

UCH-FC
B. Ambiental
C 975
C-1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“CONTRIBUCIÓN MOLECULAR A LA BIOGEOGRAFÍA DEL
GÉNERO *Diplomystes* (Teleostei: Siluriformes) EN
SUDAMÉRICA”**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo, mención Medio Ambiente.

LEONARDO ANGELO CUROTTO LEIVA

Director de Seminario de Título: Dr. Elie Poulin

Noviembre 2014

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. **Leonardo Angelo Curotto Leiva**

“CONTRIBUCIÓN MOLECULAR A LA BIOGEOGRAFÍA DEL GÉNERO *Diplomystes* (Teleostei: Siluriformes) EN SUDAMÉRICA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo, mención Medio Ambiente.

Elie Poulin
Director Seminario de Título

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Elie Poulin', written over a horizontal line.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. David Véliz
Presidente Comisión

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'David Véliz', written over a horizontal line.

Prof. Irma Vila
Evaluador

A handwritten signature in blue ink, appearing to be 'Irma Vila', written over a horizontal line.



Santiago de Chile, 29/01/2015



Nací un 17 de Agosto de 1984, en Santiago y soy el primero de los 4 hijos hombres de Vittorio y Laura. Mi vida siempre ha sido dominada por la influencia que han tenido en mí mis familiares cercanos, que en el caso de esta particular familia, llegan a conformar hasta los hijos de los primos de mis padres. Mis primeros años de vida transcurrieron en una casa que estaba a pasos de la nonna Rina y el tío Dante, quienes se encargaron de despertar en mí la imaginación y la capacidad para jugar tardes enteras en torno a realidades inventadas, siempre con la cuota de orden y criterio de la Nonna. Por el otro lado, estaban los abuelos Gastón e Irene, que nos visitaban desde el fin de Chile durante los meses de invierno y nos regalaban y preparaban para disfrutar, año por medio, de la aventura de viajar a Gumalau, la estancia que marcó mis ideales de vida y mi idea de un paraíso, haciendo del trabajo y la ganadería, un juego que nunca quería terminar. Si pienso en familias especiales, una con 4 padres y 7 hermanos es parte del subconjunto; Vivir a dos casas de distancia de tus primos es algo que debiese ser más frecuente en el mundo.

Comencé a formarme educacionalmente en la Scuola Italiana, donde conocí a parte de los amigos que hasta el día de hoy me acompañan de cerca y lejos. Tomamos caminos diferentes que marchan paralelos, la mejor manera de mantenerlos cerca. Ahí conocí también de la disciplina deportiva a través el básquetbol y lo que significa disfrutar de sus éxitos y fracasos año a año, algo que nunca podré dejar de lado. Entre los aportes de profesores muy queridos y el traspaso de las experiencias de mis padres y tíos,

apareció la biología como un instrumento para descubrir y entender el mundo en el que vivo. Las preguntas empezaron a encontrar una respuesta y siempre se abrían mayores y nuevas interrogantes. Llegó el momento de decidir qué quería estudiar. Lo único claro era que el camino seguro seguía de la mano de la Ciencia. Viendo el ejemplo que ya habían validado mis papás, elegí la Universidad de Chile como la institución de la cual quería formar parte y encontré, casi por casualidad, una carrera con un nombre que ningún amigo ha logrado recordar ni repetir, pero que me entregó todas las herramientas que necesitaba para resolver mis preguntas y abrir nuevos desafíos. Ahí mismo conocí un nuevo mundo de amigos con quienes compartía muchas de las inquietudes, motivaciones y maneras de ver la vida, amigos que pasaron a ser parte indispensable en mi proceso de formación. No sé diferenciar perfectamente en qué minuto y en cuál de todas las historias que vivimos pasaron a ser parte de mi vida, pero les agradezco infinitamente ser parte fundamental de ella.

Hoy, a pasos de convertirme en un profesional (finalmente), me comparo con el que hace 25 años entraba al colegio, con el que hace un poco más de 10 entraba a la Universidad y con el que hace 4 empezaba a trabajar, y veo al mismo en esencia, que disfruta y se cuestiona la vida con las cosas simples, pero que cuenta con la suma de una batería de herramientas (limitada pero en evolución) y una capacidad de aprendizaje reconfigurada, que me permiten desarrollar y cuestionar mis convicciones para buscar y perseguir el futuro en el que quiero vivir mis próximos años.

A Vittorio y Laura,

que construyeron la red de caminos que me llevaron a las puertas de la Ciencia.

A todo el Laboratorio de Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, por haberme permitido desarrollar y aprender de mi Seminario de Título, en especial y principalmente al Dr. Elie Poulin que me aceptó como alumno y guió en este proceso, gracias por el tiempo invertido y compartir sus conocimientos de manera tan abierta. Trabajar en el laboratorio fue siempre una experiencia muy agradable y enriquecedora. A todos quienes hasta ese minuto formaron parte del equipo: Angie Díaz, Marcela Espinoza, Jimena Guerrero, Christian Ibáñez, Claudia Maturana, Constanza Napolitano, Cecilia Pardo, Claudio Quezada y Pilar Salinas. Agradezco de forma particular a Claudio González por su paciencia y dedicación, tanto a enseñar filogeografía y técnicas de ecología molecular como el tiempo invertido en amistad y ocio necesario (espero algún día ver una publicación que explique el fenómeno de la amplificación de citocromo b de *Yoldia*).

Gracias al Dr. David Véliz y a la Profesora Irma Vila, quienes integraron la comisión evaluadora y gentilmente realizaron las observaciones que complementaron este trabajo.

Agradezco al Instituto de Ecología y Biodiversidad por el apoyo y financiamiento de este trabajo a través del proyecto ICM P05-002 PFB 023.

La concreción de este proyecto no hubiese sido posible sin parte de las muestras de tejido y animales proporcionados por Fernando Novoa y el Centro de Ecología Aplicada (CEA).

Finalmente, FINALMENTE!, agradezco el apoyo interminable e incondicional de toda mi familia y amigos, por la paciencia y particular incentivo (Andy, Carla, Caro, Cava, Jocy, Johat, Nacho, Pato, Talo). Gracias por no dejar nunca de creer en mí.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INTRODUCCIÓN.....	1
Origen, diversidad y distribución de la familia Diplomystidae	1
Sistemática del género <i>Diplomystes</i>	4
La filogeografía para estudiar la biogeografía histórica.....	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
Muestreo.....	12
Generación de los datos moleculares.....	14
Marcador D-loop.....	15
Análisis estadísticos y reconstrucción filogeográfica.....	16
RESULTADOS	19
Marcador citocromo b	19
Marcador D-loop.....	20
Análisis filogeográfico	21
DISCUSIÓN	26
CONCLUSIÓN.....	29
BIBLIOGRAFÍA.....	31

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Nombre científico y categoría de conservación de las especies de <i>Diplomystes</i> presentes en las cuencas hidrográficas de Chile	2
Tabla 2. Listado de las 11 especies de peces del Orden Siluriformes presentes en las aguas continentales de Chile.....	3
Tabla 3. Lugar de procedencia, especie afin y número de individuos a analizar	13
Tabla 4. Índices de diversidad molecular del marcador <i>cyt-b</i> por sub-muestras, de acuerdo a los agrupamientos observados	20
Tabla 5. Índices de diversidad molecular del marcador D-loop por sub-muestras, de acuerdo a los agrupamientos observados	20
Tabla 6. Resultado de los componentes del análisis espacial de la varianza molecular.	24

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa geográfico del sitio de origen de las muestras del estudio..... 12
- Figura 2.** Red de haplotipos construida en base a las secuencias obtenidas para *cyt-b* y D-loop. 22
- Figura 3.** Árbol de máxima parsimonia construido a partir de los haplotipos obtenidos para cada localidad muestreada..... 24

LISTADO DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ap	Antes del presente
C	Citosina
<i>cyt-b</i>	Gen del citocromo b
D-loop	Región control mitocondrial
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
G	Guanina
Ma	Millones de años
mtADN	Ácido desoxirribonucleico mitocondrial
NOR's	Organizadores del nucléolo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SAMOVA	Análisis espacial de la varianza molecular
T	Timina

RESUMEN

El hallazgo de peces asociados al género *Diplomystes* en aguas de la cuenca del río Baker, latitud que excede los rangos de distribución descritos para el género, motivaron una revisión del estado taxonómico del grupo por medio de una aproximación filogeográfica del concepto de especie. A través de la utilización de marcadores moleculares y análisis filogeográficos, se logró comparar las secuencias del gen mitocondrial citocromo b (*cyt-b*) y de la región de control (D-loop), de una muestra compuesta por peces provenientes de ríos y lagos de Chile y Argentina, en conjunto con información existente en las bases de datos de GenBank. Los resultados filogeográficos sugieren la existencia de 4 haplogrupos o unidades monofileticas, los cuales apoyan la hipótesis de un único género representante de la familia, compuesto por 4 especies. De las 4 especies reconocidas, 3 serían endémicas de Chile (*D. camposensis*, *D. nahuelbutaensis* y *D. chilensis* o *Diplomystes sp.*), mientras la otra correspondería a los especímenes colectados en las diferentes localidades de Argentina. Este último grupo también incluye los individuos colectados desde aguas del río Baker. Ante la evidencia de la existencia de individuos de la misma especie a ambos lados de la Cordillera de los Andes, se plantea la hipótesis de una colonización postglacial del Río Baker a partir de poblaciones argentinas, facilitada por los procesos de inversión de los cauces de aguas asociados al colapso de los glaciares del Campo de Hielo.

ABSTRACT

The discovery of fish grouped under the *Diplomystes* genus in the basin of the Baker River, an area that exceeds the range of distribution delimited for this species, challenged us to review the taxonomic status of this group by a phylogeographical approach of the concept of specie. Through the usage of genetic markers and phylogeographical analysis, it was possible to compare the sequence of the mitochondrial gene cytochrome b (*cyt-b*) and the control region (D-loop), of a sample of fishes taken from rivers and lakes from Chile and Argentina, together with the information available in GenBank databases. Phylogeographical results suggest the existence of four haplogroups or monophyletic units, which support the hypothesis of a unique genus representative of the family composed by four species. Of these four known species, three would be endemic to Chile (*D. camposensis*, *D. nahuelbutaensis* and *D. chilensis* or *Diplomystes sp.*), whereas the remaining one would belong to the specimen collected in the different localities of Argentina. This last group also includes the individuals collected from waters of the Baker River. From the evidence of the existence of individuals of the same species on both sides of the Andes Mountains, a hypothesis of a post-glacial colonization of the Baker River from Argentinean populations is proposed, a process facilitated by the inversion process of the water beds associated to the collapse of the glaciers from the Southern Patagonian Ice Field.

INTRODUCCIÓN

Origen, diversidad y distribución de la familia Diplomystidae

Los peces del orden Siluriformes son comúnmente llamados "peces gato" o "bagres", nombres bajo los cuales son conocidas unas 37 familias de amplia distribución en el mundo. Existen distintas hipótesis sobre el origen del orden aceptándose, como la más probable, la de un origen gondwánico (Myers, 1967) o sudamericano (Novacek y Marshall, 1976), con una posterior dispersión hacia Europa y Asia. La mayoría de la evidencia fósil apoya esta hipótesis, ya que los primeros registros del orden pertenecen a depósitos del Cretácico tardío (Campaniano-Maestrichtiano) encontrados en Norteamérica (Formación Fox Hill), Bolivia (Formación el Molino) y Argentina (Formación Los Alamitos) (Arratia y Gayet, 1995; Cione y Prasad, 2002). En las cuencas hidrográficas de Chile, los Siluriformes constituyen el grupo de peces más diverso, tanto a nivel de familias como de géneros, con un total de 11 especies distribuidas desde el extremo norte del país hasta Tierra del Fuego. Tres de ellas pertenecen a la familia Diplomystidae, reconocida por retener un gran número de características morfológicas pleisomórficas del grupo de los Siluriformes, por lo que es considerada basal dentro del orden (Lundberg y Baskin, 1969; Fink y Fink, 1981; Arratia, 1987; Hardman, 2005). El registro fósil da también cuenta de la existencia del género *Diplomystes* en Sudamérica desde el Cretácico (Arratia y Cione 1996). En la actualidad, esta familia monogénica es endémica de la fauna dulceacuícola de la región austral de Sudamérica, encontrándose sólo en ríos y lagos de Chile y Argentina. Hasta el momento se reconocen 6 especies del género *Diplomystes*: *D. chilensis* Molina 1782, *D. nahuelbutaensis* Arriata 1978 y *D. camposensis* Arriata 1978 (Habit y

col., 2006) presentes exclusivamente en Chile y *D. mesembrinus* Ringuet 1982, *D. cuyanus* Ringuet 1965 y *D. viedmensis* MacDoagh 1931 en Argentina.

Tabla 1. Nombre científico y categoría de conservación de las especies de *Diplomystes* presentes en las cuencas hidrográficas de Chile, basado en Campos y colaboradores (1998): (V) Vulnerable, (P) En peligro de extinción o extinto, (I) Insuficientemente conocida.

Especie	XV	I	II	III	IV	V	RM	VI	VII	VIII	IX	XIV	X	XI	XII
<i>D. chilensis</i>					P	P	P								
<i>D. nahuelbutaensis</i>								I	I	P	P				
<i>D. camposensis</i>											V	V	V		

Las tres especies de *Diplomystes* presentes en Chile, se distribuyen alopátricamente en sentido latitudinal habitando los ríos y lagos de la zona comprendida entre las regiones IV y X (**Tabla 1**). Todos los *Diplomystes* chilenos se encuentran en la lista de especies vulnerables o en peligro de extinción dada la degradación de hábitats, alteración de los sistemas fluviales y la introducción de especies exóticas (Campos y col., 1998; Dyer, 2000). En el caso de *D. chilensis*, a pesar de campañas de recolección de peces en su zona de distribución, la ausencia de registro reciente sugiere su posible extinción.

Recientemente campañas realizadas para el levantamiento de línea de base del proyecto Hidroaysén, encontraron especímenes morfológicamente diagnosticados como representantes afines al género *Diplomystes* en el río Baker donde, hasta la fecha, no se había reportado la presencia de peces del género.

Tabla 2. Listado de las 11 especies de peces del Orden Siluriformes presentes en las aguas continentales de Chile. El endemismo está referido a peces de agua dulce de Chile, incluyendo las provincias biogeográficas Chilena, Patagónica y Tílica (sensu Dyer 2000). Las categorías de conservación están basadas en Campos y col. (1998).

FAMILIA	ESPECIE	ENDÉMICA	CATEGORÍA DE CONSERVACIÓN
Nematogenyidae	<i>Nematogenys inermis</i> (Guichenot 1848)	Sí	Peligro Extinción
Trichomycteridae	<i>Bullockia maldonadoi</i> (Eigenmann 1928)	Sí	Peligro Extinción
	<i>Trichomycterus areolaus</i> (Valenciennes 1840)	No	Vulnerable
	<i>Trichomycterus chiltoni</i> (Eigenmann 1928)	Sí	Peligro Extinción
	<i>Trichomycterus rivulatus</i> (Valenciennes 1840)	Sí	Rara
	<i>Trichomycterus chungaraensis</i> (Arratia 1983)	Sí	Peligro Extinción
	<i>Trichomycterus laucaensis</i> Arratia (1983)	Sí	Peligro Extinción
	<i>Hatcheria macraei</i> (Girard 1855)	No	Rara
Diplomystidae	<i>Diplomystes chilensis</i> (Molina 1782)	Sí	Peligro Extinción
	<i>Diplomystes nahuelbutaensis</i> (Arratia 1987)	Sí	Peligro Extinción
	<i>Diplomystes camposensis</i> (Arratia 1987)	Sí	Vulnerable

Sistemática del género *Diplomystes*

Existe un número limitado de estudios filogenéticos del grupo y aún no se ha llegado a un consenso sobre el número de taxos que lo componen ni la posición que deberían tener en la filogenia del orden. La identificación y caracterización de las especies se ha realizado principalmente en base a caracteres morfológicos de difícil diagnóstico (e.g. morfología de los huesos), que resultan en pequeñas diferencias que sólo algunos expertos son capaces de evaluar y clasificar.

La hipótesis aceptada hasta el momento, basada en evidencia morfológica, es que la familia Diplomystidae sería basal, monofilética y el grupo hermano de todo el resto de los bagres (Greenwood y col. 1966; Lundberg y Baskin, 1969; Fink y Fink, 1981, Fink y Fink, 1996; Arratia, 1987; Grande, 1987; De Pinna, 1998). Grande (1987) propone la existencia del suborden Diplomystoidei compuesto únicamente por la familia Diplomystidae. Recientemente estas hipótesis fueron contestadas por el estudio de Sullivan y col. (2006) que, basado en el uso de secuencias de los genes nucleares *rag1* y *rag 2*, concluye que; si bien la familia es monofilética, tal como se había propuesto anteriormente, ésta no sería basal dentro del orden y que sería reemplazada por Loricarioidei. Tradicionalmente la familia Diplomystidae ha sido considerada como monogénica y compuesta por seis especies, tres endémicas de Chile (*D. chilensis*, *D. camposensis* y *D. nahuelbutaensis*), y tres distribuidas en ríos y lagos de Argentina (*D. cuyanus*, *D. viedmensis* y *D. mesembrinus*) (Azpelicueta, 1994; Azpelicueta y col., 1998). Sin embargo, no existe un consenso al respecto y otros investigadores plantean hipótesis alternativas. Arratia (1987), basándose en estudios de sistemática y taxonomía, sostiene que la familia estaría compuesta por dos géneros: *Olivaichthys* y *Diplomystes*. El primero sería monotípico (*O. viedmensis*) de amplia distribución en

Argentina, abarcando la zona entre las provincias de San Juan y Chubut (Arratia y col., 1983). El segundo, presente sólo en Chile, estaría compuesto por las tres especies señaladas, *D. chilensis*, *D. camposensis* y *D. nahuelbutaensis*, que presentarían una distribución alopátrica asociada a la limitada capacidad de dispersión de las especies y la conformación geográfica de cuencas aisladas que muestran los ríos y lagos de la zona oeste de la Cordillera de los Andes (Campos y col., 1997). A estas tres especies mencionadas, Arratia (1987) agrega que individuos encontrados en los ríos Copequén, Tinguiririca y Maule serían distintos morfológicamente a los restantes de la especie, sin embargo, dado el bajo número de muestras y antecedentes, no aclara la posición sistemática relativa y los deja catalogados como *Diplomystes* sp. Esta hipótesis taxonómica es contestada en su conjunto por Sullivan y col. (2006) argumentando que, sumado a la gran similitud morfológica observada entre todos los ejemplares de *Diplomystes*, la diferencia encontrada entre secuencias del gen nuclear *rag* de individuos de dos especies de los géneros propuestos anteriormente (*Olivaichthys* y *Diplomystes*) es menor al ~0,1%, lo que es al menos un orden de magnitud menor a lo encontrado en cualquier otra comparación entre otras dos especies congénicas del orden Siluriformes (Sullivan y col., 2006).

Genéticamente, a nivel de cariotipos, se ha determinado que la familia Diplomystidae posee un número cromosómico conservado $2N=56$. A través de la ubicación de los organizadores del nucléolo (NOR's) y el bandeo C, se ha logrado distinguir entre individuos de las especies *D. nahuelbutaensis*, *D. camposensis* y *D. mesembrinus* (Campos y col., 1997; Oliveira y Gosztonyi, 2000).

A nivel filogenético, como es de esperarse dada la controversia existente entre las diversas teorías sistemáticas formuladas, no se han logrado esclarecer las relaciones

existentes entre las especies de *Diplomystes*. Arratia (1987) propone una filogenia para el género a partir de caracteres morfológicos, utilizando como grupo externo a *Olivaichthys* y concluye que el género *Diplomystes* sería monofilético, con *D. camposensis* como especie basal.

La filogeografía para estudiar la biogeografía histórica

Consecuencia de la particular conformación geográfica que muestran los sistemas dulceacuícolas de Chile y Argentina, es probable que muchas de las preguntas relacionadas con la actual distribución y diversidad de la biota asociada puedan ser respondidas a través de análisis biogeográficos y filogeográficos.

El origen y posterior desarrollo de los sistemas hídricos, determinado por fenómenos físicos ocurridos durante la historia geológica de la zona, resultaron en la conexión o aislamiento de éstos, influyendo en la historia evolutiva de la biota asociada. En este sentido la distribución actual de la ictiofauna asociada a los cursos de agua continentales es el reflejo de eventos vicariantes provocados por el surgimiento de barreras físicas que han resultado en la fragmentación de las masas de agua, aislando unas, de otras. La existencia y distribución de algunas especies de peces dulceacuícolas en la subregión Austral de diferentes géneros como *Trichomycterus*, *Percichthys* y *Cheirodon*, tanto en Argentina como en Chile, ha sido tomada como evidencia de la relación geográfica histórica que existió entre las cuencas habitadas por estos peces (Arratia y col., 1983; Dyer 2000). El caso de las especies de la familia Diplomystidae no es diferente a esta generalización; autores como Azpelicueta (1994), Dyer (2000) y Ruiz y Berra (1994) proponen que este modelo es el que mejor explica los patrones biogeográficos asociados a las distintas especies existentes. Por una parte, se ha propuesto que el surgimiento de la Cordillera de los Andes que comenzó a principios del Mioceno (23 Ma), fue de por sí un evento vicariante que podría haber separado taxas con una distribución continua, aislándolas y generando eventos de especiación que habrían dado como resultado los números y distribución actual de las especies presentes (Lundberg y Chernoff, 1992). Por otra parte, la alternancia reiterada

de periodos glaciales e interglaciales durante el Pleistoceno (2.6 Ma-10.000 ap) contribuyeron a producir cambios drásticos en el clima, en la topografía, e incluso en el nivel del mar. Además, durante el Holoceno (10.000 ap – hasta el presente), se han producido en la zona numerosas erupciones volcánicas que han influido en la distribución de las especies a través de la modificación del terreno y los sistemas de drenaje de las cuencas hidrográficas.

El estudio de la distribución geográfica de la diversidad genética constituye un avance fundamental para entender la historia y la evolución de un grupo de especies estrechamente relacionadas. Este objetivo es central en la disciplina de la Filogeografía, la cual ha permitido grandes progresos en el entendimiento de la biogeografía histórica de muchos grupos (Avice y col., 1987). Para el caso de las especies de agua dulce, la interpretación de la distribución de linajes mitocondriales se relaciona estrechamente con los eventos geológicos y climáticos que han determinado la evolución de las cuencas junto con las características biológicas de las especies, tales como, su potencial migratorio o comportamiento reproductivo. Además, en estos ambientes, se debe tomar en cuenta la influencia de las actividades antrópicas sobre las poblaciones y su hábitat (Gallo y Sarmiento, 2003).

Para estudiar procesos históricos que pueden haber originado la distribución geográfica actual de los individuos, se debe considerar que los patrones observados se asocian con la genealogía de los individuos y describen señales de estructuración genética dentro y entre especies. Eventos como expansiones en el tamaño poblacional, cuellos de botella, vicarianza y migración, pueden ser inferidos a través de análisis filogenéticos. Mediante modelos que integran teorías de coalescencia, historia genealógica de los alelos e información de distribución de los individuos, se puede

asociar precisamente los roles de cada una de estas fuerzas en la formación de los patrones observados actualmente (Avice, 2000).

Una manera de lograr recopilar la información necesaria para trabajar en filogeografía, es considerar la distribución geográfica de linajes dentro de las poblaciones de una o más especies. Para esto es necesario contar con un marcador molecular ideal que debiera presentar características como: (a) ser distinguible y ampliamente distribuido para asegurar que se puedan establecer comparaciones de homología entre la gran variedad de organismos existentes; (b) que sea fácil de aislar y manipular; (c) tener una estructura molecular simple; (d) presentar un modo de heredabilidad que evite la recombinación y otras formas de rearrreglos genéticos; (e) evolucionar a una tasa que permita considerar los caracteres que aparecen en la historia de vida de las especies, a una escala temporal adecuada; (f) presentar un número de estados suficientes que permita establecer relaciones filogenéticas bajo criterios de parsimonia razonables. En gran medida, el ADN mitocondrial de los llamados animales superiores reúne todos estos criterios (Avice y col., 1987). En particular, se ha descrito que el ADN mitocondrial puede mostrar un alto grado de variación incluso a nivel intrapoblacional. Variados estudios han demostrado que la tasa de sustitución es mayor en el ADN mitocondrial que en regiones codificantes del ADN genómico (Brown y col., 1979), lo que le conferiría un nivel resolutivo adecuado para estudios poblacionales.

Dentro del mtADN existe una región de alta variabilidad no codificante que flanquea una región conservada que sirve como origen de replicación para el genoma mitocondrial completo denominada región control mitocondrial (D-loop). En la mayoría de los animales la región D-loop es mucho más variable que el resto del ADN mitocondrial, lo que le confiere características especiales para ser utilizado como

marcador molecular en estudios de divergencia o diferenciación reciente entre poblaciones o especies (Parker y col., 1998). Por estos motivos la región D-loop es utilizada ampliamente en estudios moleculares que intentan encontrar patrones de diversidad y diferenciación genética entre poblaciones, especies e incluso géneros (Ruzzante y col., 2006).

En este estudio, se utilizó la información obtenida a través de la secuenciación de los genes mitocondriales D-loop y *cyt-b*, para resolver la categoría taxonómica de especies del género *Diplomystes* encontradas en muestreos realizados en la cuenca del río Baker y, al mismo tiempo, proponer e integrar la información disponible para el género en una hipótesis biogeográfica que explique la distribución actual de las especies encontrada Sudamérica.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

Las diferentes especies de *Diplomystes* descritas corresponden a linajes independientes restringidos al rango de distribución de cada una de ellas.

La divergencia entre linajes de ambos lados de la Cordillera de los Andes superaría las observadas dentro de Chile o Argentina.

Objetivo general:

- Evaluar las relaciones filogenéticas existentes entre las especies de *Diplomystes* colectadas, a través de análisis de la información obtenida a partir de la secuenciación de los marcadores mitocondriales D-loop y *cyt-b*.

Objetivos específicos:

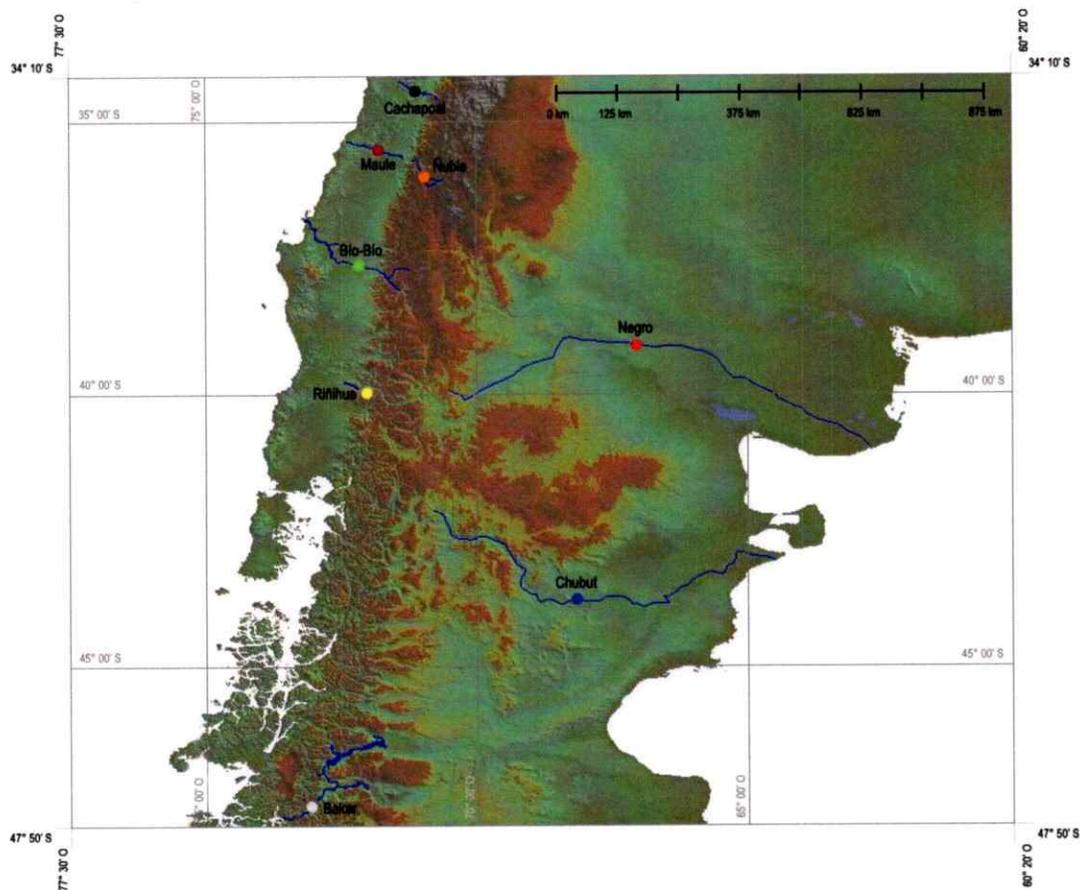
- Determinar el número de linajes independientes del género *Diplomystes* que se encuentran presentes en los sistemas dulceacuícolas chilenos y argentinos.
- Determinar genéticamente a qué especie de *Diplomystes* pertenecen los individuos encontrados en el río Baker.
- Obtener mediante una aproximación biogeográfica nuevas hipótesis taxonómicas para el género *Diplomystes* en base al análisis de las nuevas secuencias obtenidas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se estudió una muestra de 84 individuos conservados y fijados en alcohol 95% de propiedad del Laboratorio de Ecología Molecular de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile. La muestra está compuesta por un grupo de ejemplares completos provenientes de 6 diferentes ríos y lagos de Chile y otro de trozos de tejido de individuos provenientes de 2 ríos de Argentina. La configuración geográfica de los sitios de procedencia de las muestras se detalla en la **Figura 1**.

Figura 1. Mapa geográfico del sitio de origen de las muestras del estudio.



Dado que para establecer las diferencias morfológicas que determinan a qué especie corresponde cada individuo de la muestra resulta extremadamente complejo, en el caso de los individuos completos, e imposible en el caso de las muestras de tejido; la determinación de ésta se realizó en base al lugar de procedencia de la muestra y los patrones de distribución históricos por especie descrito en la literatura.

El número de individuos por especie y la localidad a la que pertenecen se resume en la

Tabla 3.

Tabla 3. Lugar de procedencia, especie afín, y número de individuos a analizar. La especie a la que pertenece cada individuo se basó en el lugar de origen de cada individuo de la muestra.

Lugar de origen	Especie	N
río Baker	<i>Diplomystes sp.</i>	15
río Ñuble	<i>Diplomystes sp.</i>	6
río Maule	<i>Diplomystes sp.</i>	10
río Cachapoal	<i>D. chilensis</i>	2
río Chubut	<i>D. mesembrinus</i>	17
río Negro	<i>D. viedmensis</i>	1
río Biobío	<i>D. nahuelbutaensis</i>	12
lago Riñihue	<i>D. camposensis</i>	21

Para los casos de las muestras obtenidas desde los ríos pertenecientes a la cuenca hidrográfica del Maule (ríos Maule y Ñuble), se ha descrito la presencia de individuos clasificados como *Diplomystes chilensis* y *Diplomystes sp.*, por lo que la clasificación taxonómica llegó sólo a nivel de género.

Hasta la fecha no existían descripciones de distribución de diplomystidos en zonas al sur de la X región. El límite austral de la distribución del género por el lado oeste de la Cordillera de los Andes estaba fijado por la presencia de *D. camposensis* en las hoyas



hidrográficas de los ríos Valdivia y San Pedro, lo que implica que las muestras obtenidas desde la cuenca del río Baker quedaron sin clasificación taxonómica de especie.

Generación de los datos moleculares

Se extrajo ADN de tejido muscular de cada individuo mediante el método salino, diseñado especialmente para la manipulación de ADN genómico y protocolos de PCR (*Polimerase Chain Reaction*) (Aljanabi y Martínez 1997).

A partir del material obtenido de la extracción se amplificó, usando reacciones de PCR, fragmentos de los marcadores moleculares del mtADN citocromo b (*cyt-b*) y región control mitocondrial (D-loop).

Marcador citocromo b

Mediante protocolos de PCR se amplificó fragmentos de 800 pb del gen *cyt-b* del mtADN usando un termociclador Thermo Electron Hybaid Px2.

Para amplificar una fracción del gen *cyt b* se utilizaron los partidores "14841L" (sense) y "600H" (antisense) descritos por Kocher y col. (1989).

La secuencia de cada partidor de *cyt-b* es la siguiente:

14841L: 5' AAA AAG CTT CCA TCC AAC ATC TCA GCA TGA TGA AA 3'

600H: 5' TTG TTG GAG CCT GTT TCG TG 3'

Para cada reacción PCR de 25 μ L se utilizó: 2 μ L de dNTPs (2.5 mM), 1,6 μ L de $MgCl_2$ (50mM), 2,5 μ L de Tampón 10x, 1,0 μ L de cada partidor (14841L y 600H) (10 p/ μ L), 0,3 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L), 15,6 μ L de agua microfiltrada y 2 μ L de ADN de cada

individuo (50 ng/ μ L). Las condiciones de reacción elegidas fueron: una denaturación inicial de 4 minutos a 95 °C; 30 ciclos de denaturación durante 1 minuto a 95 °C, alineamiento durante 1 minuto a 59 °C y elongación durante 1,5 minutos a 72 °C, seguidos por una elongación final de 7 minutos a 72 °C.

Los fragmentos obtenidos fueron purificados mediante el kit de purificación "QIAquick" de Qiagen (Canadá) para luego ser enviados a secuenciar a MacroGen Inc. (www.macrogen.com). La secuenciación de los amplificadores se realizó únicamente en el sentido 5'-3'.

Para verificar que la información obtenida de la secuenciación de los fragmentos amplificadores fuera la deseada, ésta se contrastó con la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information), mediante el programa BLAST usando el algoritmo de búsqueda blastn.

Marcador D-loop

Mediante protocolos de PCR se amplificaron fragmentos de 850 pb de la Región Control del mtADN usando un termociclador Thermo Electron Hybaid Px2.

Dado que no existen partidores para D-loop diseñados especialmente para *Diplomystes*, se utilizó oligonucleótidos probados anteriormente para bagres del género *Trichomycterus* (*T. areolatus*), adecuando los protocolos para los intereses de este estudio. La utilidad de estos partidores ha sido probada con anterioridad y se ha verificado que éstos funcionan apropiadamente para amplificar genes mitocondriales de *Diplomystes* (datos no publicados).

La secuencia de cada partidor de la región control del ADN mitocondrial de *T. areolatus* es la siguiente:

tRNA-Pro partidor sense (Peje F): 5' CCT AAC TCC CAA AGC TAG GAT 3'

tRNA-Phe partidor antisense (Bagre R): 5' TGC GGA TAC TTG CAT GTA TAA 3'

Para cada reacción PCR de 25 μ L se utilizaron: 2 μ L de dNTPs (2,5mM), 1,6 μ L de MgCl₂ (50mM), 2,5 μ L de Tampón 10x, 1.0 μ L de cada partidor (Peje F y Bagre R) (10 p/ μ L), 0,3 μ L de Taq polimerasa (5 U/ μ L), 15.6 μ L de agua microfiltrada y 1 μ L de ADN de cada individuo (50 ng/ μ L). Las condiciones de reacción utilizadas fueron: una denaturación inicial de 4 minutos a 95 °C; 30 ciclos de denaturación durante 1 minuto a 95 °C, alineamiento durante 1 minuto a 59 °C y elongación durante 1,5 minutos a 72 °C, seguidos por una elongación final de 7 minutos a 72 °C.

Los fragmentos obtenidos fueron purificados mediante el kit de purificación "QIAquick" de Qiagen (Canadá) para luego ser enviados a secuenciar a Macrogen Inc. (www.macrogen.com). Los amplificados obtenidos fueron secuenciados únicamente en el sentido 3'-5'.

Al igual que con el marcador *cyt-b*, la información obtenida de la secuenciación de los fragmentos amplificados fue contrastada con la base de datos del NCBI mediante el programa BLAST usando el algoritmo de búsqueda blastn. Cada secuencia obtenida fue editada, corregida y alineada en el programa Proseq v2.91 (Filatov 2002).

Análisis estadísticos y reconstrucción filogeográfica

Dado que ambos marcadores elegidos para este estudio pertenecen al genoma mitocondrial y se comportan como un mismo loci, probada la ausencia de

recombinación genética en la zona durante la reproducción sexual de los animales, se decidió realizar los análisis utilizando como información de entrada la base de datos generada a partir de la concatenación de ambos marcadores.

Como una aproximación poblacional para definir grupos de poblaciones geográficamente homogéneas y máximamente diferenciadas unas de otras, se realizó un análisis espacial de la varianza molecular de la muestra utilizando el programa SAMOVA 1.0 (Dupanloup, y col. 2002)

Se determinaron las relaciones genealógicas construyendo redes de haplotipos en base a los sitios polimórficos encontrados en todas las secuencias obtenidas utilizando el algoritmo "Median-Joining" (incluido en el programa Network v4.5) (Bandelt y col. 1999).

Una vez establecido el posible número de haplogrupos representados en la muestra, los índices estándar de diversidad molecular [diversidad haplotípica (h), número de haplotipos (K), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π)] serán calculados para cada grupo de haplotipos, usando el programa DnaSP v 5.00.07 (Rozas y col. 1995).

Para proponer una hipótesis filogenética del grupo se construyó un árbol de máxima parsimonia en el programa MEGA v4.0 (Tamura y col. 2007), que selecciona entre 100.000 iteraciones el cladograma filogenético que requiera menor cambio evolutivo y explique la diferencia entre los datos obtenidos. Como el objetivo está orientado a distinguir únicamente los diferentes grupos que componen el género, no se utilizó secuencias de otros organismos para enraizar el cladograma obtenido.

Para establecer la proporción de sitios nucleotídicos en que difieren dos grupos de secuencias al ser analizadas, se calculó la "*p distance*" dividiendo el número sitios nucleotídicos diferentes de cada grupo, por el número total de sitios comparados entre secuencias. En este análisis no se considera la diferencia que pudiese resultar de la múltiple sustitución de un mismo sitio polimórfico, su tasa de sustitución, ni las diferencias que pudiesen existir entre las tasas de evolución entre sitios. Este indicador permite obtener una aproximación a la distancia genética observada entre los diferentes grupos obtenidos.

RESULTADOS

Marcador *citocromo b*

El resultado de la secuenciación y posterior edición de las secuencias de *Diplomystes* para el marcador *cyt-b*, fueron fragmentos de 498 pb correspondientes a 68 individuos distintos

Se encontró un total de 28 sitios polimórficos que definieron 15 distintos haplotipos. En 26 de los 28 sitios polimórficos detectados, las mutaciones encontradas fueron sinónimas. En otros 2 sitios se encontró 1 mutación en 2 individuos que cambió la composición aminoacídica de la proteína codificada. Una correspondió a una transversión de citocina por una adenina en la posición relativa 427 de un individuo, produciendo una mutación neutra reemplazando una leucina por una isoleucina en la posición 143 de la estructura primaria de la proteína. La segunda correspondió a la transición de una timina por una citocina en la posición relativa 344 de un individuo diferente, reemplazando una metionina por una treonina en la posición 115 de la secuencia aminoacídica de la proteína. Los índices de diversidad molecular para el marcador de la muestra se resumen en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Índices de diversidad molecular del marcador *cyt-b* por sub-muestras, de acuerdo a los agrupamientos observados en la red de haplotipos de la figura 2. Número de individuos analizados (N), número de haplotipos (K), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π).

Índices de diversidad	Riñihue	Biobío	Baker-Chubut Negro	Maule-Cachap. Ñuble
N	21	12	20	14
K	2	4	2	5
S	1	5	1	6
H	0,095	0,727	0,189	0,736
π	0,00019	0,0021	0,00038	0,0048
Π	0,095	1,045	0,189	2,374

Marcador D-loop

Como resultado de la secuenciación y edición de las secuencias de *Diplomystes* para el marcador D-loop, se obtuvieron fragmentos de 770 pb correspondientes a 61 individuos distintos donde se encontraron un total de 33 sitios polimórficos que definieron 23 haplotipos. Los índices de diversidad molecular para el marcador D-loop de la muestra se resumen en la **Tabla 5**.

Tabla 5. Índices de diversidad molecular del marcador D-loop por sub-muestras, de acuerdo a los agrupamientos observados en la red de haplotipos de la figura 2. Número de individuos analizados (N), número de haplotipos (K), número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π).

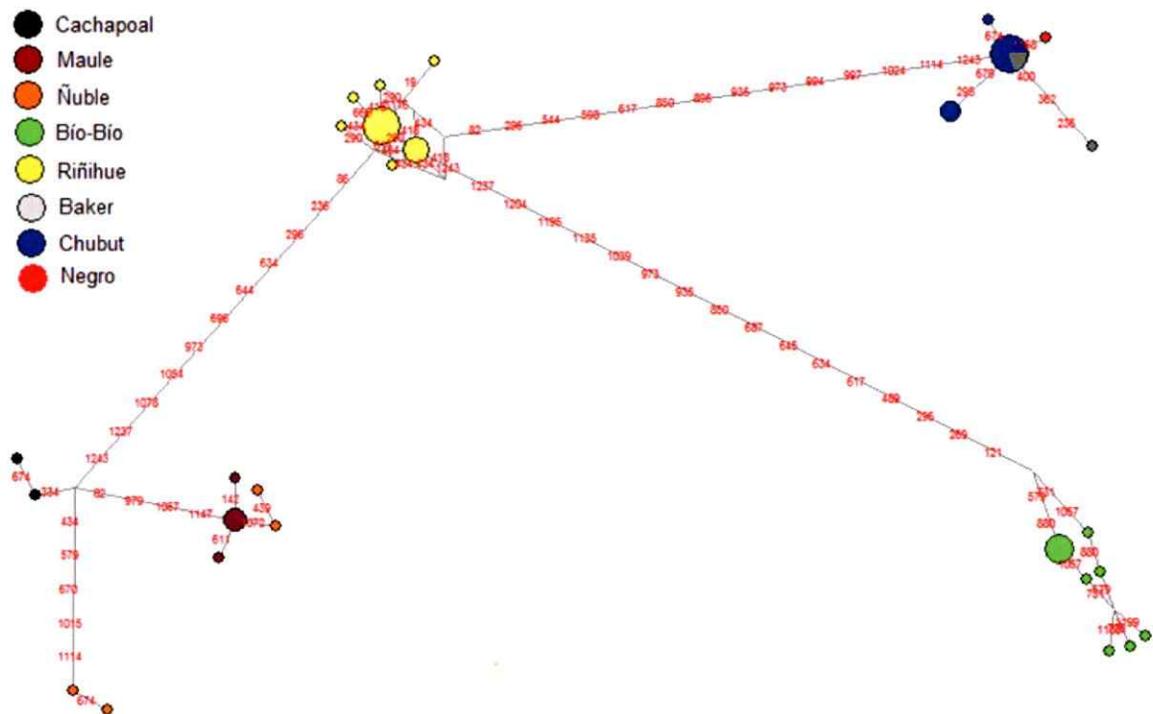
Índices de diversidad	Riñihue	Biobío	Baker-Chubut Negro	Maule-Cachap. Ñuble
N	20	12	17	12
K	7	4	4	8
S	6	3	6	9
H	0,711	0,652	0,493	0,848
π	0,001	0,001	0,001	0,004
Π	0,895	1,000	1,088	2,500

Análisis filogeográfico

El análisis espacial de la varianza molecular (SAMOVA) de los datos obtenidos de muestra se resume en la **Tabla 6**. Estadísticamente SAMOVA muestra que, la maximización de la varianza encontrada en la muestra se obtiene cuando se consideran como unidades de comparación 4 agrupamientos de datos. Dicha separación explicaría un 83,14% de la varianza, determinada por la diferencia establecida entre grupos, porcentaje que se vuelve significativamente menor cuando se supone la existencia de dos o tres grupos de datos relacionados. La estructuración está medida según los porcentajes de la varianza que se explican por la comparación de los agrupamientos elegidos. Cuando se fuerza el indicador para que se compare la varianza de únicamente dos bloques, el resultado es el agrupamiento de las localidades de Cachapoal, Maule y Ñuble por una parte y de Baker, Chubut, Biobío y Riñihue. Al trabajar con tres bloques, el agrupamiento resultante es de las localidades de Cachapoal, Maule, Ñuble y Riñihue, un segundo que incluye a Baker y Chubut y un tercero que aísla a la localidad de Biobío. Por último, al trabajar con cuatro bloques, el resultado es el agrupamiento de las localidades de Cachapoal, Maule y Ñuble por una parte, Baker y Chubut en un segundo grupo, y el aislamiento en dos unidades diferentes que se corresponden con las especies muestreadas desde los ríos Riñihue y Biobío. Esta partición, tal como se observa en los datos resumidos en la **Tabla 6**, explica el mayor porcentaje de la variación entre grupos y minimiza la variación encontrada en el análisis intragrupos. De esta manera, se asume que la estructuración observada en los datos se ve mejor explicada cuando se considera la existencia de 4 grupos de peces asociados con las localidades de muestreo.

Como resultado del análisis con el algoritmo "Median-Joining" de los 28 polimorfismos de las secuencias amplificadas para cada individuo colectado, se obtuvo la red de haplotipos de la **Figura 2**, que muestra, una marcada correspondencia entre el lugar de procedencia y el tipo de secuencia obtenida. Cada haplotipo se asoció directamente a la localidad de muestreo, los que a su vez, están en directa relación con los agrupamientos y la estructuración observada mediante el análisis espacial de la varianza molecular de los datos.

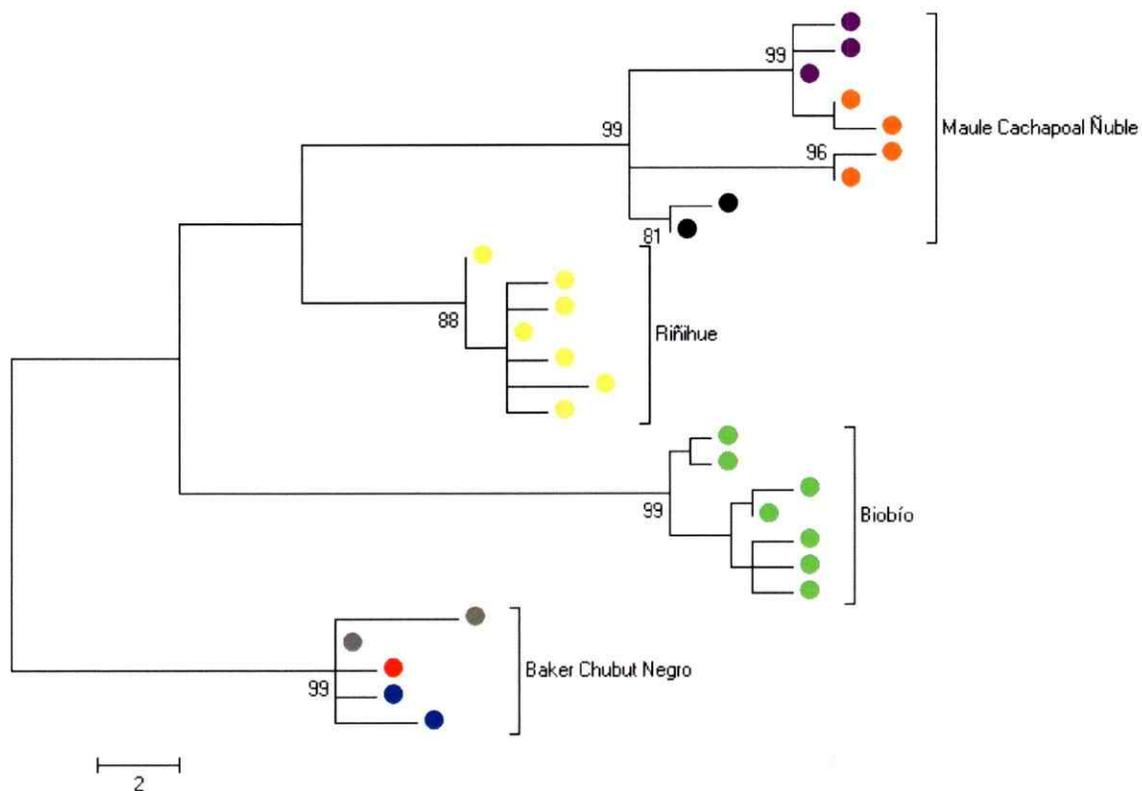
Figura 2. Red de haplotipos construida en base a las secuencias obtenidas para cytb y D-loop. Cada haplotipo o tipo de secuencia es representada por un círculo de tamaño proporcional a su frecuencia. Los colores indican la localidad a la que pertenecen. Sobre la línea que une los diferentes haplotipos, correspondiente a la distancia mutacional, se indica en rojo la posición de las mutaciones existentes entre ellos.



Los agrupamientos señalados anteriormente corresponden a: un primer grupo (color amarillo) formado por todas las secuencias provenientes del lago Riñihue; un segundo grupo (color verde), corresponde a todas las secuencias obtenidas a partir de individuos capturados en el río Biobío; un tercer grupo (colores azul, rojo y gris), se asocia a las secuencias obtenidas para individuos de los ríos Chubut, Negro y Baker respectivamente; por último existe una cuarta agrupación de las secuencias (colores naranja, negro y morado), que reúne haplotipos de individuos colectados desde los ríos Ñuble, Cachapoal y Maule respectivamente, de donde se desprende un conglomerado de dos haplotipos provenientes del río Ñuble que presentarían un alto grado de diferencia con otras secuencias recabadas de individuos colectados tanto del mismo río, como de los ríos Cachapoal y Maule que, según éste análisis, presentarían un alto grado de similitud. Sólo se encontraron haplotipos compartidos entre localidades para los casos de los ríos Baker y Chubut.

Al construir los árboles de máxima parsimonia, el resultado es el observado en la **Figura 3**. Los agrupamientos resultantes se correlacionan directamente con lo observado en las redes de haplotipos. Cada rama del árbol construido está apoyada por un alto sustento estadístico, que agrupa claramente a los individuos en función de las localidades de muestreo.

Figura 3. Árbol de máxima parsimonia construido a partir de los haplotipos obtenidos para cada localidad muestreada.



La **Tabla 6** resume los datos calculados mediante SAMOVA en función del número agrupamientos a comparar estadísticamente según su varianza genética y estructuración geográfica.

Tabla 6. Resultado de los componentes del análisis espacial de la varianza molecular que separa las poblaciones en agrupaciones en directa relación con la localidad muestreada.

	Dos grupos	Tres grupos	Cuatro grupos
Entre grupos	28,89%	45,88%	83,14%
Entre poblaciones de los grupos	64,41%	46,88%	9,17%
Entre individuos	6,70%	7,24%	7,69%

La Tabla 7 resume los valores de "p-distance" calculados para cada par de secuencia entre los 4 grupos seleccionados, resultado de los análisis de máxima parsimonia y SAMOVA. Los valores resultan similares independiente del par de localidades comparadas.

Tabla 7. Diferencia nucleotídica establecida a través de "p-distance" para las secuencias promedio asociadas con los agrupamientos encontrados según las localidades de muestreo.

	Riñihue	Biobío	Baker Chubut Negro
Riñihue			
Biobío	0,0174		
Baker Chubut Negro	0,0148	0,0211	
Cachapoal Ñuble Maule	0,0139	0,0202	0,0199

DISCUSIÓN

De los análisis genéticos realizados, mediante 3 aproximaciones diferentes, se observa la existencia de 4 bloques de haplotipos diferentes entre ellos. Tres grupos pertenecen a individuos muestreados únicamente desde ríos chilenos. En otros dos quedan aislados los individuos de Biobío y Riñihue en concordancia con las propuestas taxonómicas planteadas a la fecha, que asocian a *D. nahuelbutaensis* con el río Biobío y a *D. camposensis* al lago Riñihue. Los datos de peces obtenidos de los ríos Maule, Cachapoal y Ñuble agrupan en una unidad, posiblemente relacionados con la presencia de *D. chilensis* o *Diplomystes sp.* reportada por Arratia (1987). Un cuarto grupo incluye individuos tanto de Argentina como de Chile. En éstos solo se encontraron haplotipos compartidos entre individuos muestreados desde los ríos Baker y Chubut. Adicionalmente se pueden incluir los individuos muestreados desde el río Negro, lo que indicaría que todos pertenecen a la misma especie.

La diferencia encontrada entre ellos y la conformación de los 4 grupos además se sustenta en la distancia genética equivalente encontrada entre los agrupamientos analizados. El valor de "p-distance" calculado para cada par de localidades, es similar entre ellos, lo que sugiere que la diferenciación de las poblaciones ha ocurrido a tasas semejantes y en vías temporales paralelas, produciendo el aislamiento genético de las diferentes especies que hoy pueblan los ríos del lado chileno y que ésta sería comparable con la especie compartida entre Chile y Argentina. Esta diferencia apoyaría la existencia de un único género a en los ríos de Argentina y Chile.

Los resultados de los análisis filogeográficos sugieren que, dentro de la muestra analizada, existirían al menos 4 linajes independientes en el género *Diplomystes*, con

carácter monofilético. La mayor diferencia encontrada entre individuos de un mismo grupo se observó entre los colectados en los ríos de la zona norte de Chile, donde se ha postulado la existencia de dos especies diferentes: *D. chilensis* (posiblemente extinto) y un grupo postulado por Arratia (1987) como una especie no descrita.

El hallazgo de individuos del género *Diplomystes* en aguas del río Baker desplaza el límite del rango de distribución conocido para las especies del género en al menos 17° de latitud hacia el sur en el territorio chileno. De acuerdo a los análisis genéticos realizados y lo que se observa claramente en la red de haplotipos construida (**Figura 3**), los peces provenientes de las localidades de Chubut y Negro no muestran divergencia comparable a lo observado entre los otros haplogrupos y los individuos de Baker, incluso, el haplotipo correspondiente a las especies encontradas en dicha latitud es compartido con los de los ríos del lado argentino de la distribución del género. Dado este resultado, se postula que la especie presente en Chile y en Argentina sería la misma. Esto implica además que ésta sería la única especie de género compartida entre ríos de ambos países.

Las diferencias encontradas en los individuos muestreados desde ríos de Argentina, a los que se suman los del río Baker, no son suficientes para sustentar la hipótesis de la existencia de especies diferentes en Argentina. Si, al igual que en Chile, la distribución de las especies está directamente relacionada con las cuencas hidrográficas, los resultados apuntan a la existencia de una única especie con un amplio rango de distribución. El aislamiento genético entre poblaciones de diplomístidos producido en Chile como resultado de la separación física de las cuencas hidrográficas de los ríos que corren de este a oeste a lo largo del territorio, pudiese no ser determinante en el



caso del territorio Argentino. Los cursos de agua al este de la Cordillera de los Andes recorren mayor distancia, permitiendo la mezcla de las aguas de diversos ríos, lo que configura una red hidrográfica de mayor complejidad. Esta condición física de interconexión de los ríos y hábitats limitaría los procesos de especiación, dando como resultado, una menor diferencia genética observable entre las que hasta hoy se conocen como especies.

La presencia de especies y haplotipos compartidos entre Chile y Argentina sugiere la posible colonización desde un lado de la cordillera hacia el opuesto. Este proceso podría estar relacionado con inversión de cauces de ríos que han sido postulados en trabajos de Turner y colaboradores (2005), donde se mostraría evidencia de cambios en los patrones de desglaciación ocurridos entre el último máximo glaciar y el presente en el flanco este de la Cordillera de los Andes, entre los 46° y 48°, zona que comprendería los rangos de distribución actuales del género, tanto por el lado Chileno, como el Argentino. Se postula que el cauce del río Baker habría desaguado, previo a la última glaciación, hacia el mar Atlántico y que, tras las modificaciones que experimentó el terreno producto del efecto del avance y retroceso de los hielos, éste habría invertido el sentido de desagüe permitiendo la conexión con el mar Pacífico y por ende formando una vía de comunicación entre sistemas dulceacuícolas de Argentina y Chile facilitando una posible colonización con especies que encontraban restringidos sus rangos de distribución a las extensiones de las cuencas hidrográficas existentes.

CONCLUSIÓN

En función de los resultados obtenidos a partir del análisis de las secuencias genéticas de los marcadores D-loop y *cyt-b* del genoma mitocondrial de los organismos de la muestra analizada y, en particular, de la evidencia de existencia de haplotipos compartidos entre individuos provenientes del río Baker y de ríos del lado argentino de la Cordillera de los Andes, se sugiere que los individuos colectados desde aguas del río Baker corresponden a la misma especie de *Diplomystes* que habitan Argentina. No es posible determinar con exactitud a qué especie corresponden, dado que los resultados encontrados abalan una hipótesis taxonómica intermedia a las actualmente planteadas, proponiendo un único género representante de la familia con 4 especies. De las 4 especies reconocidas, 3 serían endémicas de Chile (*D. camposensis*, *D. nahuelbutaensis* y *D. chilensis* o *Diplomystes* sp.) y una cuarta sería compartida entre ríos de Chile y Argentina. A esta última corresponderían los individuos muestreados desde el río Baker, desplazando, hasta al menos este punto geográfico, el rango de distribución conocido para el género. Además de las implicancias referentes a los rangos de distribución del género, la presencia de una cuarta especie aumenta la diversidad del género presente en Chile.

De los datos obtenidos no es posible determinar la relación entre los individuos colectados desde los ríos Cachapoal, Ñuble y Maule con las hipótesis de extinción de *D. chilensis* o la existencia de un nuevo grupo, dada la imposibilidad de contar con material genético de organismos diagnosticados como *D. chilensis*. Para dilucidar este punto se requeriría de un muestreo intensivo de la zona, que permitiera contar con un número significativo de ejemplares, para intentar esclarecer con mayor precisión la

situación taxonómica de las poblaciones de los ríos de la zona intentando integrar en el análisis material genético correspondiente a los individuos tipo de *D. chilensis*.

La presencia de individuos de la misma especie a ambos lados de la Cordillera de los Andes, sin diferencias significativas en cuanto a la cantidad de sitios polimórficos encontrados, plantea la hipótesis de una colonización postglacial del Río Baker a partir de poblaciones argentinas. Este fenómeno tendría sustento en la hipótesis planteada por Turner y colaboradores (2005) basada en la evidencia geológica de la inversión de los cauces de aguas de los ríos que desaguan el Lago General Carrera, ligado al colapso de los glaciares del Campo de Hielo.

BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi, S.M., Martinez, I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nuc. Ac. Res. Rev.* **25**:4692-3.
- Arratia, G. 1983. Preferencias de hábitat de peces siluriformes de aguas continentales de Chile (Fam. Diplomystidae y Trichomycteridae). *Stud. Neotr. Fau. Envir. Rev.* **18**: 217-237.
- Arratia, G. 1987. Description of the primitive family Diplomystidae (Siluriformes, Teleostei, Pisces): morphology, taxonomy and phylogenetic implications. *Bonn. Zool. Mono. Rev.* **24**: 5-120.
- Arratia, G. & Cione, A.L. 1996. The fish fossil record of southern South America. En Arratia, G. (ed.), *The vertebrate fossil record of southern South America*. pp. 9-72. München Geowissenschaft Abhandlungen.
- Arratia, G. & Gayet, M. 1995. Sensory canals and related bones of Tertiary Siluriform crania from Bolivia and North America and comparison with recent forms. *J. Vert. Paleon, Rev.* **15**: 482-505.
- Awise, J.C., Arnold, J.R., Ball, M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J.E., Reeb, C.A. & Saunders, N.C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Ann. Rev. Ecol. Syst. Rev.* **18**: 489-522.
- Awise, J. 2000. Phylogeography. En Awise, J. (ed.), *Phylogeography: The History and Formation of Species*. pp 447-500. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- Azpelicueta, M. 1994. Three East-Andean species of *Diplomystes* (Siluriformes: Diplomystidae). *Ichth. Explo. Fresh. Rev.* **5**: 223-240.
- Azpelicueta M. & Rubilar, A. 1998. A Miocene *Nematogenys* (Teleostei: Siluriformes: Nematogenyidae) from South-Central Chile. *J. Vert. Paleon. Rev.* **18**: 475-483.
- Bandelt H.J., Forster, P. & Röhl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Bio. Evol. Rev.* **16**:37-48.
- Brown, W.M., George, M. & Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNAProc. Natl. Acad. Sci. Rev. **76**: 1967-1971.
- Campos, H., Arratia, G. & Cuevas, C. 1997. Karyotypes of the most primitive catfishes (Teleostei: Siluriformes: Diplomystidae). *J. Zool. Syst. Evol. Res. Rev.* **35**:113-119.
- Cione, A. & Prasad, G. 2002 The oldest known catfish (Teleostei, Siluriformes) from Asia (India, Late Cretaceous). *J. Paleon. Rev.* **76**:190-193.
- De Pinna, M. 1998. Phylogenetic relationships of neotropical siluriformes (Teleostei: Ostariophysii): historical overview and synthesis of hypotheses. En Malabarba, L. R.,



- Reis, R. E., Vari, R. P., Lucena, Z.M & Lucena, C. A. (eds.), Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes. pp. 279-330. Edipucrs, Porto Alegre, Brasil.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol. Rev.* **11**: 71-81.
- Dyer, B. 2000. Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Est. Oceanol. Rev.* **19**: 77-98.
- Filatov, D.A. 2002. PROSEQ: a software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Eco. Not. Rev.* **2**: 621-624.
- Fink, S.V. & Fink, W.L. 1981. Interrelationships of the ostariophysan fishes (Teleostei). *Zoo. J. Linn. Soc. Rev.* **4**: 297-353.
- Fink S.V. & Fink, W.L. 1996. Interrelationships of Ostariophysan fishes. En Stiassny, M. I.J., Parenti, I.R. & Johnson, G.D. (eds.), *Interrelationships of Fishes*, pp. 209-249. Academic press, San Diego.
- Gallo, H. & Díaz-Sarmiento, J. 2003. Variabilidad genética del bagre rayado *Pseudoplatystoma fasciatum* (Pisces: Pimelodidae) en el río Magdalena (Colombia). *Rev. Acad. Colomb. Cienc.* **27**: 599-605.
- Grande, L. 1987. Redescription of *Hypsidoris farsonensis* (Teleostei: Siluriformes), with a reassessment of its phylogenetic relationships. *J. Vert. Paleont. Rev.* **7**: 24-54
- Greenwood, P.H., Rosen, D.E., Weitzman, S.H. & Myers, G.S. 1966. Phyletic studies of teleostean fishes, with a provisional classification of the living forms. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. Rev.* **131**: 341-455
- Habit, E., Dyer, B. & Vila, I. 2006. Estado de conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gay. Rev.* **1**: 100-113.
- Hardman, M. 2005. The phylogenetic relationships among non-diplomystid catfishes as inferred from mitochondrial cytochrome b sequences; the search for the ictalurid sister taxon (Otophysi: Siluriformes). *Mol. Phylog. Evol. Rev.* **3**: 700-720.
- Hebert P.D., Cynwinska A, Ball S.L. & Dewaard, J.R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. Roy. Soc. Lond. Rev.* **270**: 313-321.
- Hebert P.D., & Gregory, T.R. 2005. The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Syst. Bio. Rev.* **54**: 852-859.
- Kocher, T.D., Thomas, K.W., Meyer, A., Edwards, S.V, Pääbo, S., Villablanca, F.X. & Wilson, A.C. 1989. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proc. Nati. Acad. Sci. Rev.* **86**: 6196-6200.
- Lundberg, J.G. & Chernoff, B. 1992. A fossil of the Amazon fish *Arapaima* (Teleostei: Arapaimidae) from the Miocene La Venta fauna of Colombia, South America. *Biotro. Rev.* **24**: 2-14.

- Lundberg, C. & Baskin J. N. 1969. The caudal skeleton of the catfishes, order Siluriformes. *Amel. Mus. Novit. Rev.* **23**: 1- 149.
- Montoya-Burgos, J.I., 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Eco. Rev.* **12**: 1855-1867.
- Myers, G.S. 1967. Zoogeographical evidence of the age of the South Atlantic Ocean. *Stud. Trop. Oceano. Rev* **5** :614-621.
- Novacek, M. & Marshall, L. 1976. Early biogeographic history of Ostariophysan Fishes. *Cop. Rev.* **1**: 1-12.
- Oliveira C, Gosztonyi A.E. 2000. A cytogenetic study of *Diplomystes mesembrinus* (Teleostei, Siluriformes, Diplomystidae) with a discussion of chromosome evolution in Siluriformes. *Caryo. Rev.* **53**: 31–37.
- Parker, P.G., Snow, A.A., Schug, M.D., Booton, G.C. & Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecol. Rev.* **79**: 361-382.
- Rozas, J. & Rozas, R. 1995. DnaSP, DNA sequence polymorphism: an interactive program for estimating Population Genetics parameters from DNA sequence data. *Comput. Applic. Biosci. Rev.* **11**: 621-625.
- Ruiz, V.H. & Berra, T. 1994. Fishes of the high Biobio river of south-central Chile with notes on diet and speculations on the origin of the ichthyofauna. *Ichthyology Explo. Freshw. Rev.* **5**: 5-18.
- Ruzzante, D., Walde, S.J., Cussac, V.E., Dalebout, M.L., Seibert, J., Ortubay, S., & Habit, E. 2006. Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Mol. Ecol. Rev.* **15**: 2949-2968.
- Sullivan, J.P., Lundberg, J.G. & Hardman, M. 2006. A phylogenetic analysis of the major groups of catfishes (Teleostei: Siluriformes) using rag1 and rag2 nuclear gene sequences. *Mol. Phylo. Evo. Rev.* **41**: 636 – 662.
- Tamura, K, Dudley, J, Nei, M & Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Phylo. Evo. Rev.* **24**: 1596-1599.
- Turner, K.J., Fogwill, C.J., McCulloch, R.D. & Sugden, D.E. 2005, Deglaciation of the eastern flank of the north patagonian icefield and associated continental-scale lake diversions. *Geogr. Ann. Rev.* **87**: 363–37.