. Antarctoperlinae se organiza en grupos definidos (clados A, B y C), o en géneros individuales, pero no se combinan para formar un linaje. Los únicos Antarctoperlinae de Nueva Zelandia *Vesicaperla* y *Zelandobius* no constituyen un grupo monofilético.

#### **Evolución de los fenotipos con reducción del vuelo.**

Los resultados del Mapeo filogenético de la reducción del vuelo (Fig. 4) muestran evolución independiente de los rasgo áptero y braquíptero. No se observan relaciones supragenéricas de los rasgos.

## DISCUSIÓN

La familia Gripopterygidae se comporta como un linaje en todos nuestros análisis, a excepción de la estimación de MP e IB para los genes COI e H3 que no muestran resolución a ese nivel. En los restantes análisis de ML e IB el grupo hermano de Gripopterygidae es Austroperlidae como habría sido sugerido de forma independiente en anteriores estudios filogenéticos realizados con morfología (Zwick 1973, 2000, 2003). El resultado de MP es similar al que obtienen Terry & Whiting (en preparación) cuyo estudio es el que pone en duda la monofilia de Gripopterygidae y que se habría realizado únicamente con MP. A nuestro parecer hay argumentos para apoyar la monofilia de Gripopterygidae y atribuir estos problemas a un artefacto de la estimación de MP cuando se realiza sobre datos moleculares.

Los resultados de los géneros *Chilenoperla* y *Pelurgoperla* como parafiléticos, son congruentes con los antecedentes de la morfología ninfal (Vera 2008), donde previamente se indicaba la necesidad de una eventual modificación taxonómica. Ambas evidencias independientemente apuntan en la misma dirección, donde *Pelurgoperla* puede ser considerado como un miembro del linaje de *Chilenoperla* y *Ch. puerilis* debería ser excluida.

Las agrupaciones de subfamilias no encuentran respaldo en nuestros resultados, siendo congruente con las opiniones que de forma independiente presentaban los estudios de Terry & Whiting (en preparación) y McLellan & Zwick (2007). Sin embargo nuestros resultados dejan ver una serie de linajes que se relacionan parcialmente con estas categorías

taxonómicas. Gripopteryginae *sensu strictus* es uno de los linajes de mayor cohesión en nuestros análisis, sin embargo al interior de este no logramos un resultado único al comparar las metodologías de inferencia filogenética, es posible que se requiera de marcadores de mayor variabilidad para consensuar una única topología, un candidato puede ser Cyt-b. Dinotoperlinae fue reconocido como un linaje por el estudio de Terry & Whiting (en preparación), sin embargo contaba con un limitado muestreo, al incorporar un mayor número de taxa, los géneros de América del Sur *Aubertoperla* y *Alfonsoperla* se integran a Dinotoperlinae (clado D), inicialmente *Alfonsoperla* fue descrito pero no asignado a subfamilia, recientemente Froehlich (2010) en su catálogo de las especies neotropicales lo asigna a Dinotoperlinae sin desarrollar una explicación. Nuestros resultados muestran una estrecha vinculación de *Alfonsoperla* con *Aubertoperla* y confirman su ubicación en Dinotoperlinae, de modo que a este conjunto lo hemos denominado Dinotoperlinae *census lato* ya que incorpora a *Aubertoperla*, que en ninguno de nuestros análisis se agrupó con los restantes Gripopteryginae. Aún cuando nuestra muestra de Leptoperlinae es pequeña, permite relacionar taxa de ambos continentes, como se había señalado con anterioridad, sin embargo excluyen a *Newmanoperla*, de modo que lo designamos como Leptoperlinae *sensu stricto*. Sin duda que Antarctoperlinae es el grupo más complejo y requiere de una reorganización, los clados A, B y C muestran una tendencia a relacionarse, pero no logran respaldo estadístico, el resto de los géneros adopta diversas ubicaciones. Finalmente *Notoperlopsis* no muestra asociación con los Zelandoperlinae de modo que esta subfamilia tampoco se comporta como un linaje. Un resultado de esta configuración es que las relaciones transoceánicas ocurren en gran parte de la topología, sólo los clados A, B, C y E, tiene representantes exclusivos de América del Sur, lo que hace suponer que gran parte de

la diversificación genérica de la familia se desarrolló antes de la fragmentación del supercontinente Gondwana.

### **Reducción del vuelo**

Al observar la topología resultante, los taxa ápteros no se reúnen en un clado y cada uno de los géneros que las contienen *Andiperla*, *Vesicaperta* y *Notoperla* se presentan distantes unos de otros. De igual forma ocurre con las especies braquípteras de *Limnoperla*, *Notoperla* y *Notoperlopsis*. Aún cuando la nueva configuración vulnera la estructura de subfamilias, esta no afecta la relación que presentan las especies con reducción del vuelo aquí incluidas, de modo que la evolución independiente de estos rasgos encuentra en nuestro estudio un respaldo filogenético. El efecto que estas especies provocan sobre la reconstrucción del estado ancestral de los linajes es despreciable, siendo la pérdida del vuelo exclusividades de cada género y la mayor parte de los ancestros del linaje Gripopterygidae presentan el fenotipo volador. Por lo tanto la evolución independiente de los rasgos es la mejor explicación.

Ciertamente existen muchas otras taxa que presentan reducción del vuelo, cuya remota distribución ha dificultado obtener especímenes aptos para estudios moleculares, y que no han sido incluidas en este trabajo. Se requiere de nuevos esfuerzos para complementar estos resultados, en especial de aquellos géneros monoespecíficos cuyas relaciones son aún inciertas y podrían contribuir resolviendo o aumentando el respaldo de los nodos basales de la filogenia de Gripopterygidae.

### AGRADECIMIENTOS

A los revisores del manuscrito que han contribuido a mejorar este estudio. A todos quienes nos enviaron especímenes o datos que permitieron recolectar el material aquí utilizado. Muy especialmente a la colaboración de Guillermo Ferrú por facilitar imagos de *Claudioperla* del altiplano chileno, a Ian D. McLlelan (†) y Claudio Gilberto Froehlich quienes nos facilitaron Bibliografía y especímenes de *Antarctoperlinae* de Nueva Zelandia y *Gripopteryginae* de Brasil respectivamente. Al Dr. Ariel Camousseight (†) y a Susana Toledo por su invaluable apoyo en los trabajos de campo. Al equipo de trabajo del laboratorio GEVOL-Universidad de Chile por su apoyo en los análisis de las muestras, muy especialmente a Luis Pastenes por su asistencia técnica. A la Sección de Entomología del Museo Nacional de Historia Natural-Chile, por facilitar laboratorios y equipos. A los proyectos que han financiado las actividades realizadas en este estudio: MECESUP UMC-0204, CONICYT AT-23070183.

**Tabla 2.I.** Diversidad de especies actuales y de géneros para la Familia Gripopterygidae según su distribución geográfica. Modificada de: Fochetti & Tierno de Figueroa 2008, Froehlich 2010 y McLellan 2006. En paréntesis se indica el número de géneros incluidos en el presente análisis filogenético.

	América del Sur	Nueva Zelandia	Australia	total
Géneros	27 (24)	12(4)	13(4)	52 (32)
Especies	90	72	134	278

Tabla 2.II. Datos de los especímenes utilizados para la obtención de secuencias. Se indica el nombre de la especie, su familia o subfamilia en el caso de los Gripopterygidae, el sexo (M=♂, H=♀), su fenotipo de desarrollo alar (M= macróptero, A= áptero, B= braquiptero), sus datos de coleta y los códigos de acceso a Gen Bank.

Especie	Familia o Subfamilia	sexo	Fen.	Localidad de colecta	Códigos de acceso Gen Bank		
					16S	COI	H3
<i>Inconeuria porteri</i> Klapálek 1919	Perlidae Latreille 1802	M	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 22-01-2006; 30°50'S/72°30'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Nigroperla costalis</i> Illies 1964	Perlidae Latreille 1802	M	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 22-01-2006; 30°50'S/72°30'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Diamphipnoa sp.</i>	Diamphipnoidae Ricker 1950	M	M	SA, Chile, Talca, Vilches Alto 06-04-2007; 35°36'S/71°03'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Neuroperlopsis patris</i> Illies 1960	Eustheniidae Tillyard 1921	M	M	SA, Chile, Ñuble, Shangrila 26-01-2006,	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Penturoperla barbata</i> Illies 1960	Austroperlidae Tillyard 1921	M	M	SA, Chile, Talca, Vilches Alto 06-04-2007; 35°36'S/71°03'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Klapopteryx armillata</i> Navás 1928	Austroperlidae Tillyard 1921	M	M	SA, Chile, Talca, Vilches Alto 06-04-2007; 35°36'S/71°03'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Araucanioperla bullocki</i> (Navás 1933)	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 30-05-2005; 30°50'S/72°30'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Araucanioperla brinki</i> (Froehlich 1960)	Antarctoperlinae	H	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 30-05-2005; 30°50'S/72°30'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Ceratoperla schwabei</i> Illies 1963	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 13-09-2005; 30°50'S/72°30'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Neopentura semifusca</i> Illies 1965	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Cautín, Lago Conguillío 16-01-2005; 38°37'S/71°40'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Plegoperla punctata</i> (Froehlich 1960)	Antarctoperlinae	H	M	SA, Chile, Valdivia, Oncol 06-12-2005	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Antarctoperla michaelsoni</i> (Klapalek 1904)	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Santiago, Cajón del Maipo	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Pehuenioperla llaima</i> Vera 2009	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Cautín, lago Conguillío 20-09-2008; 38°37'S/71°40'W	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Vesicaperla celmisia</i> McLellan 2003	Antarctoperlinae	H	A	NZ, CO, Old Man Range, 1450msnm, 01-01-1992.	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Vesicaperla trilinea</i> McLellan 2003	Antarctoperlinae	H	A	NZ, CO, Pisa Range, 1680msnm, 23-01-2002.	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Zelandobius uniramus</i> McLellan 1993	Antarctoperlinae	M	M	NZ, SL, Wairuna South, Storry Peak, 09-10-2005.	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Zelandobius macburneyi</i> McLellan 1993	Antarctoperlinae	M	M	NZ, CO Nokomai Range, 7-nov-2004.	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Zelandobius truncus</i> McLellan 1993	Antarctoperlinae	M	M	NZ, OL, Chain Hills, 28-ene-2004.	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX
<i>Zelandobius unicolor</i> Tillyard 1923	Antarctoperlinae	M	M	NZ, MC, McKinnon Stm, Godley, 22-10-2004.	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX	XXXXXXXXXX

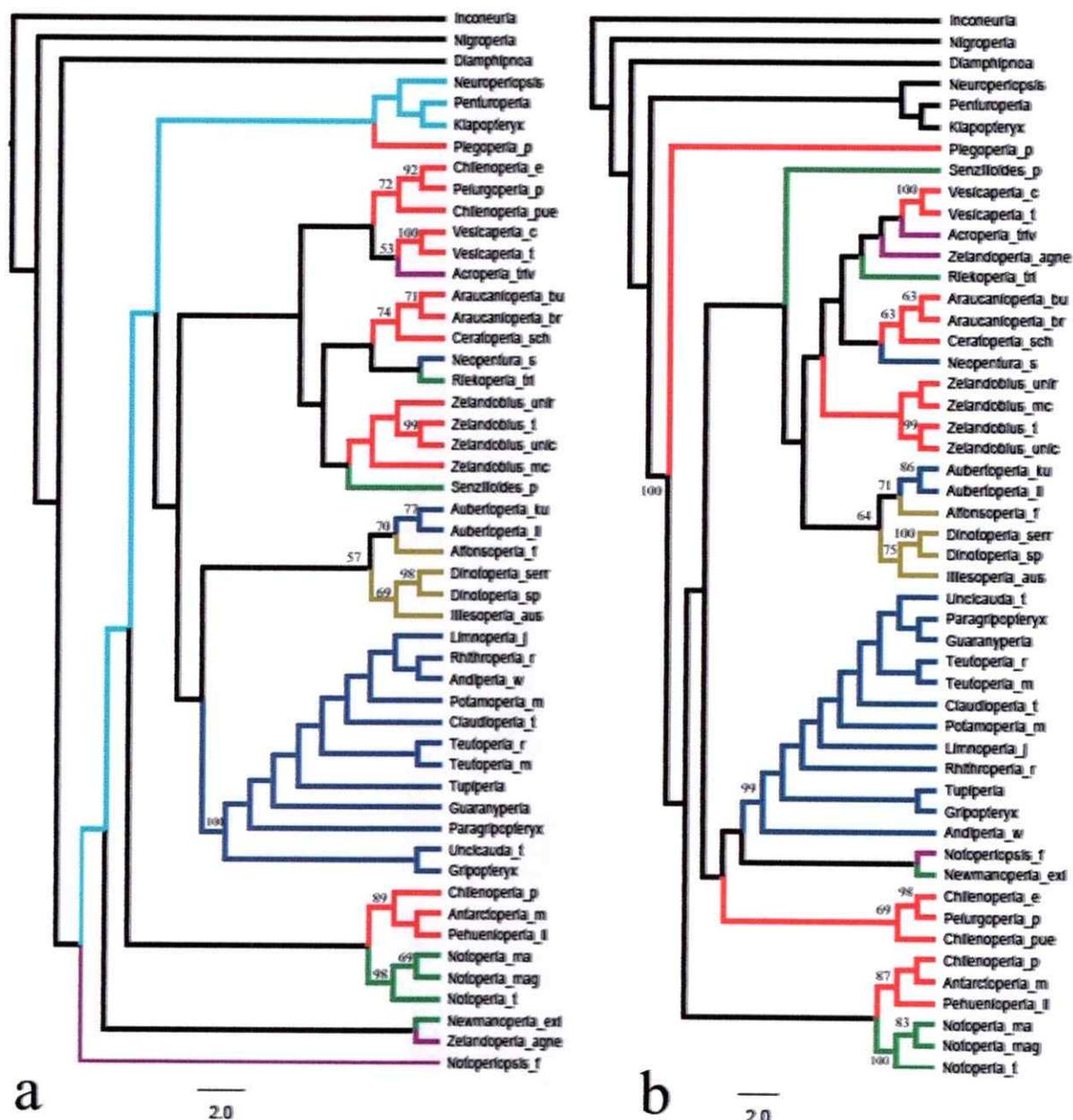
<i>Chilenoperla elongata</i> Vera 2008	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Talca, Vilches Alto 06-04-2007; 35°36'S/71°03'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Chilenoperla puelche</i> Vera 2011	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Cautín, Manzanar 03-11-2007; 38°27'S/71°40'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Pelurgoperla personata</i> Illies 1963	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Llanquihue, Río Blanco 15-02-2009;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Chilenoperla puerilis</i> Illies 1963	Antarctoperlinae	M	M	SA, Chile, Coihaique, Río La Paloma 15-09-2007	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Alfonsoperla flinti</i> Zwick & McLellan 2007	Dinotoperlinae	M	M	SA, Chile, Cautín, Manzanar 03-11-2007; 38°27'S/71°40'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Aubertoperla illiesi</i> Froehlich 1960	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Cautín, Lago Conguillfo 16-01-2005; 38°37'S/71°40'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Aubertoperla kuscheli</i> Illies 1963	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Magallanes, Punta Arenas 12-02-2008; 53°08'S/71°01'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Limnoperla jaffueli</i> (Navás 1928)	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Santiago, Cajón del Maipo	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Rhithroperla rossi</i> (Froehlich 1960)	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Aysén, Río Cisnes, 5-02-2006;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Teutoerla brundini</i> Illies 1963	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Aysén, Río Cisnes, 5-02-2006;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Teutoerla maulina</i> Vera 2006	Gripopteryginae	H	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 19-11-2005;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Uncicauda testacea</i> (Vera 2006)	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Coihaique, Río La Paloma 15-02-2007	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Potamoperla myrmidon</i> (Mabille 1891)	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Coihaique, La Tapera, Río Cisnes 14-02-2006	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Claudioperla tigrina</i> (Klapalek 1904)	Gripopteryginae	M	M	SA, Chile, Paríacota, Lago Chungará 19-12-2005;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Andiperla willinki</i> Aubert 1956	Gripopteryginae	M	A	SA, Chile, Tierra del Fuego, Cord. de Darwin 05-01-2006;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Paragripopteryx</i> Enderlein 1909	Gripopteryginae		M	SA, Brasil, Jundiaí, Serra do Japi 11-03-2008; 23°14'S/46°57'W.	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Gripopteryx</i> Pictet 1841	Gripopteryginae		M	SA, Brasil, Jundiaí, Serra do Japi 11-03-2008; 23°14'S/46°57'W.	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Tupiperla</i>	Gripopteryginae	M	M	SA, Brasil, Jundiaí, Serra do Japi 11-03-2008; 23°14'S/46°57'W.	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Guaranyperla guapiara</i> Froehlich	Gripopteryginae	M	M	SA, Brasil, Jundiaí, Serra do Japi 11-03-2008; 23°14'S/46°57'W.	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Senzilloides pangipullii</i> (Navás 1928)	Leptoperlinae	M	M	SA, Chile, Cautín, Lago Conguillfo 16-01-2005; 38°37'S/71°40'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Notoperla macdowalli</i> McLellan & Mercado 2005	Leptoperlinae	M	A	SA, Chile, Santiago, Yerba Loca	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Notoperla magnaspina</i> McLellan 2006	Leptoperlinae	M	B	SA, Chile, Coihaique, Baño viejo 2009;	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Notoperla tunelina</i> (Navás 1917)	Leptoperlinae	H	M	SA, Chile, Última esperanza 06-02-2008; 51°15'S/ 72°55'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX
<i>Notoperlopsis femina</i> Illies 1963	Zelandoperlinae	H	M	SA, Chile, Cauquenes, Río Curanilahue 13-09-2005; 30°50'S/72°30'W	XXXXXXXX	XXXXXXXX	XXXXXXXX

**Tabla 2.III.** Referencias de las secuencias descargadas desde GenBank para los genes 16S y H3.

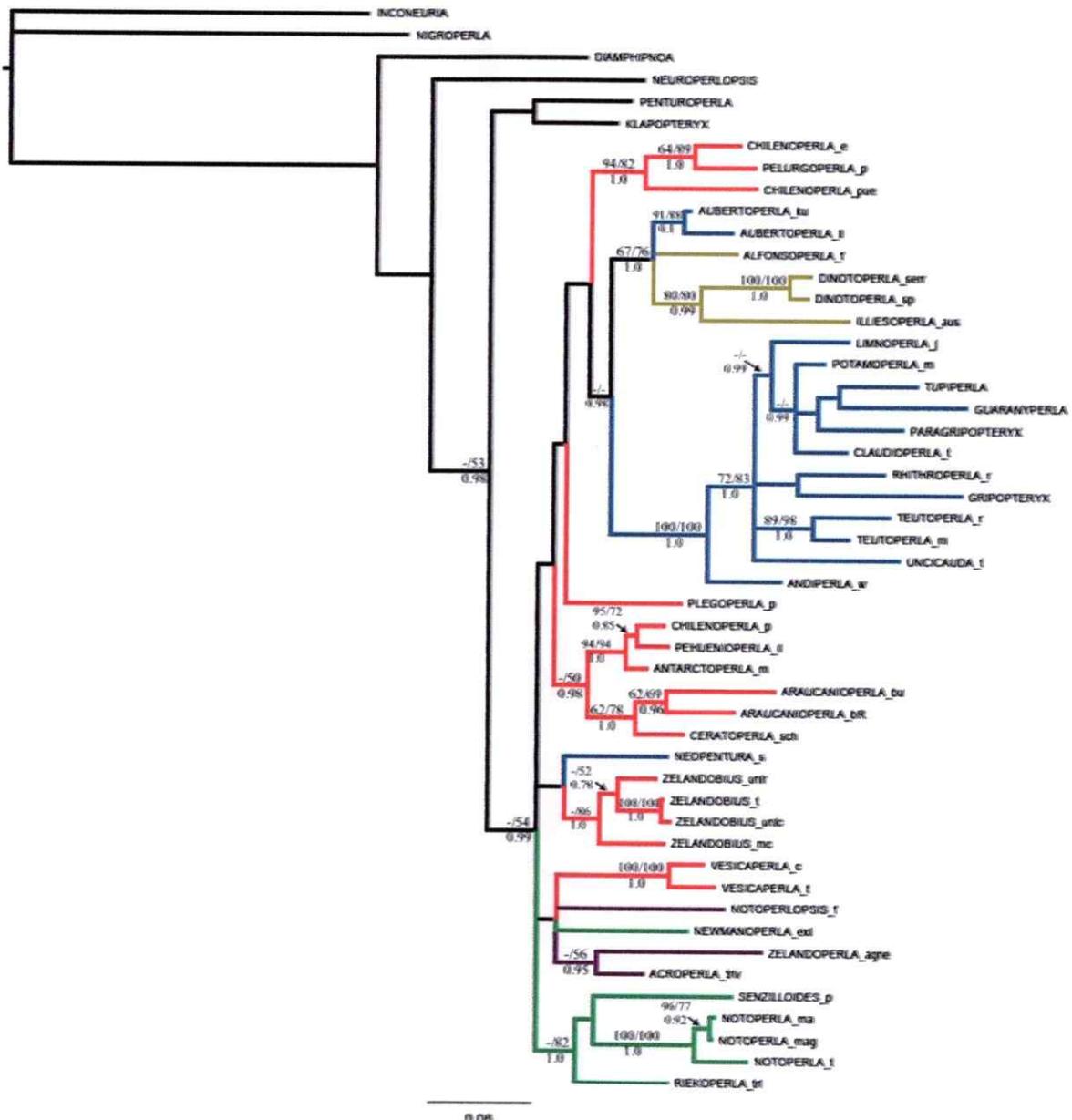
especie	subfamilia	Acceso 16S	Acceso H3
<i>Riekoperla triloba</i>	Leptoperlinae	EF623171	EF622590
<i>Newmanoperla exigua</i>	Leptoperlinae	EF623162	EF622583
<i>Dinotoperla serricauda</i>	Dinotoperlinae	EF623165	EF622586
<i>Dinotoperla sp.</i>	Dinotoperlinae	EF623160	EF622582
<i>Illiesoperla australis</i>	Dinotoperlinae	EF623158	EF622580
<i>Zelandoperla agnetis</i>	Zelandoperlinae	EF623157	EF622579
<i>Acroperla trivacauta</i>	Zelandoperlinae	EF623155	EF622578

**Tabla 2.IV.** Respaldos estadísticos para los nodos A-G, resultados de cada partición y método de inferencia. Se indica en cada casillero los valores para las tres metodologías MP/ML/IB, siendo los dos primeros resultados de Bootstrap y el último de probabilidad *a posteriori*. No observable con las taxa disponibles= no, clado ausente o sin respaldo= -.

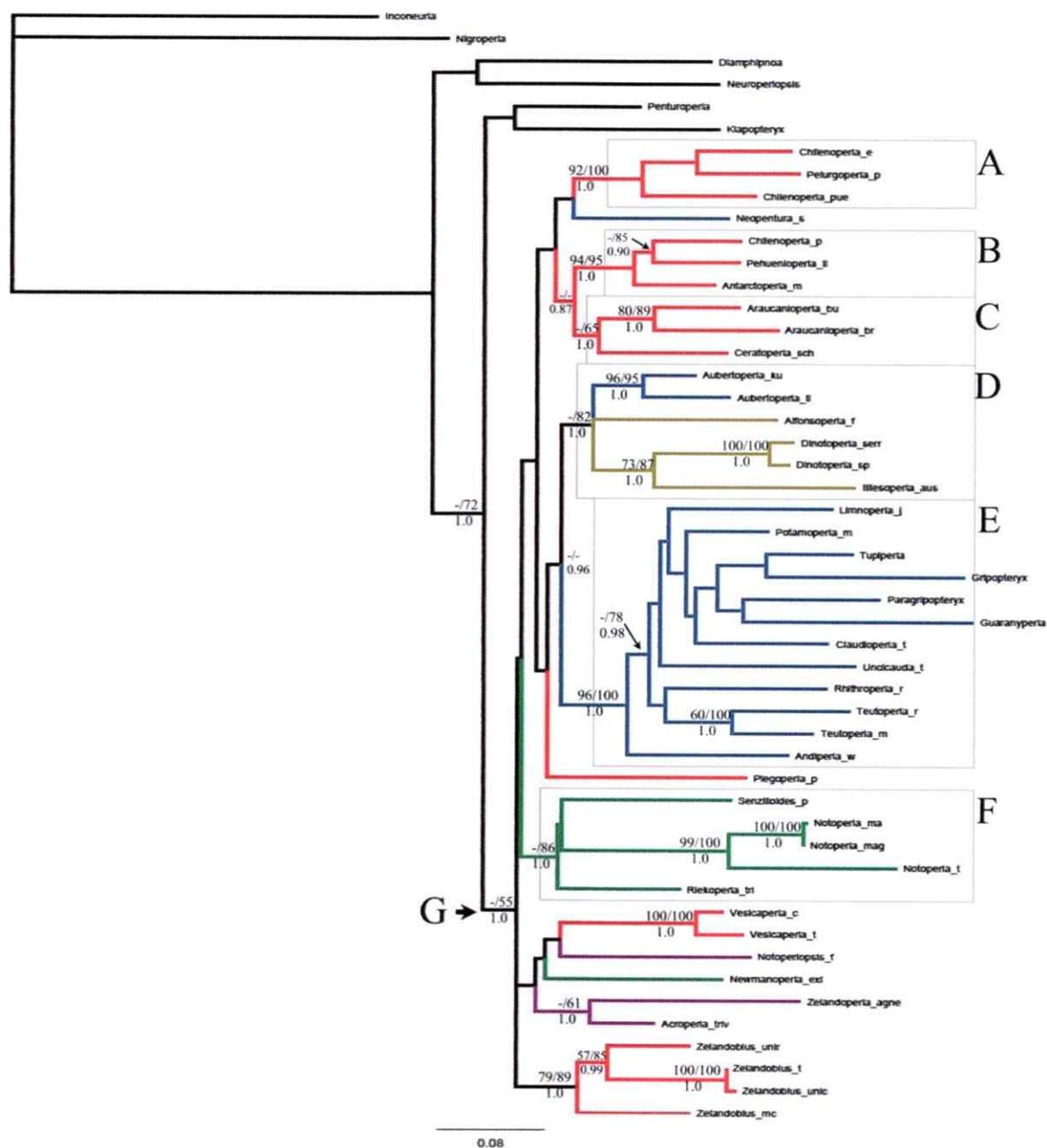
Particiones	16S	COI	H3	16S+COI	16S+H3	16S+COI +H3
Clados						
A	78/97/1.0	57/-/0.96	-/-/	93/95/1.0	71/82/1.0	92/100/1.0
B	85/90/1.0	-/-/1.0	-/-/	90/72/1.0	94/94/1.0	94/95/1.0
C	72/70/1.0	-/-/	-/-/	-/71/1.0	62/78/1.0	-/65/1.0
D	70/85/1.0	no	-/-/	-/-/	67/76/1.0	-/82/1.0
E	96/95/1.0	-/-/0.99	-/-/0.82	81/98/1.0	100/100/1.0	96/100/1.0
F	-/-/	no	50/-/1.0	-/-/	-/82/1.0	-/84/ 1.0
G	-/-/0.92	-/-/	-/-/	-/-/1.0	-/54/0.99	-/55/1.0



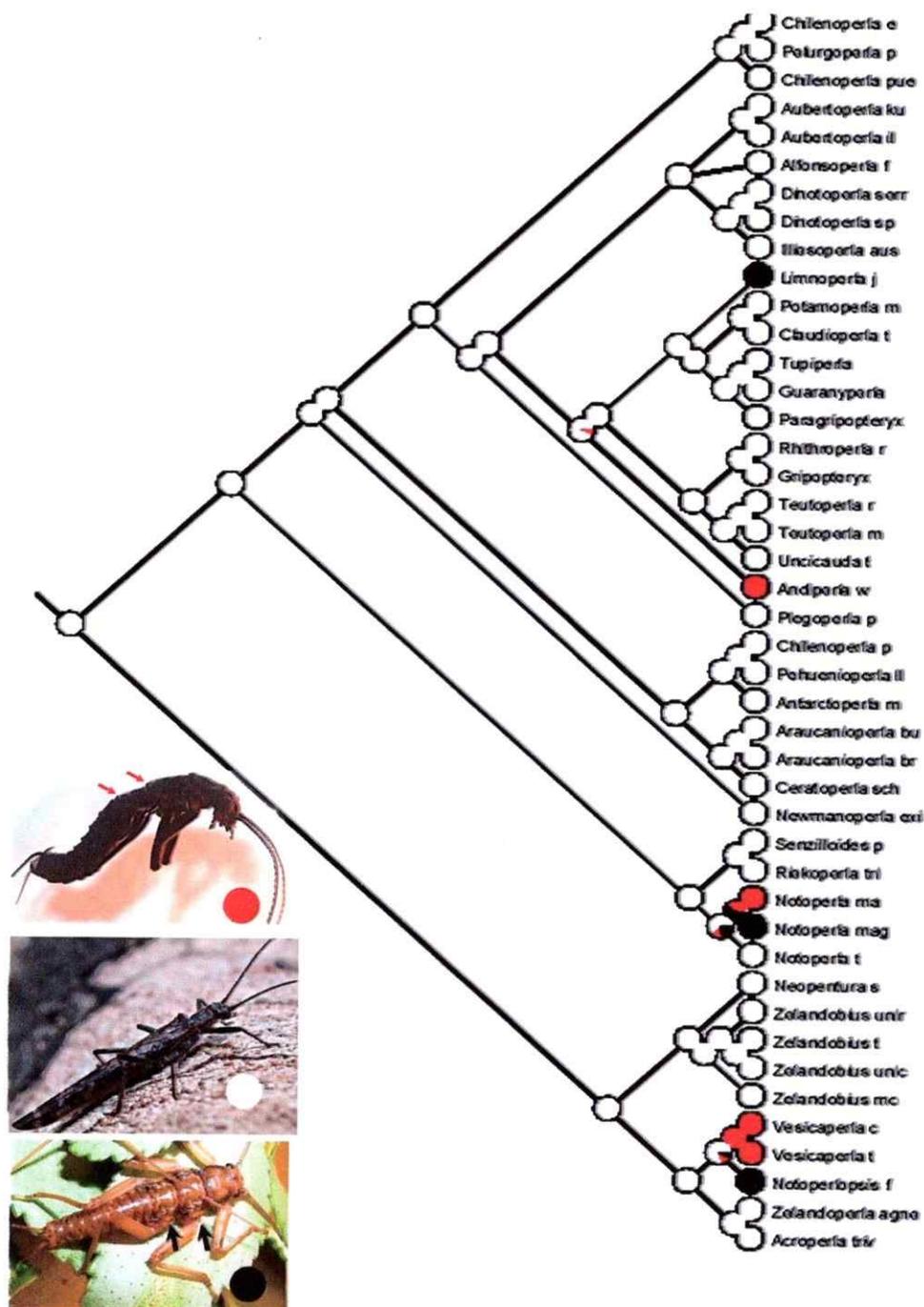
**Figura 2.1.** Hipótesis filogenéticas obtenida con el método de MP para la partición del gen 16S. Los colores representan las siguientes subfamilias: Antarctoperlinae (rojo), Gripopteryginae (azul), Dinotoperlinae (café), Leptoperlinae (verde) y Zelandoperlinae (violeta), se indica los respaldos estadísticos para bootstrap sobre los nodos. **a)** árbol que muestra la subordinación de elementos de otras familias en Gripopterygidae. **b)** árbol corregido tras aplicación de *constraints* para forzar la monofilia de Gripopterygidae.



**Figura 2.2.** Hipótesis filogenética obtenida con el método de IB para la partición de dos genes combinados (16S+H3). Los colores representan las siguientes subfamilias: Antarctoperlinae (rojo), Gripteryginae (azul), Dinotoperlinae (café), Leptoperlinae (verde) y Zelandoperlinae (violeta). Se indican los nodos con respaldo estadístico para bootstrap MP/ML, y bajo ellos la probabilidad *a posteriori* de IB.



**Figura 2.3.** Hipótesis filogenética obtenida con el método de ML para la partición de los tres genes combinados (16S+COI+H3). Se indican en cuadros los linajes A, B, C, D, E, F y con una flecha el nodo del linaje G. Los colores representan las siguientes subfamilias: Antarctoperlinae (rojo), Gripopteryginae (azul), Dinotoperlinae (café), Leptoperlinae (verde) y Zelandoperlinae (violeta). Se indican los nodos con respaldo estadístico para bootstrap MP/ML, y bajo ellos la probabilidad *a posteriori* de IB.



**Figura 2.4.** Reconstrucción de los estados ancestrales para la reducción del vuelo en Griopterygidae. Se obtuvo con el análisis de ML, modelo MK1 estimado sobre el árbol de ML para la partición de dos genes combinados (16S+H3). Los fenotipos se indican con colores y figuras: rojo áptero (*Andiperla willinki*); blanco macróptero (*Chilenoperla elongata*); negro braquíptero (*Notoperla magnaspina*).

## BIBLIOGRAFÍA

- Amorim D.S., C.M De Santos & S.S. De Oliveira. 2009. Allochronic taxa as an alternative model to explain circumantarctic disjunctions. *Systematic Entomology* 34:2-9.
- Aubert, J. 1956. *Andiperla willinki* n. sp., Plécoptere nouveau des Andes de Patagonia. *Mitt. Schweiz. Ent. Ges.* 39:229-232.
- Camousseigh, A. 1995. Plecoptera. En: *Diversidad Biológica de Chile* (Eds. J.A. Simonetti, M.T.K. Arroyo, A.E. Spotorno y E. Lozada), pp. 218-223. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica, Santiago de Chile.
- Colgan DJ, McLauchlan A, Wilson GDF, Livingston SP, Edgecombe GD, Macaranas J, Cassis G & Gray MR. 1998. Histone H3 and U2 snRNA DNA sequences and arthropod molecular evolution. *Australian Journal of Zoology* 46:419- 437.
- Dean, J. & R.S.T. Clair. 2006. *Dinotoperla walkeri* sp. nov. (Plecoptera: Gripopterygidae), a brachypterous stonefly from western Victoria, Australia. *Zootaxa* 1230:55-62.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Fochetti, R. & J.M. Tierno de Figueroa. 2008. Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta). *Hydrobiologia* 595:365-377.
- Folmer O, Black M, Hoeh W, Lutz R & Vrijenhoek R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from divergence metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology* 3:294-299.
- Froehlich, Cl. 2010. Cataloge of Neotropical Plecoptera. *Illiesia* 6(12):118-205.

- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Illies, J. 1958. Abranchioperlidae, eine neue Plecopterenfamilie. *Investigaciones Zoológicas Chilenas* 4:223-230.
- Illies, J. 1960. Die erste auch im Larvenstadium terrestrische Plecoptere. *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 33(3):161-168.
- Illies, J. 1963. Revision der südamerikanischen Gripopterygidae (Plecoptera). *Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft* 36: 145-248.
- Illies, J. 1964. Die Plecopteren-Unterfamilie Andiperlinae (Auflösung einer unnatürlichen Negativgruppe nach REMANE). *Zoologischer Anzeiger*. 172(1):37-48.
- Illies, J. 1968. The first wingless stonefly from Australia. *Psyche* 75:328-333.
- Illies, J. 1969. Biogeography and ecology of neotropical freshwater insects, especially those from running waters. En: *Biogeography and ecology in South America* (Eds. E.J. Fittkau, J. Illies, H. Klinge, G.H. Schwabe & H. Sioli), pp. 685-708. Dr. W. Junk N.V., Publishers the Hague.
- Jowett T. 1986. Preparation of nucleic acids, in *Drosophila: a practical approach*. Oxford, IRL Press.
- Kohshima, S. 1985. Patagonian glaciers as insect habitats, En: *Glaciological Studies in Patagonia Northern Icefield*, (Eds. C. Nakajima), Data Center for Glacier Research, Japanese Society of Snow and Ice, Nagoya University, pp.96-99.
- Lanfranco, D. 1982. Presencia de *Andiperla willinki* en Chile. *Anales del Instituto de la Patagonia* 13:207-209.

Lecci, L.S. & Cl. Froehlich. 2011. Taxonomic revision of *Griopteryx* (Pictet, 1841) (Plecoptera: Griopterygidae). *Zootaxa* 2792:1-21.

Lencioni, V. 2004. Survival strategies of freshwater insects in cold environments. *Journal of Limnology* 63 (suplemento 1): 45-55.

Maddison W.P. & D.R. Maddison. 2003. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 1.0. Disponible en <http://mesquiteproject.org>.

McLellan, I.D. & P. Zwick. 2007. New species of and keys to South American Griopterygidae (Plecoptera). *Illiesia*, 3(4), 20-42.

McLellan, I.D. 1971. A revision of australian Griopterygidae (Insecta: Plecoptera). *Australian Journal of Zoology, Supplementary Series* 2: 1-79.

McLellan, I.D. 1977. New alpine and southern Plecoptera from New Zealand, and a new classification of the Griopterygidae. *New Zealand of Zoology* 4:119-147.

McLellan, I.D. 1979. New Zealand terrestrial stoneflies and some ideas on speciation. *Gewasser und Abwasser* 64:56-59.

McLellan, I.D. 1993. Antartoperlinae (Insecta: Plecoptera). *Fauna of New Zealand* 27:1-70.

McLellan, I.D. 2006. Endemism and Biogeography of New Zealand Plecoptera (Insecta). *Illiesia* 2(2):15-23.

McLellan, I.D., M.L. Miserendino & M.E.T. Hollmann. 2006. Two new species of *Notoperla* (Plecoptera: Griopterygidae) and a redescription of *Notoperlopsis femina* Illies. *Zootaxa* 1140:53-68.

- Morrone JJ. 1999. Presentación preliminar de un nuevo esquema biogeográfico de América del Sur. *Biogeographica* 75: 1-16.
- Palma, A. & R. Figueroa. 2008. Latitudinal diversity of Plecoptera (Insecta) on local and global scales. *Illiesia* 4(8):81-90.
- Palumbi SR, Martín A, Romano S, McMillan WO, Stice L & Grabowski G. 1991. *The Simple Fool's Guide to PCR*. University of Hawaii. Honolulu. 35 pp.
- Pessacq, P. 2009. A new Gripopterygidae (Plecoptera) species from southern Patagonia. *Zootaxa* 2264:51-57.
- Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molecular Biology and Evolution*. 25(7):1253-1256.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Stark, B., Cl. Froehlich & M.C. Zúñiga. 2009. South American stoneflies (Plecoptera). A.B.L.A volumen 5, Pensoft Sofia-Moscow 154pp.
- Swoofford DL. 2000. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Terry, M. D., M. F. Whiting. En Preparación. Phylogenetic systematics of Plecoptera: evidence from morphology and six genes.
- Thompson JD, Higgins DG & Gibson TJ. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* 22(22):4673-4680.

Vera, A. & A. Camousseigh. 2006. Estado de conocimiento de los plec6pteros de Chile. *Gayana* 70:57-64.

Vera, A. 2008. Una nueva especie de *Chilenoperla* (Plecoptera: Gripopterygidae) y las consecuencias taxon6micas del descubrimiento de su ninfa. *Gayana* 72(2): 144-156.

Vera, A. 2011. Nuevos registros distribucionales de *Notoperla* Enderlein (Plecoptera: Gripopterygidae), con comentarios taxon6micos y biol6gicos. *Anales Instituto Patagonia* 39(1):109-112.

Vera, A., A. Zuñiga-Reinoso & C. Muñoz-Escobar. 2012. Perspectiva hist6rica sobre la distribuci3n de *Andiperla willinki* "Drag3n de la Patagonia" (Plecoptera: Gripopterygidae). *Revista Chilena de entomología* 37:87-94.

Zwick, P. 1973. Insecta: Plecoptera. Phylogenetisches system und katalog. *Das Tierreich* 94: i-xxxii, 1-465. De Gruyter, Berlin, New York.

Zwick, P. 2000. Phylogenetic system and zoogeography of the Plecoptera. *Annual Review of Entomology* 45:709-746.

Zwick, P. 2003. Morphological support of the major clades of Plecoptera. *Entomologische Abhandlungen* 61(2):128-130.

## CAPITULO III:

DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA Y POLIMORFISMO ALAR DE *LIMNOPERLA*  
*JAFFUELI* (NAVÁS, 1930) (PLECOPTERA, GRIPOPTERYGIDAE)

## RESUMEN:

*Limnoperla jaffueli* (Navás 1930), es la especie de Gripopterygidae que se distribuye en el mayor rango latitudinal de América del Sur, y pese a los diversos estudios que la citan, es necesaria una actualización de su distribución, la que damos a conocer en base a datos georeferenciados y asignados a cuencas hidrográficas para Chile. Además esta especie presenta polimorfismo en el desarrollo de las alas, reconociéndose individuos voladores (macrópteros) y no voladores (braquípteros). En este trabajo se describen morfométricamente ambos fenotipos y se estudia su relación con la distribución geográfica mediante un análisis de componentes principales.

Los resultados muestran ausencia o escasos datos distribucionales para cuencas de la zona norte, costeras y archipiélagos de Aysén y Magallanes. Se reportan 15 nuevas poblaciones con individuos braquípteros, siete de ellas con ambos fenotipos, mientras que aquellas únicamente de fenotipo braquíptero se ubican al sur de los 45°S. El análisis morfométrico muestra una distribución bimodal para la longitud alar, mientras que en el PCA se reconocen dos grupos al norte y sur de los 45°S.

## INTRODUCCIÓN:

*Limnoperla jaffueli* (Navás 1930), constituye un género monotípico y es la especie de Plecoptera que presenta el mayor rango de distribución latitudinal de Chile, desde los 30°S hasta Tierra del Fuego (Vera & Camousseigh 2006). Además parece ser la especie más frecuente de muestrear en los sistemas hídricos de la zona centro, sur y Austral de Chile (Oyanedel *et al.* 2008; Valdovinos *et al.* 2010). Adicionalmente *L. jaffueli* es el único Gripopteryginae que presenta polimorfismo alar, presentando fenotipos voladores y no voladores, estos últimos con una mayor frecuencia hacia el extremo austral de su rango de distribución.

La distribución de los Plecoptera de América del Sur ha sido revisada en varias oportunidades, y en especial para Gripopterygidae a partir del trabajo fundador de Illies (1963). Sin embargo, en la mayor parte de estos trabajos se indican rangos latitudinales o regionales de distribución sobre la base de revisiones bibliográficas (Zwick 1973; Cekalovic, 1976; Camousseigh 1995; Vera & Camousseigh 2006; Vera 2008; Palma & Figueroa 2008; Stark *et al.* 2009; Froehlich 2010). Los rangos de distribución señalados podrían presentar errores de identificación inicial, cuando se soportan únicamente en el estudio de ninfas, como es habitual en el trabajo limnológico, siendo los imagos los que maximizan una identificación confiable. La causa de estas dificultades en identificación ninfal se debe a dos factores: 1.- la falta de herramientas adecuadas de identificación, 2.- la falta de estudios específicos en la discriminación de las especies en sus diferentes estadios. Para *L. jaffueli* la identificación de imagos es simple y esta registrada en herramientas como



claves, descripciones y figuras desde Illies (1963), Benedetto (1974) y Stark *et al* (2009), lo que se encuentra en oposición con la discriminación de sus ninfas, las que se asemejan morfológicamente a varios otros géneros de Gripopteryginae como son: *Claudioperla* Illies, 1963, *Rhithroperla* Illies, 1963 y *Teutoerla* Illies, 1963, estos dos últimos pueden coexistir con *Limnoperla* y superponer su distribución desde los 35°S hasta Tierra del Fuego. La discriminación entre las ninfas de *Limnoperla* con las de *Rhithroperla* y *Teutoerla* se logró en los estudios de Vera 2005 y 2006 respectivamente. Estos trabajos fueron incorporados por McLellan & Zwick (2007) y Stark *et al.* (2009), quienes entregan herramientas de identificación para ninfas sudamericanas. Estas contribuciones son relativamente recientes y hacen esperable la persistencia de dificultades en la identificación en publicaciones contemporáneas. Por otra parte, aún se hace necesaria una revisión de la distribución dada con anterioridad en la bibliografía. Por esta razón nos hemos planteado como un primer objetivo actualizar a nivel de cuencas hidrográficas la distribución de *L. jaffueli* para así poder explorar como se distribuyen los fenotipos que reducen el vuelo, cual es su continuidad geográfica, su frecuencia y su relación con el gradiente latitudinal, pudiendo o no establecer una variación clinal con la latitud.

El polimorfismo en el desarrollo de las alas de esta especie, se presenta como fenotipos voladores (macrópteros) y no voladores (braquípteros), esta condición es conocida para otros Plecoptera a nivel global y dentro de la familia Gripopterygidae por ejemplo para *Nesoperla fulvescens* Tillyard, 1923 (Zelandoperlinae). En *L. jaffueli* el polimorfismo se presenta en ambos sexos y fue descrita inicialmente por Illies (1963) para poblaciones monomórficas de uno u otro fenotipo, siendo macróptera la más frecuente y braquíptera excepcional, solo describe en un par de poblaciones para Magallanes y en un único imago macho proveniente de Valdivia. Illies (1963) discutió esta variación como una adaptación a

las condiciones ventosas australes. Además, señala que la reducción de las alas estaría asociada a la elongación de las antenas y a la reducción de los cercos.

Para explicar la conservación de múltiples fenotipos en el desarrollo de las alas para otros insectos se han planteado varias hipótesis. Un grupo de ellas enfrenta el problema como un sistema de compromisos entre el desarrollo de alas y la musculatura del vuelo versus un mayor tamaño para desarrollar gónadas y huevos (Jonson, 1969, Crnokrak & Roff. 2002). En este caso se favorece la dispersión (macrópteros) frente a escenarios cambiantes y la permanencia (braquípteros) frente a escenarios estables (Southwood, 1962, Denno, 2001), aquí la longitud de las alas podría ser un rasgo determinado cuantitativamente, el que se expresaría de acuerdo a umbrales (Roff 1994, 2001) pudiendo revertir el fenotipo dentro de una población. Otro grupo de hipótesis acude a las causas históricas donde el aislamiento favorece por selección natural a los estacionarios frente a los dispersantes, estos últimos al abandonar la población se pierden fuera de la "isla" conduciendo a la fijación del rasgo no volador (Darwin, 1872, Anderson 1997).

La extensión de la distribución geográfica de *L. jafuelli* la expone tanto a un gradiente climático como a una abrupta perturbación histórica, como han sido las glaciaciones pleistocénicas, convirtiéndola en un buen modelo para explorar estas hipótesis en diversos escenarios. Al respecto este estudio busca como un segundo objetivo describir morfométricamente la variación fenotípica, para evaluar cuan continua o discreta se presenta la longitud de las alas, como se relaciona con el sexo, otras variables morfométricas y con la distribución geográfica de las poblaciones.

## MATERIALES Y METODOS:

Para la actualización distribucional de *L. jaffueli*, hemos utilizado las referencias bibliográficas que señalen a lo menos los especímenes identificados junto a su localidad específica, y hemos omitido aquellos que solo indican rangos de latitud. Se han estudiado e identificado los imagos depositados en las colecciones del Museo Nacional de Historia Natural (MNHN) y del Instituto de Entomología José Herrera González de la Universidad Metropolitana de Ciencias de la Educación (UMCE). Adicionalmente se han recolectado nuevos especímenes (imagos) en zonas deficitarias y que han sido georeferenciadas en grados de latitud y posteriormente transformadas a UTM con las herramientas disponibles en "<http://recursos.gabrielortiz.com>".

La evaluación morfométrica se realizó sólo con especímenes conservados en etanol de 70% o superiores, los cuales en su mayoría provenían de colectas recientes realizadas para este estudio. Gran parte de los especímenes (imagos) museológicos se encuentran montados en seco, provocando torsión y deformidad del cuerpo durante su deshidratación, además de la fragilidad de sus apéndices, los que frecuentemente se encuentran mutilados. Esta condición impide su medición y por ello fueron excluidos del análisis.

Material examinado: se examinaron 844 imagos para su identificación y asignación a cuencas hidrográficas. 441 fueron medidos para el análisis morfométrico 441. En la Tabla 3.1 y Figura 3.1 se indica el número y procedencia de los especímenes medidos. Para

incorporar la máxima variabilidad morfológica de la especie, se incluyó poblaciones entre los 33°S y los 54°S, con especímenes de ambos sexos y fenotipos.

La morfometría consideró mediciones corporales lineales, tomadas en una lupa estereoscópica Nikon con oculares de 10X y objetivos (zoom) de 0,7X a 3X, con reglilla incorporada al ocular. Las variables morfométricas evaluadas se muestran en la figura 3.2 y se explicitan a continuación:

LT: longitud corporal, medida en vista dorsal desde el margen anterior del clípeo y hasta el margen posterior del X tergo abdominal.

La: longitud de la antena, medida desde la base del escapo hasta su extremo distal.

Lc: longitud del cerco, medida desde su esclerito basal hasta su extremo distal.

LAA: longitud del ala anterior, medida como una línea recta desde la tegula hasta el ápice de la lámina.

Lfp: longitud del fémur posterior, medida en vista lateral, estableciendo una línea recta desde el centro de la articulación con el trocánter, hasta su extremo distal.

Ac: ancho cefálico, medido en vista dorsal como la distancia máxima entre los márgenes externos de los ojos.

At: ancho del mesonoto, medido en vista dorsal como la distancia en línea recta entre ambas tegulas.

Estas siete variables fueron incluidas en un análisis de componentes principales (PCA) sin previa transformación, utilizando el programa SPSS 17.0. El análisis visual sobre la distribución de casos en el espacio multivariado incluyó el sexo, el fenotipo y las poblaciones de origen. Adicionalmente se realizó un análisis discriminante para evaluar los grupos identificados con el PCA.

## RESULTADOS:

### Distribución geográfica de *L. jaffueli*

#### Estudio bibliográfico:

La localidad Tipo de la especie es: Chile Valparaíso Estero Marga Marga (Navás 1928); otras especies que posteriormente fueron establecidas como sinónimos se presentaban en las Provincias de Malleco, Ñuble y Llanquihue (Navás 1930, 1933; Froehlich 1960). En la revisión de Illies (1963) se indican 25 localidades en Chile (se excluye Chiloé continental, Aysén y Tierra del Fuego) y se declara a esta especie como la de mayor distribución, presentándose desde Valparaíso a Magallanes tanto en la costa como en la Cordillera de los Andes, además se identifica por primera vez en Argentina para Neuquén. El catálogo de Cekalovic (1976), extiende su distribución al norte en la localidad de Coquimbo: El Bato y al sur en Tierra del Fuego: Rusfín, agrega una serie de otras localidades intermedias a las ya señaladas. Vera (2005) adiciona una población en la costa de Cauquenes, Río Curanilahue. Miserendino & Pizzolon (2003) y Pessacq & Miserendino (2008) reconocen nuevas localidades asociadas a la Cordillera de Los Andes en la Patagonia argentina, para las provincias de Chubut, Santa Cruz y Río Negro. Finalmente los estudios de Oyanedel *et al.* (2008) y Valdovinos *et al.* (2010) registran la especie para la Provincia de Aysén en Chile, lo que le da continuidad regional a los registros de distribución. En el Catálogo de Froehlich (2010) se resume esta información en Regiones y Provincias. El esfuerzo de muestreo representado en los trabajos anteriormente citados resulta en el reconocimiento

casi sin excepción de poblaciones de fenotipo macróptero. Solo Illies (1963) reconoce tres localidades con braquípteros: Valdivia: Isla teja; Magallanes: Pto. Bories Río Cuchara; Última esperanza, Lago Portefío.

#### **Estudio de imagos depositados en colecciones:**

Se estudiaron 72 especímenes montados en seco desde la colección entomológica UMCE. Se identificaron 19 localidades representativas del centro sur de Chile, 16 especímenes presentaron el fenotipo braquíptero (tabla II), distribuidos en siete localidades, dos de ellas contienen ambos fenotipos con lo que se trataría de poblaciones de fenotipo mixto (Cautín Los Ñirres Pitrufrquén; Arauco San José de Colico).

La colección entomológica del MNHN presenta dos formatos: en seco y en húmedo. Se estudiaron 58 especímenes montados en seco los que se distribuyen en 20 localidades, 12 especímenes presentan fenotipo braquíptero (Tabla II) distribuidos en dos localidades: Cauquenes Canelillos solo con braquípteros y Arauco San José de Cólico con ambos fenotipos. Los especímenes en húmedo han sido depositados en esta colección en su mayoría como un resultado del presente estudio, e incluyen 714 imagos distribuidos en 43 localidades, de ellas 5 representan poblaciones sólo de fenotipo braquíptero (Aysén Dos Lagunas, Jeinimeni, Tamango; Magallanes Río grey, Lago Deseado) y tres representan poblaciones con fenotipos mixtos (Región Metropolitana Aculeo; Cauquenes Los Ruiles; Valdivia Bonifacio). La colección del MNHN representa todo el rango distribucional de la especie.

En la Figura 3.3 se muestra un mapa de Chile que transfiere los datos de distribución a cuencas hidrográficas, donde se observa que la mayor parte de las localidades citadas en

bibliografía se asocian a centros urbanos y de grandes cuencas. Los datos museológicos y las recolectas recientes realizadas para este estudio, permiten dar continuidad latitudinal a la distribución en las principales cuencas desde Choapa (IV Región) hasta Baker (XI Región), interrumpiéndose parcialmente en Chiloé Continental al sur de Puelo. Los registros son inexistentes para: la cuenca del Río Bravo, Campos de Hielo Sur y la estepa patagónica (continental y de Tierra del Fuego), aún cuando esta última ha sido explorada recurrentemente. Los registros de las grandes cuencas contrastan con la ausencia de datos para las cuencas pequeñas, en especial las costeras de todo el país. Gran parte de los nuevos registros se han realizado justamente en estas cuencas. Chiloé únicamente cuenta con un registro y no hay datos para los archipiélagos al sur de Chiloé.

El estudio de las recientes localidades exploradas, resulta en el hallazgo de nuevas poblaciones braquípteras y por primera vez de poblaciones de fenotipo mixto, sin presentar estados intermedios (tabla 3.II). Entre Choapa y Chiloé, las poblaciones con fenotipo braquíptero se ubican fundamentalmente en la zona costera del centro sur del país, su continuidad es incierta dada la escases de muestreos. Las poblaciones de fenotipo mixto presentan ambos fenotipos para los dos sexos en variable. Hace excepción la población de Aculeo (Región Metropolitana), que se ubica en el valle central y contiene escasos individuos braquípteros. En Aysén y Magallanes las poblaciones braquípteras son frecuentes en ambientes de bosque degradado a estepa y comparten latitud con poblaciones de fenotipo macróptero, las que se ubican en ambiente de bosques. No se han identificado poblaciones de fenotipo mixto en esta región geográfica.

### **Morfometría del Polimorfismo de *L. jaffueli*:**

La distribución de cinco variables semeja una curva gausiana sin ser normal, Lant se muestra irregular y LAA presenta dos modas. La distribución de la razón LAA/AC se muestra bimodal (Fig. 3.4), lo que separa con precisión a los calificados como voladores de los no voladores.

Los análisis de componentes principales muestran que los dos primeros componentes explicaron el 65,5% de la varianza. El primer componente principal explica el 42,53% de la varianza, donde las siete variables se relacionan positivamente, siendo las de mayor importancia: LT, LAA, Lant y Lfp. El segundo componente principal explica el 22,97% de la varianza, se relaciona positivamente con AC y AT, siendo estas mismas variables las de mayor importancia.

La distribución de los individuos en el espacio multivariado, no muestra la formación de grupos discretos. Cuando se observa la distribución de los individuos de fenotipo braquíptero respecto de los de fenotipo macróptero (Fig. 3.5), se observa una tendencia a ordenarse, donde una mayor densidad de braquípteros se ubica en el extremo menor del CP1 y todo el rango del CP2, con mayor densidad en su extremo positivo, la nube de puntos adquiere una forma de "media luna"; los individuos de fenotipo macróptero se agrupan en el centro del campo y hacia el extremo mayor del CP1. Cuando se observa la distribución de los sexos, ambos se presentan en todo el espacio, pero la mayor parte de los machos en ambos fenotipos, se agrupan en el extremo negativo de CP2 y menor de CP1, en oposición a las hembras.

Al considerar la distribución geográfica, los individuos tienden a agruparse en el espacio multivariado según su localidad de origen, pero muestran una alta superposición, sin ordenarse de acuerdo a un clino latitudinal. En la figura 3.6 los individuos han sido

coloreados según su procedencia y las localidades fueron numeradas latitudinalmente. En la nube de puntos se observa la formación de dos grupos continuos a ambos lados de una "diagonal ascendente". El grupo superior reúne a las poblaciones australes desde la cuenca del Río Aysén, hasta la cuenca del Azopardo en Tierra del Fuego (13-18), donde la más diferenciada corresponde a Dos Lagunas. En el grupo inferior se reúnen las restantes poblaciones (1-12), e incluye la localidad tipo de *L. jaffueli* (Marga-marga) situada en una posición central en la nube de puntos.

El análisis discriminante aplicado a estos dos grupos resulta en una única función discriminante, la que clasifica los sujetos en dos grupos de forma significativa (eigenvalue 3,401, sig. 0.000). La ecuación discriminante incluyó cinco variables y excluyó a LFP y AT ( $D1 = -1.182 + 0.149LT + 1.209Lant + 0.061Lc + 0.185LAA - 7.810AC$ ). Finalmente el 98,2% de los individuos fueron clasificados en sus grupos de origen y solo 2,8 % (8 individuos del grupo 1 fueron clasificados en el grupo 2).

### DISCUSIÓN:

En cuanto a la distribución de *L. jaffueli*, es posible afirmar que se encuentra en gran parte de las cuencas de la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes desde los 30° de latitud Sur hasta los 54° en Tierra del Fuego. Sin embargo, identificamos disyunción en las cuencas costeras, en torno a Campos de hielo sur, y en las zonas de estepa patagónica en el continente y Tierra del Fuego, además de la ausencia de registros en los archipiélagos. Es posible que esta falta de datos se deba a un sesgo de muestreo, ya que la continuidad de esta especie capaz de explotar diversos hábitat no parece cuestionarse, pese a ello las cuencas hidrográficas de Chile central y sur se ven intervenidas por la acción antropogénica en la

cordillera con la minería, en el valle central por la agricultura y el urbanismo, y especialmente en la costa desde el Maule a Los Lagos por la explotación forestal. Para *L. jaffueli* se han reportado ninfas e imagos consumiendo una variada dieta, que muestra en lugares de explotación forestal el consumo abundante de polen de pino y aromo (Tierno de Figueroa *et al.* 2006), lo que hace esperable su presencia en otros lugares también intervenidos. En este escenario, los nuevos registros han incrementado la distribución de los fenotipos no voladores, tanto en número de localidades como en extensión geográfica. De este modo, este fenotipo continúa siendo poco abundante pero más frecuente que lo reportado con anterioridad (Illies 1963). El braquipterismo se presenta en gran parte del rango latitudinal de la especie, y no se concentra únicamente en las regiones australes. Además los registros de braquipterismo muestran una transferencia desde una posición costera en el Centro-Sur de Chile a una posición más continental en la región Austral. En las regiones de Aysén y Magallanes se encuentran poblaciones de fenotipo único, ya sean braquípteras o macrópteras, pero no hay registro de poblaciones de fenotipo mixto, mientras que desde Valdivia al norte se presentan poblaciones de fenotipo mixto, las que son reportadas en este estudio por primera vez y se encuentran principalmente en localidades costeras.

De las siete variables morfométricas estudiadas en *L. jaffueli*, solo la longitud de alas muestra una distribución bimodal. Cuando se le ajusta con el ancho de la cabeza, en la razón LAA/AC, resulta en un aumento de la discriminación de ambos fenotipos (Fig. 3.4). Otras variables como el largo corporal, de las antenas y de los cercos estarían influenciado por la dieta, el sexo y desarrollo del individuo, como se indica en estudios de ciclo de vida, donde estas variables frecuentemente son malos indicadores de la talla relativa de un individuo y se prefiere utilizar el ancho de la cabeza para inferirla (Zwick 2003). La

distribución de las variables de longitud alar, antenas y cercos no se asemejan entre sí, de modo que la sugerencia de Illies (1963) donde discrimina ambos fenotipos con estas tres variables no ha sido respaldada.

El PCA de las siete variables ordena a los individuos en voladores y no voladores aún cuando muestran algo de superposición.

En el espacio multivariado se reconocen dos regiones, que agrupan por una parte a las poblaciones de distribución Centro-Sur a norte de los 45°S y por otra a las de distribución Austral. En la región Centro-Sur el fenotipo braquíptero se concentra en el extremo de individuos más pequeños (<CP1) y los macrópteros ocupan el lugar de tamaños medianos a grandes (>CP1 y <CP2). En la Región Austral, todos los individuos tienden a ser más bien robustos (>CP2), y el fenotipo braquíptero ocupa gran parte del rango de tamaños.

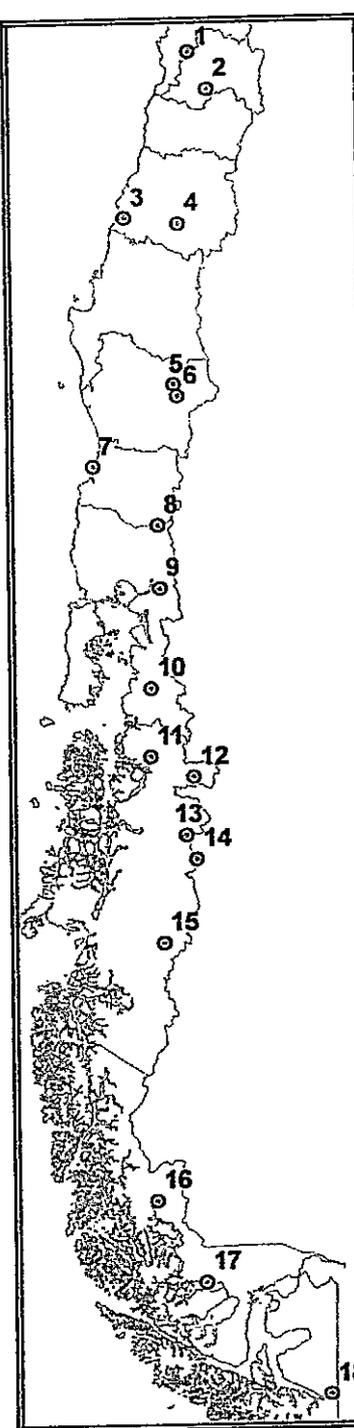
Se observa que el sexo influye como era esperado, para cada grupo y población, donde las hembras ocupan los lugares de mayor talla.

La influencia de la latitud sobre las variables morfométricas estudiadas no fue claro, observándose un aumento de la variabilidad de CP1 y CP2 conforme disminuye la latitud. Posiblemente la segregación de ambos fenotipos y su amplia distribución impide el reconocimiento de un clino latitudinal.

Finalmente la distribución de los dos fenotipos no parece tener una explicación simple y se deben explorar tanto causas históricas como ecológicas.

**AGRADECIMIENTOS:**

A todos quienes me han facilitado especímenes y datos de distribución, Marcelo Guerrero, Juan Enrique Barriga, Elisabeth Arias (NSF DEB 04454413 to Et Arias &K.W. Will), Sergio Rothmann. A Carolina Gallardo por su ayuda en los datos georeferenciados. A Ariel Camousseigh, Mario Elgueta y Patricia Estrada, por facilitar el acceso a colecciones del MNHN y UMCE respectivamente. A Susana Toledo por su asistencia en el trabajo de campo. A los proyectos que han financiado las actividades realizadas en este estudio: MECESUP UMC-0204, CONICYT AT-23070183.

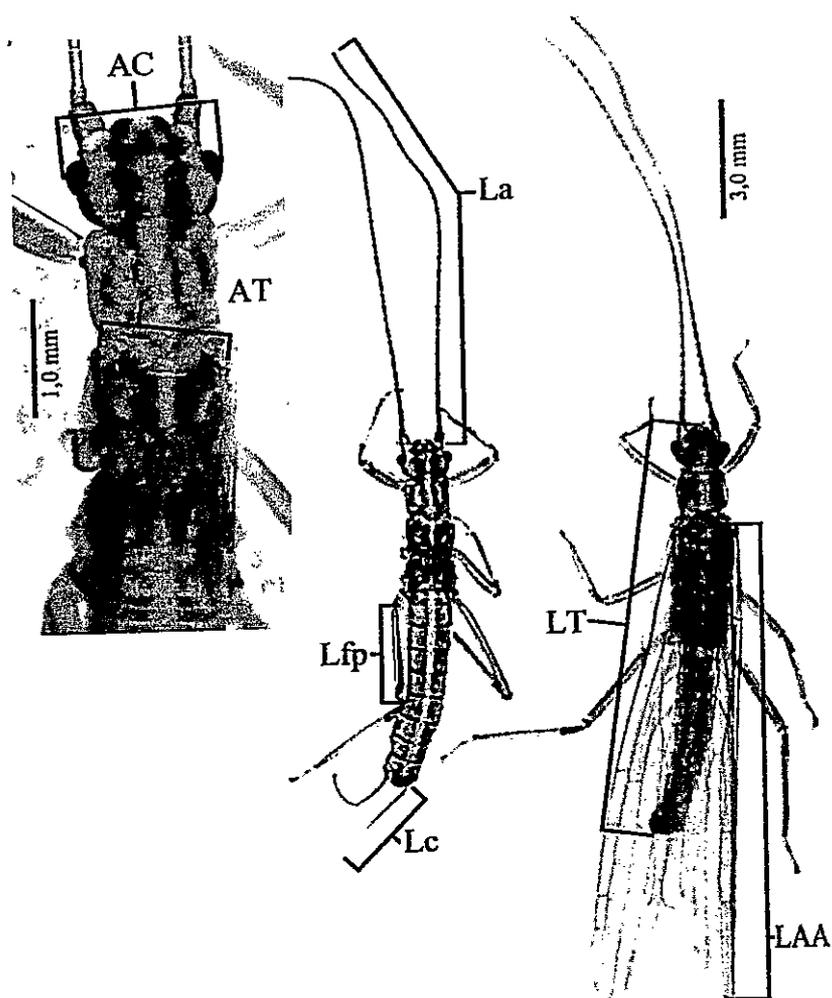


Especímenes y localidades estudiadas en el análisis morfométrico. Se indican las subcuencas y las coordenadas en grados y UTM.

localidad	N	Subcuencas	Coordenadas		UTM	Zona 19
			Grados			
1 Valparaíso, Petorca, Coihuzú	30	Est. Marga Marga	71°11'27,94" 33°16'1,48"	W S	295916,03 6316962,98	X Y
2 Santiago, Maipo, L. Aculeo	62	Est. Ahue	70°52'45,73" 33°51'28,52"	W S	326143,97 6252008,23	X Y
3 Maule, Cauquenes, R. Curanilahue	39	R. Curanilahue	72°50'32,47" 35°50'1,48"	W S	183015,12 6028804,68	X Y
4 Maule, Linares	3	R. Loncomilla	71°29'47,9" 35°57'14,4"	W S	274830,95 6018272,17	X Y
5 Araucanía, Cautín, Manzanar	20	Cautín Alto (hasta antes junta R. Quepe)	71°42'31,16" 38°27'37,84"	W S	263661,98 5739612,25	X Y
6 Araucanía, Cautín, Conguillío	30	Cautín Alto (hasta antes junta R. Quepe)	71°38'47,87" 38°38'46,95"	W S	269669,04 5719140,81	X Y
7 Los Ríos, Valdivia, Bonifacio	6	Costeras entre R. Lingue y R. Valdivia	73°23'4,66" 39°41'38,52"	W S	123996,22 5597002,48	X Y
8 Los Lagos, Osorno, Anticura	38	R. Píaiquen	72°08'45,64" 40°39'43,7"	W S	234048,81 5493987,44	X Y
9 Los Lagos, Llanquihue, L. Tagua	30	Costeras entre R. Petrohue y R. Puelo	72°10'5,89" 41°38'52,44"	W S	236151,27 5384465,27	X Y
10 Los Lagos, Palena, L. Yelcho	9	R. Yelcho	72°27'8,36" 43°12'18,66"	W S	219534,19 5210611,17	X Y
11 Aisén, Aisén, L. Risopatrón	8	Costeras entre Seno Ventisquero y R. Cisnes	72°31'45,42" 44°16'24,57"	W S	218341,12 5091690,71	X Y
12 Aisén, Coihaique, La Tapera, R. Cisnes	8	R. Cisnes	71°58'5,52" 44°37'37,83"	W S	290988,81 5055087,08	X Y
13 Aisén, Coihaique, Balmaceda, R. Huemules	37	R. Simpson	71°50'54,81" 45°31'47,06"	W S	277570,02 4954252,23	X Y
14 Aisén, Coihaique, Dos Lagunas	38	R. Simpson	71°38'46,34" 45°54'48,86"	W S	294781,62 4912149,99	X Y
15 Aisén, Capitán Prat, L. Cochrane	1	R. Baker entre Desagüe L. J. M. Carrera y R. de La Colonia	72°27'45,89" 47°11'57,98"	W S	237735,97 4766854,31	X Y
16 Magallanes, Última Esperanza, R. Serrano	13	Costeras entre Fiordo Caho y Fiordo Peel	72°59'22,38" 51°13'35,18"	W S	221468,18 4317428,1	X Y
17 Magallanes, Magallanes, Seno Skyring	43	Costeras Continentales del Seno Skyring	71°53'58,1" 52°32'43,33"	W S	303399,4 4174351,02	X Y
18 Magallanes, Tierra del Fuego, L. Deseado	26	Costeras entre R. Azopardo y Seno Serrano	68°45'46,38" 54°22'12,02"	W S	515404,72 3975284,17	X Y

Figura 3.1. Mapa de Chile con los puntos de distribución de las poblaciones incluidas en el estudio morfométrico.

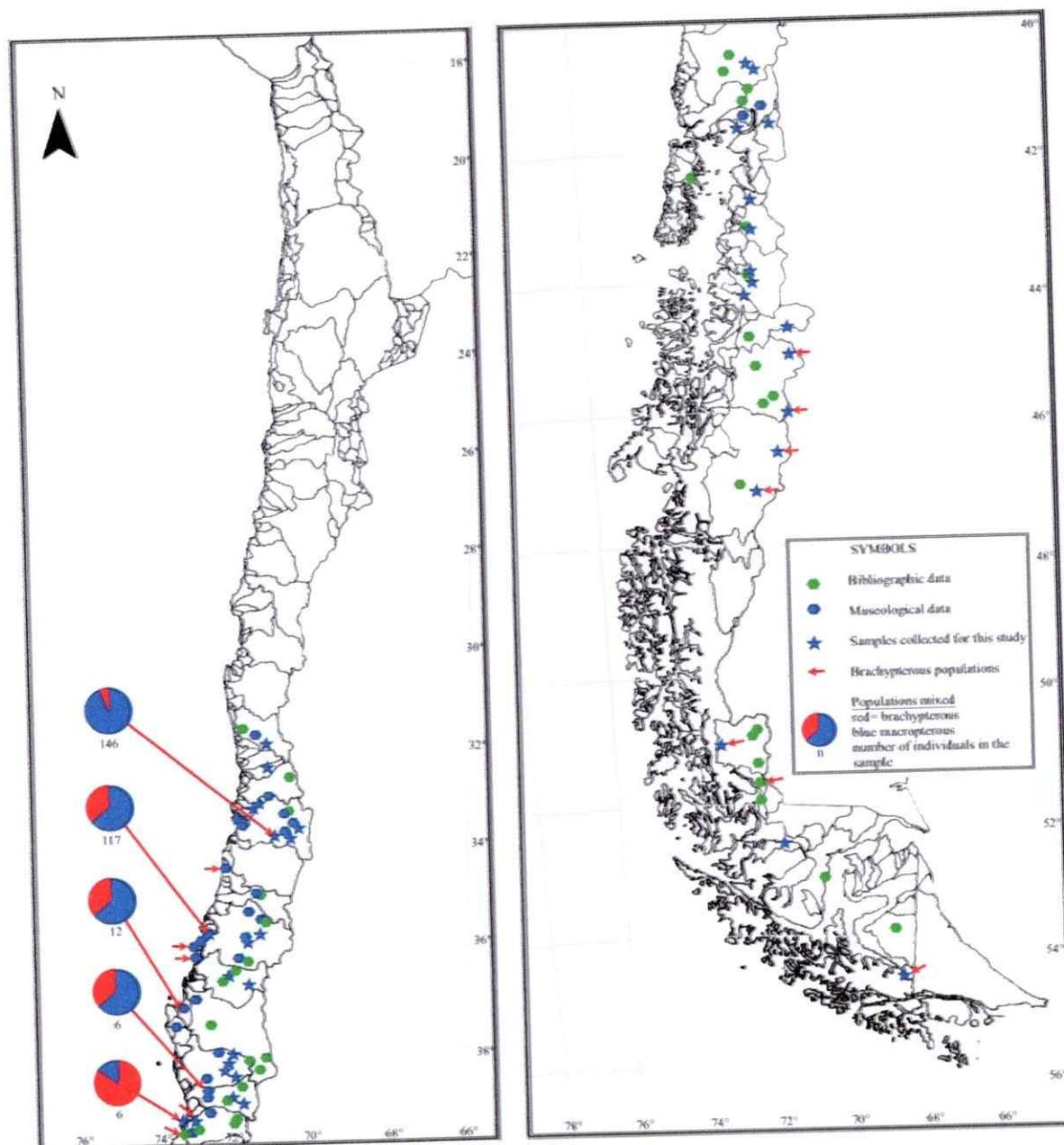
Tabla 3.I. Número de especímenes medidos para cada población incluida en el estudio morfométrico, se indica la subcuena y las georeferencias de procedencia.



**Figura 3.2.** Imagos ♀ de *L. jaffueli* en vista dorsal, con las mediciones lineales trazadas (ver texto para simbología). De izquierda a derecha: cabeza y tórax de fenotipo braquíptero, vista general del fenotipo braquíptero, vista general del fenotipo macróptero.

**Tabla 3.II.** Localidades que presentaron individuos de fenotipo braquíptero. Se indican las georeferencias, la procedencia de las muestras examinadas (museológicas: MNHN, UMCE y de colectas tomadas para este estudio: aquí), el fenotipo (macrópteros: Macro, braquípteros: Braq) y sexo (machos M, hembras F) de los individuos presentes en la muestra.

Localidad	Coordenadas		Altitud mt.	Procedencia	Macro		Braq	
	S	W			M	F	M	F
XIII Región, Santiago, Laguna Aculeo	33°51'28,52"	70°52'45,73"	379	aquí	86	55	3	2
VI Región, Colchagua, Pichilemu	34°23'11.39"	71°59'14.12"	30	UMCE				1
VII Región, Río Curanilahue (R.N. Los Ruiles)	35°50'01,48"	72°30'32,47"	214	aquí	25	42	31	19
VII Región, Cauquenes, Canellillos	35°54'41.08"	72°41'04.52"	37	UMCE+MNHN	3	4	5	5
VII Región, Cauquenes Trehualemu	35°57'25.48"	72°44'52.93"	14	UMCE				1
XI Región Cautín Los Ñirres, Pitrufquén	38°59'07.00"	72°38'13.47"	93	UMCE	1	3		2
VII Región Concepción Colico Norte	37°23'32.47"	73°19'57.73"	127	UMCE+MNHN	1	4		2
VIII Región, Arauco San José de Colico	37°21'41.17"	73°20'23.26"	112	UMCE	3	1		1
XIV Región, Valdivia, Bonifacio	39°41'38,52"	73°23'4,66"	75	aquí	1	1	1	3
XIV Región, Valdivia, Oncol	39°45'32.28"	73°20'13.52"	378	aquí				1
XI Región, Aysén, M.N. Dos Lagunas	45°54'48,86"	71°38'46,34"	680	aquí			22	47
XI Región, R.N. Lago Jeinimeni	46°50'10.61"	72°00'01.30"	855	aquí				1
XI Región, R.N. Tamango, lago Cochrane	47°11'57,98"	72°27'45,89"	182	aquí				1
XII Región, P.N. Torres del Paine, Río Serrano	51°13'35.18"	72°59'22.38"	20	aquí			5	7
XII Región, Tierra del Fuego, Lago Deseado	54°22'12.02"	68°45'46.38"	174	aquí			9	16



**Figura 3.3.** Distribución de *L. jaffueli*, sobre un mapa de cuencas hidrográficas de Chile (modificado de Niemeyer y Cereceda 1984). Se indican los puntos tomados de la literatura, desde colecciones y las muestras tomadas en este estudio; las poblaciones solo con individuos de fenotipo braquíptero, con flechas rojas; las poblaciones mixtas, con un grafico de torta que muestra la proporción de individuos con fenotipo braquíptero en rojo, macroptero en azul y en número de individuos de la muestra.

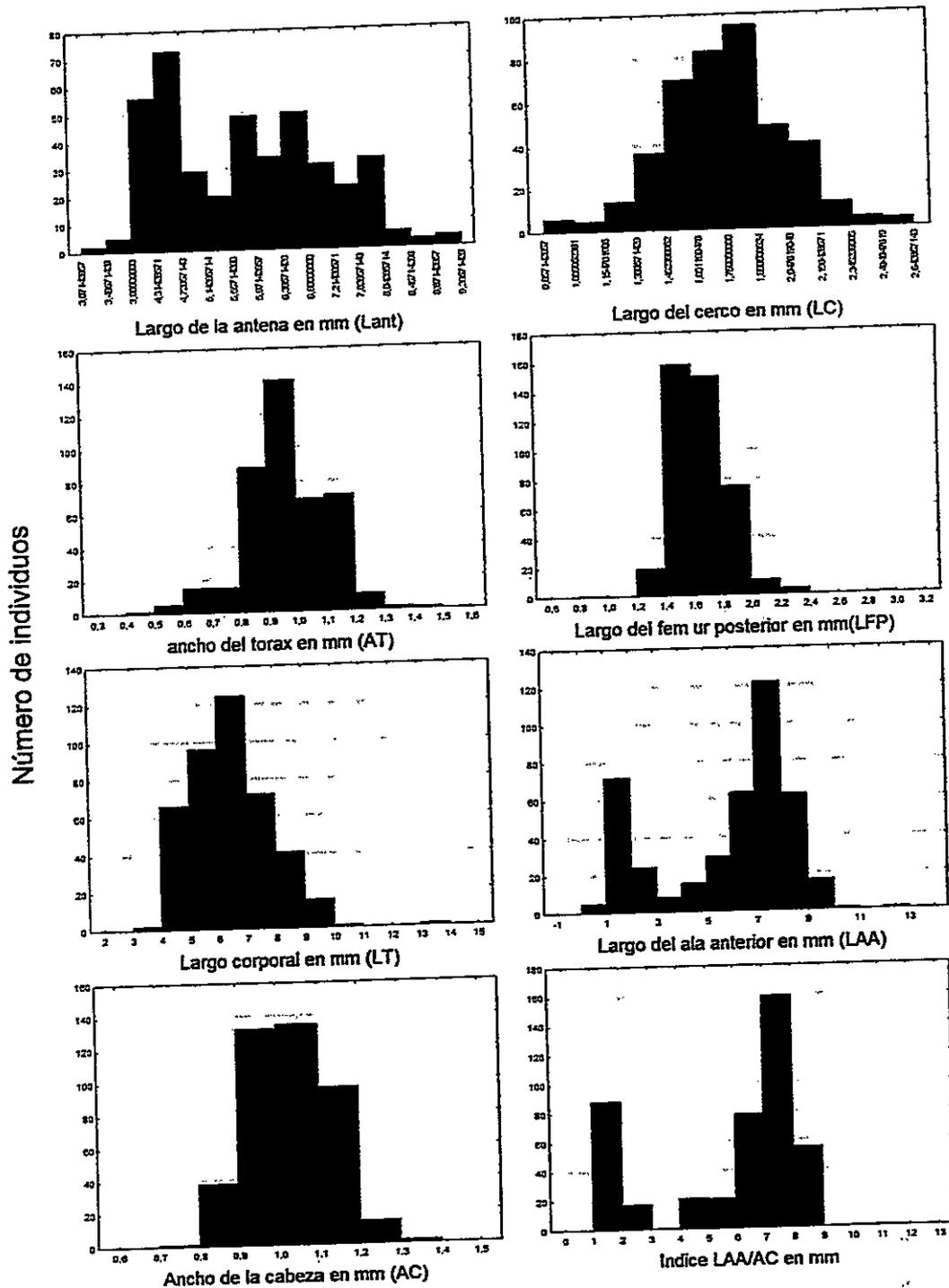
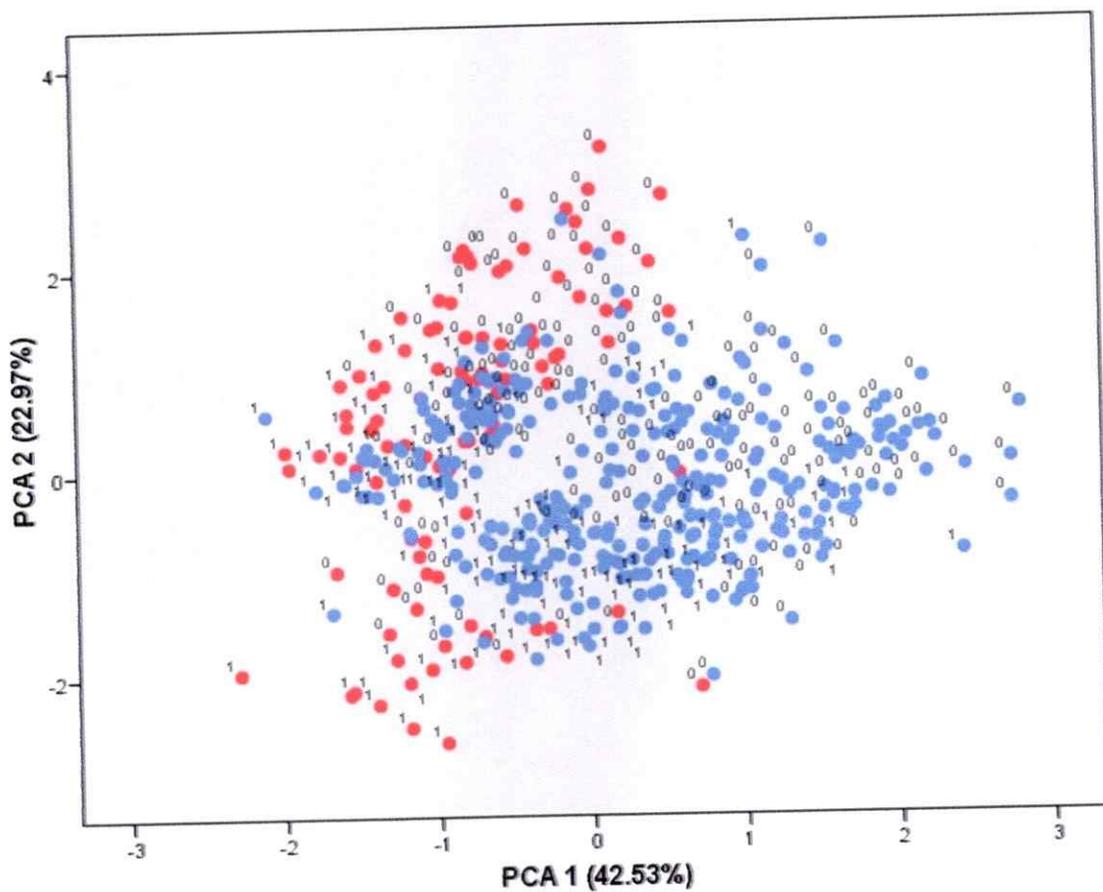
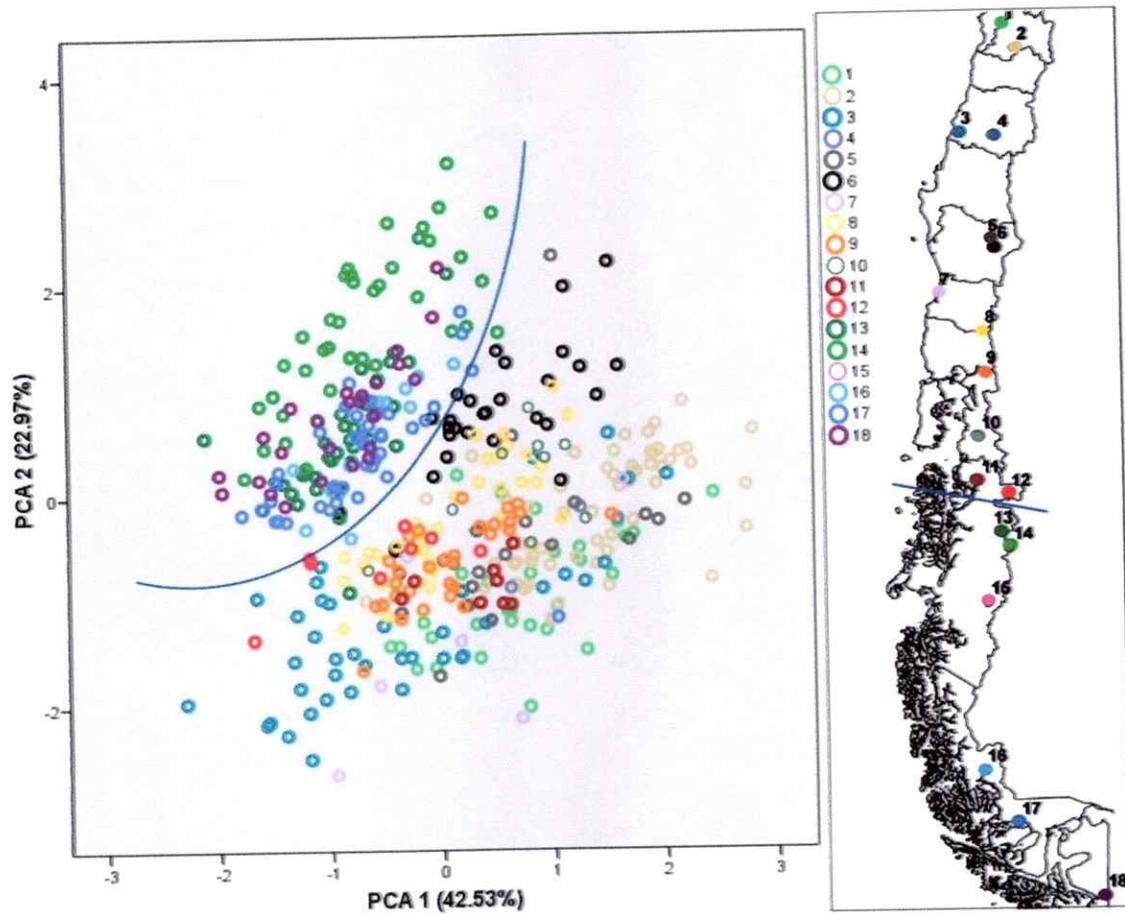


Figura 3.4. Distribuciones de las frecuencias para las siete variables morfométricas consideradas en *L. jaffueli*, han sido estimadas sobre 441 individuos provenientes de 18 poblaciones de El cuadro del extremo inferior derecho muestra la razón largo del ala anterior sobre el ancho de la cabeza (LAA/AC).



**Figura 3.5.** Resultados del análisis de componentes principales para las variables morfométricas estudiadas. Se muestra la condición macroptera en azul, braquiíptera en rojo y los sexos con etiquetas ♂=1, ♀=2.



**Figura 3.6.** Distribución de las 18 poblaciones analizadas en el espacio multivariado del PCA, la línea azul traza los límites entre las poblaciones 1-12 y 13-18.

**BIBLIOGRAFÍA:**

- Anderson, N.M. 1997. Phylogenetic test of evolutionary scenarios: the evolution of flightlessness and polymorphism in insects. *Mémoires du Muséum National d'Histoire Naturelle*. 173. the Origin of Biodiversity in Insects: Phylogenetic Tests of Evolutionary Scenarios (ed. By P. Grandcolas), 91-108.
- Benedetto, L.A. 1974. Clave para la determinación de los plecópteros sudamericanos. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 9:141-170
- Camousseight, A. 1995. Plecoptera. En: J. A. Simonetti *et al.* (Eds.) *Diversidad Biológica de Chile*. CONICYT pp. 218-223.
- Cekalovic, T. 1976. Catálogo de los plecópteros de Chile. *Boletín del la Sociedad de Biología de Concepción* L:145-156.
- Crnokrak, P & D.A. Roff. 2002. Trade-offs to flight capability in *Gryllus firmus*: the influence of whole-organism respiration rate on fitness. *J. Evol. Biology* 15:388-398.
- Darwin, C. 1872. *The Origin of Species*, 6<sup>th</sup> edn. Reprinted By Cromwell-Collier Publ. Co. 1962. New York, The Macmillan Co.:1-512.
- Denno, R.F. 2001. Reduced flight capability in British virgin Island populations of a wing-dimorphic insect: the role of habitat isolation, persistence, and structure. *Ecological Entomology* 26(1):25-36.
- Froehlich, C. 1960. Some Gripopterygids and Notonemourines (Plecoptera) from South America. *Lunds Universitets Arsskrift* 56(13):1-23.
- Froehlich, C. 2010. Cataloge of Neotropical Plecoptera. *Illiesia* 6(12):118-205.

- Illies, J. 1963. Revision der südamerikanischen Gripopterygidae (Plecoptera. Mitteilungen der Schweizerischen Entomologischen Gesellschaft 36: 145-248.
- Johnson, C.G. 1969. Migration and dispersal of insects by flight. London, Methuen: 1-763.
- McLellan, I.D. & P. Zwick. 2007. New species of and keys to South American Gripopterygidae (Plecoptera). *Illiesia* 3(4):20-42.
- Miserendino, M.L. & L. A. Pizzolon. 2003. Distribution of macroinvertebrate assemblages in the Azul-Quemquemtreu river basin, Patagonia, Argentina. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 37(3):525-539
- Navás, L. 1930. Algunos insectos de Chile 4° Serie. *Revista Chilena de Historia Natural* 34:350-366.
- Navás, L. 1933. Algunos insectos de Chile 4° Serie. *Revista Chilena de Historia Natural* 37:230-234.
- Niemeyer, H. & P. Cereceda. 1984. Geografía de Chile – Hidrografía. Instituto Geográfico Militar Ed. tomo VIII, 320 pp. Santiago de Chile.
- Oyanedel A., C. Valdovinos, M. Azócar, C. Moya, G. Mancilla, P. Pedreros & R. Figueroa. 2008. Patrones de distribución espacial de los macroinvertebrados bentónicos de la cuenca del río Aysén (Patagonia chilena). *Gayana* 72: 105-121.
- Palma, A. & R. Figueroa. 2008. Latitudinal diversity of Plecoptera (Insecta) on local and global scales. *Illiesia* 4(8):81-90.
- Pessacq, P. & M.L. Miserendino. 2008. Ephemeroptera and Plecoptera biodiversity in central Patagonia, Chubut province, Argentina. *Zootaxa* 1817:27-38.

- Roff, D. A. 2001. The threshold model as a general purpose normalizing transformation. *Heredity* 86: 404-411.
- Roff, D.A. 1994. The evolution of dimorphic traits: effect of directional selection on heritability. *Heredity* 72: 36-41
- Southwood, T.R.E. 1962. Migration of terrestrial arthropods in relation to habitat. *Biological Reviews* 37:171-214.
- Stark, B.P., C. Froehlich & M.C. Zúñiga. 2009. South American Stoneflies (Plecoptera). *Aquatic Biodiversity in Latin America, Volume 5*. Pensoft. Sofia-Moscow.
- Tierno de Figueroa, J.M., A. Vera & M.J. Lopez-Rodriguez. 2006. Adult and nymphal feeding of *Antarctoperla michaelsoni* (Klapálek, 1904) and *Limnoperla jaffueli* (Navás, 1928) (Plecoptera, Gripopterygidae) from Central Chile. *Entomologia generalis*. 29(1):39-45.
- Valdovinos, C., A. Kiessling, M. Mardones, C. Moya, A. Oyanedel, J. Salvo, V. Olmos & O. Parra. 2010. Distribución de macroinvertebrados (Plecoptera y Aeglidae) en ecosistemas fluviales de la Patagonia chilena: ¿muestran señales biológicas de la evolución geomorfológica postglacial? *Revista Chilena de Historia Natural* 83: 267-287
- Vera, A. & A. Camousseight. 2006. Estado de conocimiento de los Plecópteros de Chile. *Gayana* 70(1):57-64.
- Vera, A. 2005. Los estados ninfales de *Limnoperla* Illies 1963 y *Rhithroperla* Illies 1963 (Plecoptera: Gripopterygidae, Gripopteryginae). *Revista Chilena de Entomología* 31: 5-12.
- Vera, A. 2006. Una nueva especie de Teutoptera Illies, 1963 para Chile: *Teutoptera maulina* n. sp. (Plecoptera, Gripopterygidae), con comentarios sobre su biología. *Acta Entomológica Chilena* 30(1):29-38.

Vera, A. 2008. Orden Plecoptera. En: Biodiversidad de Chile, Patrimonio y Desafíos. P. Saball, M. T. K. Arroyo, J.C. Castilla, C. Estades, S. Larrafn, C. Moreno, L. Sierralta, J. Rovira, J.M. Ladrón de Guevara & F. Rivas (Eds). CONAMA. CHILE. 3ª edición. Pp:137-140.

Zwick, P. 1973. Insecta: Plecoptera. Phylogenetisches System und Katalog. Das Tierreich 94. Walter de Gruyter, Berlin.

Zwick, P. 2003. Shapes and patterns of wingpad development in the Plecoptera. In Research Update on Ephemeroptera & Plecoptera, E. Gaino (Ed.) University of Perugia, Perugia, Italy.

## CAPITULO IV

FILOGEOGRAFÍA DE *L. JAFFUELI* (PLECOPTERA: GRIPOPTERYGIDAE) Y SU  
RELACIÓN CON EL POLIMORFISMO ALAR.

## RESUMEN

Con el objetivo de inferir la historia de recolonización postglacial de *L. jaffueli* y examinar la relación que este proceso puede presentar con su polimorfismo alar, se realizó un estudio filogeográfico utilizando 540 pb del gen mitocondrial *ND2* para 20 localidades, las cuales representan todo su rango de distribución latitudinal. Los resultados muestran una historia compleja donde se identifican 37 haplotipos distribuidos en 3 haplogrupos ampliamente diferenciados: uno en el extremo norte de su distribución y con fenotipo macróptero, mientras que el segundo proviene de la costa maulina y reúne a la porción braquíptera de una población mixta. Finalmente el tercer y mayor de los grupos cubre todo el rango de distribución e incluye 18 poblaciones de la muestra y ambos fenotipos. Este tercer grupo muestra una estructura tipo estrella para las poblaciones al norte de Chiloé, con los elementos australes distantes y de haplotipos exclusivos. El grupo no muestra una disminución de la variabilidad genética de norte a sur como habría sido esperado en una expansión post glacial unidireccional, sino que muestran varios centros de diversidad genética derivados desde zonas de refugio. Al menos cuatro conjuntos diferentes de haplotipos ocupan la distribución al sur de Chiloé sobre la zona afectada por el último máximo glacial, de ellos solo en uno se concentra el fenotipo no volador, junto a poblaciones solo de fenotipo volador, esto implica que la distribución exclusiva del fenotipo no volador no habría sido influida por la historia glacial reciente.

## INTRODUCCIÓN

En el estudio de los procesos microevolutivos, el análisis filogeográfico tiene como una meta central el determinar aquellos procesos que dan cuenta de la diversidad genética en las poblaciones de una especie (Avice 2000). Habitualmente los procesos que afectan la dimensión espacial de la distribución de las especies son determinantes en el establecimiento del flujo génico y con ello la estructuración genética (Zera *et al* 1997; Roderick 1996). Chile presenta una biodiversidad sometida a una serie de procesos geológicos de larga y reciente data, que la transforma en un modelo ideal para estudiar el efecto de estos procesos sobre la diversidad genética y fenotípica.

Durante el Mioceno medio a superior (14 a 12 Ma cal a.p.) con la formación del Estrecho de Drake, América del Sur se desprende definitivamente del supercontinente gondwana, lo que permite la evolución de su biota en aislamiento. Durante el Plioceno (5,1 a 1.63 Ma al a.p.) se produce el mayor levantamiento de la cordillera de Los Andes y se establece el desierto de Atacama, dando origen a la actual diagonal árida sudamericana lo que margina la biota austral de otros procesos de la biota neotropical (Hinojosa y Villagrán 1997). Durante el Pleistoceno cinco períodos glaciales han afectado el extremo austral de América del Sur, dejando restringida a la mayor parte de la biota de Chile a relictos costeros (Villagrán 1994), desde donde habría recolonizado los espacios dejados por los hielos durante los interglaciares. El último máximo glacial LMG (Glaciación Llanquihue), ocurrió entre 24.000 a 17.700 años cal a.p. y cubrió de hielo Los Andes entre los 28° y los 42° S aproximadamente, a partir de los 42°30' a 55° S se extendió hacia el Pacífico en un continuo campo de hielo (Heusser 2003), este escenario fue seguido de un acelerado

proceso de deglaciación hace 15 a 16.000 años cal a.p., logrando un estado final de deglaciación hace 12.800 años cal a.p. atrás con la fragmentación de los campos de hielo norte y sur, dando origen al río Baker que drena hacia el Pacífico (Turner *et al.* 2005). En la actualidad existe una abundante biodiversidad en las regiones antes cubiertas por el hielo durante las glaciaciones, gran parte de ella es monotemática y se relaciona con especies distribuidas al norte u este de lo que fueron los campos de hielo Pleistocénicos, parte de esta biodiversidad es exclusiva del extremo Austral. Estudios biogeográficos y filogeográficos han permitido identificar un origen múltiple de la diversidad genética, lo que ha llevado a la identificación de relictos pleistocénicos en regiones australes del continente ubicadas colindantes a lo que fueron los campos de hielo o en fragmentos de territorios protegidos de las glaciaciones (Plantas vasculares de tierra del fuego, Posadas 1996; en Patagonia continental, Cosacov *et al.* 2010; en peces dulceacuícolas, Zemlak *et al.* 2008; Burrige *et al.* 2006). Para las poblaciones sometidas a las interrupciones glaciales el aislamiento pudo favorecer procesos de selección natural o deriva génica conducentes a especiación por vicarianza, grandes divergencias genéticas intraespecíficas o la fijación de fenotipos particulares.

Los procesos de recolonización, están determinados por la vagilidad de las especies y por los requerimientos ecológicos de cada taxa (Zera 1997). Para los insectos de desarrollo acuático los procesos de dispersión más importantes suelen ser la deriva y captación fluvial permitiéndoles ocupar gran parte de las cuencas hidrográficas, la dispersión entre cuencas ocurre principalmente mediada por el vuelo (Bilton 2001). La recolonización post glacial es entonces dependiente de estas capacidades intrínsecas, esperándose una estructuración genética asociada a la hidrografía (Heilveil & Berlocher 2006; Schultheis *et al.* 2002). En

las especies en donde existe pérdida total del vuelo o polimorfismo en el desarrollo de las alas o de la musculatura asociada, es esperable una estructuración aún más evidente y en el caso de la recolonización post glacial la diversidad debiera de encontrarse jerarquizada hacia el frente de migración.

Los Plecóptera son insectos de desarrollo acuático con imagos voladores, los que habitualmente son considerados malos voladores, presentan especies montañas que se desarrollan en aguas frías, y frecuentemente en aguas de deshielo glacial (Illies 1969), convirtiéndose en modelos ideales de estudio en los procesos de recolonización post glacial. Sin embargo son escasas las aproximaciones filogeográficas donde se les ha incluido (McCulloch *et al.* 2010).

Dentro de la familia Gripopterygidae existen varias especies altoandinas y australes que han perdido la capacidad de volar y que explotan hábitat periglaciales. Esta condición es poco frecuente dentro del orden Plecoptera (Fochetti & Tierno de Figueroa 2008). En algunas regiones geográficas como en Nueva Zelanda, la pérdida del vuelo para varias familias de Plecoptera es la condición más frecuente y la convergencia de este rasgo se ha atribuido a particulares procesos de disminución de área habitable combinada con aislamiento durante las glaciaciones pleistocénicas (McLellan 2006; Mynott *et al.* 2011). En América del Sur es una condición escasa pero cuando se presenta se ha reportado en distribuciones australes o altoandinas (Vera & Camousseigh 2006; Vera, 2011). Para estas taxa se ha planteado que la pérdida de las alas es una adaptación a las condiciones extremas de viento y pluviosidad que allí se presentan (Illies, 1964). Los procesos de aislamiento en estas especies puede ser tratadas como causal de la pérdida del vuelo (Darwin 1859) o como una preadaptación que

ha permitido la subsistencia en estos ambientes, dejando su huella en la posterior recolonización como poblaciones relictas (McCulloch *et al.* 2010).

Los estudios en Gripopterygidae neozelandeses (McCulloch *et al.* 2010, Mynott *et al.* 2011) incluyen especies de diferentes géneros y fenotipos alares, señalan que las especies con vuelo suprimido presentan poblaciones relictas y están más estructuradas que las voladoras, pero que en algunos casos, las especies voladoras podrían haber perdido la capacidad de volar antes de perder sus alas, de modo que se muestren tan estructuras como las no voladoras. Estos estudios filogeográficos incluyen especies representadas por poblaciones únicas o escasas y que no presentan polimorfismo intraespecífico en el desarrollo de las alas y por consiguiente del vuelo, por tanto aún queda inconcluso el efecto del polimorfismo sobre la interpretación que se hace a partir de la diversidad genética.

*Limnoperla jafuelli* (Navás 1930), es una especie de Gripopterygidae que cumple con una serie de atributos que permiten evaluar la relación entre la pérdida del vuelo y su efecto sobre la recolonización post-glacial. 1°.- Se distribuye en Chile desde los 30°S hasta Tierra del Fuego (Vera & Camousseigh 2006), desde la costa Pacífica hasta la cordillera de Los Andes, actualmente ocupa toda la extensión que fue afectada por el último máximo glacial incluida Tierra del Fuego (Fig. 4.1). 2°.- Presenta dos fenotipos en cuanto al desarrollo del vuelo, los braquípteros imposibilitados de volar en ambos sexos y los macrópteros. 3°.- Las poblaciones macrópteras son las más abundantes y ampliamente distribuidas, mientras que las poblaciones de fenotipo braquíptero están restringidas al extremo austral de Sudamérica. Existen además poblaciones de fenotipo mixto, sin estados de transición entre macrópteros y braquípteros, las que se distribuyen fundamentalmente en la zona costera entre los 35°S a

39°S (Vera & Méndez en preparación) (Fig. 4.1). Adicionalmente existen registros museológicos de individuos braquípteros en varios sectores de este intervalo costero, los que probablemente constituyen parte de poblaciones de fenotipo mixto inadecuadamente muestreadas.

De acuerdo a la vagilidad de las especies los procesos de glaciación y deglaciación afectan diferencialmente su dispersión y recolonización (Valdovinos *et al.* 2010). Es así como para especies dulceacuícolas como *Galaxias* y *Aegla* restringidas al medio acuático, el repoblamiento de las regiones de Aysén y Magallanes ocurrió a partir de refugios al este de Patagonia conjuntamente con el cambio de drenaje de los ríos al pacífico tras la fragmentación de Campos de hielo pleistocénicos (Zemlak *et al.* 2008, Perez-Losada *et al.* 2011). Y no como una dispersión desde poblaciones del norte. Sin embargo para los insectos voladores, esto sí es posible como ha ocurrido para *Nigronia* y *Chorthippus* en el hemisferio norte (Heilveil & Berlocher 2006, Hewitt, 2000), quienes han ocupando las cuencas con forme retroceden los hielos pleistocénicos de sur a norte. En América del Sur no han datos de este tipo para insectos voladores, lo que permite plantearnos un interesante escenario para *Limnoperla*. Siendo esta especie polimórfica en el desarrollo de alas podrían las poblaciones de fenotipo volador dispersarse de norte a sur siguiendo la deglaciación de los campos de hielo mientras que las poblaciones de fenotipo no volador lo realizarían de este a oeste como otros organismos de vagilidad reducida. Esto dado que las poblaciones de *Limnoperla* que ocupan las regiones antes cubiertas por campos de hielo solo se manifiestan monomórficamente ya sea como voladoras o como no voladoras, aún cuando estén a la misma latitud en Aisén y Magallanes.

El objetivo del estudio filogeográfico de *L. jaffueli*, es evaluar la hipótesis de que en Patagonia las poblaciones no voladoras representan relictos pleistocénicos que han

dispersado escasamente, mientras que las poblaciones voladoras debieran mostrar la expansión post-glacial esperada de norte a sur, en este escenario las poblaciones de fenotipo mixto distribuidas en la costa de Chile central y fuera de las áreas afectadas por las glaciaciones debieran representar las poblaciones más ancestrales que han sido influenciadas en menor grado por las interrupciones glaciales presentando mayor diversidad genética.

## MATERIALES Y MÉTODOS



### Muestreo y extracción de DNA

Las muestras fueron recolectadas con el método de sacudida del follaje y volteado de objetos adyacentes a los cuerpos de agua. Todos los especímenes fueron fijados y conservados con etanol absoluto. *L. jaffueli* fue representada para todo su rango de distribución latitudinal, con 20 localidades (Tabla 4.1, 4.2 y fig. 4.1). Se estudiaron al menos 5 individuos para cada cuenca hidrográfica que fue incluida, totalizando 107 individuos. Cada individuo fue disecado y se tomó el meso y metatórax sin tubo digestivo para la extracción de DNA.

### Extracción, Amplificación y secuenciación de DNA

La extracción de DNA total se realizó siguiendo el método propuesto por Jowett (1986).

El gen mitocondrial NADH Dehydrogenase (*ND2*) fue amplificado mediante PCR (Polymerase Chain Reaction), utilizando los partidores TM-J-192 5'-AGCTATTGGGTTTCAGACCCC-3' y N2-N-732 5'-GAAGTTTGGTTTAAACCTCC-3'

de Bonacum *et al.*, 2001. *ND2* fue seleccionado por ser fragmento variable del DNA mitocondrial y que ha sido utilizado previamente para inferir procesos Plio y Pleistocénicos (Flanders, *et al.* 2009; Nitta & O'Grady, 2008). Sin embargo el marcador más recurrente en estudios filogeográficos de insectos es *COI* (McCulloch, *et al.* 2010; McCulloch, *et al.* 2009; Heilveil & Berlocher, 2006; Fochetti, *et al.* 2009). Durante la selección del marcador evaluamos la variabilidad de *COI* y de *Cytb*, sobre una muestra de localidades distantes, el primero de ellos mostró escasa o ninguna variabilidad, mientras que *Cytb* fue tan variable como *ND2*.

La PCR fue realizada para un volumen final de 30 $\mu$ l, conteniendo 1 $\mu$ l de DNA templado, 1X de buffer de amplificación, 3mM MgCl<sub>2</sub>, 0.15mM de cada dNTP, 0.2  $\mu$ M, de cada primer, y 1U de *Taq* polymerase. La termociclación sigue el siguiente protocolo: 5 min de desnaturalización inicial a 94° C, seguido de 35 ciclos de 1min de desnaturalización a 94°C, 45 seg de alineamiento a 44° C y 1 min de extensión a 72° C, finaliza con 5 min a 72° C. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en un gel de agarosa a 1%(p/v) y enviados a purificar y secuenciar a Macrogen, Inc. (Seúl, Corea).

### **Alineamientos y Diversidad Genética**

Los alineamientos fueron realizados en el Software BIOEDIT v7.0.5.2 (Hall, 1999) y revisados manualmente. Para cada población se estimó la diversidad haplotípica (*h*) y nucleotídica ( $\pi$ ), el número de sitios polimórficos, el número medio de las diferencias por pares y además se extrajeron los haplotipos, mediante el Software DnaSP, versión 4.10.6 (Rozas *et al.* 2003).

### **Análisis Filogeográfico**

Se utilizaron dos métodos de inferencia filogenética: 1) Máxima Parsimonia (MP) utilizando el programa PAUP\* v4.0b10 (Swofford, 2002), se realizó búsqueda heurística con adición aleatoria de secuencias y el algoritmo TBR (tree bisection and reconnection). Todos los caracteres fueron tratados con igual peso y los indels tratados como missing. El soporte estadístico para los nodos fue evaluado con el método de bootstrap (Felsenstein, 1985), usando 1000 pseudoréplicas. 2) Inferencia Bayesiana (IB) donde las relaciones filogenéticas fueron inferidas utilizando el programa Mr.Bayes v3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Probabilidades *a posteriori* fueron estimadas desde una muestra de árboles construida con simulaciones de Monte Carlo con cadenas de Markov. Cuatro cadenas fueron corridas con 10 millones de generaciones cada una, muestreando cada 1000 generaciones y eliminando el 10% de las muestras (burnin). El modelo de sustitución nucleotídica utilizado fue el modelo general de tiempo reversible con sitios invariables y distribución gamma (GTR+I+G). Los árboles fueron enraizados con la inclusión de *Araucanioperla brincki* (Froehlich) como grupo externo. Este Griptopterygidae se encuentra fuera del clado Griptopteryginae *sensu stricto* (Vera & Méndez en preparación).

Para visualizar las frecuencias geográficas relativas a cada haplotipo y haplogrupo, se construyó un network de haplotipos por medio del algoritmo median-joining (MJ) network usando el programa Network versión 4.201 (Bandelt *et al.* 1999).

### **Estructura Poblacional**

Se implementó el test de estructura genética geográfica, mediante el análisis de la varianza molecular (AMOVA) con 1.000 permutaciones (Excoffier *et al.* 1992), el que fue

computado en el Software Arlequín, versión 3.5.1.2 (Excoffier *et al.* 2005). La varianza molecular fue particionada dentro de poblaciones y entre poblaciones según tres criterios de clasificación geográfica: a) Biogeográfica: provincias biogeográficas de Chile central, Maulina, Valdiviana y Bosque Magallánico (Morrone *et al.* 1997, Morrone 2000); b) hidrográfica: ríos tipificados de acuerdo a su torrente desde II a VII (Niemeyer & Cereceda 1984); y c) respecto de los campos de hielo del LGM, ya sea que la localidad se encuentre fuera o dentro de la región antes cubierta de hielo (Tabla 4.2).

## RESULTADOS:

### Estructura poblacional para *Limnoperla jaffueli*

Se identificaron 37 haplotipos del gen mitocondrial *ND2* para las 20 poblaciones y 107 especímenes analizados (Tabla 4.1). Las frecuencias nucleotídicas para toda la muestra fue: C (12.66%), T (31.48%), A (36.65%) y G (19.21%). El alineamiento obtuvo un total de 91 sitios polimórficos (S), sin necesidad de insertar indels. La diversidad haplotípica (H) fue:  $0.938 \pm 0.013$  y la diversidad nucleotídica  $0,02752 \pm 0.00329$ .

La distribución de los haplotipos en las poblaciones se muestra en la Figura 4.2. Cuatro poblaciones muestran un haplotipo único. El haplotipo más frecuente es el H10 y se presenta en 7 poblaciones de Chile central-sur, las regiones de Aisén y Magallanes presentan diversos haplotipos que están ausentes en el resto de la muestra, entre ellos el más frecuente es H30 y se presenta en tres poblaciones. En el extremo norte de la

distribución dos poblaciones concentran nueve haplotipos, que no se encuentran en el resto de la muestra y entre ambas comparten H4.

Un MJ network de haplotipos identifica tres mayores haplogrupos (Fig. 4.3) G1 (N=1), G2 (N= 11) y G3 (N= 25) separados por múltiples pasos mutacionales, la distancia entre los grupos 1 a 3 es de 45 mutaciones y la de 3 a 2 es de 20. Dentro del haplogrupo 3 se reconocen dos regiones, una que reúne a la mayor parte de las poblaciones de la muestra y se ubica en Chile central-sur (32° a 40°S aproximadamente), con la sólo excepción de la población de Conguilla. La segunda región reúne a las restantes poblaciones desde la cuenca del Río Puelo (41°S) hasta Tierra del Fuego (55°S).

Los resultados del análisis filogenético se muestran en la Figura 4.5.

La inferencia con MP encontró 11 árboles igualmente parsimoniosos con un largo de 239 pasos (CI=0.7992, RI= 0.8601, RC= 0.6873), la topología de todos los árboles coincide en reconocer los mismos tres haplogrupos del MJ network, las discrepancias topológicas ocurren al interior de los grupos G3 y G2. El respaldo estadístico solo apoya estos tres haplogrupos y no resuelve al interior de ellos.

El método de IB distingue los grupos G1 y G2, este último estaría anidado en G3. El grupo G3 se muestra como una gran politomía, desde donde se distinguen tres clados que reúnen a las poblaciones australes al sur de los 41° de latitud. Las probabilidades *a posteriori* muestran respaldo para estos tres clados, los que representan respectivamente las localidades de: a) Lago Tagua+Tapera; b) Tapera+Balmaceda y c) Dos Lagunas+Río Serrano+Seno Skyring+Lago Deseado.

El análisis de AMOVA fue realizado sobre el grupo 3, dado que los restantes grupos presentan una diferenciación muy elevada y un pequeño tamaño de muestra. Los resultados (Tabla 4.3) muestran estructura para todas las clasificaciones analizadas. El aumento en el número de regiones explica un incremento en la varianza explicada por estas diferencias, llegando a ser 40.66% cuando se trabaja con cinco regiones. El criterio hidrográfico es el que maximiza la varianza explicada entre grupos, mientras que la dicotomía entre las regiones cubiertas o no de hielo durante el último máximo glacial, apenas es significativa.

## DISCUSIÓN:

### **Estructura filogeográfica de *Limnoperla jaffueli***

Los resultados de la filogeografía de *L. jaffueli* basada en el gen parcial *ND2* son inesperados, en cuanto a la enorme diferenciación genética que muestran los tres grupos de haplotipos, estos grupos se distribuyen geográficamente de forma continua, lo que puede revelar la existencia de otros procesos que participan en la diferenciación de estas tres unidades genéticas.

El haplogrupo 1 (G1) incluye solo un haplotipo (H13) que se distingue por 45 pasos mutacionales del haplotipo más cercano (Fig. 4.3), esta constituido por individuos provenientes de una porción de la población RUIL, mientras que la porción restante presenta el haplotipo más frecuente (H10) y que forma parte del haplogrupo 3 (G3). El análisis filogenético ubica este haplotipo como el grupo hermano de todo el resto de la muestra (Fig.4.4). La población RUIL se ubica geográficamente en la costa de la región del

Maule (Fig. 4.1), en lugares que no fueron afectadas por el último máximo glacial y que habrían servido de refugio durante las glaciaciones pleistocénicas, considerando además el descenso de las líneas de costa. De acuerdo con ello, la hipótesis de estudio esperaba que esta población presentara los haplotipos más ancestrales de la especie, es así como los individuos del grupo 1 (G1) podrían interpretarse como derivados de una población relictica. En cuanto a los fenotipos de desarrollo alar, la población RUIL es de fenotipo mixto, donde todos los individuos no voladores (braquípteros) presentan el haplotipo H13, exclusivo del grupo 1 y los macrópteros presentan el haplotipo H10, el más frecuente del grupo 3. Ambos fenotipos fueron recolectados simultáneamente, de modo que es difícil explicar que no exista cruzamiento tratándose de la misma especie.

A partir de estos resultados pueden emerger varias hipótesis explicativas de esta asociación fenotipo-genotipo: 1.- representa el encuentro de dos grupos aislados largamente, donde los residentes de la población relictica son no voladores y se dispersan escasamente, lo que impide que el haplotipo H13 (G1) este en otras poblaciones, por otra parte los inmigrantes son macrópteros con mayores capacidades de dispersión y portan el haplotipo H10, el más frecuente en el resto de la especie. En este escenario la conservación de las variantes genéticas en ambos fenotipos debe necesariamente implicar que no ha existido cruzamiento, lo que sugiere un modelo evolutivo de elección de la pareja reproductiva. 2.- La divergencia molecular revela especies hermanas de tipo crípticas que han desarrollado mecanismos intrínsecos de aislamiento reproductivo, lo que les permite coexistir en ese lugar, dicho encuentro secundario puede ser independiente del fenotipo alar. Finalmente para explorar cualquiera de estas hipótesis se requiere de un diseño de muestreo que estudie más individuos e incorpore nuevas cuencas costeras.

El haplogrupo 2 (G2) muestra respaldo en el análisis filogenético y reúne a las poblaciones con mayor diversidad haplotípica (tabla 4.1). En el MJ network (Fig. 4.3) se observa una estructura con abundantes haplotipos raros y no muestreados o extintos. El grupo se distancia por 20 pasos mutacionales del haplotipo más próximo.

Este grupo reúne 2 poblaciones del extremo norte de distribución de la especie, junto a dos haplotipos provenientes de la región del Maule (Cleme), dando cuenta del 24,3% de los haplotipos hallados en toda la muestra. Este escenario sugiere que un linaje muy diverso en el extremo norte de la distribución de la especie fue submuestreado en este estudio. No es posible ampliar la discusión dada la pequeña muestra tomada de este haplogrupo.

El haplogrupo 3 (G3) es el que reúne a la mayor parte de las poblaciones estudiadas y ocupa casi el 90% de la distribución latitudinal de la especie (Figs. 4.2 y 4.3). En este grupo es posible explorar la hipótesis planteada sobre recolonización postglacial dado que cubre regiones cubiertas y no cubiertas por el último máximo glacial, así como incluir a las poblaciones de fenotipo único (macrópteras y braquípteras) ubicadas en la región de Aisén y Magallanes. En el análisis del MJ network (Fig. 4.3 derecha) se distinguen dos regiones:

- 1.- región que presenta una estructura tipo estrella donde un haplotipo más frecuente (H10) está presente en siete de las poblaciones y los restantes haplotipos en su mayoría se distancian por uno o dos pasos mutacionales de H10. Esta estructura sugiere un proceso de expansión, como era esperado para las poblaciones de Chile central-sur en un escenario post-glacial.
- 2.- región que incluye cuatro subgrupos, de los cuales tres presentan respaldo filogenético (Fig. 4.4). Las poblaciones reunidas en la región 2 son de distribución austral (Aisén y Magallanes) salvo por parte de la población CON proveniente de la Araucanía. Siete de las

poblaciones halladas aquí no comparten haplotipos con la región 1 y se organizan en tres subgrupos diferentes, lo que es coherente con la hipótesis de múltiples refugios perigraciales en el extremo austral de la distribución de la especie. La distribución geográfica de los subgrupos muestra que las tres poblaciones de Magallanes incluida Tierra del Fuego forman parte de un mismo linaje, el que a su vez presentaría una conexión trasandina con la región de Aisén (Fig.4.3). Las poblaciones de Aisén y de Chiloé continental muestran relaciones más complejas entre sí, sus haplotipos no se presentan en otras regiones y relacionan poblaciones de cuencas trasandinas y Pacíficas.

#### **Criterios de clasificación geográfica y estructura filogeográfica**

En cuanto a la clasificación en grupos geográficos, la especie muestra señales de evidente estructuración, sin embargo la diversidad genética encontrada no logra ser explicada en su totalidad por los escenarios evaluados con los criterios biogeográficos, glaciales e hidrográficos. Dada la gran diferenciación encontrada al interior de la especie, estos criterios solo fueron evaluados con AMOVA sobre el haplogrupo G3, excluyéndose los individuos que se agruparon en G1 y G2.

De los tres criterios analizados, el de clasificación hidrológica fue el que mejor representa la estructura, y es también el que genera el mayor número de grupos, llegando a explicar un 40,66% de la varianza entre regiones. Mientras que el criterio que divide las poblaciones en función del MGP, fue el que explica la menor varianza entre grupos, apenas un 17,47%.

Tratándose de insectos con desarrollo acuático, estos resultados sugieren que el régimen de los sistemas hídricos es de mayor relevancia en la dispersión aún cuando los imagos son

estados voladores. Es así como la vagilidad de estos insectos estaría limitada por la evolución de la hidrografía que los soporta más que por factores intrínsecos de dispersión.

### **Relación entre los fenotipos y la filogeografía**

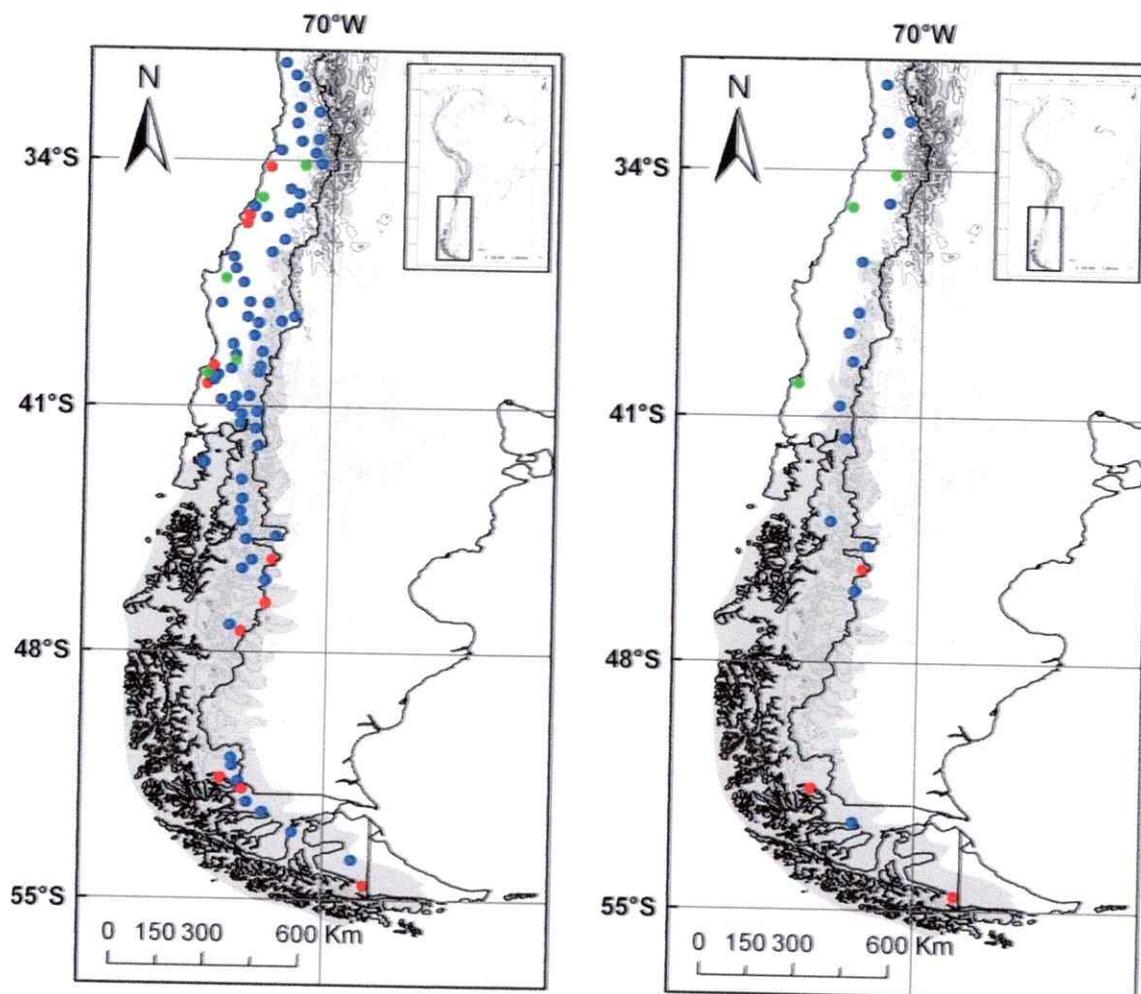
En cuanto a la distribución de los fenotipos con vuelo suprimido para esta especie, se ubican en diversas partes de la red de haplotipos (G1 y G3) y no únicamente en un linaje. En todos los elemento de G1, mientras que en G3 se ubican tanto en la región de Chile central que muestra una expansión, como en la región Austral, que muestra linajes relictos. Al haber varios linajes con esta condición, esta distribución de fenotipos podría tener explicaciones *ad hoc* para cada caso.

Lo más relevante para contrastar la hipótesis sobre el origen de las poblaciones de fenotipo único en la región austral, puede visualizarse en la distribución del fenotipo braquíptero en la región austral (R2) de G3 (Fig. 4.3). El MJ network muestra un linaje de tres haplotipos diferenciados por un paso mutacional entre sí, reúne las poblaciones de Tierra del Fuego (Ldes), Magallanes (Sky, Serr) y una de las de Aysén (Dlag), este grupo además presenta respaldo filogenético (Fig. 4.4) y es el que contiene a todas las poblaciones estudiadas con braquípterismo de la región austral. Se encuentra una conexión trasandina para estas poblaciones, demostrando la existencia de refugios australes a partir de los cuales se habría colonizado las tierras dejadas por los glaciales pleistocénicos, esto esta de acuerdo a la hipótesis planteada. Sin embargo y aún cuanto todos las poblaciones de fenotipo único braquípteras se reúnen en este linaje, la población de Magallanes "Serr" es únicamente de fenotipo macróptero y comparte haplotipos con todas las poblaciones de fenotipo único

braquíptero, contrariamente a lo esperado si los macrópteros provinieran de un linaje diferente ubicado más al norte.

Finalmente este estudio identifica tres linajes que se encuentran muy diferenciados y podrían responder a otros procesos, cuya comprensión puede mejorarse al ampliar el muestreo en cuencas no exploradas, principalmente cuencas costeras de Chile central-sur y en el extremo norte de la distribución de la especie, donde la orogénesis andina pudo jugar un rol relevante. La evidencia molecular recogida podría estar demostrando la existencia de especies crípticas al interior de *Limnoperla*.

En cuanto a la relación de los procesos de dispersión post glacial y la distribución de los fenotipos, esta evidencia demuestra que la colonización postglacial ha ocurrido desde múltiples refugios de forma independiente del tipo de fenotipo alar que las poblaciones presenten y no darían cuenta de la causa para la condición de fenotipo único en las poblaciones australes.



**Figura 4.1.** Distribución conocida en Chile para *L. jaffueli*. Los puntos de color rojo muestran registros sólo de fenotipos braquiípteros, los azules sólo de macrópteros y los verdes señalan poblaciones de fenotipo mixto. El área sombreada indica la superficie cubierta por hielo durante el último máximo glacial. A la derecha se muestran las 20 poblaciones muestreadas para este estudio.

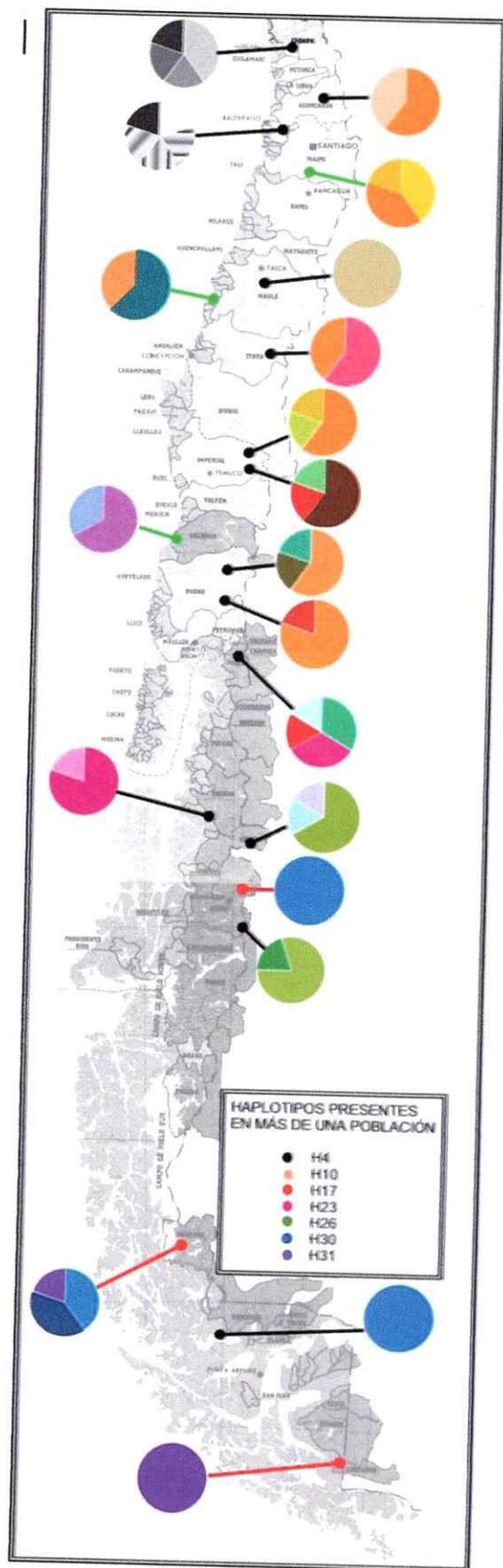
**Tabla 4.1.** Localidades y especímenes analizados de *L. jaffueli*. Se detallan las siglas utilizadas en el texto, las subcuencas a las que pertenecen las muestras, las coordenadas en grados, el número de individuos (secuencias) estudiadas, el fenotipo que presentan (M= macróptero, B= braquióptero), el número de haplotipos y la diversidad haplotípica y nucleotídica junto a su desviación estándar.

Localidad	Siglas	Subcuencas	Coordenadas	N	F	h	H	$\pi$
1 Coquimbo, Choapa, Limahuida	Lima	R. Choapa Medio	71°09'27.07" W 31°45'27.21" S	5	M	4	0.900±0.161	0,00630±0,00217
2 Valparaiso, Petorca, Colihuanay	Valpo	Est. Marga Marga	71°11'27,94" W 33°16'1,48" S	6	M	6	1.000±0.096	0.01481±0,00275
3 Valparaiso, S. Felipe, Alicahue	Alica	R. Aconcagua medio	70°45'14,72" W 32°20'36,35" S	5	M	2	0.600±0,175	0,00111±0,00032
4 Santiago, Maipo, L. Aculeo	Acule	Est. Alhue	70°52'45,73" W 33°51'28,52" S	5	M/B	3	0.800±0.164	0.00185±0.00051
5 Maule, Cauquenes, R. Curanilahue	Ruil	R. Curanilahue	72°30'32,47" W 35°50'1,48" S	8	M/B	2	0.536±0.123	0.04861±0.01118
6 Maule, Linares, San Clemente	Cleme	R. Loncomilla	71°28'56,89" W 35°32'27,71" S	5	M	1	0	0
7 Bío-Bío, Nuble Chillan, Shangrilla	Chilla	R. Itata alto	71°28'19,10" W 36°53'18,10" S	5	M	2	0.600±0,175	0,00111±0,00032
8 Araucanía, Cautín, Manzana	Manza	Cautín Alto (hasta antes junta R. Quepe)	71°42'31,16" W 38°27'37,84" S	5	M	3	0.700±0.218	0.00444±0.00167
9 Araucanía, Cautín, Conguillío	Con	Cautín Alto (hasta antes junta R. Quepe)	71°38'47,87" W 38°38'46,95" S	5	M	3	0.700±0.218	0.01852±0.01047
10 Araucanía, Cautín, Pucón	Puc	R. Pucón	71°50'25,17" W 39°13'37,47" S	5	M	3	0.700±0.218	0.00370±0.00144
11 Los Ríos, Valdivia, Bonifacio	Vald	Costeras entre R. Lingue y R. Valdivia	73°23'4,66" W 39°41'38,52" S	6	M/B	2	0.533±0.172	0.00395±0.00128
12 Los Lagos, Osorno, Anticura	Anti	R. Pilaiquen	72°08'45,64" W 40°39'43,7" S	5	M	2	0.400±0.237	0.00074±0.00044

13	Los lagos, Llanquihue, L., Tagua	Tagua	Costeras entre R. Petrohue y R. Puelo	72°10'5,89" W	6	M	4	0.876±0.129	0.01049±0.00306
14	Aisén, Aisén, L. Risopatrón	Riso	Costeras entre Seno Ventisquero y R. Cisnes	72°31'45,42" W 44°16'24,57" S	5	M	2	0.400±0.237	0.00222±0.00132
15	Aisén, Coihaique, LaTopera, R. Cisnes	Tape	R. Cisnes	71°38'5,52" W 44°37'37,83" S	6	M	3	0.600±0.215	0.00469±0.00257
16	Aisén, Coihaique, Balmaceda, R. huemules	Balma	R. Simpson	71°50'54,81" W 45°31'47,06" S	5	M	2	0.400±0.237	0.00074±0.00044
17	Aisén, Coihaique, DosLagunas	Diag	R. Simpson	71°38'46,34" W 45°54'48,86" S	5	B	1	0	0
18	Magallanes, Ultima Esperanza, R. Serrano	Serr	Costeras entre Fiordo Calvo y Fiordo Peel	72°59'22,38" W 51°13'35,18" S	5	B	3	0.800±0.164	0.00222±0.00050
19	Magallanes, Seno Skyring	Sky	Costeras Continentales del Seno Skyring	71°53'58,1" W 52°32'43,33" S	5	M	1	0	0
20	Magallanes, Tierra del Fuego, L. Desado	Ldes	Costeras entre R. Azopardo y Seno Serrano	68°45'46,38" W 54°22'12,02" S	5	B	1	0	0

Tabla 4.II.- Grupos de poblaciones clasificadas con diferentes criterios geográficos.

Localidad		Provincias biogeográficas (Morrone <i>et al.</i> 1997 & Morrone 2000)	Zonas hidrográficas (Niemeyer & Cereceda 1984)	Ubicación respecto de los campos de hielo durante el LGM (Heusser 2003)	
1	Lima	Chile Central	II Ríos en torrente de régimen mixto de la zona semiárida	Fuera del hielo	
2	Valpo				
3	Alica		III Ríos en torrente de régimen mixto de la zona subhúmeda		
4	Acule				
5	Ruil	Maulina	IV Ríos tranquilos con regulación lacustre de la zona húmeda de Chile	Bajo los campos de hielo	
6	Cleme				
7	Chilla				
8	Manza	Valdiviana	V Ríos caudalosos de la Patagonia septentrional	Fuera del hielo	
9	Con				
10	Puc				
11	Vald				
12	Anti		Bosque Magallánico	VI y VII Ríos de la zona de campos de hielo de la Patagonia meridional y territorios situados al sur del estrecho de Magallanes	Bajo los campos de hielo
13	Tagua				
14	Riso				
15	Tape				
16	Balma				
17	Dlag				
18	Serr				
19	Sky				
20	Ldes				



**Figura 4.2.**  
Distribución de los 37 haplotipos de *ND2* identificados entre las 20 poblaciones de *L. Jaffueli* analizadas. Flechas rojas representan poblaciones únicamente braquípteras; negras únicamente macrópteros y verdes a poblaciones de fenotipo mixtas.

**Tabla 4.4.** Resultados de AMOVA para los haplotipos del gen *ND2* de 17 poblaciones de *Limnoperla jaffueli* reconocidas en el grupo G3. Particiones según la distribución en función del MGP, regiones biogeográficas y regímenes de cuencas hidrográficas.

Partición	d.f.	Suma de los cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de la varianza	F	P
<b>MGP</b>						
Entre regiones	1	25.358	0.52748 Va	17.47	FCT= 0.17466	<0.04
Entre poblaciones dentro de regiones	15	145.964	1.81329 Vb	60.04	FSC= 0.72751	<0.001
Dentro de las poblaciones	68	46.182	0.67917 Vc	22.49	FST= 0.77511	<0.001
<b>Biogeografía</b>						
Entre regiones	3	214.267	0.79720 Va	27.15	FCT= 0.27152	<0.003
Entre poblaciones dentro de regiones	13	104.317	1.45969 Vb	49.72	FSC= 0.68246	<0.001
Dentro de las poblaciones	68	46.182	0.67917 Vc	23.13	FST= 0.76868	<0.001
<b>Hidrología</b>						
Entre regiones	4	100.544	1.18250 Va	40.66	FCT= 0.40659	<0.001
Entre poblaciones dentro de regiones	12	70.779	1.04667 Vb	35.99	FSC= 0.60647	<0.001
Dentro de las poblaciones	68	46.182	0.67917 Vc	23.35	FST= 0.76648	<0.001



**Figura 4.3.-** Median-joining (MJ) network de 20 poblaciones de *L. jaffueli* basado sobre secuencias parciales del gen mitocondrial *ND2*. El tamaño de las circunferencias representa la frecuencia de cada haplotipo, los pasos mutacionales se indican con numeraciones rojas. Cada color representa la proporción de individuos de la población de origen que presenta el haplotipo, los haplotipos no muestreados o desconocidos no se simbolizan, las flechas señalan la presencia de individuos de fenotipo braquíptero.

Izquierda: muestra el network completo con tres mayores haplogrupos diferenciados.

Centro: muestra un mapa de cuencas hidrográficas, donde se han coloreado las cuencas muestreadas, la barra de color muestra la distribución de haplogrupos y la simbología de localidades de acuerdo a la tabla 4.I.

Derecha: ampliación del recuadro que muestra el grupo 3. Los óvalos muestran dos regiones distinguibles dentro de G3.

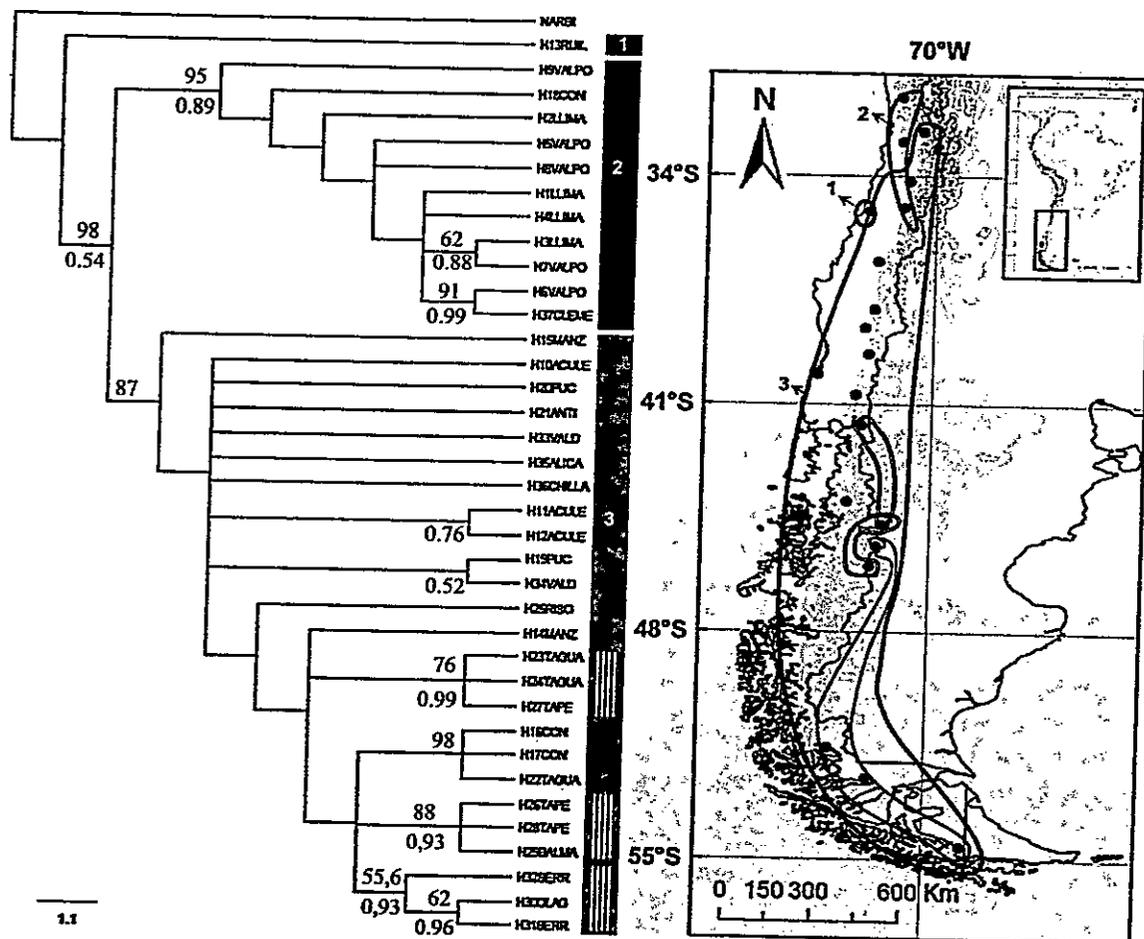


Figura 4.4.- Árbol de Máxima Parsimonia para los 37 haplotipos de *ND2* encontrados en 20 poblaciones de *Linnoperla jaffueli*. Se indican los respaldos de los nodos para 100 pseudoréplicas de bootstrap y probabilidades *a posteriori* de inferencia bayesiana. Las barras oscurecidas muestran los tres clados congruentes con los haplogrupos encontrados en el network y las achuradas muestran los subgrupos que se distinguen dentro del grupo 3. El mapa muestra óvalos que encierran las poblaciones que presentan los haplogrupos de cada grupo, ver el texto para el detalle.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Bandelt, H.-J., P. Forster & A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.
- Bermingham, E. & C. Moritz. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular ecology* 7:367-369.
- Bilton, DT., JR. Freeland & B. Okamura. 2001. Dispersal in freshwater Invertebrates. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 32:159-181.
- Bonacum, J., DeSalle, R., O'Grady, P.M., Olivera, D.S.C.G., Wintermute, J., Zilversmit, M., 2001. New nuclear and mitochondrial primers for systematics and comparative genomics in Drosophilidae. *Drosophila Information Service* 84, 201-204
- Burridge, CP., D. Craw & JM. Waters. 2006. River capture, range expansion, and cladogenesis: the genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution* 60(5):1038-1049.
- Cosacov, A., AN. Sérsic, V. Sosa, LA. Johnson & AA. Cocucci. 2010. Multiple Periglacial refugia in the Patagonia steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography* 37:1463-1477.
- Darwin, C. 1859. On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. D. Appleton, New York.

- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.
- Flanders, J., G. Jones, P. Brenda, C. Dietz, S. Zhang, G. Li, . Sharifi & S.J. Rossiter. 2009. Phylogeography of the greater horseshoe bat, *Rinolophus ferrumequinum*: contrasting results from mitochondrial and microsatellite data. *Molecular ecology* 18:306-318.
- Fochetti, R. & J.M. Tierno de Figueroa. 2008. Global diversity of stoneflies (Plecoptera; Insecta). *Hydrobiologia* 595:365-377.
- Fochetti, R., E. Sezzi, J.M. Tierno de Figueroa, M.V. Modica & M. Oliverio. 2009. Molecular systematics and biogeography of the Mediterranean stonefly genus *Tyrrhenoleuctra* (Insecta, Plecoptera). *J. Zool. Syst. Evol. Res.* 47(4), 328-336.
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analyses program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41:95-98.
- Heilveil, J.S. & H. Berlocher. 2006. Phylogeography of postglacial range expansion in *Nigroperla serricornis* Say (Megaloptera: Corydalidae). *Molecular ecology* 15:1627-1641.

- Heilveil, J.S. & S.H. Berlocher. 2006. Phylogeography of postglacial range expansion in *Nigronia serricornis* Say (Megaloptera: Corydalidae). *Molecular ecology* 15:1627-1641.
- Heusser, C.J. 2003. Ice age southern Andes a chronicle of paleoecological events. *Developments in Quaternary Science*, 3 Series editor: Jim Rose. 240 pp. Elsevier press Tuxedo USA.
- Hewitt, G. 2008. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907-913
- Hinojosa, L.F. & C. Villagrán. 1997. Historia de los Bosques del sur de Sudamérica, I. antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural* 70:225-239.
- Illies, H. Klinge, G.H. Schwabe & H. Sioli), pp. 685-708. Dr.W. Junk N.V., Publishers the Hague.
- Illies, J. 1964. Die Plecopteren-Unterfamilie Andiperlinae (Auflösung einer unnatürlichen Negativgruppe nach REMANE). *Zoologischer Anzeiger*. 172(1):37-48.
- Illies, J. 1969. Biogeography and ecology of neotropical freshwater insects, especially those from running waters En: *Biogeography and ecology in South America* (Eds. E.J. Fittkau, J.

- Jowett T. 1986. Preparation of nucleic acids, in *Drosophila: a practical approach*. Oxford, IRL Press.
- McCulloch, G.A., G.P. Wallis & J.M. Waters. 2009. Do insects lose flight before they lose their wings? Population genetic structure in subalpine stoneflies. *Molecular ecology* 18:4073-4087.
- McCulloch, G.A., G.P. Wallis & J.M. Waters. 2010. Onset of glaciation drove simultaneous vicariant isolation of alpine insects in New Zealand. *Evolution* 64 (7): 2033-2043.
- McLellan, I.D. 2006. Endemism and Biogeography of New Zealand Plecoptera (Insecta). *Illiesia* 2(2):15-23.
- Morrone, J. 2000. Biogeographic delimitation of the Subantarctic subregion and its provinces. *Rev. Mus. Argentino Cienc. Nat.* 2(1):1-15.
- Morrone, J., L. Katinas & J.V. Crisci. 1997. A cladistic biogeographic analysis of Central Chile. *J. Comp. Biol.* 2(1):25-41.
- Mynott, JH., JM. Webb & PJ. Suter. 2011. Adult and larval associations of the alpine stonefly genus *Riekoperla* McLellan (Plecoptera: Gripopterygidae) using mitochondrial DNA. *Invertebrate Systematics* 25:11-21.

- Niemeyer, H., & P. Cereceda. 1984. Geografía de Chile, Instituto Geográfico Militar, Tomo VIII Hidrografía. 320 pp. Colección Geografía de Chile Editada por el Instituto Geográfico Militar, Santiago de Chile.
- Pérez-Losada, J. Xu , C.G . Jara & K.A . Crandall. 2011. Comparing phylogeographic patterns across the Patagonian Andes in two freshwater crabs of the genus *Aegla* (Decapoda Aeglididae). En: Phylogeographic and population genetic in Crustacea. Ch. Schubart (Ed.) CRC Press.
- Posadas, P. 1996. Distributional patterns of vascular plants in Tierra del Fuego: a study applying parsimony analysis of endemism (PAE). 72(4):161-177.
- Roderick, GK. 1996. Geographic structure of insects populations: Gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual Reviews of the Entomology* 41:325-352.
- Ronquist F & Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19:1572-1574.
- Rozas, J., J.C. Sanchez-DelBarrio, X. Messeguer & R. Rozas. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19:2496-2497.
- Schultheis, A.S., L.A. Weigt & A.C. Hendricks. 2002. Gene flow, dispersal and nested clade analysis among populations of the stonefly *Peltoperla tarteri* in the southern Appalachians. *Molecular Ecology* 11:317-327.

- Swoofford DL. 2000. PAUP\*: Phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods) version 4.0b10. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Thomas, CD., EJ. Bodsworth, RJ. Wilson, AD. Simmons, ZG. Davies, M. Musche & L. Conradt. 2001. Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature* 411:577-581.
- Turner, KJ., CJ. Fogwill, RD. McCulloch & DE. Sugden. 2005. Deglaciation of the eastern flank of the north Patagonian icefield and associated continental-scale lake diversions. *Geografiska Annaler* 87 A (2):363-374.
- Valdovinos C., A. Kiessling, M. Mardones, C. Moya, A. Oyanedel, J. Salvo, V. Olmos & O. Parra. 2010. Distribución de macroinvertebrados (Plecoptera y Aeglidae) en ecosistemas fluviales de la Patagonia chilena: ¿muestran señales biológicas de la evolución geomorfológica postglacial?. *Revista Chilena de Historia Natural* 83:267-287.
- Vera, A. & A. Camousseight. 2006. Estado de conocimiento de los Plecópteros de Chile. *Gayana* 70(1):57-64.
- Vera, A. 2011. Primeros registros de *Notoperla magnaspina* McLellan (Insecta: Plecoptera) para Chile, con observaciones biológicas. *Anales del instituto de la Patagonia*

- Villagrán, CM. 1994. Quaternary history of the Mediterranean Vegetation of Chile, En: Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile, eds: MT. Kalin, P. Zedler & M. fox. Springer-Verlog. Nueva York. pp3-20
- Zelmlak, T., E.M. Habit, S.J. Wade, M.A. Battini, E.D.M. Adams & D.E. Ruzzante. 2008. Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology* 17:5049-5061.
- Zemlak, T., EM. Habit, SJ. Walde, MA. Battini, EDM. Adams & DE. Ruzzante. 2008. Across the souther Andes on fin: glacial refugia, grainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology* 17:5049-5061.
- Zera, AJ. & RF. Denno. 1997. Physiology and ecology of dispersal polymorphism in insects. *Annu. Rev. Entomol.* 42:207-230.

## CAPITULO V:

## CONCLUSIONES Y PROYECCIONES

**Logro de los objetivos e hipótesis abordados en esta tesis (ver tabla 5.1)**

En cuanto a la hipótesis 1 "El rasgo áptero ha evolucionado independientemente en el extremo austral de Sudamérica", se realizaron los análisis filogenéticos y de método comparado sobre una muestra de 50 taxa para tres genes, resultando una hipótesis filogenética robusta y parcialmente resuelta. Con ello se cumplió con los objetivos específicos planteados.

En cuanto a la sistemática del grupo, se reconoce la familia Gripopterygidae como un grupo monofilético en casi todos los análisis (métodos y particiones). Las agrupaciones de subfamilias aceptadas en la actualidad, no encuentran respaldo filogenético, pero si logramos encontrar algunos linajes que con pequeñas excepciones se aproximan a algunas subfamilias de modo que las hemos llamado: Gripopteryginae *sensu stricto* (sin *Aubertoperla*), Leptoperlinae *sensu stricto* (sin *Newmatoperla*) y Dinotoperlinae *sensu lato* (con *Aubertoperla*). Las dificultades de la resolución se encuentran dentro de la familia Gripopterygidae en los nodos basales, generando una politomía a nivel de las subfamilias.

En cuanto a la reconstrucción de estados ancestrales para la reducción del vuelo, los taxa de fenotipo áptero no constituyen un clado y se distribuyen en distintas regiones de la topología, por lo tanto la evolución independiente de estos rasgos encuentra respaldo filogenético. De esta forma se cumple la predicción y la hipótesis 1 resulta ser afirmativa.

**Limitaciones:**

Se hace evidente que para el análisis filogenético que, aún cuando se ha aumentado el número de taxa, hace falta lograr una mayor representación de elementos australianos y neozelandeses para poder resolver las agrupaciones a nivel de subfamilias y quizás sea necesario explorar nuevos genes nucleares. En cuanto a la reconstrucción de estados ancestrales, se requiere de un mayor esfuerzo de muestreo para representar los taxa ápteros faltantes. Una vez realizado esto se podría estimar algunos tiempos de divergencia.

En cuanto a la hipótesis 2 **“Condiciones de aislamiento y restricciones al flujo génico conducen a la fijación de fenotipos con vuelo suprimido en Gripopterygidae”**.

El modelo a estudiar *Limnoperla jaffueli* fue caracterizado morfológicamente y en su distribución. Nuestros resultados muestran que la especie se distribuye de forma continua en las grandes cuencas de la vertiente occidental de la cordillera de Los Andes desde los 30° a los 54° de latitud Sur incluida Tierra del Fuego; estando ausente en regiones de estepa patagónica (Magallanes y Tierra del Fuego). Se identificaron regiones sin información en los archipiélagos al sur de Chiloé, en la mayor parte de las cuencas costeras de Chile central y en regiones aledañas a los campos de hielo, debido probablemente a una falta de esfuerzo de muestreo. El fenotipo más frecuente es el macróptero, mientras que el braquíptero, a diferencia de lo reportado con anterioridad, resulta estar ampliamente distribuido tanto en la región austral como en Chile central, con poblaciones de fenotipo único y otras con ambos fenotipos respectivamente. El análisis morfométrico de los fenotipos muestra una distribución bimodal para el largo de las alas, sin relación con otras variables de la envergadura. El análisis de componentes principales, ordenó la muestra en dos regiones que

reúnen a las poblaciones de Chile central hasta el norte de Aysén y por otra parte a las restantes poblaciones hasta Tierra del Fuego, estos grupos encuentran significancia en un análisis discriminante. El primer grupo reúne a los fenotipos más gráciles, mientras que el grupo austral a los fenotipos más robustos. Estos grupos no se relacionan con el braquíptero, ni con una secuencia latitudinal, de modo que la reducción de las alas es un fenómeno complejo que debe responder tanto a causas históricas como ecológicas.

La diversidad genética de las 20 poblaciones de *Limnoperla jaffueli* estudiadas, muestra estructuración geográfica. Para las poblaciones el extremo norte, Chile central-sur, Aysén y Magallanes existen haplotipos únicos no compartidos con las otras regiones geográficas. La filogeografía muestra un resultado inesperado, donde se reconocen tres haplogrupos muy divergentes, dos de ellos representan unas pocas poblaciones (Los Ruiles en parte; Illapel, Valparaíso y Clemente), las restantes poblaciones se reúnen en un network que muestra un estado de crecimiento poblacional (forma de estrella), para las poblaciones de Chile central hasta Pto. Montt, con un haplotipo más frecuente presente en siete de las 10 poblaciones que incluye la estrella. Las restantes poblaciones hasta el extremo sur muestran cuatro pequeños grupos con relaciones estrechas y escasa variabilidad. El fenotipo braquíptero se distribuye en todo el network, sin embargo las poblaciones de fenotipo único presentes en Aysén y Magallanes se relacionan directamente y se separan de las macrópteras de Aysén, no de las de Magallanes (seno Skyring). Estos resultados sugieren la presencia de relictos australes e identifica múltiples puntos de origen para la recolonización post glacial, pero no muestran que en todas las poblaciones relictas australes se hubiera fijado el rasgo no volador, de modo que no es conclusivo en ese aspecto y la predicción planteada en esta tesis solo se cumple parcialmente. Por otra parte el árbol polarizado de acuerdo a los resultados filogenéticos obtenidos en la primera parte de esta tesis, nos muestra que un

haplotipo de las cuencas costeras de Chile central y que esta presenta en una población de fenotipo mixto es el grupo hermano de todo el resto, de modo que se cumple lo esperado para identificar a estas poblaciones como relictas.

Finalmente se puede decir que para la hipótesis 2 los resultados no son concluyentes, dado que el estudio de un experimento natural de aislación y restricción de flujo génico como fue el ocurrido para *L. jaffueli* en relictos australes durante el máximo glacial pleistocénico, revela que para esta especie, los relictos australes recolonizan las áreas adyacentes desde una ubicación trasandina, lo que se evidencia en múltiples refugios, pero que solo en uno de estos linajes se concentra n las poblaciones con fenotipo braquíptero. Además este mismo linaje es el que incluye y comparte haplotipos con una población de fenotipo único macróptero. La interpretación de este patrón es que la fijación del rasgo volador y no volador es independiente de la condición de refugio austral, y estas poblaciones de fenotipo único responderían a procesos ecológicos más que a históricos.

**Limitaciones:**

La diversidad genética encontrada sugiere la necesidad de incorporar nuevos marcadores para interpretar los resultados. Por otra parte se hace necesaria la incorporación de un mayor número de cuencas costeras en el muestreo.

Tabla 5.1. Resumen del logro de los objetivos planteados en esta tesis

Hipótesis, Predicciones y Objetivos específicos	Resultado obtenido
<b>Hipótesis 1.- El rasgo áptero ha evolucionado independientemente en el extremo austral de Sudamérica.</b>	Se cumple
<i>Predicción: Las especies ápteras de distribución austral no constituyen un grupo monofilético, presentando en un mismo clado tanto especies ápteras como macrópteras.</i>	Se cumple
<b>Objetivos específicos:</b> 1.- Construir una hipótesis filogenética robusta para los géneros de Griproterygidae.	Se construye con 47 taxa y 3 genes parciales, presenta respaldos de géneros, algunos grupos próximos a subfamilias, pero con falta de resolución en los nodos basales dentro de Griproterygidae, esta familia es reconocida como monofilética.
2.- Mapear los rasgos macróptero, áptero y polimórfico sobre la filogenia.	Se identifica origen independiente para los rasgos que suprimen el vuelo.
<b>Hipótesis 2.- Condiciones de aislamiento y restricciones al flujo génico conducen a la fijación de fenotipos con vuelo suprimido en Griproterygidae.</b>	Parcial, los resultados no son concluyentes, ya que de los relictos australes derivan poblaciones de fenotipos únicos volador y no volador.
<i>Predicciones:</i> a) <i>Se espera que una especie polimórfica como L. jaffueli presente un filograma resuelto dadas las restricciones históricas al flujo génico, en localidades sometidas a perturbaciones</i>	Se cumple parcialmente ya que el filograma está resuelto cerca de la base mostrando restricciones al flujo génico, pero muestra limitada resolución dentro de G3.
b) <i>Se espera que la recolonización de una especie polimórfica como L. jaffueli sobre una región sometida a perturbaciones glaciales, ocurra a partir de varios refugios.</i>	Se cumple ocurre, al menos 4 grupos con haplotipos no compartidos se encuentran geográficamente relacionados.
c) <i>Se espera que una especie polimórfica como L. jaffueli presente zonas de refugio sobre regiones afectadas por perturbaciones glaciales, estas poblaciones sólo presentaran fenotipos braquípteros.</i>	No se cumple, presenta zonas de refugio en regiones australes, pero las poblaciones macrópteras australes forman parte de las poblaciones relictas.
<b>Objetivos específicos:</b> 1.- Describir y definir los estados macróptero y braquíptero para <i>L. jaffueli</i> .	Ambos estados se presentan como grupos discretos, donde el largo de las alas fue el rasgo morfológico más explicativo de la distribución de

	la variabilidad.
2.- Construir una hipótesis filogeográfica para <i>L. jaffueli</i> .	La filogeografía muestra topologías con linajes resueltos en la porción basal, y para tres linajes australes.
3.- Construir una red de haplotipos y relacionarla con su distribución geográfica y sus fenotipos.	Muestra estructuración geográfica, donde un escenario hidrológico es el más explicativo. Se identifican grupos derivados de múltiples refugios que presentan haplotipos exclusivos. El braquípterismo se distribuye en diversas agrupaciones y es compartido en el extremo austral con el macropterismo.

#### Proyecciones:

Al finalizar este estudio consideramos cumplido el objetivo general que nos planteamos, pero nuestros resultados nos dejan con más preguntas que respuestas. Lejos de encontrar una relación directa entre las perturbaciones australes y la reducción del vuelo en Gripopterygidae, encontramos orígenes independientes de estos fenotipos, lo que quiere decir que en cada caso se podría encontrar un proceso único e irrepetible que de cuenta de este fenotipo, como ocurre en la convergencia de los rasgos, en este caso la ausencia del rasgo puede tener distintas causas dentro de la familia. En la exploración del modelo polimórfico no encontramos una explicación simple sino que podrían ocurrir procesos históricos combinados con fenómenos ecológicos, donde es necesario identificar la contribución de estos factores, para cada grupo que presente individuos con reducción del vuelo. La divergencia genética encontrada sugiere la necesidad de estudiar sus unidades taxonómicas, donde *Limnoperla* es actualmente considerada como un género monoespecífico.

Un tema aparte corresponde a la diversidad genética mostrada por la población de Los Ruiles (cuenca costera de Chile central) para *L. jaffueli*, esta población es de tipo mixta y muestra dos haplotipos uno para cada fenotipo, los macrópteros presentan el haplotipo más frecuente de la especie y los braquípteros muestran un haplotipo único separado por 47 pasos mutacionales del anterior. Esta situación no puede abordarse satisfactoriamente con el diseño desarrollado en este estudio, a modo de hipótesis, debiera de existir un mecanismo que conserve la diferencia genética entre dos fenotipos de una misma población, pudiendo ocurrir una selección diferencial de las parejas reproductivas. Otra alternativa y la que ofrece la mayor reestructuración del estudio es que se trate efectivamente de especies diferentes de tipo crípticas. En cualquier caso se hace indispensable para abordar este estudio, incorporar una mayor muestra de las poblaciones en cuencas costeras de Chile central. En el estudio molecular incluimos solo dos poblaciones provenientes del margen costero, aún cuando existía material museológico de otras poblaciones de la costa y de fenotipo mixto, este no estaba en las condiciones adecuadas para el trabajo molecular.

Otro aspecto es el estudio de las poblaciones al norte de la cuenca del Río Aconcagua, las que fueron escasamente exploradas y sin embargo mostraron una alta diversidad de haplotipos únicos.

Para finalizar, el estudio que se ha realizado en esta tesis muestra un escenario más complejo que el esperado para dar respuesta a las preguntas planteadas, no obstante, da cuenta del descubrimiento de un modelo de insectos que permite abordar preguntas de carácter histórico en procesos macroevolutivos y microevolutivos que escasamente había

sido estudiado con estos fines. Los resultados expuestos aquí muestran que aún existe escaso entendimiento del efecto glacial sobre taxa sensibles como son las relacionadas a cuencas hidrográficas y cuya dispersión ocurre mediado imagos voladores a diferencia de peces anfibios y otros invertebrados bentónicos, lo que invita al estudio de otras taxa dulceacuícola para indagar sobre la existencia del evidente patrón de divergencia molecular que aquí se ha descubierto. Por otra parte la evolución de la pérdida del vuelo en *Gripopterygidae* parece tener causas múltiples incluso en especies emparentadas, la extensa historia de la taxa en estudio, la pudo someter a diversos eventos que la condujeron a la pérdida del vuelo, los cuales pueden o no estar relacionados. En síntesis los resultados aclaran y corrigen varios supuestos de la recolonización post glacial lo que permite limpiar el sistema de estudio y redirigir las preguntas sobre el modelo, unidades y procesos, abriendo una avenida de análisis para preguntas macro y microevolutivas.