

UCH-FC
MAG-EBE
S165
C.1

DIVERSIDAD GENÉTICA DE
Galaxias maculatus
EN EL RÍO PASCUA Y EN EL FIORDO CALÉN:
COLONIZACIÓN POSTGLACIAL DE UNA CUENCA
PATAGÓNICA Y CALIBRACIÓN DEL RELOJ MOLECULAR
DE LA ESPECIE

Tesis
Entregada A La
Universidad De Chile
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos
Para Optar Al Grado De
Magíster en Ciencias Biológicas con Mención
en Ecología y Biología Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

María Pilar Salinas González

Abril 2011

Director de Tesis: Dr. Elie Poulin
Codirector: Dr. Patricio Moreno



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

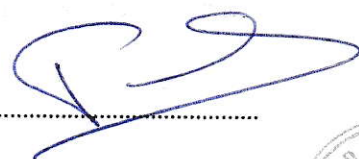
TESIS DE MAGÍSTER

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

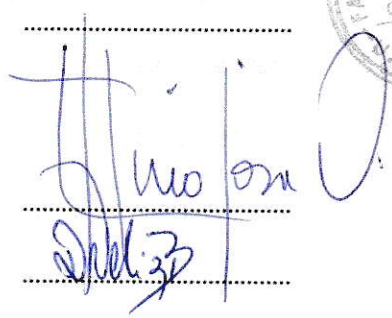
María Pilar Salinas González

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 28/03/2011.

Director de Tesis:
Dr. Elie Poulin



Co-Director de Tesis
Dr. Patricio Moreno



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Felipe Hinojosa

Dr. David Veliz



AGRADECIMIENTOS



Deseo agradecer en primer lugar a mi director de tesis, Dr. Elie Poulin, por haberme permitido trabajar bajo su tutela e insertarme en el área de estudio de la Ecología Molecular. Esta tesis no hubiese sido posible sin haber contado con su confianza y constante apoyo, incluso a pesar de encontrarme lejos durante el período de redacción. Le agradezco también por las largas horas dedicadas a la revisión del manuscrito, y por sus sabios consejos y enseñanzas que dieron sustento al contenido de mi trabajo.

Del mismo modo, agradezco al Instituto de Ecología y Biodiversidad de la Universidad de Chile, por su respaldo entregado al Laboratorio de Ecología Molecular, al alero del cual realicé mi trabajo.

Quisiera agradecer igualmente al Dr. Fernando Novoa y al Centro de Ecología Aplicada de Santiago, por haber aportado las muestras utilizadas en este estudio, así como

informaciones complementarias vitales para esta investigación.

Mis agradecimientos van también a mi cotutor, Dr. Patricio Moreno, por revisar en varias oportunidades el escrito durante su desarrollo, aportando exhaustivas correcciones, observaciones y reseñas que consolidaron la argumentación paleoambiental de esta investigación.

A mis revisores, Dres. Felipe Hinojosa y David Véliz, les agradezco también por el tiempo dedicado a la revisión de esta tesis, y por sus acertadas correcciones sobre el contenido y la forma del trabajo.

Agradezco igualmente a Christian Ibañez, por ayudar en la realización de algunos análisis, por su interés y útiles comentarios aportados a este trabajo. De igual manera quiero agradecer a Claudio González, por su interés y valiosas observaciones, a Claudia Maturana, por su ayuda aportada al avance del trabajo en laboratorio, Marcela Espinoza, por su apoyo y ayuda en el laboratorio, a Jimena Guerrero, Pamela Morales, María José Pérez, por sus sabios consejos, y al resto de mis compañeros del laboratorio de



Ecología Molecular, quienes también me demostraron su apoyo.

Por último, no puedo dejar de agradecer a mi marido y mis padres, quienes nunca dejaron de alentarme y apoyarme para llevar a cabo este trabajo.



ÍNDICE DE MATERIAS



Resumen	1
Abstract	3
1 Introducción	5
2 Materiales y métodos	14
3 Resultados	23
4 Discusión	36
5 Conclusiones	48
6 Bibliografía	51

ÍNDICE DE TABLAS



Tabla 1: Polimorfismos observados entre los 77 haplotipos de <i>G. maculatus</i>	24
Tabla 2: Índices de diversidad Molecular	25
Tabla 3: Resultados del test de F_{st}	28

ÍNDICE DE FIGURAS



Figura 1: Etapas del retroceso del flanco este del Manto de Hielo Patagónico	12
Figura 2: Mapa de origen de las muestras	15
Figura 3: Frecuencias de los haplotipos encontrados en el lago Quetru, en la desembocadura del río Pascua y en la desembocadura del río Baker	26
Figura 4: Relaciones filogenéticas entre haplotipos	27
Figura 5: Distribución del número de diferencias entre pares de secuencias para la población del fiordo (figura 5a) y la del lago (figura 5b)	30
Figura 6: Variación de los tamaños efectivos poblacionales en función del tiempo, según método de Máxima Verosimilitud	32
Figura 7: (a) Árbol filogenético de Máxima Verosimilitud, que incluye los haplotipos encontrados a lo largo de la distribución de <i>G. maculatus</i> en Sud-América. (b) Distribución de frecuencias de los grupos y subgrupos de haplotipos según sitio de muestreo, modificada de Zemlak y col. (2010)	33, 35
Figura 8: Ubicación de los sitios de muestreo dentro de la desembocadura del río Pascua.	42

RESUMEN

Luego del retroceso de los hielos de Patagonia tras el Último Máximo Glacial (UMG), se postula que los nuevos hábitats descubiertos fueron colonizados por inmigrantes provenientes desde las áreas cercanas que permanecieron libres de hielo durante la última glaciación. Sin embargo, pocos estudios han logrado ilustrar estos procesos. En este contexto, el presente trabajo propone reconstruir la historia de una población de peces de un lago postglacial de la Patagonia, así como determinar el origen y el modo de colonización del lago a partir de poblaciones adyacentes. Con este objetivo, se analizó el ADN mitocondrial del pez diadrómico *Galaxias maculatus*, proveniente de Lago Quetru, ubicado en la cuenca del Río Pascua, y del fiordo Calén, en el que desemboca este río.

Una marcada estructuración de la diversidad genética revela la existencia de dos poblaciones diferenciadas, habitando de forma separada el lago y el fiordo. Los bajos niveles de diversidad genética encontrados en el lago, junto a una red de haplotipos en estrella, indican

que la población de Lago Quetru habría pasado por un evento de expansión reciente. En contraposición, la población del fiordo exhibe altos niveles de diversidad y una extensa y compleja red de haplotipos, revelando su antiguo origen. Estos resultados sugieren que la población presente actualmente en el fiordo habría sobrevivido, por lo menos, a la última glaciación, permaneciendo probablemente en el paleolitoral Pacífico. Por otra parte, los patrones de diversidad genética sugieren que la población actual del lago habría sido fundada luego de la desglaciación local a partir de un número probablemente reducido de migrantes provenientes del fiordo.

A base de las fechas propuestas según antecedentes geológicos para la formación de la cuenca del Río Pascua y por lo tanto del lago Quetru, la calibración de la tasa molecular intraespecífica de *G. maculatus* dió un valor de entre 8,3% y 12%, muy superior a las tasas calculadas a partir de estudios filogenéticos en el género *Galaxias*.

ABSTRACT

After the retreat of Patagonian glaciers behind the Last Glacial Maximum, the new habitats exposed were colonized by immigrants coming from surrounding areas that remained uncovered from icesheets during last glaciation. However, few studies have illustrated this process. In this context, the present work propose to reconstruct the story of a fish population inhabiting a Patagonian postglacial lake, as well as determine its origin and the lake's colonization way from adjacents populations. For this, we analized the mitochondrial DNA of the diadromous fish *Galaxias maculatus* coming from Lago Quetru, located in the Río Pascua basin, and from the Calén Fjord, in which this river flows.

A strong genetic structure reveals the existence of two differentiated populations inhabiting separately the lake and the fjord. The low levels of genetic diversity found in the lake, as well as its starlike haplotipe network, indicate that Lago Quetru population would have gone through a recent expansion event. In opposition, the

fjord population exhibit high levels of genetic diversity and an extensive and complex haplotype network, revealing its ancient origin. These results suggest that the fjord population would have survived, at least, the last glaciation, probably remaining in the Pacific paleolittoral. On the other hand, the genetic diversity patterns suggest that the current lake's population would have been founded after the local deglaciation, from a probably reduced number of migrants coming from the fjord.

According to proposed dates for the Río Pascua basin formation, based on geological data, the intraspecific molecular rate calibration of *G. maculatus* throw a value of 8,3%-12%. This value far exceeds the rate values calculated from phylogenetic studies in the *Galaxias* genus.

1. INTRODUCCIÓN

Ciclos glaciales en Patagonia: consecuencias sobre la distribución y diversidad genética de las especies.

Los repetidos ciclos glaciales del Cuaternario (2,5 Ma - presente) provocaron fluctuaciones del volumen y extensión de las capas de hielo en distintos continentes, en particular en las zonas de mayor latitud. Entre ellas se encontraba el Manto de Hielo Patagónico, que, durante los períodos glaciales, cubría la Cordillera de Los Andes casi por completo (Rabassa, 2008). Durante el Último Máximo Glacial (UMG, hace 25.000-17.000 años antes del presente en Patagonia), éste se extendía a lo largo de 1.800 Km desde el norte de la Región de Los Lagos hasta el extremo sur de Tierra del Fuego. Al sur de los 43° S, cubría, muy probablemente, desde el margen oeste marino, como lo indican análisis de estratigrafía de la zona de los fiordos (Da Silva y col., 1997), hasta poco más allá de la Cordillera de Los Andes. Así lo indican las morrenas terminales depositadas por el manto cerca del límite este del lago General Carrera (Hein y col., 2010).

Durante la Última Terminación Glacial, el retroceso de los hielos provocó la separación de esta gran capa en los dos bloques que conforman los Campos de Hielo Patagónico Norte y Sur, dando origen a varias cuencas exorreicas que actualmente drenan hacia el Océano Pacífico (Turner y col., 2005; McCulloch y col., 2000).

Durante cada ciclo glacial se registra un incremento en el volumen de hielo continental, una disminución de las temperaturas superficiales del mar y de la atmósfera a nivel global, además de una disminución del nivel del mar y de la concentración atmosférica de gases de efecto invernadero (Broecker y Denton, 1990). Estos cambios ambientales afectan generalmente la distribución de las especies, pudiendo ocurrir un desplazamiento del rango de distribución hacia zonas que permitan la permanencia de las poblaciones durante las épocas glaciales (Hewitt, 2000, 2004). De otro modo, las especies pueden persistir en áreas geográficas restringidas dentro de su previa distribución, debido a condiciones ambientales locales. Estas áreas han sido comúnmente definidas como refugios glaciales (Provan y Bennett, 2008).

Dentro de Patagonia han podido encontrarse ejemplos de zonas de permanencia, donde especies de lagartijas

(Victoriano y col., 2008; Vidal y col., 2011), plantas (*Hypochaeris palustris*, Muellner y col., 2005; *Fitzroya cupressoides*, Premoli y col., 2000; *Austrocedrus chilensis*, Pastorino y Gallo, 2002), roedores (*Abrothrix olivaceus*, Smith y col., 2001; *Oligoryzomys longicaudatus*, Palma y Col., 2005) y peces (*Galaxias platei*, Ruzzante y col., 2008; Zemlak y col., 2008; *Galaxias maculatus*, Zemlak y col., 2010; *Percichthys trucha*, Ruzzante y col., 2006, 2008), que actualmente ocupan zonas anteriormente cubiertas por glaciales, debieron permanecer, durante el UMG, al norte y/o al este del Manto de hielo Patagónico. Ruzzante y col. (2008) proponen también la existencia de un refugio, en su sentido estricto, ubicado dentro de las discontinuidades del manto de hielo al sur-oeste de Los Andes, para la especie *G. Platei*.

Un proceso inverso ocurre durante las épocas interglaciales, cuando las especies amplían su rango de distribución, ya sea gracias a la aparición de nuevos hábitats disponibles, y/o de nuevas vías de comunicación entre hábitats. En Patagonia se registran expansiones del rango de distribución a partir de las zonas de permanencia previamente citadas, hacia las zonas postglaciales. Por ejemplo, varios peces de agua dulce

(*Percichthys trucha*, Ruzzante y col., 2006; *Galaxias platei*, Zemlak y col., 2008; *Galaxias maculatus*, Zemlak y col., 2010; *Diplomystes mesembrinus*, Poulin com. Pers.) muestran linajes que durante la época glacial se restringían al lado argentino de Patagonia, y que hoy se encuentran también al oeste de Los Andes, gracias al establecimiento de nuevos drenajes que permitieron la colonización de esta zona.

Estos procesos han podido verse tanto a través de registros fósiles, como a través de marcas en la diversidad genética de las especies (Hewitt, 2000, 2004). En regiones donde los registros fósiles indican que ha habido colonización postglacial, las especies han mostrado una baja diversidad genética (Hewitt, 2004), debido a la baja cantidad de mutaciones que han podido acumularse en tan corto tiempo. En cambio, en aquellas regiones que constituyeron antiguos refugios o zonas de permanencia, las poblaciones presentan una mayor diversidad genética, por el hecho de poseer un mayor tamaño poblacional y por su mayor tiempo de coalescencia. Este es el argumento que se ha utilizado para demostrar la antigüedad y sobrevivencia a períodos glaciales de poblaciones de numerosas especies, como aquellas especies de Patagonia anteriormente mencionadas, y otras muchas

pertenecientes, en su mayoría, al hemisferio norte (Wallis y col., 2001; Wares y Cunningham, 2001; Hewitt, 2004).

Al mencionar los cambios en la distribución no se debe olvidar que, en la mayoría de los casos, éstos se asocian a variaciones importantes en la demografía y en general, en la dinámica de las poblaciones (Hewitt, 2004). Estos fenómenos demográficos, como son la extinción de linajes, los cuellos de botella y los efectos fundadores luego de una colonización reciente, también afectan y marcan la diversidad genética de las especies, provocando su erosión (Bernatchez y col., 1989; Ruzzante y col., 2006).

Galaxias maculatus, pez migratorio que habita cuencas patagónicas.

Galaxias maculatus es un pez diadrómico que presenta distribución gondwánica, al igual que la familia Galaxiidae a la que pertenece. El origen de esta distribución ha generado un debate entre quienes sustentan la hipótesis de una fragmentación mesozoica (Croizat y col., 1974; Rosen, 1974, 1978) y quienes apoyan la hipótesis de dispersión transoceánica

(McDowall, 1978, 2002). Esta última hipótesis postula que la amplia distribución alcanzada por los galaxiidae se debería a la capacidad migratoria de aquellas especies de carácter diadrómico. Estudios genéticos han apoyado esta última hipótesis al obtener divergencias entre continentes que datarían de una fecha muy posterior a la fragmentación de Gondwana (Berra y col., 1996, Waters y Burridge, 1999). Sin embargo, los resultados obtenidos por Waters y col. (2000), no permiten descartar del todo el rol de la vicarianza.

En América del sur, *G. Maculatus* se distribuye desde los 33° S hasta Tierra del Fuego, incluyendo zonas andinas y valles que se encontraron cubiertos por el manto de hielo Patagónico durante el Pleistoceno (Cussac y col., 2004, Habit y col., 2010). A lo largo de esta distribución, *G. maculatus* habita lagos, ríos y zonas costeras Atlánticas y Pacíficas, presentando tanto poblaciones lacustres de carácter no migratorio, como también poblaciones migratorias, que descienden a los estuarios a desovar. Es este carácter diadrómico el que hubiese permitido a la especie ocupar ambientes marinos adyacentes a los hielos continentales pleistocénicos (Mc. Dowall, 2002; Zemlack y col., 2010). De hecho, resultados de Zemlack y col. (2010) sugieren que su diversidad y estructura genética

se habrían conservado casi intactas a pesar de los varios ciclos glaciales. Los autores atribuyen toda evidencia de estructuración genética a la barrera frente a la dispersión conformada por la Cordillera de la Costa y al comportamiento no migratorio o diadrómico-filopátrico.

Dentro de las áreas habitadas por *G. maculatus* encontramos la cuenca del río Pascua. Ubicada en la XI Región de Chile, nace durante el retiro de los hielos de la última glaciación pleistocénica, al separarse los Campos de Hielo Patagónicos Norte y Sur. Desde entonces, el Campo de Hielo Sur comienza a drenar hacia el Océano Pacífico a través de este río, el cual, por su historia glacial y por el hecho de desembocar en el Océano Pacífico, conforma un sistema ideal para estudiar los procesos de colonización postglacial en especies migratorias. En 2005, Turner y col. proponen un escenario detallado de la desglaciación de esta zona, estimando a 12.800 años AP la fecha de la ruptura del Manto de Hielo Patagónico (figura 1).

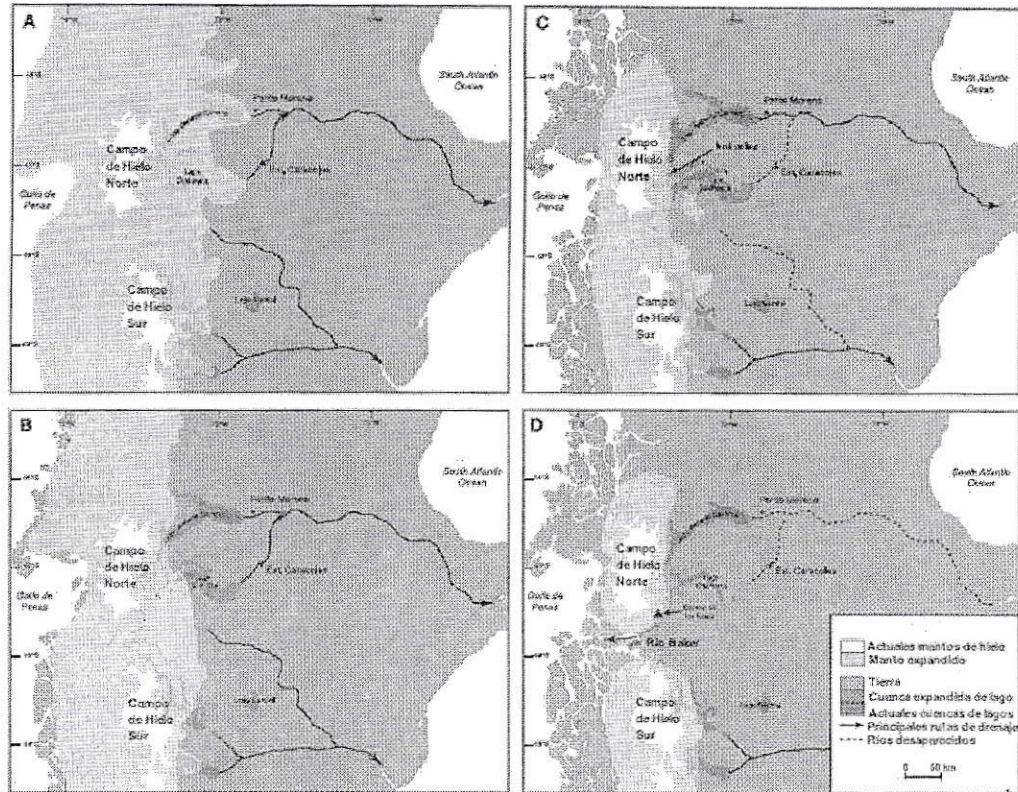


Figura 1: Etapas del retroceso del flanco este del Manto de Hielo Patagónico (figura modificada de Turner y col., 2005.): (A) El máximo glacial, 18.000 años AP (B) Etapa intermedia, donde aparecen los lagos General Carrera y Cochrane drenando hacia el este. (C) Tras un mayor retroceso glacial, reunión de ambos lagos en un solo gran paleolago. (D) Situación luego del quiebre del Manto de Hielo Patagónico y ruptura del dique de hielo que sostenía el paleolago. Tras este evento, datado de 12.800 años AP, se habría iniciado el drenaje de las aguas del paleolago a través del río Baker hacia el Océano Pacífico.

En este estudio buscamos detectar una señal de los últimos períodos glaciales sobre la diversidad genética de *G. maculatus* en la Cuenca del río Pascua. Debido a su carácter diadrómico, planteamos que la especie hubiese podido sobrevivir a los periodos más fríos del

Cuaternario Tardío, permaneciendo en el paleolitoral Pacífico, y (re)colonizar las cuencas formadas luego del retiro de los hielos.

Al postular esta hipótesis, planteamos los siguientes objetivos:

- Utilizando el marcador molecular mitocondrial D-Loop, queremos caracterizar y comparar la diversidad genética de *G. maculatus* en la hoya hidrográfica del río Pascua y en el fiordo Calén, dónde desemboca este río, analizando también el grado de estructuración de esta diversidad.
- A partir de los datos de diversidad genética, pretendemos inferir la historia demográfica de las poblaciones dentro de la zona estudiada, comparando y contrastando la historia glacial local y regional.
- Recopilando las informaciones disponibles de la variabilidad genética de *G. maculatus* en la literatura, nos proponemos reconstruir las relaciones filogenéticas entre los haplotipos encontrados en el presente estudio y los analizados en otras poblaciones en Patagonia chilena y argentina.

2. MATERIALES Y METODOS

Recolección de las muestras:

Las muestras fueron recolectadas durante los veranos 2007 y 2008. Se obtuvo y almacenó en alcohol especímenes de *G. maculatus* provenientes (i) del fiordo Calén, dentro de la desembocadura del río Baker (27 individuos), (ii) del fiordo Calén, dentro de la desembocadura del río Pascua (43 individuos) y (iii) del Lago Quetru, ubicado en la cuenca de Río Pascua (32 individuos), (figura 2).

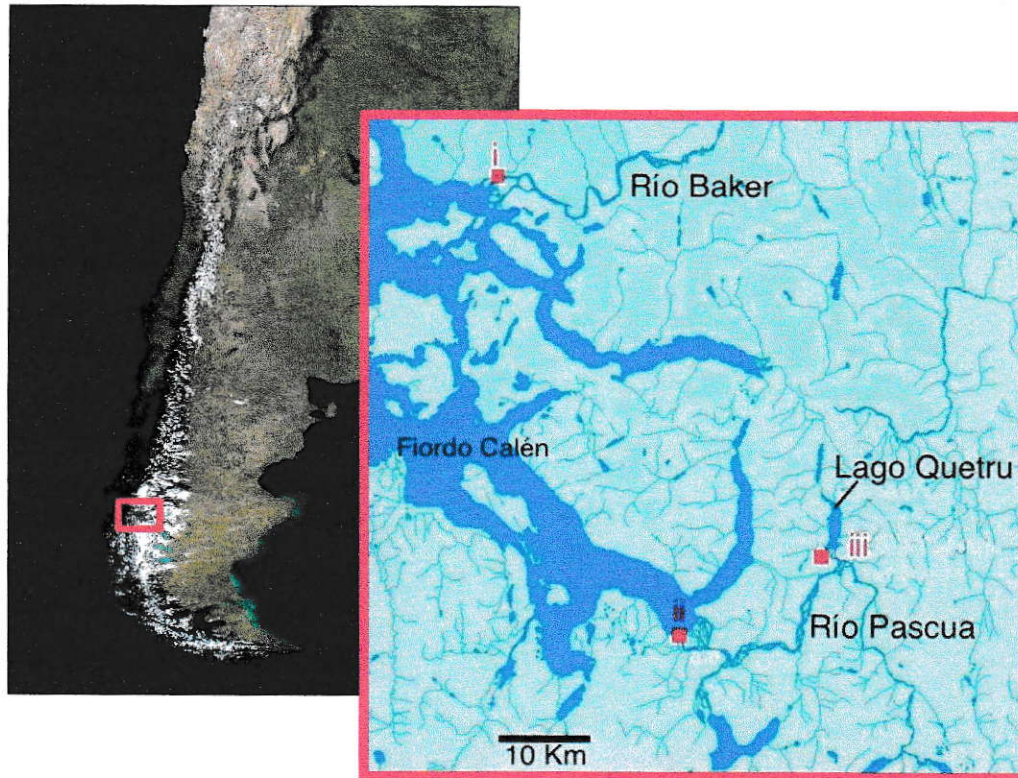


Figura 2: Mapa de origen de muestras. La localización de cada sitio de muestreo se indica con un cuadrado rojo. El sitio (i) se ubica en el fiordo Calén, dentro de la desembocadura del río Baker ($47^{\circ}46' S$, $73^{\circ}34' O$), el sitio (ii) en el fiordo Calén, dentro de la desembocadura del río Pascua ($48^{\circ}13' S$, $73^{\circ}19' O$), y el sitio (iii) se ubica dentro del desagüe del lago Quetru, a 0,4 km de la confluencia con el río Pascua ($48^{\circ}13' S$, $73^{\circ}06' O$).

Obtención de secuencias de la región control del ADN mitocondrial:

Se llevó a cabo la extracción del ADN de cada individuo a partir del tejido muscular, utilizando un protocolo de extracción salina descrito por Aljanabi y Martínez

(1997). El ADN extraído se almacenó a 4°C, para la posterior amplificación y secuenciación de la región control (D-Loop) del ADN mitocondrial.

Un fragmento de alrededor de 1000 pares de bases se amplificó utilizando el par de partidores *GAL-F* (5'TAACTCTCACTCTTAACTCCCAAAG-3') y *GAL-R* (5'TGATAGTAAAGTCA GGACCAAGCC3'), diseñados en nuestro laboratorio a partir de la secuencia completa del ADN mitocondrial de *G. maculatus* (acceso GeneBank AP004104). Para ello, se utilizó un volumen de reacción de 25 µL, que contenía: 2 µL de dNTPs (2.5mM), 1,1 µL de MgCl₂ (50mM), 2,5 µL de Tampón 10x, 2 µL de cada partidador (10 p/µL), 0,25 µL de Taq polimerasa (5 U/µL), 14,15 µL de agua microfiltrada y 1 µL de ADN. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: denaturación inicial de 5 minutos a 94° C; 35 ciclos de: denaturación a 94° C por 30 segundos, anillamiento a 48° C por 30 seg, y extensión a 72° C por 1 minuto, seguidos de una una elongación final de 10 minutos a 72° C.

Los amplicones fueron visualizados en gel de agarosa al 2%, purificados utilizando el kit QIAquick (Qiagen) y luego enviados a MacroGen Inc. (www.macrogen.com) para su secuenciamento bidireccional. Las secuencias forward y

reverse fueron alineadas, ensambladas, y editadas en el programa PROSEQ 2.9 (Filatov, 2002).

Análisis de diversidad genética y estructuración:

Se calcularon diferentes índices de diversidad molecular para cada localidad (número de sitios polimórficos S , número de haplotipos K , diversidad haplotípica H y número promedio de diferencias entre pares de secuencias Π), a través del programa DNAsp 4.1 (Rozas y col., 2003). Se examinó las relaciones filogenéticas de los haplotipos, construyendo una red a través del programa NETWORK 4.5 (Bandelt y col., 1999), usando el algoritmo de "Median-Joining" que favorece las conexiones más cortas durante la reconstrucción.

Se realizó también un análisis de estructuración genética entre pares de localidades calculando el índice "Pairwise Fst", en el programa ARLEQUIN 3.1 (Excoffier y col., 2005). Este índice cuantifica el nivel de diferenciación genética entre pares de sitios de muestreo, basándose en el promedio de diferencias entre secuencias acumuladas entre y dentro de cada localidad. A partir de este índice se realiza un test de permutación, basado en una

distribución de valores esperados de F_{st} , bajo la hipótesis nula de ausencia de diferenciación entre sitios. De este modo se entrega la probabilidad de obtener un valor mayor o igual al del F_{st} observado a través de estas permutaciones (P-value). El valor de F_{st} indica la magnitud de la diferenciación entre dos poblaciones, mientras que el P-value correspondiente indica la probabilidad de equivocarse al rechazar la ausencia de diferencia genética. En el caso de este trabajo, para poner a prueba la significancia del valor de F_{st} obtenido, se realizan 1000 permutaciones de los haplotipos entre los pares de sitios analizados.

Inferencia de la historia demográfica:

Luego de haber definido las poblaciones en base a los análisis anteriores, se realizaron distintos análisis de inferencia de la historia demográfica de cada una de ellas.

Se realizó en primer lugar el test de neutralidad de Tajima para cada población (Tajima, 1989, programa ARLEQUIN 3.1). Este permite detectar si la distribución de los polimorfismos se desvía de la distribución

esperada bajo un modelo nulo, que presupone un equilibrio entre mutaciones y deriva génica. Suponiendo que nuestro marcador molecular no es afectado por la selección natural, el test nos informa sobre la variación o mantención del tamaño poblacional en el tiempo. Se basa sobre el hecho que una variación del tamaño provoca una discrepancia entre dos estimadores del parámetro θ ($=2N\mu$, donde N representa el tamaño efectivo poblacional y μ la tasa de substitución nucleotídica). Si los dos estimadores θ_s (basado en el número de sitios polimórficos) y θ_{Π} (basado en el promedio de diferencias acumuladas entre pares de secuencias) mostraran un valor similar, sería indicativo de una población que ha logrado un equilibrio entre la fuerza de la mutación (que introduce diversidad) y la de deriva génica (que provoca la pérdida de diversidad), y que por lo tanto, ha mantenido su tamaño estable en el tiempo. En este caso, el índice de Tajima (D) tendrá un valor cercano a cero. Si en cambio, este fuese negativo, sería indicativo de una población que aún no ha alcanzado este equilibrio, por haber pasado por un evento de expansión reciente. Para obtener la significancia del resultado, se generan muestras al azar bajo la hipótesis de equilibrio de fuerzas, a través de un algoritmo de coalescencia. El P-

value del estadístico D representa la proporción de valores D obtenidos al azar menores o iguales al D observado.

También, para cada población, se construyó la distribución del número de diferencias entre pares de secuencias, o "Distribución Mismatch" (programa ARLEQUIN 3.1). Tal como describen Rogers & Harpending (1992), una población en equilibrio demográfico debiera mostrar una distribución multimodal, que refleja el proceso estocástico de desaparición de haplotipos por deriva génica. En contraste, una población que haya pasado por una expansión demográfica en el pasado debiera presentar una distribución unimodal. La posición de la moda de esta distribución se relaciona con el tiempo que ha pasado desde el crecimiento poblacional, otorgándonos una estimación del valor del parámetro $\tau = 2\mu t$ (dónde t es el tiempo transcurrido desde el inicio del evento de crecimiento súbito de la población). Tras construir la distribución, ARLEQUIN 3.1 estima los parámetros relativos a la expansión poblacional, τ , θ_0 (correspondiente al inicio de la expansión) y θ_1 (correspondiente al final de la expansión). Por medio de un método propuesto por Shneider y Excoffier (1999), el

programa busca aquellos valores de parámetros que minimicen la suma de las desviaciones cuadradas (SSD) entre la distribución mismatch observada y la esperada bajo el modelo de expansión súbita.

Además, se reconstruyó la historia demográfica utilizando el programa LAMARK 2.1.5 (Kuhner, 2006). Este construye árboles de coalescencia utilizando el criterio de optimización de Máxima Verosimilitud, a partir de los cuales estima distintos parámetros poblacionales. La tasa de crecimiento g , así como el valor del parámetro θ , son estimados bajo el supuesto de un crecimiento exponencial que sigue la siguiente fórmula: $\theta_t = \theta_0 e^{(-gt)}$, donde θ_t es el valor del parámetro θ en el tiempo t , y θ_0 es el valor actual de θ . El tiempo del inicio de expansión se identificó en aquel momento en que θ_t equivale a 1% del valor de θ_0 (como lo recomiendan los autores del programa).

Sobre la base de los parámetros arrojados por los análisis anteriores, se estimó las fechas de los cambios demográficos en unidades de tiempos mutacionales. A partir de estos datos, y asumiendo que el lago no pudo haber aparecido hace más de 12.800 años AP (considerando

los antecedentes geológicos sobre el retiro de los hielos en la zona, Turner y col. 2005), se calculó la tasa de substitución correspondiente a cada modelo demográfico.

Relaciones filogenéticas de los haplotipos de *G. maculatus* de Sud-América:

Se reconstruyeron las relaciones filogenéticas de los haplotipos de *G. maculatus* a lo largo de su distribución en Sud-América, utilizando los haplotipos reportados por Zemlak y col. (2010) e incluyendo los haplotipos de Lago Quetru y del fiordo. Por medio del programa MEGA 5.0 (Kumar y col. 2008), se construyó un árbol de Máxima Verosimilitud, sirviéndonos del mismo haplotipo de *G. maculatus* de Tasmania empleado por los autores como Outgroup. El modelo de substitución nucleotídica de GTR+I+G (G=0.5640, I= 0.6826) fue seleccionado por el mismo programa.

3. RESULTADOS

Diversidad y estructuración genética:

Durante este estudio, se obtuvieron 102 secuencias de 785 pares de bases cada una. Dentro del conjunto de secuencias, se encontraron 92 sitios variables que permitieron definir 77 haplotipos diferentes (tabla 1).

Tabla 2: Índices de diversidad Molecular: Se indica el número de individuos (N), el número de sitios polimórficos por individuo (S/N), el número de haplotipos (K), el número de haplotipos corregido por rarefacción (K^*), la diversidad haplotípica (H), y el promedio del número de diferencias entre pares de secuencias (Π).

Localidad	N	S	S/N	K	K*	H	π
Desembocadura del río Baker	27	70	2.593	26	26.00 ± 0.00	0.997 ± 0.011	15.467
Desembocadura del río Pascua	43	74	1.721	41	26.22 ± 0.68	0.998 ± 0.006	12.874
Lago Quetru	32	22	0.688	11	10.00 ± 0.82	0.714 ± 0.085	3.026

Al analizar las frecuencias haplotípicas (figura 3), vemos que la mayoría de los haplotipos son únicos (91%). Esta proporción aumenta en el fiordo donde los haplotipos únicos alcanzan un 97%. De los 66 haplotipos encontrados en el fiordo, solamente 2 haplotipos están compartido entre las muestras de la desembocadura del Río Baker y del Río Pascua, y ninguno con la muestra proveniente del lago Quetru. En contraste con las muestras del fiordo, solamente 11 haplotipos se detectan en el lago y solamente 6 de ellos son únicos. Dentro de los otros haplotipos, el haplotipo 2 (H2) muestra una frecuencia elevada en comparación a los otros haplotipos del lago o del fiordo.

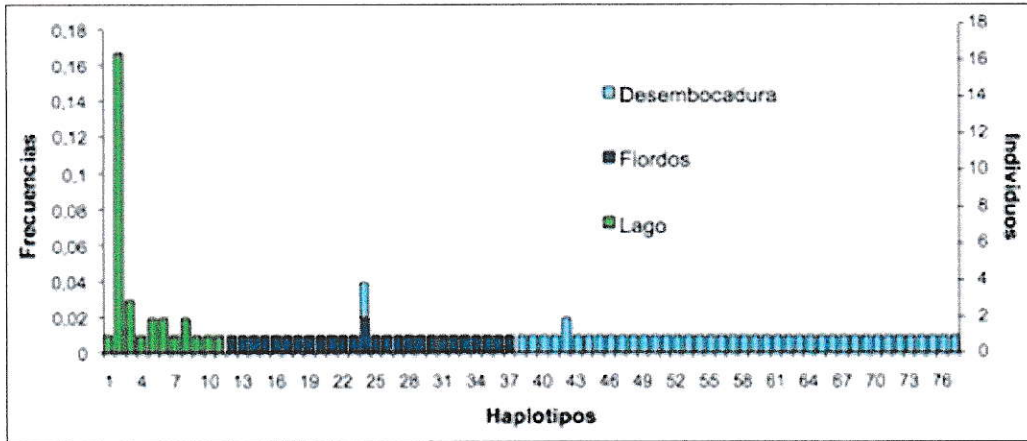


Figura 3: Frecuencias de los 76 haplotipos encontrados en Lago Quetru, en la desembocadura del río Pascua y en la desembocadura del río Baker.

Al mismo tiempo, la red de haplotipos (figura 4) muestra a los haplotipos de ambas desembocaduras mezclados dentro de una extensa red. De manera contraria, los haplotipos del lago se agrupan dentro de una estrella compacta, gran parte de ellos derivando del haplotipo central de gran frecuencia H2. Sólo dos de los haplotipos encontrados en el lago escapan de esta estrella para mezclarse dentro de la primera gran red. Cabe destacar que estos dos haplotipos son genéticamente muy cercanos entre ellos (sólo 2 substituciones los separan).

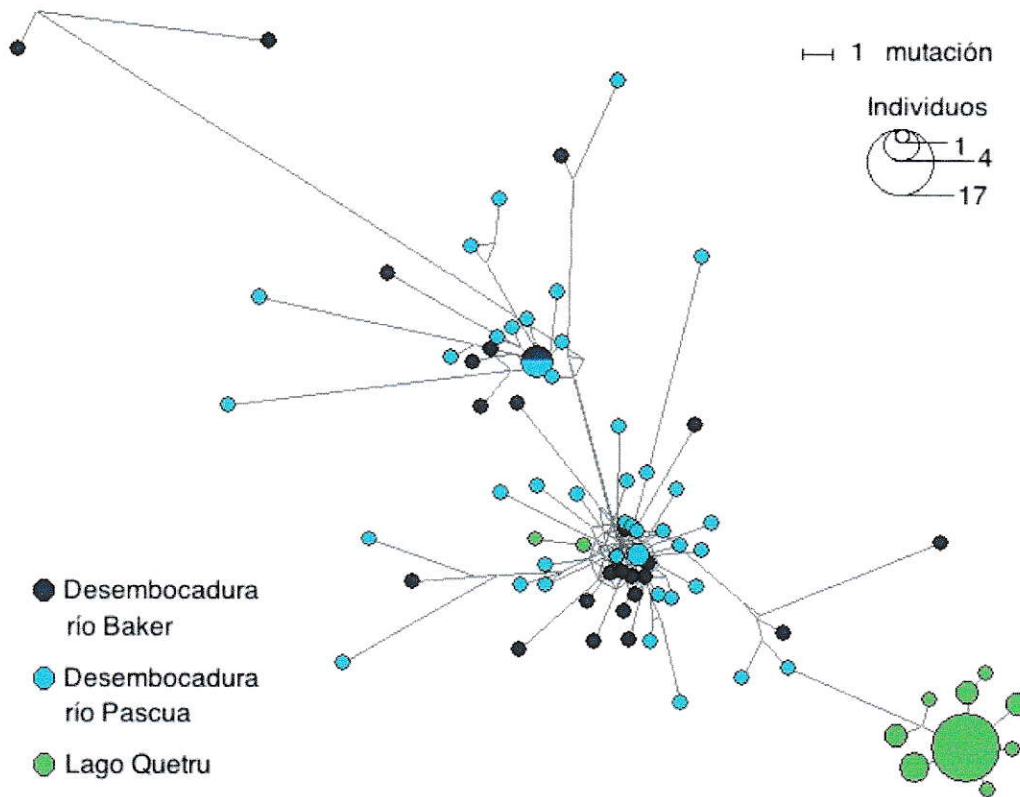


Figura 4: Relaciones filogenéticas entre los 77 haplotipos. Los haplotipos están representados como círculos que poseen un área proporcional a sus frecuencias, calculadas a partir de las 102 secuencias. Cada línea entre dos haplotipos es proporcional al número de mutaciones que los separa.

Al comparar la localidad del lago frente a cada una de las otras localidades, se encuentran signos de una marcada diferenciación genética en los altos valores del índice F_{st} (tabla 3), cuyos bajos valores de P (< 0.00001) permiten rechazar la hipótesis nula de ausencia de diferenciación. En cambio, al comparar entre las muestras provenientes de las desembocaduras, el alto valor de P (0.75) impide el rechazo de la hipótesis nula.

Estos resultados sugieren la existencia de una sola población en el fiordo, que se encuentra diferenciada de la población del lago Quetru.

Tabla 3: Resultados del test de Fst.

Localidades	FST	P-Value
Lago-Desembocadura río Baker	0.46478	<0.00001
Lago-Desembocadura río Pascua	0.46244	<0.00001
Ambas desembocaduras	0.00858	0.74775

Inferencia de la historia demográfica:

Para los análisis de inferencia demográfica de la población del lago, se descartan dos haplotipos que afectarían la señal de la historia demográfica (H7 y H10, tabla 1), debido a que en la red Median-Joining aparecen fuera del haplogrupo que forman los haplotipos de esta localidad.

El test de Tajima, realizado sobre la población del fiordo, no permite rechazar la hipótesis nula de población en equilibrio ($D = -0.951$; $P > 0.1$). En cambio, se rechaza en el caso de la población del lago, con un

valor negativo y significativo del índice D ($D = -1.647$; $P < 0.05$). Asumiendo que nuestro marcador molecular es neutro, podemos inferir que la desviación del equilibrio de la población del lago se debe a que ha pasado por un evento de expansión poblacional reciente.

La forma de la distribución mismatch de la población del fiordo es multimodal (figura 5a), lo que podría indicar que esta habría alcanzado el equilibrio deriva-mutación. La población del Lago Quetru, en cambio, parece ajustarse a la curva del modelo de expansión ($\tau = 1.670$, figura 5b). Suponiendo un crecimiento instantáneo, el valor del parámetro τ indica que este evento habría ocurrido hace aproximadamente 0.835 tiempos mutacionales. Por otra parte, los valores de θ_0 y θ_1 (0.004 y 3.577 respectivamente), nos dan una idea de la magnitud del crecimiento experimentado durante este tiempo por la población del lago, que habría multiplicado por más de 800 veces su tamaño.

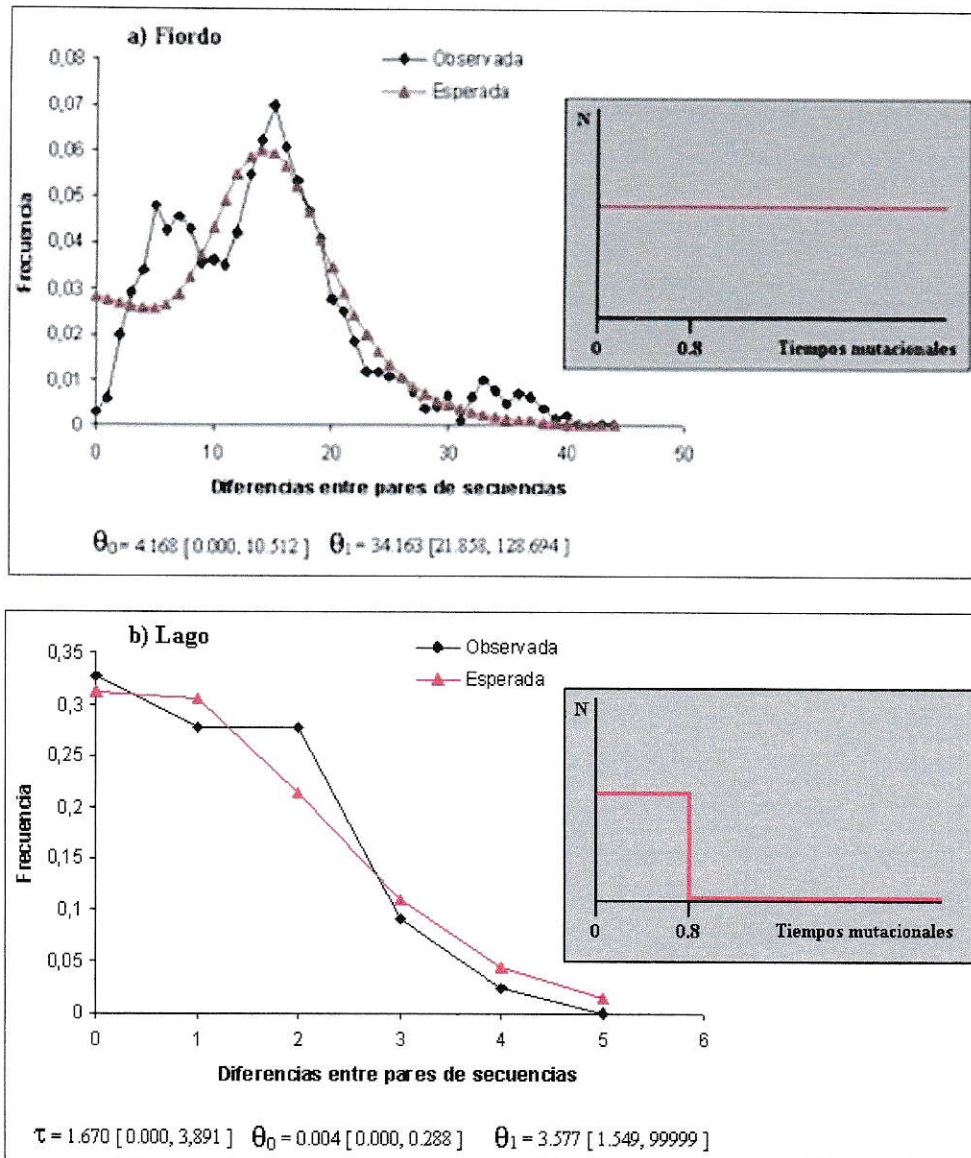


Figura 5: Distribución del número de diferencias entre pares de secuencias para las poblaciones del fiordo (figura a) y de Lago Quetru (figura b). El eje X indica el número de diferencias entre pares de secuencias, y el eje Y indica la frecuencia. Además de la distribución obtenida a partir de los datos observados, se muestra la distribución esperada según el modelo de expansión súbita. Se indican los intervalos de confianza del 95% para cada parámetro estimado. Se muestra en un gráfico anexo la dinámica del tamaño efectivo esperada para cada población, indicando la fecha de ocurrencia de la expansión poblacional del lago, dada por el valor del parámetro τ .

Asimismo, considerando un crecimiento exponencial, los valores de tasa de crecimiento g y tamaño poblacional obtenidos sobre la base del análisis de Máxima Verosimilitud (figura 6), indican nuevamente a una población de reciente expansión en la localidad del lago. El crecimiento de esta población se inicia hace aproximadamente 1.2 tiempos mutacionales, valor relativamente similar a la fecha estimada por el análisis de distribución Mismatch. Desde esta fecha, la población del lago habría incrementado cerca de 100 veces su tamaño, tal como indican los valores inicial y actual del parámetro θ ($\theta_0=0.1$, $\theta_1=13.7$).

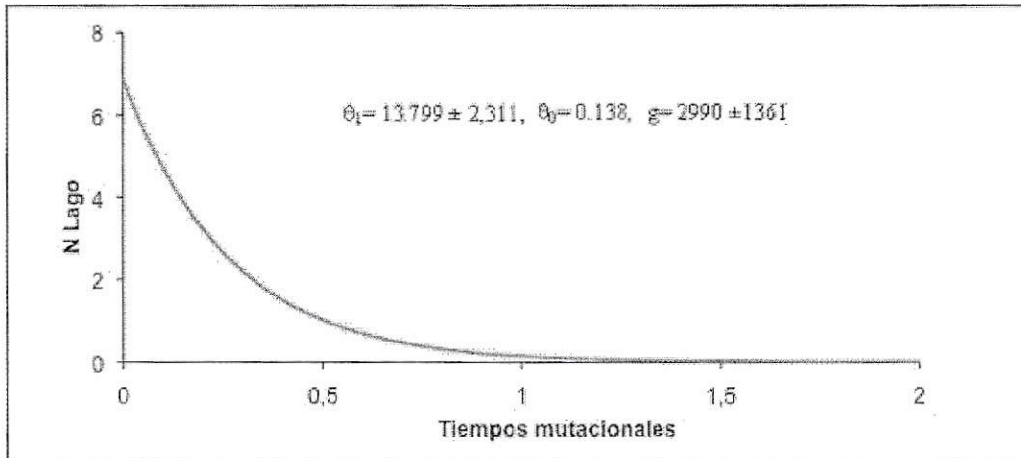


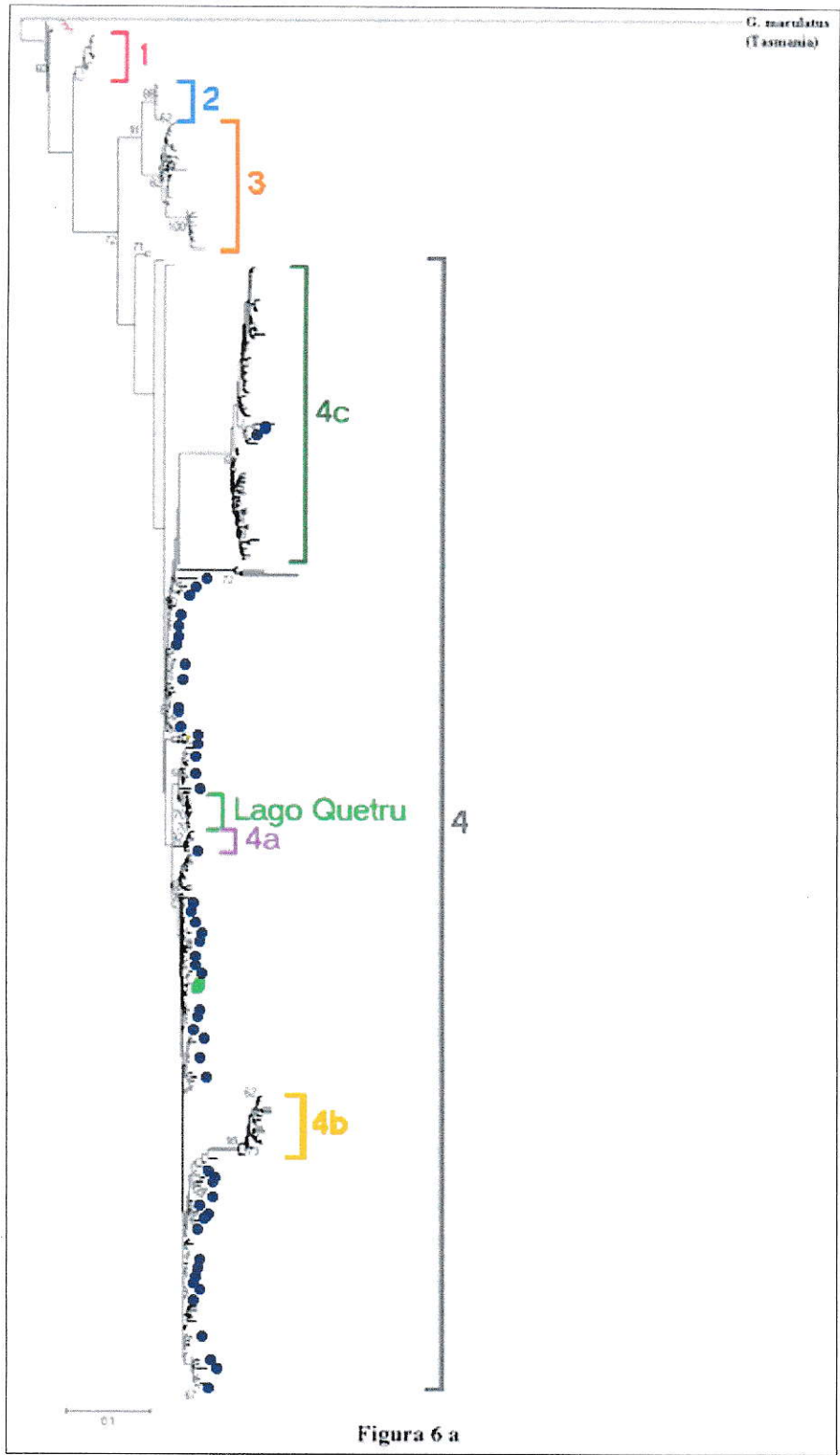
Figura 6: Variación del tamaño efectivo ($N = \theta/2$) de la población del lago, en función del tiempo, estimada por método de Máxima Verosimilitud. El eje Y indica el tamaño, expresado en número de copias heredables y el eje X el tiempo, en tiempos mutacionales. Se indican los valores del parámetro θ al inicio de la expansión (θ_0) y en el tiempo actual (θ_1), junto con la tasa de crecimiento exponencial (g), en unidades mutacionales*/tiempos mutacionales. *Una unidad mutacional corresponde al tiempo promedio, en años, que se requiere para fijar una mutación en cada secuencia.

A partir de los valores de fechas en tiempos mutacionales, y sobre la base de una tasa de mutación de 1,8% (i.e. 0.018 cambios/sitio/millón de años), utilizada por Zemplak y col. (2010) para estudiar la filogeografía de *G. maculatus* en Patagonia, calculamos los tiempos de inicio de expansión de la población del lago. La distribución Mismatch nos da una fecha aproximada de

59.000 años AP, mientras que el análisis de Máxima Verosimilitud indica una fecha de 86.000 años AP. Por otro lado, asumiendo la fecha de 12.800 años AP para el inicio del drenaje del río Pascua (Turner y col., 2010, figura 1) y entonces como edad máxima para el lago Quetru, calculamos tasas de substitución para *G. maculatus* a partir de los valores de fechas en tiempos mutacionales estimadas. En el caso de un crecimiento instantáneo la tasa estimada es de 8,3%, mientras que para un crecimiento exponencial es de 12,0%.

Relaciones filogenéticas de los haplotipos de *G. maculatus* de Sud-América:

Analizados junto al resto de los haplotipos encontrados en Sud-América, vemos que los de la población del fiordo se encuentran repartidos dentro de uno de los cuatro haplogrupos encontrados por Zemlak y col. (2004, figura 6), específicamente en el haplogrupo 4. El haplogrupo de Lago Quetru aparece como otro subgrupo más dentro del gran grupo de haplotipos patagónicos, mientras que los haplotipos del fiordo, en su mayoría, se ubican fuera de estos subgrupos.



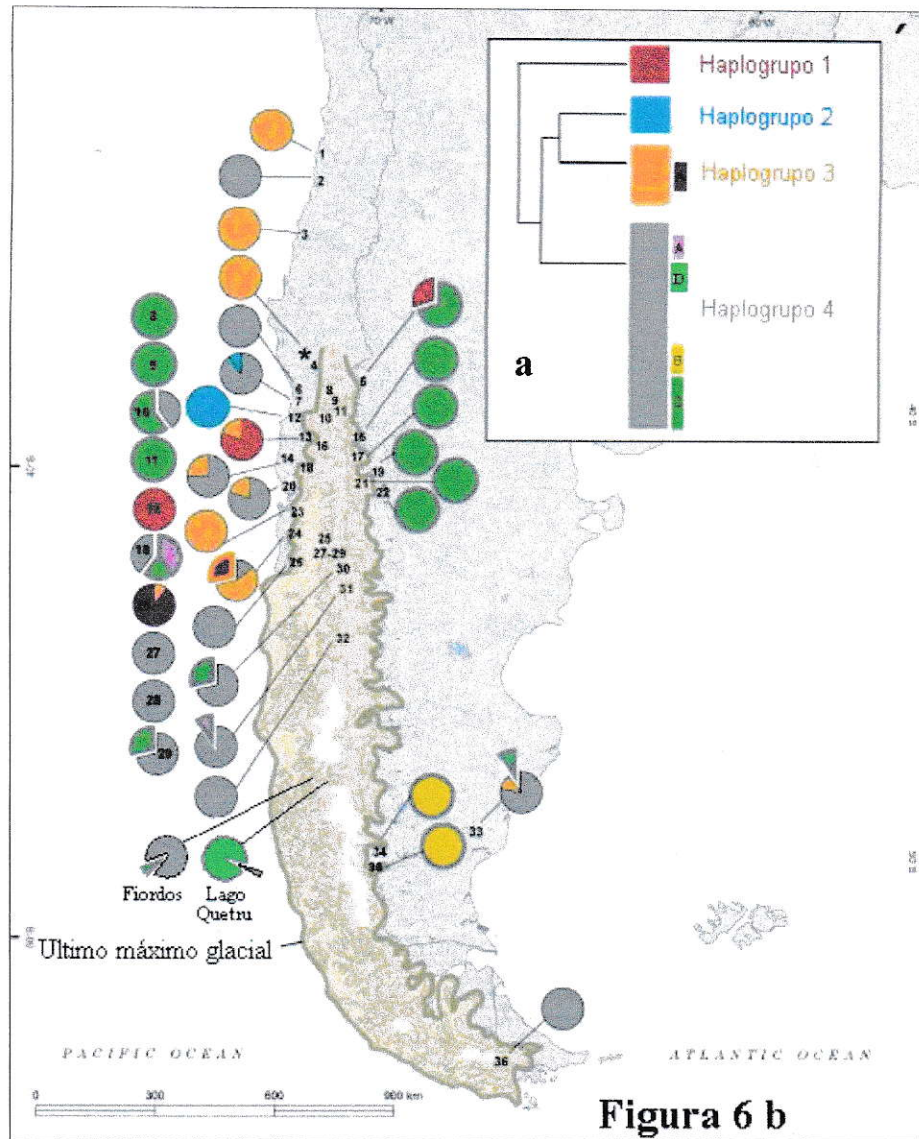


Figura 6: (a) Arbol filogenético construido por método de Máxima Verosimilitud, que incluye todos los haplotipos encontrados a lo largo de la distribución de *G. maculatus* en Sud-América. Se indican los grupos (haplogrupos 1, 2, 3 y 4) y subgrupos (3A, 4A, 4B Y 4C) de haplotipos fuertemente sustentados de Zemlak y col. 2010. El subgrupo marcado en verde corresponde al de los haplotipos del lago Quetru, mientras que los haplotipos de la población del fiordo, en amarillo, se encuentran repartidos dentro del haplogrupo 4, con sólo uno de sus 26 haplotipos ubicándose dentro del subgrupo 4A, y dos haplotipos dentro del 4C. (b) Figura modificada de Zemlak y col. (2010), que muestra la distribución de frecuencias de los grupos y subgrupos de haplotipos según sitio de muestreo.

4. DISCUSIÓN

Persistencia de la población marina durante la(s) glaciación(es):

La elevada diversidad y ausencia de estructura genética entre los sitios del fiordo (tabla 2), indican que en esta zona habita una población de gran tamaño. El resultado no significativo obtenido en el test de neutralidad realizado a esta población ($P > 0.1$), además de su distribución mismatch multimodal (figura 5a) y su extendida red de haplotipos (figura 3) sugieren también que no habría sufrido grandes variaciones en su tamaño poblacional durante los últimos períodos glaciales. Considerando que durante el UMG el manto de hielo se extendía hasta el margen del Océano Pacífico, la población probablemente habría permanecido en el paleolitoral Pacífico adyacente al margen oeste del manto de hielo Patagónico. Luego del retroceso glacial, habría extendido su rango de distribución hacia la zona del fiordo. Estos resultados concuerdan con lo propuesto por Waters y Burrige en 1999, quienes, luego de observar

altos niveles de diversidad mitocondrial intraespecífica en *G. Maculatus*, postulan que la especie constituiría un linaje antiguo, que ha sido capaz de mantener poblaciones de gran tamaño por largo tiempo. De este modo la especie habría evitado la extinción de linajes, acumulando un gran nivel de diversidad genética. Esta capacidad de sobrevivir y mantener grandes poblaciones se debería al carácter anadrómico de *G. Maculatus*. El valor adaptativo de este carácter, según McDowall (1980), correspondería precisamente a la capacidad de escapar de los climas desfavorables durante las épocas glaciales.

El haplogrupo 4 de Zemlak y col. (2010, figura 6), dentro del cual se encuentran repartidos los haplotipos del fiordo, posee una amplia distribución en Patagonia, ubicándose tanto en el norte como en el sur, a ambos lados de la Cordillera de los Andes. Sin embargo presenta los mayores valores de diversidad y abundancia en Patagonia noroeste. Según Zemlak y col. (2010), dentro de este haplogrupo habrían comenzado a diferenciarse a lo menos 3 subgrupos, a medida que la especie se dispersó desde las regiones costeras del noroeste de Patagonia hacia el este de la Cordillera de Los Andes, vía las regiones costeras del sur.

El hecho de que los haplotipos de la población del fiordo se encuentren repartidos dentro del haplogrupo de mayor distribución y diversidad de Patagonia, sin aparecer dentro de ninguno de sus subgrupos, indica que los individuos del fiordo pertenecen a una gran población ancestral a partir de la cual se diferencian nuevos subclados que colonizan ríos y lagos. Los datos de Zemlak y col. (2010) indican que sus individuos no se restringen sólo a la zona del fiordo, sino que habitan también a lo largo de lagos y ríos próximos a la costa oeste patagónica, encontrándose también en el canal Beagle, e incluso en la desembocadura de Río Chico, en la costa austral de Argentina. Estos lagos y ríos estarían, por ende, conectados por un importante flujo génico con la costa, y la diversidad genética de esta población marina provendría, a lo menos en parte, de sus individuos migratorios.

Efecto fundador tras la colonización postglacial de Lago Quetru

Tras el retroceso de la cubierta glacial que se extendía sobre la cuenca de Río Pascua, el lago Quetru habría sido colonizado por individuos de la especie *G. Maculatus* provenientes de la población marina. El análisis

filogenético (figuras 6a y 6b) muestra que la población encontrada en este lago forma parte de los subgrupos que habrían comenzado a diferenciarse a partir de esta gran población. Aunque nuestros datos no permitan descartar del todo una procedencia argentina de los colonizadores, que habrían remontado, en ese caso, desde la costa Atlántica, el origen Pacífico aparece como el más probable. Esto, debido a la distribución que presenta *G. maculatus* en la zona, ausentándose de la zona alta del río Pascua y de Lago O' Higgins, donde habitaría en cambio la especie *G. platei* (Zemlak y col. 2008).

La baja diversidad que actualmente presenta la población de este lago (tabla 2) y el hecho de que posea haplotipos muy similares entre sí (figura 4), indica que este evento colonizador habría ocurrido por vía de un efecto fundador. En este tipo de eventos participan muy pocos individuos, cuya diversidad conforma una reducida muestra de la gran diversidad genética de la población original. Sin embargo, ya fueran uno o varios los eventos de fundación, estos pocos individuos colonizadores debieran haber poseído una diversidad que reflejara la enorme diversidad de la población del fiordo. Es decir que, durante sus inicios, la población de Lago Quetru debe haber presentado una diversidad genética reducida, pero

compuesta de haplotipos muy distintos entre sí. Luego, la fuerte deriva génica que ocurre al fundarse una nueva población a partir de un número de individuos reducido, habría eliminado gran parte de esta diversidad inicial. Muy pocos haplotipos fundadores habrían sobrevivido a la deriva, en particular el haplotipo de mayor frecuencia presente en el lago, a partir del cual se generaron los haplotipos de baja frecuencia que conforman el haplogrupo compacto, así como uno de los dos haplotipos que se encuentran en la red extensa.

La diferencia de diversidad (tabla 2) y estructuración genética entre el lago y los sitios del fiordo (tabla 3) muestra que, luego de la colonización, no se mantuvo un flujo genético desde la desembocadura de Río Pascua hacia Lago Quetru. En el caso contrario, debiéramos ver a varios de los haplotipos muestreados en el lago mezclados dentro de la extensa red de la población marina. Sin embargo, de los 11 haplotipos extraídos del lago, sólo dos haplotipos únicos se ubican dentro de esta gran red. Estos se encuentran además muy relacionados entre sí, diferenciados por sólo dos mutaciones, siendo poco probable que provengan de dos migrantes distintos del fiordo. Con mayor probabilidad, esos haplotipos provendrían de un sólo haplotipo ancestral. Este habría

sido transportado por los individuos colonizadores durante el evento fundador, y habría sobrevivido a la deriva génica tal como lo hizo el haplotipo central del haplogrupo del lago. Sin embargo, este haplotipo habría sido mayormente afectado por la deriva que el haplotipo central del lago, lo que explicaría el hecho de que sólo veamos a estos dos haplotipos únicos, en vez de un haplogrupo más desarrollado. Los dos haplotipos corresponderían entonces a una diversidad genética remanente dentro de la población del lago. Por esta razón, se tomó la decisión de no incluirlos para los análisis de inferencia demográfica en esta población.

En contraste, nos ha sido imposible descartar totalmente un posible flujo del lago hacia el fiordo. Debido a la inmensa diversidad de la población marina, sería muy difícil encontrar haplotipos provenientes del lago que hayan migrado río abajo. Sin embargo, a pesar de que 29 de los individuos de la zona de desembocadura del río Pascua fueran colectados en sitios ubicados varios kilómetros río arriba (figura 7, sitios 2 y 3) no se encontró ningún haplotipo del lago en esta zona. Esto nos sugiere que la población de la parte baja del río sería de carácter anadrómico, mientras que la del lago correspondería a una población residente. Tal

interpretación ha sido propuesta en varias otras poblaciones de *Galaxias maculatus* a lo largo de su distribución en Sudamérica (Cussac y col., 2004) y en Oceanía (Waters y Burridge, 1999).

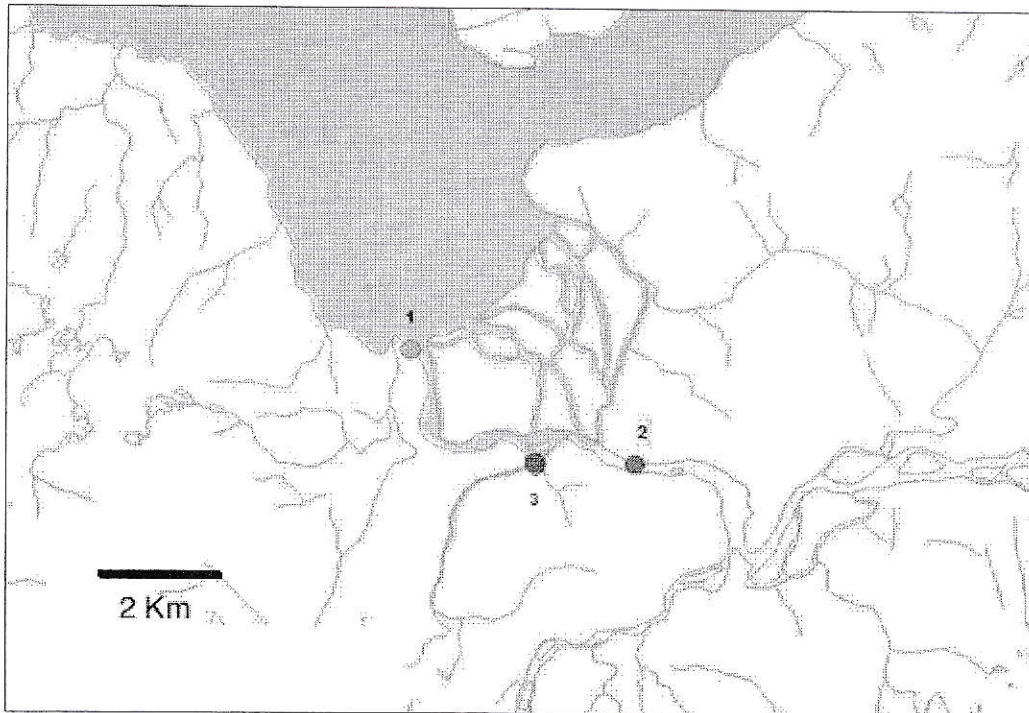


Figura 7: Ubicación de los sitios de muestreo dentro de la desembocadura del río Pascua.

Además, el hecho de que existan diferencias tróficas muy notorias entre las localidades de Tortel y del lago (Contreras, 2007) brinda mayor apoyo aún a la tesis de escasa o nula movilidad entre las poblaciones. Finalmente, las razones por las cuales estas poblaciones

habrían quedado desconectadas luego de su establecimiento, podrían estar ligadas al establecimiento de barreras físicas al flujo génico, o bien al cambio en la biología de la especie, como se ha descrito para ciertas poblaciones residentes de *G. Maculatus* en Chile (Zattara y Premoli, 2005), y en el resto de su distribución en el hemisferio sur (Cussac y col., 2004, McDowall, 1972, Ling y col., 2001).

De los otros subgrupos diferenciados a partir de la población marina, dos (4B y 4C, figura 6) habrían aparecido en la Patagonia Argentina. Al igual que la población de Lago Quetru, éstos exhiben una distribución Andina y se sitúan a gran distancia de la costa. Por lo tanto, podrían corresponder a poblaciones formadas a través de un mecanismo similar al de la población del lago, vía un efecto fundador a partir de la población marina. Este modo de colonización constituiría una segunda manera de generar variabilidad genética dentro de esta especie migratoria, al originar nuevas poblaciones de diferente composición genética. Este podría tratarse de un mecanismo generalizado dentro de los peces migratorios afectados por los ciclos glaciales: varias otras poblaciones de *G. Maculatus* y de otras especies migratorias de la familia Galaxiidae, tanto de Sudamérica

como de Oceanía, muestran distribución postglacial (Cussac y col., 2004, Waters y Craw, 2008), pudiendo haber sido originadas también por medio de un efecto fundador. Por ejemplo, Ling y col. (2001) describen a 3 poblaciones residentes de *G. Maculatus*, habitando 3 lagos distintos de Nueva Zelanda, que se habrían originado a partir de un proceso como el que describimos para la población de Lago Quetru. Estas poblaciones, como muchas otras poblaciones residentes descritas para *G. maculatus* (Mc. Dowall, 1972), muestran diferencias morfológicas, que podrían evidenciar el inicio de un proceso de especiación.

Esta respuesta biogeográfica de *G. Maculatus* frente a los cambios ambientales asociados a los ciclos glaciales, difiere de la respuesta mostrada por las especies de agua dulce que no exhiben carácter diadrómico. En vez de desarrollar grandes poblaciones resilientes en el mar, estas especies recurrirían a la recolonización de nuevos hábitats postglaciales, a partir de distintos refugios o zonas de permanencia límnicas, desarrollando una diversidad genética estructurada. Este es el caso de *G. Platei*, especie habitante de ríos y lagos patagónicos. A pesar de no ser una especie diadrómica, este pez de agua dulce habría logrado sobrevivir a las glaciaciones,

gracias a su tolerancia a las bajas temperaturas. Esto le habría permitido permanecer en antiguos ríos y lagos proglaciales, al este y oeste del manto de hielo (Ruzzante y col., 2008). A partir de estos refugios o zonas de permanencia, y gracias a su habilidad para migrar dentro de sistemas de agua dulce, lograría luego establecer una distribución postglacial, evidenciando una gran capacidad de recolonizar nuevos hábitats. Por medio de esta estrategia límnic, habría llegado a establecer una amplia distribución en Patagonia (Zemlak y col., 2008) y a dominar el ensamble de peces dentro de las cuencas Andinas de esta región, sobre todo en lagos ubicados a gran altura (Habit y col., 2010). Sin embargo, a diferencia de *G. maculatus*, muestra una diversidad genética estructurada, a raíz de su permanencia en refugios glaciales (Zemlak y col. 2008).

G. platei ha sido también reportada dentro de nuestra zona de estudio, en la cuenca del lago O' Higgins, que origina el río Pascua (Zemlak y col., 2008, datos no publicados). Sin embargo, habría llegado a colonizar esta zona de manera diferente a *G. maculatus*, permaneciendo, durante el UMG, en algún hábitat límnic ubicado al sur de la Patagonia Argentina (Zemlak y col., 2008). Desde

esta zona habría colonizado el lago O'Higgins tras el deshielo.

Estimación de la tasa molecular intraespecífica de *G. maculatus*:

Lago Quetru se habría formado durante la desglaciación local e inicio del drenaje de Lago O'Higgins a través del río Pascua. Esto ocurrió tras el quiebre del Campo de Hielo Patagónico, evento acotado con una edad máxima de 12.800 años AP (Turner y col., 2005); figura 1). Si bien esta fecha corresponde al inicio del drenaje del río Baker a partir de Campo de hielo Norte, tras romperse el dique de hielo que encajonaba las aguas de un gran paleolago en el sector del lago General Carrera, podemos suponer una fecha similar para el inicio del drenaje del río Pascua, pues este nace a partir de Campo de hielo Sur. Sin embargo, las fechas de inicio de expansión de su población (59.000 y 86.000 años AP), calculadas en base a la tasa de 1.8% cambios/sitio/millón de años, claramente sobreestiman la fecha de dicho suceso. Esta incongruencia podría deberse a que la tasa de substitución utilizada no es adecuada para ser aplicada en el estudio de eventos tan recientes como el de la expansión de la población de Lago Quetru, debido a la dependencia temporal que han

mostrado las tasas de substitución (Ho y col. 2005). Para muchos grupos ya se ha demostrado que, a mayor antigüedad del evento evolutivo, menor es el valor de la tasa calibrada (Ho y col., 2005; Burridge y col., 2008). De hecho, la tasa de 1.8% corresponde al valor asintótico que toma la curva de calibración de la tasa de *Galaxias* (Burridge y col., 2008), definido en base a fechas que superan los 200.000 años AP. Bajo esta fecha, al calibrar en base a eventos cada vez más recientes, los autores obtienen tasas que aumentan de manera exponencial, y que a la vez muestran gran incerteza en sus estimaciones. Por lo tanto, y dado que podemos extrapolar la edad geológica del lago Quetru según la fecha de la apertura del Manto Patagónico, lo más apropiado es estimar una tasa de mutación intraespecífica para nuestra especie, calibrando sobre la base de la fecha citada. Obtenemos entonces una tasa de 8,3%, según el modelo de crecimiento instantáneo, y de 12%, si suponemos un crecimiento exponencial. Burridge y col. (2008) obtienen tasas similares para el género *Galaxias*, al calibrar en base a un evento de divergencia que habría ocurrido hace 12.000 años AP en Nueva Zelanda, según indica la edad del evento geológico acoplado.

5. CONCLUSIONES

En el fiordo Calén, encontramos a una población marina de *G. maculatus*, cuyos elevados niveles de diversidad genética señalan su antiguo origen. Esta población habría logrado sobrevivir a uno, o tal vez a varios períodos glaciales, permaneciendo en el paleolitoral Pacífico. Luego, el retroceso de los glaciares que ocupaban la zona del fiordo durante el UMG habría permitido que la población se extendiera hasta esta zona. La gran capacidad migratoria de sus individuos les habría permitido también colonizar otros nuevos hábitats expuestos durante la Última Terminación Glacial, como es el caso de Lago Quetru. Tras su formación, este lago habría recibido la llegada de un bajo número de colonizadores marinos, que desde entonces habrían constituido una población residente, estableciéndose una marcada estructuración entre ambas poblaciones. Este mecanismo de colonización por efecto fundador habría moldeado la diversidad genética de muchas otras

poblaciones de *G. maculatus* que hoy se encuentran habitando lagos postglaciales.

Así como los eventos vicariantes que han permitido calibrar el reloj molecular en varias especies (Burridge y col., 2008, Craw y col., 2008), el evento de expansión postglacial detectado en nuestro trabajo nos permitió calibrar una tasa de substitución a corta escala temporal. Sin embargo, debemos tener presente que el evento colonizador no necesariamente ocurre inmediatamente después de la aparición del nuevo hábitat, que la expansión poblacional puede suceder después de algún tiempo transcurrido tras la llegada de los colonizadores, y que tampoco contamos con la cronología absoluta específica a la cuenca del río Pascua, por lo que los menores valores de tasas aquí estimados, de 8,3 y 12% deben considerarse como un piso. A partir de este valor, la tasa podría aumentar, según valores de fechas de expansión más recientes.

Este trabajo representa un avance significativo en el estudio de los procesos de recolonización postglacial a través de efectos fundadores. A la vez, se pone en evidencia las consecuencias de este proceso, como la pérdida de diversidad genética a nivel poblacional y el

establecimiento de estructura genética espacial en las especies. Los resultados también contribuyen al debate sobre el uso en inferencia demográfica de tasas de sustitución nucleotídica obtenidas a partir de reconstrucciones filogenéticas. Como ha sido recientemente sugerido por especialistas de la evolución molecular (Ho y col., 2005), nuestros resultados muestran una tasa nucleotídica estimada en base a los eventos geomorfológicos, muy superior a la obtenida en estudios filogenéticos y usadas previamente para reconstruir la historia demográfica de peces patagónicos. Esta evidencia pone en duda estas estimaciones, así como la visión general de los procesos biogeográficos en el cono sur de sudamérica.

BIBLIOGRAFÍA

- Aljanabi S.M, Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucl. Acids Res.* 25: 4692-4693.
- Bandelt H.J, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16:37-48.
- Bernatchez L, Dodson J.J, Boivin S. 1989. Population bottlenecks: influence on mitochondrial DNA diversity and its effect in coregonine stock discrimination. *J. Fish. Biol.* 35: 233-244.
- Berra T.M, Crowley L.E.L.M, Ivanstoffs W, Fuerst P.A. 1996. *Galaxias maculatus*: an explanation of its biogeography. *Mar. Freshwater Res.* 47: 845-9.
- Broecker W.S, Denton G.H, 1990. What drives glacial cycles? *Sci. Am.* 262: 49-56.
- Burrige C.P, Crac D, Fletcher D, Waters J.M. 2008. Geological dates and molecular rates: Fish DNA sheds light on time dependency. *Mol. Biol. Evol.* 25(4): 624-633.
- Contreras M. 2007. Proyecto Hidroeléctrico Aysén. Línea base de flora y fauna acuática en los ríos Baker y Pascua. www.hidroaysen.cl/site/PDF/Documentos/Res_Ejecutivo_Flora_y_Fauna_Acuatica.pdf
- Cosacov A, Sersic A.N, Sosa V, Johnson L.A, Cocucci A.A. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *J. Biogeogr.* 37: 1463-1477.
- Croizat L, Nelson G.J, Rosen D.E. 1974. Centers of origin and related concepts. *Syst. Zool.* 23:265-287.
- Cussac V, Ortubay S, Iglesias G, Milano D, Lattuca M.E, Barriga J.P, Battini M, Battini M, Gross M. 2004. The distribution of South American galaxiid fishes: the role

of biological traits and post-glacial history. *J. Biogeogr.* 31: 103-121.

Da Silva J.L, Anderson J.B, Stravers J. 1997. Seismic facies changes along a nearly continuous 241 latitudinal transect: the fjords of Chile and the northern Antarctic Peninsula. *Mar. Geol.* 143: 103-123.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin version 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinform. Online* 1: 47-50.

Filatov D.A. 2002. ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Mol. Ecol. Notes* 2: 621-624.

Habit E, Piedra P, Ruzzante D.E, Walde S.J, Belk M.C, Cussac V.E, Gonzalez J, Colin N. 2010. Changes in the distribution of native fishes in response to introduced species and other anthropogenic effects. *Global Ecol. Biogeogr.* 19: 697-710.

Hein A.S, Hulton N.R.J, Dunai T.J, Sugden D.E, Kaplan M.R, Xu S. 2010. The chronology of the Last Glacial Maximum and deglacial events in central Argentine Patagonia. *Quaternary Science Reviews*, 29: 1212-1227.

Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.

Hewitt., G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 359: 183-195.

Ho S.Y.W, Pillips M.J, Cooper A, Drummond A.J. 2005. Time dependency of molecular rate estimates and systematic overestimation of recent divergence times. *Mol. Biol. Evol.* 22(7): 1561-1568.

Hulton N.R.J, Purves R.S, McCulloch R.D, Sugden D.E, Bentley M.J. 2002. The last Glacial Maximum and deglaciation in southern S. Am. *Quat. Sci. Rev.* 21: 233-241.

Kim I, Phillips C.J, Monjeau J.A, Birney E.C, Noack K, Pumo D.E, Sikes R.S, Dole J.A. 1998. Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Mol. Ecol.* 7(6): 667-78.

- Kuhner M.K. 2006. LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768-770.
- Kumar S, Dudley J, Nei M, Tamura K. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9: 299-306.
- Lessa E.P, D' Elía G, Pardiñas U.F.J. 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Mol. Ecol.* 19: 3031-3037.
- Ling N, Gleeson D.M, Willis K.J, Binzegger S.U. 2001. Creating and destroying species: the 'new' biodiversity and evolutionarily significant units among New Zealand's galaxiid fishes. *J. Fish Biol.* 59A : 209-222.
- McCulloch R.D, Bentley M.J, Purves R.S, Hulton N.R.J, Sugden D.E, Clapperton C.M. 2000. Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *J. Quat. Sci.* 15(4): 409-417.
- McDowall R.M. 1972. The species problem in freshwater fishes and the taxonomy of diadromous and lacustrine populations of *Galaxias maculatus* (Jenyns). *J. Roy. Soc. New Zea.* 2, 325-367.
- McDowall R.M. 1978. Generalised tracks and dispersal in biogeography. *Syst. Zool.* 27: 88-104.
- McDowall, R.M. 1980. Freshwater fishes and plate tectonics in the southwest Pacific. *Palaeogeogr. palaeoclimat. palaeoecol.* 31: 337-351.
- McDowall, R.M. 2002. Accumulating evidence for a dispersal biogeography of southern cool temperate freshwater fishes. *J. Biogeogr.* 29: 207-219.
- Millerón M, Gallo L, Marchelli P. 2008. The effect of volcanism on postglacial migration and dispersal. A case study in southern South America. *Tree Genet. Genomes* 4: 435-443.
- Morando M, Avila L, Baker J, Sites Jr. J.W. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution* 58: 842-861.

- Muellner A.N, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza C.M. 2005, Blackwell Publishing, Ltd. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochoeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Mol. Ecol.* 14: 203-212.
- Palma R.E, Rivera-Milla E, Salazar-Bravo J, Torres-Pérez F, Pardinás U.F.J, Marquet P.A, Spotorno A.E, Meynard A.P, T.L. Yates. 2005. Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *J. Mammal.* 86: 191-200.
- Pastorino M.J, Gallo I.A. 2002. Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest *J. Biogeogr.* 29: 1167-1178.
- Premoli A.C, Kitzberger T, Veblen T.T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *J. Biogeogr.* 27: 251-260.
- Provan J, Bennett K.D. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends Ecol. Evol.* 23: 564-571
- Rabassa J. 2008. Late Cenozoic Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. En: Rabassa J. (Ed), *The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra Del Fuego*. *Dev. Quat. Sci.* 11, pp. 151-204. Elsevier, Amsterdam, Holanda.
- Rogers A.R, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic distances. *Mol Biol Evol* 9: 552-569.
- Rosen D.E. 1974. Phylogeny and zoogeography of salmoniform fishes and relationships of *Lepidogalaxias salamandroides*. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 153: 265-326.
- Rosen D.E. 1978. Vicariant patterns and historical explanation in biogeography. *Syst. Biol.* 27: 159-188.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio J.C, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Ruzzante D.E, Walde S.J, Cussac V.E, Dalebout M.L, Seibert J, Ortubay S, Habit E. 2006. Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of

orogeny, glaciation, and volcanism. *Ecology* 15: 2949-2968.

Ruzzante D.E, Walde S.J, Gosse J.C, Cussac V.E, Habit E.H, Zemlak S.S, Adams E.D.M. 2008. Climate control on ancestral population dynamics: insight from patagonian fish phylogeography. *Mol. Ecol.* 17(9): 2234-2244.

Shneider S, Excoffier L. 1999. Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among Sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152: 1079-1089.

Smith M.F, Kelt D.A, Patton J.L. 2001. Testing models of diversification in mice in the *Abrothrix olivaceus/xanthorhinus* complex in Chile and Argentina. *Mol. Ecol.*, 10: 397-405.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123:585-595.

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. A.*, 87: 363-374.

Victoriano P.F, Ortiz J.C, Benavides E, Adams B.J., Sites J.W. 2008. Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropicuridae) from the central-southern Andean range. *Molec. Ecol.* 17: 2397-2416.

Vidal M.A, Moreno P.I, Poulin E. 2011. En prensa. Insular colonization of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaeminae) in southern Chile. *Mol. Ecol.*

Wallis G.P, Judge K.F, Bland J, Waters J.M, Berra T.M. 2001. Genetic diversity in New Zealand *Galaxias vulgaris* sensu lato (Teleostei: Osmeriformes: Galaxiidae): a test of a biogeographic hypothesis. *J. Biogeogr.* 28: 59-67.

Wares J.P, Cunningham C.W.C. 2001. Phylogeography and historical ecology of the North Atlantic intertidal. *Evolution*, 55(12): 2455-2459.

Waters J.M, Burrridge C.P, 1999. Extreme intraspecific mitochondrial DNA sequence divergence in *Galaxias*

maculatus (Osteichthys: Galaxiidae), One of the world's most widespread freshwater fish. Mol. Phyl. Evol. 11(1): 1-12.

Waters J.M, Dijkstra L.H, Wallis G.P. 2000. Biogeography of a southern hemisphere freshwater fish: how important is marine dispersal? Mol. Ecol. 9: 1815-1821.

Waters J.M, Crow D. 2008. Evolution and biogeography of New Zealand's longjaw galaxiids (Osmeriformes: Galaxiidae): the genetic effects of glaciation and mountain building. Freshwater Biol. 53: 521-534.

Zattara E.E, Premoli A.C. 2005. Genetic structuring in Andean landlocked populations of *Galaxias maculatus*: effects of biogeographic history. J. Biogeogr. 32: 5-14.

Zemlak T.S, Habit E.M, Walde S.J, Battini M.A, Adams E.D.M. Ruzzantes D.E. 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. Mol. Ecol. 17: 5049-5061.

Zemlak T.S, Habit E.M, Walde S.J, Carrea C, Ruzzante D.E. 2010. Surviving historical Patagonian landscapes and climate: molecular insights from *Galaxias maculatus*. BMC, Evol. Biol. 10:67.