



**UNIVERSIDAD DE CONCEPCION**

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Programa de Doctorado en Sistemática y Biodiversidad

**CONTRIBUCIÓN DE FACTORES HISTÓRICOS, ESPACIALES Y AMBIENTALES SOBRE  
LA ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA POBLACIONAL DE TRES ESPECIES DE  
MACROINVERTEBRADOS DE AGUA DULCE QUE HABITAN EN LA CUENCA DEL  
ITATA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN SISTEMÁTICA Y BIODIVERSIDAD**

**JESSICA PAOLA BORQUEZ CASTRO**

**CONCEPCION-CHILE**

**2013**

**Profesor Guía: NICOLAS DOMINIQUE MICHEL GOUIN**

Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas

CEAZA

## TABLA DE CONTENIDOS

<b>AGRADECIMIENTOS</b>	i
<b>RESUMEN</b>	ii
<b>1.0 INTRODUCCION GENERAL</b>	1
<b>1.1 Ecosistemas dulceacuícolas en el contexto del cambio global</b>	1
<b>1.2 Estructuración poblacional en sistemas lóticos: causas, consecuencias y desafíos</b>	2
<b>1.3 Ecología, rasgos de la historia de vida y vulnerabilidad de las especies</b>	3
<b>1.4 Marcadores Moleculares</b>	7
<b>2.0 HIPOTESIS DE TRABAJO</b>	10
<b>3.0 OBJETIVOS</b>	12
<b>4.0 PRESENTACIÓN Y OBJETIVO DEL ESTUDIO</b>	13
<b>CAPITULO I : Rol de los factores históricos sobre los procesos de diferenciación poblacional en especies de macroinvertebrados de la cuenca del Itata</b>	14
<b>5.0 RESUMEN</b>	15
<b>6.0 INTRODUCCION</b>	16
<b>7.0 MATERIALES Y METODOS</b>	19
<b>7.1 Muestreo</b>	19
<b>7.2 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial</b>	19
<b>7.3 Análisis filogenético y construcción de redes de haplotipos</b>	20
<b>7.4 Diferenciación poblacional y análisis demográficos</b>	21
<b>8.0 RESULTADOS</b>	25
<b>8.1 Diversidad de haplotipos</b>	25
<b>8.2 Análisis de clados Anidados (NCPA)</b>	25
<b>8.3 Estructuración genética poblacional y análisis demográficos</b>	32
<b>9.0 DISCUSION</b>	37
<b>CAPITULO II : Factores espaciales y calidad del ambiente sobre la diferenciación poblacional de dos especies de macroinvertebrados de la cuenca del Itata</b>	45
<b>10.0 RESUMEN</b>	46

11.0 INTRODUCCION .....	48
12.0 MATERIALES Y METODOS.....	52
12.1 Muestreo, Extracción de ADN y Condiciones de Amplificación de Marcadores Microsatélites.....	52
12.2. Análisis de la diversidad genética.....	53
12.3. Análisis de Estructuración Poblacional: Ordenación espacial y flujo génico.....	54
12.4. Efecto de la hidrografía (topografía) y la distancia geográfica sobre la diferenciación poblacional.....	56
12.5 Cuello de botella y Tamaño efectivo poblacional.....	57
12.6 Análisis de Partición de la varianza: contribución de las variables ambientales y espaciales sobre la diferenciación poblacional de <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> .....	59
12.6. i. Descriptores de la calidad del agua.....	59
12.6. ii Particionamiento de la varianza.....	60
13.0 RESULTADOS .....	62
13.1 Diversidad genética intrapoblacional.....	62
13.1. i Variabilidad genética del gastrópodo <i>Chilina dombeyana</i> .....	62
13.1. ii Variabilidad genética del insecto <i>A. chilensis</i> .....	64
13.2 Estructuración Poblacional en <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> .....	65
13.3 Tamaño efectivo poblacional, reducción poblacional y Migración.....	80
13.4 Patrón de la variabilidad genética.....	86
13.5 Análisis de la partición de la varianza para evaluar el efecto de las variables ambientales y espaciales que contribuyen a la diferenciación poblacional en <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> .....	88
14.0 DISCUSION .....	91
14.1 Diversidad genética intrapoblacional a través de la cuenca del Itata.....	91
14.2 Estructuración poblacional en <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> .....	92
14.3 Efecto de la hidrografía (topografía) y la distancia geográfica sobre la diferenciación poblacional.....	94
14.4 Aspectos demográficos de las poblaciones <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> .....	95
14.5 Efecto de las variables ambientales y espaciales que contribuyen a la diferenciación poblacional en <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> .....	96
15.0 CONCLUSIONES GENERALES.....	99

<b>16.0 BIBLIOGRAFIA</b>	.....	<b>103</b>
<b>17.0 ANEXOS</b>	.....	<b>125</b>
<b>i. SECCION A</b>	.....	<b>125</b>
<b>ii. SECCION B. PUBLICACIONES</b>	.....	<b>133</b>

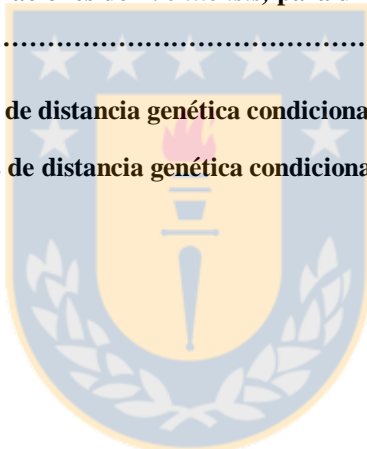


## INDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Variabilidad genética del ADNmt en las poblaciones muestreadas de <i>C. dombeyana</i> , <i>A. chilensis</i> y complejo <i>Aegla sp.</i> .....	24
Tabla 2. Resultados del análisis de anidamiento de clados (NCA) en <i>C. dombeyana</i> basados en pruebas de permutaciones .....	26
Tabla 3 . Resultados del análisis de anidamiento de clados (NCA) en el complejo <i>Aegla sp.</i> , basados en pruebas de permutaciones. ....	29
Tabla 4. Resultados del análisis de anidamiento de clados (NCA) en <i>A. chilensis</i> basados en pruebas de permutaciones .....	32
Tabla 5 . Resultados de los análisis jerárquicos de AMOVA para las poblaciones del complejo <i>Aegla sp.</i> , <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> codistribuidas en la cuenca del Itata.....	34
Tabla 6. Particiones utilizadas para realizar comparaciones en el análisis jerárquico de AMOVA.....	61
Tabla 7 . Características de los loci microsatélites aislados en el gastrópodo de agua dulce <i>Chilina dombeyana</i> .....	63
Tabla 8. Características de los loci microsatélites aislados en el insecto <i>Aquarius chilensis</i> .....	63
Tabla 9 . Variabilidad genética de las poblaciones de <i>C. dombeyana</i> para las 14 localidades consideradas en el estudio.....	64
Tabla 10. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>A. chilensis</i> , para las 13 localidades consideradas en el estudio .....	65
Tabla 11. Resultados de los análisis de AMOVA que muestra la cantidad de la varianza genética explicada por cada subdivisión en función de las agrupaciones hidrográficas y de Structure para las localidades muestreadas en <i>A. chilensis</i> y <i>C. dombeyana</i> .....	67
Tabla 12. Matriz de valores pareados de <i>Fst</i> y sus probabilidades entre los 14 sitios de muestreo en <i>C. dombeyana</i> . ....	67
Tabla 13. Matriz de valores pareados de <i>Fst</i> y sus probabilidades entre los 13 sitios de muestreo en <i>A. chilensis</i> . ....	68
Tabla 14. Estimación de los tamaños efectivos poblacionales ( <i>Ne</i> ) en las poblaciones de <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> . ....	81
Tabla 15. Valores de probabilidad asociados a un exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado en equilibrio mutación-deriva para las poblaciones de <i>C. dombeyana</i> y <i>A. chilensis</i> , mediante una prueba de Wilcoxon realizada con el programa Bottleneck. ....	82
Tabla 16. Resultados de los modelos lineales y de la fracción de las variables individuales significativas incorporadas a la partición de varianza.....	90

Anexos: i. Sección A

Tabla I. Características biológicas de historia de vida, requerimientos ecológicos y de hábitat de <i>C. dombeyana</i> , <i>A. chilensis</i> , y el complejo de especies de aeglas ( <i>Aegla sp.</i> ).....	125
Tabla II. Matriz de valores pareados de <i>Fst</i> en base al marcador mitocondial (COIADNmt) y probabilidades entre las poblaciones de <i>C. dombeyana</i> .....	126
Tabla III. Matriz de valores pareados de <i>Fst</i> en base al marcador mitocondial (COIADNmt) y probabilidades entre las poblaciones del complejo <i>Aegla sp.</i> .....	126
Tabla IV. Matriz de valores pareados de <i>Fst</i> en base al marcador mitocondial (COIADNmt) y probabilidades entre las poblaciones de <i>A. chilensis</i> . .....	127
Tabla V. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>C. dombeyana</i> , para un total de 11 loci marcadores microsátélites y 14 localidades de la cuenca del Itata.....	127
Tabla VI. Variabilidad genética de las poblaciones de <i>A. chilensis</i> , para un total de 6 loci marcadores microsátélites y 13 localidades de la cuenca del Itata.....	129
Tabla VII. Matriz de los valores pareados de distancia genética condicional (cGD) para <i>C. dombeyana</i> .....	130
Tabla VIII. Matriz de los valores pareados de distancia genética condicional (cGD) para <i>A. chilensis</i> .....	130



## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las poblaciones de macroinvertebrados de agua dulce muestreadas en el area de estudio y la respectiva distribución de haplotipos de ADNmt por especie .....	22
Figura 2. Red de haplotipos de <i>Chilina dombeyana</i> con el diseño de clados anidados para datos de secuencias COI-ADNmt. ....	26
Figura 3. Red de haplotipos del complejo <i>Aegla sp.</i> con el diseño de clados anidados para datos de secuencias COI-ADNmt.....	28
Figura 4. Árbol no-enraizado basado en Máxima Verosimilitud que muestra las relaciones filogenéticas entre haplotipos de ADNmt del complejo <i>Aegla sp.</i> que habitan la cuenca del Itata.....	30
Figura 5. Red de haplotipos de <i>Aquarius chilensis</i> con el diseño de clados anidados para datos de secuencias COI-ADNmt. ....	31
Figura 6. Test de Mantel de las correlaciones entre la distancia geográfica (Hidrográfica) y divergencia genética ( $F_{ST} / (1-F_{ST})$ ) para haplotipos de: A) <i>C. dombeyana</i> , B) <i>A. araucaniensis</i> .....	36
Figura 7. Análisis de autocorrelación espacial (Mantel correlograma) en A) <i>C. dombeyana</i> , B) <i>A. araucaniensis</i> .....	36
Figura 8. Análisis de aislamiento por distancia (IBD) mediante la prueba de Mantel para <i>A. chilensis</i> y <i>C. dombeyana</i> .....	70
Figura 9. Mantel autocorrelograma ( $r$ =Estadístico Mantel Estandarizado) en base a las medidas de distancia genética (cGD) y $F_{st}$ para las localidades estudiadas en <i>A. chilensis</i> y <i>Chilina dombeyana</i> .....	71
Figura 10. A) Ploteo tridimensional del análisis factorial de correspondencia obtenido en GENETIX utilizando 11 loci microsatélites de <i>C. dombeyana</i> . B) Árbol de distancia DAS entre individuos.....	72
Figura 11. A) Ploteo tridimensional del análisis factorial de correspondencia obtenido en GENETIX utilizando 6 loci microsatélites de <i>A. chilensis</i> . B) Árbol de distancia DAS entre individuos.....	72
Figura 12. Resultados de análisis de agrupamiento con Structure para las poblaciones de <i>C. dombeyana</i> , representados por tres diferentes colores. ....	74
Figura 13. Resultados de análisis de agrupamiento con Structure para las poblaciones de <i>A. chilensis</i> , representados por tres diferentes colores .....	75
Figura 14. Graph poblacional para las localidades de A) <i>C. dombeyana</i> y B) <i>A. chilensis</i> .....	77
Figura 15. Modelo de interpolación gráfica basado en la representación gráfica de la estructura genética de A) <i>Chilina dombeyana</i> B) <i>Aquarius chilensis</i> .....	78
Figura 16. Árbol de Neighbor-joining (NJ) del modelo Stream Tree de diferenciación genética en base a la distancia genética cGD entre A) 13 poblaciones de <i>A. chilensis</i> y B) 14 poblaciones de <i>C. dombeyana</i> .....	79
Figura 17. Arbol de Neighbour-joining en base a la distancia de Nei ( $D_a$ ) entre las poblaciones de A) <i>C. dombeyana</i> , y B) <i>A. chilensis</i> .....	84

Figura 18. Número de migrantes históricos entre las diversas localidades muestreadas para A) *C. dombeyana* y B) *A. chilensis*. .....85

Figura 19. Medidas de variabilidad genética en *C. dombeyana* y *A. chilensis* versus las distancias entre las localidades y el punto de confluencia en la desembocadura del Río Chillán sin considerar las localidades de Cholguán.....88

Figura 20. Diagrama de Venn de la partición de la varianza en la distancia genética condicional (cGD) entre poblaciones de A) *C. dombeyana* y B) *A. chilensis*. .....90

*Anexos: i. Sección A*

Figura I. Test de Mantel de las correlaciones entre la distancia geográfica (Hidrográfica) y divergencia genética ( $F_{ST}$  /  $(1-F_{ST})$ ) para haplotipos de cada par de poblaciones de *A. chilensis*, en base a los resultados utilizando el marcador COI-ADNmt.....131

Figura II. Análisis de autocorrelación espacial (Mantel correlograma) en *A. chilensis* mediante marcador mitocondrial (COI-ADNmt).....131

Figura III. Ubicación de las poblaciones de macroinvertebrados de agua dulce muestreadas en el area de estudio. ....132





## **AGRADECIMIENTOS**

Quiero agradecer el apoyo recibido del proyecto Fondecyt N° 1090404 por el aporte realizado al presente trabajo de investigación.

A las becas de Doctorado Nacional de Conicyt.

A la beca para la realización de Tesis Doctoral de Conicyt.

A la beca de término de Tesis Doctoral de Conicyt.

A mi profesor guía el Doctor Nicolás Gouin, por su ayuda en la dirección y corrección de este trabajo, publicaciones y pasantías realizadas. Por su constante colaboración y disposición en la realización de cursos y unidades de investigación durante mis estudios de Doctorado.

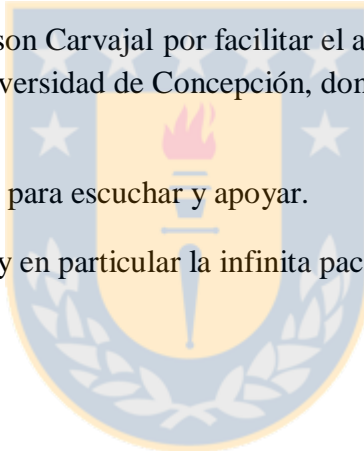
A la Dra. Vivían Jerez y al Dr. Cristián Hernández por todas las gestiones realizadas que han sido un gran apoyo para avanzar y dar termino exitoso a mis estudios de Doctorado.

Al comité de Doctorado por la disposición a revisar el presente trabajo y por todas las sugerencias.

A la Dra. Amparo Uribe y al Dr. Nelson Carvajal por facilitar el acceso a las instalaciones del laboratorio de Enzimología de la Universidad de Concepción, donde fue desarrollada gran parte del trabajo de laboratorio de esta tesis.

A mis compañeros que siempre están para escuchar y apoyar.

A mi familia por su constante apoyo y en particular la infinita paciencia de mi hija Camila.



## RESUMEN

Los ecosistemas dulceacuícolas se encuentran entre los más alterados y de mayor peligro de pérdida de la biodiversidad. En ecosistemas lóticos, sumado a una natural estructuración debido a una arquitectura jerárquica de redes hídricas, se encuentran las perturbaciones de origen antropogénico que fragmentan el hábitat, lo que altera el grado de conectividad entre sitios e incrementa el nivel de estructuración de sus poblaciones. Sin embargo, los patrones intraespecíficos de la diversidad genética son determinados por procesos históricos y contemporáneos. El rol que ejercen los factores históricos fue evaluado en un complejo de tres especies de aeglas (*Aegla sp.*), un insecto *Aquarius chilensis* y un gastrópodo, *Chilina dombeyana* mediante un análisis filogeográfico basado principalmente en un análisis de clados anidados (NCA) utilizando secuencias de ADNmt (COI). Los resultados sugieren que un componente histórico de fragmentación pasada y contiguo rango de expansión puede haber actuado sobre las poblaciones de las especies estrictamente acuáticas. En el caso de las poblaciones del insecto no existen asociaciones significativas para la totalidad del cladograma de esta especie aquello probablemente debido a un mayor flujo génico. Las diferencias entre especies muy probablemente sean explicadas en función de las diferentes habilidades dispersivas existentes entre ellas. Con la finalidad de evaluar la influencia que ejercen una variedad de características del paisaje sobre la conectividad y grado de estructuración de las poblaciones, se realizó un estudio comparativo bajo el marco de la disciplina de la genética del paisaje en las especies *C. dombeyana* y *A. chilensis*, quienes fueron seleccionadas por encontrarse ampliamente representadas en la cuenca del Itata, por presentar diferentes habilidades de dispersión y niveles de tolerancia a la contaminación ambiental. Mediante la utilización de marcadores microsatélites polimórficos fueron evaluados aspectos demográficos y el rol de los factores espaciales, variables ambientales físico-químicas y de hábitat. Los resultados muestran diferencias entre las poblaciones de ambas especies. A diferencia de las poblaciones del insecto, las poblaciones de *C. dombeyana* muestran evidencia de un nivel de variabilidad genética levemente inferior y que disminuye a mayores distancias desde la zona de confluencia en la desembocadura del Río Chillán. Además, muestran evidencia de un patrón de aislamiento por distancia ( $r=0.869$ ,  $P=0.001$ ), una mayor influencia de la hidrografía y un nivel de estructuración levemente superior ( $F_{ST} = 0,318$   $P < 0.001$ ) que las poblaciones de *A. chilensis* ( $F_{ST} = 0.213$ ,  $P < 0.001$ ), explicado en esta última especie en función del elevado nivel de diferenciación que presentan algunas localidades en especial T6. Los tamaños efectivos ( $N_e$ ) son variables entre poblaciones en ambas especies, con una tendencia hacia una disminución en el tiempo en *C. dombeyana* ( $N_e$  histórico promedio=277,  $N_e$  actual promedio=58) y *A. chilensis* ( $N_e$  histórico promedio=267,  $N_e$  actual promedio=64). En ambas especies existe evidencia de

que algunas poblaciones pueden sufrir eventos de cuellos de botella recientes ( $p < 0.05$ ), lo cual demuestra que las poblaciones de estas especies pueden sufrir episodios de inestabilidades demográficas.

Los resultados de los análisis de partición de varianza indican diferencias entre las especies, para las poblaciones de *C. dombeyana* las variables ambientales físico-químicas (conductividad y fósforo orgánico) y de hábitat (diámetro de bolones Max y Medio) explican el 44% de la diferenciación genética lo que, sumado al efecto de las variables espaciales, explicaría un 77%. Para las poblaciones de *A. chilensis* las variables ambientales físico-químicas (demanda química de oxígeno y nitratos) explican el 13% de la divergencia genética y que sumado al efecto de variables espaciales y de hábitat (velocidad de corriente) explicaría un 25%. Sin embargo, en diferente medida las poblaciones de ambas especies son afectadas por procesos de contaminación de origen urbano y agrícola, lo que sumado a los efectos estocásticos y espaciales contribuye a los procesos de diferenciación de sus poblaciones.



## 1.0 INTRODUCCION GENERAL

### 1.1 Ecosistemas dulceacuícolas en el contexto del cambio global

Las expansiones humanas así como el creciente aumento en el uso de la tierra sobre todo en las últimas décadas han resultado en una pérdida de hábitat, en modificaciones y fragmentaciones de muchos de los hábitat naturales del mundo (Stutchbury, 2007; Aguilar *et al.*, 2008; Sherry, 2008). Precisamente son estos disturbios antropogénicos los que más han influenciado recientemente la estructura poblacional de la mayoría de las especies, siendo la fragmentación y la pérdida de hábitat las más importantes perturbaciones que afectan el tamaño y número de las poblaciones (Goodman *et al.*, 2001; Radiespiel *et al.*, 2008). La fragmentación de una población puede tener importantes consecuencias sobre la diversidad genética y el grado de estructuración que esta presenta, principalmente por los efectos de la deriva genética y la reducción del flujo génico (Martínez-Cruz *et al.*, 2007). Existe abundante evidencia empírica de que la pérdida de hábitat tiene efectos negativos sobre la biodiversidad (Brooks *et al.*, 2002; Santos & Telleria, 2006) y que la disminución de la diversidad genética también tiene a largo plazo importantes consecuencias sobre el potencial evolutivo de las poblaciones para adaptarse a cambios de las condiciones ambientales (Traill *et al.*, 2010). Tanto la endogamia como la pérdida de diversidad en las poblaciones de pequeño tamaño también pueden comprometer su persistencia a corto plazo (Frankham, 2005); por ello, resulta fundamental avanzar en el conocimiento de la estructura y tipos de relaciones entre poblaciones para evaluar las consecuencias genéticas de la fragmentación del hábitat y garantizar tanto un adecuado manejo de especies en peligro (Pacioni *et al.*, 2010) como la mantención de la biodiversidad generalmente afectada por el incremento de parches aislados y de menor tamaño (Fahrig, 2003).

Los ecosistemas dulceacuícolas no escapan a esta situación y son particularmente vulnerables a los efectos del cambio global, siendo identificados como los de mayor peligro de pérdida de la biodiversidad (MEA, 2005; Revenga *et al.*, 2005; Clarke *et al.*, 2008) y con una mayor necesidad de atención de conservación (Abell, 2002). Eso se debe principalmente al impacto que generan las diferentes actividades de tipo antropogénico sobre los ecosistemas dulceacuícolas, incluyendo alteraciones en el uso del suelo, deposición de nitrógeno, invasión de especies exóticas y mayor extensión en el cambio del clima (Kapelle *et al.*, 1999; Sala *et al.*, 2000). Según Revenga *et al.* (2005), las amenazas a los ecosistemas y a la biodiversidad dulceacuícola pueden ser clasificadas en cinco categorías diferentes: sobreexplotación, contaminación del agua, modificación del flujo de agua (corriente), destrucción o degradación del agua, e invasión de especies exóticas. Las influencias combinadas e interactuantes de estos cinco procesos han resultado a nivel mundial en la disminución

tanto del número de poblaciones de especies dulceacuícolas como del rango geográfico que ellas ocupan (Dudgeon *et al.*, 2006; Strayer, 2006), situación que puede producir fragmentación de las poblaciones y consecuente alteración de la variabilidad genética y de su potencial evolutivo (Bijlsma *et al.* 2000; Hedrick 2000; Spielman *et al.* 2004a, b). Dado el alarmante deterioro de los ecosistemas acuáticos y al hecho de que la presencia de especies confinadas a pequeños rangos geográficos es también muy común en ecosistemas de agua dulce (Abell *et al.*, 2008), surge la necesidad de implementar investigaciones que puedan llevar a la identificación de los mejores indicadores de la condición y amenazas a las especies dulceacuícolas (Revengea *et al.*, 2005; Dudgeon *et al.*, 2006). Esto implica evaluar el impacto de la tendencia global en la disminución de la calidad de agua y cómo afecta aquello a las poblaciones de especies dulceacuícolas, y así poder comprender como las especies reaccionan a este cambio. De hecho, trabajos recientes muestran evidencia de que las poblaciones de insectos acuáticos tienen más riesgos de extinción en hábitats de buena calidad que en hábitats de una calidad más pobre (Suhonen *et al.*, 2010).

### **1.2 Estructuración poblacional en sistemas lóticos: causas, consecuencias y desafíos**

Los ecosistemas de agua dulce corresponden a hábitats naturalmente fragmentados (Sharma & Hughes, 2009; Woodward *et al.*, 2010), donde el intercambio biótico entre parches ocurre por medio de la dispersión de individuos, un proceso que es asociado al cambio evolutivo a través del consecuente movimiento de genes (ej. flujo génico) entre sitios (Bohonak & Jenkins, 2003). Analizar este proceso es fundamental por tres razones: i) para entender cómo el movimiento de individuos o gametos influencia la estructura genética de las poblaciones, ii) para determinar los factores que promueven la adaptación local, y iii) para describir la dinámica que facilita la propagación de nuevas mutaciones benéficas (Manel *et al.*, 2003). Las características del paisaje que influyen en la conectividad entre poblaciones y, por ende, en la distribución de la diversidad genética intraespecífica corresponden a los gradientes de pendiente a lo largo de los cursos de agua, a la organización jerárquica y la variabilidad hidrológica de los hábitats, lo cual contribuye a la estructuración poblacional en las especies lóticas dentro de las cuencas (Cook *et al.*, 2010). De hecho, las características del hábitat local y de los gradientes ambientales (ej. temperatura del agua, calidad del agua, etc.) pueden tener un rol importante en los patrones de dispersión y subsecuente flujo génico y en adaptación local (Bohonak & Jenkins, 2003). Aún pequeñas alteraciones de las condiciones ambientales pueden afectar la composición genética de las poblaciones (Schwartz *et al.* 2007) y cada vez es mayor la evidencia de que los cambios evolutivos pueden ser rápidos y estar asociados con las mismas perturbaciones antropogénicas responsables de la actual crisis de extinción incluyendo la sobreexplotación, la degradación y

fragmentación del hábitat, y las invasiones biológicas (Stockwell *et al.*, 2003; Carroll *et al.*, 2007; Hendry *et al.*, 2008). Por ello, resulta primordial evaluar el grado de conectividad entre hábitats de agua dulce dentro de las cuencas fluviales para comprender los efectos de los cambios antropogénicos sobre la fragmentación y la diferenciación de las poblaciones. Además, la arquitectura de drenaje que es propia de las cuencas hidrográficas de ríos conduce a una baja conectividad física entre ramas (Gomi *et al.*, 2002) y los organismos que en ella habitan enfrentan generalmente gradientes de calidad del hábitat y de resistencia al movimiento más que una situación binaria de hábitat buenos e inhóspitos (Cushman, 2006b). En especies que carecen de un estado de dispersión aérea incluso los parches que se encuentran espacialmente cercanos pueden resultar efectivamente muy lejanos (Fagan, 2002), incrementando las tasas de diferenciación genética de las poblaciones (Hughes *et al.*, 1999), disminuyendo además las tasas de inmigración hacia los ensamblajes locales (Hughes, 2007), lo cual limita también las oportunidades de recolonización en eventos de extinciones locales (Richardson & Danehy, 2007). Los organismos acuáticos quedan dispuestos al interior de este sistema de redes fluviales en sistemas lineares que se ajustan a un modelo de intercambio de miembros conocido como “*stepping-stone*” y que involucra exclusivamente a las poblaciones adyacentes. Por lo tanto las mayores estimaciones de flujo génico se encuentran en las poblaciones más cercanas (Palumbi, 2003). En este tipo de sistema, las interacciones de los organismos con el ambiente biótico y abiótico son el contexto de la selección natural y será lo que finalmente determine qué genotipos son los mejores para una situación dada (Hufbauer & Torchin, 2007). Siendo la estructura genética espacial el resultado de una combinación de procesos evolutivos, conductuales, ecológicos y estocásticos que operan en diferentes escalas espaciales y temporales y que raramente se encuentran estables o en equilibrio (Epperson, 1993).

### **1.3 Ecología, rasgos de la historia de vida y vulnerabilidad de las especies**

Entre las especies más representadas a lo largo de los ríos de la región Central-Sur de Chile, se encuentran las especies de aeglas (*Aegla araucaniensis*, *Aegla pewencha*, *Aegla laevis talcahuano*), la especie de insecto *Aquarius chilensis* y el gastrópodo *Chilina dombeyana*. Desde una perspectiva ecológica, la familia Aeglidae (Dana, 1852) tiene la particularidad de ser la única familia de crustáceos decápodos restringidos completamente a hábitats dulceacuícolas (Bond-Buckup *et al.*, 2008). Corresponden a un grupo endémico de Sudamérica y pertenecientes a un único género *Aegla* Leach, el cual consiste de aproximadamente 70 especies y subespecies reconocidas (Bond-Buckup, 1994; Bond-Buckup *et al.*, 2008; Bücken *et al.*, 2008; Giri & Loy, 2008) distribuidas entre Chile, Brazil, Argentina, Uruguay y Bolivia. En Chile, existen 19 especies y subespecies de aeglas, incluyendo 16 taxa

endémicos (Pérez-Losada *et al.*, 2002a). Hasta ahora los estudios moleculares realizados en aeglas mediante marcadores mitocondriales y nucleares han permitido avanzar considerablemente en el conocimiento que se tiene de las relaciones filogenéticas entre los aeglidos chilenos y respecto del origen del grupo (Pérez-Losada *et al.*, 2002b). Aspectos de su historia de vida señalan que las aeglas son dioicas, presentan un desarrollo directo sin estados larvales de nado libre y que las hembras pueden depositar entre 64-255 huevos (López 1965), los cuales cargan unidos a los pleopodos debajo del abdomen (Martin & Felgenhauer, 1986, Bücker *et al.*, 2008, Bond-Buckup *et al.*, 2008). El período de incubación dura entre cuatro a ocho meses, por lo que una hembra adulta puede realizar una puesta de huevos por año y el proceso de reclutamiento ocurriría para la mayoría de las especies durante la primavera (Bond-Buckup *et al.*, 2008). De los huevos eclosionan estados juveniles cuyo largo del caparazón mide entre 1.13 - 1.58 mm los que permanecen unidos al abdomen de la madre por algunos días después de la eclosión (Greco *et al.*, 2004, Bond-Buckup *et al.*, 2008) y son morfológicamente similares al adulto. Estudios de contenido estomacal indican que estos individuos son omnívoros alimentándose de fino material orgánico particulado, partes de plantas en descomposición, de macrófitas y de invertebrados acuáticos (Isler, 1988, Castro-Souza & Bond-Buckup, 2004, Bücker *et al.*, 2008). Las aeglas son encontradas en ambientes con buenas condiciones ambientales y aguas relativamente bien oxigenadas, por lo tanto han sido considerados organismos sensitivos a las perturbaciones ambientales (Trevisan *et al.*, 2009).

El suborden Basommatophora (Mollusca: Gastropoda) corresponde a un clado monofilético que comprende a la mayoría de los gastropodos pulmonados que viven en ecosistemas dulceacuícolas (Jarne *et al.*, 2010). El grupo comprende cinco familias y cerca de 300 especies ovíparas y que depositan sus huevos en cápsulas (Escobar *et al.*, 2011). Con la potencialidad de reproducirse uniparentalmente a través de una autofertilización interna o biparentalidad a través de fertilización cruzada (Jarne *et al.*, 1993; Jarne *et al.*, 2010). La especie de molusco gastrópodo, *C. dombeyana* (Bruguière, 1789) pertenece a la familia Chiliniidae, endémica de Chile, cuyas poblaciones son generalmente encontradas en aguas frías, limpias y bien oxigenadas de Chile Central (Valdovinos *et al.*, 2004; Valdovinos, 2006). Esta especie pertenece a un género primitivo de caracoles de hábitos límnicos (Brace, 1983), descritos como hermafroditas simultáneos, de escaso desplazamiento, gran abundancia local y de fácil captura (Bisol *et al.*, 1994). Individuos de esta especie pueden hacer 4-8 puestas de 20-30 huevos cada temporada, y 90% de las puestas se registran entre Diciembre y Marzo aunque las puestas pueden encontrarse esporádicamente todo el año, careciendo de un estado larval de vida libre (Valdovinos C., comunicación personal). La mayoría de los gastrópodos de agua dulce son



micro herbívoros y/o pastoreadores micro omnívoros que se alimentan de películas bacteriales, algas y diatomeas (Strong, 2008). Existen escasos antecedentes de esta especie y los pocos estudios que han sido realizados tienen relación a un interés epidemiológico respecto de los estados infecciosos que suelen parasitar estos organismos.

El insecto *A. chilensis* es una especie de heteróptero conocido comúnmente con el nombre de “zapateros” o “chinchas patinadores”, que pertenece a la familia Gerridae y corresponde a insectos comunes de hábitat acuáticos presentes en hábitats templados, subtropicales y tropicales (Andersen, 1982; Damgaard & Cognato, 2006) de aguas lólicas o lénticas, especializados en la película superficial del agua pero con un desarrollo acuático (Andersen, 1982). Esta especie corresponde a la única especie citada para Chile (Morales-Castaño & Molano-Rendon, 2009), desde una perspectiva ecológica son organismos depredadores, que se alimentan preferentemente de presas vivas que caen a la superficie del agua (Stonedahl, 1982). El ciclo de vida de *A. chilensis* incluye las etapas de huevo, cinco estados larvales y el estado adulto. Usualmente depositan sus huevos bajo la superficie de palos, vegetación y otros materiales (Meranezzi & Mazunari, 2007). Los huevos presentan un tamaño promedio entre 0.3-1.6 mm y son depositados en grupos y unidos mediante una sustancia gelatinosa (Andersen & Polhemus, 1976, Stonedahl, 1982). En el caso de los gerridos, las estrategias reproductivas pueden reflejar situaciones de protección de los sitios de oviposición por parte de los machos como mecanismo de defensa del territorio y aunque en alguna extensión esta conducta es dependiente de la densidad de otros machos, también puede estar asociada con cambios estacionales del hábitat (Spence & Andersen, 1994). En general, especies de Gerridae ponen entre 20-40 huevos, y en zonas templadas pueden hacer dos o más puestas por temporada (Spence & Wilcox, 1986; Spence & Andersen, 1994). Basado en las salidas a terreno, *A. chilensis* empieza a reproducirse en la región del Bío-Bio en Diciembre y termina muy probablemente en Marzo ya que no hay evidencia de pares que fueran encontradas en Abril y Mayo (Gouin N., comunicación personal). Las variaciones en el esfuerzo reproductivo entre especies de gerridos pueden corresponder a adaptaciones a rasgos del hábitat que afectan las tasas de mortalidad de adultos y juveniles (Vepsäläinen & Patama, 1983; Kaitala *et al.*, 1989; Firko, 1986), y tanto los factores abióticos como el clima (Firko, 1986) o la contaminación (Bendell, 1988) pueden ser importantes agentes de mortalidad en estas especies. También un mayor período de reproducción así como una mayor fecundidad son características esperables en especies de hábitat impredecibles (Spence & Andersen, 1994). Teniendo presente además, que la tasa de producción de huevos en estas especies se encuentra también limitada por la disponibilidad de alimento (Spence & Andersen, 1994), entonces puede ocurrir que el crecimiento de la población sea limitado en condiciones menos



favorables afectando las características demográficas de las poblaciones, dado principalmente por la adopción de una estructura gregaria compacta en la cual mayoritariamente predomina una forma áptera (Fairbairn, 1984). Sin embargo, a partir de las experiencias en terreno tres individuos de un total de 743 que fueron muestreados corresponden a individuos alados del tipo macrópteros y que representan el 0.3% de la población muestreada (Gouin N., comunicación personal). A pesar de la existencia de un polimorfismo respecto del grado del desarrollo alar en los insectos heterópteros (Anderson, 1982), en la mayoría de las poblaciones los adultos carecen de alas y la dispersión entre arroyos es rara (Calabrese, 1979; Fairbairn, 1986; Fairbairn & Desranleau, 1987). Esta característica ha sido expuesta como una causa probable de una estructuración genética como resultado de un reducido flujo génico debido a que puede afectar las capacidades de dispersión de las especies en busca de mejores hábitat (Zera, 1981).

Las especies de aeglas y el gastrópodo *C. dombeyana* corresponden a organismos estrictamente acuáticos y por lo tanto confinados al interior de un cuerpo de agua. Aquello intensifica el grado de vulnerabilidad respecto de las amenazas antropogénicas que ocurren en estos ecosistemas, tales como deforestación, urbanización, cultivo, pastoreo excesivo, introducción de especies exóticas, y fragmentación del hábitat debido por ejemplo a la construcción de presas (Pérez-Losada *et al.*, 2002; Nilsson *et al.*, 2005). En aeglas el quinto par de pereopodos es reducido en tamaño anulando la capacidad de caminar activamente (Lopretto, 1978; Martin & Abele, 1988) y ha sido un grupo taxonómico utilizado en estudios comparativos por su limitada habilidad de dispersión (Xu *et al.* 2009, Valdovinos *et al.*, 2010), en comparación con peces o formas adultas aladas. Aquello, reviste vital importancia en términos de conservación debido a que los invertebrados de baja vagilidad resultan más lábiles al impacto de las actividades antropogénicas debido a que muchas de sus poblaciones son localizadas y fragmentadas (Valdovinos *et al.*, 2010). La disminución de la fauna de gastrópodos de agua dulce del mundo ha sido atribuida a las características propias de la historia de vida de estos organismos y a los efectos antropogénicos. La poca vagilidad, los requerimientos de hábitat específicos, los rangos geográficos restringidos y la baja fecundidad afectan la capacidad de estos organismos de adaptarse a los cambios en los regímenes de flujo de agua y a la contaminación (Strong *et al.*, 2008). Una tabla comparativa de las características biológicas y requerimientos ecológicos entre las especies se encuentra disponible en la sección de anexos (Anexo A, Tabla I).

Bond-Buckup *et al.* (2008) reconocen bajo el criterio de IUCN a 23 especies de aeglas consideradas como especies amenazadas o en peligro de extinción, debido principalmente a que la mayoría de las especies tienen áreas de distribución restringidas y al rápido deterioro que sufre el ambiente que ellas

ocupan. En un estudio reciente, Pérez-Losada *et al.* (2009) utilizaron descripciones publicadas del hábitat, análisis de poblaciones, y las distribuciones geográficas de todas las especies de *Aegla* en Sudamérica para aclarar su estado de conservación, encontrando que el 32% de las especies de *Aeglas* se podían considerar como amenazadas. *C. dombeyana* y en general todos los integrantes de la familia Chilinidae han sido clasificados como vulnerables debido principalmente al incremento en la pérdida de hábitat que ocupan estos organismos (Valdovinos *et al.*, 2006). De acuerdo a Figueroa *et al.* (2007), *C. dombeyana* es una especie que presenta un menor nivel de tolerancia a la contaminación del agua que *Aquarius chilensis*, siendo entonces esperable que en comparación a las poblaciones de *A. chilensis*, sus poblaciones sean más perjudicadas al enfrentar las zonas más perturbadas de la cuenca, lo que puede alterar su metabolismo o el número de oviposaduras como ha sido evidenciado empíricamente cuando organismos de estas especies han sufrido, por ejemplo, estados infecciosos (Olmos & George-Nascimento, 1997). Entonces una mala calidad del agua puede afectar en mayor medida la sobrevivencia, generar procesos de extinciones locales o incrementar el grado de fragmentación y pérdida de la variabilidad genética de las poblaciones de *C. dombeyana*.

#### **1.4 Marcadores Moleculares**

La utilización de secuencias de ADN mitocondrial para detectar estructura poblacional y patrones históricos en la diferenciación genético poblacional es una técnica ampliamente utilizada por los investigadores (Avise, 2004). El genoma mitocondrial de invertebrados es una pequeña molécula circular haploide, tienen una longitud total de unos 16000 pares de bases y codifica para 13 proteínas, 22 tRNA y 2 RNA ribosomales (Boore, 1999). Debido a su tamaño relativamente pequeño y al alto número de copias existentes en una célula, esta molécula resulta muy fácil de amplificar. Además, cuenta con un limitado mecanismo de reparación de ADN, razón por la que tiende a evolucionar a una tasa que es 2 a 10 veces más elevada que la del genoma nuclear (Fetzner & Crandall, 2002). El ADN mitocondrial es un marcador de elección por su naturaleza haploide, de herencia maternal, falta de recombinación y por el revolucionario aspecto de tratar a los segmentos de ADNmt extraídos a partir de individuos pertenecientes a grupos poblacionales, como unidades operacionales taxonómicas (OTUs) en un análisis filogenético (Hickerson *et al.*, 2010). Estos datos haplotípicos pueden ser tratados filogenéticamente al interior de las especies rindiendo filogenias intraespecíficas o asociados a componentes históricos responsables de la estructura poblacional (Avise, 2004).

Para investigar las asociaciones entre datos genéticos y rasgos del paisaje es necesario realizar una cuidadosa selección de los marcadores moleculares que se van a utilizar. Los marcadores nucleares son

particularmente útiles a escalas espaciales pequeñas (ej. local o regional) y generalmente corresponden a escalas temporales finas (Balkenhol *et al.*, 2009). Estos presentan la ventaja de definir genotipos multilocus a partir de loci que exhiben un gran número de alelos segregantes y entonces el número posible de genotipos multilocus que se pueden definir resulta ser muy elevado (Chakraborty *et al.*, 1993). Entre los marcadores genéticos más ampliamente usados en estudios de genética de poblaciones, ecología molecular y conservación, se encuentran los microsatélites o secuencias de repetición simples (SSR). Estos marcadores se caracterizan por poseer un gran poder de resolución genética (Schlötterer, 1998; Allendorf & Luikart, 2007), incluso en poblaciones con bajos niveles de variación genética, con algún grado de endogamia o con una cercanía geográfica (Rakoczy-Trojanowska & Bolibok, 2004). Ellos consisten de repeticiones en tandem altamente variables, con motivos de repetición generalmente de corta secuencia de uno a seis nucleótidos (ej. (CA)<sub>n</sub>; (TAA)<sub>n</sub>; (CATA)<sub>n</sub>; etc.) (Tóth *et al.*, 2000). Dada su alta tasa de polimorfismo, los microsatélites son corrientemente los mejores marcadores posibles para evaluar flujo génico y diferenciación genética poblacional, aún en una muy pequeña escala geográfica (Lowe *et al.*, 2004). Sin embargo, cuando se utilizan marcadores microsatélites surge la dificultad de tener que seleccionar el modelo mutacional más apropiado entre varios modelos que se encuentran disponibles, siendo tres los más utilizados. El modelo paso a paso (SMM; Ohta & Kimura, 1973) asume que cada mutación incrementa o disminuye el número de repeticiones en solo una unidad repetitiva, mientras que el modelo de alelos infinito (IAM; Kimura & Crow, 1964) asume que cada mutación al azar crea un nuevo alelo. Si el primero parece implícitamente más apropiado con los marcadores microsatelitales, debido a su estructura repetitiva, se acepta actualmente que el modelo mutacional ideal se situaría probablemente entre estos dos modelos extremos (Di Rienzo *et al.*, 1994). Estos autores propusieron un modelo mixto (TPM) que permite incorporar una fracción de mutaciones de tipo SMM y la otra de mutaciones de tipo IAM. En este estudio utilizamos un modelo mixto que incluye 70 % de mutaciones SMM y 30% de IAM, lo que corresponde a valores generalmente utilizados.

Además, a diferencia de los marcadores AFLP, también muy utilizados en estudios de genética del paisaje (Sork & Waits, 2010), los microsatélites presentan la gran ventaja de ser codominantes. Xu & Fu (2004) señalan que estos marcadores pueden ser particularmente útiles para resolver historias genéticas de las poblaciones debido a su alta tasa de mutación y gran nivel de polimorfismo, siendo capaces de revelar variación a escala fina entre poblaciones que recientemente han divergido y que otros marcadores (ej. aloenzimas, secuencias de ADN mitocondrial) fallan en detectar (Selkoe & Toonen, 2006). Para los loci microsatélites, selectivamente neutrales, la estructura genética de la población es

determinada primariamente como un balance entre el impacto segregante de la deriva (tamaño efectivo de la población) y el efecto homogenizador de la migración (Ridley, 1996; Knopp & Merila, 2009).

Una combinación de marcadores mitocondriales y nucleares permite una aproximación integral que combina el alto polimorfismo de los marcadores microsátélites con las altas tasas de mutación de los marcadores mitocondriales; aquello permite resolver eventos demográficos de pequeña escala con eventos filogeográficos de escalas de mayor tiempo ancestral o históricas (Feulner *et al.*, 2004).



## 2.0 HIPÓTESIS DE TRABAJO:

**H1: Dado que los patrones de distribución, filogeografía y dinámica poblacional de los organismos dulceacuícolas están influenciados por características biológicas propias de las especies y factores físicos históricos y contemporáneos del ambiente, se espera que especies que cohabiten y compartan mayores características biológicas presenten patrones filogeográficos y dinámicas poblacionales concordantes.**

Los eventos históricos (ej. Fragmentación pasada y rangos de expansión) que pueden influenciar la historia evolutiva de especies codistribuidas debieran afectar de manera diferencial su estructura filogeográfica en función de sus características biológicas (dispersión) y la capacidad de respuesta que estas presentan, así como también la historia demográfica de sus poblaciones cuyas diferencias históricas en los tamaños poblacionales (expansión o contracción poblacional) puede ser respuesta de su condición biológica.

**H2: En un sistema hidrográfico de ríos donde se espera que las poblaciones se encuentren interconectadas y estructuradas de acuerdo a un modelo de tipo salto en piedra, aquellas poblaciones de especies con menor capacidad dispersiva presentarán mayores niveles de diferenciación genética y estructuración poblacional.**

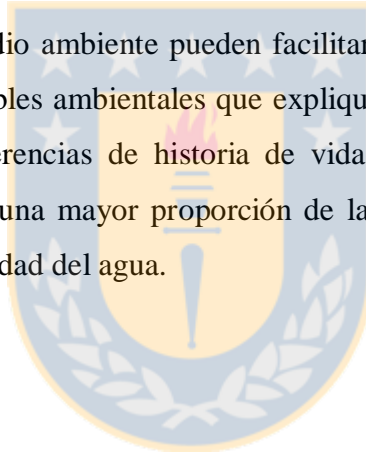
Bajo un modelo nulo de tipo salto de piedra el flujo génico de las poblaciones disminuye como resultado de la distancia geográfica, lo que puede generar un patrón de aislamiento por distancia, en el que la mayor divergencia entre las poblaciones se establece en función de la distancia existente entre ellas. Las especies con menor capacidad de dispersión pueden incrementar la pérdida de la variabilidad genética hacia porciones superiores de la cuenca que presentan mayores distancias desde la zona de desembocadura.

**H3: Poblaciones de especies de macroinvertebrados que se encuentren en zonas perturbadas tenderán a presentar mayor inestabilidad demográfica y menor tamaño efectivo ( $N_e$ ) que aquellas poblaciones de zonas no perturbadas, siendo mayor el efecto en poblaciones de especies menos tolerantes a la calidad del agua.**

Las poblaciones que habitan en lugares perturbados de la cuenca pueden estar frecuentemente sometidas a fluctuaciones demográficas y sufrir recurrentes eventos de cuello de botella, lo que conlleva a un decrecimiento del tamaño de las poblaciones locales y por ende a un decrecimiento del tamaño efectivo de sus poblaciones. Entonces, las poblaciones de los sitios más afectados deberían presentar más evidencias de cuellos de botella recientes que las poblaciones de sitios de mejor calidad, y este patrón debiese ser más pronunciado en aquellas especies menos tolerantes a la contaminación del agua.

**H<sub>4</sub>: En una especie menos tolerante a una mala calidad de agua se debería observar correlaciones significativas entre las variables ambientales responsables de la estructuración poblacional y la distancia genética existente entre sus poblaciones, siendo las variables que caracterizan la calidad del agua aquellas que debieran resultar más informativas para esta especie.**

Características del paisaje y del medio ambiente pueden facilitar o restringir la conectividad genética entre poblaciones. Aunque las variables ambientales que expliquen patrones de estructuración pueden diferir entre especies debido a diferencias de historia de vida, se espera para una especie menos tolerante a la calidad del agua que una mayor proporción de la varianza genética sea explicada por aquellas variables que reflejan la calidad del agua.



### 3.0 OBJETIVOS

#### Objetivo general

Evaluar la importancia relativa de los factores históricos, espaciales y ambientales sobre la diversidad genética y estructuración poblacional de tres especies de invertebrados dulceacuícolas (Crustáceo Aeglidae: *Aegla sp*; Molusco Gastrópodo: *Chilina dombeyana*; Insecto Hemiptera: *Aquarius chilensis*) dentro de la cuenca hidrográfica del río Itata.

#### Objetivos específicos

1. Identificar procesos demográficos e inferir eventos históricos que estructuran la distribución actual de la diversidad genética en estas tres especies mediante el análisis de secuencias de ADNmt.
2. Determinar los niveles de variación genética que presentan las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis* mediante el uso de marcadores microsatélites.
3. Analizar la diferenciación genética poblacional de *C. dombeyana* y *A. chilensis* con métodos clásicos y de análisis espacial de la variación de microsatélites.
4. Detectar evidencia de cuellos de botella recientes y estimar tamaños efectivos poblacionales ( $N_e$ ) con los marcadores microsatélites en las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis*.
5. Evaluar con los marcadores microsatélites el efecto del ambiente sobre los patrones de estructuración e inestabilidades demográficas observados en las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis*.
6. Comparar los patrones de diversidad genética, estructuración poblacional, y las variables ambientales explicativas entre especies en función de la calidad del agua.

#### ***4.0 Presentación y objetivo del estudio***

Conforme se ha indicado, el desarrollo de este estudio que ha sido dividido en dos capítulos se encuentra destinado a resolver la importancia que ejercen los diversos factores históricos, espaciales y ambientales sobre los patrones de diversidad y estructuración poblacional de especies de macroinvertebrados de agua dulce que habitan en la cuenca del río Itata. El primer capítulo comprende un estudio filogeográfico de las especies de interés basado en secuencias de ADN mitocondrial del gen de la citocromo oxidasa I (COI) mediante un análisis de anidamiento de clados y análisis demográficos para desentrañar los procesos históricos que han actuado y estructurado las poblaciones de especies con diferentes características y rasgos de historias de vida.

El segundo capítulo corresponde a un estudio de genética del paisaje realizado por medio de marcadores moleculares microsátélites, donde se investigó el impacto que los factores demográficos, espaciales y la calidad del ambiente ejercen sobre la diferenciación poblacional de dos especies de macroinvertebrados acuáticos de agua dulce, *Chilina dombeyana* y *Aquarius chilensis*, que presentan diferentes niveles de tolerancia a la contaminación del agua. Ambas especies fueron seleccionadas en función de sus características biológicas y representatividad a lo largo de toda el área de estudio. Finalmente, se exponen las conclusiones generales alcanzadas a través de ambas estrategias de estudio y que han permitido avanzar en el conocimiento que se tiene de estas especies pertenecientes a ecosistemas fluviales naturalmente fragmentados y fuertemente impactado por actividades antropogénicas.



## **CAPÍTULO I**

### **ROL DE LOS FACTORES HISTÓRICOS SOBRE LOS PROCESOS DE DIFERENCIACION POBLACIONAL EN ESPECIES DE MACROINVERTEBRADOS DE LA CUENCA DEL**

**ITATA**



## 5.0 RESUMEN

Los patrones intraespecíficos de la diversidad genética son determinados por procesos históricos y contemporáneos. En el caso de especies codistribuidas los patrones filogeográficos pueden ser congruentes como respuesta a un mismo evento histórico o discordante cuando las especies son afectadas diferencialmente. La congruencia de los patrones filogeográficos fue analizada mediante un análisis de anidamiento de clados y análisis demográficos utilizando secuencias de ADNmt (COI) para dilucidar la historia evolutiva de tres especies de aeglas (*Aegla pewencha*, *Aegla araucaniensis*, y *Aegla laevis talcahuano*), el insecto *Aquarius chilensis* y el gastrópodo, *Chilina dombeyana* que habitan en la cuenca del Itata. Los análisis de anidamiento de clados sugieren que un evento de fragmentación alopátrica habría afectado a las poblaciones de las especies de aeglas. Las poblaciones de *A. araucaniensis* y *C. dombeyana* muestran evidencia de un patrón concordante de expansión de rango contiguo. Las poblaciones de *A. l. talcahuano* resuelven dos procesos que no son mutuamente excluyentes, colonización a gran distancia y/o episodios de fragmentación pasada. En tanto que las poblaciones de *A. pewencha* y *A. araucaniensis* son significativamente asociadas al interior de un clado ancestral de jerarquía superior que resuelve evidencia de una restricción al flujo génico. En el caso de las poblaciones del insecto y para las localidades T6, T8 y T9 se resuelven dos procesos que no son mutuamente excluyentes, colonización a grandes distancias y/o episodios de fragmentación pasada. Para la totalidad del cladograma de esta especie no existen asociaciones significativas, aquello probablemente debido a un mayor flujo génico. Los análisis demográficos muestran evidencia de expansión demográfica en las poblaciones de *C. dombeyana* (Tajima's  $D = -1.466$ ,  $P < 0.05$ ; Fu's test =  $-23.885$ ,  $P < 0.01$ ) y *A. araucaniensis* ( $D = -1.646$ ;  $P < 0.05$ ; Fu's  $F_s = -14.301$ ,  $P < 0.01$ ) con evidencia de haber sufrido episodios de cuello de botella ( $\theta < \theta_w$ ). Además existe en ambas especies un patrón concordante de aislamiento por distancia con evidencia de autocorrelación positiva para distancias inferiores a 12 km. Existe evidencia de un patrón generalizado de significativa estructuración genética ( $\Phi_{st} > 0.17$ ) en la totalidad de las poblaciones de las especies analizadas, congruente con el escaso número de haplotipos compartidos. Un menor nivel de estructuración presentan las poblaciones del insecto, cuyas mayores diferenciaciones se establecen respecto de las localidades T6, T8 y T9. Todo lo anterior permite concluir que tanto los factores históricos como contemporáneos pueden influenciar los patrones actuales de estructuración y diferenciación poblacional particularmente en *A. araucaniensis* y *C. dombeyana*, habitantes estrictos del medio acuático. Cuyas diferencias con las poblaciones del insecto muy probablemente son debidas a las diferentes habilidades dispersivas que presentan respecto de esta especie.

## 6.0 INTRODUCCION

La vulnerabilidad a la que se encuentran expuestas la mayoría de las especies dulceacuícolas es principalmente debida a los drásticos cambios que experimentan las condiciones ambientales de su entorno como resultado de las intensas actividades humanas sobre estos ecosistemas (Hansen *et al.*, 2012). La pérdida del hábitat y la fragmentación pueden afectar severamente la biodiversidad a nivel genético, especies y ecosistemas (Fahrig, 2003; Dobson *et al.* 2006) y en hábitat con considerable impacto antropogénico, muchas especies persisten exclusivamente en pequeñas poblaciones disyuntas, expuestas a condiciones inestables y cuya viabilidad depende exclusivamente del grado de intercambio genético entre poblaciones (With *et al.* 2006). Si bien, las restricciones geográficas impuestas al flujo natural de genes entre las poblaciones de una especie incrementan la diferenciación genética entre las poblaciones. Ésta se puede incrementar aún más de manera artificial por causas antropogénicas (Hao *et al.*, 2006) y conducir finalmente a poblaciones con un elevado nivel de estructuración genética.

La filogeografía es una disciplina que permite reconstruir los componentes históricos de la estructura poblacional considerando la distribución geográfica de linajes genealógicos (Avice, 2004), contribuyendo a decifrar patrones de recolonización post-glacial (Bernatchez & Wilson, 1998; Taberlet *et al.*, 1998; Petit *et al.*, 2002; Hewitt, 2004; Xu *et al.*, 2009) e identificar barreras geográficas históricas que actúan como determinantes de aislamiento y que pueden ser usadas para generar hipótesis de especiación alopátrica (Hickerson *et al.*, 2010). En la actualidad esta disciplina avanza hacia la estimación de historias demográficas en un contexto explícitamente espacial, evaluando el grado de congruencia espacial y temporal de taxa co-distribuidos (Hickerson *et al.*, 2010). Numerosos estudios han investigado estructuración filogeográfica en organismos de agua dulce (Waters *et al.* 2000; Crandall *et al.*, 2000; Baker *et al.*, 2004; Huey *et al.*, 2006; Apte, 2007; Faulks *et al.*, 2010) y han revelado patrones filogeográficos a través del uso del ADN mitocondrial (DNAMt), el cual continúa siendo el marcador de elección para descubrir patrones filogeográficos (Barrowclough *et al.*, 2009). En general, debido a su estructura dendrítica, las poblaciones de sistemas lóticos tienden a ser particularmente vulnerables a la fragmentación lo cual puede ser exacerbado por la migración unidireccional (Barson *et al.*, 2009; Fagan *et al.*, 2002, 2005) y hace más difícil la habilidad de moverse entre ramas resultando en poblaciones altamente estructuradas (Wong *et al.*, 2004; Cambell-Grant *et al.*, 2007, Brown & Swan, 2010). Sin embargo, la variación entre las especies respecto de las características históricas, ecológicas y rasgos de historia de vida afectará su respuesta a los principales factores ambientales (Ruzzante *et al.*, 2008), lo cual puede actuar como barreras ambientales y dificultar el intercambio biótico entre parches fragmentados y conformar la estructura genética de las

poblaciones (Donnelly and Twonson, 2000), afectando el subsecuente cambio evolutivo por movimiento de genes (ej. flujo génico).

Los patrones intraespecíficos de la diversidad genética son determinados por procesos históricos y contemporáneos. En teoría, las diferentes señales que dejan los procesos de flujo génico recurrente e históricos, permiten desentrañar las contribuciones que estos factores hacen al patrón observado de composición haplotípica (Alexandrino *et al.*, 2002). Los procesos históricos tales como episodios de fragmentación pasada pueden ser esenciales para comprender patrones actuales de estructuración genética de las poblaciones a nivel intraespecífico (Hughes *et al.*, 2009). Incluso información de subsecuente contacto secundario puede ser recobrada mediante análisis filogenéticos basados en datos de secuencias de ADN y que permitirían explicar procesos históricos y ancestrales en un contexto geográfico. Sin embargo, además se ha postulado que especies codistribuidas pueden mostrar patrones filogeográficos congruentes, indicando respuestas similares ante una serie de eventos climáticos y geológicos o bien patrones discordantes manifestando respuestas que son independientes (Steele & Strorfer, 2007). Si múltiples especies son ubicadas en la misma región geográfica y sus poblaciones son afectadas por fuerzas similares es posible que sus árboles filogeográficos muestren evidencia indirecta de procesos históricos y geológicos que expliquen patrones de similaridad a una escala superior o por el contrario, en función de las diferencias respecto de factores ecológicos y genéticos causar incongruencia en los patrones filogeográficos (Lapointe & Rissler, 2005). Varios estudios han comparado las respuestas de diferentes grupos de organismos sometidos a las mismas condiciones de gradientes del ambiente (Paavola *et al.*, 2006) y estos estudios han señalado que en general aquellos taxa que presentan una débil capacidad de dispersión exhiben una mayor concordancia que aquellos que son grandes dispersadores (Grenouillet *et al.*, 2008). Patrones concordantes de estructuración genética espacial entre grupos de organismos de agua dulce han sido mucho menos estudiados que en grupos de organismos terrestres (Heino *et al.*, 2005; Pavola *et al.*, 2006; Grenouillet *et al.*, 2008) y la mayoría de ellos han concluido que cuando los ensambles en ecosistemas de agua dulce no son concordantes entre grupos taxonómicos, es debido a que estos responden a diferentes factores ambientales cuando se trata de pequeñas escalas espaciales (Paavola *et al.*, 2003, Tolonen *et al.* 2005, Buffagni *et al.*, 2000; Larsen *et al.*, 2012).

La conectividad hidrológica en ecosistemas de agua dulce es a menudo variable, con períodos de bajo flujo que desconectan sectores y reducen las oportunidades de flujo génico (Huey *et al.* 2006). Como resultado las poblaciones de agua dulce aisladas del flujo génico desarrollan distintas frecuencias

haplotípicas a través de los procesos de deriva genética y selección ambiental (Hurwood & Hughes, 2001). El análisis *nested clade* (NCA), corresponde a un método especialmente sensitivo mediante el cual los datos genéticos (haplotipos) y geográficos pueden ser utilizados para diferenciar múltiples eventos históricos o contemporáneos separados en espacio y tiempo (Templeton, 1998; Pfenninger & Posada, 2002). Esta aproximación tiene el poder de discriminar entre patrones filogeográficos debido a flujo génico restrictivo versus eventos históricos que operan a nivel poblacional (Templeton 1998), incluyendo la expansión de rango y la fragmentación (Crandall *et al.*, 2009).

Mediante el uso de ADN mitocondrial, fue investigado a una fina escala espacial los patrones filogeográficos de estructuración genética en poblaciones codistribuidas de tres diferentes phylum de especies de organismos de macroinvertebrados de agua dulce, que incluyen tres especies de aeglas (*A. pewencha*, *A. laevis talcahuano* y *A. araucaniensis*) una especie de insecto, *Aquarius chilensis*, y una de molusco, *Chilina dombeyana*; todas especies ampliamente distribuidas a lo largo de un mismo sistema hidrográfico de agua dulce en Chile central. Considerando la estructura dendrítica que caracteriza estos sistemas hídricos, los organismos que habitan estos ecosistemas suelen adoptar un sistema de distribución lineal lo que sumado a las potenciales limitaciones en su capacidad de dispersar pueden hacer que estas especies presenten un patrón de distribución influenciado geográficamente y característico de un sistema de aislamiento por distancia. Recobrar la historia evolutiva de especies codistribuidas es el principal objetivo del estudio y para resolverlo se investigó la distribución de filogrupos basados en set de secuencias de ADN mitocondrial mediante diferentes aproximaciones que incluyen métodos filogeográficos y demográficos. Principalmente, indicadores demográficos complementarios y un análisis de anidamiento de clados permitieron contrastar y revelar patrones de estructuración poblacional y eventos históricos que influyen las poblaciones de las especies investigadas y que dan forma a la actual distribución de la diversidad genética que las compone y responder así a preguntas tales como, ¿es posible que las especies muestren un patrón concordante en su respuesta frente a eventos naturales que han afectado históricamente a sus poblaciones? o ¿pueden éstas tener respuestas independientes que imponen barreras al flujo génico en las poblaciones de unas especies y que no alteran significativamente la conectividad poblacional de otras?.

## 7.0 MATERIALES Y METODOS

### 7.1 Muestreo

Las muestras de aeglas (*A. araucaniensis*, *A. l. talcahuano*, *A. pewencha*), del gastrópodo, *C. dombeyana*, y del insecto *A. chilensis*, fueron obtenidas principalmente a partir de diferentes localidades distribuidas a lo largo del rango de distribución de las especies en la cuenca del Río Chillán en la región del Biobío en Chile Central y en dos sitios del Río Cholguán. Ambos pertenecientes a la cuenca del Río Itata (71°00-72°30W, 36°30-37°00S; Fig. 1). Los individuos fueron colectados durante los meses de marzo-abril de 2009 y almacenados en frascos con alcohol 95% para su posterior extracción de ADN.

### 7.2 Extracción de ADN, amplificación y secuenciación de ADN mitocondrial

El ADN genómico fue extraído desde tejido del músculo del pie en moluscos, abdomen y patas en el insecto y a partir de branquias en las aeglas. Para los ejemplares de *A. chilensis* y *C. dombeyana* se utilizó un procedimiento de extracción de sales (Bruford *et al.*, 1992), en tanto que para las aeglas se empleó el kit Wizard SV Genomic Purification system (Promega). Posteriormente el ADN de todas las especies fue almacenado a -20°C para su posterior análisis.

La variación del ADN mitocondrial fue evaluado utilizando un segmento de 748 bp de la enzima Citocromo Oxidasa subunidad I (COI) en 126 individuos de *Aquarius chilensis*, un segmento de 703 bp en 137 individuos de *Chilina dombeyana* y un segmento de ADN de 897 bp para 79 individuos de *Aegla pewencha*, *A. l. talcahuano* y *Aegla araucaniensis*. Las reacciones de amplificación en cadena de la polimerasa (PCR) fueron realizadas utilizando los partidores COI-f 5'-GAGCTCCAGATATAGCATTCC-3', COI-r 5'-GTATAAGCGTCTGGGTAGTC-3' (van Syoc, 1995; Perez-Losada *et al.*, 2002b) en las aeglas y el molusco; y los partidores HCO2198-LCO1490 (Damgaard and Cognato, 2005) en el caso de *A. chilensis*. Las amplificaciones PCR fueron llevadas a cabo utilizando un termociclador MAXYGENE (Axygen, USA) en reacciones de 25 µl que contienen 20 ng de ADN genómico, 1.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer PCR, 200 µM de cada dNTP, 5 pmol de cada partidor y 0.75 U de Taq ADN polimerasa (Promega). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: 3 minutos a 95°C, 35 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 48 °C (temperatura de *annealing*, Ta), 1 minuto a 72 °C y una extensión final de 5 min a 72 °C. Todos los productos PCR fueron chequeados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en buffer TAE 0.5X (20mM de baseTris, 10 mM ácido acético, 1 mM EDTA, pH 8) con la finalidad de evaluar la presencia de

productos de tamaños correctos, luego fueron teñidos con bromuro de etidium y visualizados con un transiluminador UV (250 nm). Una secuenciación bidireccional fue desarrollada en la empresa MACROGEN Inc. (Seoul, Korea). Posteriormente todas las secuencias serán depositadas en GenBank.

### **7.3 Análisis filogenético y construcción de redes de haplotipos**

Durante el transcurso del análisis de las secuencias de ADN en aeglas se pudo discriminar la presencia de varias especies congénicas distribuidas a lo largo de la cuenca. Por ello, fue necesario evaluar las relaciones filogenéticas entre haplotipos de ADN mitocondrial de las poblaciones de aeglas. Un árbol de *maximum likelihood* fue obtenido utilizando el programa MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011) mediante 1000 bootstrap de réplicas bajo el modelo GTR+ $\Gamma$ +I. El programa TCS v1.21 (Clement *et al.*, 2000) fue usado para construir en cada especie una red parsimoniosa que muestra las relaciones existentes entre los haplotipos, encontrando el ajuste más adecuado en los pasos de conexiones que permiten reconstruir el tipo de relaciones intraespecíficas de haplotipos utilizando un estadístico en base a la teoría neutral de coalescencia (Hudson, 1989). Utilizando esta red haplotípica se realizó un análisis de anidamiento de clados (NCA) en orden a discernir procesos que pueden influenciar la estructura genética de las poblaciones. NCA asume que los haplotipos y los clados al interior de la red son ancestrales y que los haplotipos en los extremos (puntas) de la red son más recientes. En base a esto el método implementado en el software ANeCA (Panchal, 2007), trata de rechazar la hipótesis nula de “no asociación” entre la variación haplotípica y la geografía. Si la hipótesis nula es rechazada una explícita clave de inferencias es usada para interpretar las asociaciones estadísticamente significativas utilizando las reglas de Templeton *et al.* (1987) y Templeton & Sing (1993) para definir una jerarquía de clado sobre la red de haplotipos intraespecífica. De este modo es posible diferenciar patrones en la distribución de la diversidad genética asociada a la información geográfica, el análisis permite distinguir entre eventos históricos como los eventos de fragmentación pasada de aquellos contemporáneos como dispersión reciente y flujo génico utilizando una aproximación coalescente.

El método comienza anidando los haplotipos terminales de la red (*tips*) que se consideran clados de nivel cero, éstos se unen a aquellos haplotipos que estén separados por un paso mutacional y se obtienen los clados de un paso, continuando paso por paso para identificar los clados de nivel superior hasta el nivel final de anidamiento que incluye la red entera. Este diseño de anidamiento fue usado como entrada para los análisis con la distancia geográfica, el cual se utiliza para examinar la distancia geográfica al interior y entre los clados. Esto fue realizado mediante el programa GeoDis version 2.5 (Posada *et al.*, 2000) implementado en el software ANeCA (Panchal, 2007) para evaluar las asociaciones significativas de los haplotipos. Este programa examina la estructura de la población



según lo determinado por las coordenadas geográficas o las distancias pareadas y compara estos valores con la red creada por TCS. La salida de este programa entrega dos estadísticos, la distancia del clado ( $D_c$ ), el cual mide la dispersión geográfica dentro del clado y la distancia del clado anidado ( $D_n$ ), el cual mide la dispersión geográfica de un clado en relación a otros clados en el mismo nivel de anidamiento. También se obtuvo un estadístico interno (I-T), el cual calcula dentro de un clado el promedio de la distancia interior menos el promedio de la distancia de los extremos dentro de cada categoría de anidamiento. En este tipo de análisis hay tres razones por las cuales la hipótesis nula de no asociación entre haplotipos y distribución geográfica no puede ser rechazada, por un tamaño inadecuado de las muestras, panmixia (ej. falta de estructura poblacional) o insuficiente variación genética (Templeton *et al.*, 1995).

#### **7.4 Diferenciación poblacional y análisis demográficos**

Las secuencias de ADN fueron alineadas y editadas a ojo utilizando el programa BioEdit 7.01 (Hall, 1999). Los mapas con las ubicaciones de las muestras y gráficas circulares de frecuencias haplotípicas fueron construídas utilizando el programa PhyloGeoViz v2.4.5 (Tsai, 2011) y Google Maps (Google Inc., Mountain View, CA). Para cada especie, el polimorfismo de ADNmt global y al interior de las poblaciones fue cuantificado usando el programa DnaSPv5 (Librado & Rozas, 2009). Para ello, se calculó la diversidad de haplotipos ( $H_d$ ; Nei, 1987) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ; Nei, 1987), definida como el número promedio de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias y su error estándar (Nei 1987). Para determinar si las poblaciones de este estudio se encontraban en equilibrio mutación-deriva, se realizaron pruebas de neutralidad. Tajima D (Tajima, 1989) fue calculado para evaluar si existe evidencia de expansión poblacional, así como la prueba Fu's  $F_s$  (Fu, 1997). Ambos parámetros que permiten evaluar aspectos demográficos de las poblaciones. Los valores fueron generados utilizando 5.000 simulaciones coalescentes utilizando el software Arlequin v.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Si la población no se desvía de lo esperado bajo neutralidad, Tajima D y Fu's  $F_s$  muestran valores no significativos mientras que valores significativos y negativos son considerados evidencia de expansión de las poblaciones. Valores negativos de Fu's  $F_s$  se obtienen a partir de un exceso de alelos raros y sería más sensible a las mutaciones recientes, mientras que Tajima D detecta diferencias por pares y es más sensible a mutaciones antiguas. Finalmente, para complementar la evaluación de las historias demográficas de las poblaciones, fueron calculados el índice raggedness (R index, Harpending, 1994) y el estadístico SSD mismatch (suma significativa de la desviación al cuadrado) con Arlequin v.5. El modelo nulo para estos estadísticos mismatch (R index, SSD) es que la población está creciendo exponencialmente.



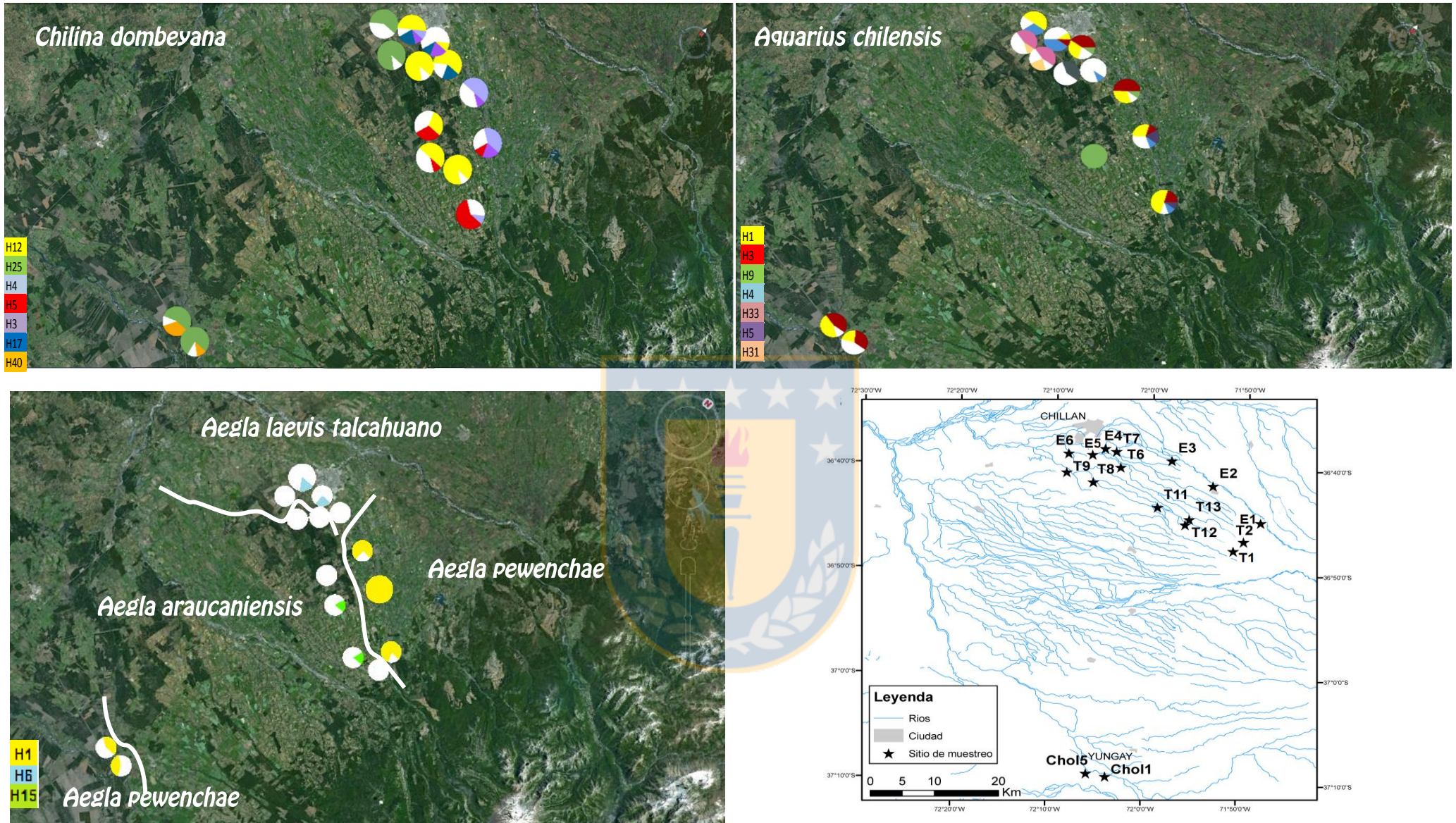


Fig.1. Ubicación de las poblaciones de macroinvertebrados de agua dulce muestreadas en el área de estudio (mapas y códigos modificados de Debels *et al.*, 2005), y la respectiva distribución de haplotipos de ADNmt por especie (gráficas circulares). Haplotipos restringidos a una única localidad muestreada se encuentran uniformemente representados en blanco, mientras que los haplotipos compartidos entre varias localidades siguen un código de color en la correspondiente gráfica. La clave de color para los haplotipos se muestra en el extremo lateral izquierdo de cada imagen. E = sitios de muestreo en el Río Chillán, T = sitios de muestreo en los tributarios del Río Chillán, Chol = sitios de muestreo en el Río Cholguán. Las líneas blancas dibujadas en la imagen inferior izquierda representan los transectos divisorios correspondientes a los límites geográficos ocupados respectivamente por cada una de las especies de aeglas distribuidas en cada set de localidades analizadas.



El estadístico R index adquiere bajos valores cuando las poblaciones presentan distribuciones unimodales como típicamente es esperado cuando las poblaciones se expanden. Sin embargo, cuando los valores de SSD son significativos ( $P < 0.05$ ) la hipótesis nula de una repentina expansión poblacional es rechazada. Esta combinación de métodos permite independientemente evaluar las inferencias específicas de NCA y pruebas estadísticas de demografía vinculadas al crecimiento poblacional, basadas en supuestos o principios completamente diferentes. En ese contexto fueron calculadas las diversidades genéticas contemporáneas ( $\theta\pi$ ) e históricas ( $\theta_w$ ) utilizando el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009). La diversidad genética contemporánea se basa en diferencias pareadas entre secuencias, mientras que la diversidad genética histórica esta basada en el número de sitios segregantes entre las secuencias. La comparación de estas dos estimaciones proporciona información de la dinámica poblacional sobre la historia evolutiva reciente (Templeton, 1993); las diferencias entre ellas son indicativas de un reciente cuello de botella (si  $\theta\pi < \theta_w$ ) o reciente crecimiento poblacional (si  $\theta\pi > \theta_w$ ) (Templeton, 1993; Pearse & Crandall, 2004).

Para evaluar los patrones de diferenciación genética entre las poblaciones fueron realizadas estimaciones pareadas de diferenciación poblacional ( $\Phi_{ST}$ ) cuyos valores de probabilidad asociados fueron calculados usando 10.000 permutaciones y un análisis de la varianza molecular (AMOVA) utilizando los métodos implementados en Arlequín v.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Los análisis de AMOVA se realizaron teniendo en consideración las diversas agrupaciones jerárquicas en función de la hidrografía propia de los ríos considerados en el estudio. Así, los grupos fueron particionados en la rama hidrográfica del principal curso de agua del Río Chillán (E: 1-2-3-4-5-6); dos principales ramas tributarias (T: 2-6-13) y (T: 8-9-11-12); la rama tributaria menor T7 que se une al principal curso de agua a la altura de E4, y finalmente los sitios correspondientes al Río Cholguán (Chol1 y Chol 5).

A nivel de poblaciones se aplicó un test de Mantel para evaluar la influencia relativa del aislamiento genético por una probable distancia geográfica, mediante una asociación significativa entre matrices de donde la diferenciación genética y distancia geográfica puedan explicar un posible patrón de aislamiento por distancia (IBD). Los valores de la medida de diferenciación genética linealizada de Slatkin  $F_{ST}$  ( $F_{ST} = 1 / (1 - F_{ST})$ ) (Slatkin 1995) fue utilizada como distancia genética la cual fue obtenida utilizando el software Arlequin (Excoffier *et al.*, 2005). Las distancias geográficas corresponden a matrices lineales e hidrográficas. En el caso de *A. chilensis* ambas matrices fueron utilizadas con la finalidad de comparar y evaluar si existe algún grado de significancia en función del tipo de distancia empleada en esta especie. Para las especies estrictamente acuáticas, sólo la matriz de distancia

hidrográfica fue empleada en el análisis. La correlación entre ambos tipos de matrices, genéticas y geográficas fue ploteada en un gráfico y calculada mediante la prueba Mantel utilizando 1000 aleatorizaciones con el software IBDWS versión 3.23 (Jensen *et al.*, 2005). El programa R (Development Core Team 2011) fue utilizado para corroborar los resultados del test de Mantel y realizar los análisis de correlogramas de Mantel empleando el paquete vegan (Oksanen *et al.*, 2011), que permite evaluar la presencia de autocorrelación espacial en cada especie a través del área de estudio. Las matrices de distancias genéticas y geográficas fueron particionadas en clases de distancias discretas para los propósitos del análisis de correlograma. El estadístico Mantel ( $r_M$ ) fue calculado para cada clase de distancia y su significancia probada usando 1000 permutaciones. Bajo la hipótesis nula de no asociación entre la ubicación geográfica y la similaridad genética todos los puntos deberían estar ubicados en la línea cero. Los puntos sobre la línea cero (valores positivos de  $r_M$ ) indican menor distancia genética entre los casos pareados (autocorrelación positiva) y los puntos bajo la línea cero indican mayor distancia genética entre los casos pareados.

Tabla 1. Variabilidad genética del ADNmt en las poblaciones muestreadas de *C. dombeyana*, *A. chilensis* y complejo *Aegla sp.* Tamaño de la muestra (N), número de haplotipos (n), diversidad haplotípica (Hd) y diversidades genéticas contemporáneas ( $\theta\pi$ ) e históricas ( $\theta_w$ ). Prueba de Tajima's D y Fu's Fs para la expansión poblacional, índice raggedness (R index), y estadístico mismatch de la suma de desviaciones cuadradas (SSD).

Especie	N	n	Fst	Hd $\pm$ SD	Tajima's D	Fu's Fs	R index	SSD	$\theta\pi$	$\theta_w$
<i>A. pewenchaе</i>	28	8	0.168*	0,680 $\pm$ 0,100	-1,260	-3.025	0.0358*	0.0502*	0.01101	0.01729
<i>A. araucaniensis</i>	30	26	0.529**	0,995 $\pm$ 0,010	-1.646*	-14.301**	0.0036	0.0046	0.01618	0.02879
<i>A. l.talcahuano</i>	21	18	0.448**	0,981 $\pm$ 0,023	0.412	-6.874**	0.0081	0.0052	0.02389	0.02192
<i>A. chilensis</i>	126	43	0,273**	0,897 $\pm$ 0,015	-1,395*	-23.906**	0.0024	0.1521**	0.01082	0.01772
<i>C. dombeyana</i>	137	41	0,330**	0,848 $\pm$ 0,000	-1.466*	-23.885**	0.0026	0.0033	0.01945	0.03537

\*\* P < 0.01; \*, P < 0.05

## 8.0 RESULTADOS

### 8.1 Diversidad de haplotipos

A partir de 137 secuencias de ADNmt fueron encontrados 41 diferentes haplotipos en *C. dombeyana*. Treinta y cuatro de esos haplotipos pertenecen exclusivamente a una única localidad y solo 7 haplotipos fueron encontrados en múltiples sitios. El sitio E4 contiene el mayor número de haplotipos, 9 (22%), pero también incluye la mayor muestra de haplotipos únicos (*singletons*) pertenecientes a una ubicación geográfica. Un patrón similar se registró en las poblaciones de aeglas, solo 3 de 52 diferentes haplotipos fueron encontrados en múltiples sitios entre las 79 secuencias de ADNmt que fueron analizadas. La subdivisión de haplotipos por especie comprende 8 haplotipos para *A. pewencha*, 26 haplotipos para *A. araucaniensis*, 18 haplotipos presentes en *A. l. Talcahuano*. El haplotipo “1” fue el único más frecuente con 18 individuos (34.62%) y se encontró presente sólo en las poblaciones de *A. pewencha* (Fig.1). En las poblaciones de *A. chilensis*, 43 diferentes haplotipos fueron encontrados entre las 126 secuencias de DNAm y 7 haplotipos fueron encontrados en múltiples sitios (Fig. 1).

### 8.2 Análisis de clados Anidados (NCPA)

Los cladogramas de anidamiento construidos para los haplotipos de ADNmt en las especies *A. chilensis*, *Aegla sp.* (*A. araucaniensis*, *A. laevis talcahuano* y *A. pewencha*) y *C. dombeyana* resuelven diferentes patrones de evolución (Fig. 2, 3, 4). En *C. dombeyana* el cladograma comprende tres clados de 5 pasos, ocho clados de 4 pasos, dieciséis clados de 3 pasos, treinta y siete clados de 2 pasos y setenta y ocho clados de 1 paso (Fig. 2). El patrón de asociación geográfica/genética para *C. dombeyana* de acuerdo a lo sugerido significativamente por NCA corresponde a un escenario de “expansión de rango contiguo” como el principal proceso que da forma a la distribución espacial de haplotipos en los clados 4-4, 5-1 y el cladograma entero (Table 2).

Tabla 2. Resultados del análisis de anidamiento de clados (NCA) en *C. dombeyana* basados en pruebas de permutaciones. Solo los clados que son significativos aparecen mostrados ( $P < 0.05$ ).

Clado	$X^2$	Probabilidad	Cadena de Inferencia	Patrón Inferido
4-4	14.1867	0.0083	1-2-11-12 NO	Contiguo rango de expansión
4-5	7.0000	0.0283	1-19-20-2 IO	Inconclusivo
5-1	48.2657	0.0000	1-2-11-12 NO	Contiguo rango de expansión
5-2	48.6382	0.0000	Hipotesis nula no puede ser rechazada	Avanza siguiente clado
6-1	191.4872	0.0000	1-2-11-12 NO	Contiguo rango de expansión

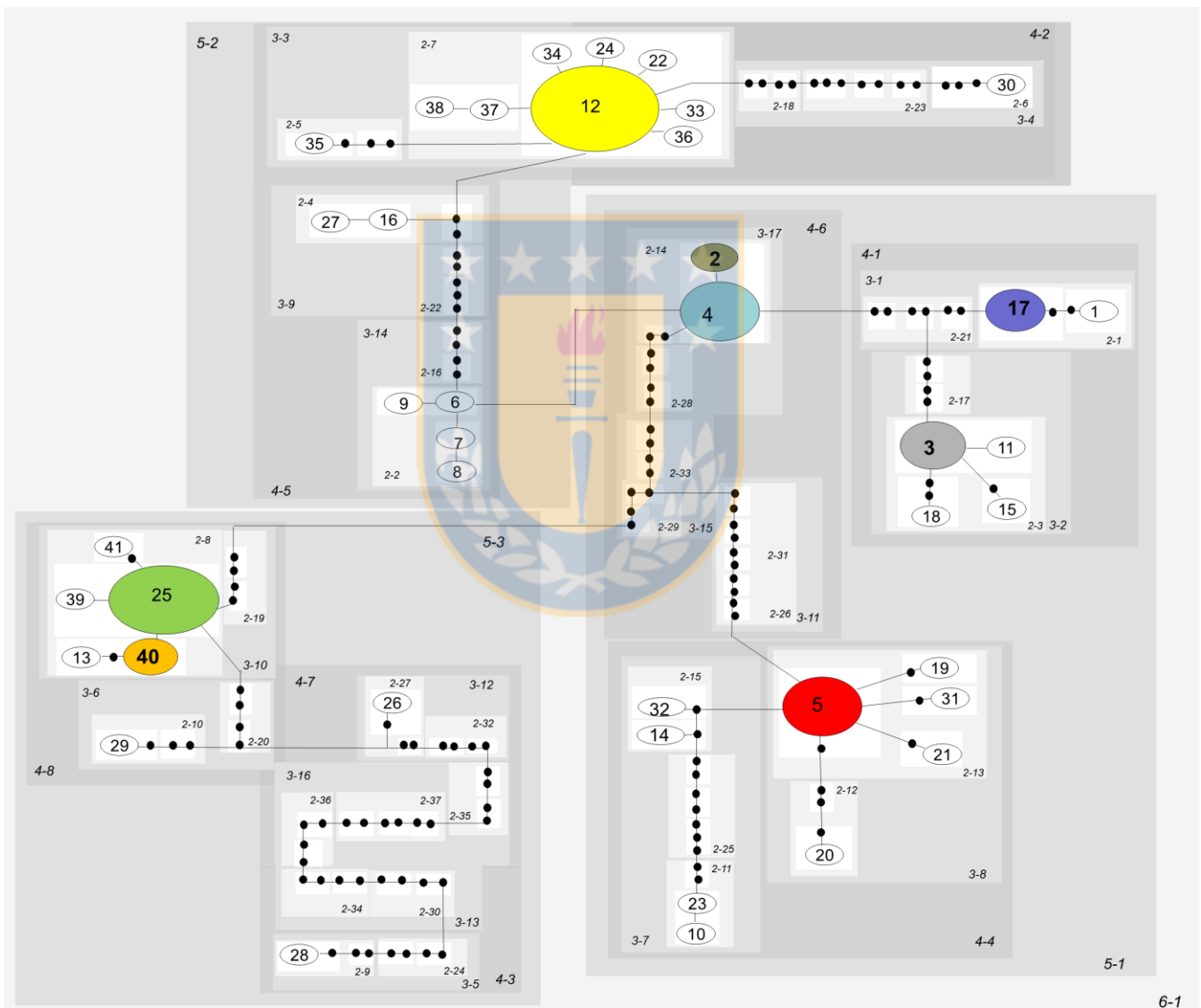


Figura 2. Red de haplotipos de *Chilina dombeyana* con el diseño de clados anidados para datos de secuencias COI-ADNmt. El tamaño del círculo del haplotipo es proporcional a su frecuencia. Los círculos sólidos negros en la red representan haplotipos extintos o no muestreados. Código de color correspondiente a la Figura 1.

En aeglas el sistema de clados anidados resolvió dos clados de 6 pasos, cinco clados de cinco pasos, doce clados de 4 pasos, veintiséis clados de 3 pasos, cincuenta y seis clados de 2 pasos y ciento diecinueve clados de 1 paso (Fig. 3). En aeglas los resultados de los análisis de anidamiento de clados y filogenia son consistentes con la separación de tres especies al interior de la cuenca, identificadas como *A. pewencha*, *A. araucaniensis* y *A. laevis talcahuano* (Fig. 4); todas ellas presentan haplotipos únicos para cada especie. Al interior del cladograma, *Aegla pewencha* se encuentra básicamente identificada en los clados 5-1 y 4-12, y sus poblaciones se encuentran localizadas en el principal curso de agua del Río Chillán y dos sitios en el Río Cholguán. Los clados 4-3, 4-11 y 5-2 incluyen poblaciones de *A. araucaniensis*, localizadas al interior de las zonas de tributarios en el Río Chillán. En esta especie la clave de inferencia permite distinguir para el clado 4-2 un patrón de fragmentación alopátrica y para el clado 5-2, que lo contiene, un patrón de contiguo rango de expansión. El clado 6-1 contiene poblaciones de *A. pewencha* y *A. araucaniensis* y fue significativamente asociado con las distribuciones geográficas, mostrando un restringido flujo génico pero es incapaz de discriminar entre dos principales procesos evolutivos: una dispersión de larga distancia sobre áreas no ocupadas por las especies, o la existencia de un pasado flujo génico seguido de la extinción de las poblaciones intermedias. El clado 6-2 contiene exclusivamente a las poblaciones de *A. l. talcahuano* y resuelve dos procesos que no son necesariamente mutuamente excluyentes, colonización a gran distancia y/o episodios de fragmentación pasada. Finalmente, el cladograma entero resuelve un proceso evolutivo histórico de fragmentación alopátrica (Tabla 3).

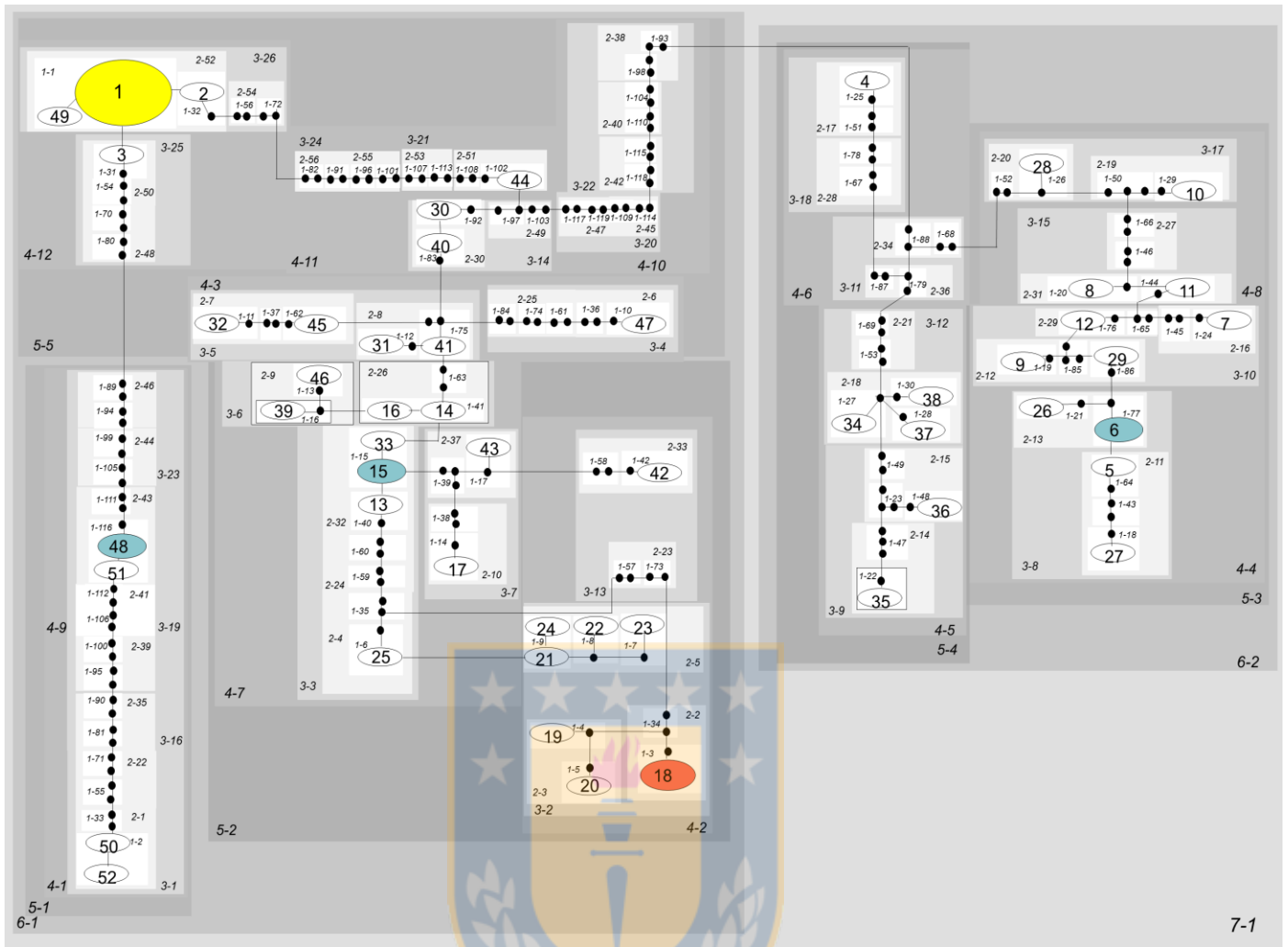


Figura 3. Red de haplotipos del complejo *Aegla sp.* con el diseño de clados anidados para datos de secuencias COI-ADNmt. El tamaño del haplotipo es proporcional a su frecuencia. Los círculos sólidos negros en la red representan haplotipos extintos o no muestreados. Código de color correspondiente a la Figura 1, con la excepción de aquellos haplotipos de igual frecuencia cuya diferenciación requiere la incorporación de un nuevo color.

Tabla 3. Resultados del análisis de anidamiento de clados (NCA) en el complejo *Aegla sp.*, basados en pruebas de permutaciones. Solo los clados que son significativos aparecen mostrados ( $P < 0.05$ ).

Clado	$X^2$	Probabilidad	Cadena de inferencia	Patrón inferido
4-2	22.0	0.0004	1-19 NO	Fragmentación Alopátrica
5-2	17.7927	0.0002	1-2-11-12 NO	Contiguo rango de expansión
6-1	28.1548	0.0003	1-2-3-5-6*-7-8 YES	Restringido Flujo génico/dispersión, con alguna dispersión de larga distancia sobre áreas intermedias no ocupadas por las especies; o bien flujo génico histórico seguido de extinción de las poblaciones intermedias.
6-2	15.5288	0.0005	1-2-11-12 NO	Colonización de grandes distancias y/o fragmentación pasada (no necesariamente mutuamente exclusiva)
7.1	74.000	0.0000	1-19 NO	Fragmentación Alopátrica

El cladograma para el insecto *A. chilensis* dió dos clados de 5 pasos, tres clados de 4 pasos, diez clados de 3 pasos, veintidos clados de 2 pasos y cincuenta y cinco clados de 1 paso (Fig. 5). En el clado 1-2 no fue posible identificar la causa de una significativa estructuración señalando que debido a un muestreo geográfico inadecuado no es posible discriminar entre fragmentación y aislamiento por distancia. Para el clado 4-1 se resuelven dos procesos que no son necesariamente mutuamente exclusivos, referidos a la colonización a grandes distancias y/o episodios de fragmentación pasada. Por lo tanto, no es posible distinguir cuál de estos dos eventos históricos es el responsable de la distribución actual de haplotipos siendo también posible que ambos puedan haber ejercido un rol. Para el clado 4-4 la respuesta no es concluyente y sólo para el clado 5-1 se puede identificar restricción al flujo génico con aislamiento por distancia. Para el clado 5-2 y el cladograma total la hipótesis nula no puede ser rechazada posiblemente por la mayor capacidad de dispersión del insecto (Fig. 5; Tabla 4).



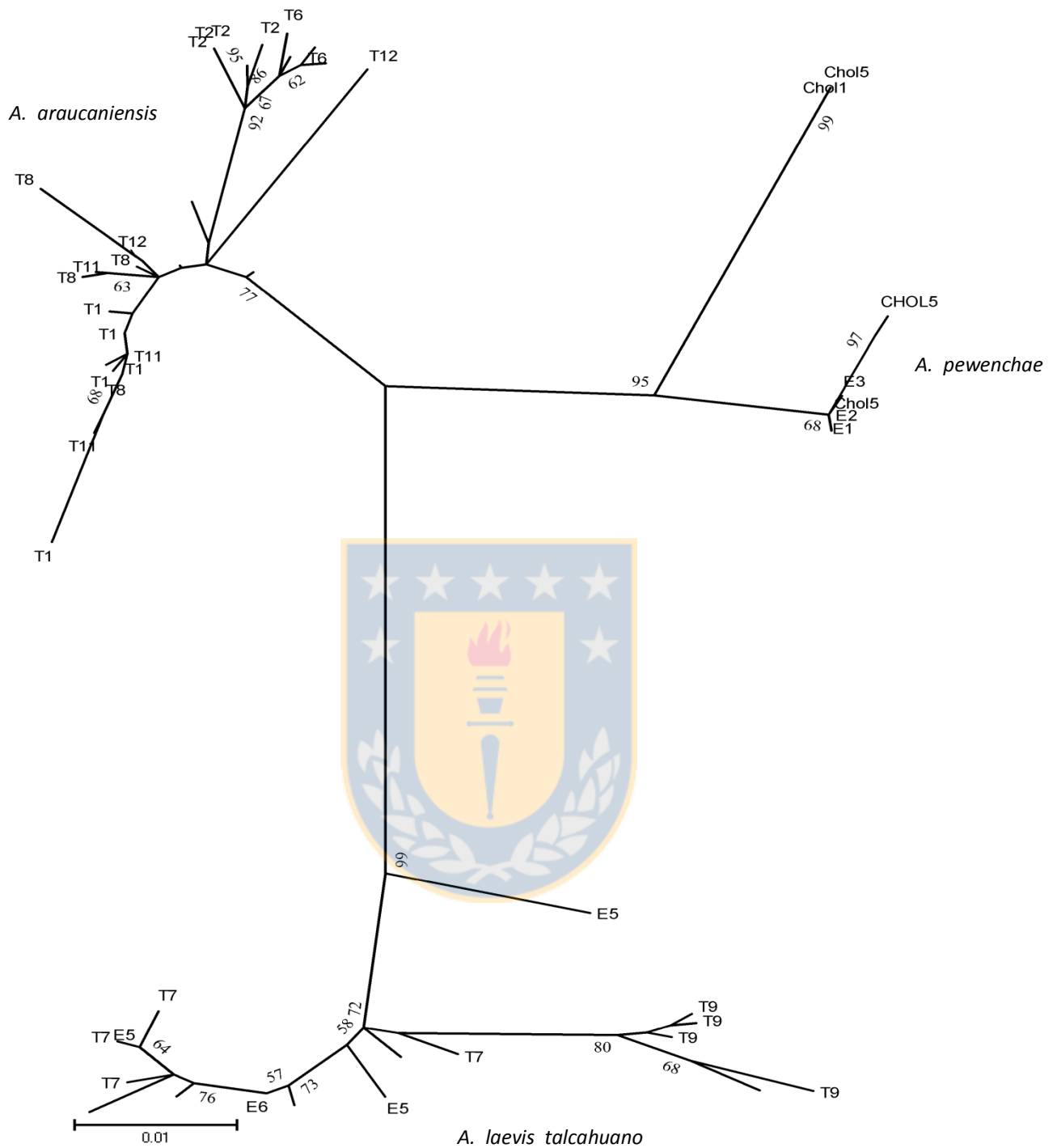


Figura 4. Árbol no-enraizado basado en Máxima Verosimilitud que muestra las relaciones filogenéticas entre haplotipos de ADNmt del complejo *Aegla* sp. que habitan la cuenca del Itata. Asumiendo el modelo de evolución de tiempo reversible (GTR) y la tasa entre sitios de distribución Gamma con sitios invariantes (G+I), (LogL:-2167.65). El largo de las ramas es proporcional a la cantidad de cambios. Los valores de Bootstrap son mostrados como porcentajes sobre la base de 1000 replicas. La clave de los nombres corresponden a los diferentes sitios mencionados en la Figura 1, distribuidos en la cuenca del Itata.

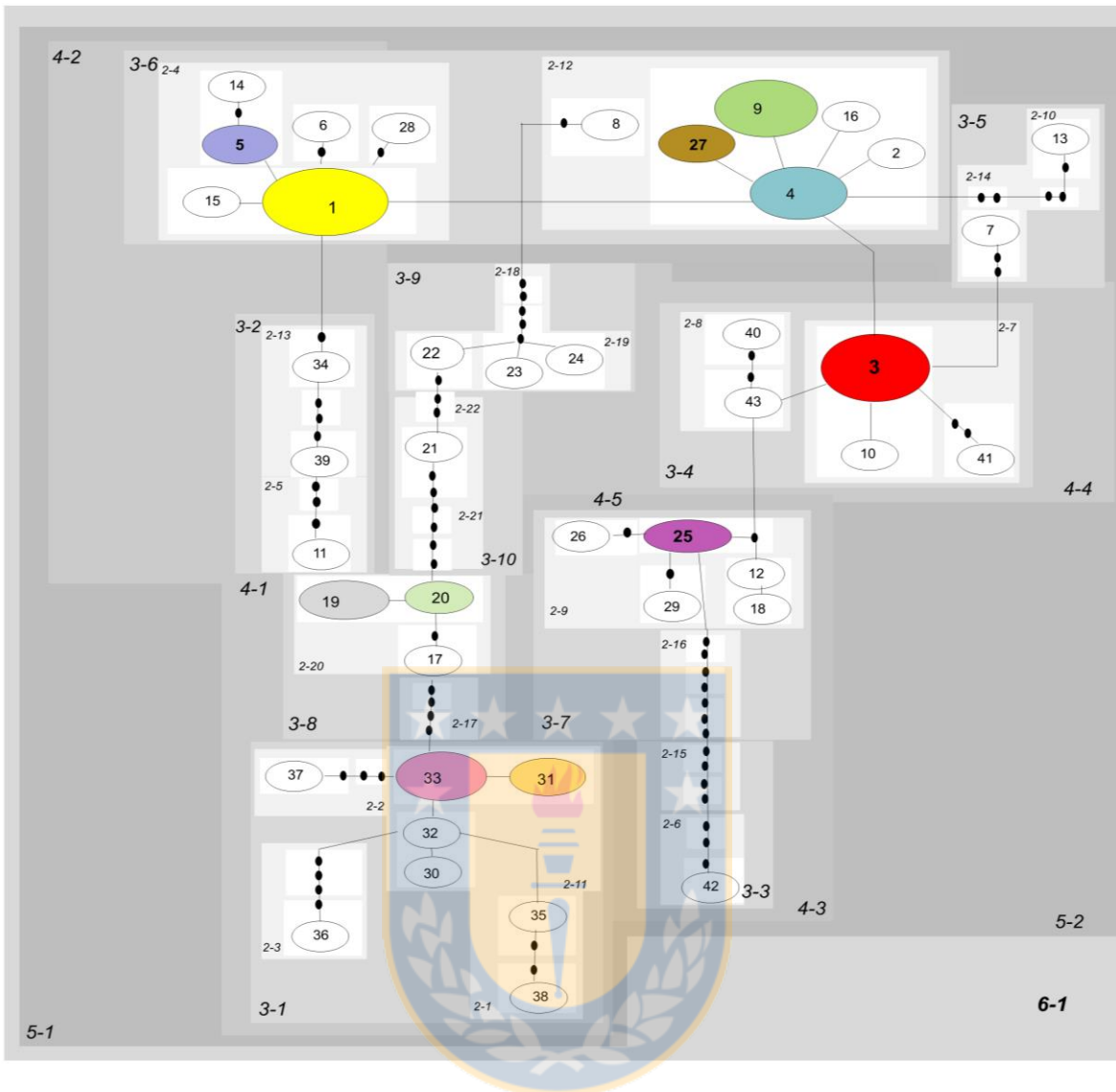


Figura 5. Red de haplotipos de *Aquarius chilensis* con el diseño de clados anidados para datos de secuencias COI-ADNmt. El tamaño del haplotipo es proporcional a su frecuencia. Los círculos sólidos negros en la red representan haplotipos extintos o no muestreados. Código de color correspondiente a la Figura 1.

Tabla 4. Resultados del análisis de anidamiento de clados (NCA) en *A. chilensis* basados en pruebas de permutaciones. Solo los clados que son significativos aparecen mostrados ( $P < 0.05$ ).

Clado	$X^2$	Probabilidad	Cadena de inferencia	Patrón inferido
1-21	46.6700	0.0076	1-2-3-4-9-10 NO	Muestreo geográfico inadecuado para discriminar entre fragmentación y aislamiento por distancia.
4-1	29.6000	0.0000	1-2-11-12-13-14 NO	Colonización a larga distancia y/o fragmentación pasada (no necesariamente mutuamente exclusiva).
4-4	36.2224	0.0000	1-2 IO	Inconclusivo
5-1	57.9765	0.0000	1-2-3-4 NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
5-2	20.2894	0.0143	Hipótesis nula no puede ser rechazada	Moviendo al próximo clado
6-1	51.4360	0.0000	Hipótesis nula no puede ser rechazada	Moviendo al próximo clado

### 8.3 Estructuración genética poblacional y análisis demográficos

Para todas las especies de agua dulce los resultados de la diversidad genética indicados por la diversidad haplotípica ( $H_d$ ) fueron generalmente altos pero la diversidad nucleotídica contemporánea ( $\theta\pi$ ) fue relativamente baja como se aprecia en la Tabla 1. Este patrón de  $H_d$  alto y  $\theta\pi$  bajo puede sugerir un crecimiento poblacional repentino a partir de pequeñas poblaciones ancestrales (bajo  $N_e$ ). Sin embargo, estos valores de  $\theta\pi$  son generalmente más altos que los reportados para la aegla Patagónica, *A. neuquensis* (Barber *et al.*, 2012). La historia demográfica medida por pruebas independientes muestra señales significativas y consistentes de expansión poblacional en el total de las poblaciones de *C. dombeyana* (Tajima's  $D = -1.466$ ,  $P < 0.05$ ; Fu's test = -23.885;  $P < 0.01$ ) y en *A. araucaniensis* (Tajima's  $D = -1.646$ ,  $P < 0.05$ ; Fu's test = -14.301;  $P < 0.01$ ), soportado por los resultados de los estadísticos mismatch sustentando el modelo nulo de expansión demográfica para las poblaciones de *C. dombeyana* (R index = 0.0026; SSD = 0.0033) y *A. araucaniensis* (R index = 0.0036; SSD = 0.0046), (Tabla 1). Por el contrario, en *A. pewenchaë*, los resultados de la prueba de Tajima y Fu's  $F_s$  no son significativos (Tajima's  $D = -1.260$ ,  $P > 0.05$ ; Fu's test = -3.025;  $P > 0.05$ ) y los estadísticos mismatch no soportan la hipótesis de un evento de expansión poblacional (R index = 0.0358,  $P < 0.05$ ; SSD = 0.0502,  $P < 0.05$ ). En el caso de *A. l. talcahuano* los resultados no son consistentes entre los resultados de Tajima  $D$  y Fu's  $F_s$ . Para la especie de insecto *A. chilensis*, principalmente el valor significativo de SSD rechaza la hipótesis nula de expansión demográfica (Tabla 1). Al comparar las diversidades

genéticas históricas y contemporáneas, éstos indicaron un elevado decline de la variabilidad genética en las poblaciones de *A. araucaniensis* and *C. dombeyana*, señalando en ambas la ocurrencia de recientes eventos de cuello de botella, los que suelen ser seguidos de expansiones poblacionales (Tabla 1).

Los análisis de AMOVA mostraron que las poblaciones de *A. araucaniensis* revelan una significativa y elevada subdivisión entre sus poblaciones ( $\Phi_{ST} = 0.452$ ;  $P < 0.0001$ ), entre las poblaciones de *A. l.talcahuano* ( $\Phi_{ST} = 0.183$ ;  $P < 0.05$ ) y las poblaciones de *A. pewencha* ( $\Phi_{ST} = 0.168$ ,  $P = < 0.05$ ) y una fuerte divergencia entre las tres especies de aeglas ( $\Phi_{CT} = 0.543$ ;  $P < 0.0001$ ). La diferenciación genética para *C. dombeyana* mostró que el 66% de la variación total podría ser explicada al nivel de la variación entre poblaciones ( $\Phi_{st} = 0.330$ ;  $P < 0.0001$ ) y el 72% para *A. chilensis* ( $\Phi_{st} = 0.273$ ;  $P < 0.0001$ ); revelando una significativa y fuerte divergencia genética en general en todas las especies de macroinvertebrados de agua dulce analizados (Tabla 5). Sin embargo, los valores de  $\Phi_{ST}$  pareados para las poblaciones de *A. chilensis* fueron generalmente más bajos ( $\Phi_{st} = 0-0.66$ , promedio 0.233 y 56.41% con valores: 0.10-0.66) que la más amplia variación registrada por las especies de aeglas ( $\Phi_{st} = 0-0.90$ , promedio 0.518 y 87.61% con valores: 0.1-0.90) y *C. dombeyana* ( $\Phi_{st} = 0-0.86$ , promedio 0.292 y 82.41% con valores: 0.1-0.86). En Aquarius, los valores de  $\Phi_{st}$  más bajos que el promedio fueron observados entre muestras ubicadas al interior del Río Chillán. Así como, la diferenciación entre muestras localizadas en los principales cursos de agua del Río Chillán y algunos tributaries (T6-T8-T9) fueron a su vez los más pronunciados, con una mayoría de valores de  $\Phi_{st}$  pareados que excedieron el valor de 0.45. Las matrices de datos de estructuración poblacional ( $\Phi_{st}$  pareados) por especie se muestran en la sección de Anexos (Anexos A, Tablas II, III, IV).

Tabla 5. Resultados de los análisis jerárquicos de AMOVA para las poblaciones del complejo *Aegla sp.*, *C. dombeyana* y *A. chilensis* codistribuidas en la cuenca del Itata.

Fuente de variación‡	Componente Varianza	Variación (%)	Festadístico
<i>A. pewenchaе</i>			
Dentro de Poblaciones	5.030	83.24	F <sub>ST</sub> =0.168*
Entre poblaciones	0.2765	4.58	F <sub>SC</sub> = 0.052 <sub>ns</sub>
Dentro de grupos			
Entre grupos	0.7360	12.18	F <sub>CT</sub> =0.122 <sub>ns</sub>
<i>A. araucaniensis</i>			
Dentro de Poblaciones	5.7833	54.82	F <sub>ST</sub> =0.452***
Entre poblaciones	0.7658	7.26	F <sub>SC</sub> =0.117***
Dentro de grupos			
Entre grupos	4.0000	37.92	F <sub>CT</sub> =0.379 <sub>ns</sub>
<i>A. laevis talcahuano</i>			
Dentro de Poblaciones	10.539	81.70	F <sub>ST</sub> =0.183*
Entre poblaciones	1.033	8.01	F <sub>SC</sub> = 0.089 <sub>ns</sub>
Dentro de grupos			
Entre grupos	1.3271	10.29	F <sub>CT</sub> =0.103 <sub>ns</sub>
Entre localidades ocupadas	10.34215	54.32	F <sub>CT</sub> =0.543***
Por las tres especies de Aeglas			
<i>C. dombeyana</i>			
Dentro de Poblaciones	9.1512	66.96	F <sub>ST</sub> =0.330***
Entre poblaciones	3.0038	21.98	F <sub>SC</sub> = 0.2471***
Dentro de grupos			
Entre grupos	1.5108	11.06	F <sub>CT</sub> =0.111***
<i>A. chilensis</i>			
Dentro de Poblaciones	7.4075	72.67	F <sub>ST</sub> =0.273***
Entre poblaciones	0.9714	9.53	F <sub>SC</sub> = 0.115***
Dentro de grupos			
Entre grupos	1.8138	17.80	F <sub>CT</sub> =0.178*

ns=  $P > 0.05$ , \*= $P \leq 0.05$ , \*\*\*= $P \leq 0.001$ ; ‡ grupos corresponden a diferentes ramas hidrográficas (ver Capítulo II. Tabla 6).

Los resultados del test de Mantel para evaluar la correlación entre matrices indicó una significativa y positiva correlación entre las distancias geográficas (distancias hidrográficas) y genéticas exclusivamente en *C. dombeyana* ( $r = 0.4857$ ,  $P = 0.002$ ) y *A. araucaniensis* ( $r=0.8291$ ,  $P= 0.009$ );

revelando un patrón de aislamiento por distancia (IBD; Fig. 6 A, B). Sin embargo, no existen correlaciones significativas en *A. pewenchaе* ( $Z = -0.129724$ ,  $P = 0.784$ ), *A. l. talcahuano* ( $Z = 0.6224$ ,  $P = 0.2330$ ) y *A. chilensis* ( $Z = -0.2723$ ,  $P = 0.945$ ). Los resultados significativos de los análisis de autocorrelación espacial a través del área de estudio son mostrados en la Figura 7. En *C. dombeyana*, el estadístico de mantel ( $r_M$ ) fue obtenido para ocho clases de distancia de 17.22 km y el correlograma reveló un positivo and significativo valor de  $r$  ( $r_M = 0.298132$ ;  $P < 0.01$ ) a distancias comprendidas en un rango de: 2.66-19.88 km y no existen valores de autocorrelación significativos para las clases de distancias superiores (Fig. 7A). Para *A. araucaniensis* el estadístico de mantel ( $r_M$ ) fue obtenido para cinco clases de distancia de 15.29 km y los resultados señalan una positiva y significativa autocorrelación ( $r_M = 0.6740$ ;  $P < 0.05$ ) en un rango de distancias de: 5.29-20.58 km, sin resultados de autocorrelación significativos para distancias superiores (Fig. 7B). Las restantes especies de aeglas (*A. pewenchaе* y *A. l. talcahuano*) y el insecto *A. chilensis*, no presentan evidencias significativas de autocorrelación positiva o negativa a través del rango geográfico analizado. Estos resultados sugieren que en al menos dos especies de macroinvertebrados acuáticos, el caracol *C. dombeyana* y en una especie de aegla, *A. araucaniensis*, existe evidencia significativa de que las poblaciones se encuentran diferenciadas bajo un patrón de aislamiento por distancia. Sin embargo, los resultados de los análisis de autocorrelación de Mantel indican que este tipo de relación no es la misma a través de todo el rango de las distancias hidrográficas. Básicamente es posible sustentar que a distancias menores de 20 km, estas especies muestran evidencia de ser genéticamente más similares entre sí que respecto de las restantes poblaciones. En el caso de la especie de insecto, *A. chilensis*, si bien no existe evidencia significativa que muestre una señal de autocorrelación positiva o negativa para aquellas clases de distancia comprendidas entre el rango de 1.42 a 8.69km, las poblaciones exhiben una autocorrelación negativa al límite de la significancia ( $r_M = -0.214584$ ;  $P = 0.071$ ), lo que puede sugerir una mayor diferenciación genética entre poblaciones que se encuentran a distancias menores de 10 km (Anexo A, Fig. I, II).

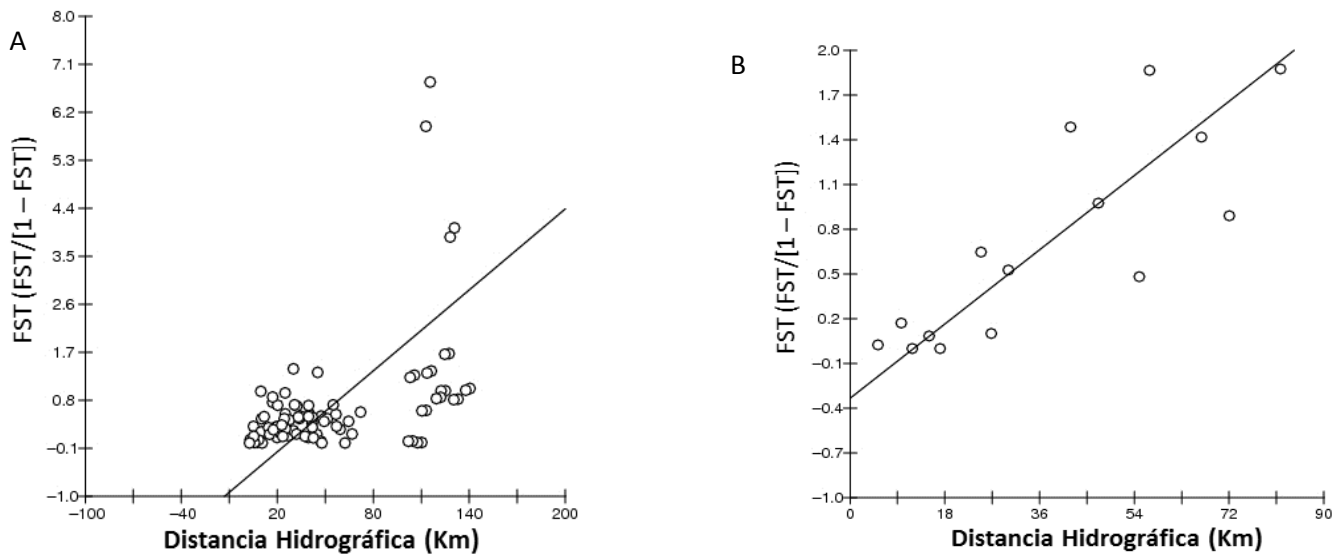


Figura 6. Test de Mantel de las correlaciones entre la distancia geográfica (Hidrográfica) y divergencia genética ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ) para haplotipos de: A) *C. dombeyana*, B) *A. araucaniensis*.

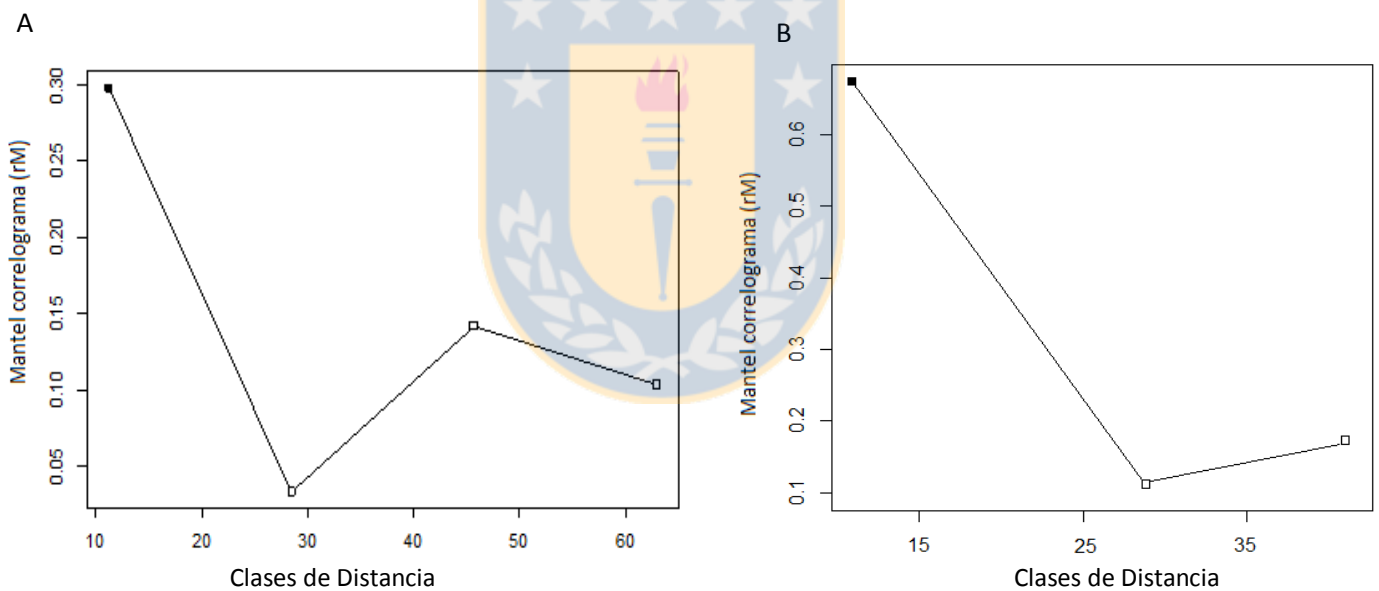


Figura 7. Análisis de autocorrelación espacial (Mantel correlograma) en A) *C. dombeyana*, B) *A. araucaniensis*. Los correlogramas muestran las relaciones entre clases de distancia hidrgráfica (x-axis) y el valor de correlación de Mantel (y-axis). Estadísticos Mantel positive (rM ) representan una positive autocorrelación señalando una baja distancia entre pares. Los simbolos en color negro corresponden a valores estadísticamente significativos ( $P < 0.005$ ) y los símbolos sin color corresponden a datos sin significancia.

## 9.0 DISCUSIÓN

El ADN mitochondrial (ADNmt) es un marcador genético apropiado para evaluar patrones filogeográficos y la reciente historia evolutiva de las especies (Avise, 2000) y es frecuentemente utilizado en estudios filogeográficos (Beheregaray, 2008). Una aproximación estadística objetiva que permite llevar a cabo inferencias filogeográficas históricas en las especies es el análisis de clados anidados (NCPA), una técnica controversial que ha sido criticada por algunos investigadores (Petit 2008; Knowles & Maddison 2002; Panchal & Beaumont 2007; Nielsen & Beaumont 2009) y defendida por otros (Knowles 2008; Templeton 2009, 2010). Éstos últimos argumentan que NCPA puede acusiosamente inferir procesos basados en un método de coalescencia y evaluar hipótesis filogeográficas mediante permutaciones aleatorias que permiten discriminar la significancia estadística de los clados entre las muestras, y por lo tanto discernir eficazmente un patrón de estructuración filogeográfica utilizando información espacial. Este análisis también ha contribuido para detectar y comprender patrones de reciente expansiones de rango, invasiones biológicas y ha demostrado ser útil en probar hipótesis taxonómicas que resuelven la existencia de diferentes especies (Crandall *et al.*, 2009).

Los resultados del presente estudio demuestran que un análisis de clados anidados resulta ser una buena herramienta para dilucidar procesos históricos significativos que moldean la evolución de las poblaciones dulceacuícolas de las especies codistribuidas de macroinvertebrados que fueron analizados. El análisis confirmó que el Río Chillán se encuentra habitado por tres especies de aeglas: *A. araucaniensis*, *A. l. talcahuano* y *A. pewenchaе*. La taxonomía de aeglas se encuentra bajo continua revisión y el estatus de algunas especies ha sido cuestionado (Pérez-Losada *et al.*, 2002b; Jara *et al.* 2003). Nuevas especies han sido reconocidas recientemente (Crandall *et al.*, 2010; Santos *et al.*, 2012), o han sido subsecuentemente descritas a partir de los estudios filogenéticos previamente descritos por Pérez-Losada *et al.* (2004) (Bartolomei-Santos *et al.*, 2011; Bond-Buckup *et al.*, 2010a; Bond-Buckup *et al.*, 2010b). Otras investigaciones han sugerido la posibilidad de una nueva especie, como ocurrió con el grupo poblacional de Yaldad en la isla de Chiloé (see Xu *et al.*, 2009) y potencialmente nuevas especies en Argentina se encontrarían bajo estudio (McLaughlin *et al.*, 2010). Las aeglas corresponden a un grupo particular de organismos. Ellas pertenecen a un único género, *Aegla* Leach, 1820, son organismos restringidos exclusivamente a ambientes acuáticos de agua dulce, son endémicos de Sudamérica y comprenden 69 especies que han sido reconocidas (McLaughlin *et al.*, 2010). Debido a sus especializados requerimientos de hábitat por ser organismos acuáticos obligados sus poblaciones podrían potencialmente sufrir procesos de subdivisión. En este estudio existe evidencia de un alto



grado de estructuración genética en las poblaciones de aeglas que viven en la cuenca del Itata, con un elevado número de haplotipos únicos, similar a lo reportado para *A. neuquensis* cuyas poblaciones contienen sólo nueve haplotipos compartidos y 75% de haplotipos únicos (Barber *et al.*, 2012). De acuerdo a los resultados de NCA las poblaciones del complejo de especies de aeglas que habitan en la cuenca del Itata muestran evidencia de un evento histórico de fragmentación alopátrica. En particular, las poblaciones de *A. araucaniensis* y *A. pewenchaе* muestran evidencia de un flujo génico restringido con áreas intermedias no ocupadas por las especies o bien señala la posibilidad de un flujo génico ancestral seguido por la extinción de las poblaciones intermedias. Algunas poblaciones de *A. araucaniensis* muestran evidencia de fragmentación en las localidades tributarias comprendidas en el clado 4-2 (T2 y T6) y un escenario de un rango de expansión contiguo para los tributarios comprendidos en un nivel de anidamiento superior (T1-T2-T6-T8-T11-T12). Este escenario evolutivo también evidencia que las poblaciones de *A. l. talcahuano* pueden haber sufrido un evento de fragmentación pasada y/o una colonización a grandes distancias, eventos que no necesariamente son mutuamente excluyentes. Estos resultados muestran concordancia con los patrones actuales de distribución y el rango alcanzado por cada una de las especies que habitan la cuenca. *A. l. talcahuano* es un habitante exclusivo de las localidades de E5, E6, T7 y T9, en tanto que *A. araucaniensis* habita las restantes localidades tributarias T1, T2, T6, T8, T11 y T12, y *A. pewenchaе* ocupa los territorios de los cursos de agua principal de Chillán y Cholguán E1, E2, E3, Chol1y Chol5. En función de las características geográficas del área de estudio y de las limitadas capacidades de dispersión de las especies acuáticas, aquellas condiciones más favorables del agua en la región andina de la cuenca (Debels *et al.*, 2005) permiten hipotetizar una conexión ancestral pleistocénica en la cabecera de la cuenca que pudo servir como áreas de refugios pleistocénicos. Cómo ha sido planteado para las localidades andinas de la región del Ñuble (36°30`S) y el valle Malalcahuello, las que contaban con zonas libres de hielos que pudieron actuar como refugios andinos a partir de los cuales posteriormente se expanden las poblaciones en períodos interglaciares (Heusser, 2003; Holling & Schilling, 1981; Vera-Escalona *et al.*, 2012). Estos hábitat apropiados de las regiones andinas y que actúan como posteriores núcleos de expansión, podrían ser responsables de la actual distribución y mantención de diferentes especies de aeglas y de la distribución haplotípica de *C. dombeyana* y *A. chilensis*. Para las especies consideradas en el estudio, las principales ramas hidrográficas de Chillán y Cholguán presentan haplotipos que son comunes a ambos sistemas y que pueden ser explicados por modelos que implican etapas de conexión y aislamientos de ríos, como el evento de “secuestro de río” planteado por Hughes *et al.*, (2009), en él un río que históricamente se encuentra aislado de otras ramas hidrológicas por barreras geomorfológicas y conectado con un flujo continuo con otras ramas hídricas, puede en el

tiempo sufrir procesos que alteran esta situación anulando barreras históricas que han existido por años y creando nuevas barreras en áreas donde jamás han existido. Un ejemplo de la literatura muestra evidencia en *Cherax destructor* (Decápoda: Parastácidae) mediante un análisis de clados anidados, de procesos de aislamientos ancestrales entre cuencas diferentes pero que son capaces de sufrir eventos de recolonización por uniones temporales que han sufrido estas cuencas en episodios de grandes inundaciones que abarcan toda la extensión geográfica de ambas cuencas, las que posteriormente son aisladas cuando dichas condiciones se revierten (Hughes & Hillyer, 2003).

Entre los más importantes procesos históricos naturales que han influenciado los patrones de diversidad actuales en las especies se encuentran los ciclos glaciales; documentados principalmente en el hemisferio norte y con trabajos que han incrementado en interés desarrollados principalmente en la zona Patagónica del hemisferio sur (Ruzzante *et al.*, 2011). De acuerdo a este autor los glaciales habrían cubierto el sur de Chile hasta aproximadamente los 39°S, causando graves alteraciones en la distribución de las especies y extinciones locales en especies acuáticas debido a sus escasas capacidades dispersivas (Unmack *et al.*, 2009). En un rango algo más amplio (~36°S -56°S), otros autores han señalado que durante la glaciación del Pleistoceno las masas de hielo cubrieron extensas áreas de Sudamérica (McCulloch *et al.* 2000; Hulton *et al.* 2002). Aquello significa que las masas de hielo pudieron afectar directamente a la región o imponer un rango limítrofe Sur de drásticas alteraciones climáticas de gran escala que puede suponerse ejercieron una significativa influencia de la glaciación y/o haber intensificado las oscilaciones climáticas sufridas por la región durante el período pleistocénico. Esta zona que ha sido también afectada por eventos volcánicos que imponen cambios en la geografía y en el terreno (paisaje) con una actividad que se remontaría hacia los 640.000 años (Pfanzel, 2008). Estas condiciones que permiten suponer que muchas de las poblaciones dulceacuícolas y entre ellas las aeglas hayan sido afectadas en su distribución y existan zonas cuyas condiciones les permitieron funcionar como áreas refugio en la cuenca. Poco es conocido, en general respecto de la evolución de las especies de aeglidos (Bartolomei-Santos, 2011), y los estudios previos han demostrado que los ciclos glaciales acaecidos durante el Pleistoceno han sido la fuerza primaria en generar fuertes patrones de estructuración y divergencia entre poblaciones glaciadas y no glaciadas, como ha sido el caso en *Aegla alacalufi* (Xu *et al.*, 2009).

En el caracol *C. dombeyana*, los análisis de NCA mostraron evidencia de un único proceso histórico que pudo haber actuado sobre sus poblaciones y corresponde a un rango de expansión contigua. Un 79% de haplotipos únicos caracterizaron las poblaciones de *C. dombeyana*, una situación similar a la

registrada en aeglas. Bajo un régimen drástico de oscilaciones climatológicas ancestrales y los rasgos de historia de vida de estas especies con limitadas capacidades de dispersión, un patrón de dispersión contiguo resulta un evento histórico plausible de haber actuado sobre las poblaciones del caracol que pueden explicar la actual distribución de haplotipos de esta especie. En el caso de las poblaciones del insecto, es probable que debido a una mayor capacidad de dispersión (flujo génico) de los organismos de esta especie a nivel del cladograma entero no se detecten asociaciones significativas entre la diversidad genética y la geografía en esta especie. Sin embargo, las localidades tributarias T6, T8 y T9; si detectan una significativa asociación que implica un proceso de colonización a grandes distancias y/o una fragmentación pasada sin necesidad de ser procesos excluyentes entre si. En general, los insectos tienen una inmensa capacidad de adaptación y pueden ser favorecidos por los cambios ambientales (Mock *et al.*, 2007), pudiendo habitar en un amplio rango de ecosistemas demostrando el enorme éxito biológico que estos organismos tienen al ser capaces de existir donde otros animales simplemente no pueden sobrevivir (Behura, 2006). Sin embargo, también existe evidencia de estructuración en una especie de insecto heteróptero *Aquarius remigis*, cuyas poblaciones muestran evidencia de una significativa variación espacial de las frecuencias alélicas, con un nivel de heterocigocidad que refleja sólo un cuarto del nivel de variabilidad de otras especies de gerridos con alto flujo génico, gran desarrollo alar o como podría esperarse comparado con otros insectos (Zera, 1981). Considerando además que los factores abióticos tales como el clima (Firko, 1986) o la contaminación (Bendell, 1988) pueden ser importantes agentes de mortalidad en gerridos.

Comparado con las otras especies de macroinvertebrados de este estudio, completamente restringidas al medio acuático, el insecto *A. chilensis* presenta un nivel de estructuración moderadamente menor y aquello muy probablemente ha sido una respuesta a una mayor habilidad de dispersión.

Los organismos de agua dulce son ideales para estudiar procesos evolutivos y patrones filogeográficos debido precisamente a que corresponden a especies con limitada capacidad de dispersión y una fragmentación del hábitat que produce discontinuidad en las distribuciones a menudo se encuentra asociada con la estructura genética de sus poblaciones (Verovnik & Trontelj, 2004). Usualmente el rango de la mayoría de ellas se encuentra completamente restringido debido no solo a las escasas habilidades de dispersión sino también a sus particulares requerimientos de hábitat. Estas características impiden a los organismos adoptar estrategias de escape cuando las condiciones ecológicas se tornan adversas, y es factible pensar que aquello conduzca a extinciones locales seguidas de posteriores procesos de colonización cuando esas condiciones mejoran. Bajo estas circunstancias las poblaciones pueden sufrir episodios de inestabilidades demográficas. En este estudio, si bien en las

poblaciones de *A. laevis talcahuano*, las pruebas demográficas no son concluyentes, para las poblaciones de *A. araucaniensis* y *C. dombeyana*, existe un claro patrón que muestra evidencia de una significativa expansión demográfica. Pruebas independientes de expansión demográfica (SSD) e índice *raggedness* (R index) son concordantes en ambas especies y soportan las señales de expansión demográfica en las poblaciones. Sin embargo, las poblaciones en ambas especies también son capaces de sufrir episodios de reducción en el tamaño de sus poblaciones, como lo demostraron los resultados de los análisis comparativos de la diversidad genética histórica y contemporánea, detectando eventos recientes de cuello de botella ( $\theta\pi < \theta w$ ), lo cual es luego seguido muy probablemente de expansiones locales bajo condiciones que tornen más favorables a las poblaciones.

La cuenca del río Chillán que estas poblaciones habitan drena muchos de los desechos agrícolas de la zona, con una considerable cantidad de agua que es extraída para su uso en irrigación agrícola y para la producción de agua potable para la ciudad de Chillán (Debels *et al.*, 2005). Aquello, da cuenta que las poblaciones dulceacuícolas de estas especies pueden sufrir episodios de inestabilidad demográfica, al estar expuestas no solo a la fragmentación de la estructura dendrítica por si misma sino también a todos los tipos de actividades antropogénicas disruptivas que afectan estos ambientes impactando la calidad del hábitat y del agua. De hecho, la calidad del agua de la cuenca ha sido clasificada como aguas de muy buena calidad en la porción superior de la cuenca, regular en la porción intermedia y de una mala o muy pobre calidad en las porciones más bajas de la cuenca (Debels *et al.*, 2005; Figueroa *et al.*, 2007), una situación ambiental que puede exponer a pequeñas poblaciones aisladas a procesos de extinciones locales en los sectores más afectados de la cuenca.

Una situación demográfica diferente es la resuelta para las poblaciones de *A. pewenchaе*. En ellas no se obtienen evidencias significativas en los indicadores demográficos y los estadísticos bajo un modelo de expansión reciente (SSD e índice *rageness*) rechazan la hipótesis nula de un crecimiento poblacional. Por ello, un proceso demográfico de expansión poblacional no es aceptado y aquello, aporta evidencia de que las poblaciones de *A. pewenchaе* no se ajustan a un modelo demográfico de expansión espacial, sino más bien sugiere una situación estacionaria o bien que sus poblaciones han sufrido eventos recurrentes de cuello de botella. Sin embargo, al comparar las diversidades históricas y contemporáneas, se aprecia que no existen grandes diferencias entre los valores por lo que un episodio reciente de cuello de botella parece no haber afectado a estas poblaciones. Considerando que *A. pewenchaе* cubre un amplio rango latitudinal (Jara *et al.*, 2006) y que existen poblaciones de esta especie que habitan los principales cursos de agua del río Chillán y que también están presente en al

menos dos sitios del río Cholguán sugiere que las poblaciones de *A. pewenchaie* representan las de más amplia distribución y cuyos haplotipos muy probablemente fueron ampliamente representados en los sectores de cabecera andina de la cuenca, en aquellas instancias que pudieron ver favorecidos episodios de conexión y continuidad hidrográfica. En el caso de las poblaciones del insecto las diferentes pruebas demográficas muestran evidencias discondantes, si bien algunos indicadores de expansión demográfica, resuelven señales significativas. Principalmente, el estadístico mismatch que corresponde al valor más alto y significativo encontrado en todas las poblaciones no permite sustentar una demografía en expansión. Aunque, estas poblaciones a diferencia de lo registrado en *A. araucaniensis* y en *C. dombeyana*, no han sufrido de eventos de cuello de botella recientes, siendo probablemente más estables demográficamente que aquellas poblaciones.

La estructuración genética y divergencia entre las poblaciones son comunes en especies de agua dulce. Sin embargo, la diferenciación entre las poblaciones también puede estar relacionada con la distancia que las separa siguiendo un patrón de aislamiento por distancia (IBD). Tanto las poblaciones de *A. araucaniensis* como las de *C. dombeyana* mostraron un significativo patrón de IBD y los resultados del correlograma de Mantel indican una positiva autocorrelación para las clases de distancias más pequeñas. Normalmente las autocorrelaciones declinan con el incremento del rango de distancias, lo que puede ser atribuido a un gradiente genético o a un sistema de estructuración con saltos (Osborne & Wiley, 1992; Legendre & Legendre, 1998). Posiblemente la poca distancia de dispersión alcanzada por las especies explica una elevada significancia y positiva autocorrelación que señala una menor distancia genética a cortas distancias. Recientemente, Bertin *et al.* (2012) demostraron para rasgos morfológicos que una importante porción de la variación del tamaño de la concha en *C. dombeyana* se encontraba espacialmente estructurada con una mayor similaridad explicada entre aquellas poblaciones dispuestas a menos de 12 km de distancia hidrográfica.

Existen características en las historias de vida de las especies que también pueden favorecer procesos de esta naturaleza. Las aeglas, por ejemplo, tienen un desarrollo directo y las hembras llevan sus huevos debajo del pleon (Bücker *et al.*, 2008), los juveniles permanecen con la madre por algún tiempo (López *et al.*, 2004); esta falta de fase larval puede restringir su dispersión y ha sido señalada como una causa potencial de un alto nivel de estructuración y bajo flujo génico en las poblaciones de *Aegla longirostri* ( $F_{st}= 0.147-0.663$ ,  $P < 0.001$ ; Bartolomei-Santos *et al.*, 2011). Ejemplos de especies con un elevado grado de estructuración genética de sus poblaciones incluyen, *Aegla alacalufi* (Xu *et al.*, 2009), *Aegla neuquensis* (Xu *et al.*, 2009; Barber *et al.*, 2012), *Aegla longirostri* (Bartolomei-Santos *et*

*al.*, 2011), así como en otras especies de agua dulce como el camarón de río, *Austrapotamobius pallipes* (Gouin *et al.* 2011), cangrejos de agua dulce (Daniels *et al.* 2006) y peces (Ruzzante *et al.* 2006).

En el insecto *A. chilensis* (Heteroptera: Gerridae), las poblaciones tributarias T6-T8-T9 muestran elevados valores de  $F_{st}$  pareados que contrastan con el resto de las estimaciones de estructuración poblacionales. Estas poblaciones habitan en zonas tributarias del río Chillán y pueden verse afectadas por los efectos de una fragmentación de hábitat por causas antropogénicas así como por un progresivo deterioro de la calidad de su ambiente, afectando la conectividad entre sus poblaciones. Eso es un aspecto importante dado que esta especie de insecto presenta características ecológicas únicas, mayoritariamente presentan una forma áptera (Fairbairn, 1984) y su dispersión entre arroyos es escasa (Calabrese, 1979; Fairbairn, 1986; Fairbairn and Desranleau, 1987), características que han sido expuestas como causas probables de estructuración genética que pueden afectar las capacidades de dispersión de estos insectos en busca de mejores hábitat (Zera, 1981). Sin embargo, al considerar la totalidad de las poblaciones la distancia no representa una significativa barrera al flujo génico y la distribución observada de haplotipos refleja diferencias en los niveles de migración de los individuos entre sitios de muestreo. Aquello, también puede ser reflejo de la acción homogenizadora realizada por algunos individuos macrópteros presentes en las poblaciones, en conformidad a la proposición de “rescate genético” propuesto por Sewall Wright, y que plantea que basta un único individuo migrante para mantener los mismos alelos segregantes en todas las poblaciones (Wright, 1931, 1940; Tallmon *et al.*, 2004), estos individuos pueden potencialmente ser responsables de la mantención de un flujo génico que establece conexión entre sistemas los sistemas hidrográficos de Chillán y Cholguán.

Dependiendo de las capacidades de dispersión o de las características de la historia de vida de las especies, la importancia de las condiciones ambientales locales varían y afectan los patrones de distribución espacial de las especies (Grenouillet *et al.*, 2008). Sin embargo, debido a causas antropogénicas muchas de las condiciones del terreno (paisaje) han sido drásticamente alteradas y pueden ejercer un severo impacto en los organismos dulceacuícolas, quienes ven afectado en primera instancia el grado de conectividad existente entre las poblaciones, muchas de ellas fraccionadas en subunidades aisladas y expuestas a drásticos cambios demográficos de sus tamaños poblacionales. Tal es el caso de las poblaciones del molusco y varias especies de aeglas, limitadas en su capacidad de dispersión, y por lo tanto restringidas en su rango de distribución. Sus poblaciones pueden mantenerse aisladas con bajo flujo de migrantes y que refleja la escasa cantidad de haplotipos compartidos que fueron encontrados. En el caso de aeglas, en la cuenca además se confirmó la presencia de tres



especies, cuyas poblaciones se mantienen en rangos de distribución aislados y restringidos, lo que puede incrementar el grado de vulnerabilidad de algunos grupos poblacionales, los que deben obligadamente responder a los cambios de su entorno (fragmentación de hábitat) o sufrir procesos de extinciones locales. Existen evidencias de varias especies de aeglas consideradas de distribuciones altamente restringidas y muchas de ellas son especies consideradas vulnerables o en peligro de extinción (Bond-Buckup *et al.*, 2008; Pérez-Losada *et al.*, 2002a, 2004, 2009). En los últimos 25 años, los aeglididos han experimentado progresivas reducciones de sus poblaciones debido al severo deterioro que han sufrido muchos de los ecosistemas dulceacuícolas de Chile (Jara, 2005; Bahamonde *et al.*, 1998) y al echo de que estas especies habitan exclusivamente aguas continentales (Santos, 2009). Es el caso de *A. l. talcahuano*, que de acuerdo al criterio IUCN es considerada una especie vulnerable en todo su rango de extensión (San Fernando-Chillán, Bahamonde *et al.*, 1998; Pérez-Losada *et. al.*, 2002) y cuyas poblaciones se han reducido al menos en un 30% (Pérez-Losada *et. al.*, 2002).

Las especies dulceacuícolas analizadas en este estudio revelan un alto grado de diferenciación poblacional. Aunque el insecto *A. chilensis* muestra menores niveles de estructuración y mayor flujo génico que las otras especies estudiadas, probablemente explicado por las diferencias en las capacidades y estrategias de dispersión, algunas de sus poblaciones tributarias evidencian un alto grado de estructuración genética. Hasta ahora, los estudios realizados en *aquarius* han diagnosticado sólo las relaciones filogenéticas entre especies de heterópteros (Damgaard *et al.*, 2005; Damgaard *et al.*, 2012), estudios filogeográficos y demográficos aplicados a esta especie no han sido desarrollados. En lo concerniente a *C. dombeyana*, la familia completa ha sido considerada vulnerable debido a la continua pérdida de hábitat disponibles (Valdovinos *et al.* 2006), los resultados de este estudio muestran evidencia de un elevado nivel de estructuración genética de sus poblaciones con inestables procesos demográficos. Teniendo presente además que esta especie ha sido identificada como poco tolerante a la contaminación del agua (Figuroa *et al.*, 2007), sus poblaciones pueden resultar muy afectadas en su demografía bajo condiciones que alteren la calidad ambiental de su entorno.



## Capitulo II

### **FACTORES ESPACIALES Y CALIDAD DEL AMBIENTE SOBRE LA DIFERENCIACIÓN POBLACIONAL DE DOS ESPECIES DE MACROINVERTEBRADOS DE LA CUENCA DEL ITATA**



## 10. RESUMEN

Los sistemas de redes fluviales corresponden a hábitat naturalmente fragmentados y expuestos a perturbaciones antropogénicas que pueden actuar como barreras al flujo génico alterando la conectividad entre poblaciones, incrementando la fragmentación y diferenciación de las poblaciones. Bajo el marco de la Genética del Paisaje se abordó un estudio poblacional interespecífico, cuyo objetivo es comparar los patrones de variabilidad y estructuración genética en dos especies de macroinvertebrados dulceacuícolas con diferentes niveles de tolerancia a la contaminación del agua, un molusco gastrópodo *C. dombeyana* y un insecto acuático, *A. chilensis*, que habitan en la cuenca del Itata y cuyos rasgos de historia de vida y capacidades dispersivas difieren entre sí. Mediante la utilización de once marcadores microsátélites polimórficos en *C. dombeyana* y seis en *A. chilensis*, fueron evaluados aspectos demográficos y el rol de los factores espaciales, variables ambientales físico-químicas y de hábitat, mediante técnicas clásicas de genética de poblaciones y de ecología espacial. Los resultados muestran diferencias entre las poblaciones de ambas especies. En *C. dombeyana* se observa un nivel de variabilidad genética levemente inferior que en *A. chilensis*. A diferencia de las poblaciones del insecto, las poblaciones de *C. dombeyana* se adecúan a un patrón de aislamiento por distancia ( $r=0.869$ ,  $P=0.001$ ) y muestran evidencia de autocorrelación positiva a distancias menores a 28 km, existiendo una disminución de la variabilidad genética en *C. dombeyana* a mayores distancias desde la zona de confluencia en la desembocadura del Río Chillán. No se encontraron evidencias significativas de que aquello ocurra en las poblaciones del insecto. Una mayor influencia de la hidrografía en *C. dombeyana* y las diferencias en las habilidades dispersivas entre especies potencian esta disminución de la diversidad genética. Las poblaciones de ambas especies presentan un elevado nivel de estructuración, *A. chilensis* ( $F_{ST} = 0.213$ ,  $P < 0.001$ ) y *C. dombeyana* ( $F_{ST} = 0,318$   $P < 0.001$ ). Sin embargo, existen diferencias en los niveles y distribución de la estructuración entre pares poblacionales, y que en el caso de *A. chilensis* aquello ocurre principalmente respecto de una localidad tributaria denominada T6. Los análisis de agrupamiento de Structure, la distancia DAS de alelos compartidos, de conectividad mediante *graph* poblacional y de varianza (AFC) resultan concordantes e informativos al interior de cada especie. Para *C. dombeyana* se encuentra evidencia de tres grupos que separan los grupos poblacionales de los principales cursos de agua del Río Chillán y un pequeño tributario (T7), de aquellos de los sectores tributarios del mismo río y de dos localidades pertenecientes al Río Cholguán. A diferencia de las poblaciones de *C. dombeyana*, en *A. chilensis* se evidencia un grupo principal que reúne a las localidades del curso principal, algunos tributarios del Río Chillán y a ambas localidades del Río Cholguán y separa este grupo de tres

localidades de tributarios y de la localidad T6 que se presenta altamente diferenciada. Los análisis demográficos aplicados a sus poblaciones revelan un patrón contemporáneo de bajos tamaños efectivos en ambas especies (*C. dombeyana*:  $8 < N_e < 2289$ ; *A. chilensis*:  $3 < N_e < 146$ ), siendo precisamente la excepción la población Choll ( $N_e = 2289$ ) en *C. dombeyana* que registra un mayor tamaño poblacional y que permite asegurar un adecuado nivel de variabilidad. Al comparar los datos históricos y contemporáneos se aprecia una disminución en el tiempo de los tamaños efectivos, que resulta más pronunciado en las poblaciones de *C. dombeyana* que en las del insecto *A. chilensis*. Sin embargo, existe un patrón concordante para ambas especies respecto de las localidades E2, E4 y E6, que han sido afectadas con grandes disminuciones en los tamaños efectivos y presentan evidencia de haber sufrido episodios de cuello de botella que pone en manifiesto señales de inestabilidades demográficas que han afectado a las poblaciones de estas especies.

Con la finalidad de explicar los procesos de diferenciación poblacional fueron evaluados los efectos de los componentes espaciales obtenidos a partir de una matriz hidrográfica en función de la distancia lineal e hidrográfica entre localidades, los procesos no direccionales (AEM) y direccionales en función del flujo del agua (AEM), además de aproximadamente 20 distintos parámetros que permitieron evaluar las condiciones físico-químicas y de calidad de hábitat. Los análisis de partición de varianza logran explicar un 77% de la varianza en el caso de las poblaciones de *C. dombeyana* y un 25% en las poblaciones de *A. chilensis*. Principalmente las condiciones de hábitat respecto del tamaño de bolones arrojan la mayor fracción de la varianza explicada en *C. dombeyana*, probablemente debido a la importancia que este medio tiene como fuente de alimento, protección de depredadores y sujeción de las corrientes de agua. Por el contrario, en *A. chilensis* las variables físico-químicas de nitrato y la demanda química de oxígeno (DQO) explican el mayor porcentaje de la varianza (13%). Ambas especies muestran evidencia de ser afectadas en algún grado por procesos de contaminación de origen urbano y agrícola que contribuyen a los procesos de diferenciación de sus poblaciones.

## 11.0 INTRODUCCION

La pérdida de hábitat y la fragmentación se encuentran entre los mayores peligros de pérdida de la biodiversidad del mundo (Ganzhorn *et al.*, 2003). En la mayoría de las cuencas que han sido alteradas como consecuencia de las actividades humanas, las transformaciones del paisaje reducen el área, la calidad y la conectividad del hábitat, afectando la viabilidad de las poblaciones en muchas especies (Fahring, 2003, Walker *et al.*, 2008), y resultan ser un factor determinante del decline de las poblaciones (Ayllón *et al.*, 2012). De hecho, las características del hábitat local y de los gradientes ambientales (ej. temperatura del agua, calidad del agua, etc.) pueden tener un rol importante en los patrones de dispersión y subsecuente flujo génico y en adaptación local (Bohonak & Jenkins, 2003). Es sabido que la fragmentación de hábitat tiene consecuencias sobre la distribución de la diversidad genética dentro y entre poblaciones reduciendo la habilidad de las poblaciones de adaptarse a los cambios ambientales (Goodman *et al.*, 2001; Spielman *et al.*, 2004). Caughley & Gunn (1996) señalaron que el aislamiento de las poblaciones conlleva un decrecimiento del tamaño de las poblaciones locales y por ende a un decrecimiento del tamaño efectivo de las poblaciones ( $N_e$ ), cuya relación puede dar cuenta de la pérdida de variación genética de las poblaciones.

El tamaño efectivo de una población ( $N_e$ ) representa el tamaño ideal de una población con cruzamiento al azar, demográficamente estable y que en teoría debiese poseer la misma cantidad de diversidad genética de una población real (Chickhi & Bruford, 2005). Las poblaciones que tienen tamaños efectivos reducidos son afectadas en su capacidad de respuesta frente a procesos de selección o de deriva genética (Bengsson & Cronberg, 1999; Frankham & Kingslover, 2004), acentuando las diferencias en sus frecuencias alélicas e incrementando los efectos perjudiciales de la endogamia lo que puede aumentar el riesgo de extinción (Bickham *et al.*, 2000). Una situación particularmente preocupante corresponde a las especies de agua dulce cuyos números y tamaños poblacionales se reducen drásticamente. En este sentido, la genética del paisaje es una disciplina que proporciona el marco teórico para evaluar la influencia de las características ambientales y rasgos del paisaje sobre el flujo génico y la estructuración espacial de la variación genética (Manel *et al.* 2003, 2009; Guillot *et al.* 2005, Storfer *et al.* 2007). Esta disciplina integra métodos analíticos provenientes de las áreas de la ecología del paisaje, geografía, estadística espacial y genética de poblaciones para comprender los rasgos espaciales de las discontinuidades de la variación genética (Manel *et al.* 2003, 2010; Holderegger & Wagner 2006, Storfer *et al.* 2007). La genética del paisaje ha hecho importantes contribuciones en la evaluación del rol que ejercen las características del paisaje, barreras físicas y

cambios del paisaje por efectos antropogénicos sobre la conectividad y grado de aislamiento de las poblaciones (Sork & Waits, 2010).

Comprender el flujo génico en función de las características del entorno puede proveer información acerca de los factores que influyen en el movimiento efectivo de individuos a través del espacio, debido a que las características del paisaje son a menudo un determinante principal de la estructuración poblacional y de la tasa de dispersión existente entre las poblaciones (Wilmer *et al.*, 2008). Precisamente, son los atributos o condiciones del entorno que resultan menos favorables a las especies, los que limitan o restringen el movimiento efectivo de los individuos y generan fragmentación en las poblaciones, una situación de aislamiento que reduce el flujo génico y que puede afectar tanto a la diversidad genética mediante procesos de deriva e *inbreeding* (Allendorf & Luikart 2007) como a la evolución de las especies, incrementando procesos de adaptación local e impidiendo el intercambio de alelos que resultan benéficos a las poblaciones (Slatkin 1987, Wang *et al.* 2009). La conectividad en hábitat fragmentados resulta fundamental para la estabilidad de las poblaciones (Minor & Urban, 2008). Sin embargo, los efectos de la fragmentación del hábitat varían de acuerdo a las necesidades específicas que tienen las especies respecto del hábitat y de los efectos antropogénicos que a modo de barreras pueden actuar como impedimento en el movimiento entre parches de hábitat (Decout *et al.*, 2012) y promover la fragmentación y diferenciación de las poblaciones. Precisamente, las alteraciones del hábitat por causas antropogénicas pueden reducir las tasas de dispersión entre las poblaciones, aumentando las posibilidades de extinción de poblaciones locales (Hanski, 1999, Howes *et al.*, 2008), especialmente en pequeñas poblaciones fragmentadas resultando en un proceso relativamente común (Fahrig & Merriam, 1994; Kindlmann & Burel, 2008).

En un sistema de redes fluviales, los organismos quedan expuestos naturalmente a un sistema jerárquico de redes hídricas en el cual los individuos se distribuyen de acuerdo a un modelo lineal de intercambio conocido como “*stepping-stone*” y que involucra exclusivamente a las poblaciones adyacentes. Aunque este sistema de redes interconectadas que es típico de las cuencas hidrográficas tiene la ventaja de simplificar el modo de conectividad entre poblaciones a un sistema vectorial en una dimensión, este grado de conectividad entre sitios a lo largo de un río puede generar problemas estadísticos debido a la posible dependencia espacial entre observaciones. Por ejemplo, para aproximarse a adecuados modelos predictivos de la estructura genética de las poblaciones se necesita la cuantificación de los efectos relativos que ejercen los diversos parámetros del paisaje sobre la variación genética (Cushman *et al.*, 2006a; Foll & Gaggiotti, 2006; Faubet & Gaggiotti, 2008). Sin embargo, las

medidas de diferenciación genética y las distancias de separación efectiva son principalmente pareadas y a menudo muestran autocorrelación espacial. Entonces es necesario evaluar las aproximaciones estadísticas a utilizar para lograr distinguir los verdaderos efectos del paisaje que influyen la variación genética y su estructura y así realizar adecuadas inferencias ecológicas (Wagner & Fortin, 2005). Un problema que han debido enfrentar los estudios ecológicos es esta falta de independencia de las observaciones o datos utilizados en la mayoría de las pruebas estadísticas (Cliff & Ord, 1981). En particular, las observaciones se encuentran en un contexto espacial dando origen a un tipo de relación entre ellas, entendida como dependencia espacial y que puede ser debida a una autocorrelación entre la variable biológica de interés y los factores que afectan esa variable (Dale & Fortin, 2009). Resulta factible que frente a dependencias espaciales positivas o negativas, se enmascare la verdadera relación, debido principalmente a las diferencias en los tamaños efectivos de las muestras, por ejemplo, dando surgimiento a más resultados aparentemente significativos de los que la data puede justificar (Legendre & Legendre, 1998). Considerando que el efecto total de la dependencia espacial sobre el tamaño de la muestra efectiva es dependiente del balance entre correlaciones positivas y negativas sobre todos los posibles pares de observaciones del estudio (Cressie, 1991; Dale & Fortin, 2002) y que esta sería una situación explicada normalmente bajo un fenómeno de parches en ecología, es habitual que se generen autocorrelaciones que fluctúan con la distancia entre valores altos y bajos (Dale & Fortin, 2009). Si la correlación declina exponencialmente con la distancia y los factores que causan patrones espaciales pueden ser considerados unidireccionales, como cuando el factor dominante es orientado a través de una dirección (ej. curso de agua) (Dale, 1999), es posible evaluar el grado de correlación de las variables y su dependencia de la distancia con modelos de autocorrelación en una dimensión o en su equivalencia a procesos que se ajustan a procesos espaciales bidireccionales (Ripley, 1981).

En los ríos la presencia de una arquitectura jerárquica de redes hidrográficas puede limitar los procesos evolutivos, demográficos y ecológicos de organismos acuáticos, afectando la distribución y abundancia de las especies que ocupan estos sistemas (Grant *et al.*, 2009). Los estudios que permiten evaluar la influencia de las condiciones del ambiente sobre dos o más especies resultan cruciales para comprender la forma en que las especies son afectadas por las características del paisaje, en función de su historia de vida, abundancia poblacional y características ecológicas. Por ello, los estudios comparativos son necesarios y permiten alcanzar una visión más integrativa del impacto del paisaje y su cambio a un nivel comunitario, y así tener una mejor comprensión del impacto antropogénico sobre la biodiversidad de los ecosistemas dulceacuícolas.

Los invertebrados corresponden a importantes componentes de las cadenas tróficas en ecosistemas de agua dulce y son particularmente vulnerables a los cambios ambientales. Entre las principales consecuencias se encuentran las alteraciones impredecibles del rango distribucional de las especies, de la estructura comunitaria y de la interacción entre las especies (McCarty 2001; Walther *et al.*, 2002). Para especies con individuos de limitadas capacidades de migración hacia zonas de mejor calidad de agua (río arriba), se espera que frente a presiones de selección causadas por cambios ambientales (ej. reducción de la calidad de agua) éstos no tengan posibilidad de escapar, debiendo adaptarse a dichos cambios y/o sufrir pérdida de adecuación biológica. Una comparación interespecífica permite inferir si las poblaciones de una especie se encuentran más afectadas que las poblaciones de la otra especie debido a las diferencias espaciales o de la calidad de agua. Por ello, bajo el marco de la genética del paisaje se investigó las características demográficas y el impacto que los factores espaciales y la calidad del ambiente ejercen sobre la diferenciación poblacional de dos especies de macroinvertebrados acuáticos de agua dulce, *Chilina dombeyana* y *Aquarius chilensis*, ampliamente distribuidos a lo largo de la cuenca del Itata y que presentan diferentes niveles de tolerancia a la contaminación del agua (Figueroa *et al.*, 2007). Para ello se utilizaron marcadores moleculares microsátélites y también diversos descriptores de su hábitat local utilizando parámetros físico-químicos del agua, datos de biodiversidad de macroinvertebrados acuáticos, calidad de la vegetación de ribera y aspectos físicos del cauce fluvial, en varios sitios principalmente a lo largo de la cuenca hidrográfica del río Chillán en Chile central (VIII Región). Estos factores permiten evaluar el efecto que estos componentes del paisaje o la combinación de ellos pueden tener sobre los niveles de variabilidad y diferenciación genética de las poblaciones, información que es fundamental para la interpretación de los patrones espaciales de estructuración poblacional.



## 12.0 MATERIALES Y MÉTODOS

### 12.1 Muestreo, Extracción de ADN y Condiciones de Amplificación de Marcadores Microsatélites

Las muestras fueron obtenidas a partir de diferentes localidades distribuidas principalmente a lo largo del Río Chillán y en dos localidades del Río Cholguán, las que fueron muestreadas durante los meses de marzo-abril de 2009 (Fig. 1, Mapa en extenso ver Anexos, Fig. III). El ADN genómico fue extraído mediante un procedimiento de extracción de sales (Bruford *et al.*, 1992), a partir de tejido del músculo del pie en el molusco, *C. dombeyana* y del abdomen y patas en el insecto, *A. chilensis*. Posteriormente el ADN de todas las especies fue almacenado a -20°C para su posterior análisis.

El desarrollo del set de partidores microsatélites para *C. dombeyana* y *A. chilensis* se realizó en la empresa Genetic Marker Services (Brighton, UK). Los detalles del protocolo utilizado se encuentran disponibles en el sitio web [www.geneticmarkerservices.com](http://www.geneticmarkerservices.com). En *C. dombeyana* fueron desarrollados once marcadores microsatélites todos polimórficos y amplificables mediante procedimiento PCR. Ocho de estos partidores microsatélites (CM52, CM44, CM49, CM 53, CM48, CM42, CM50, CM41) fueron estandarizados en una muestra de 24 individuos pertenecientes a la localidad E2 del curso de agua principal del Río Chillán y publicados en *Molecular Ecology Resources* en el año 2011 (Anexo B). Posteriormente se estandarizaron y agregaron al análisis tres nuevos marcadores microsatélites polimórficos (CM27, CM30, CM25).

En el insecto *A. chilensis* fueron utilizados los partidores microsatélites, Hem1, Hem 6, Hem8, Hem9, Hem10 y Hem 11, todos polimórficos y amplificables en las poblaciones de *A. chilensis*. A la fecha de esta investigación no fue posible incorporar nuevos partidores microsatélites al set de marcadores disponibles para esta especie, debido a algunas complicaciones que surgieron durante de desarrollo y estandarización de nuevos partidores SSR por parte de la empresa. Los resultados de los clonamientos realizados revelaron evidencias de masivos fragmentos de ADN ricos en secuencias GT que parecen dominar en el genoma de este insecto. La creación de una nueva librería enriquecida en secuencias AG, dió como resultado la obtención de estos 6 partidores microsatélites todos utilizables en la especie. En ambas especies, cada partidior *forward* o *reverse* fue marcado en el extremo utilizando marcadores fluorescentes 6FAM, HEX or NED conforme se señala en las tablas 7 y 8. Se utilizó un termociclador MAXYGENE (Axygen, USA) y reacciones de 10 µl que contienen 20 ng de ADN genómico, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, buffer PCR 1X, 200 µM de cada dNTP, 3 pmol de cada partidior y 0.25 U of GoTaq Hot Start polimerasa (Promega). Las condiciones óptimas para PCR consisten en un paso de denaturación

inicial a 95°C durante 120 seg, seguido por una amplificación de 30 ciclos de denaturación a 94°C por 60 seg, *annealing* de temperaturas específicas por 60 seg (Tabla 6, 7) y extensión a 72°C por 60 seg. Finalmente, se realizó un paso de elongación final de 72°C por 10 minutos. Los productos PCR fueron separados utilizando un secuenciador automático con capilares mediante el analizador ABI 3130 (Applied Biosystems) y el tamaño alélico determinado mediante comparación con el standard de tamaño ROX-labeled CEQ 400 utilizando el programa GeneMarker (SoftGenetics).

## **12.2. Análisis de la diversidad genética**

Un total de 501 individuos de *C. dombeyana* y 525 individuos de *A. chilensis* fueron exitosamente genotipados en ambos sets de marcadores microsatélites polimórficos. La especie *C. dombeyana* fue analizada en 14 localidades distribuidas principalmente a lo largo del río Chillán y en dos sitios del Río Cholguán. Los resultados fueron obtenidos utilizando un total de 11 marcadores microsatélites sobre un rango de tamaño de muestreo comprendido entre 17 individuos pertenecientes a la localidad T2 y 49 de la localidad T9. El número promedio de alelos por locus fue de 12.27, con un rango alélico compendido entre 3 y 36 alelos (Tabla 7). Las poblaciones de *A. chilensis* fueron examinadas en 13 diferentes localidades distribuidas principalmente a lo largo del río Chillán y en dos sitios del Río Cholguán. Mediante seis marcadores microsatélites polimórficos y sobre un rango de tamaño de muestreo comprendido entre 18 individuos pertenecientes a la localidad T12 y 59 de la localidad T8. El número promedio de alelos por locus fue de 6.16, con un rango alélico compendido entre 5 y 21 alelos (Tabla 8).

Para ambas especies la presencia de alelos nulos fue revisada utilizando MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*, 2004). La desviación al equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) para cada combinación de locus-muestra y la determinación del desequilibrio gamético entre cada par de loci fueron probados por un test de probabilidad exacta disponible en GENEPOP (Rousset, 2008). La significancia de los valores fueron ajustados mediante corrección Bonferroni (Rice, 1989). Los niveles de diversidad genética poblacional fueron medidos por medio de la determinación del número de alelos (NA), el número promedio de alelos por locus (NMA) y la riqueza alélica ajustada por las diferencias en el tamaño de la muestra (RA), y que en conjunto con el coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) fueron calculados a través del programa FSTAT 2.9.3.2 (Goudet, 2001). Además, fueron calculados el contenido de loci polimórfico al 95% y 99% (P), la heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y esperada ( $H_e$ ) por medio del programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 1996-2004). El número de alelos únicos o alelos privados, referidos al número de alelos que esta representado de manera exclusiva en una población fue calculado mediante un método de rarefacción cuya comparación se realizó con una muestra de 17 y 18

individuos de *C. dombeyana* y *A. chilensis*, respectivamente utilizando el programa HP-Rare (Kalinowski, 2005).

Dada la poca habilidad que poseen las especies seleccionadas de desplazarse río arriba, es probable que pueda existir una pérdida gradual de la diversidad genética a lo largo de estos ejes. Es decir, si existe un sesgo en el flujo génico en dirección río abajo, debería esperarse que la diversidad genética disminuya río arriba. Para evaluar aquello fueron consideradas las distancias entre los puntos de la desembocadura tanto de los ríos Chillán como Cholguán y las diversas localidades muestreadas. En búsqueda de correlaciones significativas con las diversas medidas de diversidad genética (número promedio de alelos por locus (MNA), alelos privados, riqueza alélica (RA), heterocigocidad observada ( $H_o$ ) y heterocigocidad esperada ( $H_e$ ), obtenidas para el total de los loci. La organización de la diversidad genética fue analizada mediante regresiones lineales en el programa R R.2.13.0 (R Development Core Team 2011).

### **12.3. Análisis de Estructuración Poblacional: Ordenación espacial y flujo génico**

La diferenciación genética como medida de estructuración poblacional fue cuantificada por medio del estadístico  $F_{ST}$  que incluye una estimación total y comparación por pares de valores de  $F_{ST}$  entre las muestras (Weir & Cockerham, 1984) usando el programa ARLEQUIN v.5 (Excoffier *et al.*, 2005). El tipo de relación genética entre todos los individuos genotipados fue estimado mediante un análisis de correspondencia factorial (FCA; Leroy, 2008) utilizando el programa GENETIX. FCA corresponde a un factor de análisis el cual detecta la mejor combinación lineal de variables (frecuencias alélicas en diferentes loci) y describe la variación entre observaciones a nivel de individuos o poblaciones. Se aplicaron varias aproximaciones para probar diferencias genéticas entre poblaciones. La distancia de alelos compartidos (ASD; Chakraborty & Jin, 1993) se utilizó para realizar análisis de agrupamiento determinando la proporción de alelos compartidos entre los individuos. Esta medida ha demostrado ser útil para detectar fina estructuración espacial aún con tamaños de muestras pequeños (Gao & Starmer, 2007), y fue calculada con el programa POPULATIONS 1.2.03 (Langella, 2002). Los árboles fueron visualizados con MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011). Un análisis jerárquico de la varianza molecular (AMOVA) fue aplicado usando el software ARLEQUIN v.5 (Excoffier *et al.*, 2005). Este método fue utilizado también para probar el efecto de la hidrografía sobre la diferenciación poblacional de cada especie. La distribución de las agrupaciones hidrográficas y de Structure utilizadas para los análisis de AMOVA se presentan en la Tabla 6.

Para investigar la distribución y el número posible de grupos poblacionales a lo largo del sistema hidrográfico, fue utilizado en ambas especies el algoritmo bayesiano implementado en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000; Evanno *et al.* 2005). Este programa utiliza diversos modelos implícitos en su metodología para asignar individuos a las diversas agrupaciones en base a sus genotipos sin considerar la información geográfica, y permite detectar discontinuidades genéticas y potencial variación clinal. Para ello, se utilizó el modelo “admixture” con las frecuencias alélicas correlacionadas (lo cual asume que las frecuencias alélicas en las diferentes poblaciones son probablemente similares debido a la migración o ancestría compartida). El período de Burn-in y MCMC (cadena Markov Monte Carlo) fue de 10.000 cada uno (Evanno *et al.* 2005). El programa fue corrido con 20 réplicas en orden a cuantificar la cantidad de variación de la probabilidad para cada K (número probable de poblaciones, con valores simulados de K entre 1 y 14). El valor promedio del log likelihood [L (K)] de la data fue calculado y el valor más probable de k fue identificado utilizando el valor máximo de L (K) arrojado por STRUCTURE y corroborado mediante el cálculo de Delta K ( $\Delta K = [L''(K)]/Stdev$  (Evanno *et al.*, 2005).

Para evaluar la estructura genética entre poblaciones también fue utilizado el método multivariado “Population Graphs” (Dyer & Nason, 2004). Este método no considera un modelo previo de ordenamiento poblacional para examinar la distribución de la estructura genética intraespecífica, sino que considera la forma de una topología gráfica. En ella se describe la estructura de un complejo de poblaciones (nodos) basados en la distribución de la covarianza genética entre todas las poblaciones estudiadas a partir de datos de marcadores moleculares, lo que determina la topología del graph. A diferencia de otras aproximaciones no cuantifica en términos pareados o con aproximaciones coalescentes, sino que relaciona en base a la covarianza genética entre las conexiones establecidas entre todas las poblaciones de una forma simultánea y que pueden ser fácilmente visualizadas en una topología que resulta de interacciones históricas y contemporáneas entre las poblaciones (Dyer & Nason, 2004). Los individuos de cada población definen un centroide poblacional multidimensional y cada centroide define una única coordenada multidimensional que representa un valor individual promedio al interior de cada población. El tamaño de los nodos es proporcional a la diversidad genética dentro de las muestras y las conexiones entre nodos son correspondientes a la covarianza genética que representa la conectividad entre nodos (localidades). Un graph poblacional permite probar desde una hipótesis nula de no estructuración genética hasta análisis que determinan cómo la variación genética es distribuida entre las poblaciones a través del territorio (Dyer & Nason 2004; Dyer, 2007). El graph fue construido utilizando Genetic Studio (Dyer, 2009) implementado en el programa R. Para cuantificar la

diferenciación entre las poblaciones muestreadas se utilizó la distancia genética condicional (cGD, Dyer *et al.*, 2010) y la topología de red resultante fue utilizada para evaluar congruencia en las regiones identificadas por STRUCTURE y para inferir conexiones de flujo génico en las poblaciones, probablemente ancestral y que es posible de detectar en la actualidad.

La aproximación bayesiana implementada en el programa BAYESASS 3 (Wilson & Rannala 2003) fue utilizada en ambas especies para obtener estimaciones contemporáneas de la tasa de migración (M), comprendida como el número de migrantes que son intercambiados entre las localidades mediante MCMC. El programa no asume que las poblaciones deban estar en equilibrio migración-deriva y/o equilibrio Hardy-Weinberg. Fueron utilizadas un total de  $3 \times 10^6$  iteraciones,  $10^6$  iteraciones fueron descartadas y cada 1000 iteraciones se registró la data. La estimación contemporánea del número de migrantes fue obtenida en base a una tasa de mutación esperable para microsatélites de  $\mu = 5 \times 10^{-4}$  (Amos *et al.*, 1996; Goldstein & Schlotterer, 1999; Hardy *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011) con la finalidad de hacer comparables los resultados con las estimaciones históricas de flujo génico obtenidas mediante análisis basados en un método de inferencia bayesiana implementado en el programa Lamarc 2.1 (Kuhner, 2006), detalles de las condiciones del método se muestran en la sección 12.5 para las estimaciones de tamaño efectivo ( $N_e$ ). Los resultados históricos fueron representados en un diagrama de red para la totalidad de las poblaciones analizadas y las estimaciones contemporáneas fueron representadas en un árbol de *neighbour-joining* basado en la distancia de Nei Da (Nei *et al.*, 1983), que muestra los tipos de relaciones genéticas entre las muestras a partir de las frecuencias alélicas de microsatélites y que ha demostrado ser útil para reconstruir filogenias (Takesaki & Nei, 1996), el cual fue calculado en el programa POPULATIONS 1.2.03 (Langella, 2002) y visualizados con MEGA version 5.0 (Tamura *et al.*, 2011).

#### ***12.4. Efecto de la hidrografía (topografía) y la distancia geográfica sobre la diferenciación poblacional***

Para evaluar si a nivel de poblaciones la diferenciación genética podría ser explicada por la distancia geográfica (aislamiento por distancia, IBD) se aplicó un test de Mantel en conformidad a las indicaciones señaladas en el capítulo I. Sin embargo, además de la medida de diferenciación genética de Slatkin  $F_{ST}$  ( $F_{ST} = 1 / (1 - F_{ST})$ ) (Slatkin 1995) fue utilizada una matriz pareada de distancia genética condicional (cGD, Dyer, 2010). Las distancias geográficas utilizadas en los análisis corresponden a una distancia lineal en el caso del insecto, *A. chilensis* debido a que no existen diferencias significativas en los resultados al utilizar la matriz de distancia hidrográfica en los análisis. Para *C. dombeyana* fue

utilizada una matriz hidrográfica y la correlación y significancia de ambos tipos de matrices, así como la gráfica IBD fue calculada con el programa IBDWS v. 3.23 (Jensen *et al.*, 2005). Además, un análisis de autocorrelación espacial fue utilizado en el programa R utilizando el paquete vegan (Oksanen *et al.*, 2011), para evaluar si el genotipo observado de un individuo en una localidad es dependiente del genotipo de un individuo en una localidad vecina. Los planteamientos del método pueden ser revisados en la sección materiales y métodos del capítulo I.

Por medio de análisis de regresiones múltiples implementadas en el software STREAMTREE (Kalinowski *et al.*, 2008) se analizaron las asociaciones entre los diversos segmentos de distancias entre ramas hidrográficas de la cuenca, los que han sido previamente definidos de acuerdo a una visión más contemporánea de ríos, y las diferencias genéticas que se establecen entre las poblaciones asignadas a tales segmentos. Las distancias son mapeadas y cuantificadas para cada segmento hidrográfico de la red que las conecta (Cook *et al.*, 2010). El ajuste del modelo fue evaluado utilizando un coeficiente de determinación ( $R^2$ ). Se utilizó un método gráfico de interpolación para generar un modelo tridimensional del paisaje genético utilizando el programa Alleles in Space (AIS) (Miller, 2005). El diseño de este método permite visualizar patrones de diversidad genética a través de la superficie en un espacio tridimensional (los ejes  $x$  e  $y$  representan latitud y longitud, en tanto que el eje  $z$  representa la distancia genética). Una red de conectividad entre todas las localizaciones geográficas es construida en base al método de triangulación de Delaunay. La estructuración genética a través del paisaje se infiere a partir de las medidas de distancias genéticas utilizando la interpolación del inverso de la distancia ponderada a través de una cuadrícula uniforme que abarca toda el área de muestreo. Luego, las distancias genéticas residuales entre observaciones o las alturas de la superficie son calculadas y ubicadas en el punto medio de cada conexión en la red. Se utilizó un tamaño de cuadrícula de 50x50 con un parámetro de distancia ponderada ( $a$ ) de 1. El procedimiento crea “*peaks*” en áreas donde la distancia genética entre individuos es alta y valles o depresiones cuando esta distancia es baja, proporcionando una perspectiva visual de la distribución espacial de la estructura genética sobre el paisaje (Miller *et al.* 2006).

### **12.5 Cuello de botella y Tamaño efectivo poblacional**

Para evaluar la existencia de cuellos de botella recientes se utilizaron los algoritmos implementados en el programa BOTTLENECK 1.2.03 (Cornuet & Luikart, 1996; Piry *et al.*, 1999). El programa BOTTLENECK permite evaluar si las poblaciones muestran un relativo exceso de heterocigocidad con respecto a lo esperado en equilibrio mutación-deriva. La teoría asume que aquellas poblaciones que han



sufrido recientemente un cuello de botella presentan un exceso de heterocigocidad en loci selectivamente neutrales en relación a la heterocigocidad esperada bajo equilibrio mutación-deriva, aquello en razón de la eliminación de alelos raros (Cornuet & Luikart, 1996). Los excesos en heterocigocidad se desarrollan durante unas pocas generaciones después que ha ocurrido un cuello de botella porque inicialmente la diversidad alélica declina más rápido que la heterocigocidad debido a la pérdida de estos alelos raros (Cornuet & Luikart, 1996). Debido a la complejidad de los patrones de mutación de los microsatélites estos análisis fueron realizados comparando los modelos de mutación paso a paso (SMM) y el modelo mixto (TPM). Las desviaciones entre las distribuciones de frecuencia de heterocigocidad observada y esperada, bajo un modelo de mutación-deriva, fueron probadas usando el test de Wilcoxon en base a 10.000 iteraciones.

Las estimaciones de los tamaños efectivos poblacionales ( $N_e$ ) fueron calculadas empleando una metodología de inferencia bayesiana basada en la teoría de coalescencia que se encuentra implementada en el programa Lamarc 2.1 (Kuhner, 2006) y en base a un método de desequilibrio de ligamiento (LD) utilizando el programa Ne estimator (LDNE) (Waples & Do, 2008). Este último realiza inferencias en base a un método de correlación de alelos entre loci utilizando un intervalo de confianza del 95% mediante el método jackknife utilizando la fórmula de corrección de sesgo de Waples (2006). El programa Lamarc trabaja en base a una integración espacial de las posibles genealogías mediante cadenas de Markov-Monte Carlo (MCMC), y permite estimar el parámetro theta ( $\theta$ ) de acuerdo a la siguiente ecuación,  $\theta = 4N_e\mu$ , donde  $N_e$  es el tamaño efectivo de la población y  $\mu$  es la tasa de mutación neutral por sitio y por generación. Las estimaciones de theta fueron calculadas considerando un modelo mixto (TPM; Di Rienzo *et al.*, 1994) que incluye un 70 % de mutaciones SMM y 30% de IAM, que entrega estimaciones con un menor intervalo de confianza y específicas para cada población. El valor de la tasa de mutación utilizada fue de  $\mu=5 \times 10^{-4}$  lo cual es esperable para marcadores microsatélites (Amos *et al.*, 1996; Goldstein & Schlotterer, 1999; Hardy *et al.*, 2003; Wang *et al.*, 2011). Lamarc asume que los individuos pertenecen a subpoblaciones panmícticas, que la estructura de las subpoblaciones ha sido constante a través del tiempo en el árbol de coalescencia y que la variación observada es neutral (Kuhner, 2006).

Para evaluar si existen diferencias respecto de los tamaños efectivos ( $N_e$ ) o eventos de cuello de botella que han afectado las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis*, que habitan sitios con diferentes calidades de agua, se organizó la data en valores de presencia o ausencia de eventos de cuello de botella y se consideraron sitios de baja calidad ( $<5.5$  ChSignal) o de mayor calidad ( $>5.5$  ChSignal) en



función de los valores de calidad de agua del indicador biótico Signal (Figueroa *et al.*, 2007). Además, se calculó para cada sitio de muestreo en común a ambas especies la diferencia existente entre los tamaños efectivos ( $N_e$ ) históricos y contemporáneos. Las comparaciones fueron realizadas mediante una prueba U de Mann-Whitney de dos colas y mediante un método de proporciones donde fue calculado en primera instancia la proporción de  $N_e$  de la especie más sensible respecto de la especie más tolerante, y comparados en una prueba de chi cuadrado respecto del valor esperado de la proporción que sería igual a 1.

## ***12.6 Análisis de Partición de la varianza: contribución de las variables ambientales y espaciales sobre la diferenciación poblacional de *C. dombeyana* y *A. chilensis****

### ***12.6. i. Descriptores de la calidad del agua***

Todos los parámetros que permiten evaluar la calidad del agua fueron tomados en terreno y analizados según corresponda, en laboratorios especializados del centro EULA como parte de las actividades del proyecto Fondecyt N° 1090404. Los parámetros físicos y las muestras de agua para análisis químicos fueron tomados una vez durante el muestreo en terreno en el período de verano de 2009 y colectados de acuerdo a métodos estándares (APHA-AWWA-WPCF, 1995). La temperatura, pH, y conductividad del agua fueron medidos por medio de un termómetro con una precisión de 0,1°C, un pH-metro portátil calibrado "Schoot Geräte", un medidor de conductividad digital "Cole Palmer", respectivamente. Basado en Debels *et al.* (2005) se midió la demanda biológica de oxígeno ( $BOD_5$ ), la demanda química de oxígeno (COD), amoníaco, nitritos, nitratos, ortofosfatos, turbidez, fósforo orgánico, nitrógeno orgánico, sólidos disueltos totales, sólidos disueltos inorgánicos, sólidos disueltos orgánicos, sólidos suspendidos totales, coliformes totales y coliformes fecales.

En cada localidad fueron registradas las coordenadas geográficas (longitud, latitud) mediante el empleo de un sistema de posicionamiento global (GPS). La descripción de hábitat para cada uno de los sitios muestreados fue determinada por medio del índice de hábitat fluvial (IHF) y el índice de bosque de rivera (QBR), ambos desarrollados para describir características ecológicas y físicas de ríos mediterráneos (Pardo *et al.*, 2002; Suárez *et al.*, 2002) y como herramienta para la gestión de los recursos hídricos (Palma *et al.*, 2009). Por medio del índice QBR son obtenidos distintos componentes y atributos de las riberas: cubierta vegetal, estructura de la vegetación, naturalidad/complejidad del bosque ribereño y grado de alteración del canal fluvial. De igual manera el índice IHF relaciona de manera independiente la presencia de distintos componentes en el cauce fluvial, entre ellos aspectos

físicos del cauce relacionados con la heterogeneidad de hábitats y que dependen de la hidrología y del sustrato existente. Este índice consta de siete bloques que permiten evaluar: el grado de inclusión en rápidos y sedimentación en pozas, la frecuencia de rápidos, la composición del sustrato, los regímenes de velocidad y profundidad, el porcentaje de sombra en el cauce, elementos de heterogeneidad (como hojas, troncos, raíces expuestas) y la cobertura de vegetación acuática. También fueron tomados datos de velocidad de corriente (max., min., promedio), diámetro de bolones (máx., min., medio) y ancho del río.

Sin embargo, también fueron utilizados índices bióticos para definir la calidad del agua. Los macroinvertebrados bentónicos son los grupos más utilizados como indicadores biológicos para evaluar la calidad ecológica de los sistemas fluviales (Bonada *et al.* 2006). En Chile, una adaptación al método original de familias (IBF) conocido como índice biótico SIGNAL (*Stream Invertebrates Grade Number-Average Level*) ha sido exitosamente aplicado a la cuenca del río Chillán demostrando su eficacia para detectar cambios temporales y de la estructura comunitaria (Figueroa *et al.*, 2007). Este método fue utilizado de forma complementaria a la caracterización física y química de los ríos, para determinar el grado de perturbación que presenta la cuenca. Como resultado se obtiene un puntaje final que luego es asociado a cinco clases o categorías de calidad ambiental.

### **12.6. ii Particionamiento de la varianza**

El rol que ejercen los factores espaciales y/o las condiciones ambientales (calidad del agua) sobre los patrones de diferenciación poblacional en *C. dombeyana* y *A. chilensis* fue investigado mediante una técnica de particionamiento de la varianza, conocida como análisis de redundancia basado en distancias (dbRDA), que permite discriminar entre el set de variables aquellas que de forma aislada o en conjunto contribuyen significativamente a la divergencia genética de las poblaciones. Todos los análisis fueron desarrollado en el programa R.2.13.0 (R Development Core Team 2011).

La matriz de distancia genética (cGD) fue transformada mediante un principio de análisis de coordenadas (PCoA) a una matriz de coordenadas de la cual se obtienen los eigenvalues posteriormente utilizados en un análisis de redundancia (RDA). Las matrices cGD para ambas especies se encuentran disponibles en la sección anexos (Anexos A, Tabla VII, VIII). Para evaluar la contribución de las variables espaciales se utilizó tres aproximaciones diferentes: la primera conocida como “*Moran eigenvector’ s map*” (MEM), que permite modelar procesos no direccionales; la segunda denominada “*asymmetric eigenvector maps*” (AEM; Dry *et al.*, 2006) es una aproximación explícitamente diseñada para modelar procesos con una importante direccionalidad (ej. Flujo de ríos); la tercera consiste en una

transformación de las matrices hidrográficas (*C. dombeyana*, *A. chilensis*) y lineales (*A. chilensis*) en una matriz rectangular. Para MEM y AEM, fue utilizado un esquema de conexión que sigue la estructura dendrítica de la red hidrográfica y que permite obtener las variables a partir de una descomposición espectral de la relación espacial entre sitios. Para AEM, la dirección espacial se estableció de acuerdo al flujo del río, mediante la inclusión de conexiones a un sitio hipotético (Blanchet *et al.* 2008) y estableciendo pesos a la conexiones entre sitios de acuerdo a Bertin *et al.*, (2012). Los componentes espaciales de AEM fueron construidos utilizando el paquete “AEM” y para MEM se utilizó el paquete “spacemaker” instalado en el programa R. Sólo aquella estrategia que explique la mayor porción de la variación ( $>_{adj}R^2$ ) en la variabilidad genética entre las poblaciones es incluida en los análisis de partición de varianza.

Posteriormente, para la totalidad de variables que incluyen las variables espaciales previamente descritas, más las variables físico-químicas, de hábitat y datos de presencia/ausencia de predadores, se realizó un procedimiento de selección *forward*, que se encuentra disponible en el paquete “packfor” instalado en el programa R. Así, fueron individualizadas al interior de cada set de parámetros sólo aquellas variables significativas, las que posteriormente fueron incorporadas a un análisis de partición de varianza. Este método utiliza un análisis RDA para particionar la cantidad de la variación total que es explicada de manera individual y conjunta por cada uno de los subset de variables retenidos después de la selección *forward*, utilizando el paquete “vegan” instalado en el programa R. Los resultados son visualizados mediante un diagrama Venn que muestra la significancia de sus componentes, a excepción de las fracciones compartidas las que no pueden ser evaluadas.

Tabla 6. Particiones utilizadas para realizar comparaciones en el análisis jerárquico de AMOVA.

Sistemas Hidrográficos	Agrupación (Structure)	
	<i>C. dombeyana</i>	<i>A. chilensis</i>
Río Chillán (E:1-2-3-4-5-6)	Grupo I (E: 2-3-4-6; T7)	Grupo I (E: 1-2-3-4-5-6; T7) (Chol:1-5)
Pichilluanco (T:2-6-13)	Grupo II (T: 2-6-8-9-11-12-13)	Grupo II (T6)
Lluanco (T:8-9-11-12)	Grupo III (Chol1-Chol5)	Grupo III (T: 8-9-12)
El Gato T7 Cholguán (chol:1-5)		

## 13.0 RESULTADOS

### 13.1 Diversidad genética intrapoblacional

#### 13.1. i Variabilidad genética del gastrópodo *Chilina dombeyana*

Las frecuencias genotípicas de cada locus se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg. A nivel poblacional sólo T9 muestra evidencia significativa de desviación al equilibrio Hardy-Weinberg y un bajo aunque significativo porcentaje de endogamia ( $F_{IS} = 0.067$ ;  $P < 0.01$ ) (Tabla 9). Sin embargo, al interior de esta población sólo el marcador cm48 mostró evidencia significativa de desequilibrio Hardy-Weinberg, después de las correcciones Bonferroni. No existe evidencia de un patrón sistemático de desequilibrio gamético y sólo 13 de 770 comparaciones de pares de loci mostraron evidencias significativas después de las correcciones Bonferroni. De acuerdo a los análisis realizados con MicroChecker no existiría evidencia de errores de genotipación y tampoco problemas generalizados debido a la presencia de alelos nulos. Sólo cuatro casos puntuales para tres diferentes loci mostraron evidencia de algún grado de frecuencia de alelos nulos en las localidades E3, E4 y T12. Sin embargo, aquello no significa un problema para el desarrollo del estudio debido a la baja frecuencia observada ( $< 0.18$ ).

A nivel poblacional *C. dombeyana* presenta un relativamente elevado nivel de diversidad genética (Tabla 9). La proporción de loci polimórficos (P) al 95% y 99% es muy elevado ( $> 0.81$ ) a excepción de T2 donde el nivel de polimorfismo es intermedio ( $P_{(0.95)} = 0.36$ ;  $P_{(0.99)} = 0.54$ ). La mayor riqueza alélica se encuentra registrada en la localidad E4, en tanto que el menor valor corresponde a T2 (Tabla 9). Los niveles de heterocigocidad fueron relativamente altos, la heterocigocidad esperada varió entre 0.104 para la localidad T2 y 0.640 en E4, con un promedio de  $0.475 \pm 0.133$ . Para la heterocigocidad observada la variación fue entre 0.112 para T2 y 0.644 en E6, con una media de  $0.485 \pm 0.132$  (Tabla 9). Un 65% de las localidades muestreadas presentaron una baja frecuencia de alelos privados (0 - 0.14) y el 35% restante que corresponde a las localidades E4, T7, T9, Chol1 y Chol 5 registran valores moderadamente superiores (0.20-0.49). Los niveles de variabilidad genética detallados por locus y población se encuentran disponibles en la sección anexos (Anexo A, Tabla VI).

Tabla 7. Características de los loci microsatellites aislados en el gastrópodo de agua dulce *Chilina dombeyana*.

Locus	Secuencia Partidor (5'-3')	Rango de tamaño (bp)	Motivo de Repetición	Ta(°C)	A
cm52	F: GACTTTAATGATTTCAGAACA R: 6Fam-TGACCCATCTGTGCCTATCA	146-156	[AG]11	55	5
cm53	F: Hex-CACTGTTGGCATATCAGTGGA R: TGCAGGGTAGAAAATTAGACT	184-228	[AG]14	55	36
cm48	F: Ned-AGATAAACGGGGCTGCAATA R: CAGGCAATACCTCCCACACT	192-195	[AC]6	57	3
cm44	F: 6Fam-CGTCAAGTGTTCGTTGAGC R: GCGGCTGACTGTAACAAAGG	200-217	[AC]10	55	6
cm49	F: GATCCGCAATGATGATGTTG R: Hex-ACTGGTGTCTGGTGGGTAG	251-295	[GA]13	55	25
cm50	F: 6Fam-GACGAAGATAGACATCAGCAC R: 5'-CTCTTTACCTGCCTGCGTTT	115-130	[GA]9	55	4
cm42	F: GCGGTAATCAAAGACGCACT R: 6Fam-TTGTCATCACACCTCGATTCA	199-233	[GA]11	55	17
cm41	F: Hex-GCGGACTTTCTCTCAGTCTCC R: GTACTGACTTCAAGCACG	210-234	[GA]12	55	10
cm25*	HEX	120-140	(GT) <sub>11</sub> (TGTA) <sub>8</sub> (GT) <sub>7</sub>	55	9
cm30*	FAM	166-179	(GT) <sub>6</sub> ..(GT) <sub>4</sub> (GGGT) <sub>2</sub> (GT) <sub>2</sub> ..(GT) <sub>9</sub>	55	9
cm27*	NED	125-149	(GT) <sub>7</sub> ... (GT) <sub>9</sub>	57	11

Ta = temperatura de annealing, A = número de alelos, \* datos no publicados (información disponible a nicogouin@gmail.com)

Tabla 8. Características de los loci microsatellites aislados en el insecto, *Aquarius chilensis*.

Locus	Marcador Fluorescente	Rango de tamaño (bp)	Motivo de Repetición	Ta(°C)	A
Hem10*	FAM	112-125	[AG]9	55	8
Hem1*	NED	168-194	[GA]12	57	21
Hem9*	FAM	143-171	[GA]19	55	18
Hem6*	NED	198-227	[AG]16	57	19
Hem8*	HEX	146-153	(GA)3TTT(GA) <sub>7</sub>	55	5
Hem11*	NED	129-144	[GA]11	57	6

\* datos no publicados (información disponible a nicogouin@gmail.com)

Tabla 9. Variabilidad genética de las poblaciones de *C. dombeyana* para las 14 localidades consideradas en el estudio. Tamaño de la muestra (N), Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho) por sitio en el total de loci, nivel de polimorfismo al 95% ( $P_{(0,95)}$ ) y 99% ( $P_{(0,99)}$ ), número promedio de alelos por locus (MNA), riqueza alélica, alelos privados y coeficiente de consanguineidad (Fis).  $\#P$  = prueba exacta de probabilidad (P) para la desviación al equilibrio Hardy–Weinberg.

Site	N	He $\pm$ S.E.	Ho $\pm$ S.E.	P <sub>(0,95)</sub>	P <sub>(0,99)</sub>	M.N.A.	Riqueza Alélica	Alelos Privados	Fis	#P
E2	34	0,4848 $\pm$ 0,1981	0,5214 $\pm$ 0,2040	0,909	1	3,5455	3,13	0,06	-0.060	0,248
E3	38	0,5398 $\pm$ 0,1934	0,5227 $\pm$ 0,2140	1	1	4,2727	3,73	0,12	0.045	0,146
E4	42	0,6408 $\pm$ 0,1687	0,6239 $\pm$ 0,1879	1	1	6,3636	5,45	0,26	0.039	0,050
E6	37	0,6285 $\pm$ 0,1959	0,6441 $\pm$ 0,2042	1	1	5,000	4,61	0,02	-0.009	0,488
T2	17	0,1040 $\pm$ 0,1452	0,1123 $\pm$ 0,1544	0,364	0,546	1,5455	1,55	0,00	-0.050	1,000
T6	31	0,5265 $\pm$ 0,1828	0,5351 $\pm$ 0,1938	1	1	5,0909	4,62	0,14	0.002	0,646
T7	38	0,5573 $\pm$ 0,2372	0,5957 $\pm$ 0,2589	1	1	5,4545	4,79	0,47	-0.054	0,809
T8	36	0,5015 $\pm$ 0,2480	0,5121 $\pm$ 0,2588	0,909	1	4,7273	4,21	0,09	-0.004	0,880
T9	49	0,5412 $\pm$ 0,2208	0,5106 $\pm$ 0,2454	1	1	5,4545	4,58	0,21	0.067*	<b>0,007</b>
T11	40	0,4308 $\pm$ 0,1902	0,4651 $\pm$ 0,2132	0,909	1	3,7273	3,14	0,09	-0.067	0,701
T12	32	0,3961 $\pm$ 0,1683	0,3728 $\pm$ 0,1428	1	1	3,2727	3,08	0,03	0.076	0,136
T13	20	0,3551 $\pm$ 0,3076	0,3758 $\pm$ 0,3259	0,818	0,818	3,2727	3,18	0,14	-0.033	0,993
Chol1	46	0,4658 $\pm$ 0,2491	0,4975 $\pm$ 0,2697	0,818	0,909	5,9091	4,42	0,49	-0.057	0,846
Chol5	41	0,4735 $\pm$ 0,2493	0,5140 $\pm$ 0,2680	0,818	1	5,2727	4,38	0,27	-0.073	0,952

Cifra en negrita representa valor significativo después de corrección Bonferroni. \* =  $P < 0.01$

### 13.1. ii Variabilidad genética del insecto *A. chilensis*

Las poblaciones de *A. chilensis* presentan un elevado nivel de variabilidad genética para sus poblaciones (Tabla 10). Las frecuencias genotípicas de cada locus y para el total de localidades analizadas se encuentran en equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla 10). No existe evidencia de un patrón sistemático de desequilibrio gamético, todas corresponden a diferentes pares de loci y poblaciones, y sólo 3 de 195 comparaciones de pares de loci mostraron evidencias significativas después de las correcciones Bonferroni. De acuerdo a los análisis realizados con MicroChecker no existiría evidencia de errores de genotipación y tampoco problemas generalizados debido a la presencia de alelos nulos. Existen cinco casos aislados sin un patrón definido con una baja frecuencia observada ( $\leq 0.13$ ). La proporción de loci polimórficos (P) al 95% y 99% es muy elevada considerando tanto  $P_{(0,95)}$  ( $> 0.66$ ) como  $P_{(0,99)}$  ( $> 0.83$ ). La mayor riqueza alélica se encuentra registrada en la localidad E6, en tanto que el menor valor corresponde a T12 (Tabla 10). Los niveles de heterocigocidad fueron relativamente altos, la heterocigocidad esperada varió entre 0.661 para la localidad E4 y 0.404 en T12, con un promedio de  $0.596 \pm 0.084$ . Para la heterocigocidad observada la variación fue entre 0.388 para T6 y 0.703 en E2, con una media de  $0.600 \pm 0.088$  (Tabla 10). Un 69% de las localidades muestreadas presentan una baja



frecuencia de alelos privados (0 - 0.16) y el 31% restante que corresponde a las localidades E1, E5, T6 y Chol5 registran valores moderadamente superiores (0.22-0.44). Los niveles de variabilidad genética detallados por locus y población se encuentran disponibles en la sección anexos (Anexo A, Tabla VI).

Tabla 10. Variabilidad genética de las poblaciones de *A. chilensis*, para las 13 localidades consideradas en el estudio. Tamaño de la muestra (N), Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho) por sitio en el total de loci, nivel de polimorfismo al 95% ( $P_{0,95}$ ) y 99% ( $P_{0,99}$ ), número promedio de alelos por locus (MNA), riqueza alélica, alelos privados y coeficiente de consanguinidad (Fis).  $\#P$  = prueba exacta de probabilidad (P) para la desviación al equilibrio Hardy–Weinberg.

Site	N	He $\pm$ S.E.	Ho $\pm$ S.E.	P <sub>(0,95)</sub>	P <sub>(0,99)</sub>	M.N.A.	Riqueza Alélica	Alelos Privados	Fis	P
E1	45	0,5539 $\pm$ 0,3455	0,5649 $\pm$ 0,3464	1	1	7,3333	5,6	0,26	-0.008	0,242
E2	40	0,6579 $\pm$ 0,2039	0,7038 $\pm$ 0,1970	1	1	6,5000	5,43	0,15	-0.055	0,513
E3	44	0,5784 $\pm$ 0,2795	0,5826 $\pm$ 0,2971	0,833	1	6,3333	5,01	0,16	0.005	0,698
E4	32	0,6617 $\pm$ 0,2085	0,6536 $\pm$ 0,1824	1	1	6,0000	5,36	0,05	0.029	0,970
E5	48	0,6492 $\pm$ 0,2328	0,6392 $\pm$ 0,2052	1	1	8,0000	6,06	0,28	0.027	0,282
E6	37	0,6585 $\pm$ 0,2186	0,6545 $\pm$ 0,1849	1	1	7,1667	6,16	0,06	0.022	0,276
T6	49	0,4386 $\pm$ 0,2552	0,3883 $\pm$ 0,2151	1	1	4,6667	3,64	0,22	0.125	0,596
T7	32	0,6143 $\pm$ 0,2247	0,6553 $\pm$ 0,2470	1	1	5,5000	4,82	0,07	-0.050	0,786
T8	59	0,6536 $\pm$ 0,1001	0,6138 $\pm$ 0,0844	1	1	6,1667	4,52	0,12	0.070	0,215
T9	41	0,6105 $\pm$ 0,1363	0,6357 $\pm$ 0,1558	1	1	5,3333	4,51	0,06	-0.027	0,195
T12	18	0,4046 $\pm$ 0,2987	0,4496 $\pm$ 0,3285	0,666	0,833	2,5000	2,48	0,00	-0.080	0,893
Chol1	46	0,6196 $\pm$ 0,2061	0,6434 $\pm$ 0,2067	1	1	7,6667	5,54	0,14	-0.027	0,672
Chol5	34	0,6480 $\pm$ 0,1872	0,6183 $\pm$ 0,1868	1	1	7,0000	5,8	0,44	0.061	0,380

### 13.2 Estructuración Poblacional en *C. dombeyana* y *A. chilensis*

Los análisis jerárquicos de la varianza molecular (AMOVA) realizados en Arlequin, muestran en ambas especies una significativa diferenciación genética en el total de la data poblacional. AMOVA se utilizó también para estimar diferenciaciones poblacionales entre agrupaciones hidrográficas. Sin embargo, el mayor porcentaje de la varianza es explicada al interior de las poblaciones con un 78.63% en el caso de *A. chilensis* ( $F_{ST} = 0.213$ ,  $P < 0.001$ ) y 68.15% en el caso de *C. dombeyana* ( $F_{ST} = 0,318$   $P < 0.001$ ) (Tabla 11). Sólo el 10.83% en *A. chilensis* y el 26.22 % en *C. dombeyana* del total de la variación de las frecuencias alélicas fueron explicadas entre particiones hidrográficas, y el 10.55% en *A. chilensis* y el 5.63% en *C. dombeyana* de la variación fue explicada entre las poblaciones al interior



de los grupos (particiones hidrográficas). Un nuevo análisis de AMOVA que incluye las agrupaciones identificadas por el programa STRUCTURE y otros análisis de diferenciación poblacional, muestran que en *C. dombeyana* no existen diferencias significativas respecto de los resultados previamente descritos. Corroborando el fuerte componente hidrográfico que influencia los patrones de estructuración poblacional en esta especie (Tabla 11). Sin embargo, en *A. chilensis* se aprecian diferencias respecto del porcentaje de varianza que es explicado entre grupos, el cual se incrementa levemente ( $F_{CT} = 0.158$ ,  $P < 0.01$ ) y disminuye el porcentaje de variación explicado entre poblaciones al interior de los grupos ( $F_{ST} = 0.066$ ,  $P < 0.001$ ). En cuanto a las comparaciones pareadas de  $F_{st}$  por sitios los resultados muestran para *C. dombeyana* que la diferenciación genética entre localidades vecinas presentan generalmente los valores más bajos de  $F_{st}$  (0.002-0.098). Los valores de  $F_{st}$  más altos registrados corresponden a comparaciones entre sitios que presentan una lejanía geográfica o que corresponden a sitios del curso principal de agua versus las regiones tributarias o ambos sitios pertenecientes a la cuenca Cholguán ( $F_{st}$ : 0.103-0.651) (Tabla 12). En tanto que el patrón para *A. chilensis* señala que aproximadamente el 77% de las comparaciones entre sitios presentan evidencia de baja estructuración entre aquellos sitios pertenecientes al principal curso de agua y sitios tributarios ( $F_{st}$ : 0-0.083; Tabla 13) y respecto de los sitios más lejanos de la cuenca del río Cholguán ( $F_{st}$ : 0.008-0.103). Sin embargo, existen tres principales excepciones: primero el sitio E1 que presenta bajos valores de estructuración respecto de los sitios T12 y Cholguán ( $F_{st}$ : 0.065-0.103) pero registra valores más altos de  $F_{st}$  para la totalidad de sitios restantes tanto del principal curso de agua como de regiones tributarias ( $F_{st}$ : 0.148-0.280); segundo los sitios T8 y T12 con un grado de estructuración intermedia ( $F_{st}$ : 0.130-0.341) y finalmente el sitio T6 con el más alto grado de estructuración registrado ( $F_{st}$ : 0.362-0.533) (Tabla 13).

Tabla 11. Resultados de los análisis de AMOVA que muestra la cantidad de la varianza genética explicada por cada subdivisión en función de las agrupaciones hidrográficas y de Structure para las localidades muestreadas en *A. chilensis* y *C. dombeyana*.

<b><i>C. dombeyana</i></b>						
Fuente de variación †	Sistemas Hidrográficos			Agrupación Structure		
	Componente			Componente		
	varianza	Variación (%)	Festadístico	varianza	Variación (%)	Festadístico
Dentro de Poblaciones	1,362	68.15	$F_{ST}=0,318^{***}$	1,362	65,38	$F_{ST}=0,346^{***}$
Entre poblaciones						
dentro de grupos	0,112	5,63	$F_{SC}=0.076^{***}$	0,164	7,91	$F_{SC}=0.107^{***}$
Entre grupos	0,524	26.22	$F_{CT}=0,262^{***}$	0,556	26,7	$F_{CT}=0,267^{***}$
<b><i>A. chilensis</i></b>						
Dentro de Poblaciones	0,698	78,63	$F_{ST}=0,213^{***}$	1,826	79,181	$F_{ST}=0,208^{***}$
Entre poblaciones						
dentro de grupos	0,093	10,55	$F_{SC}=0,118^{***}$	0,129	5,63	$F_{SC}=0.066^{***}$
Entre grupos	0,096	10,83	$F_{CT}=0,108^*$	0,35	15,1882	$F_{CT}=0,158^{**}$

\*= $P < 0.05$ , \*\*= $P \leq 0.01$ , \*\*\*= $P \leq 0,001$ ; † ver tabla 6 que resume la totalidad de agrupaciones hidrográficas y de agrupación structure.

Tabla 12. Matriz de valores pareados de  $F_{ST}$  y sus probabilidades entre los 14 sitios de muestreo en *C. dombeyana*. Los valores de  $F_{ST}$  en negrita representan valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ) después de la corrección Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. E2		<b>0.261</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2. E3	0.002		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
3. E4	0.131	0.098		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
4. E6	0.120	0.085	0.020		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
5. T2	0.481	0.424	0.378	0.386		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
6. T6	0.255	0.222	0.146	0.108	0.249		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
7. T7	0.276	0.224	0.068	0.140	0.396	0.211		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
8. T8	0.261	0.225	0.131	0.127	0.270	0.060	0.128		<0.001	<0.010	<0.010	<0.001	<0.001	<0.001
9. T9	0.218	0.191	0.128	0.103	0.230	0.028	0.157	0.021		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
10. T11	0.309	0.266	0.182	0.148	0.261	0.052	0.189	0.023	0.050		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
11. T12	0.295	0.260	0.165	0.129	0.405	0.081	0.224	0.109	0.105	0.062		<0.001	<0.001	<0.001
12. T13	0.429	0.383	0.312	0.326	0.198	0.142	0.313	0.132	0.140	0.161	0.315		<0.001	<0.001
13. Chol1	0.492	0.436	0.348	0.356	0.650	0.475	0.400	0.468	0.438	0.455	0.415	0.619		<b>0.594</b>
14. Chol5	0.493	0.436	0.346	0.364	0.651	0.475	0.393	0.468	0.437	0.458	0.429	0.619	0.000	

Abajo de la diagonal: valores de  $F_{ST}$  pareados entre sitios de muestreo. Arriba de la diagonal: valores de probabilidad ( $P$ ) entre sitios. Los valores de  $F_{ST}$  significativos señalados:  $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ .

Tabla 13. Matriz de valores pareados de *Fst* y sus probabilidades entre los 13 sitios de muestreo en *A. chilensis*. Los valores de *Fst* en negrita representan valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ) después de la corrección Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. E1		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2. E2	0.148		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<b>0.153</b>	<0.001	<b>0.063</b>	<b>0.117</b>
3. E3	0.220	0.034		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
4. E4	0.247	0.033	0.043		<0.01	<b>0.225</b>	<0.001	<0.05	<0.001	<b>0.288</b>	<0.001	<0.01	<0.001
5. E5	0.275	0.033	0.036	0.016		<b>0.648</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
6. E6	0.280	0.034	0.033	0.005	0.000		<0.001	<0.001	<0.001	<b>0.387</b>	<0.001	<0.001	<0.001
7. T6	0.456	0.413	0.504	0.395	0.454	0.448		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
8. T7	0.256	0.039	0.050	0.013	0.044	0.043	0.470		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
9. T8	0.276	0.130	0.208	0.161	0.182	0.164	0.362	0.213		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
10. T9	0.203	0.004	0.040	0.005	0.013	0.000	0.386	0.050	0.108		<0.001	<0.01	<0.001
11. T12	0.065	0.223	0.266	0.303	0.331	0.341	0.533	0.334	0.308	0.262		<0.001	<0.001
12. Chol1	0.103	0.009	0.040	0.058	0.064	0.053	0.401	0.075	0.169	0.023	0.173		<b>0.279</b>
13. Chol5	0.083	0.008	0.077	0.078	0.083	0.080	0.379	0.087	0.143	0.035	0.180	0.001	

Abajo de la diagonal: valores de *Fst* pareados entre sitios de muestreo. Arriba de la diagonal: valores de probabilidad (*P*) entre sitios. Los valores de *Fst* significativos señalados:  $P < 0.001$ ;  $P < 0.01$ ;  $P < 0.05$ .

En *A. chilensis* la variación genética no fue significativamente correlacionada con las distancias hidrográficas en las comparaciones pareadas de todas las muestras al realizar la prueba Mantel, al utilizar tanto la medida de distancia genética linealizada ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ; ( $r = 0.192$ ;  $P = 0.851$ ) como la medida basada en la distancia genética condicional cGD ( $r = 0.094$ ,  $P = 0.662$ ) (Fig. 8). Tampoco existe evidencia de autocorrelación para las poblaciones de esta especie en ninguna clase de distancia y en ambas medidas de distancia utilizadas (Fig. 9). Por el contrario, en el caso de *C. dombeyana* existe evidencia de un patrón significativo de aislamiento por distancia para la medida de *Fst* linealizado ( $r = 0.809$ ,  $P = 0.001$ ) y cGD ( $r = 0.869$ ,  $P = 0.001$ ) (Fig 8), además de significativa autocorrelación positiva para distancias comprendidas en un rango de 2.66-19.88 km al utilizar *Fst* ( $rM = 0.493$ ,  $P < 0.001$ ) y cGD ( $rM = 0.398$ ,  $P < 0.001$ ) como matriz de distancia genética. Los resultados empleando la distancia genética condicional (cGD) muestran además una correlación positiva para distancias comprendidas en un rango de 19.88-37.10 km ( $rM = 0.2602$ ,  $P < 0.05$ ) (Fig. 9).

El análisis factorial de correspondencia (AFC) aplicado a las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis* en base a su similaridad genética muestra tres grupos altamente diferenciados en cada especie. En *C. dombeyana*, el análisis basado en las frecuencias alélicas de los individuos separó en el primer eje las poblaciones del curso principal del río Chillán de las poblaciones tributarias y respecto de las

poblaciones del río Cholguán (Fig. 10A). Las poblaciones de *A. chilensis* muestran una evidente separación del grupo T6 y diferencia las poblaciones tributarias T8 y T9 de todo el resto de las poblaciones muestreadas. Ninguno de los factores discrimina una separación del grupo de individuos de *A. chilensis* pertenecientes a las poblaciones del río Cholguán (Fig. 11A). Algo similar se observó en el árbol de distancia ASD entre individuos en ambas especies (Fig. 10B, 11B).



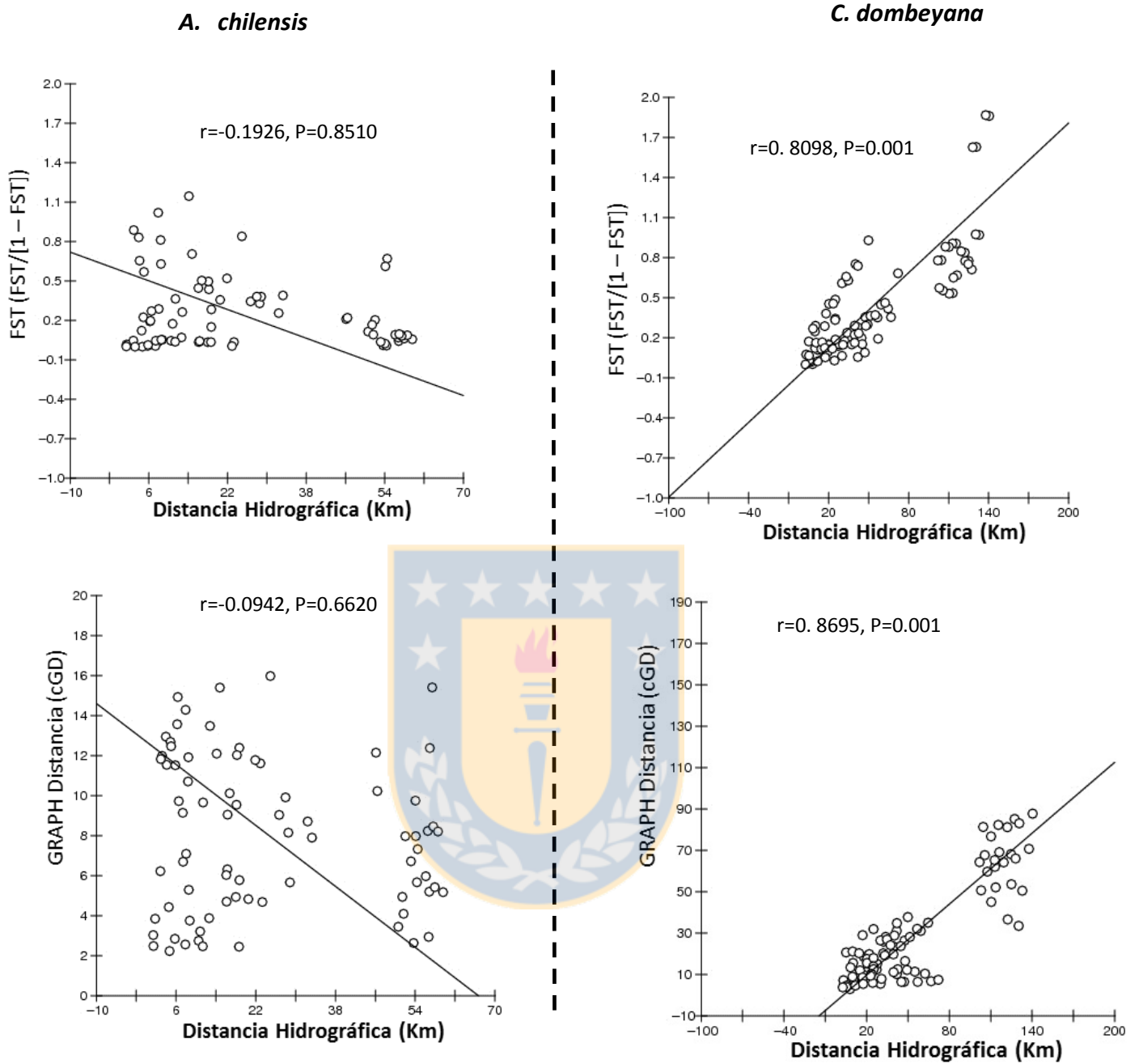


Figura 8. Análisis de aislamiento por distancia (IBD) mediante la prueba de Mantel para *A. chilensis* y *C. dombeyana*. Las gráficas muestran la relación entre los valores de  $F_{ST}$  linealizado ( $F_{ST}/(1-F_{ST})$ ), distancia cGD entre sitios y la distancia hidrográfica entre sitios de muestreo en kilómetros (Km).

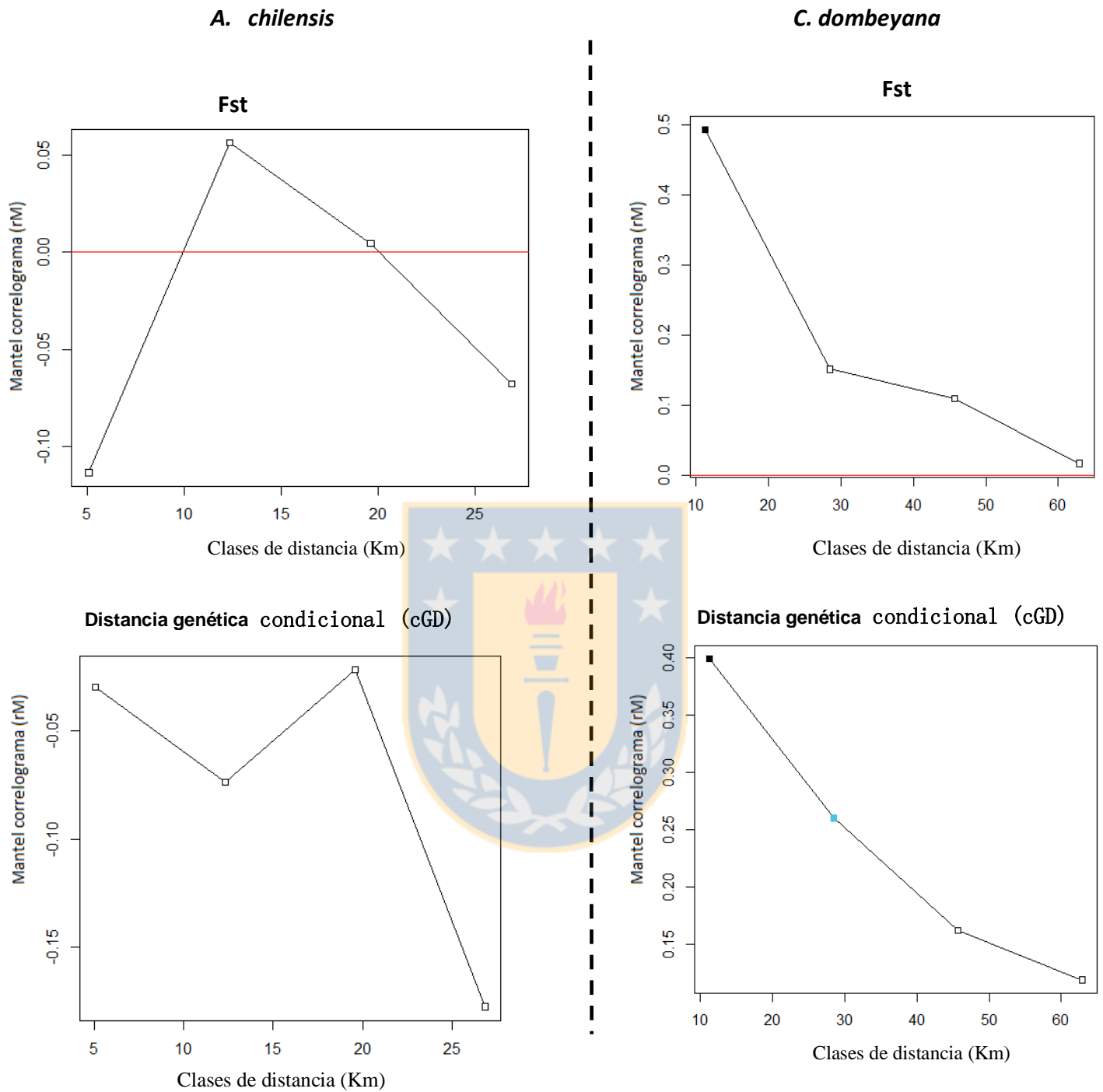


Figura 9. Mantel autocorrelograma ( $r$ =Estadístico Mantel Estandarizado) en base a las medidas de distancia genética (cGD) y  $F_{st}$  para las localidades estudiadas en *A. chilensis* (columna izquierda) y *Chilina dombeyana* (columna derecha). Código de color: Negro:  $P=0.001$ ; azul:  $P= 0.017$ .

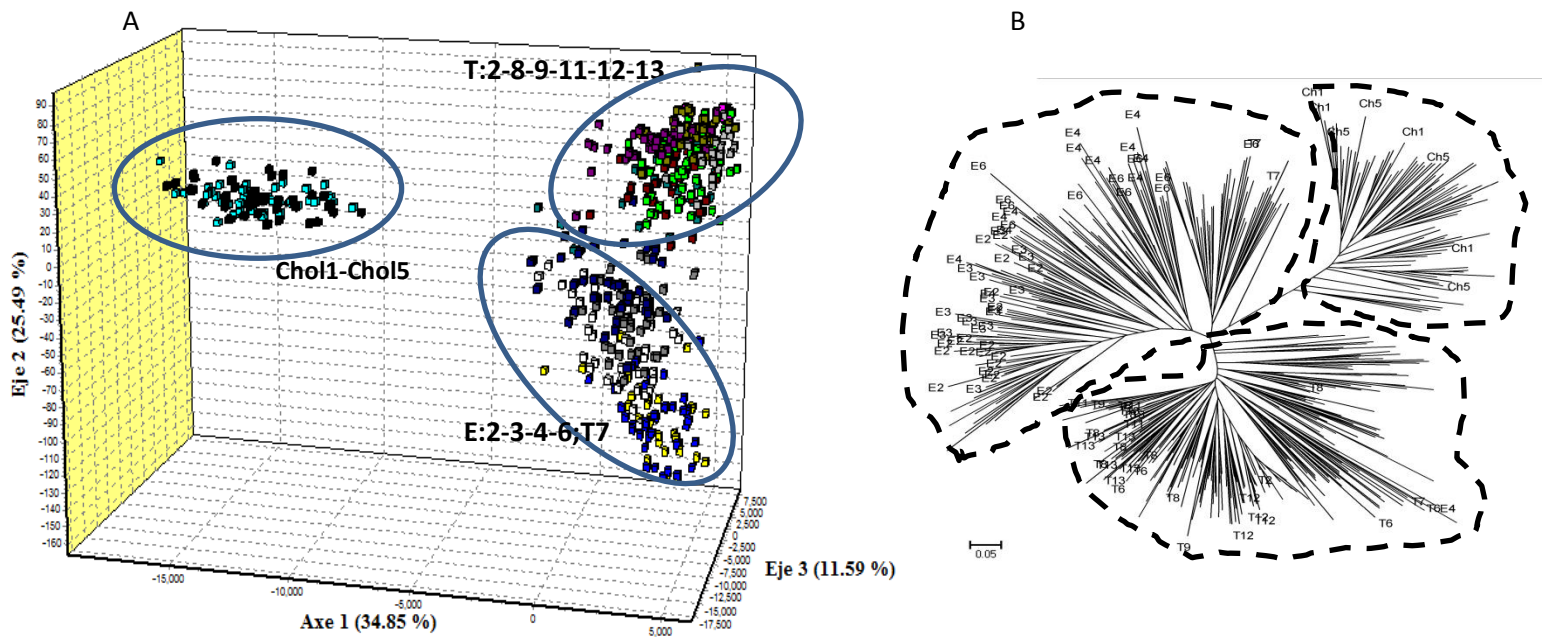


Figura 10. A) Ploteo tridimensional del análisis factorial de correspondencia obtenido en GENETIX utilizando 11 loci microsatélites de *C. dombeyana*. Los tres grupos diferenciados se muestran delimitados por círculos. B) Árbol de distancia DAS (distancia entre alelos compartidos) entre individuos.

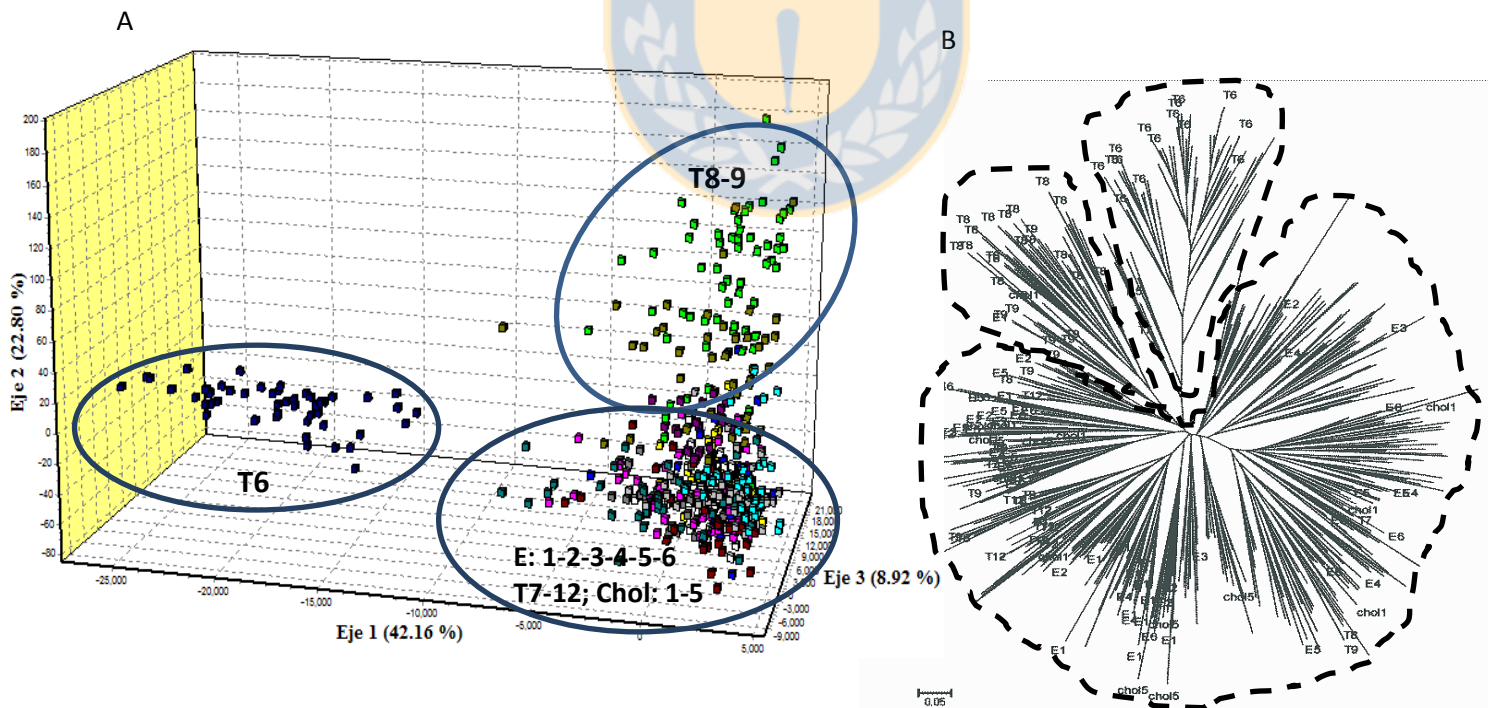


Figura 11. A) Ploteo tridimensional del análisis factorial de correspondencia obtenido en GENETIX utilizando 6 loci microsatélites de *A. chilensis*. Los tres grupos diferenciados se muestran delimitados por círculos. B) Árbol de distancia DAS (distancia entre alelos compartidos) entre individuos.



En ambas especies, los resultados del análisis con el programa STRUCTURE señalan que el número más apropiado de grupos genéticos diferenciados (K) corresponde a tres (K= 3), al utilizar tanto el método de variación de la probabilidad para cada K como el cálculo de Delta K. Sin embargo, la composición poblacional de los tres grupos genéticos difiere para cada especie (Fig.12, 13). En *C. dombeyana* los grupos poblacionales identificados corresponden a: curso principal Río Chillán y estación T7, tributarios del Río Chillán y finalmente, las dos estaciones del Río Cholguán (Fig. 12). En general, las poblaciones no difieren significativamente en la heterogeneidad de su composición genética, con estaciones que contienen individuos cuyos genotipos son bastante uniformes y particionados en los tres grupos principales (Fig. 16). Para las poblaciones de *A. chilensis*, fue identificado entre los tres grupos genéticos diferenciados, un grupo principal que comprende a las localidades del curso principal del Río Chillán, incluyendo T7 y dos sitios del Río Cholguán, un segundo grupo que incorpora los tributarios T8, T9, T12 y finalmente, sólo la población T6 absolutamente diferenciada del resto de las agrupaciones fue identificada como un grupo exclusivo (Fig. 17).



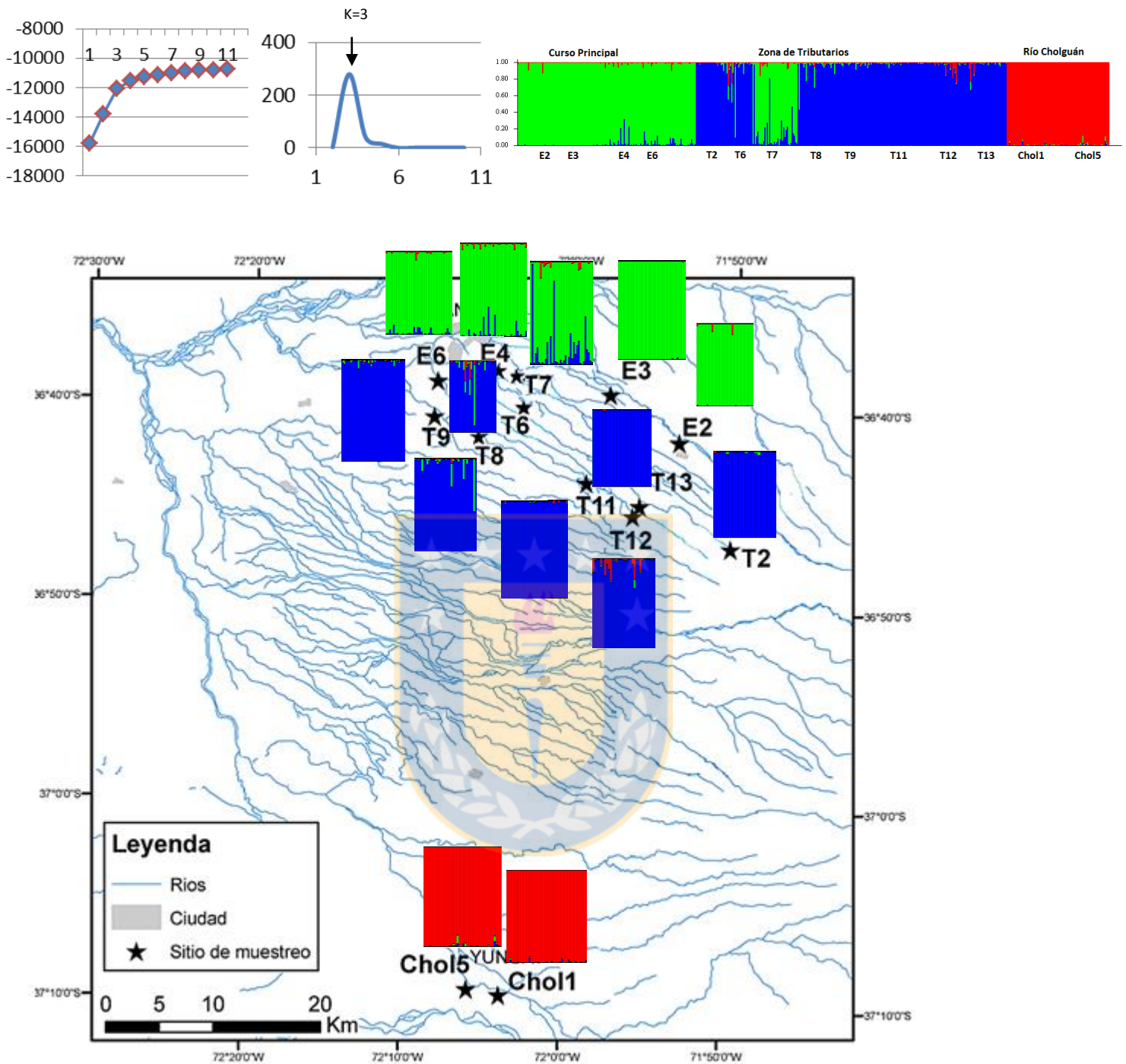


Figura 12. Resultados de análisis de agrupamiento con Structure para las poblaciones de *C. dombeyana*, representados por tres diferentes colores. Cada barra muestra un único individuo con cada color representando la contribución de un cluster a un genotipo individual. Ambas gráficas superiores corresponden a las metodologías propuestas para determinar el número más probable de grupos genéticos (K) y la barra lateral corresponde a la identificación de las localidades al interior de cada grupo identificado por Structure.

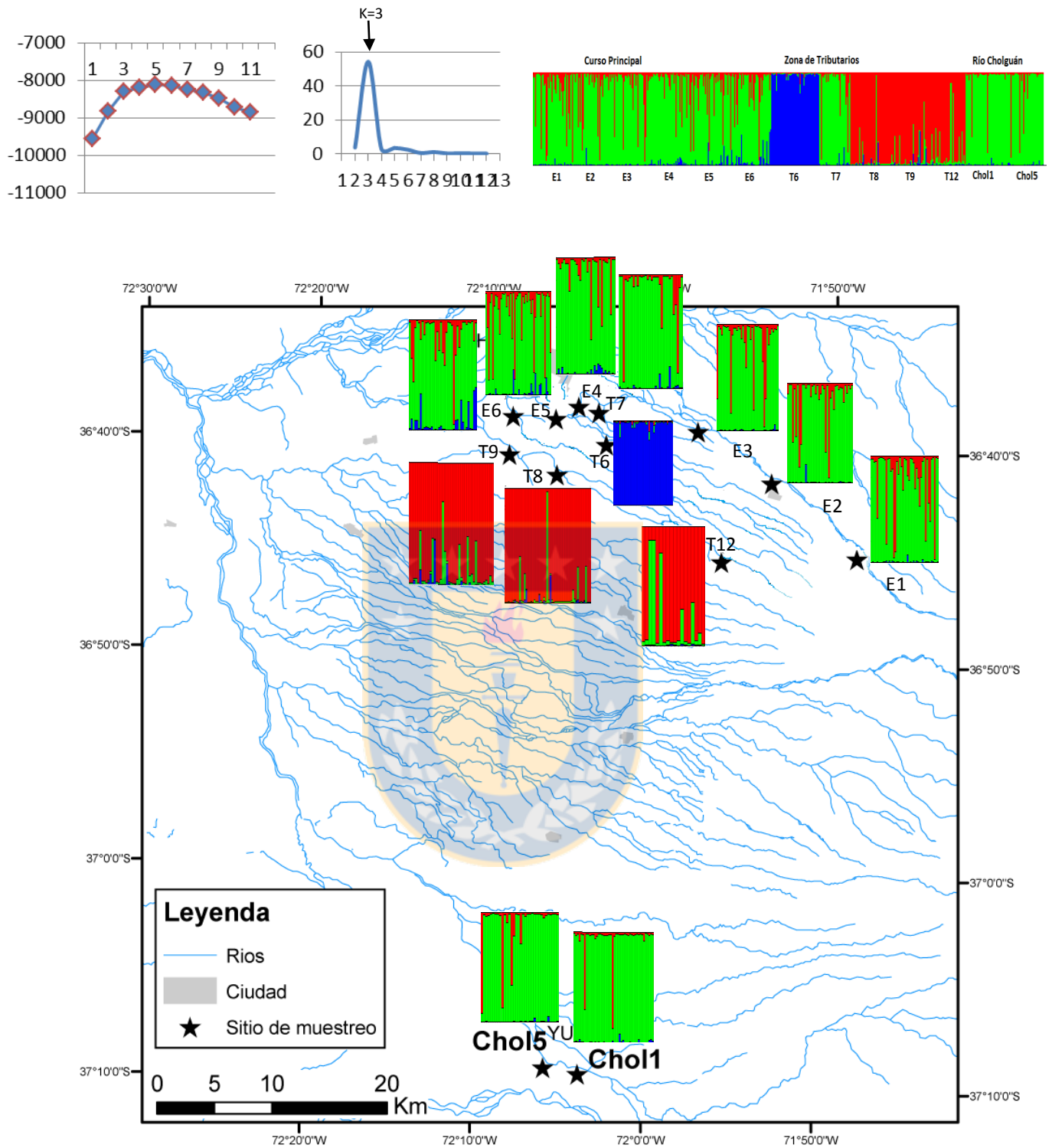


Figura 13. Resultados de análisis de agrupamiento con Structure para las poblaciones de *A. chilensis*, representados por tres diferentes colores. Cada barra muestra un único individuo con cada color representando la contribución de un cluster a un genotipo individual. Ambas gráficas superiores corresponden a las metodologías propuestas para determinar el número más probable de grupos genéticos (K) y la barra lateral corresponde a la identificación de las localidades al interior de cada grupo identificado por Structure.

La topología de los graph para las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis* es consistente con los resultados de structure (Fig. 14 A, B). Sin embargo, para *C. dombeyana* en las localidades de Cholguán se define un graph independiente de dos nodos que no está conectado al graph principal de 12 nodos que incluye la totalidad de las poblaciones de la cuenca del Río Chillán. Al interior de este graph, existe significativa estructuración entre un subgraph definido por las localidades del curso principal de agua en el río Chillán representadas por el color verde y que incluyen 5 nodos y 8 bordes, y un segundo subgraph definido por las poblaciones de la región de tributarios (color azul, 7 nodos, 12 bordes). Las poblaciones de *C. dombeyana* pertenecientes a uno u otro subgraph muestran evidencia de una mayor conexión entre las localidades interiores respecto de aquellas de grupos diferentes. Sólo la localidad T7 muestra evidencia de una escasa conexión entre subgraph al interior del Río Chillán (Fig. 14A).

En *A. chilensis*, las localidades de Cholguán distantes geográficamente de los sitios del Río Chillán se definen integradas al subgraph principal (color verde) en un gran sistema de interconexión (9 nodos, 15 bordes). La localidad T6 muy diferenciada genéticamente de las otras en los análisis anteriores, presenta 4 bordes de conexión al cluster principal y 3 bordes de conexión con un tercer subgraph, definido por tres nodos correspondientes a las localidades tributarias T12, T8 y T9 (color rojo) pertenecientes al Río Chillán y que incluyen 3 bordes de interconexión y 2 bordes de conexión con el cluster 1 y 3 con la población T6 (Fig. 14B).

En *A. chilensis* y a diferencia de *C. dombeyana* existe evidencia de un nivel generalizado de mayor conectividad entre las localidades (Fig. 14 A, B). Las diferencias entre ambas especies también son visualizadas en los análisis de interpolación. La comparación de ambas gráficas muestra para *C. dombeyana* una separación entre grupos del curso principal del Río Chillán incluido T7 (zona de mayores *peaks*), respecto de una zona de tributarios homogénea (sin *peaks*) y de las localidades de Cholguán (2 *peak*). En el caso del insecto *A. chilensis* no hay evidencia de diferenciación con las localidades de Cholguán (sin *peaks*) y en el sector de T6 se establece grandes diferencias respecto de las localidades del curso principal de agua y de las zonas que incluyen T8 y T9 en la zona de los tributarios (Fig. 15 A, B). Estos resultados son concordantes con las agrupaciones de Structure y con los análisis de graph poblacionales.

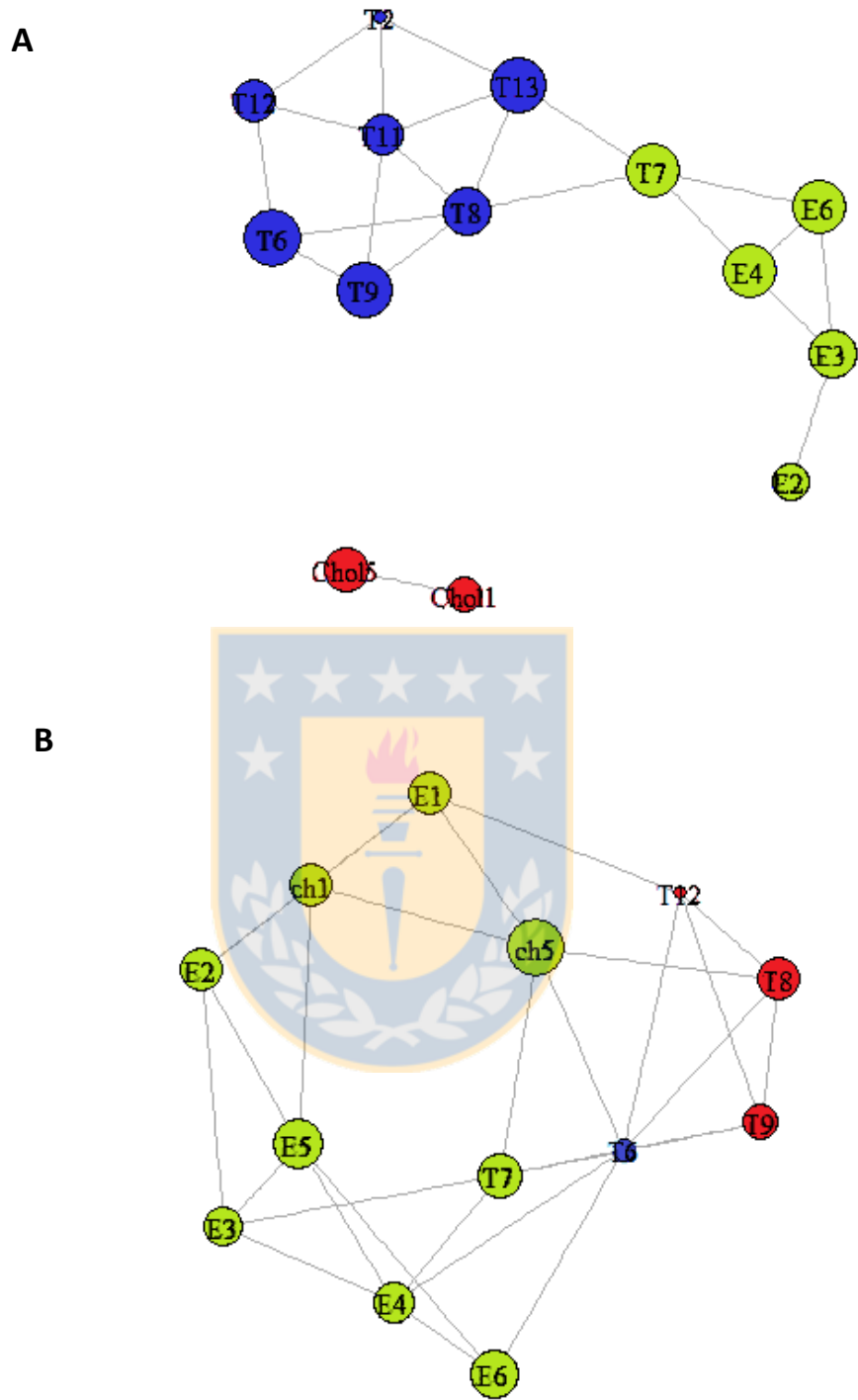


Figura 14. Graph poblacional para las localidades de A) *C. dombeyana* y B) *A. chilensis*. El tamaño de los nodos es proporcional a la diversidad genética dentro de las muestras y las conexiones entre nodos son correspondientes a la covarianza genética y representan el grado de conectividad entre localidades. Código de colores de subgraph en correspondencia a las agrupaciones identificadas por Structure.

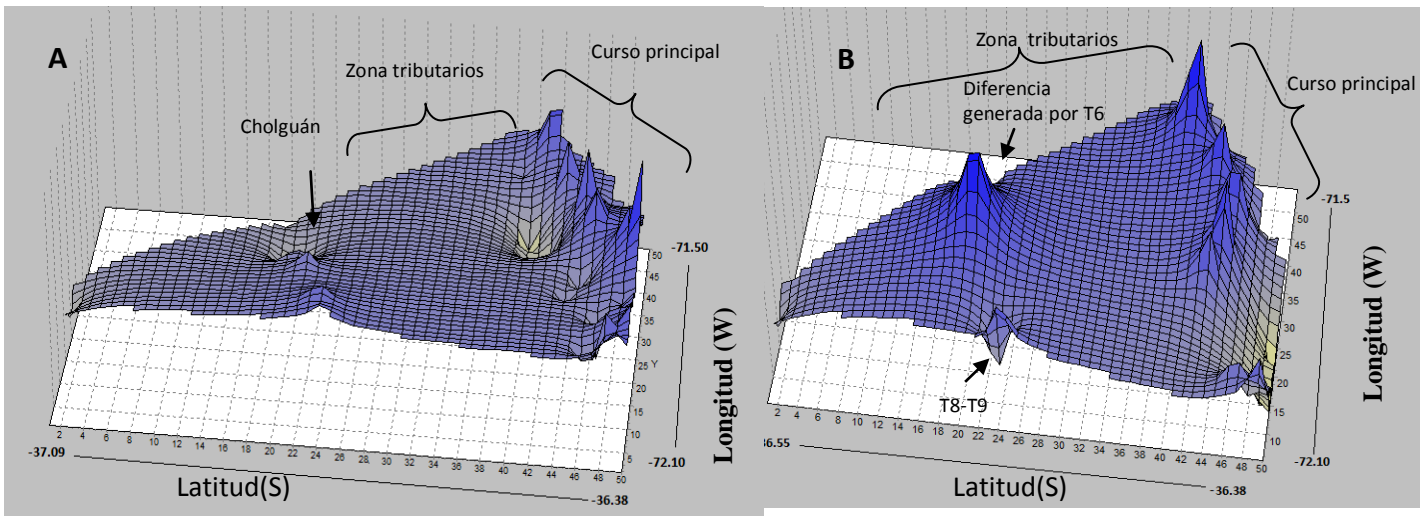
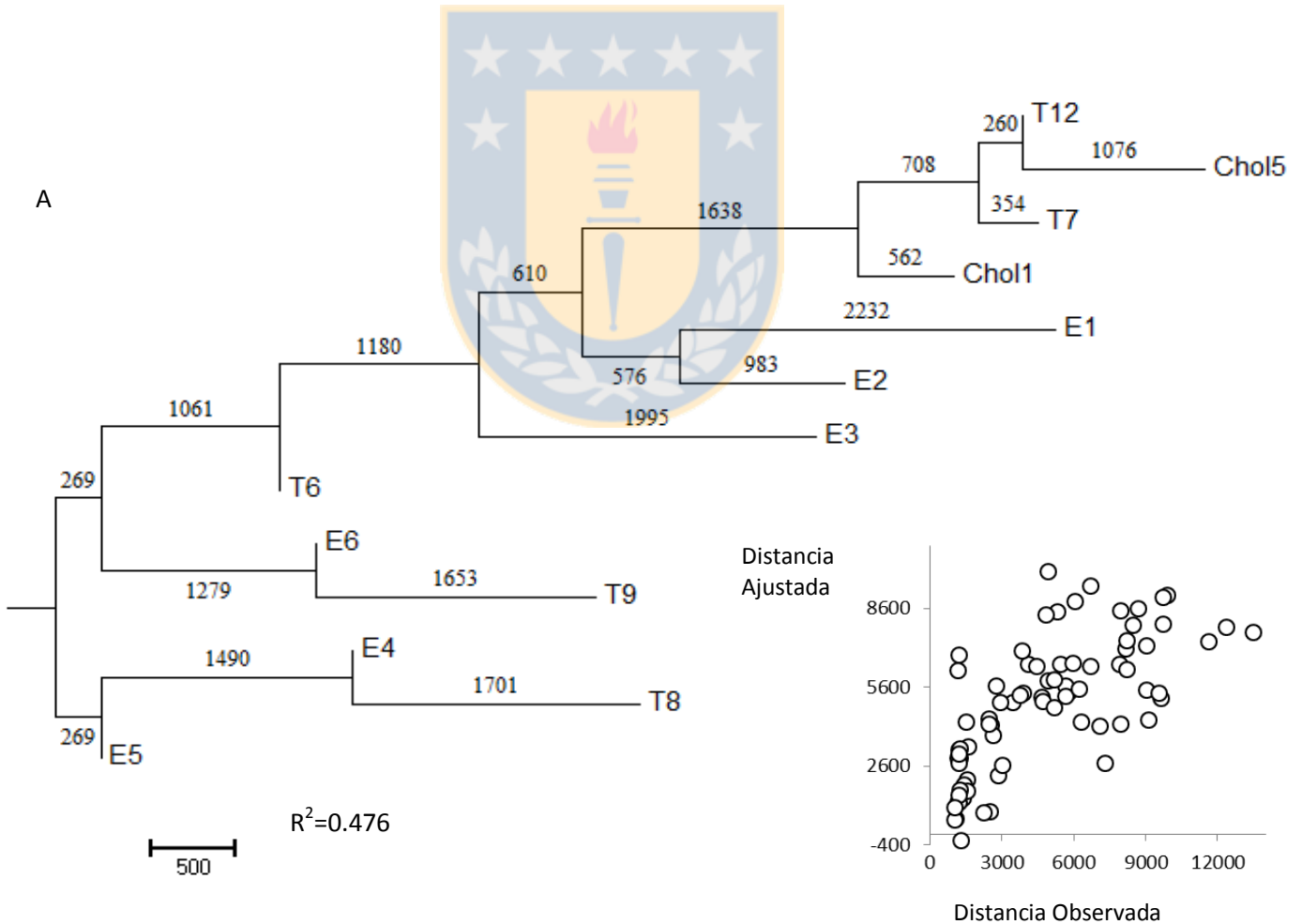


Figura 15. Modelo de interpolación gráfica basado en la representación gráfica de la estructura genética de A) *Chilina dombeyana* B) *Aquarius chilensis*. Los ejes X e Y representan coordenadas geográficas y la altura de la superficie a lo largo del eje Z señala las distancias genéticas de cada especie respectivamente.





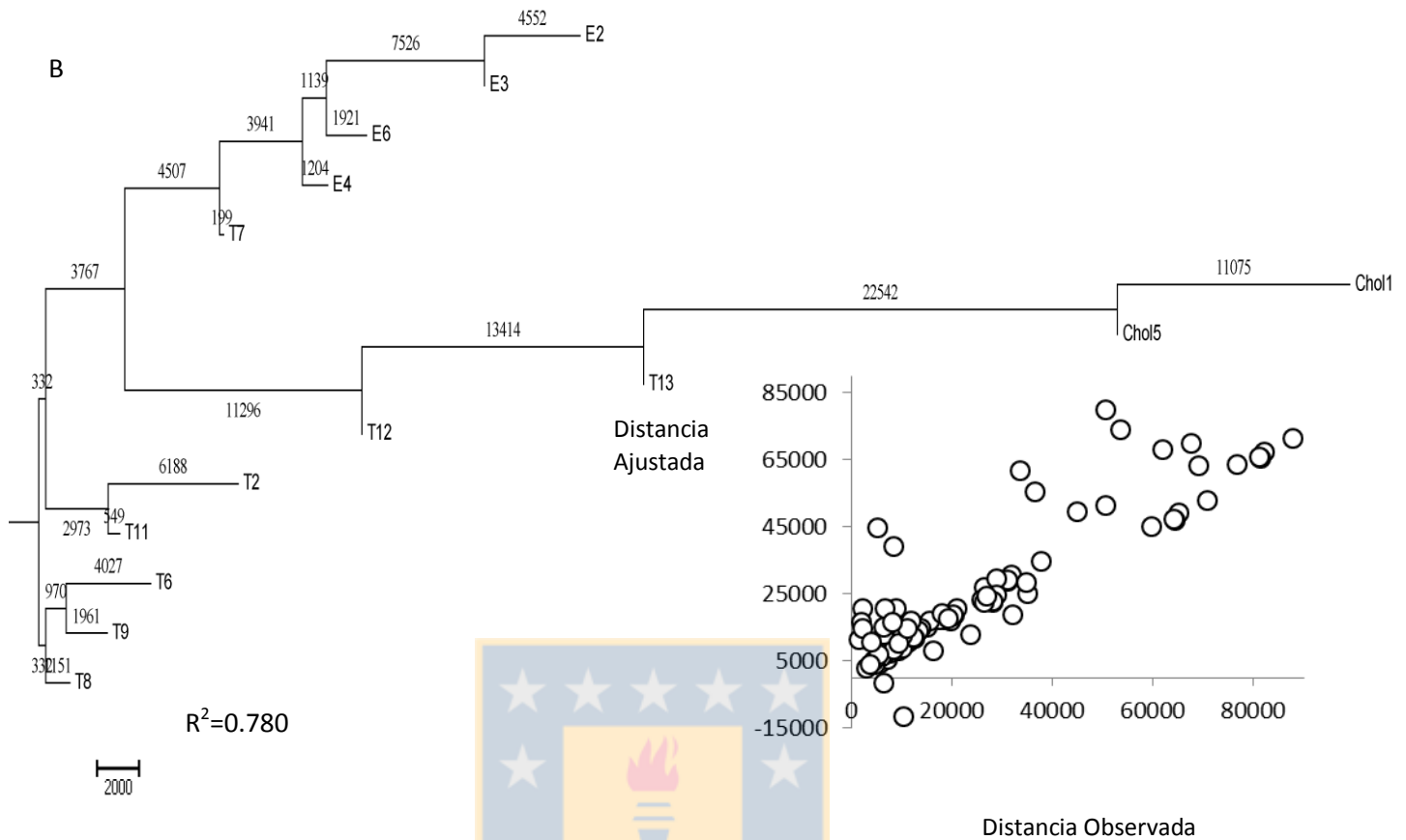


Figura 16. Árbol de Neighbor-joining (NJ) del modelo Stream Tree de diferenciación genética en base a la distancia genética cGD entre A) 13 poblaciones de *A. chilensis* y B) 14 poblaciones de *C. dombeyana*. La proporción de la variación explicada por el modelo (topografía de la red hidrográfica) aparece señada por el indicador  $R^2$ , en el extremo inferior izquierdo. Ambas gráficas situadas en el extremo inferior derecho señalan los resultados generados por el análisis StreamTree y corresponden a las distancias genéticas esperadas v/s distancias observadas, ajustadas a las redes hidrográficas para cada sección del río que fue incorporada al modelo entre las localidades muestreadas.

Finalmente, los resultados de los análisis con StreamTree mostraron un bajo ajuste del modelo a la estructura genética de *A. chilensis* utilizando como medida la distancia cGD ( $R^2 = 0.476$ ; Fig 16A) y un ajuste superior en el caso de las poblaciones de *C. dombeyana* ( $R^2 = 0.780$  Fig. 16B). Debido a que StreamTree asume que la dispersión ocurre exclusivamente a lo largo de las ramas incluidas en el análisis (particionamiento entre secciones hidrográficas conectadas), aquello sugeriría que en *C. dombeyana* la diferenciación genética interpoblacional fue relativamente bien explicada por un patrón contemporáneo de conectividad hidrográfica. Si bien, en esta especie la dispersión ha tenido lugar en el sentido de la hidrografía, aquello no ocurriría en *A. chilensis* cuya especie tiene un patrón de migración que no es exclusivamente explicado por la estructuración hidrográfica.



### 13.3 Tamaño efectivo poblacional, reducción poblacional y Migración

Los tamaños efectivos ( $N_e$ ) a largo plazo fueron estimados para las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis* mediante el método implementado en Lamarc y se observan en la Tabla 14. Bajo el modelo de mutación mixto TPM se obtuvo un amplio rango de estimaciones de los tamaños efectivos poblacionales (*C. dombeyana*:  $27 < N_e < 731$ ; *A. chilensis*:  $45 < N_e < 1583$ ). Los mayores tamaños poblacionales se registran en las poblaciones T8 en *C. dombeyana* ( $N_e=731$ ) y E4 en *A. chilensis*, ( $N_e=1583$ ) y las más bajas estimaciones corresponden a las poblaciones T2 en *C. dombeyana* ( $N_e=27$ ) y T6 en *A. chilensis* ( $N_e=45$ ).

Las estimaciones contemporáneas de tamaño efectivo en base a los resultados de *Ne estimator* muestran un patrón generalizado de bajos tamaños efectivos en *A. chilensis* ( $3 < N_e < 146$ ) y *C. dombeyana* ( $8 < N_e < 2289$ ), siendo la única excepción la población Chol1 en *C. dombeyana* que registra el mayor tamaño efectivo poblacional ( $N_e=2289$ ). A partir de los resultados obtenidos por ambas metodologías se aprecia que las poblaciones de *C. dombeyana* han sufrido variaciones en el tamaño efectivo de sus poblaciones, a excepción de cuatro sitios de mayor estabilidad y que representan sólo el 29% del total de poblaciones analizadas (E3, T2, T7, Chol 1). El resto de sus poblaciones muestra evidencia de un  $N_e$  decreciente (71%). Una situación levemente mejor se presenta en *A. chilensis*, en esta especie el 46 % de sus poblaciones analizadas muestra evidencia de una relativa estabilidad (E1, E3, E5, T6, T8, Chol 5). Se aprecian localidades en las cuales el comportamiento demográfico de las poblaciones en ambas especie difiere. Por ejemplo en Chol 5, T6 y T8 el tamaño efectivo de *C. dombeyana* muestra una disminución en el tiempo y en el caso de *A. chilensis* se presenta estable e incluso con un leve incremento en algunas localidades. Exclusivamente en la localidad T7, la situación se invierte y en este sitio es la especie de insecto la que se ve más afectada mostrando evidencia de una disminución temporal del  $N_e$  (Tabla 14). Sin embargo, existe un patrón concordante en las localidades E2, E4, E6, T9 y T12 que han afectado drásticamente a ambas especies, en estos sitios se aprecian grandes disminuciones en los tamaños efectivos (Tabla 14). Para sitios de una menor calidad ( $< 5.5$  ChSignal), tanto el método de proporciones ( $X^2 = 0.819$ ,  $P= 0.975$ ) como la comparación de las diferencias de  $N_e$  históricas y contemporáneas (Z-score= 0.241,  $P=0.785$ ) no muestran diferencias significativas entre las especies. También en sitios de mejor calidad ( $< 5.5$  ChSignal) se observa la misma situación tanto para el método de proporciones ( $X^2 = 6.223$ ,  $P= 0.183$ ) como en la prueba U de Mann-Whitney (Z-score= 0.646,  $P= 0.492$ ) para la diferencia de  $N_e$  histórico y contemporáneo entre

ambas especies. Por lo tanto, los resultados indican que no existen diferencias en los tamaños efectivos de las poblaciones de ambas especies en sitios con diferentes calidades de agua.

Tabla 14. Estimación de los tamaños efectivos poblacionales ( $N_e$ ) en las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis*.

Población	<i>C. dombeyana</i>				<i>A. chilensis</i>			
	Lamarc‡		LDNe		Lamarc‡		LDNe	
	Ne	IC	Ne	IC	Ne	IC	Ne	IC
E1	NR	NR	NR	NR	105	(80 - 168)	64	(40 -136)
E2	355	(129 - 644)	102	(46 - Inf.)	336	(162 - 564)	44	(27 - 100)
E3	101	(87 - 327)	108	(56 - 590)	126	(110 - 412)	83	(44-356)
E4	143	(117 - 356)	56	(41 - 83)	1583	(686 - 3041)	89	(36 - Inf.)
E5	NR	NR	NR	NR	158	(146 -299)	122	(61 - 901)
E6	288	(83 - 340)	20	(16 -26)	193	(124 - 678)	26	(18 - 41)
T2	27	(14 - 49)	33	(8 - Inf.)	NR	NR	NR	NR
T6	454	(157 -713)	47	(30 - 90)	45	(35 - 86)	57	(31 - 163)
T7	68	(45 - 143)	70	(45 -143)	236	(138 - 506)	47	(25 - 168)
T8	731	(311 -1337)	50	(31 - 109)	106	(59 - 157)	146	(67 - 10754)
T9	219	(109 - 440)	83	(56 -147)	64	(55 - 141)	21	(14 - 33)
T11	424	(141 - 489)	78	(44 -239)	NR	NR	NR	NR
T12	215	(184 -1144)	8	(6 -9)	99	(57 - 195)	3	(2 - 5)
T13	309	(266 - 1064)	41	(20 - 218)	NR	NR	NR	NR
Chol1	233	(118 - 427)	2289	(187 - Inf.)	368	(297 - 602)	77	(45 - 194)
Chol5	310	(103 - 536)	57	(40 - 92)	54	(47 - 168)	48	(30 - 104)
log likelihood	-20628,96				-11705,9452			

‡ Tamaño efectivo con modelo mutacional TPM. IC= intervalo de confianza al 90%. Inf= infinito. NR= Sin registro.

Mediante la prueba de Wilcoxon implementada en Bottleneck se encontró evidencia en ambas especies de un significativo exceso de heterocigotos comparado a lo esperado en equilibrio mutación/deriva (Tabla 15). En *C. dombeyana*, la población de E6 (Wilcoxon test:  $P \leq 0.027$ ) bajo el modelo TPM reveló un significativo exceso de heterocigotos y que en el caso del modelo SMM se encontraría al límite de la significancia y ninguna de las restantes poblaciones muestran evidencias de recientes reducciones poblacionales bajo ningún modelo mutacional. En tanto que las poblaciones de *A. chilensis*, muestran evidencia significativa de reducción poblacional en las poblaciones E2 (Wilcoxon test:  $P \leq 0.0039$ ) y E4

(Wilcoxon test:  $P=0.008$ ) evidenciado exclusivamente bajo el modelo mutacional TPM (Tabla 15). Los resultados presentados muestran evidencia de que las poblaciones de ambas especies pueden sufrir eventos de inestabilidades demográficas. Sin embargo, no existe una significativa diferenciación entre las especies al comparar la ocurrencia de eventos de cuellos de botella entre sitios con diferentes calidades de agua ( $Z\text{-score} = -0,339$   $p = 0.727$ ).

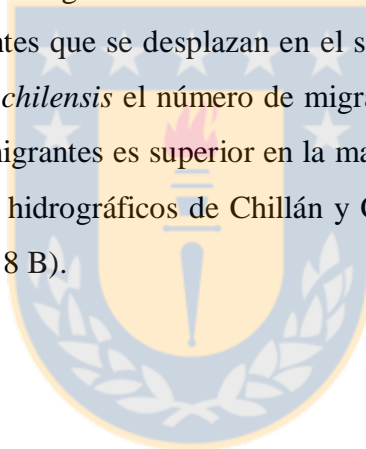
Tabla 15. Valores de probabilidad asociados a un exceso de heterocigotos con respecto a lo esperado en equilibrio mutación-deriva para las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis*, mediante una prueba de Wilcoxon realizada con el programa Bottleneck. TPM= modelo de mutación en dos fases, SMM= modelo de mutación paso a paso.

Población	<i>C. dombeyana</i>		<i>A. chilensis</i>	
	TPM	SMM	TPM	SMM
E1	NR	NR	0,922	1
E2	0,289	0,711	<b>0,039</b>	0,922
E3	0,232	0,817	0,719	0,977
E4	0,103	0,913	<b>0,008</b>	0,078
E5	NR	NR	0,344	0,961
E6	<b>0,027</b>	<b>0,062</b>	0,344	0,781
T2	0,945	0,961	NR	NR
T6	0,65	0,994	0,961	0,992
T7	0,551	0,995	0,078	0,719
T8	0,768	0,959	0,281	0,977
T9	0,65	0,966	0,281	0,781
T11	0,84	0,995	NR	NR
T12	0,618	0,949	0,313	0,313
T13	0,633	0,85	NR	NR
Chol1	0,994	1	0,922	0,977
Chol5	0,992	1	0,578	0,984

Los patrones de migración contemporáneos (número de migrantes entre pares de poblaciones) muestran en las poblaciones de *C. dombeyana* la existencia de un mayor flujo génico entre poblaciones con mayor cercanía geográfica y un patrón generalizado de bajo flujo génico. Las estimaciones resuelven un rango de migración comprendido entre 36 y 604 individuos, y muestran resultados de un flujo génico localizado entre E2 y E3, en las localidades Chol 1 y Chol5 del Río Cholguán y entre

algunos pares poblacionales de las zonas tributarias (T9-T6, T9-T8, T11-T13, T11-T12 y T11-T6) (Fig. 17A). En el caso de las localidades E4, E6, T2, T7 no se registran número de migrantes (Fig. 17A).

Sin embargo, en *A. chilensis* las estimaciones muestran un mayor número de pares de localidades con una significativa proporción de migrantes y con una mayor distancia geográfica entre ellas, en comparación con los resultados obtenidos en *C. dombeyana*. Entre estas y para un rango comprendido entre 20 y 568, se encuentran E3-E6, Chol1-E5, Chol1-E1, T12-E1, T12-E2. Además, la direccionalidad del flujo entre estas localidades permite inferir que algunos individuos logran desplazarse más allá de la topología impuesta por un sistema de red hídrico como es el caso entre las localidades T12-E1, T12-E2, Chol1-E1. En el caso de T6, T8, T9 no se registran número de migrantes (Fig. 17 B). Las comparaciones pareadas realizadas mediante el programa de Lamarc, muestran evidencia de un mayor flujo histórico para las poblaciones de ambas especies. Sin embargo, en *C. dombeyana* el rango del número de migrantes se encuentra comprendido entre 1-25, con valores superiores para el número de migrantes que se desplazan en el sentido de la direccionalidad de la red hídrica (Fig. 18A). En el caso de *A. chilensis* el número de migrantes se encuentra comprendido entre 1-50 individuos, el intercambio de migrantes es superior en la mayoría de las conexiones establecidas entre localidades en ambos sistemas hidrográficos de Chillán y Cholguán e independiente del sentido de la direccionalidad de la red (Fig. 18 B).



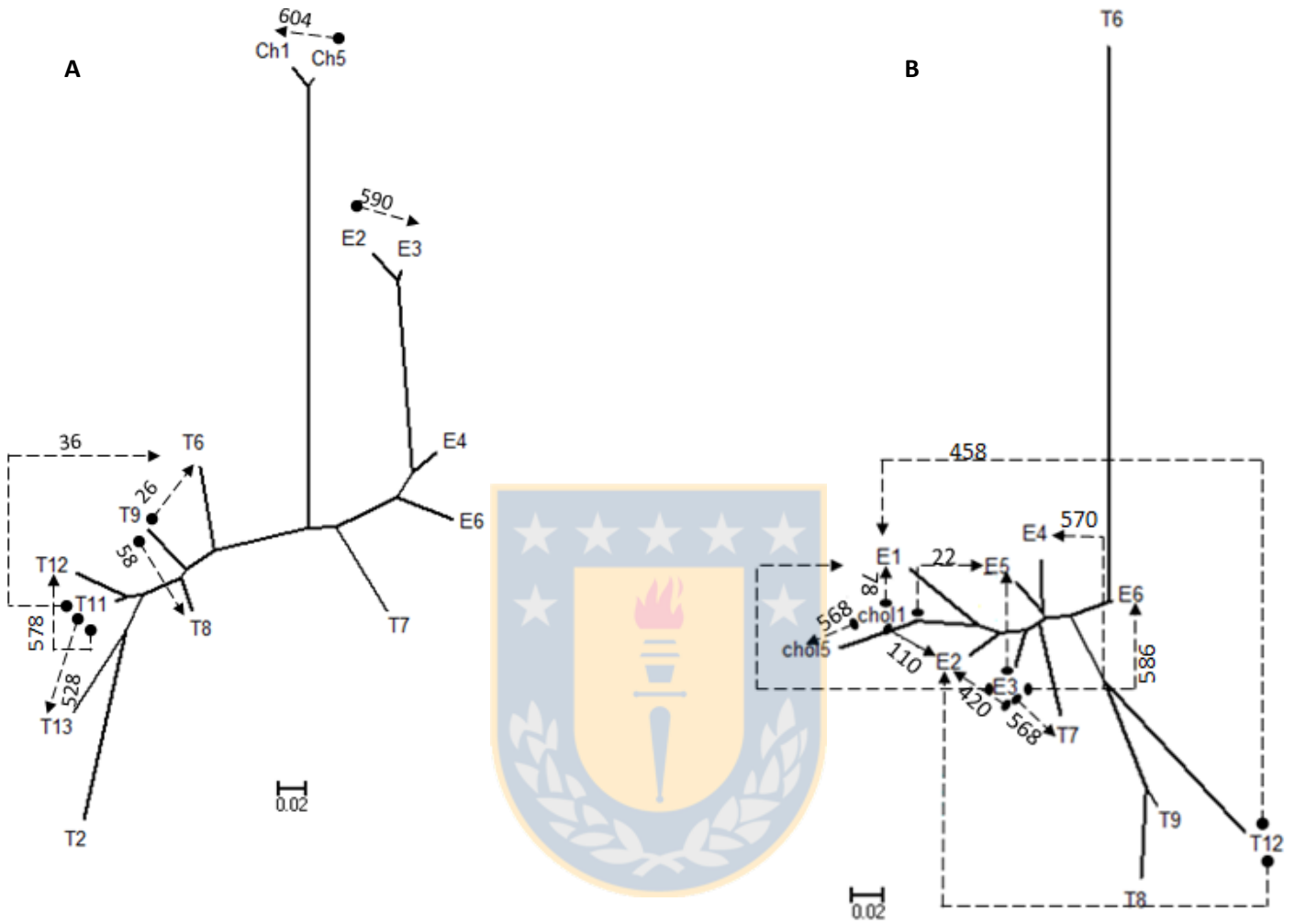


Figura 17. Arbol de Neighbour-joining en base a la distancia de Nei (Da) entre las poblaciones de A) *C. dombeyana*, y B) *A. chilensis*. Los valores corresponden al número de migrantes intercambiados. Las flechas y valores asociados indican la dirección del flujo génico y el número de migrantes estimado entre las localidades.

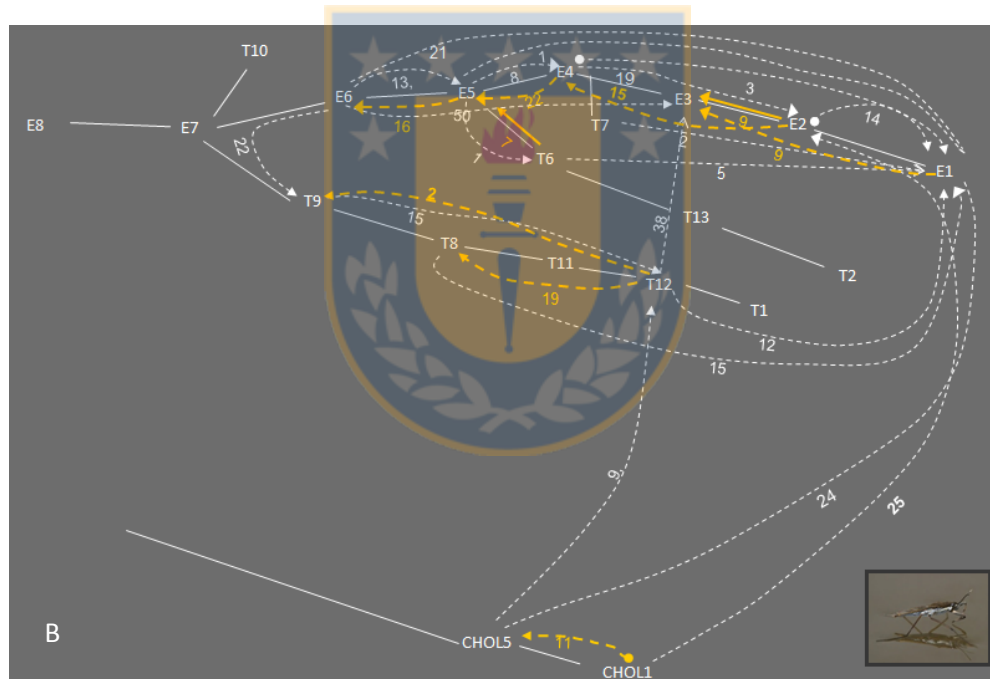
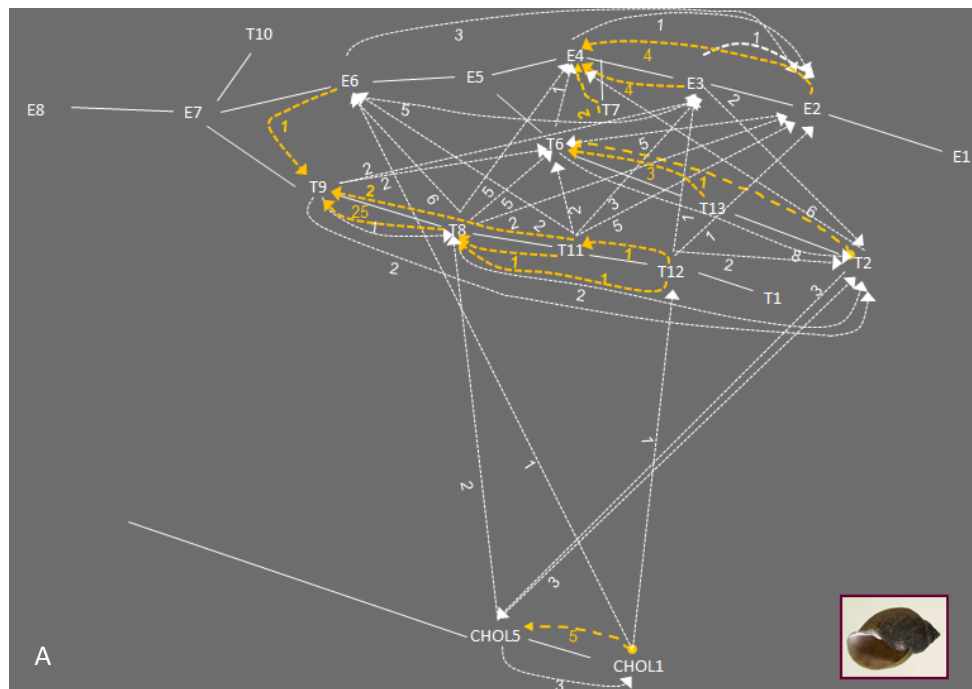
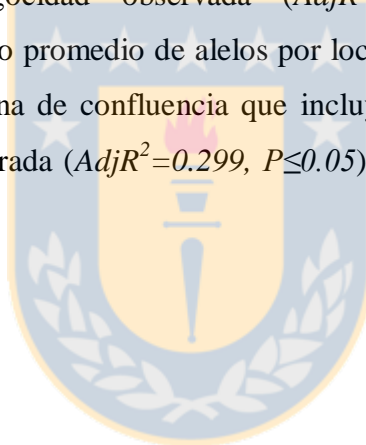


Figura 18. Número de migrantes históricos entre las diversas localidades muestreadas para A) *C. dombeyana* y B) *A. chilensis*. Las flechas y valores asociados indican la dirección del flujo génico y el número de migrantes estimado entre las localidades.

### ***13.4 Patrón de la variabilidad genética***

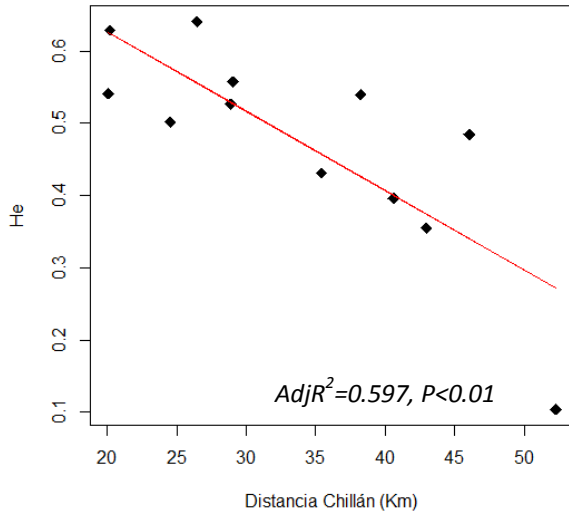
En función de la estructura propia de un sistema de redes hidrográficas, el flujo de agua hacia zonas de confluencia y desembocadura determina un sistema con un fuerte componente de direccionalidad de aguas río abajo. Dada esta situación, fue planteado que el flujo génico se encuentre sesgado en una dirección río abajo y que entonces la variabilidad genética se reduzca en dirección contraria (río arriba). Los resultados de estos análisis muestran señales significativas de que aquello ocurre en las poblaciones de *C. dombeyana* para varios parámetros de diversidad genética. Sin embargo, este patrón no es significativo para la especie de insecto *A. chilensis* para ninguna de las variables analizadas (Fig. 19).

En *C. dombeyana* se observa evidencia significativa de correlación entre la diversidad genética y la distancia desde la confluencia (desembocadura) del Río Chillán. Para la heterocigocidad esperada ( $AdjR^2=0.597$ ,  $P\leq 0.01$ ), heterocigocidad observada ( $AdjR^2=0.541$ ,  $P\leq 0.01$ ), riqueza alélica ( $AdjR^2=0.744$ ,  $P\leq 0.001$ ), y el número promedio de alelos por locus ( $AdjR^2=0.738$ ,  $P\leq 0.001$ ) (Fig. 19). Al considerar las distancias a la zona de confluencia que incluye al Río Cholguán, los resultados a excepción de la heterocigocidad esperada ( $AdjR^2=0.299$ ,  $P\leq 0.05$ ) no son significativos para los demás parámetros de diversidad genética.

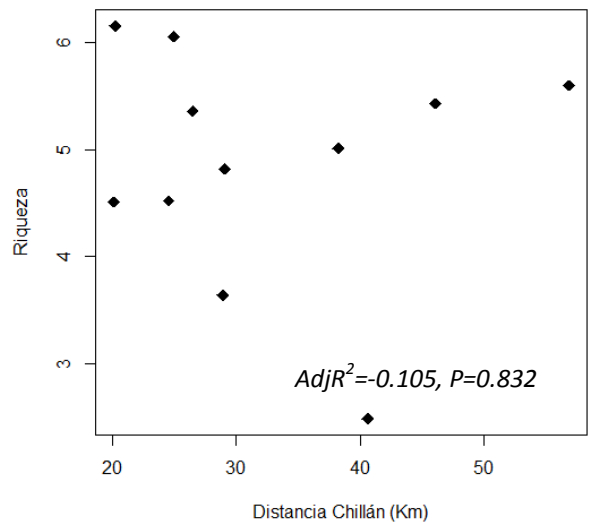
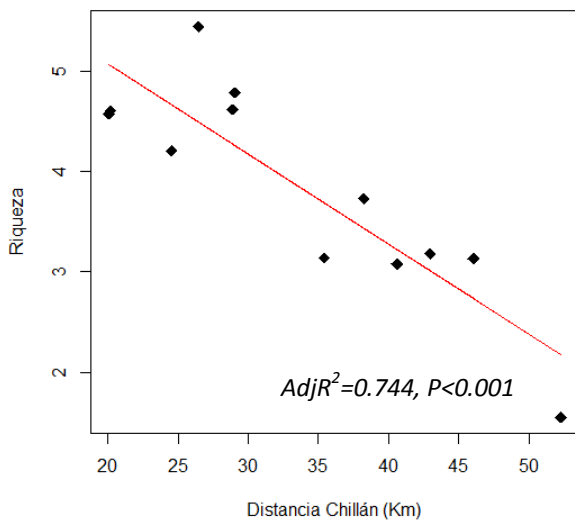
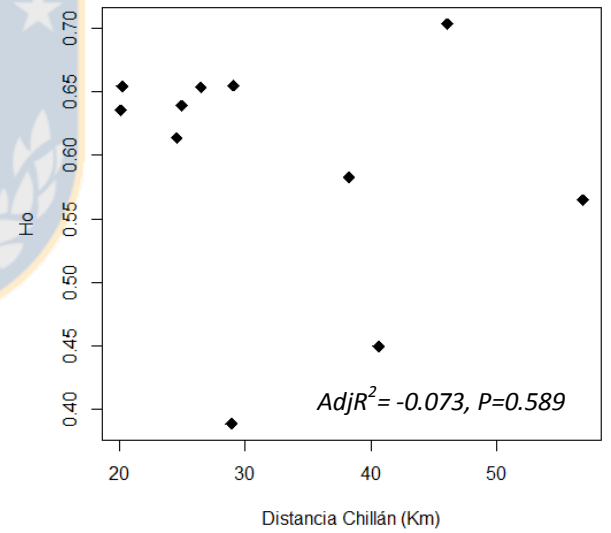
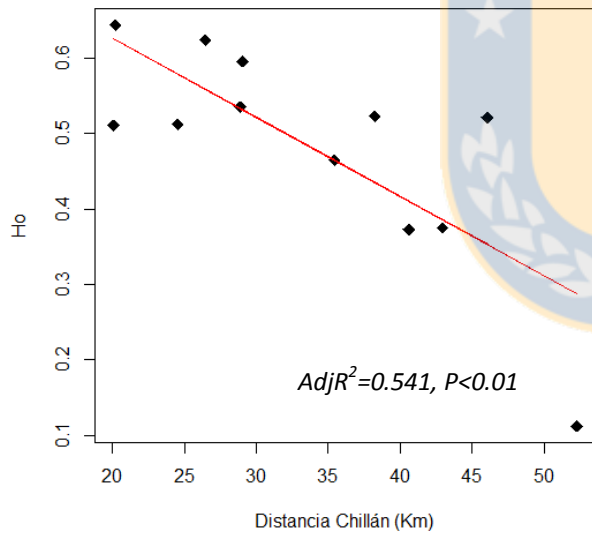
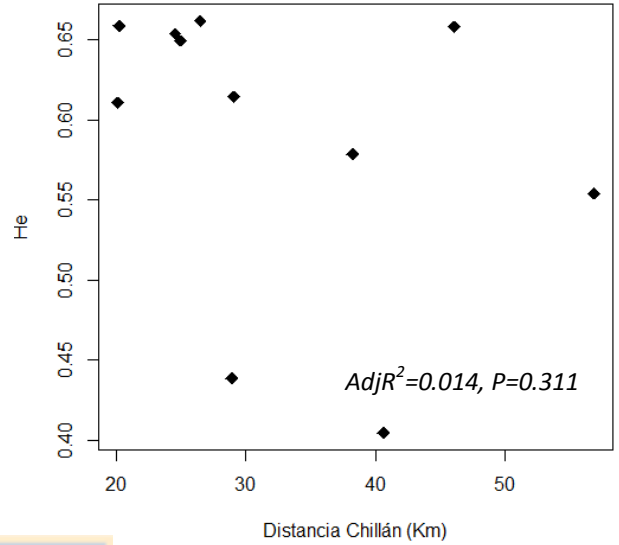




***C. dombeyana***



***A. chilensis***



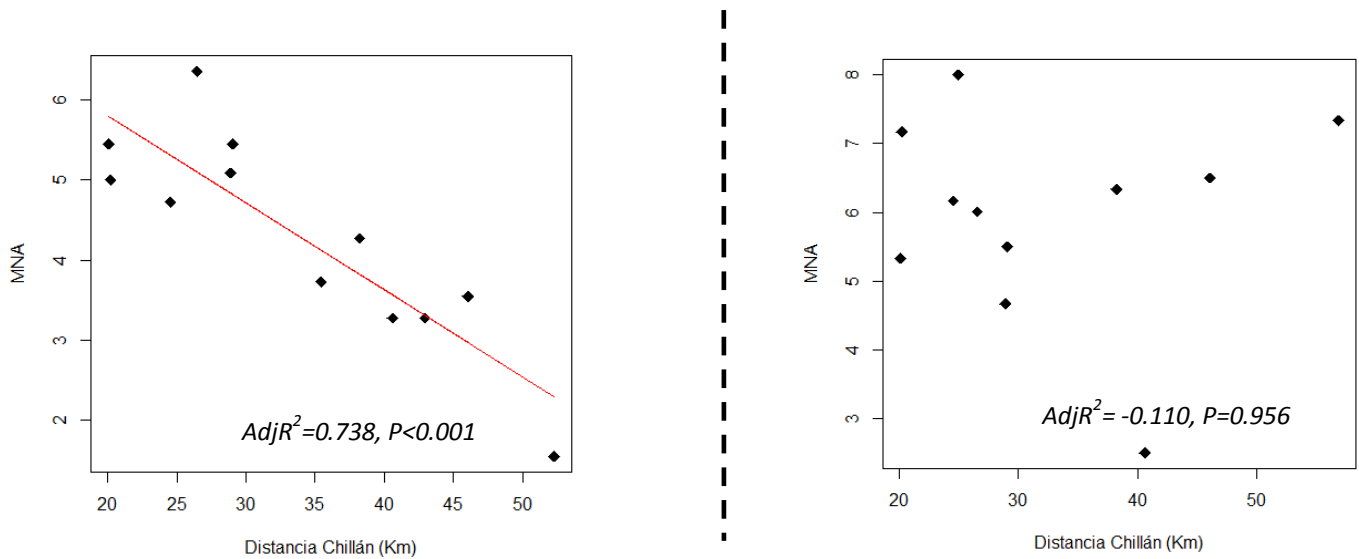


Figura 19. Medidas de variabilidad genética en *C. dombeyana* y *A. chilensis* versus las distancias entre las localidades y el punto de confluencia en la desembocadura del Río Chillán sin considerar las localidades de Cholguán. La línea fue ajustada cuando las regresiones fueron significativas.

### 13.5 Análisis de la partición de la varianza para evaluar el efecto de las variables ambientales y espaciales que contribuyen a la diferenciación poblacional en *C. dombeyana* y *A. chilensis*

Los resultados del análisis de partición de varianza muestran que las variables ambientales físico-químicas (conductividad y fósforo orgánico) y de hábitat (Diámetro de bolones máximo y el Diámetro de bolones medio) juntas explican el 44 % de la variación de los datos en *C. dombeyana*, lo que sumado al efecto de la variable espacial, obtenida a partir de un análisis de componentes principales aplicado sobre una matriz hidrográfica (V3) explicaría en conjunto un 77% de la variación genética interpoblacional (Tabla 16). Gran parte de la variación es explicada individualmente por las características del hábitat, entre estas las variables el diámetro de bolones máximo y medio por si solas son capaces de explicar un 23% de la variación (Fig. 20A). En *A. chilensis*, al contrario un menor porcentaje de la varianza es explicada. Los resultados del análisis de partición de varianza muestran que las variables ambientales físico-químicas (demanda química de oxígeno y Nitrato), de hábitat (variabilidad de regímenes de velocidad y profundidad) y componente espacial (V1) en conjunto sólo alcanzan a explicar un 25 % de la variación de la data (Tabla16, Fig. 20B). En esta especie el mayor

porcentaje de la varianza es explicado individualmente por las variables físico-químicas: demanda química de oxígeno y nitrato (13%). Luego un 4% de la varianza tiene un componente espacial (V1) y un 3% es explicado individualmente por la variabilidad de los regímenes de velocidad y profundidad del hábitat y que en conjunto estarían informando del restante 11% de la variación explicada en las poblaciones de *A. chilensis*.

En general, la divergencia genética de las poblaciones del caracol *C. dombeyana* se encuentran importantemente explicadas por las características del hábitat a diferencia de *A. chilensis*, donde la mayor contribución la realizan las características físico-químicas del agua. Para la especie de caracol el efecto conjunto de las características físico-químicas, hábitat y espaciales, logran explicar gran parte de la variación y diferenciación de sus poblaciones. En el caso de *A. chilensis* las contribuciones conjuntas de las condiciones físico-químicas, espaciales y de hábitat no muestran una fuerte relación y no logran incrementar el porcentaje de la variación ya explicado en las fracciones que consideran las variables del espacio y del hábitat (11%) o sólo las características físico-químicas seleccionadas (13%). Por lo tanto, existe un 75% de la variación que no logra ser explicado por este set de variables. Si bien en *C. dombeyana*, el efecto conjunto de estos tipos de variables consigue explicar gran parte de la variación (77%), también se desprende de aquello que las variables puedan estar correlacionadas entre ellas. Sin embargo, las características particulares de este set de variables influyen significativamente la divergencia genética de las poblaciones de *C. dombeyana* (Tabla 16, Fig. 20).

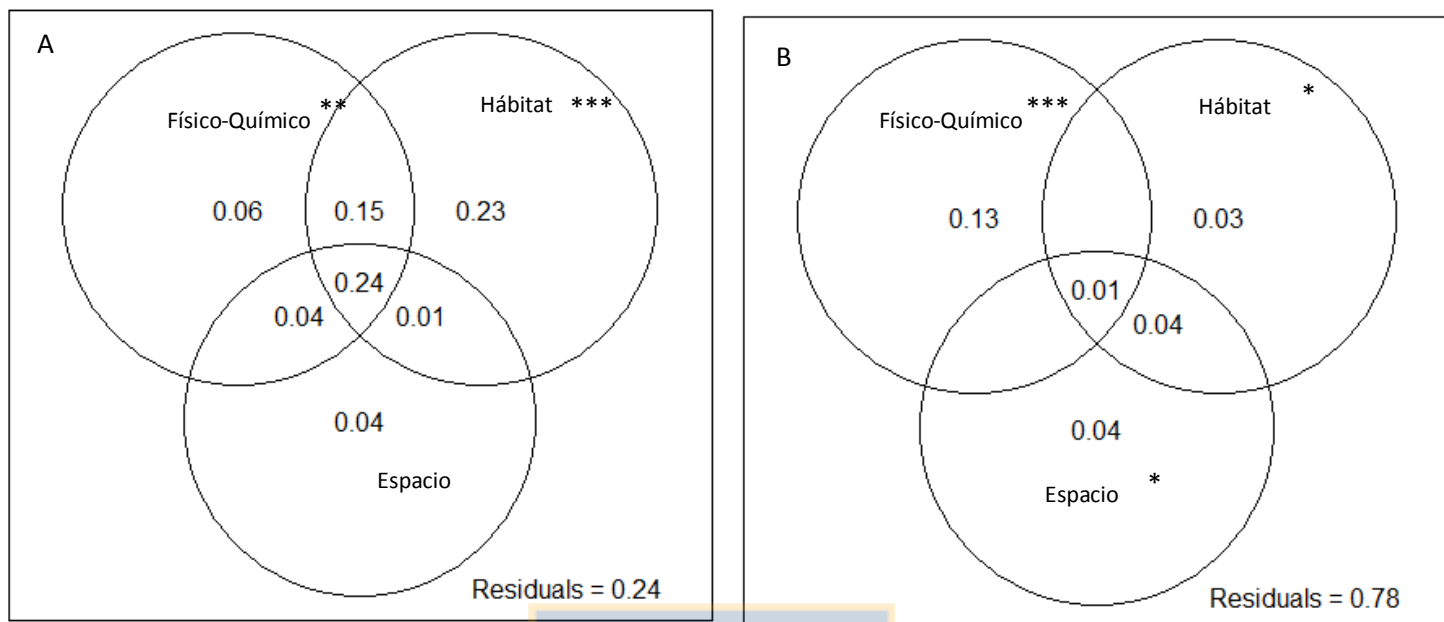


Figura 20. Diagrama de Venn de la partición de la varianza en la distancia genética condicional (cGD) entre poblaciones de A) *C. dombeyana* y B) *A. chilensis*. Los valores representan la proporción de la varianza explicada por cada tipo de datos señalados en el diagrama, de forma individual o conjunta ( $R^2$ ). La significancia estadística de las fracciones individuales son representadas por asteriscos (\* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\*  $P \leq 0.001$ ). La significancia de la fracción compartida no puede ser evaluada. Si la contribución conjunta de dos o más set no es distinta de cero, el valor de  $R^2$  no se muestra en la gráfica.

Tabla 16. Resultados de los modelos lineales y de la fracción de las variables individuales significativas incorporadas a la partición de varianza. V1, V3 corresponden a variables espaciales obtenidas a partir de un análisis de coordenadas principales, coeficiente de determinación ajustado a los grados de libertad para la contribución relativa de cada variable individual y modelo general ( $R^2_{adj}$ ), Estadístico de Fisher (F) y probabilidad asociada (P).

Especie	Tipo de datos	Variable	Individual			$R^2_{adj}$ (Global)	Modelo	
			Global $R^2_{adj}$	F	P		F	P
<i>C. dombeyana</i>	Espacial	V3	0.37	7.303	0.006	0.29	5.810	0.006
	Hábitat	Dbmax	0.41	8.347	0.005	0.62	11.769	0.003
		Dbmedio	0.27	9.368	0.002			
	Físico-químico	CdtM	0.34	6.461	0.005	0.48	7.20	0.001
FOM		0.21	0.488	0.009				
<i>A. chilensis</i>	Espacial	V1	0.14	1.855	0.008	0.08	1.875	0.005
	Hábitat	RVP	0.13	1.787	0.021	0.06	1.787	0.02
	Físico-químico	DQO	0.12	1.53	0.046	0.12	1.780	0.002
Na		0.14	1.90	0.015				

## 14.0 DISCUSION

En ecosistemas de agua dulce, la conectividad entre poblaciones de una especie es determinada por la estructura dendrítica de red hidrográfica, la posición espacial de las poblaciones dentro de la jerarquía de la red, las historias de vida específica de las especies y las características de dispersión (Lowe *et al.* 2006; Campbell-Grant *et al.*, 2007; Hughes, Schmidt & Finn, 2009; Morrissey & De Kerckhove, 2009). Las diferencias ecológicas y de rasgos de historia de vida de las especies pueden afectar su respuesta a los principales factores ambientales (Petit *et al.*, 2003; Ruzzante *et al.*, 2008). Por ejemplo, los primeros estudios realizados en genética del paisaje, los que fueron básicamente aplicados en peces salmónidos (Rieman & Dunham, 2000; Verspoor *et al.* 2005; Neville *et al.*, 2006; Dillane *et al.*, 2007) fueron exitosos en detectar evidencias significativas de estructuración en función de las características migratorias de las especies y de la conectividad de arroyos. También ha sido principalmente en peces donde se ha investigado las consecuencias de alteraciones antropogénicas que afectan el patrón de conectividad de redes hidrográficas (Reid *et al.*, 2008; Raeymaekers *et al.*, 2009; Storfer *et al.*, 2010). Sin embargo, son pocos los estudios en genética del paisaje aplicados a más de una especie de invertebrados acuáticos de agua dulce con diferencias en rasgos de historia de vida. Este estudio permitió comparar a una fina escala espacial los niveles de variabilidad y diferenciación genética presentes en las poblaciones de *C. dombeyana*, un gastrópodo acuático de agua dulce y una especie de insecto heteróptero, *A. chilensis* de una forma principalmente áptero y habitante de la película superficial del agua.

### 14.1 Diversidad genética intrapoblacional a través de la cuenca del Itata

Mediante el uso de marcadores microsatélites fueron caracterizadas las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis* y a partir de los resultados es factible evidenciar que en ambas especies las poblaciones presentan niveles relativamente elevados de variabilidad genética. Sin embargo, las poblaciones de *A. chilensis* resuelven un nivel de heterocigocidad relativamente superior y un mayor número alélico promedio para sus poblaciones que *C. dombeyana* considerando además que estas poblaciones han podido ser evaluadas solo con 6 loci respecto de los 11 marcadores utilizados en la especie de caracol. Esta variabilidad genética, en el caso de las poblaciones de *C. dombeyana*, se encuentra influenciada por la hidrografía propia de los sistemas de redes fluviales que caracterizan los sistemas lóticos, mostrando evidencia de un incremento en la diversidad genética desde la zona superior (río arriba) hacia los sitios de la desembocadura (río abajo). Si bien las poblaciones de especies cuyo ciclo de vida se encuentra totalmente restringido al medio acuático pueden dispersar de forma activa o pasiva, como

resultado del flujo de agua unidireccional la dispersión entre las poblaciones suele ser sesgada en dirección río abajo, lo que resulta en un intercambio asimétrico de sus individuos (Morrissey & De Kerckhove, 2009). Para algunos invertebrados acuáticos, particularmente insectos pueden también dispersar fuera de la columna de agua, reduciendo el flujo aguas abajo siendo capaces de un movimiento terrestre desde un drenaje a otro (Schmidt *et al.*, 1995).

Las poblaciones de *C. dombeyana*, resuelven un patrón que es consistente con la asimetría del flujo génico y que no ocurre en las poblaciones de *A. chilensis*, sugiriendo diferencias en la dispersión entre especies y que en el caso de *C. dombeyana* estaría fuertemente influenciada por el sentido del flujo aguas abajo en las redes dendríticas. El patrón de aislamiento por distancia y los análisis de autocorrelación espacial muestran que en *C. dombeyana* a diferencia de *A. chilensis*, el flujo génico ocurre en el sentido de la red hídrica y localmente entre las poblaciones vecinas, mostrando evidencia de un mayor grado de diferenciación genética en *C. dombeyana* que en *A. chilensis*. Estudios realizados en otras especies de invertebrados muestran evidencias de un patrón similar. Zickovich & Bohonak (2007) investigaron la estructura genética de dos especies de invertebrados basados en secuencias de la citocromo oxidasa subunidad I (COI). Una especie de efemeróptera (*F. quillieri*) y de un anfípodo (*H. azteca*) que habitan en un sistema de ríos de California perennes e intermitentes y encontraron una mayor diversidad genética en el efemeróptera *F. quillieri* que en el anfípodo *H. azteca*, así como una fuerte diferenciación genética entre las poblaciones del anfípodo explicado básicamente por las diferencias en las capacidades de dispersión de ambas especies. Posteriormente, Alp *et al.* (2012), compararon también una especie de efemeróptera (*Baetis rhodani*) y un anfípodo (*Gammarus fossarum*), investigando a fina escala los patrones de diferenciación genética entre sus poblaciones en un sistema prealpino. Una baja diferenciación genética fue observada en *B. rhodani*, aún a distancias superiores a 100 km, lo cual parece reflejar altas tasas de flujo génico. En *G. fossarum*, se detectó una alta diferenciación genética de sus poblaciones en el sentido del flujo de la red probablemente debido a la limitada capacidad de dispersión que presenta esta especie y al grado de aislamiento que sufren algunas poblaciones respecto de otras redes fluviales vecinas, resultados que son concordantes con los encontrados por Zickovich & Bohonak (2007).

#### **14.2 Estructuración poblacional en *C. dombeyana* y *A. chilensis***

A partir de los resultados de los análisis de varianza AMOVA, se observa que las poblaciones de *C. dombeyana* muestran evidencia de una fuerte diferenciación genética interpoblacional ( $F_{st}=0.32$ ) y levemente inferior en *A. chilensis* ( $F_{st}=0.21$ ). Sin embargo, existen diferencias en la forma en que estos

niveles de estructuración se presentan a largo del área de estudio. En general las poblaciones de *C. dombeyana* presentan valores relativamente homogéneos de estructuración a lo largo de la cuenca, marcado básicamente por la distancia existente entre las localidades, mayor estructuración entre localidades lejanas y escasa estructuración entre localidades vecinas. Con una fuerte influencia de la hidrografía. A diferencia de lo que ocurre en las poblaciones de *A. chilensis*, aquí independientemente de la lejanía existente entre las localidades, existen casos localizados de pares poblacionales con un alto grado de estructuración, como es el caso de la localidad T6, altamente diferenciada. Los análisis de agrupamiento con structure y la distancia ASD entre alelos compartidos, muestran resultados concordantes para cada especie. En ellos se confirma la separación de tres grupos genéticos altamente diferenciados, pero de diferente composición en ambas especies. Principalmente en el caso de *C. dombeyana* las localidades de Chillán se diferencian de la zona tributaria del Río Chillán y de las localidades de Cholguán. Una situación diferente ocurre en las poblaciones de *A. chilensis*. En esta especie las poblaciones del curso de agua principal del río Chillán, incluidas varias localidades del área de tributarios, y las localidades del Río Cholguán forman un grupo homogéneo interconectado, que se separa exclusivamente de un grupo localizado de tres sitios tributarios y del grupo T6, respecto de los cuales presenta un alto grado de divergencia genética.

Una metodología que permite identificar grupos de poblaciones que mantienen intercambio de migrantes corresponde a la topología de graph poblacional (Dyer, 2007). A partir de la identificación de las poblaciones que exhiben una significativa covarianza condicional, se construye una red que establece todas las posibles conexiones entre localidades. La distancia de un graph poblacional (cGD) se considera más sensible y de mayor poder estadístico debido a que esta medida considera la covarianza genética de la totalidad de las poblaciones lo que permitiría una mayor asociatividad para comprender cómo el flujo génico interactúa con las variables espaciales y ecológicas del ambiente (Dyer *et al.*, 2010). En este estudio las topologías de los *graph* poblacionales soportan la diferenciación de los grupos ya inferidos por los análisis de agrupamiento, como por ejemplo, los grupos que han sido identificados por Structure. Principalmente, resulta destacable en la especie de caracol la aparición de un graph independiente para ambas localidades de Cholguán que significa una desconexión entre las localidades de ambos sistemas hidrográficos. Así como, al hecho que la localidad T7 corresponde al único nexo de interconexión entre grupos del curso principal de agua de Chillán y la mayoría de los cursos tributarios del Río Chillán. La mayor conexión en el *graph* de *C. dombeyana* se encuentra restringida al interior de cada subgraph, en concordancia con los resultados de los demás análisis y con las determinaciones contemporáneas de flujo génico. En el caso de las poblaciones de *A. chilensis*, existe un enorme grado de interconexión entre sus poblaciones aún entre aquellas pertenecientes a



diferentes sistemas hidrográficos de los Ríos Chillán y Cholguán. Este gran sistema de conexión reconoce la distinción del grupo tributario reconocido por Structure, pero aparece estableciendo conexiones al grupo principal y por lo tanto no aparecen identificados como graph independientes o de baja conectividad, a diferencia de lo que ocurre con las poblaciones de *C. dombeyana*. Si bien, *A. chilensis* pertenece a un grupo de insectos cuyas características ecológicas y de rasgos de vida han sido presentadas como una condición que permite prever que estos insectos debieran encontrarse principalmente sometidos a la fuerza de la deriva de las corrientes del flujo hídrico (Gray, 2003). Los resultados que aquí han sido presentados demuestran que si bien ellos son individuos capaces de sufrir dispersión pasiva, la topología de la red en sí tiene un menor efecto sobre el grado de estructuración que presentan sus poblaciones, siendo capaces de realizar una dispersión activa contracorriente y entre diferentes sistemas hidrográficos. Eso sugiere fuertemente una mayor capacidad de dispersión, en comparación a *C. dombeyana*, cuyo patrón de fuerte estructuración da señales significativas de que sus poblaciones no están experimentando altas tasas de flujo génico y que, en base a los análisis de autocorrelación espacial, las conexiones de migración entre sus poblaciones ocurriría principalmente entre poblaciones vecinas (distancias (cGD) <28 km).

### ***14.3 Efecto de la hidrografía (topografía) y la distancia geográfica sobre la diferenciación poblacional***

Como disciplina, la genética del paisaje ha avanzado considerablemente en el desarrollo de métodos estadísticos que relacionen datos genéticos con las características del ambiente (Murphy *et al.* 2008; Balkenhol *et al.* 2009; Cushman & Landguth 2010), que pueden limitar o facilitar la conectividad entre poblaciones (Storfer *et al.*, 2010). Uno de sus principales objetivos es comprender como la geografía da forma a la composición genética de las poblaciones (Storfer *et al.*, 2007) y entre las distintas aplicaciones metodológicas, el algoritmo de StreamTree permite mapear diferencias genéticas entre poblaciones asignando las distancias genéticas a las diferentes secciones de la red hidrográfica, aquello permite describir la distribución espacial de la diversidad genética (Kalinowski *et al.*, 2008).

Los procesos de dispersión que tienen lugar en *C. dombeyana* ocurren en el sentido de la red y por lo tanto la topología sería un factor que influencia su estructura poblacional. En esta especie, las distancias genéticas entre localidades muestreadas fueron relacionadas a los segmentos hidrográficos de la red (STREAMTREE, Fig. 16;  $R^2 = 0.780$ ). Eso es un aspecto clave considerando que la habilidad que tienen los organismos para desplazarse a través del terreno es crítico para la mantención de las poblaciones (Fahrig, 2003; Cushman, 2006b; Lindenmayer & Fischer, 2007) y dado que la estructura

poblacional de esta especie se encuentra bajo la influencia de la jerarquía de la red hidrográfica, aquello estaría de acuerdo al modelo de aislamiento por distancia que presenta *C. dombeyana*. Por el contrario, los análisis con StreamTree muestran un menor ajuste del modelo a la estructura genética de *A. chilensis* ( $R^2 = 0.476$ ; Fig. 22A), cuyas poblaciones muestran evidencia de una menor influencia de la topografía de la red sobre la estructuración de sus poblaciones, así como de la distancia geográfica que no resuelve una correlación significativa entre la distancia genética y geográfica.

#### 14.4 Aspectos demográficos de las poblaciones *C. dombeyana* y *A. chilensis*

El tamaño efectivo ( $N_e$ ) es una medida útil para conocer el potencial de pérdida de la diversidad genética, así como el potencial evolutivo que las especies tienen (Tallmon *et al.*, 2010). Además, los estudios comparativos que permiten obtener estimaciones de  $N_e$  a partir de múltiples poblaciones y en más de una especie pueden ayudar a generar hipótesis acerca de los factores biológicos que influyen los  $N_e$  en las especies (Phillipsen *et al.*, 2010). Las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis* muestran evidencia de un patrón generalizado de bajos tamaños efectivos ( $N_e$ ). Un flujo génico restringido como el que se aprecia en las poblaciones de *C. dombeyana*, limitado dentro de un sistema dendrítico por la distancia y confinada a establecer conexiones con las localidades vecinas, resuelve no sólo un elevado nivel de estructuración poblacional sino que también refleja episodios de inestabilidades demográficas (localidad E6).

Las comparaciones de estimaciones temporales y contemporáneas dan evidencia de un descenso progresivo de los tamaños efectivos de gran parte de las poblaciones en ambas especies (E2-E4-E6-T9 y T12). Una reducción de los tamaños efectivos poblacionales también ha afectado aunque en menor medida a las poblaciones del insecto y existe evidencia para dos localidades (E2 y E4) que las poblaciones de *A. chilensis* son capaces de sufrir episodios de cuello de botella. Resulta esperable que dependiendo de las capacidades de dispersión, rasgos de historia de vida y las condiciones del entorno, la capacidad de respuesta que las poblaciones de estas especies tienen para enfrentar una fase de recuperación posterior a un evento de cuello de botella sea diferente. Las poblaciones de *C. dombeyana*, de igual modo que cualquier especie confinada a un medio acuático y con una baja habilidad dispersiva, frente a condiciones que resulten menos favorables no tienen la posibilidad de colonizar otros hábitat. Por ello, para las poblaciones de tamaño reducido y aisladas, los efectos de la deriva genética pueden ser muy drásticos. Sin embargo, frente a episodios comunes que afectan a las poblaciones de ambas especies, reduciendo sus tamaños poblacionales y sufriendo inestabilidades demográficas, más allá de particulares factores biológicos, la consistencia de estos episodios permiten suponer que otras características tienen la potencialidad de actuar sobre sus poblaciones, como las

condiciones del hábitat o las características del ambiente que tornan las condiciones adversas para la estabilidad demográfica de las poblaciones.

Algunos autores han intentado establecer el menor tamaño de la población en el cual el impacto de los factores genéticos sea mínimo, sugiriendo valores de  $N_e = 50$ , para minimizar la depresión por endocruzamiento a corto plazo, y de  $N_e = 500$ , para mantener suficiente potencial evolutivo a largo plazo (Franklin, 1980; Lande, 1988; Franklin & Frankham, 1998; Lynch & Lande, 1998; Palstra & Ruzante, 2008). Por ello, las estimaciones de  $N_e$  pueden ser una importante herramienta en la evaluación de la vulnerabilidad de las poblaciones en peligro de extinción (Mace & Lande, 1991). En este estudio aproximadamente la mitad de las poblaciones de ambas especies presenta un valor levemente superior a  $N_e = 50$  y sólo la población Chol 1 se encuentra dentro de este rango asegurando la mantención de la variabilidad genética de siguientes generaciones poblacionales. Las restantes poblaciones analizadas presentan un  $N_e$  inferior a 50, existiendo el riesgo de que la gran mayoría de las poblaciones en ambas especies no se encuentren en condiciones de asegurar la variabilidad genética de las poblaciones futuras.

#### ***14.5 Efecto de las variables ambientales y espaciales que contribuyen a la diferenciación poblacional en *C. dombeyana* y *A. chilensis****

Si bien los rasgos de historia de vida o las capacidades de dispersión son factores preponderantes en determinar el grado de estructuración y diferenciación de las poblaciones. Sumado a esta condición se encuentran también las condiciones de su entorno, sean éstas espaciales considerando la topografía de red que estos organismos ocupan, características ambientales y/o de calidad de hábitat que de manera aislada o conjunta pueden contribuir a la diferenciación poblacional. Una situación que no es ajena a las alteraciones antropogénicas que han sufrido los ecosistemas acuáticos en las últimas décadas. Cambios en los regímenes de agua y una degradación general de los hábitat acuáticos han cambiado dramáticamente estos ecosistemas (Allan & Castillo, 2007). Los cambios en la configuración del paisaje pueden afectar directamente la diferenciación genética de las poblaciones debido a que son afectados los patrones espaciales de cruzamiento y dispersión de los organismos (Cushman *et al.*, 2012). En este estudio los análisis de partición de varianza muestran diferencias entre ambas especies en la forma en que estas son afectadas en sus patrones de diferenciación poblacional debido a diferentes condiciones físico-químicas, de hábitat y/o espaciales.

Así, en las poblaciones de *C. dombeyana* un 77% de la variación es explicada versus un 25% en las poblaciones del insecto. El mayor porcentaje en *C. dombeyana* es explicado por las condiciones de

hábitat en particular por el diámetro de bolones máximo y medio. Los caracoles se alimentan de hierbas acuáticas y de algas (Valdovinos & Parra, 2006). La superficie de los bolones cubiertos de algas corresponden a fuentes de alimento y soporte favoreciendo la adhesión al sustrato, como sitios de oviposición, pueden servir además como protección a depredadores y a las corrientes de agua en ambientes de aguas más rápidas oponiendo resistencia a ser arrastrados por la corriente. Un estudio realizado en *Chilina flumigea* señala que la principal razón de la disminución de la densidad de sus poblaciones fue la modificación ambiental que sufrió su hábitat debido a la remoción de sustratos duros como bolones y troncos desde el fondo del canal debido a que estos sustratos les sirven no sólo como sitios de sujeción para los adultos sino también para la oviposición, lo que finalmente tiene una significativa influencia sobre la estabilidad de sus poblaciones (Gutierrez *et al.*, 2012).

Entre los parámetros físico-químicos, la conductividad y el fósforo orgánico, sugieren una cierta vulnerabilidad de la especie a procesos de contaminación. La cuenca del Itata ha sido sometida a intervenciones antropogénicas que alteran la calidad de su entorno, por ejemplo extracciones de áridos directamente del lecho del río (Valdovinos, 2006), y su uso destinado principalmente a las actividades agrícolas y como fuente de agua potable para la ciudad de Chillán. La intensidad de la agricultura en el mundo ha aumentado significativamente durante los últimos 30 años, y debido a las modificaciones en el uso del suelo se han potenciado los efectos negativos en la química del agua (Melian *et al.*, 1999; Rodvang & Simpkins, 2001, González *et al.*, 2003). Incrementando la contaminación de las aguas por la presencia de nutrientes, principalmente fosfatos de origen urbano y nitratos de procedencia agrícola, especialmente de los fertilizantes aplicados y por ende asociados con la agricultura como contaminantes del agua (McLaughlin *et al.*, 1985, Gonzalez *et al.*, 2003). En *C. dombeyana* la conductividad y el fósforo orgánico son variables que influyen y explican individualmente un 6% de la varianza respecto del grado de diferenciación genética de las poblaciones. Sin embargo, en las poblaciones del insecto *A. chilensis* la concentración de nitratos con valores elevados en las poblaciones T6, T9, T12 (0.43- 0.73) y la demanda química de oxígeno, corresponden a los parámetros que explican de manera individual un 13% lo que es equivalente a la mitad de la fracción de la varianza total explicada para esta especie. Aquello hace inferir que estos organismos son importantemente afectados por procesos de contaminación (calidad del agua), lo que sumado a una pequeña fracción que aportan las condiciones espaciales (hidrografía) y en menor proporción la variabilidad en los regímenes de velocidad (3%) logran explicar un cuarto de la divergencia genética de sus poblaciones. A pesar de la menor habilidad dispersiva de *C. dombeyana*, mayor vulnerabilidad y menor tolerancia a las perturbaciones respecto de una mala calidad de agua que *A. chilensis* (Figuroa, *et al.*, 2007), las

características físico-químicas afectan en mayor medida a las poblaciones del insecto. Si bien, en las poblaciones de *C. dombeyana*, las características físico-químicas, espaciales y de hábitat en conjunto tienen un mayor efecto y explican una mayor proporción de la diferenciación de sus poblaciones que en *A. chilensis*, y a pesar de que pueda existir una correlación entre las variables, que incremente el porcentaje de la fracción explicada en *C. dombeyana*, indudablemente existe un efecto más drástico de estos componentes que contribuyen en mayor medida a la diferenciación poblacional de esta especie.



## 15.0 CONCLUSIONES GENERALES

Respecto de **H1**: se observa una mayor concordancia en las historias evolutivas y demográficas entre poblaciones de especies con similares características de historia de vida y habilidades dispersivas.

- I. En base a los marcadores mitocondriales, los análisis de anidamiento de clados revelan la influencia de factores históricos principalmente de eventos de fragmentación pasada y expansión de rango contiguo sobre los patrones de diferenciación y estructuración poblacional de las especies acuáticas obligadas. Un patrón filogeográfico congruente ocurre entre las poblaciones de *A. araucaniensis* y *C. dombeyana* y pone en evidencia que sus poblaciones pueden ser afectadas de un modo similar, presentando evidencia de inestabilidades demográficas con resultados que señalan que sus poblaciones pueden haber sufrido eventos de cuello de botella. Las poblaciones del insecto muestran menores señales históricas de fragmentación y diferenciación poblacional, aquello debido probablemente a las diferentes habilidades dispersivas respecto de las demás especies y de un mayor nivel de tolerancia que éstas tienen para sobreponerse a las condiciones de un entorno menos favorable. Apoyado además en la potencialidad de establecer un flujo génico entre los sistemas hidrográficos de Chillán y Cholguán mediado por algunos individuos macrópteros. Sin embargo, y aunque no mutuamente excluyente se postula que en base a la distribución haplotípica de las especies de macroinvertebrados analizadas que pudo existir una conexión ancestral andina que pudo conectar los sistemas hidrográficos de Chillán y Cholguán y que posteriormente quedaron aislados.
- II. Los análisis contemporáneos en base a marcadores microsatélites fueron aplicados a las poblaciones de *C. dombeyana* y *A. chilensis*, en función de su representatividad a lo largo del área de estudio. Los resultados obtenidos bajo el marco de un estudio de genética del paisaje, permiten concluir que existen diferencias en el patrón de diferenciación y nivel de estructuración que presentan estas especies. En particular y en conformidad a lo planteado por las hipótesis se observa:

Respecto de **H2**: las poblaciones de *C. dombeyana* presentan una mayor influencia de la hidrografía, niveles superiores de diferenciación genética y estructuración poblacional que las poblaciones de *A. chilensis*.

a) Las poblaciones de *C. dombeyana* presentan un nivel de variabilidad genética levemente inferior que las poblaciones del insecto y que esta variabilidad en la especie de caracol disminuye hacia las localidades ubicadas río arriba de las zonas de confluencia de la desembocadura del Río Chillán, no existiendo señales significativas de que aquello ocurra en *A. chilensis*. Aquello explicado en función de las diferencias en las habilidades y la forma en la que ocurren los procesos de dispersión.

b) Existe evidencia de altos niveles de estructuración genética en las poblaciones de ambas especies. Sin embargo, para las poblaciones de *A. chilensis* este nivel es levemente inferior y explicado principalmente por la enorme diferenciación impuesta respecto de algunas localidades, principalmente el sitio T6. No obstante, en *A. chilensis* se resuelve un grupo principal de gran interconexión y que comprende localidades distantes.

c) Los análisis de agrupamiento establecen diferencias respecto de la asociación entre localidades que conforman los grupos diferenciados. Para *C. dombeyana* los cursos de agua principal del Río Chillán incluido T7 se diferencian de los sitios de los sectores tributarios y de ambas localidades del Río Cholguán. Para las poblaciones de *A. chilensis*, la situación es diferente. Aquí las poblaciones del principal curso de agua del Río Chillán, incluido T7, más algunas localidades del área de tributarios del mismo río y ambas localidades ubicadas en Cholguán forman parte de un mismo grupo y que se diferencian exclusivamente de las localidades T8-T9-T12 que integran un segundo grupo y de la localidad T6 que se manifiesta altamente diferenciada y que conforma un tercer grupo independiente.

d) Los resultados muestran evidencia que las poblaciones de *C. dombeyana* a diferencia de las poblaciones del insecto, se adecúan a un patrón de aislamiento por distancia, que sus poblaciones son más influenciadas por la hidrografía del sistema de redes fluviales y que muestra evidencia de autocorrelación espacial que permite identificar en base a una matriz de distancia genética condicional una mayor similitud genética entre las localidades vecinas menores a una distancia de 28 km. Existe también diferencias en las tasas de migración contemporáneas entre ambas especies que apoyan los resultados de un flujo génico de mayores distancias en *A. chilensis* y restringido a localidades vecinas en *C. dombeyana*.

Respecto de **H3**, En un gradiente lineal y río abajo, se encuentran las zonas más perturbadas de la cuenca y en donde se aprecian reducciones de los tamaños efectivos ( $N_e$ ). Sin embargo, los resultados muestran evidencia para ambas especies de un patrón general de bajos tamaños efectivos con evidencia



de una reducción histórica de  $N_e$ , con un efecto levemente superior en las poblaciones de *C. dombeyana*.

e) Existe evidencia de un patrón generalizado de bajos tamaños efectivos poblacionales ( $N_e$ ) en general para ambas especies y un decrecimiento histórico establecido en base a comparaciones entre estimaciones de largo plazo y contemporáneas. Algunas localidades muestran señales de inestabilidad demográfica debido a episodios de cuello de botella. Aunque no es factible discernir diferencias significativas entre las especies en función de la calidad del agua.

Respecto de **H4**: *C. dombeyana* resulta significativamente afectada por las condiciones de Hábitat. Sin embargo, y a pesar de que sus poblaciones son afectadas por la calidad del agua. Contrario a lo que se esperaba las poblaciones del insecto *A. chilensis* resultan más afectadas por las características físico-químicas que dan cuenta de la calidad del agua.

f) La diferenciación poblacional en *C. dombeyana* es explicada principalmente por las características del hábitat respecto del tamaño de bolones, que pueden servir de protección a modo de sujeción, como sitios de oviposición y evitar el efecto de las corrientes del agua. En el caso de las poblaciones de *A. chilensis* el mayor porcentaje de la varianza explicado en esta especie corresponde a las características físico-químicas que dan cuenta de la calidad del agua. Principalmente por contaminantes de origen agrícola. Un 77% de la varianza logra ser explicado en *C. dombeyana* y un 25% en *A. chilensis*.

Finalmente, las poblaciones de estas dos especies de macroinvertebrados consideradas en la literatura con diferentes grados de tolerancia a la contaminación ambiental, muestran evidencia significativa de diferenciación y estructuración poblacional a una fina escala espacial. Los resultados señalan la situación de vulnerabilidad a la que quedarían expuestas varias de sus poblaciones si las condiciones del entorno aumentan el nivel de deterioro de sus aguas principalmente en la zona baja de la cuenca. Las poblaciones de *C. dombeyana* necesitan de un entorno de una buena calidad de hábitat, especialmente en función del sustrato que ellas utilizan. De aquí los efectos perjudiciales que tendrían las alteraciones realizadas directamente sobre su hábitat. Además, de los perjudiciales efectos que tiene una mala calidad de agua, producto de los contaminantes urbanos y agrícolas especialmente en el insecto para aquellas localidades que presentan elevados niveles de nitrato en sus aguas, pero que igualmente afecta a las poblaciones de ambas especies. Naturalmente frente a condiciones de un entorno deteriorado, es potencialmente esperable que si esta situación no mejora muchas de estas poblaciones puedan sufrir procesos de extinciones locales en el tiempo y por ello, resulta necesario

realizar estudios temporales que permitan monitorear la situación de vulnerabilidad en la que se encuentran estas poblaciones y así poder identificar poblaciones con capacidad de mantener variabilidad genética y con prioridad de conservación o establecer planes de restauración de hábitat o de protección en aquellos hábitat que presentan poblaciones más estables demográficamente.



## 16.0 BIBLIOGRAFIA

- Alexandrino J., Arntzen J.W. & Ferrand N. (2002) Nested clade analysis and the genetic evidence for population expansion in the phylogeography of the golden-striped salamander, *Chioglossa lusitanica* (Amphibia: Urodela). *Heredity*, **88**: 66–74.
- Abell R. (2002) Conservation biology for the biodiversity crisis: A freshwater follow-up. *Conservation Biology*, **16**: 1435-1437.
- Abell R., Thieme M.L., Revenga C., Bryer M., Kottelat M., Bogutskaya N., Coad B., Mandrak N., Contreras S., Bussing W., Stiassny M., Skelton P., Allen G., Unmack P., Naseka A., NG R., Sindorf n., Robertson J., Armijo E., Higgins J., Heibel T.J., Wikramanayake E., Olson D., Lopez H.L, Reis R. E., Lundberg J.G., Sabaj M.H & Petry P. (2008) Freshwater ecoregions of the world: A new map of biogeographic units for freshwater biodiversity Conservation. *Bioscience*, **58**(5): 403-414.
- Aguilar R., Quesada M., Ashword L., Herrerias-diego Y. & Lobo J. (2008) Genetic consequences of hábitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, **17**: 5177-5188.
- Allendorf F.W. & Luikart G. (2007) Conservation and the genetics of populations. Blackwell Publishing Ltd, Malden, USA. 69-71pp.
- Andersen N.M. (1982) The semiaquatic bugs (Hemiptera: Gerromorpha): phylogeny, adaptations, biogeography and classification. *Entomograph*, **3**:1-455.
- Andersen N.M. & Polhemus J.T. (1976) Water-striders (Hemiptera: Gerridae, Veliidae, etc.). In: Cheng L (ed) Marine insects. North Holland, Amsterdam, p 187-224.
- Apte S., Smith P.J. & Wallis G.P. (2007) Mitochondrial phylogeography of New Zealand freshwater Crayfishes *Paranephrops* spp. *Molecular Ecology*, **16**:1897-1908.
- Avise J.C. (2000) Phylogeography: The history and formation of species. Harvard University Press. Cambridge, Massachusetts.
- Avise J.C. (2004) Molecular Markers, Natural History, and Evolution, 2nd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Ayllón D., Almodóvar A., Nicola G.,Parra I. & Elvira B. (2012) A new biological indicator to assess The ecological status of Mediterranean trout type streams. *Ecological indicators*, **20**: 295 303.
- Bahamonde N., Carvacho A., Jara C., López M., Ponce F., Retamal M.A., Rudolph E. (1998)

Categorías de conservación de decápodos nativos de aguas continentales de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*, **47**: 91-100.

- Baker A.M., Sheldon F., Somerville J., Walker K.F. & Hughes J.M. (2004) Mitochondrial DNA phylogenetic structuring suggests similarity between two morphologically plastic genera of Australian freshwater mussels (Unionida: Hyriidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **32**: 902-912.
- Balkenhol N., Waits L.P., Dezzani R. (2009) Statistical approaches in landscape genetics: an evaluation of methods for linking landscape and genetic data. *Ecography*, **32**: 818–830.
- Barber B.R., Xu J., Pérez-Losada M., Jara C.G., Crandall K.A. (2012) Conflicting evolutionary Patterns due to Mitochondrial introgression and multilocus phylogeography of the patagonian freshwater crab *Aegla neuquensis*. *Plos One*, **7**(6): e37105. Doi: 10.1371/journal.pone.0037105.
- Barson N.J., Cable J., Van Oosterhout C. (2009) Population genetic analysis of microsatellite variation of guppies (Poeciliareticulata) in Trinidad and Tobago: evidence for a dynamic source–sink metapopulation structure, founder events and population bottlenecks. *Journal of Evolutionary Biology*, **22**: 485-497. doi:10.1111/j.1420-9101.2008.01675.x
- Barrowclough G.F. & Zink R.M. (2009) Funds enough, and time: mtDNA, nuDNA and the discovery of divergence. *Molecular Ecology*, **18**: 2934–2936.
- Brace R.C. (1983) Observations on the Morphology and Behaviour of *Chilina fluctuosa* Gray (Chiliniidae), with a discussion on the Early Evolution of Pulmonate Gastropods. *Philosophical transactions. The Royal Society. Biological Sciences*, **300**: 463-491.
- Brooks T.M., Mittermeier R.A., Mittermeier C.G., da Fonseca G.A.B., Rylands A.B., Konstant W.R., Flick P., Pilgrim J., Oldfield S., Magin G. & Hilton-Taylor C. (2002) Habitat loss and extinction in the hotspots of biodiversity. *Conservation Biology*, **16**: 909-923.
- Beheregaray L.B. (2008) Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for The Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, **17**: 3754–3774.
- Behura S. (2006) Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues. *Molecular Ecology*, **15**: 3087–3113.
- Bendell B.E. (1988) Lake acidity and the distribution and abundance of water striders (Hemiptera: Gerridae) near Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Zoology*, **66**(10): 2209-2211. Doi: 10.1139/z88-328
- Bengtsson B.O. & Cronberg N. (2009) The effective size of bryophyte populations. *Journal of Theoretical Biology*. **258**: 121–126.

- Bernatchez L. & Wilson C.C. (1998) Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology*, **7**: 431-452.
- Bertin A., Ruíz V.H., Figueroa R. & Gouin N. (2012) The role of spatial processes and environmental determinants in microgeographic shell variation of the freshwater snail *Chilina dombeyana* (Bruguière, 1789). *Naturwissenschaften*. Doi 10.1007/s00114-012-0890-8.
- Bijlsma R., Bundgaard J. & Boerema A. (2000) Does inbreeding affect the extinction risk of small populations?: predictions from *Drosophila*. *Journal of Evolutionary Biology*, **13**: 502–514.
- Bisol P.M., Alay F., Gavilan J.F., Gonzalez F. & Cabello J. (1994) Influencias del ambiente sobre la estructura genética de dos poblaciones de *Chilina dombeyana* (Bruguiere, 1789) (Mollusca: Pulmonata) del río Bio-Bío. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* (Chile), **65**: 181-185.
- Bohonak A. & Jenkins D. (2003) Ecological and evolutionary significance of dispersal by freshwater invertebrates. *Ecology letters*, **6**:783-796.
- Bond-Buckup G., Jara C.G., Pérez-Losada M., Buckup L., *et al.* (2008) Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**: 267-273.
- Bond-Buckup G., Jara C.G., Buckup L. & Bueno A.A.P. (2010a) Description of a new species of Aeglidae, and new records of related species from river basins in Argentina (Crustacea, Anomura). *Zootaxa*, **2343**: 18-30.
- Bond-Buckup G., Jara C.G., Buckup L., Pérez-Losada M., Bueno A.A.P., Crandall K.A & Santos S. (2010b) New species and new records of endemic freshwater crabs from the Atlantic forest in southern Brazil (Crustacea, Anomura, Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology*, **30**(3): 495–502.
- Boore J.L. (1999) Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, **27**(8): 1767-1780.
- Bücker F., Gonçalves R., Bond-Buckup G. & Melo, A.S. (2008) Effect of environmental variables on the distribution of two freshwater crabs (Anomura: Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology*, **28**(2): 248- 251.
- Buffagni A., Crosa G.A., Harper D.M. & Kemp J.L. (2000) Using macroinvertebrate species Assemblages to identify river channel habitat units: an application of the functional habitats concept to a large, unpolluted Italian river (River Ticino, northern Italy). *Hydrobiologia*, **435**: 213–225.
- Brown B.L., Swan C.M. (2010) Dendritic network structure constrains metacommunity properties in riverine ecosystems. *Journal of Animal Ecology*, **79**: 571–580. Doi: 10.1111/j.1365-2656.2010.01668.x

- Bruford M.W., Hanotte O., Brookfield, J.F.Y. & Burke T. (1992) Single-locus and multilocus DNA fingerprint. In: Hoelzel AR (eds), *Molecular Genetic Analysis of Populations: A Practical Approach*. IRL Press, Oxford, pp 225–270.
- Calabrese D.M. (1979) Pterygomorphism in 10 Nearctic species of Gem's. *The American Midland Naturalist*, **101**: 61–68.
- Cambell-Grant E.H.C., Lowe W.H. & Fagan W.F. (2007) Living in the branches: population dynamics And ecological processes in dendritic networks. *Ecology Letters*, **10**: 165–175.
- Clarke A., Mac Nally R., Bond N. & Lake P.S. (2008) Macroinvertebrate diversity in headwater streams: a review. *Freshwater Biology*, **53**: 1707-1721.
- Carroll S.P., Hendry A.P., Reznick D.N. and Fox C.W. (2007) Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology*, **21**: 387–393.
- Castro-Souza T. & G. Bond-Buckup (2004) O nicho trófico de duas espécies simpátricas de Aegla Leach (Crustacea, Aeglidae) no tributário da Bacia do Rio Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **21**: 805-813.
- Chakraborty R., Srinivasan M.R. & Daiger S.P. (1993) Evaluation of Standard Error and Confidence Interval of Estimated Multilocus Genotype Probabilities, and Their Implications in DNA Forensics. *American Journal Human Genetics*, **52**: 60-70.
- Chickhi L. & Bruford, M. (2005) Mammalian population Genetics and Genomics. *Mammalian Genomics*, **21**, 539-584.
- Clement M., Posada D. & Crandall K.A. (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**: 1657–1659.
- Cliff A.D. & Ord J.K. (1981) *Spatial Processes: Models and Applications*, London: Pion.
- Cook B.D., Kennard M.J., Real K., Pusey B.J. & Hughes J.M. (2010) Landscape genetic analysis of the tropical freshwater fish *Mogurnda mogurnda* (Eleotridae) in a monsoonal river basin: importance of hydrographic factors and population history. *Freshwater Biology*, doi: 10.1111/j.1365-2427.2010.02527.x
- Cook B.D., Kennard M.J., Real K., Pusey B.J. & Hughes J.M. (2010) Landscape genetic analysis of the tropical freshwater fish *Mogurnda mogurnda* (Eleotridae) in a monsoonal river basin: importance of hydrographic factors and population history. *Freshwater Biology*, doi: 10.1111/j.1365-2427.2010.02527.x
- Crandall K.A., Bininda-Emonds O.R.P., Mace G. & Wayne R.K. (2000) Considering evolutionary Processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, **15**: 290–295.
- Crandall K.A., Robison H.W. & Buhay J.E. (2009) Avoidance of extinction through nonexistence: the

- use of Museum specimens and molecular genetics to determine the taxonomic status of an endangered freshwater crayfish. *Conservation Genetic*, **10**: 177–189.
- Crandall KA, Santos SG, Bond-Buckup G, Perez Losada M, Jara C, Buckup L. (2010) New records and description of a new species of Aeglidae (Crustacea, Anomura) from river basins in Southern Brazil. *Nauplius*, **18**(1): 79-86.
- Cressie N.A. (1991) Statistics for spatial data. John Wiley & Sons, Inc., New York, N.Y. 900p.
- Cushman S.A., Mckelvey K.S., Hayden J. & Schwartz M.K. (2006a) Gene flow in complex landscapes: testing multiple hypotheses with causal modeling. *The American Naturalist*, **168**(4): 486-499.
- Cushman SA (2006b) Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: a review and prospectus. *Biological Conservation*, **128**: 231–240.
- Cushman S.A., Shirk A. & Landguth E.L. (2012) Separating the effects of habitat area, fragmentation and matrix resistance on genetic differentiation in complex landscapes. *Landscape Ecology*, **27**: 369–380. DOI 10.1007/s10980-011-9693-0
- Dale M.R.T. (1999) Spatial Pattern Analysis in Plant Ecology, Cambridge: Cambridge University Press.
- Dale M.R.T. & Fortin M-J. (2002) “Spatial Autocorrelation and Statistical Tests in Ecology,” *Écoscience*, **9**: 162–167.
- Dale M.R.T. & Fortin M.J. (2009) Spatial autocorrelation and statistical tests: some solutions. American Statistical Association and the International Biometric Society. *Journal of Agricultural, Biological, and Environmental Statistics*, **14** (2): 188–206. Doi: 10.1198/jabes.2009.0012.
- Damgaard J. (2008) Evolution of the semi-aquatic bugs (Hemiptera: Heteroptera: Gerromorpha) with a reinterpretation of the fossil record. *Acta entomológica Musei Nationalis Pragae*, **48**(2): 251-268.
- Damgaard J. & Cognato A.I. (2003) Sources of character conflict in a clade of water striders (Heteroptera: Gerridae). *Cladistics*, **19**(6): 512–526.
- Damgaard J. & Cognato A.I. (2005) Phylogeny and reclassification of species groups in *Aquarius* Schellenberg, *Limnporus* Stal and *Gerris* Fabricius (Insecta: Hemiptera-Heteroptera, Gerridae). *Systematic Entomology*, **31**(1): 93–112.
- Damgaard J. & Cognato A.I. (2006) Phylogeny and reclassification of species groups in *Aquarius* Schellenberg, *Limnporus* Stal and *Gerris* Fabricius (Insecta: Hemiptera-Heteroptera, Gerridae). *Systematic Entomology*, **31**: 93-112.
- Damgaard J. (2012) What about we know about the phylogeny of the semi-aquatic Bugs (Hemiptera:



Heteroptera: Gerromorpha)?. *Entomologica Americana*, **118**(1): 81-98. Doi: 10.1664/12-RA-030.1

- Daniels S.R., Gouws G. & Crandall K.A. (2006) Phylogeographic patterning in a freshwater crab species (Decapoda: Potamonautidae: Potamonautes) reveals the signature of historical climatic oscillations. *Journal of Biogeography*, **33**: 1538–1549.
- Debels P., Figueroa R., Urrutia R., Barra R. & Niell X. (2005) Evaluation of water quality in the Chillán River (Central Chile) using physicochemical parameters and a modified water quality index. *Environmental Monitoring and Assessment*, **110**: 301-322.
- Decout S., Manel S., Miaud C. & Luque S. (2012) Integrative approach for landscape-based graph connectivity analysis: a case study with the common frog (*Rana temporaria*) in human-dominated landscapes. *Landscape Ecology*, **27**:267–279. DOI 10.1007/s10980-011-9694-z
- Di Rienzo A., Peterson A.C., Garza J.C., Valdes A.M., Slatkin M. & Freimer N.B. (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **91**: 3166-3170.
- Dudgeon D., Arthington A.H., Gessner M.O., Kawabata Z-I., Knowler D.J. (2006) Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. *Biological reviews*, **81**: 163-182.
- Dobson A., Lodge D., Alder J. *et al.*, (2006) Habitat loss, trophic collapse, and the decline of ecosystem services. *Ecology*, **87**: 1915–1924.
- Donnelly M.J. & Twonson H. (2000) Evidence for extensive genetic differentiation among populations of the malaria vector *Anopheles arabiensis* eastern Africa. *Insect Molecular Biology*, **9**: 357-367
- Dyer RJ, Nason JD (2004) Population graphs: the graph theoretic shape of genetic structure. *Molecular Ecology*, **13**, 1713–1727.
- Dyer RJ (2009) Genetic Studio: a suite of programs for spatial analysis of genetic-marker data. *Molecular Ecology Resources*, **9**: 110–113.
- Dyer R. J. (2007) The evolution of genetic topologies. *Theoretical Population Biology*, **71**: 71–79.
- Dyer R.J., Nason J.D. & Garrick R.C. (2010) Landscape modelling of gene flow: improved power using conditional genetic distance derived from the topology of population networks. *Molecular Ecology*, **19**: 3746-3759.
- Epperson B.K. (1993) Spatial and Space-Time correlations in System of subpopulations with genetic drift and migration. *Genetics*, **133**:711-727.
- Escobar J.S., Auld J.R., Correa A.C., Alonso J.M., Bony Y.K., Coutellec M.A., Koene J.M., Pointier J.P., Jarne P. & David P. (2011) Patterns of mating-system evolution in hermaphroditic animals:

- Correlations among selfing rate, inbreeding depression and the timing of reproduction. *Evolution*, **65**(5): 1233–1253. doi:10.1111/j.1558-5646.2011.01218.x
- Evanno G., Regnaut S. & Goudet J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, **14**: 2611–2620.
- Excoffier L, Laval G & Schneider, S. (2005) Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics* online, **1**: 47–50.
- Fahrig L. (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, **34**: 487–515.
- Faulks L.K., Gilligan D.M. & Beheregaray L.B. (2010) Evolution and maintenance of divergent lineages in an endangered freshwater fish, *Macquaria australasica*. *Conservation Genetics*, **11**: 921-934. Doi: 10.1007/s10592-009-9936-7.
- Fagan W.F. (2002) Connectivity, fragmentation and extinction risk in dendritic metapopulations. *Ecology*, **83**: 3243–3249
- Fagan W.F., Aumann C., Kennedy C.M. & Unmack P.J. (2005) Rarity, fragmentation, and the scale dependence of extinction-risk in desert fishes. *Ecology*, **86**: 34–41.
- Fairbairn D.J. (1984) Microgeographic variation in body size and development time in the waterstrider, *Limnopus notabilis*. *Oecologia*, **61**: 126-133.
- Fairbairn D.J. (1986) Does alary dimorphism imply dispersal dimorphism in the waterstrider, *Gerris remigis*?. *Ecological Entomology*, **11**: 355-368.
- Fairbairn D.J. & Desranleau L. (1987) Flight threshold, wing muscle histolysis, and alary polymorphism: Correlated traits for dispersal tendency in the Gerridae. *Ecological Entomology*, **12**: 13-24.
- Fahrig L. & Merriam G. (1994) Conservation of fragmented populations. *Conservation Biology*, **8**:50-59. Doi:10.1046/j.1523-1739.1994.08010050.x
- Faubet P. & Gaggiotti O. (2008) A new Bayesian method to identify the environmental factors that influence recent migration. *Genetics*, **178**: 1491-1504
- Feulner P., Bielfeldt W., Zachos F.E., Bradvarovic J., Eckert I. & GB Hartl G.B. (2004) Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). *Heredity*, **93**: 299–306.
- Figuroa R., Palma A., Ruiz V. & Niell X. (2007) Análisis comparativo de índices bióticos utilizados en la evaluación de la calidad de las aguas en un río mediterráneo de Chile: río Chillán, VIII Región. *Revista chilena de Historia Natural*. **80**(2): 225-242.
- Firko M.J. (1986) Comparative life history evolution in the waterstrider, *Gerris remigis*. PhD thesis.

University Pennsylvania, Philadelphia. 220 pp.

- Foll M. & Gaggiotti O. (2006) Identifying the environmental factors that determine the genetic structure of populations. *Genetics*, **174**: 875–891.
- Frankham R. (2005). Genetics and extinction. *Biological Conservation*, **126**: 131-140.
- Frankham R. & Kingslover J.G. (2004) Response to environmental change: Adaptation or extinction. In: *Evolutionary Conservation Biology*. (Eds. Ferrier, R., Dieckman, U., Couvet, D.), pp. 85–100. Cambridge. University Press, Cambridge.
- Franklin I.R. (1980) Evolutionary change in small populations. In: *Conservation Biology An Evolutionary-Ecological Perspective* (Eds. Soule ME, Wilcox BA), pp. 135–150. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.
- Franklin I.R. & Frankham R. (1998) How large must populations be to retain evolutionary potential? *Animal Conservation*, **1**, 69–73.
- Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**: 915–925.
- Ganzhorn J., Goodman S., Dehgan A. (2003) Effects of forest fragmentation on small mammals and lemurs. In: *The Natural History of Madagascar* (eds Goodman SM, Benstead JP), pp. 1228–1234. University of Chicago Press, Chicago.
- Gao X. & Starmer J. (2007) Human population structure detection via multilocus genotype clustering. *BMC Genetics*, **8**: 34. Doi: 10.1186/1471-2156-8-34
- Gomi T., Sidle R.C. & Richardson J.S. (2002) Understanding processes and downstream linkages of Headwater systems. *BioScience*, **52**: 905–916.
- González L., González A. & Mardones M. (2003) Evaluación de la vulnerabilidad natural del acuífero freático en la cuenca del río Laja, centro-sur de Chile. *Revista geológica de Chile*, **30**(1): 3-22. Doi.org/10.4067/S0716-02082003000100001
- Goodman S.J., Tamate H.B., Wilson R., Nagata J., Tatsuzawa S., Swanson G.M., Pemberton J.M. & McCullough D.R. (2001) Bottlenecks, drift and differentiation: the population structure and demographic history of sika deer (*Cervus nippon*) in the Japanese archipelago. *Molecular Ecology*, **10**(6): 1357-1370.
- Gouin N., Souty-Grosset C., Bórquez J., Bertin A. & Grandjean F. (2011) Disentangling the impact of demographic factors on population differentiation of an endangered freshwater crayfish (*Austropotamobius pallipes*) using population density and microsatellite data. *Freshwater Biology*, **56**(4): 2105-2118. Doi:10.1111/j.1365-2427.2011.02629.x
- Grant EHC, Green LE & Lowe WH (2009) Salamander occupancy in headwater stream networks.

*Freshwater Biology*, **54**: 1370–1378.

- Gray M. (2003) Notes on invertebrate drift: A pilot study. Annual report. Oneonta State University, Biological Field Station at Cooperstown, 6 p.
- Greco, L. S. L., V. Viau, M. Lavalpe, G. Bond-Buckup, and E. M. Rodriguez (2004) Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology*, **24**: 309-313.
- Grenouillet G., Brosse S., Tudesque L., Lek S., Baraillé Y. & Loot G. (2008) Concordance among Stream assemblages and spatial autocorrelation along a fragmented gradient. *Biodiversity Research*, **14**: 592– 603.
- Guillot G., Estoup A., Mortier F. *et al.* (2005) A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, **170**: 1261–1280.
- Gutiérrez-Gregoric D.E., Núñez V. & Rumi A. (2012) Population Dynamics of Freshwater Gastropod *Chilina fluminea* (Chilinidae) in a Temperate Climate Environment in Argentina. *The Veliger* **51**(3):109–116.
- Hall T.A. (1999) BioEdit: A user friendly biological sequence alignment editor and analysis programme for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, **41**: 95-98.
- Hansen M.M., Olivieri I., Waller D.M., Nielsen E.E. & The GeM Working Group. (2012) Monitoring adaptative genetic responses to environmental change. *Molecular Biology*, **21**: 1311-1329. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05463.x
- Hanski I. (1999) Metapopulation ecology. Oxford University Press, Oxford
- Harpending H.C. (1994) Signature of ancient population-growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**: 591–600.
- Hedrick P.W. (2000) Highly variable loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution*, **53**: 313-318.
- Heino J., Paavola R., Virtanen R. & Muotka T. (2005) Searching for biodiversity indicators in running waters: do bryophytes, macroinvertebrates, and fish show congruent diversity patterns? *Biodiversity and Conservation*, **14**: 415–428.
- Hendry A.P., Farrugia T. & Kinnison M.T. (2008) Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Molecular Ecology*, **17**: 20–29.
- Heusser CJ (2003) Ice age southern Andes: A cronicle of paleoecological events. Developments Quater Sci, 3. Elsevier Press. 238 p.
- Hewitt G.M., (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, **359**: 183–195.

- Hickerson M.J., Carstens B.C., Cavender-Bares J., Crandall K.A., Graham C.H., Johnson J.B., Rissler L., Victoriano P.F. & Yoder A.D. (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**: 291-301. Doi:10.1016/j.ympev.2009.09.016
- Holderegger, R. & Wagner H. H. (2006) A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology*, **21**: 793- 796.
- Holling JT, Schilling DH (1981) Late Wisconsin-Weichselian mountain glaciers and small ice caps. In: Denton GH, Hughes TJ, editors. The last great ice sheet. New York, USA: John Wiley & Sons, Inc. pp. 179–206.
- Howes B.J., Brown J.W., Gibbs H.L., Herman T. B., Mockford S.W., Prior K.A. & Weatherhead P.J. (2008) Directional gene flow patterns in disjunct populations of the black ratsnake (*Pantheropsis obsoletus*) and the Blanding's turtle (*Emydoidea blandingii*). *Conservation Genetics*, **10**: 407–417. DOI 10.1007/s10592-008-9607-0
- Hudson R.R. (1989) How often are polymorphic restriction sites due to single mutation? *Theoretical Population Biology*, **36**: 23–33.
- Huey J. A., Hughes J.M., Baker A.M. (2006) Patterns of gene flow in two species of eel-tailed catfish, *Neosilurus hyrtlii* and *Porochilus argenteus* (Siluriformes: Plotosidae), in western Queensland's dryland rivers. *Biological Journal of the Linnean Society*, **87**: 457-467.
- Hufbauer R.A & Torchin M.E. (2007) Integrating ecological and evolutionary theory of biological invasions. Pp. 79-96 In: *Biological Invasions: Ecological Studies*, Vol. 193. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Hughes J.M., Mather P.B., Sheldon A.L. & Allendorf F.W. (1999) Genetic structure of the stonefly, *Yoraperla brevis*, populations: the extent of gene flow among adjacent montane streams. *Freshwater Biology*, **41**: 63–72.
- Hughes J.M. (2007) Constraints on recovery: using molecular methods to study connectivity of aquatic biota in rivers and streams. *Freshwater Biology*, **52**: 616-631.
- Hughes J.M., Hillyer M.J. (2003) Patterns of connectivity among populations of *Cherax destructor* (Decapoda: Parastacidae) in western Queensland, Australia. *Marine and Freshwater Research*, **54**: 587–596.
- Hughes J.M., Schmidt D.J. & Finn D.S. (2009) Genes in Streams: Using DNA to Understand the Movement of Freshwater Fauna and Their Riverine Habitat. *BioScience*, **59**(7): 573–583.
- 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 South America. *Quaternary Sciences Reviews*, **21**: 233–241.
- Hurwood D.A. & Hughes J.M. (2001) Historical interdrainage dispersal of eastern rainbowfish from The Atherton Tableland, north-eastern Australia. *Journal of Fish Biology*, **58**: 1125-1136.
- Isler M. L. (1988) Alimentación natural, conducta alimentaria y preferencia dietaria en *Aegla denticulata* Nicolet, 1849 (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae). Unpublished Thesis, Universidad Austral de Chile, Valdivia, Chile 50 pp.
- Jara C.G P érez-Losada M. & Crandall K.A. (2003) New species of freshwater anomuran crab of the Genus *Aegla* Leach, 1821 (Crustacea: Decapoda: Aeglidae) from the Nahuelbuta Coastal Range, Chile. *Proceedings of the Biological Society of Washington*, **116**(4): 933-942.
- Jara C. (2005) Crustáceos del género *Aegla* [Decapoda: Anomura] en la Cordillera de la Costa: Su Importancia para la conservación de la biodiversidad de aguas continentales en Chile, In: Smith-Ramírez, C., Armesto, J.J., Valdovinos, C. (Eds). "Historia, Biodiversidad y Ecología de los Bosques Costeros de Chile". Editorial Universitaria, Santiago, 708 pp.
- Jara C., Rudolph E. & González E. (2006) Estado de conocimiento de los malacostráceos dulceacuícolas de Chile. Current state of knowledge of freshwater malacostracans of Chile. *Gayana*, **70**(1): 40-49.
- Jarne P., Vianey-Liaud M. & Delay B. (1993) Selfing and outcrossing in hermaphrodite freshwater Gastropods (Basommatophora): where, when and why. *Biological Journal of the Linnean Society*, **49**: 99-125.
- Jarne P., Pointier J.P., David P. & Koene J.M. (2010) Basommatophoran gastropods. Pp. 173–196 In A. Córdoba Aguilar & J.L. Leonard, eds. The evolution of primary sexual characters in animals. Oxford University Press, New York.
- Jensen J.L., Bohonak A.J., & Kelley S.T. (2005) Isolation by distance, web service v.3.23. *BMC Genetics*, **6**: 13. <http://ibdws.sdsu.edu/>. Doi: 10.1186/1471-2156-6-13
- Kalinowski S.T. (2005) HP-Rare: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic diversity. *Molecular Ecology Notes*, **5**:187-189.
- Kalinowski S.T., Meeuwig M.H., Narum S.R. & Taper M.L (2008) Stream trees: a statistical method for mapping genetic differences between populations of freshwater organisms to the sections of streams that connect them. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **65**: 2752–2760.
- Kaitala V., Kaitala A. & Getz W.M. (1989) Evolutionarily stable dispersal of a waterstrider in a temporally and spatially heterogeneous environment. *Evolution Ecology*, **3**: 283- 298.



- Kappelle M., Van Vuuren M.M.I. & Baas P. (1999) Effects of climate change on biodiversity: a review and identification of key research issues. *Biodiversity and Conservation*, **8**: 1383-97.
- Kimura M. & Crow J.F. (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, **49**: 725-738.
- Kindlmann P. & Burel F. (2008) Connectivity measures: a review. *Landscape Ecology*, **23**: 879-890.
- Knopp T. & Merilä J. (2009) Microsatellite variation and population structure of the moor frog (*Rana arvalis*) in Scandinavia. *Molecular Ecology*, **18**: 2996-3005.
- Knowles L.L. (2008) Why does a method that fails continue to be used? *Evolution*, **62**: 2713-2717.
- Knowles L.L. & Maddison, W.P. (2002) Statistical phylogeography. *Molecular Ecology*, **11**: 2623-2635.
- Lande R. (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science*, **241**, 1455-1460.
- Lapointe F.J. & Rissler (2005) Congruence, consensus, and the comparative phylogeography of codistributed species in California. *The American Naturalist*, **166** (2): 290-299.
- Larsen S., Mancini L., Pace G., Scalici M. & Tancioni L. (2012) Weak Concordance between Fish and Macroinvertebrates in Mediterranean Streams. *PLoS ONE*, **7**(12): e51115. Doi: 10.1371/journal.pone.0051115
- Legendre P. & Legendre L. (1998) *Numerical Ecology* (2nd English ed.), Amsterdam: Elsevier.
- López M. (1965) Estudios biológicos en *Aegla odebrechtii paulensis*, Schmitt (Crustacea, Decapoda, Anomura). *Zoologia*, **25**: 301-314.
- López L.S., Viau V., Lavolpe M., Bond-Buckup G., Rodriguez E. M., (2004) Juvenile hatching and maternal care in *Aegla uruguayana* (Anomura, Aeglidae). *Journal of Crustacean Biology*, **24**: 309-313.
- Lopretto E.C. (1978). Las especies de *Aegla* Leach del centro-oeste Argentino en base a la morfología comparada del quinto par de pereiópodos (Crustacea, Anomura, Aeglidae). *Neotrópica*, **24**(71): 57-68.
- Lowe A.J., Harris S.A. & Ashton P. (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwells, Oxford. 344 pp.
- Lowe W.H., Likens G.E. & Power M.E. (2006). Linking scales in stream ecology. *BioScience*, **56**: 591-597.
- Librado P. & Rozas J. (2009) Dna SP v5: A software for comprehensive analysis of DNA Polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**: 1451-1452.
- Lindenmayer D.B. & Fischer J. (2007) Tackling the habitat fragmentation pancheston. *Trends in Ecology and Evolution*, **22**:111-166.



- Lynch M. & Lande R. (1998) The critical effective size for a genetically secure population. *Animal Conservation*, **1**: 70–72.
- Mace G.M. & Lande R. (1991) Assessing extinction threats: toward a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Conservation Biology*, **5**: 148–157
- Manel S., Schwartz M.K., Luikart G. & Taberlet P. (2003) Landscape ecology: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**: 189-197.
- Manel S., Joost S. & Epperson B.K. (2010) Perspectives on the use of landscape genetics to detect genetic adaptive variation in the field. *Molecular Ecology*, **19**: 3760–3772.
- Manel S. & Segelbacher G. (2009) Meeting review: perspectives and challenges in landscape genetics. *Molecular Ecology*, **18**: 1821-1822.
- Martin, J.W. & Abele, L.G. (1988) External morphology of the genus *Aegla* (Crustacea: Anomura: Aeglididae). *Smithsonian Contributions to Zoology*, **453**: 1-46.
- Martin J.W. & Felgenhuer B.E. (1986) Grooming behavior and the morphology of grooming appendages in the endemic South American crab genus *Aegla* (Decapoda, Anomura, Aeglididae). *Journal of zoology* (London, England: A), **209**: 213–224.
- Martínez-Cruz B., Godoy J.A. & Negro J.J. (2007) Population fragmentation leads to spatial and temporal genetic structure in the endangered Spanish imperial eagle. *Molecular Ecology*, **16**:477-486.
- McCarty J.P. (2001) Ecological consequences of recent climate change. *Conservation Biology*, **15**: 320–331.
- McCulloch R.D., Bentley M.J. & Purves R.S. (2000) Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal Quaternary Sciences*, **15**: 409–417.
- McLaughlin R.A., Pope P.E. & Hansen E.A. (1985) Nitrogen fertilization and groundcover in a hybrid poplar plantation. *Journal of Environmental Quality*, **14**: 241-145.
- McLaughlin P.A., Lemaitre R., Crandall K. (2010) Annotated checklist of anomuran decapod crustaceans of the world (exclusive of the Kiwaoidea and families Chirostylidae and Galatheidae of the Galatheoidea). Part III – Aegloidea. *The Raffles Bulletin of zoology*. Supplement, **23**: 131–137.
- [MEA] Millenium Ecosystem Assessment (2005) Ecosystems and human well-being. Health synthesis. World Health Organization. Washington (DC): Island Press.
- Melian R., Myrlian N., Gouriev A., Moraru C. & Radstake F. (1999) Groundwater quality and rural drinking water supplies in the Republic of Moldova. *Hydrogeology Journal*, **2**(7): 188-196.

- Meranezzi E.A. & Masunari S. (2007) Description of first two juvenile stages of *Aegla schmitti* Hobbs III, 1979 (Anomura: Aeglidae). *Nauplius*, **15**(2): 73-80.
- Miller M.P. (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial And genetic information. *Journal of Heredity*, **96**: 722–724.
- Miller M.P., Bellinger R., Forsman E.D. & Haig S.M. (2006) Effects of historical climate change, Habitat connectivity, and vicariance on genetic structure and diversity across the range of the red tree vole (*Phenacomys longicaudus*) in the Pacific Northwestern United States. *Molecular Ecology*, **15**: 145-159.
- Minor E. & Urban D.L. (2008) A Graph-Theory Framework for Evaluating Landscape Connectivity and Conservation Planning. *Conservation Biology*, **22**(2): 297–307. DOI: 10.1111/j.1523-1739.2007.00871.x
- Mock K.E., Bentz B.J., O'Neill E.M., Chong J.P., Orwin J. & Pfrender, M.E. (2007) Landscape-scale Genetic variation in a forest outbreak species, the mountain pine beetle (*Dendroctonus Ponderosae*). *Molecular Ecology*, **16**: 553-568.
- Morales-Castaño I. & Molano-Rendón F. (2009) Revisión de los géneros Eurygerris y Tachygerris (Hemiptera: Tachygerrini) para la región neotropical. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, **80**: 395-410.
- Murphy M.A., Dezanni R, Pilliod D.S. & Storfer A. (2010) Landscape genetics of high mountain frog metapopulations. *Molecular Ecology*, **19**: 3634–3649.
- Nei M. (1987) Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York.
- Nielsen R. & Beaumont M. A. (2009) Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology*, **18**:1034-1047.
- Oksanen J., Blanchet F.G, Kindt R., Legendre P., O'Hara R B., Simpson G.L., Solymos P., Stevens M.H. & Wagner H. (2011) Vegan: Community ecology package. R package version 1.17-6 <http://CRAN.R-project.org/package=vegan>.
- Olmos V. & George-Nascimento M. (1997) El gremio de larvas de Digenea en el caracol del sur de Chile Chilina dombeyana:¿qué indica la tasa metabólica de los hospedadores parásitados?. *Revista Chilena de Historia Natural*, **70**:109-118.
- Osborne L.L. & Wiley M.J. (1992) Influence of tributary spatial position on the structure of warmwater fish communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **49**: 671–681.
- Paavola R., Muotka T., Virtanen R., Heino J. & Kreivi P. (2003) Are biological classifications of headwater streams concordant across multiple taxonomic groups? *Freshwater Biology*, **48**:1912–1923.

- Paavola R., Muotka T., Virtanen R., Heino J., Jackson D. & Mäki-Petäys A. (2006) Spatial scale affects Community concordance among fishes, benthic macroinvertebrates, and bryophytes in streams. *Ecological Applications*, **16**: 368–379.
- Pacioni C., Wayne A.F. & Spencer P.B.S. (2010) Effects of habitat fragmentation on population structure and long-distance gene flow in an endangered marsupial: the woylie. *Journal of Zoology*. Doi: 10.1111/j.1469-7998.2010.00750.x
- Palstra F.P. & Ruzzante D.E. (2008) Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence? *Molecular Ecology*, **17**: 3428–3447.
- Palumbi S.R. (2003) Population genetics, demographic, connectivity and the design of marine reserves. *Ecological Applications*, **13**(1): S146–S158
- Panchal M. (2007) The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, **23**: 509–510.
- Panchal M. & Beaumont M.A. (2007) The automation and evaluation of nested clade phylogeographic analysis. *Evolution*, **61**: 1466–1480.
- Paavola R., Muotka T., Virtanen R., Heino J., Jackson D. & Mäki-Petäys A. (2006) Spatial scale Affects community concordance among fishes, benthic macroinvertebrates, and bryophytes in streams. *Ecological Applications*, **16**: 368–379.
- Pérez-Losada M., Jara C.G., Bond-Buckup G. & Crandall K.A. (2002a) Conservation phylogenetics of Chilean freshwater crabs *Aegla* (Anomura, Aeglidae): Assigning priorities for aquatic habitat protection. *Biological Conservation*, **105**: 345–353.
- Pérez-Losada M., Jara C.G., Bond-Buckup G. & Crandall K.A. (2002b) Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) freshwater crabs from Chile. *Journal of Crustacean Biology*, **22**: 304–313.
- Pérez-Losada M., Bond-Buckup G., Jara C.G. & Crandall K.A. (2004) Molecular systematics and Biogeography of the southern South American freshwater ‘crabs’ *Aegla* (Decapoda: Anomura: Aeglidae) using multiple heuristic tree search approaches. *Systematic Biology*, **53**: 767–780.
- Pérez-Losada M., Bond-Buckup G., Jara C.G. & Crandall K.A. (2009) Conservation assessment of Southern South American freshwater ecoregions on the basis of the distribution and genetic diversity of crabs from the genus *Aegla*. *Conservation Biology*, **23**: 692–702.
- Pearse D.E. & Crandall K.A. (2004) Beyond FST: analysis of population genetic data for conservation. *Conservation Genetics*, **5**: 585–602.

- Pfanzelt S., Grau J. & Rodríguez R. (2008) A vegetation map of nevados de Chillán volcanic complex, Bio-Bío Region, Chile. *Gayana Botanica*, **65**(2): 209-219.
- Petit R.J., Brewer S., Bordacs S. *et al.*, (2002) Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management*, **156**: 49–74.
- Petit R.J., (2008) The coup de grâce for the nested clade phylogeographic analysis?. *Molecular Ecology*, **17**: 516–518.
- Posada D., Crandall K.A. & Templeton A.R. (2000) Geodis. A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**: 487–488.
- Pfenninger M. & Posada D. (2002) Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution*, **56**: 1776–1788.
- R Core Development Team, (2008) R: A language and environment for statistical computing.
- Radespiel U., Rakotondravony R., Chikhi L. (2008) Natural and anthropogenic determinants of genetic structure in the largest remaining population of the endangered goldenbrown mouse lemur, *Microcebus ravelobensis*. *American Journal of Primatology*, **70**: 860–870.
- Raeymaekers J.A., Raeymaekers D., Koizumi I., Geldof S. & Volckaert F.A. (2009) Guidelines for restoring connectivity around water mills: a population genetic approach to the management of riverine fish. *Journal of Applied Ecology*, **46**: 562–571.
- Rakoczy-Trojanowska M. & Bolibok H. (2004) Characteristics and a comparison of three classes of microsatellite-based markers and their application in plants. *Cellular and Molecular biology letters*, **9**(2): 221-238.
- Revenga C., Campbell I., Abell R., De Villiers P. & Bryer M. (2005) Prospects for monitoring freshwater ecosystems towards the 2010 targets. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**: 397-413.
- Richardson J.S. & Danehy R.J. (2007) A synthesis of the ecology of headwater streams and their riparian zones in temperate forests. *Forest Science*, **53**: 131–147.
- Ridley M. (1996) *Evolution*, 2<sup>nd</sup> edn. Blackwell Science, Inc., Cambridge.
- Ripley B.D. (1981) *Spatial Statistics*, New York: Wiley.
- Rodvang S.J. & Simpkins W.W. (2001) Agricultural contaminants in Quaternary aquitards: A review of occurrence and fate in North America. *Hydrogeology Journal*, **1**(9): 44-59.
- Rousset F. (2008) genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 103–106.

- Ruzzante D.E., Walde S.J., Cussac V.E. *et al.*, (2006) Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology*, **15**: 2949–2968.
- Ruzzante D.E., Walde S.J., Gosse J.C. *et al.* (2008) Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology*, **17**: 2234–2244.
- Ruzzante D.E., Walde S.J., Macchi P.J., Alonso M. & Barriga J.P. (2011) Phylogeography and Phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103**: 514–529.
- Sala O.E., Chapin F.S., Armesto J.J., Berlow R., Bloomfield J., *et al.*, (2000) Global biodiversity Scenarios for the year 2100. *Science*, **287**: 1770-1774.
- Santos T. & Tellería J.L. (2006) Pérdida y fragmentación del hábitat: efecto sobre la conservación de las especies. *Ecosistemas*, **15**(2): 3-12.
- Santos S., Bond-Buckup G., Pérez-Losada M. & Bartholomei-Santos M.L. (2009) *Aegla manuinflata*, a new species of freshwater anomuran (Decapoda: Anomura: Aeglidae) from Brazil, determined by morphological and molecular characters. *Zootaxa*, **2088**: 31-40.
- Santos S., Bond-Buckup G., Buckup L., Perez-Losada M., Finley M. & Crandall K.A. (2012) Three new species of *Aegla* (Anomura) freshwater crabs from the upper Uruguay river hydrographic basin in Brazil. *Journal of crustacean Biology*, **32**(4): 529-540. doi: 10.1163/193724012x635935.
- Schneider S., Roessli D. & Excoffier L. (2000) Arlequin ver. 2.000: A software for population genetics analysis. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schlötterer C. (1998) Microsatellites. (Eds. Hoelzel, A.R.) In: *Molecular genetic analysis of populations*. Oxford University Press, New York, 237-262 pp.
- Schwartz M.K., Luikart G., & Waples R.S. (2007) Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology and Evolution* **22**: 25-33. Doi:10.1016/j.tree.2006.08.009
- Selkoe K.A. & Toonen R.J. (2006) Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, **9**: 615-629.
- Sharma S. & Hughes J.M. (2009) Genetic structure and phylogeography of freshwater shrimps (*Macrobrachium australiense* and *Macrobrachium tolmerum*): the role of contemporary and historical events. *Marine and Freshwater Research*, **60**(6): 541-553.
- Sherry T.W. (2008) Community approach to tropical forest fragmentation gets us closer to understanding mechanisms by revealing strong indirect effects. *Animal Conservation*, **11**: 361-363. Doi: 10.1111/j.1469-1795.2008.00205.x
- Slatkin M. (1985) Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**:



393- 430.

- Slatkin, M. 1987. Gene flow and geographic structure of natural populations. *Science*, **236**: 787-792.
- Slatkin M. (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**: 457-462.
- Sork V.L. & Waits L. (2010) Contributions of landscape genetics—approaches, insight, and future potential. *Molecular Ecology*, **19**: 3489-3495.
- Spear S.F., Balkenhol N., Fortin M.-J., McRae B.H. & Scribner K. (2010) Use of resistance surfaces for landscape genetic studies: considerations for parameterization and analysis. *Molecular Ecology*, **19**: 3576–3591.
- Spence J.R. & Wilcox R.S. (1986) The mating system of two hybridizing species of water striders (Gerridae). *Behavioural and Ecological Sociobiology*, **19**: 87-95.
- Spence J.R. (1989) The habitat templet and life history strategies of pond skaters (Heteroptera: Gerridae): reproductive potential, phenology, and wing polymorphism. *Canadian Journal of Zoology*, **67**: 2432-2447.
- Spence J.R. & Andersen N.M. (1994) Biology of water striders: Interactions between systematic and ecology. *Annual Reviews Entomology*, **39**: 101-128.
- Spielman D., Brook B.W., Briscoe D.A. & Frankham R. (2004a) Does inbreeding and loss of genetic diversity decrease genetic resistance? *Conservation Genetics*, **5**: 439–448
- Spielman D., Brook B.W. & Frankham R. (2004b) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proc Natl Acad Sci USA*, **101**: 15261–15264
- Stockwell C.A., Hendry A.P. & Kinnison M.T. (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**: 94–101.
- Stonedahl G.M. & Lattin J.D. (1982). The Gerridae or Water Striders of Oregon and Washington (Hemiptera:Heteroptera). Technical Bulletin 144. Agricultural Experiment Station. Oregon State University Corvallis, Oregon.
- Storfer A., Murphy M.A. & Evans J.S., Goldberg C.S., Roginson S., Spear S.F., Dezzani R., Delmelle E., Vierling L., Waits L.P. (2007) Putting the ‘landscape’ in landscape genetics. *Heredity*, **98**: 128–142. Doi:10.1038/sj.hdy.6800917
- Storfer A., Murphy M.A., Spear S.F., Holderegger R. & Waits L.P. (2010) Landscape genetics: where are we now? *Molecular Ecology*, **19**: 3496–3514. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2010.04691.x
- Steele C.A. & Storfer A. (2007) Phylogeographic incongruence of codistributed amphibian species based on small differences in geographic distribution. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **43** (2): 468-79.

- Strayer D.L. (2006) Challenges for freshwater invertebrate conservation. *Journal of the North American Benthological Society*, **25**: 271-287.
- Strong E.E., Gargominy O., Ponder W.F., Bouchet P. (2008) Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. *Hydrobiologia*, **595**:149-166. DOI 10.1007/S10750-007-9012-6
- Stutchbury B.J.M. (2007) The effects of habitat fragmentation on animals: gaps in our knowledge and new approaches. *Canadian Journal of Zoology*, **85**: 1015-1016.
- Suhonen J., Hilli-Lukkarinen M., Korkeamäki E., Kuitunen M., Kullas J., Penttinen J. & Salmela J. (2010) Local extinction of dragonfly and damselfly populations in low- and high-quality habitat patches. *Conservation Biology*, **24**: 1148-1153.
- Taberlet P., Fumagalli L., Wust-Saucy A.G. & Cosson J.F. (1998) Comparative phylogeography and Postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, **7**: 453–464.
- Tajima F., (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**: 585–595.
- Takezaki N, Nei M (1996) Genetic distances and reconstruction of phylogenetic trees from microsatellite DNA. *Genetics*, **144**: 389-399.
- Tallmon D.A., Gordon L., Waples R.S. (2004) The alluring simplicity and complex reality of genetic rescue. *TRENDS in Ecology and Evolution*, **19**(9): 489-496.
- Tallmon D.A., Gregovich D., Waples R.S., Baker C.S. & Jackson J., Taylor B.L., Archer E., Martien K.K., Allendorf F.W. & Schwartz M.K. (2010) When are genetic methods useful for estimating contemporary abundance and detecting population trends?. *Molecular Ecology Resources*, **10**: 684–692. Doi: 10.1111/j.1755-0998.2010.02831.x
- Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M. & Kumar S. (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, **28**: 2731–2739.
- Templeton A.R., (1993) The ‘Eve’ hypothesis: a genetic critique and reanalysis. *American Anthropologist*, **95**: 51– 72.
- Templeton A.R. (1998) Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, **7**: 381–397.
- Templeton A.R., Boerwinkle E. & Sing C.F. (1987) A cladistic analysis of phenotypic associations With haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Basic theory and an analysis of alcohol dehydrogenase activity in *Drosophila*. *Genetics*, **117**: 343–351.
- Templeton A.R. & Sing C.F. (1993) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes



- Inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics*, **134**: 659-669.
- Templeton A.R. (2009) Why does a method that fails continue to be used: the answer. *Evolution*, **63**: 807-812.
- Templeton A.R. (2010) Coalescent-based, maximum likelihood inference in phylogeography. *Molecular Ecology*, **19**: 431-435.
- Thomassen H.A., Cheviron Z.A., Freedman A.H., Harrigan R.J., Wayne R.K. & Smith T.B. (2010) Spatial modelling and landscape-level approaches for visualizing intra-specific variation. *Molecular Ecology*, **19**: 3532-3548.
- Tolonen K.T., Holopainen I.J., Hämäläinen H., Rahkola-Sorsa M., Ylöstalo P., Mikkonen K., & Karjalainen J. (2005) Littoral species diversity and biomass: concordance among organismal groups and the effects of environmental variables. *Biodiversity and Conservation*, **14**: 961-980.
- Tóth G., Gáspári Z. & Jurka J. (2000) Microsatellites in different eukaryotic genomes: survey and analysis. *Genome research*, **10**(7): 967-81.
- Trails L.W., Brook B.W., Frankham R.R. & Bradshaw C.J.A. (2010) Pragmatic population viability targets in a rapidly changing world. *Biological Conservation*, **143**: 28-34.
- Trevisan A., Ubiratan L., Santos S. (2009) Abundância e distribuição de Aeglidae (Crustacea: Anomura) em função do uso da terra na bacia hidrográfica do Rio Jacutinga, Rio Grande do Sul, Brasil. *Zoologia*, **26**(3): 419-426.
- Tsai Y.H. (2011) PhyloGeoViz: a web-based program that visualizes genetic data on maps. *Molecular Ecology Resources*. **11**(3): 557-561.
- Unmack P.J., Bennin A.P., Habit E.M., Victoriano P.F. & Johnson J.B (2009) Impact of ocean barriers, topography, and glaciation on the phylogeography of the catfish *Trichomycterus areolatus* (Teleostei: Trichomycteridae) in Chile. *Biological Journal of the Linnean Society*, **97**: 876-892.
- Van Syoc, R. J. (1995) Barnacle mitochondrial DNA: determining genetic relationships among species Of *Pollicipes*. In: F. R. Schram and J. T. Hoeg. (Eds.), *New Frontiers in: Barnacle Evolution Crustacean Issues 10*. A. A. Balkema, Rotterdam, The Netherlands, pp. 269-296.
- Valdovinos C., Moya C. & Olmos V. (2004) Biodiversidad de moluscos terrestres en la ecorregión Valdiviana (Chile). En: *Biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa*. (Eds. C. Smith, J. Armesto & C. Valdovinos), pp. 292-306. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Valdovinos C. (2006) Invertebrados dulceacuícolas. En: *Conama, (Eds), Biodiversidad de Chile. Patrimonio y desafíos*. Ocho Libros Editores, Santiago de Chile, pp. 204-225.

- Valdovinos C. (2006). Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, **70**(1): 88-95.
- Valdovinos C., Kiessling A., Mardones M., Moya C., Oyanedel A., Salvo J., Olmos V. & Parra O. (2010) Distribución de macroinvertebrados (Plecoptera y Aeglidae) en ecosistemas fluviales de la Patagonia chilena: ¿Muestran señales biológicas de la evolución geomorfológica postglacial?. *Revista chilena de historia natural*, **83**: 267-287. Doi.org/10.4067/S0716-078X2010000200008
- Vepsäläinen K. & Patama T. (1983) Allocation of reproductive energy in relation to the pattern of Environment in five *Gerris* species. In *Diapause and Life Cycle Strategies in Insects*, ed. VK Brown, I Hodek, pp. 189-207. The Hague/Boston/London: Junk. *Entomology*, **15**: 409-418.
- Vera-Escalona I., D'Elia G., Gouin N., Fontanella F.M., Muñoz-Mendoza C. Sites, Jr. & Victoriano P. (2012) Lizards on Ice: Evidence for Multiple Refugia in *Liolaemus pictus* (Liolaemidae) during The Last Glacial Maximum in the Southern Andean Beech Forests. *PLoS ONE* 7(11): e48358. doi:10.1371/journal.pone.0048358.
- Verovnik R., Sket B. & Trontelj P. (2004) Phylogeography of subterranean and surface populations of water lice *Asellus aquaticus* (Crustacea: Isopoda). *Molecular Ecology*, **13**: 1519–1532. Doi: 10.1111/j.1365294X.2004.02171.x
- Wagner H. & Fortin M-J. (2005) Spatial analysis of landscapes: concepts and statistics. *Ecology*, **86**: 1975– 1987. Doi: 10.1890/04-0914
- Walker F.M., Sunnucks P., Taylor A.C. (2008) Evidence for habitat fragmentation altering within population processes in wombats. *Molecular Ecology*, **17**: 1674–1684.
- Walther G-R., Post E., Convey P., Menzel A., Parmesan C., Trevor J., Beebee C., Fromentin J.M., Hoegh-Guldberg O. & Bairlein F. (2002) Ecological responses to recent climate change. *Nature*, **416**: 389–395
- Wang I.J., Savage W.K. & Shaffer H.B. (2009) Landscape genetics and least-cost path analysis reveal unexpected dispersal routes in the California tiger salamander (*Ambystoma californiense*). *Molecular Ecology*, **18**:1365-1374.
- Wang I.J., Johnson J.R., Johnson B.B & Shaffer H.B. (2011) Effective population size is strongly correlated with breeding pond size in the endangered California tiger salamander, *Ambystoma californiense*. *Conservation Genetic*, **12**: 911–920. DOI 10.1007/s10592-011-0194-0
- Waples R.S. (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, **7**: 167-184.
- Waples R. S. & Do C. (2008) LDNE: a program for estimating effective population size from data on

- Linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, **8**: 753–756.
- Waters J. M., Dijkstra L.H. & Wallis G.P. (2000) Biogeography of a southern hemisphere freshwater fish: how important is marine dispersal? *Molecular Ecology*, **9**:1815-1821.
- Wilmer J. W., C. Elkin C., Wilcox L., Murray D., Niejalke & Possingham H. (2008) The influence of multiple dispersal mechanisms and landscape structure on population clustering and connectivity in fragmented artesian spring snail populations. *Molecular Ecology*, **17**: 3733-3751.
- With K.A., Chrott G.R.S. & King A.W. (2006) The implications of metalandscape connectivity for Population viability in migratory songbirds. *Landscape Ecology*, **21**: 157–167.
- Wood M.J., Cosgrove C.L. & Wilkin T.A. (2007) Within-population variation in prevalence and lineage distribution of avian malaria in blue tits, *Cyanistes caeruleus*. *Molecular Ecology*, **16**: 3263–3273
- Woodward G., Perkins D.M. & Brown L.E., (2010) Climate change and freshwater ecosystems: Impacts across multiple levels of organization. *Philosophical transactions Royal Society B*, **365**: 2093-2106. doi: 10.1098/rstb.2010.0055.
- Wong B.B.M., Keogh J.S., McGlashan D.J. (2004) Current and historical patterns of drainage connectivity in eastern Australia inferred from population genetic structuring in a widespread freshwater fish *Pseudomugil signifier* (Pseudomugilidae). *Molecular Ecology*, **13**: 391-401.
- Wright S. (1931) Evolution in Mendelian populations. *Genetics*, **16**: 97–159.
- Wright S. (1940) Breeding structure of populations in relation to speciation. *American Naturalist*, **74**: 232–248.
- Xu H.Y. & Fu Y.X. (2004) Estimating effective population size or mutation rate with microsatellites. *Genetics*, **166** (1): 555-563.
- Xu J., Pérez-Losada M., Jara C. & Crandall K. (2009) Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Molecular Ecology*, **18**: 904–918. Doi: 10.1111/j.1365-294X.2008.04070.x
- Zera A. J., (1981) Genetic Structure of Two Species of Waterstriders (Gerridae: Hemiptera) with Differing Degrees of Winglessness. *Evolution*, **35**(2): 218–225.

## 17.0 ANEXOS

### i. Sección A.

Tabla I. Características biológicas de historia de vida, requerimientos ecológicos y de hábitat de *C. dombeyana*, *A. chilensis*, y el complejo de especies de aeglas (*Aegla sp.*).

Especie*	Desarrollo	Puestas/Huevos( N°)	Alimentación	Requerimientos	Movilidad	Tolerancia	Hábitat	Observaciones
<i>Chilina dombeyana</i>	Directo	4-8 puestas 20-30 huevos (Dic-Marzo)	Microherbívoros	Agua frías, oxigenadas y limpias	baja	baja	Acuático	Adheridos a piedras o plantas acuáticas
<i>Aquarius chilensis</i>	Indirecto (5 estados larvales)	2 o más puestas 20-40 Huevos (Dic-Marzo)	Depredadores (Presas vivas)	NA	superior	alta	Película superficial del agua	Apteros (0.4% macróptero)  Estructura gregaria
<i>Aegla sp.</i>	Directo	1 puesta anual (Dic-Marzo)  64-255 huevos  Incubación: 4-8 meses	Omnívoro (invertebrados acuáticos, macrófitas, detritus vegetal)	Aguas bien oxigenadas	intermedia	intermedia	Acuático	Quinto par de pereopodo atrofiado (impide caminar activo)  Cuidado paternal

\*Para referencias bibliográficas ver texto

Tabla II. Matriz de valores pareados de *Fst* en base al marcador mitocondial (COIADNmt) y probabilidades entre las poblaciones de *C. dombeyana*. Los valores de *Fst* en negrita representan valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ) después de la corrección Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. E2		<b>0,054</b>	<0.050	<0.050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
2. E3	0,061		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
3. E4	0,098	0,173		<b>0,162</b>	<0.010	<0.001	<b>0,117</b>	<0.001	<0.001	<0.050	<0.010	<0.001	<0.001	<0.001
4. E6	0,099	0,226	0,027		<0.001	<0.001	<b>0,324</b>	<0.001	<0.001	<0.050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
5. T2	0,294	0,320	0,186	0,320		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.050	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
6. T6	0,342	0,426	0,236	0,185	0,483		<b>0,072</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<b>0,153</b>	<b>0,054</b>	<0.001	<0.001
7. T7	0,208	0,306	0,060	0,009	0,320	0,067		<0.001	<0.001	<0.050	<b>0,423</b>	<0.050	<0.001	<0.001
8. T8	0,303	0,398	0,292	0,361	0,401	0,550	0,393		<b>0,522</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<b>0,063</b>	<b>0,099</b>
9. T9	0,249	0,305	0,159	0,193	0,279	0,309	0,203	0,000		<0.001	<0.001	<0.001	<0.050	<0.050
10. T11	0,181	0,299	0,091	0,116	0,140	0,215	0,085	0,292	0,177		<0.050	<0.050	<0.001	<0.001
11. T12	0,282	0,344	0,137	0,126	0,364	0,031	0,000	0,442	0,249	0,109		<b>0,702</b>	<0.001	<0.001
12. T13	0,323	0,393	0,226	0,188	0,478	0,108	0,102	0,517	0,307	0,203	0,000		<0.001	<0.001
13. Chol1	0,433	0,487	0,374	0,521	0,501	0,864	0,564	0,037	0,054	0,432	0,619	0,756		<b>0,567</b>
14. Chol5	0,430	0,487	0,371	0,514	0,493	0,849	0,557	0,034	0,050	0,426	0,617	0,751	0,000	

Tabla III. Matriz de valores pareados de *Fst* en base al marcador mitocondial (COIADNmt) y probabilidades entre las poblaciones del complejo *Aegla sp.* Los valores de *Fst* en negrita representan valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ) después de la corrección Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. E1		<0.01	<b>0,991</b>	<b>0,090</b>	<0.010	<0.001	<b>0,180</b>	<0.001	<b>0,072</b>	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<b>0,432</b>	<b>0,099</b>
2. E2	0,556		<0.05	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	0,0180	<0.001
3. E3	0,000	0,254		0,0180	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	0,027	<0.05	<0.05	<b>0,036</b>	<0.05	<b>0,432</b>	<b>0,450</b>
4. E5	0,516	0,577	0,390		<b>0,063</b>	<0.001	<0.01	<0.05	<b>0,918</b>	<b>0,054</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05	<0.01
5. E6	0,858	0,867	0,731	0,069		<0.001	<0.001	<0.001	<b>0,414</b>	<0.01	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01
6. T1	0,869	0,870	0,620	0,537	0,801		<0.01	<0.01	<0.001	<b>0,054</b>	<0.01	<b>0,144</b>	<0.05	<0.05	<0.01
7. T2	0,907	0,896	0,658	0,539	0,814	0,652		<0.01	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001	<0.001	<0.01	<0.001
8. T6	0,902	0,894	0,666	0,548	0,815	0,651	0,392		<0.001	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.001
9. T7	0,616	0,673	0,473	0,000	0,001	0,622	0,624	0,631		0,0180	<0.01	<0.01	<0.001	<0.05	<0.01
10. T8	0,569	0,635	0,331	0,287	0,553	0,091	0,325	0,345	0,347		<b>0,063</b>	<b>0,459</b>	<b>0,594</b>	<0.01	<0.01
11. T9	0,850	0,858	0,688	0,224	0,534	0,790	0,810	0,809	0,292	0,472		<0.001	<0.01	<0.01	<0.001
12. T11	0,845	0,850	0,575	0,505	0,780	0,077	0,586	0,597	0,589	0,000	0,767		<b>0,216</b>	<0.01	<0.01
13. T12	0,745	0,765	0,471	0,443	0,723	0,146	0,471	0,493	0,524	0,000	0,699	0,024		<0.001	<0.001
14. Chol1	0,153	0,264	0,028	0,355	0,690	0,637	0,629	0,641	0,443	0,383	0,642	0,595	0,501		<b>0,486</b>
15. Chol5	0,085	0,284	0,000	0,370	0,680	0,612	0,599	0,613	0,440	0,352	0,633	0,564	0,473	0,000	

Tabla IV. Matriz de valores pareados de *Fst* en base al marcador mitocondial (COIADNmt) y probabilidades entre las poblaciones de *A. chilensis*. Los valores de *Fst* en negrita representan valores no significativos ( $P \geq 0.05$ ) después de la corrección Bonferroni.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. E1		<b>0,360</b>	<0.001	<b>0,108</b>	<b>0,333</b>	<b>0,322</b>	<0.001	<b>0,022</b>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<b>0,372</b>
2. E2	0,002		<0.001	<b>0,088</b>	<b>0,183</b>	0,1826	<0.001	0,0049	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.05
3. E3	0,101	0,143		<b>0,780</b>	<b>0,181</b>	0,0254	<0.001	0,5293	<0.001	<0.001	<0.01	<b>0,218</b>	<b>0,445</b>
4. E4	0,025	0,033	0,000		<b>0,688</b>	0,2402	<0.001	0,6416	<0.001	<0.001	<0.05	<b>0,250</b>	<b>0,888</b>
5. E5	0,007	0,029	0,024	0,000		0,5742	<0.001	0,2783	<0.001	<0.001	<0.05	<0.05	<b>0,459</b>
6. E6	0,011	0,033	0,063	0,010	0,000		<0.001	0,0303	<0.001	<0.001	<0.001	<0.01	<b>0,098</b>
7. T6	0,575	0,587	0,467	0,406	0,534	0,475		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
8. T7	0,072	0,098	0,000	0,000	0,010	0,053	0,461		<0.001	<0.001	<0.01	<b>0,170</b>	<b>0,324</b>
9. T8	0,602	0,622	0,474	0,411	0,556	0,507	0,340	0,476		0,4863	<0.001	<0.001	<0.001
10. T9	0,659	0,665	0,528	0,455	0,608	0,563	0,373	0,522	0,000		<0.001	<0.001	<0.001
11. T12	0,256	0,317	0,118	0,085	0,127	0,218	0,584	0,118	0,604	0,659		<0.01	<0.01
12. Chol1	0,102	0,120	0,021	0,008	0,088	0,100	0,245	0,046	0,230	0,261	0,105		<b>0,460</b>
13. Chol5	0,002	0,039	0,000	0,000	0,000	0,025	0,383	0,006	0,380	0,433	0,087	0,001	



Tabla V. Variabilidad genética de las poblaciones de *C. dombeyana*, para un total de 11 loci marcadores microsatélites y 14 localidades de la cuenca del Itata. Heterocigocidad esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), número alélico ( $A$ ), riqueza alélica ( $AR$ ) y probabilidad asociada al equilibrio Hardy-Weinberg ( $P$ ). Valores significativos después de la corrección Bonferroni son mostrados en negrita.

Locus		E2	E3	E4	Chillán		Pichilluanco T6	El Gato T7	T8	Luanco			Cholguán		
					E6	T2				T9	T11	T12	T13	Chol1	Chol5
CM52	N	32	37	42	37	17	28	37	28	49	39	32	20	43	40
	He	0,6577	0,7173	0,6630	0,5928	0,1609	0,4764	0,5292	0,5931	0,7022	0,5615	0,1978	0,6587	0,6871	0,6541
	Ho	0,6563	0,7568	0,8095	0,6216	0,1765	0,4286	0,5135	0,5000	0,7143	0,6154	0,2188	0,6500	0,8140	0,7250
	A	4	4	5	4	2	4	4	4	5	4	3	3	4	4
	AR	3,903	3,999	4,576	3,92	2	3,848	3,847	3,6	4,344	3,436	2,523	3	3,784	3,672
	P	0,3645	0,5977	0,7319	0,7553	1,0000	0,0750	0,5590	0,2871	0,3657	0,8818	1,0000	0,1303	0,2698	0,5052
Total Por	X2	23,5253													
Locus	P	0,7063													
CM44	N	34	38	42	37	17	31	37	36	48	40	32	20	44	40
	He	0,0843	0,1229	0,2747	0,1508	0,1609	0,2575	0,3331	0,1065	0,1191	0,1412	0,2715	0,0962	0,4925	0,4097
	Ho	0,0882	0,1316	0,3095	0,1622	0,1765	0,2258	0,3514	0,1111	0,1250	0,1500	0,3125	0,1000	0,6136	0,5250
	A	2	2	4	3	2	3	4	4	3	3	3	3	4	2
	AR	1,881	1,954	3,431	2,419	2	2,907	2,919	2,45	2,471	2,569	2,783	2,7	3,16	2
	P	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,0846	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	1,0000	0,1540	0,1256
Total Por	X2	12,8297													
Locus	P	0,9936													
CM49	N	32	38	40	34	17	21	30	19	46	39	31	20	41	37
	He	0,5850	0,7407	0,8316	0,7803	0,0000	0,6950	0,8750	0,8172	0,7890	0,6466	0,5801	0,6250	0,7820	0,8050
	Ho	0,5938	0,8158	0,8500	0,8529	0,0000	0,6190	0,9333	0,7368	0,6957	0,6154	0,3871	0,7000	0,7805	0,7838
	A	6	7	12	7	1	8	13	9	8	3	4	3	8	10
	AR	4,631	6,089	9,558	6,226	1	7,205	11,073	8,772	7,884	3	3,547	3	6,46	7,929
	P	0,1607	0,0494	0,5818	0,1425	-	0,6434	0,7657	0,5636	0,0386	0,7787	0,0028	0,6535	0,5423	0,3331
Total Por	X2	40,2885													
Locus	P	0,0365													
CM53	N	33	38	40	36	17	26	35	31	46	39	32	20	45	35
	He	0,6602	0,713	0,8800	0,8422	0,2509	0,7507	0,7461	0,7242	0,8471	0,3399	0,4399	0,7850	0,5847	0,5616
	Ho	0,6667	0,6842	0,7750	0,9167	0,2941	0,8077	0,8000	0,7742	0,7609	0,359	0,4063	0,9000	0,6444	0,6571
	A	8	9	16	10	2	6	9	10	15	7	6	8	12	9
	AR	6,083	7,434	12,623	8,693	2	5,538	8,073	7,953	10,789	5,265	5,254	7,679	7,191	6,921
	P	0,0696	0,4958	0,3200	0,4199	1,0000	0,2993	0,8261	0,8090	0,1312	0,7768	0,3512	0,7693	0,8366	0,9747
Total Por	X2	21,5595													
Locus	P	0,8013													
CM27	N	34	38	41	29	17	31	38	33	48	40	27	20	45	37
	He	0,1847	0,3168	0,6749	0,695	0,4567	0,6717	0,6375	0,6152	0,6311	0,5928	0,5898	0,2275	0,2963	0,3028
	Ho	0,2059	0,2368	0,6585	0,6552	0,4706	0,7097	0,6842	0,6667	0,7083	0,625	0,5185	0,25	0,3333	0,2973
	A	2	2	5	4	2	5	5	6	7	4	3	4	5	3
	AR	1,994	2	4,303	3,934	2	4,981	4,535	5,261	5,918	3,425	3	3,698	3,967	2,918
	P	1,0000	0,1252	0,7474	0,3094	1,0000	0,7327	0,0628	0,6505	0,9710	0,1734	0,1040	1,0000	1,0000	0,7178
Total Por	X2	22,8559													
Locus	P	0,7402													
CM48	N	32	37	42	33	17	28	38	36	48	40	32	20	44	41
	He	0,4409	0,4558	0,5714	0,4959	0	0,3565	0,1229	0,0274	0,2637	0,0487	0,1172	0	0	0,0479
	Ho	0,5313	0,3784	0,5	0,5152	0	0,4643	0,1316	0,0278	0,1042	0,05	0,125	0	0	0,0488
	A	2	2	3	3	1	2	2	2	2	2	2	1	1	3
	AR	2	2	2,999	2,998	1	2	1,954	1,472	1,999	1,672	1,957	1	1	1,829
	P	0,4255	0,2979	0,2119	0,6700	-	0,2844	1,0000	-	0,0005	1,0000	1,0000	-	-	1,0000
Total Por	X2	25,8165													
Locus	P	0,1720													
CM30	N	34	37	39	30	17	29	37	34	48	39	27	20	45	40
	He	0,4567	0,5752	0,6223	0,6150	0,0571	0,4322	0,6658	0,5774	0,6313	0,4763	0,6200	0,1800	0,5333	0,5453
	Ho	0,5294	0,5135	0,4615	0,5333	0,0588	0,4138	0,7838	0,7059	0,6667	0,5897	0,6296	0,2000	0,5111	0,6000
	A	2	4	5	4	2	3	4	3	3	3	4	2	6	4
	AR	2	3,449	4,729	3,912	2	2,991	3,99	3	3	2,826	3,969	2	4,467	3,663
	P	0,4704	0,4520	0,0103	0,0384	-	0,6181	0,5461	0,2401	0,5325	0,1165	0,3333	1,0000	0,7785	0,5422
Total Por	X2	33,2749													
Locus	P	0,1543													
CM42	N	33	38	34	30	17	26	31	28	46	38	22	19	43	41
	He	0,6612	0,6735	0,7850	0,8250	0,0000	0,8129	0,7544	0,6671	0,4941	0,5512	0,2448	0,7271	0,6033	0,6773
	Ho	0,6061	0,6316	0,8529	0,8000	0,0000	0,8077	0,7742	0,7500	0,5217	0,6316	0,2727	0,6842	0,5116	0,7561
	A	5	7	9	8	1	10	8	6	8	5	3	6	11	9
	AR	4,03	5,295	7,879	7,623	1	8,566	6,593	5,306	5,972	4,238	2,982	5,886	7,486	7,516
	P	0,407	0,5887	0,4041	0,3847	-	0,904	0,5672	0,7878	0,3866	0,4197	0,591	0,2221	0,9842	
Total Por	X2	16,1244													
Locus	P	0,9332													
CM50	N	34	38	41	37	17	31	38	36	48	38	32	20	46	41
	He	0,4152	0,4913	0,4997	0,5110	0,0000	0,3314	0,6285	0,4533	0,3750	0,4913	0,4512	0,0950	0,0636	0,0476
	Ho	0,4706	0,6579	0,5854	0,5946	0,0000	0,2903	0,5789	0,4167	0,2917	0,3947	0,5000	0,1000	0,0652	0,0488
	A	2	2	2	3	1	2	3	2	2	2	2	2	3	2
	AR	2	2	2	2,459	1	2	3	2	2	2	2	1,981	1,975	1,66
	P	0,6840	0,0544	0,3594	0,3969	-	0,5821	0,4632	0,7142	0,1318	0,3203	0,7056	1,0000	1,0000	1,0000
Total Por	X2	20,7985													
Locus	P	0,7523													
CM25	N	32	37	42	28	17	30	38	36	49	40	32	20	46	41
	He	0,6606	0,6622	0,5573	0,6983	0,0571	0,4839	0,2116	0,3542	0,6012	0,3634	0,4243	0	0,4546	0,5208
	Ho	0,7813	0,4865	0,4048	0,7143	0,0588	0,5333	0,2368	0,3611	0,6531	0,4	0,375	0	0,4783	0,5122
	A	3	3	5	4	2	6	3	4	4	4	3	1	6	6
	AR	3	3	3,808	4	2	5,276	2,441	3,455	3,988	3,097	2,997	1	4,726	4,845
	P	0,1966	0,0967	0,0087	0,5684	-	0,9687	1,0000	0,6692	0,4542	1,0000	0,0514	-	0,5669	0,3220
Total Por	X2	30,3197													
Locus	P	0,1744													
CM41	N	33	35	32	32	17	29	34	36	48	35	31	20	43	40
	He	0,5257	0,4686	0,6890	0,7070	0,0000	0,5232	0,6259	0,5806	0,4991	0,5261	0,4199	0,5113	0,6263	0,6362
	Ho	0,6061	0,4571	0,6563	0,7188	0,0000	0,5862	0,7647	0,5833	0,3750	0,6857	0,3548	0,5500	0,7209	0,7000
	A	3	5	4	5	1	7	5	3	2	4	3	3	5	6
	AR	2,95	3,841	3,998	4,531	1	5,526	4,253	2,991	2	2,971	2,913	3	4,356	5,208
	P	0,0489	0,6776	0,1533	0,6778	-	1,								



Tabla VI. Variabilidad genética de las poblaciones de *A. chilensis*, para un total de 6 loci marcadores microsatélites y 13 localidades de la cuenca del Itata. Heterocigocidad esperada (He) y observada (Ho), número alélico (A), riqueza alélica (AR) y probabilidad asociada al equilibrio Hardy-Weinberg (P). Valores significativos después de la corrección Bonferroni son mostrados en negrita.

Locus		Chillán						Pichilluanco		El Gato		Llunco			Cholguán	
		E1	E2	E3	E4	E5	E6	T6	T7	T8	T9	T12	Chol1	Chol5		
Hem6	N	44	39	44	32	45	29	48	32	59	40	18	46	34		
	He	0,7676	0,7945	0,6839	0,7939	0,8296	0,772	0,6198	0,7188	0,7101	0,7784	0,4861	0,7221	0,7872		
	Ho	0,7955	0,8718	0,7045	0,7813	0,8222	0,7813	0,4583	0,75	0,6949	0,775	0,6111	0,7609	0,7941		
	A	11	9	9	9	13	11	7	7	11	10	2	9	8		
	AR	7,587	7,369	6,984	7,694	9,286	8,965	5,262	6,179	6,475	8,047	2,000	6,402	6,772		
	P	0,2412	0,6944	0,3592	0,5634	0,4475	0,3504	0,1292	0,7773	0,1060	0,2574	0,6252	0,1232	0,2313		
Total Por Locus	X2	30,3312														
	P	0,2541														
Hem11	N	44	34	38	26	44	23	47	24	56	31	17	34	34		
	He	0,618	0,6721	0,6292	0,6487	0,665	0,638	0,1206	0,6606	0,5886	0,5354	0,6384	0,6146	0,6306		
	Ho	0,7273	0,7647	0,7105	0,6923	0,7273	0,7391	0,1277	0,75	0,5179	0,5806	0,6471	0,6765	0,6471		
	A	4	4	4	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4		
	AR	3,338	3,441	3,393	3,000	3,000	3,000	2,180	3,000	2,991	3,000	3,000	3,438	3,828		
	P	0,4971	0,4979	0,3933	0,9167	0,9102	0,1666	1	0,8785	0,2964	0,8811	1	0,9762	0,4876		
Total Por Locus	X2	13,0351														
	P	0,9837														
Hem 1	N	45	31	43	30	39	31	48	32	53	31	15	42	33		
	He	0,8622	0,8143	0,805	0,8722	0,8103	0,8621	0,6921	0,811	0,7885	0,7534	0,6733	0,8248	0,8283		
	Ho	0,9111	0,8065	0,8372	0,8333	0,7949	0,8065	0,6667	0,9688	0,7358	0,871	0,7333	0,8571	0,7879		
	A	12	11	11	11	11	12	7	10	10	8	4	15	13		
	AR	9,444	8,724	8,409	9,792	7,991	9,884	5,103	7,893	6,854	6,626	4,000	10,286	9,932		
	P	0,3338	0,5294	0,9995	0,4194	0,5196	0,1010	0,5700	0,0719	0,5231	0,1192	0,6314	0,0997	0,3592		
Total Por Locus	X2	30,6191														
	P	0,2428														
Hem10	N	43	36	42	31	47	35	49	32	58	40	18	45	31		
	He	0,1322	0,3306	0,0689	0,3829	0,318	0,3343	0,2732	0,2485	0,6801	0,4834	0	0,258	0,3377		
	Ho	0,1395	0,3333	0,0714	0,3871	0,3617	0,3429	0,2857	0,2813	0,5517	0,45	0	0,2889	0,3226		
	A	3	3	2	2	5	4	2	3	5	4	1	4	5		
	AR	2,458	2,934	1,740	2,000	3,863	3,105	1,998	2,713	4,143	3,601	1,000	3,109	4,126		
	P	1	0,5861	1	1	1	1	1	1	0,1597	<b>0,04</b>	—	1	0,6086		
Total Por Locus	X2	12,1668														
	P	0,978														
Hem8	N	43	39	42	32	48	35	48	29	58	34	17	46	34		
	He	0,1106	0,4987	0,4717	0,4409	0,4099	0,4739	0,2407	0,4405	0,4994	0,465	0,0571	0,5321	0,5368		
	Ho	0,1163	0,641	0,381	0,4688	0,3958	0,5143	0,2083	0,4483	0,5862	0,5588	0,0588	0,5217	0,4706		
	A	3	2	2	2	3	3	3	2	2	2	2	3	4		
	AR	2,176	2,000	2,000	2,000	2,680	2,984	2,661	2,000	2,000	2,000	1,882	2,800	3,523		
	P	1,0000	0,1146	0,2001	1,0000	0,0143	1,0000	0,1911	1,0000	0,2861	0,4577	—	0,2553	0,7851		
Total Por Locus	X2	26,6291														
	P	0,3220														
Hem9	N	40	36	43	29	45	35	48	30	57	38	17	45	32		
	He	0,8328	0,8372	0,8121	0,8317	0,8622	0,8706	0,6853	0,8061	0,655	0,6475	0,5727	0,7659	0,7676		
	Ho	0,7	0,8056	0,7907	0,7586	0,7333	0,7429	0,5833	0,7333	0,5965	0,5789	0,6471	0,7556	0,6875		
	A	11	10	10	9	13	10	6	8	6	5	3	11	8		
	AR	8,581	8,083	7,530	7,690	9,567	9,042	4,605	7,112	4,670	3,789	2,999	7,184	6,648		
	P	0,0140	0,3033	0,3837	0,4697	0,2593	0,1269	0,4284	0,3763	0,5741	0,7107	0,4251	0,5306	0,4817		
Total Por Locus	X2	31,0674														
	P	0,2258														
Total Por Población	X2	14,9812	11,1828	9,0486	4,5706	14,2949	14,3964	10,2217	7,9825	15,4989	15,9041	3,5697	12,8466	9,3507		
	P	0,2425	0,5133	0,6988	0,9708	0,2823	0,2761	0,5965	0,7865	0,2153	0,1957	0,8937	0,3803	0,6727		

Tabla VII. Matriz de los valores pareados de distancia genética condicional (cGD) para *C. dombeyana*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1. E2														
2. E3	2.946													
3. E4	11.293	8.347												
4. E6	12.393	9.447	5.785											
5. T2	37.761	34.815	26.467	26.928										
6. T6	31.948	29.001	20.654	21.114	13.919									
7. T7	18.516	15.57	7.222	7.683	19.244	13.431								
8. T8	26.416	23.47	15.122	15.582	11.392	5.531	7.899							
9. T9	31.114	28.168	19.82	20.281	12.194	5.988	12.597	4.698						
10. T11	31.071	28.124	19.777	20.237	6.737	10.186	12.554	4.654	5.457					
11. T12	35.013	32.067	23.719	24.18	7.447	6.472	16.496	8.597	9.399	3.942				
12. T13	28.831	25.885	17.537	17.998	8.929	11.987	10.315	6.455	11.153	6.472	10.414			
13. Chol1	50.515	53.623	62.079	67.687	87.744	82.287	69.119	76.736	81.325	81.205	85.17	83.08		
14. Chol5	33.505	36.614	45.069	50.678	70.734	65.277	52.11	59.727	64.315	64.196	68.17	66.07	3.784	0.000

Tabla VIII. Matriz de los valores pareados de distancia genética condicional (cGD) para *A. chilensis*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. E1													
2. E2	3.215												
3. E3	5.779	2.563											
4. E4	8.152	4.936	2.749										
5. E5	5.666	2.451	2.470	2.485									
6. E6	7.902	4.686	4.705	2.848	2.235								
7. T6	15.98	15.40	14.29	11.54	12.95	10.71							
8. T7	9.040	6.320	3.756	3.850	6.226	6.698	11.83						
9. T8	9.914	12.392	13.484	13.57	12.69	14.93	12.47	9.727					
10. T9	8.711	11.616	9.052	9.145	11.52	11.99	11.92	5.295	4.432				
11. T12	3.879	7.095	9.659	12.03	9.546	11.78	12.10	10.12	6.034	4.831			
12. chol1	3.448	2.638	5.202	5.426	2.941	5.176	7.328	15.41	7.976	9.753	12.15		
13. chol5	4.097	5.672	8.236	8.460	5.974	8.210	7.977	12.38	4.942	6.720	10.23	3.033	0.000

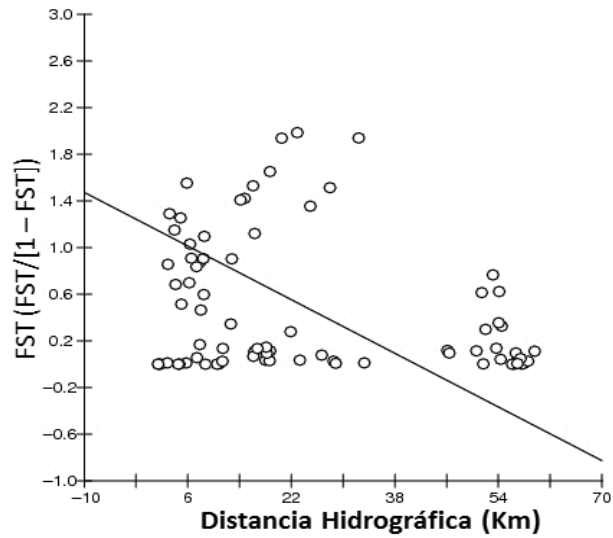


Figura I. Test de Mantel de las correlaciones entre la distancia geográfica (Hidrográfica) y divergencia genética ( $F_{ST} / (1 - F_{ST})$ ) para haplotipos de cada par de poblaciones de *A. chilensis*, en base a los resultados utilizando el marcador COI-ADNmt.

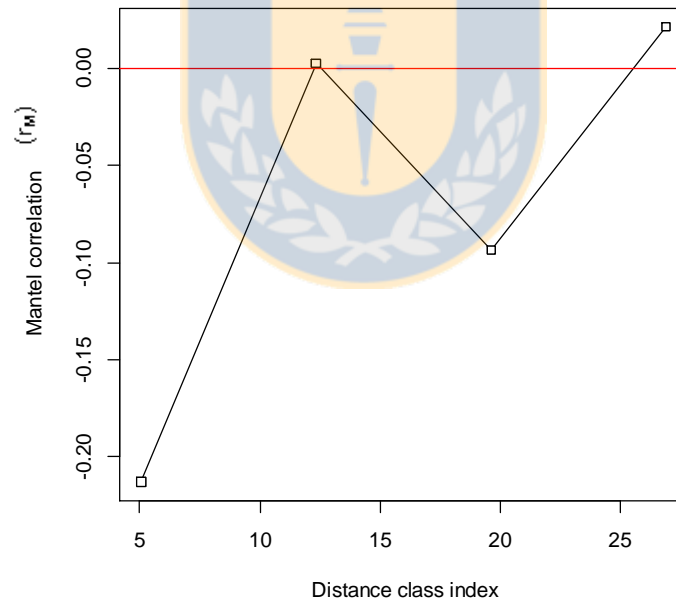


Figura II. Análisis de autocorrelación espacial (Mantel correlograma) en *A. chilensis* mediante marcador mitocondrial (COI-ADNmt). Los correlogramas muestran las relaciones entre clases de distancia hidrgráfica (x-axis) y el valor de correlación de Mantel (y-axis). Estadísticos Mantel positivo ( $r_M$ ) representan una autocorrelación positiva señalando una baja distancia entre pares. Los símbolos en color negro corresponden a valores estadísticamente significativos ( $P < 0.005$ ) y los símbolos sin color corresponden a datos sin significancia.

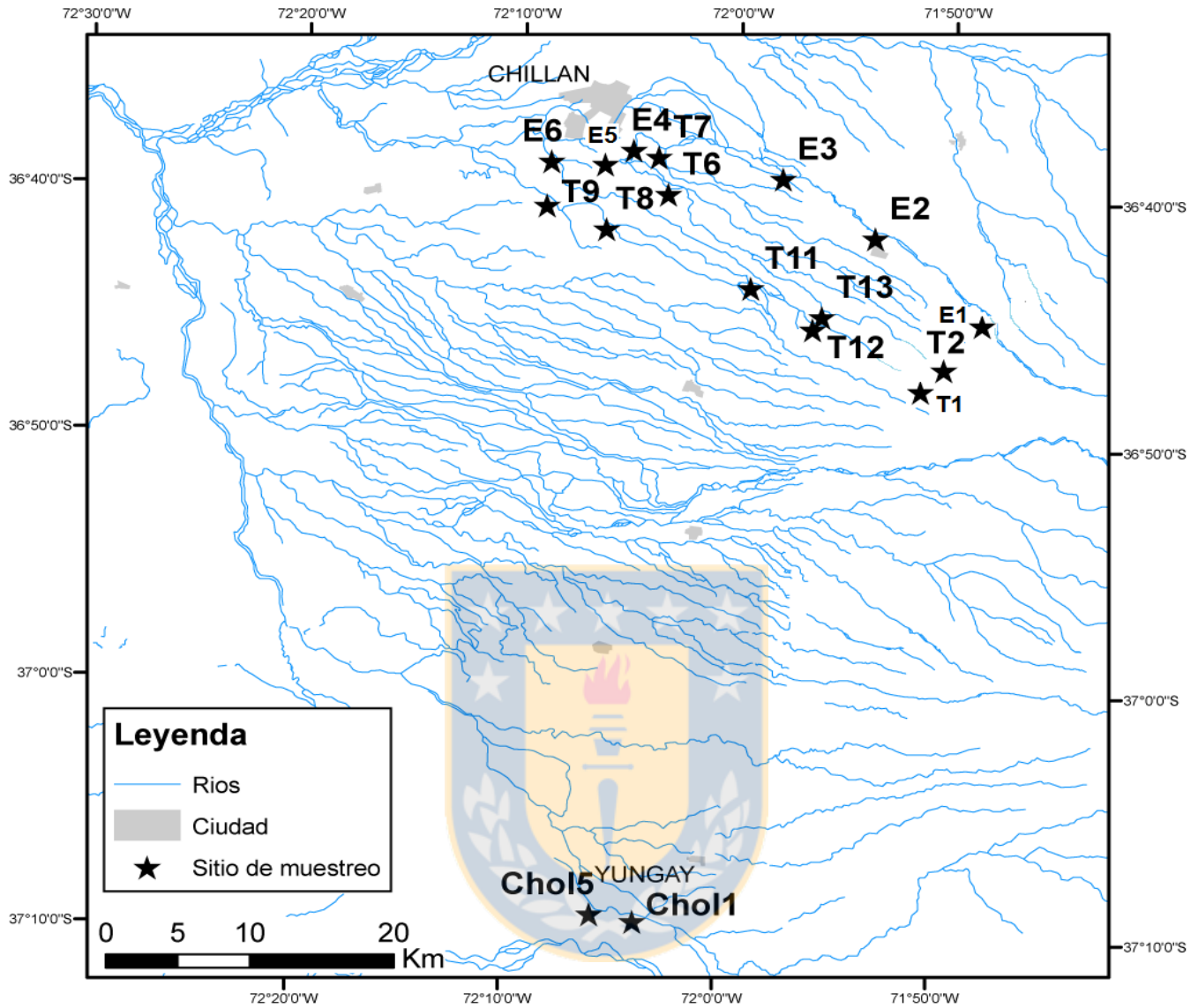


Figura III. Ubicación de las poblaciones de macroinvertebrados de agua dulce muestreadas en el area de estudio (mapas y códigos modificados de Debels *et al.*, 2005). E = sitios de muestreo en el Río Chillán, T = sitios de muestreo en los tributaries del Río Chillán, Chol = sitios de muestreo en el Río Cholguán.

## PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

**Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources Database 1 February 2011–31 March 2011**

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM,<sup>1</sup> JAMES D. AUSTIN,<sup>2,3</sup> ANGÉLINE BERTIN,<sup>4</sup> JÉSSICA P. BÓRQUEZ,<sup>5</sup> L. CÁRDENAS,<sup>6</sup> TATIANA BACRY CARDOZA,<sup>7</sup> FRANK CHAPMAN,<sup>3</sup> ADNA CRISTINA BARBOSA DE SOUSA,<sup>8</sup> ANETE PEREIRA DE SOUZA,<sup>8,9</sup> KORY C. DOUGLAS,<sup>10</sup> SIMON R. ELLWOOD,<sup>11</sup> M. FERRIOL,<sup>12</sup> A. GARMENDIA,<sup>12</sup> NICOLAS GOUIN,<sup>13</sup> JOHN HARGROVE,<sup>3</sup> MADHURI JASTI,<sup>10</sup> I. KERÄNEN,<sup>14</sup> K. E. KNOTT,<sup>14</sup> MARJETA KONEC,<sup>15</sup> K. KUITUNEN,<sup>14</sup> MARCOS PRADO LIMA,<sup>16</sup> CELESTE C. LINDE,<sup>17</sup> H. MERLE,<sup>18</sup> M. E. OLIVA,<sup>19</sup> M. PÉREZ,<sup>20</sup> EMILY SAARINEN,<sup>2,21</sup> PAUL B. SAMOLLOWSKY,<sup>10</sup> VERA MARGARETE SCARPASSA,<sup>7,22</sup> I. SEGURA,<sup>12</sup> LEON SMITH,<sup>17</sup> PETER TRONTELJ,<sup>15</sup> I. M. VALDIVIA,<sup>19,23</sup> HUGH WALLWORK<sup>24</sup> and M. WELLENREUTHER<sup>25</sup>

<sup>1</sup>Molecular Ecology Resources Editorial Office, 6270 University Blvd, Vancouver, BC V6T 1Z4, Canada, <sup>2</sup>Department of Wildlife Ecology and Conservation, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, PO Box 110430, Gainesville FL 32611-0430, USA, <sup>3</sup>Program in Fisheries and Aquatic Sciences, School of Forest Resources and Conservation, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida, PO Box 110430, Gainesville, FL 32611-0430, USA, <sup>4</sup>Departamento de Biología, Universidad de La Serena, La Serena, Chile, <sup>5</sup>Programa de Doctorado en Sistemática y Biodiversidad, Universidad de Concepción, Concepción, Chile, <sup>6</sup>Instituto de Ecología y Evolución, Universidad Austral, Casilla 567, Isla Teja, Valdivia, Chile, <sup>7</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional Pesquisas da Amazônia, Manaus, CEP 69060-001, AM, Brazil, <sup>8</sup>Centro de Biologia Molecular e Engenharia Genética, Universidade Estadual de Campinas, Barão Geraldo, CP 6010, Campinas, CEP 13083-970, SP, Brazil, <sup>9</sup>Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Barão Geraldo, CP 6109, Campinas, CEP 13083-970, SP, Brazil, <sup>10</sup>Department of Veterinary Integrative Biosciences, Texas A&M University, College Station, TX, USA, <sup>11</sup>Department of Environment and Agriculture, Curtin University, Bentley, WA 6102, Australia, <sup>12</sup>Instituto Agroforestal Mediterráneo, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, Spain, <sup>13</sup>Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte, Coquimbo, Chile, <sup>14</sup>Department of Biological and Environmental Science, University of Jyväskylä, PO Box 35, FIN-40014 Jyväskylä, Finland, <sup>15</sup>University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Department of Biology, Večna pot 111, SI-1000 Ljubljana, Slovenia, <sup>16</sup>Laboratório de Genética e Biodiversidade, Instituto de Ciência e Tecnologia das Águas, Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, CEP 68040-050, PA, Brazil, <sup>17</sup>Evolution, Ecology and Genetics, Research School of Biology, 116 Daley Rd, The Australian National University, Canberra, ACT 0200, Australia, <sup>18</sup>Departamento de Ecosistemas Agroforestales, Universidad Politécnica de Valencia, Camino de Vera s/n, E-46022 Valencia, Spain, <sup>19</sup>Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Facultad de Recursos del Mar, Universidad de Antofagasta, Av. Angamos 601, PO Box 170, Antofagasta, Chile, <sup>20</sup>Universidad de Vigo, Facultad de Biología, Departamento Bioquímica, Genética e Inmunología, Genética, 36310 Vigo, Pontevedra, Spain, <sup>21</sup>Environmental Protection Agency, Coastal Ecology Branch, 2111 SE Marine Science Drive, Newport, OR 97365, USA, <sup>22</sup>Laboratório de Genética de Populações e Evolução de Vetores de Malária e Dengue, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, CEP 69060-001, AM, Brazil, <sup>23</sup>Programa de Doctorado en Ciencias Aplicadas, Mención en Sistemas Marinos Costeros, Universidad de Antofagasta, Antofagasta, Chile, <sup>24</sup>South Australian Research and Development Institute, Hartley Grove, Urrbrae, SA 5064, Australia, <sup>25</sup>Department of Biology, Lund University, Sölvegatan 37, SE-223 62 Lund, Sweden

**Abstract**

This article documents the addition of 111 microsatellite marker loci to the Molecular Ecology Resources Database. Loci were developed for the following species: *Acipenser oxyrinchus desotoi*, *Anopheles nuneztovari sensu lato*, *Asellus aquaticus*, *Calopteryx splendens*, *Calopteryx virgo*, *Centaurea aspera*, *Centaurea seridis*, *Chilina dombeyana*, *Proctoeces cf. lintoni* and *Pyrenophora teres f. teres*.

Correspondence: Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium, E-mail: editorial.office@molcol.com

© 2011 Blackwell Publishing Ltd



## 758 PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

This article documents the addition of 111 microsatellite marker loci to the Molecular Ecology Resources Database. Table 1 contains information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and

GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column. A full description of the development protocol for the loci presented here can be found on the Molecular Ecology Resources Database (<http://tomato.biol.trinity.edu/>).

**Table 1** Information on the focal species, the number of loci developed, any other species the loci were tested in and the accession numbers for the loci in both the Molecular Ecology Resources Database and GenBank. The authors responsible for each set of loci are listed in the final column

Species	No. primers developed	Other species tested	MER database no.	GenBank accession no.	Authors
<i>Acipenser oxyrinchus desotii</i>	15	n/a	46060–46074	JF699706, JF699707, JF699709–JF699711, JF699713, JF699716, JF699717, JF699719–JF699721, JF699723–JF699725, JF699727	Hargrove, John; Saarinen, Emily; Chapman, Frank; Austin, James D.
<i>Anopheles numeztovari sensu lato</i>	18	n/a	46094–46111	JF290308–JF290325	Cardoza, Tatiana Bacry; De Sousa, Adna Cristina Barbosa; Lima, Marcos Prado; De Souza, Anete Pereira; Scarpassa, Vera Margarete
<i>Asellus aquaticus</i>	13	n/a	45566–45577, 45759	JF495109–JF495120, JF501100	Konec, Marjeta; Trontelj, Peter
<i>Calopteryx splendens</i> and <i>Calopteryx virgo</i>	19	n/a	46016–46049	JF320921–JF320939	Knott, K. E.; Keränen, I.; Kuitunen, K.; Wellenreuther, M.
<i>Centaurea aspera</i> and <i>Centaurea seridis</i>	8	n/a	46146–46153, 46475–46481	EH716506.1, EH751778.1, EH754166.1, EH772209.1, EH772571.1, EH777535.1, EH780862.1, EH783651.1, EH789030.1	Merle, H.; Segura, I.; Garmendia, A.; Ferriol, M.
<i>Chilina dombeyana</i>	9	n/a	46154–46162	JF683810–JF683818	Bórquez, Jéssica P.; Samollow, Paul B.; Douglas, Kory C.; Jasti, Madhuri; Bertin, Angéline; Gouin, Nicolas
<i>Proctoeces cf. lintoni</i>	9	n/a	46050–46052, 46054–46059	HQ891096–HQ891104	Valdivia, I. M.; Pérez, M.; Cárdenas, L.; Oliva, M. E.
<i>Pyrenophora teres</i> f. <i>teres</i>	20	n/a	46015, 46075–46093	AEEY01000406.1, AEEY01000649.1, AEEY01000824.1, AEEY01000951.1, AEEY01001218.1, AEEY01001850.1, AEEY01002068.1, AEEY01002528.1, AEEY01002811.1, AEEY01003116.1, AEEY01003328.1, AEEY01003630.1, AEEY01004659.1, AEEY01005232.1, AEEY01005482.1, AEEY01005580.1, AEEY01005671.1, AEEY01005938.1, AEEY01006651.1, AEEY01006683.1 (see paper for WGS accession coordinates)	Linde, Celeste C.; Smith, Leon; Ellwood, Simon R.; Wallwork, Hugh

1

## PERMANENT GENETIC RESOURCES NOTE

2

3

**Characterization of microsatellite loci for the Chilean freshwater gastropod *Chilina dombeyana***

4

5

Jéssica P. Bórquez<sup>1</sup>, Paul B. Samollow<sup>2</sup>, Kory C. Douglas<sup>2</sup>, Madhuri Jasti<sup>2</sup>, Angéline Bertin<sup>3</sup>, Nicolas

6

Gouin<sup>4</sup>

7

<sup>1</sup>Programa de Doctorado en Sistemática y Biodiversidad, Universidad de Concepción, Concepción, Chile.

8

<sup>2</sup>Department of Veterinary Integrative Biosciences, Texas A&M University, College Station, TX, USA.

9

<sup>3</sup>Departamento de Biología, Universidad de La Serena, La Serena, Chile.

10

<sup>4</sup>Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas, Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del

11

Norte, Coquimbo, Chile.

12

13

14 Corresponding author

15 Nicolas Gouin

16 Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas

17 Universidad Católica del Norte – Campus Guayacán

18 Larrondo 1281

19 Coquimbo, Chile

20 Email: nicogouin@gmail.com

21 Phone: (56) (51) 20437822

22 Fax: (56) (51) 334741

23

24 **Running title:** Microsatellite loci for *Chilina dombeyana*

25

26

27 **Keywords:** *Chilina dombeyana*, gastropod, freshwater, microsatellites, population genetics



28 **Abstract**

29 Nine polymorphic dinucleotide microsatellite markers were isolated and characterized for *Chilina*  
30 *dombeyana*, an endemic freshwater gastropod species from Chile. Marker polymorphism was tested in a  
31 sample of 24 individuals from a single location. The number of alleles per locus ranged between 2 and 6  
32 and the expected heterozygosity from 0.201 to 0.661. These nine polymorphic loci met the criteria of  
33 Hardy-Weinberg equilibrium and independence, and therefore will be useful for population genetics  
34 studies in *C. dombeyana*.



35 Aquatic (fresh water) ecosystems are among the most widely affected by global climate change and  
36 chemical pollution worldwide (Revenge *et al.*, 2005). *Chilina dombeyana* (Bruguière, 1789) is a freshwater  
37 gastropod mollusk endemic to Chile, inhabiting the cold and well oxygenated rivers of Central Chile  
38 (Valdovinos, 2006). This species suffers from habitat degradation and loss due to anthropogenic  
39 pressures and is considered as vulnerable to extinction (Valdovinos, 2004). However, little is known about  
40 its ecology, population connectivity, and the effect of habitat fragmentation on the evolution of its  
41 populations. In such context, analysis within a landscape genetics framework appears particularly useful  
42 because this approach has the potential to identify both landscape characteristics and the environmental  
43 variables, including variables describing local habitat quality, that influence population structure and  
44 evolution. Because of their high polymorphism and excellent resolving power at small geographical scale,  
45 microsatellite markers are ideal for conducting these kinds of analyses (Lowe *et al.*, 2004).

46 The development of microsatellite markers for *C. dombeyana* was performed by Genetic Marker Services  
47 (Brighton, UK). An overview of the protocol is available on their website at  
48 [www.geneticmarkerservices.com](http://www.geneticmarkerservices.com). Briefly, total genomic DNA for several samples from the Chillán  
49 watershed (VIII<sup>th</sup> region, Chile) was extracted from muscle tissue stored in 95% alcohol using a standard  
50 salt extraction procedure (Bruford *et al.*, 1992), and then sent to the UK for enriched library construction  
51 and polymorphism check. Genomic DNA was digested with the *Rsa* I restriction enzyme, and then  
52 oligonucleotide adaptors were ligated to the generated fragments before polymerase chain reaction (PCR)  
53 amplification to increase the number of products. Enrichment for AG, AC, AAC, AAG and GAT repeat  
54 motifs was carried out using positively charged nylon membranes with bound oligonucleotides of the  
55 respective motifs. Then the fragments containing repeat motifs were eluted and amplified by PCR before  
56 cloning using standard procedures. Positive clones were sequenced using the BigDye Termination  
57 (Applied Biosystems) and primer pairs were designed with Primer3 ([http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3\\_www.cgi](http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi)). Polymorphism was checked with unlabelled primer pairs on high-density  
58 agarose gels and eleven successful pairs were sent to our laboratory for characterization.

60 Polymorphism characterization was carried out on a subset of 24 samples from a single population  
61 located on the Chillán river designated E2 according to Debels *et al.* (2005). DNA extractions for these

62 samples were performed as described above. PCR amplifications were carried out using a MAXYGENE  
63 thermal cycler (Axygen, USA) in 10 µl reactions containing 20 ng of genomic DNA, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1X  
64 PCR buffer, 200 µM each dNTP, 3 pmol of each primer and 0.25 U of GoTaq Hot Start polymerase  
65 (Promega). The forward or the reverse primer was end-labeled with 6FAM, HEX or NED (Table 1). PCR  
66 cycling conditions were 2 min at 95°C, followed by 30 cycles of 94°C for 60 s, specific annealing  
67 temperature (Table 1) for 60 s and 72°C for 60 s, with a final elongation step of 72°C for 10 minutes. PCR  
68 products were electrophoretically separated using an ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems).  
69 Allele size was determined with the GeneMarker software (SoftGenetics) based on comparison with the  
70 migration of the ROX-labeled CEQ 400 Size Standard (Beckman Coulter). Observed and expected  
71 heterozygosity, allelic diversity and allele frequencies were calculated using FSTAT (Goudet, 2001).  
72 Departure from Hardy–Weinberg and linkage equilibrium was tested using exact probability tests  
73 implemented in GENEPOP v.3.4 (Raymond & Rousset, 1995). MICRO-CHECKER (van Oosterhout *et al.*,  
74 2004) was used to check for presence of null alleles.

75 Nine microsatellite primer pairs showed clear and reproducible amplification products (Table 1). The  
76 average number of alleles per locus was 3.44, ranging from 2 to 6. Levels of observed heterozygosity  
77 were relatively high with values between 0.227 and 0.708. Genotype frequencies at each locus did not  
78 deviate from Hardy–Weinberg proportions and no locus displayed significant gametic disequilibrium after  
79 sequential Bonferroni corrections. According to the analyses performed with MICRO-CHECKER, there  
80 was no evidence for the presence of null alleles. Therefore, given their relatively high level of  
81 heterozygosity, these nine microsatellite markers will be useful for studying spatial genetic structure and  
82 population connectivity of *C. dombeyana* in rivers of Central Chile.

83

#### 84 **References**

- 85 Debels P, Figueroa R, Urrutia R, Barra R, Niell X (2005) Evaluation of water quality in the Chillán river  
86 (Central Chile) using physicochemical parameters and a modified water quality index.  
87 *Environmental Monitoring and Assessment*, **110**, 301-322.



- 88 Goudet J (2001) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version  
89 2.9.3.). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- 90 Lowe A, Harris S, Ashton P (2004) *Ecological Genetics: Design, Analysis and Application*. Blackwells,  
91 Oxford. 344 pp.
- 92 Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and  
93 ecumenism. *Heredity*, **86**, 248–249.
- 94 Revenga C, Campbell I, Abell R, De Villiers P, Bryer M (2005) Prospects for monitoring freshwater  
95 ecosystems towards the 2010 targets. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**,  
96 397-413.
- 97 Valdovinos C, Moya C, Olmos V (2004) Biodiversidad de moluscos terrestres en la ecorregión valdiviana  
98 (Chile). En: *Biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa*. (Eds. C. Smith,  
99 J. Armesto & C. Valdovinos), pp. 292-306. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- 100 Valdovinos C (2006). Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana*,  
101 **70**(1), 88-95.
- 102 Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-Checker: software for identifying  
103 and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 535-538.

104  
105

106 **Data Accessibility:**

107 Genbank accessions: JF683810-JF683818.

108  
109

110 **Acknowledgments**

111 The authors wish to thank Ivan Vera and Nick Harvey for technical assistance. This research was funded  
112 by a grant from the Chilean National Research Agency FONDECYT #1090404. N.G. was partially  
113 supported by the project INNOVA-CORFO "Center of Biotechnology for the Development of Arid Zones -  
114 Biotecza" #06FC01IBC-71 from the Chilean Agency for Economic Development.

## Tables

Table 1. Characteristics of the microsatellite loci isolated for the freshwater gastropod *Chilina dombeyana*.

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	Size range (bp)	T <sub>a</sub> (°C)	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	F <sub>IS</sub>	P
cm41 JF683810	[GA] <sub>12</sub>	F: Hex-GCGGACTTTCTCTCAGTCTCC R: GTACTGACTTCAAGCAGC	221-234	55	3	0.542	0.469	-0.135	0.826
cm42 JF683811	[GA] <sub>11</sub>	F: GCGGTAATCAAAGACGCACT R: 6Fam-TTGTCATCACACCTCGATTCA	216-226	55	3	0.625	0.655	0.068	0.253
cm43 JF683812	[AG] <sub>29</sub>	F: GGGGATTTGTTTTGAGTGAA R: Ned-CTCCAAATCTCCAATGGAAAA	211-222	57	2	0.348	0.386	0.120	0.466
cm44 JF683813	[AC] <sub>10</sub>	F: 6Fam-CGTCAAGTGTGTTGTTGAGC R: GCGGCTGACTGTAACAAAGG	201-212	55	2	0.227	0.201	-0.105	1.000
cm48 JF683814	[AC] <sub>6</sub>	F: Ned-AGATAACGGGGCTGCAATA R: CAGGCAATACCTCCCACT	192-193	57	2	0.625	0.457	-0.348	0.989
cm49 JF683815	[GA] <sub>13</sub>	F: GATCCGCAATGATGATGTTG R: Hex-ACTGGTGTGCGTCGGGTAG	263-270	55	6	0.636	0.603	-0.032	0.651
cm50 JF683816	[GA] <sub>9</sub>	F: 6Fam-GACGAAGATAGACATCAGCAC R: 5'-CTCTTTACCTGCCTGCGTTT	113-122	55	3	0.458	0.442	-0.016	0.658
cm52 JF683817	[AG] <sub>11</sub>	F: GACTTTAATGATTTGAGAACA R: 6Fam-TGACCCATCTGTGCCTATCA	146-155	55	4	0.708	0.661	-0.051	0.696
cm53 JF683818	[AG] <sub>14</sub>	F: Hex-CACTGTTGGCATATCAGTGGA R: TGCAGGGTAGAAAAATTAGACT	204-226	55	6	0.522	0.626	0.188	0.136

T<sub>a</sub> = annealing temperature, A = number of alleles, H<sub>o</sub> = observed heterozygosity, H<sub>e</sub> = expected heterozygosity, P = P-value of exact probability test for deviation from Hardy-Weinberg equilibrium. Genbank accession numbers are given below the locus name.



## Isolation of microsatellite markers for two Chilean freshwater anomuran species (*Aegla araucaniensis* and *Aegla pwenchae*) using PCR-based methods

Nicolas Gouin · Jéssica Bórquez · Paul B. Samollow · Kory C. Douglas · Madhuri Jasti · Angéline Bertin

Received: 20 June 2011 / Accepted: 2 July 2011 / Published online: 14 July 2011  
© Springer Science+Business Media B.V. 2011

**Abstract** We developed ten polymorphic microsatellite markers for two species of freshwater anomura endemic to Chile, *Aegla araucaniensis* and *Aegla pwenchae*, using two PCR-based methods, PIMA and ISSR-PCR. Nine markers per species gave useful PCR products, revealing moderate to high levels of genetic variation. The number of alleles per locus ranged from 2 to 13 and the observed heterozygosity from 0.103 to 0.929. All the markers appeared to segregate independently. No departure from Hardy–Weinberg equilibrium was found in *A. araucaniensis* while three markers

showed evidence for deficits of heterozygotes and presence of null alleles in *A. pwenchae*. These markers will be useful for population genetics analyses.

**Keywords** Aeglidae · Crustacean · Microsatellite · PIMA · ISSR-PCR · Population genetics

The family Aeglidae consists of approximately 70 species of freshwater crustacean decapods that are endemic to South America (Bond-Buckup et al. 2008). A third of these species are considered endangered due to their vulnerability to anthropogenic pressures and their restricted distribution (Bond-Buckup et al. 2008). Molecular genetic studies performed in Chile have focused on the analysis of DNA sequences to disentangle the phylogenetic relationships between Chilean aeglid species (Pérez-Losada et al. 2002; Xu et al. 2009). However, little is known about the impact of habitat fragmentation and degradation on the evolution of populations of these freshwater crustaceans. Here we report the development of microsatellite markers for two aeglid species, *Aegla araucaniensis* and *Aegla pwenchae*, found in South Central Chile (Jara 1996).

Microsatellite isolation was achieved using two PCR-based methods: PIMA (Lunt et al. 1999) and ISSR-PCR (Zietkiewicz et al. 1994). Genomic DNA was extracted from gill tissue from samples stored in 95% alcohol using the Wizard SV Genomic Purification System (Promega). RAPD amplifications for the PIMA procedure were performed as described in Gouin et al. (2003) using GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega). ISSR-PCR reactions were carried out in 25  $\mu$ l reactions containing 30 ng of DNA, 1  $\times$  GoTaq Flexi buffer (Promega), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M each dNTP, 25 pmol of primer, and 0.75 U GoTaq

N. Gouin (✉)  
Centro de Estudios Avanzados en Zonas Áridas,  
Facultad de Ciencias del Mar, Universidad Católica del Norte,  
Campus Guayacan, Larrondo 1281, Coquimbo, Chile  
e-mail: nicogouin@gmail.com

J. Bórquez  
Programa de Doctorado en Sistemática y Biodiversidad,  
Universidad de Concepción, Concepción, Chile

P. B. Samollow · K. C. Douglas · M. Jasti  
Department of Veterinary Integrative Biosciences,  
Texas A&M University, College Station, TX, USA

A. Bertin  
Departamento de Biología, Universidad de La Serena,  
La Serena, Chile



Flexi DNA polymerase (Promega). The cycling program was: 95°C for 5 min, 12 cycles of 95°C for 1 min, 64°C for 1 min decreasing of 1°C each cycle, 72°C for 2 min, followed by 20 cycles of 95°C for 1 min, 49°C for 1 min, 72°C for 2 min, with a final elongation of 7 min at 72°C. The primers used for library construction are listed in Table 1. Separate libraries were produced for each species and method. Cloning was performed with the pGEM-T Easy cloning kit (Promega) following the manufacturer's recommendations. Positive clones were PCR-screened for the presence of internal microsatellite sequences as described in Lunt et al. (1999), using a combination of M13 vector primers with one of the following primers (CT)<sub>12</sub>-D or (GT)<sub>12</sub>-H. 349 clones were screened for *Aegla araucaniensis* and 315 for *Aegla pewenchaе*. Clones showing evidence for the presence of repeat motifs (84 in *Aegla araucaniensis* and 76 in *Aegla pewenchaе*) were re-amplified using the vector primers only, and these PCR products were sent to Macrogen (Korea Republic) for sequencing. Sequences were edited using GeneiousPro (Biomatters) and primer pairs were designed with Primer3 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>).

Thirty-eight primer sets were designed (18 for *A. araucaniensis*, 20 for *A. pewenchaе*). Most of the loci appeared monomorphic or showed multiple bands. The remaining primer pairs were amplified for polymorphism characterization in 30 individuals from a single population for each species. These samples belonged to populations from the Chillán watershed (8th region, Chile). PCR reactions were performed in 10 µl mixtures containing 20 ng of DNA, 1 × GoTaq Flexi buffer (Promega), 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µM each dNTP, 3 pmol each primer, and 0.25 U GoTaq Hot Start polymerase (Promega). Forward primers were end-labeled with fluorescent phosphoramidites (Table 2). PCR amplifications were conducted as followed: 94°C for 5 min, 35 cycles of 94°C for 30 s, specific annealing temperature (Table 2) for 15 s, 72°C for 20 s, and 72°C for 7 min. PCR products were separated using an ABI 3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Allele size was determined with GeneMarker (SoftGenetics) based on comparison with the ROX-labeled CEQ 400 Size Standard (Beckman Coulter). Heterozygosity, allelic diversity and allele frequencies were calculated using FSTAT (Goudet 2001). Departure from Hardy–Weinberg and linkage equilibrium was tested with GENEPOP (Raymond and Rousset 1995). Micro-checker (van Oosterhout et al. 2004) was used to check for presence of null alleles.

Ten loci gave clear and reproducible PCR products (Table 2). Most of them amplified well both species' DNA. Exceptions were *Ara7* in *A. araucaniensis* and *Pew2* in *A. pewenchaе*, which exhibited complicated amplification patterns and were discarded for the respective species. *Pew16* is composed of a mononucleotide repeat that gave a clear polymorphism. Mononucleotide repeats were previously considered difficult to score reliably with earlier DNA analyzer technology. But modern platforms can easily discriminate single-nucleotide-repeat length differences, so mononucleotide repeats can now provide an important class of useful polymorphic markers (Christians and Watt 2009). For *A. araucaniensis*, the nine microsatellite markers showed no departure from Hardy–Weinberg equilibrium. In *A. pewenchaе*, however, three markers (*Ara2*, *Ara4*, and *Ara13*) displayed significant deficits of heterozygotes. Although none of these tests remained significant after Bonferroni corrections, analyses with Micro-checker suggest the presence of null alleles ( $P < 0.01$ ) for these three markers. Regarding exact tests for gametic disequilibrium, two tests were barely significant in *A. araucaniensis* for the pairs *Ara4/Pew5* ( $P = 0.043$ ) and *Ara2/Pew5* ( $P = 0.049$ ). They did not remain significant after Bonferroni corrections. No significant gametic disequilibrium between marker pairs was found in *A. pewenchaе*, which suggests that the two departures observed in the other species were probably random and that all these loci are independent. Therefore, these markers will be useful for the analysis of population structure in these freshwater crustaceans.

**Table 1** List of RAPD and ISSR primers used for the libraries construction

	<i>Aegla araucaniensis</i>	<i>Aegla pewenchaе</i>
	<i>RAPD primers</i>	<i>RAPD primers</i>
	Serie 4: 301, 308, 310, 317, 340, 383 <sup>a</sup>	Serie 4: 301, 313, 318, 335, 360, 372, 381 <sup>a</sup>
	Serie 5: 406, 423, 438, 450, 455 <sup>a</sup>	Serie 5: 438, 439, 448, 450, 455, 470 <sup>a</sup>
	Serie 7: 606, 615, 620, 640, 652, 682 <sup>a</sup>	Serie 7: 603, 655, 675 <sup>a</sup>
	Serie 8: 703, 707, 710, 715, 716, 730, 735, 740, 792 <sup>a</sup>	Serie 8: 703, 707, 716, 724, 740, 763, 782, 792, 798 <sup>a</sup>
	OPA: 2-10-13-14-18 <sup>b</sup>	OPA: 1-2-7-10-12-13-14-18-20 <sup>b</sup>
	OPB: 10-12-15-17-18 <sup>b</sup>	OPB: 7-8-10-12-15-17-18 <sup>b</sup>
	<i>ISSR primers</i> <sup>a</sup>	<i>ISSR primers</i> <sup>a</sup>
	C5, E8, F6, F8, G1, H1, H2, H4, H5, E2	C3, C4, C5, E8, F6, G1, G8, H1, H2, H4, H5, E2

<sup>a</sup> Primers from the University of British Columbia

<sup>b</sup> Primers from Operon Technology

**Table 2** Characteristics of the microsatellite loci isolated for the freshwater crustacean species *Aegla araucaniensis* and *Aegla pevenchiae*

Locus	Repeat motif	Primer sequence (5'-3')	<i>Aegla araucaniensis</i>						<i>Aegla pevenchiae</i>					
			T <sub>a</sub> (°C)	Size range (bp)	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	P	T <sub>a</sub> (°C)	Size range (bp)	A	H <sub>o</sub>	H <sub>e</sub>	P
<b>Ara2</b> <i>JF693281</i>	(GGG) <sub>6</sub> (GA) <sub>23</sub>	F: 6Fam-CGGATCGGTGGAGTATATTG R: CGTGACGCATCAAGTGTAAAG	56	218–248	13	0.929	0.900	0.654	58	187–203	5	0.467	0.702	0.019
<b>Ara4</b> <i>JF693282</i>	(GA) <sub>11</sub>	F: 6Fam-AAACAGCCAGTCAGAAAG R: ATTAAAGCCGGATCACCTTG	62	134–146	7	0.654	0.678	0.347	66	130–138	5	0.591	0.757	0.025
<b>Ara7</b> <i>JF693289</i>	(TC) <sub>6</sub> (TG) <sub>2</sub>	F: 6Fam-CCTGTTTCAGTGGAGTGGTG R: GAATGGATGCCGTGAGTGAAG	-	-	-	-	-	62	329–337 <sup>b</sup>	6	0.733	0.761	0.226	
<b>Ara13<sup>a</sup></b> <i>JF693280</i>	(TA) <sub>7</sub> (CA) <sub>3</sub>	F: Hex-ATCGATCCTGAGAGTACCG R: AAAGACTAGCCAGGCCAAC	56	175–179	3	0.103	0.099	1.000	56	175–177	2	0.191	0.408	0.021
<b>Ara14<sup>a</sup></b> <i>JF693283</i>	(GAAT) <sub>5</sub>	F: Ned-AGCCATAGTTACTGACACGAG R: TTAGAGCGCCGGTCAATATG	58	139–148	3	0.166	0.155	1.000	58	148–152	2	0.300	0.299	0.673
<b>Ara16<sup>a</sup></b> <i>JF693284</i>	(GA) <sub>5</sub>	F: Ned-CACAGGTCACATGACAAGC R: ACCTTGCACTCCATCCATC	60	242–246 <sup>b</sup>	4	0.759	0.682	0.739	60	286–293 <sup>b</sup>	4	0.300	0.269	1.000
<b>Pew2</b> <i>JF693288</i>	(GAT) <sub>3</sub> (GAG) <sub>3</sub> GGG(GAG) <sub>3</sub> (GAA) <sub>4</sub> (GAG) <sub>4</sub>	F: 6Fam-AATGGTATCGATTATGATAGGG R: TCGCCAACTAACAGGAAATG	58	195–197	2	0.269	0.286	0.565	-	-	-	-	-	
<b>Pew4</b> <i>JF693287</i>	(CT) <sub>8</sub>	F: 6Fam-TGTACCGACTCCTGGTTTC R: GGAGGTATGCAGTGAAGCC	60	297–304 <sup>b</sup>	7	0.741	0.772	0.436	60	299–304 <sup>b</sup>	5	0.655	0.679	0.327
<b>Pew5</b> <i>JF693285</i>	(CA) <sub>10</sub> (CAAA) <sub>4</sub>	F: Ned-CCCAATTCATCTCGCTTC R: AATAGCCCGGGATCATAAC	58	293–297 <sup>b</sup>	4	0.310	0.276	1.000	58	283–327 <sup>b</sup>	6	0.400	0.399	0.603
<b>Pew16</b> <i>JF693286</i>	(A) <sub>6</sub> T(A) <sub>6</sub>	F: Hex-AAAAGAACCCCTCAAGCAAG R: ATGATACAGTGCATGGCTTAG	56	124–126 <sup>b</sup>	3	0.172	0.216	0.249	56	124–125 <sup>b</sup>	2	0.345	0.328	0.762

Genbank accession numbers are given below the locus name

T<sub>a</sub>, annealing temperature, A number of alleles, H<sub>o</sub>, observed heterozygosity and H<sub>e</sub>, expected heterozygosity; P, P-value of probability test for deviation from Hardy–Weinberg equilibrium

<sup>a</sup> Loci isolated with the ISSR method

<sup>b</sup> Markers showing alleles with 1 bp difference

**Acknowledgments** We thank Ivan Vera, Andrea Hueche and Paloma Gachon for technical assistance, and Ricardo Galleguillos, Cristian Gallardo Escárate and Eduardo Ruiz Ponce for providing the RAPD and ISSR primers. This research was funded by a grant from the Chilean National Research Agency FONDECYT #1090404. NG was also supported by the project INNOVA-CORFO #06FC01IBC-71.

## References

- Bond-Buckup G, Jara CG, Pérez-Losada M, Buckup L, Crandall KA (2008) Global diversity of crabs (Aeglidae: Anomura: Decapoda) in freshwater. *Hydrobiologia* 595:267–273
- Christians JK, Watt CA (2009) Mononucleotide repeats represent an important source of polymorphic microsatellite markers in *Aspergillus nidulans*. *Mol Ecol Res* 9:572–578
- Goudet J (2001) FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>
- Gouin N, Grandjean F, Pain S, Souty-Grosset C, Reynolds J (2003) Origin and colonization history of the white-clawed crayfish, *Austropotamobius pallipes*, in Ireland. *Heredity* 91:70–77
- Jara CG (1996) Taxonomía, sistemática y zoogeografía de las especies chilenas del género *Aegla* (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae). Doctoral thesis, Universidad de Concepción
- Lunt DH, Hutchinson WF, Carvalho GR (1999) An efficient method for PCR-based isolation of microsatellite arrays (PIMA). *Mol Ecol* 8:891–894
- Pérez-Losada M, Jara CG, Bond-Buckup G, Crandall KA (2002) Phylogenetic relationships among the species of *Aegla* (Anomura: Aeglidae) freshwater crabs from Chile. *J Crust Biol* 22: 304–313
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenism. *Heredity* 86:248–249
- Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes* 4:535–538
- Xu J, Pérez-Losada M, Jara CG, Crandall KA (2009) Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Mol Ecol* 18:904–918
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D (1994) Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)—anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20:176–183

