



UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Programa de Magíster en Ciencias, mención Zoología

Evaluando el papel de las glaciaciones pleistocénicas sobre la estructura filogeográfica de *Chilina* (Mollusca: Chiliniidae) en la Patagonia Occidental

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción para optar al grado de Magíster en Ciencias, con mención en Zoología

Por: VALERIA IRLANDA CABALLERO ARANEDA

Profesor guía: Claudio Luis Correa Quezada

Profesor co-guía: Gonzalo Andrés Collado Inzulza

2020

Concepción, Chile

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento.





*Dedico este trabajo a mis padres, Marcia y Hernán,
el mayor ejemplo de lo que es el esfuerzo y la perseverancia.*

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer infinitamente a mis padres, que siempre ha creído en mí, me han brindado todo su cariño, cuidados y los mejores consejos para no rendirme y seguir siempre adelante. A los dos, les estoy y estaré eternamente agradecida por haberme dado las herramientas para ser quien soy hoy día. De igual modo quiero agradecer a los demás miembros de mi linda y numerosa familia: a mis hermanas y hermanos Marcela, Claudio, Ximena, Mauricio, Milton, Ilse y Leonardo, que siempre me han apoyado y estado ahí para ayudarme en cualquier cosa que necesito. De igual modo a mis sobrinas y sobrinos Paula, Maximiliano, Moisés, Camila, Alonso, Marcos, Daniel y Ximenita, cada uno de ustedes tiene un pedacito de mi corazón, gracias por llenarme de alegrías y por considerarme como su tía favorita.

Quiero también agradecer enormemente a mi compañero de aventuras Fabián Rivera, quien en todo momento me brindó su apoyo, me dedicó su oído para escucharme y brindarme palabras de aliento en los momentos de flaqueza y celebró conmigo cada pequeño triunfo que fui teniendo a lo largo de mi trabajo. Le agradezco por eso y cómo no, por su disposición a ayudarme entender el lado informático detrás de algunos softwares que empleé para mis análisis. ¡Muchísimas gracias!

Un especial agradecimiento a mi gata Greta, que llegó a mi vida en mayo de 2019 y desde entonces no ha hecho más que brindarme su amor incondicional a través de sus abrazos, masajes y ronroneos. También mis agradecimientos van para mi pequeña gata Emilia, mi “terremotito”, que desde el día en que la vi nacer se transformó en mi pequeña luz de esperanza en medio de lo que ha sido la actual pandemia por Coronavirus.

Quiero agradecer también a Karina Aguayo, por brindarme su ayuda y estar atenta a todas mis dudas en el laboratorio y a Darío Farías, por ayudarme en los protocolos para la obtención de mis marcadores AFLP y por su valiosa amistad.

Mis agradecimientos van especialmente también a las personas que me guiaron en el transcurso de mi tesis, al Dr. Gonzalo Collado primeramente, por haber confiado en mí y darme la oportunidad de trabajar en su colección de moluscos de agua dulce, por estar abierto a mis ideas y alentarme a seguir adelante y finalmente, al Dr. Claudio Correa, por ser un

apoyo constante a lo largo de mi trabajo, por todos los consejos que me brindó y que me acompañarán por el resto de mi carrera como científica y por ser un excelente profesor guía.
¡Muchísimas gracias!

Por último, quiero agradecer a la Dirección de Postgrado de la Universidad de Concepción y al proyecto Fondecyt N°1181873 del Dr. Cristian Torres Díaz por financiar parte de esta investigación, así como también a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, por financiar parte de lo que fue mi participación en el III Congreso Argentino de Malacología en diciembre de 2019.



Tabla de contenidos

Índice de Tablas	vi
Índice de Figuras	vii
RESUMEN	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Eventos históricos que dieron lugar al paisaje Patagónico Occidental.....	1
1.2 glaciaciones pleistocénicas y estructura filogeográfica	3
1.3 Patrones filogeográficos de la biota patagónica.....	4
1.4 Modelo de estudio.....	5
1.5 Problema a abordar	9
1.6 Hipótesis	12
1.7 Objetivo general:.....	13
1.8 Objetivos específicos:.....	13
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
2.1 Recolección de muestras.....	14
2.2 Extracción y amplificación de ADN.....	16
2.3 Alineamiento y análisis filogenético de las secuencias de ADN.....	16
2.4 Estructuración genética e índices de diversidad	18
2.5 Demografía histórica.....	19
2.6 Selección de partidores y reacciones de AFLP.....	20
2.7 Análisis de datos AFLP	21
3. RESULTADOS	23
3.1 Diversidad del ADN mitocondrial.....	23
3.2 Análisis filogenéticos.....	23
3.3 Análisis genéticos poblacionales	24
3.4 Demografía histórica.....	29
3.5 Red de haplotipos.....	30
3.6 Diversidad genética nuclear	35
3.7 Estructura genética poblacional	36
4. DISCUSIÓN.....	41
4.1 Patrones filogeográficos.....	41
4.2 Refugio glacial	42

4.3 Demografía histórica.....	44
4.4 Nuevo género	46
4.5 Diversidad de especies del género <i>Chilina</i> en la Patagonia Norte Occidental	47
5. CONCLUSIONES.....	50
6. REFERENCIAS	51



Índice de Tablas

Tabla 1. Ubicación geográfica de las localidades en que se muestrearon poblaciones de Chilina en la Patagonia Occidental. Se indica también el área a la que pertenecen las muestras: glaciada (G) y no glaciada (NG).	14
Tabla 2. Secuencias de individuos del género Chilina extraídas de GenBank e incorporadas en los análisis filogenéticos. Se detalla su procedencia, número de acceso y autores.	17
Tabla 3. Partidores utilizados para las reacciones de AFLP.....	20
Tabla 4. Tamaño de muestra (N), haplotipos de ADNmt y su frecuencia, diversidad haplotípica (Hd), diversidad nucleotídica (π) y estimaciones de la diversidad genética actual (θ_π) e histórica (θ_w) de las 10 localidades de Chilina sp. Los haplotipos que están presentes en más de una localidad se muestran en negrita. SD = desviación estándar.	26
Tabla 5. Matriz de diferenciación genética (FST) entre localidades de Chilina sp., basadas en las frecuencias haplotípicas de ADNmt. Los valores no significativos ($> 0,05$) están subrayados.	28
Tabla 6. Pruebas de neutralidad (D de Tajima y Fs de Fu) y parámetros de la Distribución de Desajuste para cada localidad de muestreo.	31
Tabla 7. Diversidad de los marcadores AFLP en cada una de las 10 localidades muestreadas.	35
Tabla 8. Matriz de distancia genética de Nei entre pares de localidades de Chilina sp., calculada con los datos de AFLPs.	36

Índice de Figuras

Figura 1. Mapa de la extensión máxima aproximada de la capa de hielo del Último Máximo Glacial (LGM). Basado en Hulton <i>et al.</i> (2002) y McCulloch <i>et al.</i> (2015).	2
Figura 2. Distribución del género <i>Chilina</i> en Sudamérica. Basado en Pilsbry (1911).	7
Figura 3. (a) Embriones encapsulados. (b) Masa gelatinosa rodeando embriones encapsulados. (c) Ejemplar adulto de <i>C. dombeyana</i> realizando postura de una masa gelatinosa sobre la superficie de una roca.	11
Figura 4. Mapa de los sitios de muestreo de <i>Chilina</i> en zonas que estuvieron dentro y fuera de los márgenes del Último Máximo Glacial (triángulos y círculos, respectivamente). El área de color lila representa la extensión glacial del UMG, basado en Hulton <i>et al.</i> (2002).	15
Figura 5. Relaciones filogenéticas basadas en secuencias del gen mitocondrial COI de <i>Chilina</i> sp., reconstruidas usando el método de Inferencia Bayesiana. Los números sobre las ramas separados por un slash son probabilidades posteriores bayesianas y valores de bootstrap del análisis de MV, respectivamente.	27
Figura 6. Análisis de distribución de desajustes entre secuencias de ADNmt de <i>Chilina</i> en diferentes grupos geográficos: a) río Toltén, b) estero Camposanto, c) río Chaihuín, d) río Rahue, e) río Milagro, f) río Puelo, g) río Negro, h) zona no glaciada, i) zona glaciada, j) todas las secuencias. La línea continua representa la distribución esperada y la línea discontinua representa la distribución observada.	32
Figura 7. Diagramas de Horizonte Bayesiano (BSP) que representan la demografía histórica de <i>Chilina</i> sp. en los últimos 200 mil años, utilizando secuencias del gen mitocondrial COI. a) Demografía histórica derivada de todas las localidades de estudio. b) Demografía histórica del conjunto de localidades que forman parte de la zona glaciada. El tiempo (Ma) y el tamaño de población efectivo escalado se encuentran representados a lo largo del eje x e y, respectivamente. Las líneas continuas son estimaciones medias y las áreas sombreadas indican regiones con densidades posteriores mayores al 95% (95% HPD). Por su parte, las barras grises representan el periodo de duración del UMG (~23.000 – 25.000 ka).	33
Figura 8. Red de haplotipos del gen mitocondrial COI de 81 individuos de <i>Chilina</i> sp. provenientes de diez localidades de muestreo. Cada círculo corresponde a un haplotipo distinto y su tamaño es proporcional a su frecuencia. El número junto a cada círculo	

corresponde al nombre de cada haplotipo y los colores indican su procedencia geográfica, las que se indican también en el mapa adjunto. El área sombreada en el mapa indica la zona cubierta de hielo durante el Último Máximo Glacial. 34

Figura 9. Resultados de GENELAND utilizando el modelo de frecuencias no correlacionadas para datos de AFLP de *Chilina* sp. (n = 59). a) Histograma de densidad de probabilidad posterior por número de poblaciones (K), donde la mayor densidad corresponde a K = 2, b) Posición relativa de los puntos de muestreo, c) Asignación de los puntos de muestreo a cada cluster y d) Clusters 1 y 2 con sus respectivos puntos de muestreo. En blanco y amarillo se representa una mayor probabilidad de pertenecer a un cluster determinado, mientras que en rojo se muestra una baja probabilidad. 37

Figura 10. Resultados de STRUCTURE utilizando el modelo de mezcla con frecuencias no correlacionadas para datos de AFLPs de *Chilina* sp. (n = 59). a) Gráfico de ΔK para cada K de acuerdo con Evanno *et al.* (2005). b) K = 3 y c) K = 5. Cada individuo está representado por una línea vertical, que se subdivide en distintos colores. Estos representan a los distintos grupos detectados por el programa, por lo tanto, la fracción de cada color en un individuo indica la probabilidad de pertenecer a un grupo en particular. Los individuos están agrupados según su localidad de origen y según si estas tuvieron o no influencia glacial durante el UMG. 39

Figura 11. Resultados de GENELAND utilizando el modelo de frecuencias no correlacionadas para datos de AFLPs de *Chilina* sp. (n = 79). a) Histograma de densidad de probabilidad posterior por número de poblaciones (K), donde la mayor densidad corresponde a K = 2, b) Posición relativa de los puntos de muestreo, c) Asignación de los puntos de muestreo a cada cluster y d) Clusters 1 y 2 con sus respectivos puntos de muestreo. En blanco y amarillo se representa una mayor probabilidad de pertenecer a un cluster determinado, mientras que en rojo se muestra una baja probabilidad. 40

RESUMEN

Las oscilaciones climáticas pleistocénicas han tenido un rol preponderante en la configuración del paisaje patagónico del sur de Chile, influyendo directamente en la distribución de la variación genética de su biota. Varios estudios han evaluado el efecto de los ciclos glaciales pleistocénicos sobre las poblaciones de diversos taxones terrestres, pero pocos han utilizado como modelo a organismos de agua dulce. Utilizando secuencias de ADN mitocondrial (citocromo oxidasa I) y marcadores nucleares AFLP, se estudió el patrón filogeográfico de los caracoles de agua dulce del género *Chilina*, organismos de desarrollo directo distribuidos ampliamente en los sistemas hídricos de la Patagonia Occidental. Para ello, se incluyeron individuos de localidades ubicadas en zonas glaciadas y no glaciadas durante el Último Máximo Glacial (39°-44°S). Los análisis filogenéticos mostraron dos clados principales, uno de los cuales incluyó ejemplares de tres poblaciones de la zona no glaciada, Río Chaihuín, Río Cruces y Río Rahue, y el segundo conformado a su vez por dos clados: uno que agrupa ejemplares de las localidades situadas en la zona no glaciada y otro de las localidades de la zona glaciada. Además, se detectó una diferencia en la estructura genética entre ambas zonas: la zona no glaciada mostró una mayor diversidad genética que la zona glaciada, por lo que se presume que posiblemente pudo haber actuado como refugio glacial. Por su parte, en la zona glaciada se detectaron señales de una expansión poblacional repentina, lo que sugiere un cuello de botella reciente. Los resultados filogenéticos desafían la taxonomía tradicional del género *Chilina*, basada exclusivamente en caracteres morfológicos, mientras que los patrones filogeográficos y de diversidad genética sugieren que las poblaciones de esta zona han sido afectadas por los ciclos glaciales del Pleistoceno.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 EVENTOS HISTÓRICOS QUE DIERON LUGAR AL PAISAJE PATAGÓNICO OCCIDENTAL

Los sistemas hidrográficos de la Patagonia Occidental se vieron afectados por una serie de eventos geológicos y climáticos que ocurrieron principalmente a lo largo del periodo Cuaternario (2.5 Ma - presente). A comienzos del Mioceno, el levantamiento de los Andes del sur, que comenzó hace unos 23 millones de años y continúa hasta hoy (Ramos, 1989; Rodríguez-Tribaldos *et al.*, 2017), dividió las redes fluviales que cruzaban transversalmente el territorio sur de Sudamérica (Ruzzante *et al.*, 2006). Posteriormente, las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (~2.6 Ma – 14 ka) modificaron el patrón de drenajes de los sistemas hídricos mediante una serie de eventos, como la división o unión de cuencas fluviales por capturas, el cambio de dirección de ciertos cuerpos de agua y modificación de pendientes producto de la disminución del nivel del mar, la aparición de nuevos ríos que fueron drenando corrientes fluviales provenientes del derretimiento de glaciares, e incluso la aparición de lagos, como remanentes glaciares tras periodos de deglaciación (Strahler & Strahler 1994; Lundberg *et al.*, 1998; Rohling *et al.*, 1998; Burridge *et al.*, 2006; Pastor, 2013).

Los ciclos glaciales registrados en este período y que han afectado el cono sur de Sudamérica han sido bien documentados (Rabassa & Clapperton 1990; Ruzzante *et al.*, 2008). Entre ellos se cuentan: (1) La Gran Glaciación Pleistocénica (~1.1 Ma), (2) la Glaciación más fría del Pleistoceno (~ 0.7 Ma), (3) la Última Glaciación de Patagonia Sur (~180 ka), y (4) el Último Máximo Glacial (LGM, ~25-23 ka). Durante este último evento, las capas de hielo cubrieron extensas áreas de la Patagonia desde los 36°S hasta los 56° S, aproximadamente (Clapperton, 1993; McCulloch *et al.*, 2000; Hulton *et al.*, 2002). Al sur de los 45°S, toda la tierra al oeste de los Andes estuvo cubierta por una extensa capa de hielo (Vuilleumier, 1971), que se extendía hasta el extremo sur de Tierra del Fuego (Caldenius, 1932; Hollin y Schilling, 1981; Hulton *et al.*, 1994). En cambio, desde los 36° a 44°S, extensas áreas de la costa de Chile permanecieron descubiertas (Rabassa & Clapperton 1990; Clapperton 1993) (Figura 1). Estos sucesivos eventos, en conjunto con la orogenia andina, alteraron los ecosistemas continentales y sus niveles de conectividad, dando origen a la actual

diversidad de paisajes que conforman esta ecorregión, caracterizada por ser un territorio fragmentado, dominado por grandes lagos y corrientes hídricas que lo trazan de este a oeste, transformándose así en un laboratorio natural para el estudio de los efectos que estos cambios produjeron tanto en el paisaje como también en su biota asociada.

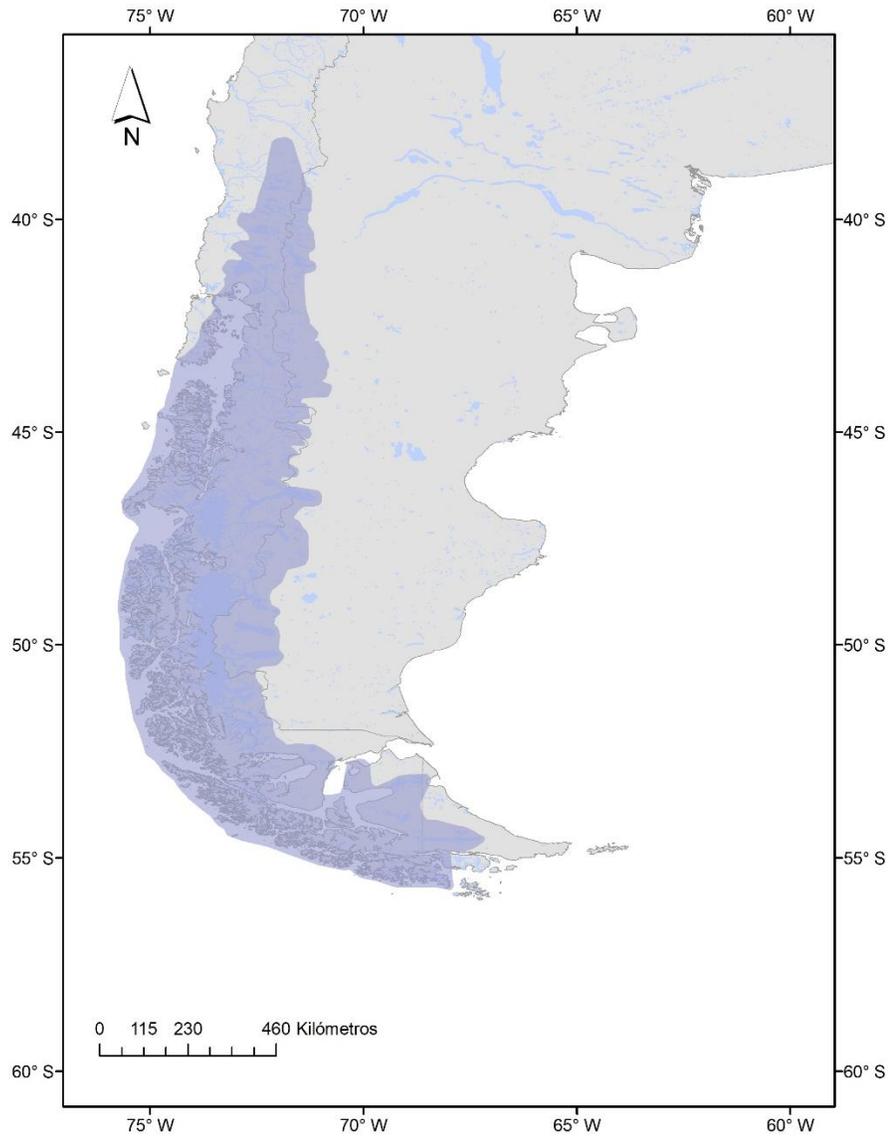


Figura 1. Mapa de la extensión máxima aproximada de la capa de hielo del Último Máximo Glacial (LGM). Basado en Hulton *et al.* (2002) y McCulloch *et al.* (2015).

1.2 GLACIACIONES PLEISTOCÉNICAS Y ESTRUCTURA FILOGEOGRÁFICA

Los eventos de avance y retroceso glacial ocurridos durante el Pleistoceno, además de haber tenido un efecto directo sobre la geografía y clima a nivel global, modificaron de manera significativa los patrones de distribución y estructura genética de las poblaciones (Hewitt, 2000). Algunas especies se vieron forzadas a dispersarse hacia nuevos territorios, mientras que otras quedaron restringidas dentro de áreas acotadas producto del surgimiento de barreras geográficas. Esto no sólo provocó la extinción de muchas especies, sino que también el origen de nuevos y distintos linajes evolutivos producto de su aislamiento geográfico (Highton, 1995). Estos grandes cambios climáticos afectaron de manera distinta a la biodiversidad global debido a las diferencias existentes a escala regional y a los distintos requerimientos y respuestas individuales de cada especie (Hewitt, 2000). Adicionalmente, muchas poblaciones quedaron aisladas geográficamente en hábitats semejantes a islas conocidas como “refugios” (Kim *et al.*, 1998; Berendzen *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2006; Soltis *et al.*, 2006). Estos corresponden a áreas con dimensiones espacio-temporales que conservan condiciones ambientales favorables para la permanencia de la biota, debido a que han estado aisladas de las fluctuaciones climáticas circundantes a gran escala temporal (Keppel *et al.*, 2012). De este modo, algunas especies habrían logrado sobrevivir en ellos, para luego expandir sus rangos de distribución durante los periodos interglaciales. Esto habría ocurrido de manera cíclica, dando origen a continuos procesos de diversificación (Hewitt, 2000).

En el Hemisferio Norte, las consecuencias que tuvieron los eventos glaciales pleistocénicos sobre la biota han sido bien documentados (Avice, 2000; Hewitt 2000; Willis y Whittaker, 2000) y son numerosos los estudios que dan cuenta del importante papel que cumplieron los refugios en la supervivencia y evolución de la biodiversidad (Soltis *et al.*, 1997; Taberlet *et al.*, 1998; Binney *et al.*, 2009). La distribución geográfica de la mayoría de la biota europea se vio influenciada por las constantes oscilaciones climáticas de este periodo, lo que llevó a que numerosas especies con buenas capacidades de dispersión se desplazaran hacia refugios situados al sur de Europa (Taberlet *et al.*, 1998; Hewitt, 2000), en tanto muchos otros taxones con baja capacidad de dispersión permanecieron en áreas de refugio ubicados al norte (Schilthuizen & Lombaerts, 1994; Hausdorf y Hennig, 2003), para luego recolonizar áreas previamente glaciadas durante periodos postglaciales. En el Hemisferio Sur, en cambio,

y específicamente en la Patagonia, no se ha estudiado en profundidad el papel que han tenido las oscilaciones climáticas pleistocénicas (Beheregaray, 2008), aun cuando existe evidencia de los grandes cambios que ha sufrido tanto el relieve como la hidrografía de esta zona y que sin duda pudieron haber influido en los patrones de distribución de las especies (Vuilleumier, 1971).

Los estudios filogeográficos han revelado que los quiebres a nivel filogenético dentro de una especie surgen como resultado de una restricción al intercambio de genes entre poblaciones y los consecuentes cambios genéticos a nivel intrapoblacional producto de su aislamiento geográfico (Hedrick, 2011). Generalmente hay una relación positiva entre el grado de fragmentación de un hábitat y el grado de estructuración genética poblacional (e.g. Xu *et al.*, 2009; Nägele & Hausdorf, 2015), así como una mayor diversidad genética en áreas que han sido más estables históricamente y una menor diversidad genética en áreas inestables como, por ejemplo, en aquellas que fueron previamente glaciadas y que pasaron por un proceso de recolonización (Hewitt, 1996). En ausencia de flujo génico, las poblaciones conespecíficas tienden a divergir, como resultado de la acción de distintas fuerzas evolutivas que actúan sobre ellas (e.g. deriva génica, selección natural y mutaciones) (Freeland, 2005). Considerando esto, es posible inferir que las áreas de refugio glacial albergan una mayor diversidad genética intraespecífica, ya que han sido más estables en el tiempo y por ende, las poblaciones que allí sobreviven son capaces de acumular variación genética a lo largo de sus generaciones, en comparación con las regiones circundantes, menos estables y que han sido recolonizadas, cuyas poblaciones exhiben una menor diversidad genética (Hewitt, 1996).

1.3 PATRONES FILOGEOGRÁFICOS DE LA BIOTA PATAGÓNICA

Las especies patagónicas han tenido respuestas diferentes frente a la magnitud de los eventos de avances y retrocesos glaciales, lo cual podría estar relacionado a sus mecanismos de dispersión y a rasgos de historia de vida (Pilger *et al.*, 2017). En efecto, mientras algunas especies quedaron restringidas a ciertos refugios terrestres interglaciares, otras se vieron excluidas de sus hábitats naturales y tuvieron que migrar hacia regiones no glaciadas (Xu *et al.*, 2009; Sérsic *et al.* 2011; Vera-Escalona *et al.* 2012). Por ejemplo, plantas terrestres tales como *Hypochoeris palustris* y *Fitzroya cupressoides* lograron persistir en refugios situados

fuera de los márgenes del UMG en la Patagonia Occidental, específicamente al norte, en la costa de Chile (Allnutt *et al.*, 1999; Premoli *et al.*, 2000, Muellner *et al.*, 2005), mientras que *Austrocedrus chilensis* lo hizo en refugios que se localizaron en la Patagonia Oriental, entre la plataforma glacial y la estepa patagónica (Pastorino *et al.*, 2002). Por otra parte, algunos roedores, como *Phyllotis xanthopygus* y *Oligoryzomys longicaudata* (Kim *et al.*, 1998; Palma *et al.*, 2005), probablemente tuvieron que migrar y posteriormente recolonizar áreas de la Patagonia desde el este no glacial, y otros, como *Abrothrix olivaceus*, lograron refugiarse en la costa de Chile (Smith *et al.*, 2001).

Se conoce mucho menos sobre el efecto que tuvo la dinámica glacial pleistocénica sobre la biota de los ambientes acuáticos de la Patagonia. Esta red de drenajes fue fuertemente influenciada por tales eventos glaciales, por lo que es esperable que la dinámica del paisaje se vea reflejada en los patrones filogeográficos de las especies acuáticas asociadas (Xu *et al.*, 2009). Los estudios disponibles, mayoritariamente realizados en peces, muestran que al igual que organismos terrestres, estos utilizaron zonas de refugio fuera de los límites de la plataforma glacial durante las glaciaciones más grandes, especialmente en la Cordillera de la Costa de Chile o en la Patagonia Oriental, lo cual se ha propuesto, por ejemplo, para *Galaxias globiceps*, *Galaxias platei*, *Galaxias maculatus*, *Percyctis melanops* y *Percyctis trucha* (Dyer 2000; Ruzzante *et al.*, 2006, 2008; Zemlak *et al.*, 2008, 2010). Sin embargo, a diferencia de lo que ha sido detectado en organismos terrestres, hay especies acuáticas como *Aegla alacalufi*, que también presentan una alta diversidad genética en refugios que se habrían ubicado al Sur de la Patagonia, dentro de los márgenes glaciales, probablemente en discontinuidades de la plataforma de hielo o en zonas costeras del continente que quedaron expuestas por la disminución del nivel del mar (Xu *et al.*, 2009), lo cual podría estar asociado a su baja vagilidad.

1.4 MODELO DE ESTUDIO

El género *Chilina* Gray, 1828 (familia Chiliniidae Dall, 1870) agrupa caracoles de agua dulce endémicos de Sudamérica (Figura 2; Pilsbry, 1911) y posee representantes en Brasil, Uruguay, Argentina y Chile (Pilsbry, 1911; Stuardo, 1961; Valdovinos, 1999, 2006; Rumi *et al.*, 2008). Es un género de gasterópodos pulmonados primitivo (Duncan, 1960; Harry, 1964;

Brace, 1983; Dayrat *et al.*, 2001; Klusmann-Kolb *et al.*, 2008; Gutiérrez-Gregoric, 2010; Jörger *et al.*, 2010) y corresponde a uno de los grupos más antiguos de la región Neotropical (Gaillard & de Castellanos, 1976).

Específicamente en Chile, la descripción y registro de las especies que componen el género se efectuó entre finales del siglo XVIII y principios del siglo XX (e.g. *C. dombeyana* Bruguière, 1789; *C. bulloides* d'Orbigny, 1835; *C. llanquihuensis* Marshall, 1933). Posteriormente esta información fue agrupada en distintas revisiones bibliográficas, por lo que hoy en día se reconocen 30 especies (Stuardo, 1961; Sielfield, 2001; Valdovinos 1999, 2006), las que se distribuyen entre los 25° y 50°S y corresponden en su totalidad a especies endémicas del territorio chileno (Fuentesalba *et al.*, 2010). No obstante lo anterior, el estado del conocimiento de estas especies sigue siendo escaso. Valdovinos (2006) destaca los vacíos de distribución de muchas de ellas, ya que se les ha descrito asociadas a zonas acotadas que comprenden una o unas pocas cuencas hidrográficas y no se tiene registro de todas ellas ni se han realizado los muestreos suficientes para determinar la veracidad de dichos datos (Valdovinos, 1999). A su vez, este autor sugiere que las especies deben ser validadas mediante el uso de caracteres moleculares y morfológicos taxonómicamente más conservativos (e.g. rádula, complejo peniano), puesto que la descripción de la mayoría de las especies del género se realizó en base a las características morfológicas que presentaba la concha de los ejemplares tipo. Esto genera diversas complicaciones a la hora de identificarlas y evaluar posibles relaciones filogenéticas (e.g. Plam *et al.*, 2008), debido a la variación en la morfología de la concha.

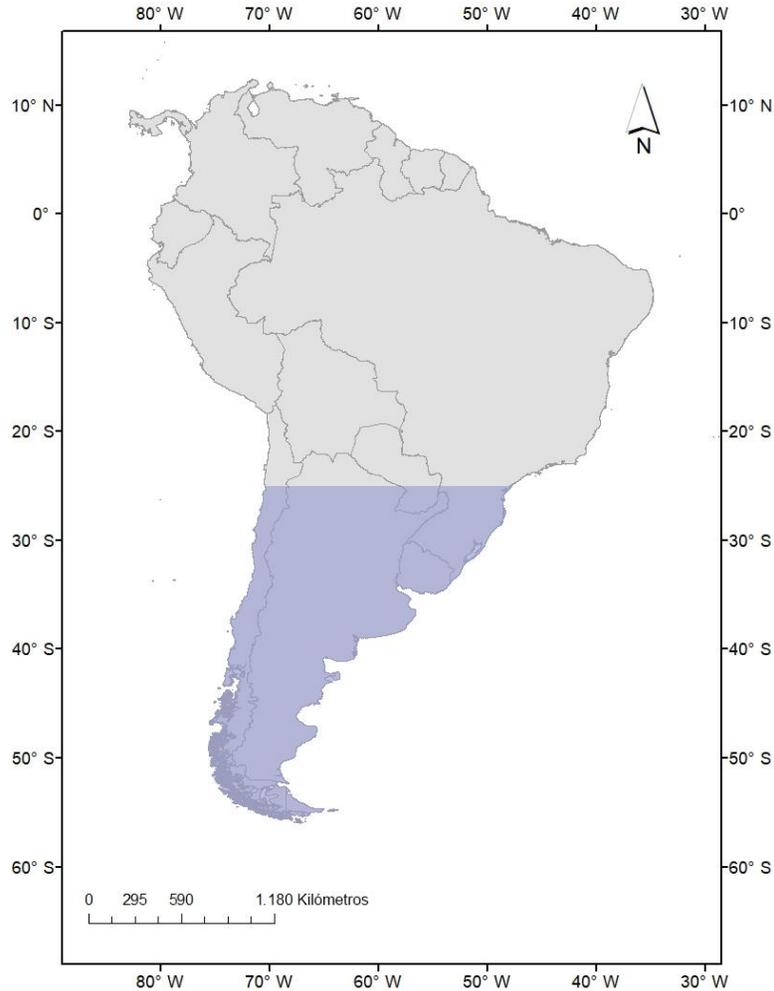


Figura 2. Distribución del género *Chilina* en Sudamérica. Basado en Pilsbry (1911).

Las poblaciones del género *Chilina* habitan principalmente aguas frías, limpias y bien oxigenadas (Valdovinos *et al.*, 2005; Valdovinos, 2006), ocupando ambientes límnicos y lénticos (Brace, 1983), donde pueden alcanzar altas densidades (Bisol *et al.*, 1994; observación personal). A pesar de esto último, aún existen vacíos en cuanto a la información sobre su biología básica. Actualmente, la mayoría de los estudios que abordan especies del género están relacionados al papel que cumplen como hospedador de parásitos tremátodos y su importancia para la salud humana (*e.g.* Olmos & George-Nacimiento, 1997). Además, hasta ahora no existen estudios acerca de su comportamiento reproductivo, pero sí se han reportado algunos antecedentes sobre su modo de reproducción, ciclo de vida y desarrollo embrionario que muestran que son especies hermafroditas simultáneas, de escaso

desplazamiento y fácil captura (Bisol *et al.*, 1994). Cada individuo sexualmente maduro pone huevos encapsulados rodeados por una masa gelatinosa y transparente bajo piedras de ríos, lagos y estuarios (Bórquez *et al.*, 2015), evitando así que sean arrastrados por la corriente (Sverdrup, 1942). Pueden realizar desde 4 a 8 puestas por cada temporada reproductiva entre los meses de diciembre y mayo, aunque también estas pueden encontrarse esporádicamente durante todo el año (observación personal). Carecen de estados larvales de vida libre (Figura 3), ya que tanto la larva trocófora como la larva véliger se desarrollan dentro de la cápsula del huevo, lo cual hace que al momento de eclosionar emerjan de él individuos juveniles similares a adultos en miniatura, por lo que presentarían desarrollo directo (Bórquez *et al.*, 2015).

Del total de especies que componen el género, nueve se han descrito en el área considerada para este estudio, que abarca entre los 39° y 42°S: *C. bulloides* d'Orbigny, 1835, *C. ampullacea* Sowerby, 1838, *C. major* Sowerby, 1838, *C. robustior* Sowerby, 1838, *C. elegans* von Frauenfeld, 1865, *C. acuminata* Soweby, 1874, *C. subcylindrica* Sowerby, 1874, *C. iheringi* Marshall, 1933 y *C. llanquihuensis* Marshall, 1933. Este territorio se encuentra surcado por numerosos ríos y lagos que hoy forman parte de distintas cuencas hidrográficas (río Toltén, río Valdivia, río Bueno, Río Maullín, río Puelo, entre otras cuencas costeras de menor envergadura), las que se vieron alteradas a distinta escala por eventos glaciales pleistocénicos. Esto convierte al área de estudio dentro de la Patagonia Occidental en un laboratorio natural, dada la heterogeneidad de sus paisajes, la historia geológica y paleoclimática, que han determinado su configuración actual y los distintos escenarios en que ha logrado diversificarse el género *Chilina*. En estudios anteriores esta área fue también abordada para evaluar el rol que han tenido las últimas glaciaciones en la filogeografía de *Aegla alacalufi*. Para ello, se compararon ambientes que estuvieron dentro de los límites del Último Máximo Glacial (zonas glaciadas) y ambientes que han sido estables históricamente por haber quedado fuera de dichos límites (zonas no glaciadas) (Xu *et al.*, 2009; Pérez-Losada *et al.*, 2011).

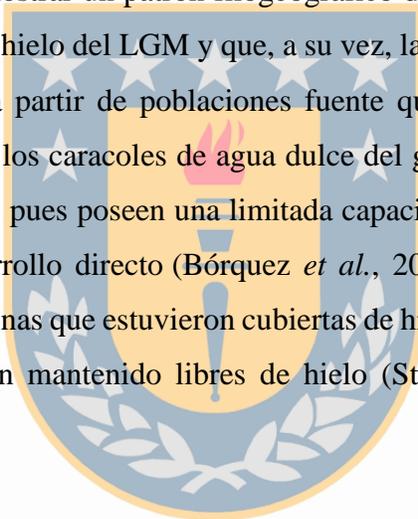
1.5 PROBLEMA A ABORDAR

Los sistemas fluviales de la Patagonia Occidental sufrieron severos cambios durante el Mioceno y Pleistoceno debido a los sucesivos eventos tectónicos que dieron origen al levantamiento de los Andes y a los eventos glaciales que acontecieron posteriormente (Lundberg *et al.*, 1998; Clapperton 1993). Numerosos ríos y lagos se originaron por el derretimiento del hielo glacial y el consecuente aumento del nivel de caudal proveniente de las cumbres andinas, el que poco a poco fue erosionando el relieve y dando forma a la red hídrica que conforma el actual sistema de cuencas hidrográficas en que se divide el territorio, transformándose así en una región con una gran diversidad de ambientes acuáticos (Strahler & Strahler 1994; Lundberg *et al.*, 1998; Rohling *et al.*, 1998; BurrIDGE *et al.*, 2006; Pastor, 2013).

Durante el LGM la plataforma de hielo cubrió gran parte de la superficie continental al Oeste de la Cordillera de los Andes desde los 45° S hacia el extremo sur de Tierra del Fuego (Caldenius, 1932; Vuilleumier, 1971; Hollin y Schilling, 1981; Hulton *et al.*, 1994), mientras que al norte de los 45° S la capa de hielo sólo cubrió la Cordillera de los Andes y zonas aledañas, dejando extensas áreas de la costa de Chile libres de hielo (Rabassa & Clapperton 1990; Clapperton 1993). Esta heterogeneidad podría verse reflejada en los patrones filogeográficos de la biota acuática asociada, dada la historia hidrológica que dio forma a ambas regiones (Xu *et al.*, 2009). De hecho, distintos estudios realizados sobre la fauna acuática de la Patagonia Occidental, principalmente en peces, indican que varias especies presentan una alta diversidad genética en regiones ubicadas al norte de los 45° S, cercanos a la sección costera, puesto que allí se habrían producido más procesos vicariantes que dieron origen a nueva diversidad a lo largo del tiempo, y como consecuencia, a poblaciones más variables y estructuradas, a partir de las cuales se habrían generado procesos de recolonización hacia territorios más australes que estuvieron cubiertos de hielo durante la última glaciación (Dyer, 2000; Ruzzante *et al.*, 2006, 2008; Zemplak *et al.*, 2008, 2010). Esto coincide con la estabilidad que ha tenido esta región a lo largo del tiempo, por lo que además es considerada como un refugio potencial para la persistencia de muchos taxones (Heusser *et al.* al. 2000; Zemplak *et al.*, 2008). Estas mismas especies, por el contrario, presentan una baja diversidad genética en zonas que se sitúan dentro de los márgenes del LGM, lo cual podría deberse a que corresponde a una región que ha sido menos estable históricamente, y

por ende, se habrían generado menos oportunidades para desarrollar procesos de diversificación (Hewitt, 1996). No obstante, este patrón se ha reportado principalmente en peces, que corresponden a organismos vágiles, lo que podría diferir en especies con capacidad de dispersión limitada. Un ejemplo de esto es la especie *Aegla alacalufi* (Xu *et al.*, 2009), que de igual modo presenta poblaciones estructuradas en zonas no glaciadas y poco estructuradas en zonas glaciadas, pero, sin embargo, dentro de los márgenes glaciales se encontró un área que pudo haber actuado como refugio, dada la alta diversidad genética que presenta, lo que puede estar ligado a la poca capacidad de dispersión que posee la especie y a la fragmentación del hábitat.

Teniendo en cuenta lo anterior, se puede hipotetizar que las especies acuáticas de vagilidad limitada podrían mostrar un patrón filogeográfico diferente entre zonas que están dentro y fuera del margen de hielo del LGM y que, a su vez, la colonización de estas últimas áreas pudo haber ocurrido a partir de poblaciones fuente que se refugiaron en zonas no glaciadas. Para evaluar esto, los caracoles de agua dulce del género *Chilina* constituyen un excelente modelo de estudio, pues poseen una limitada capacidad de desplazamiento (Bisol *et al.*, 1994) y poseen desarrollo directo (Bórquez *et al.*, 2015). Además, este género se distribuye ampliamente en zonas que estuvieron cubiertas de hielo durante el LGM, así como también en áreas que se han mantenido libres de hielo (Stuardo, 1961; Sielfield, 2001; Valdovinos 1999; 2006).



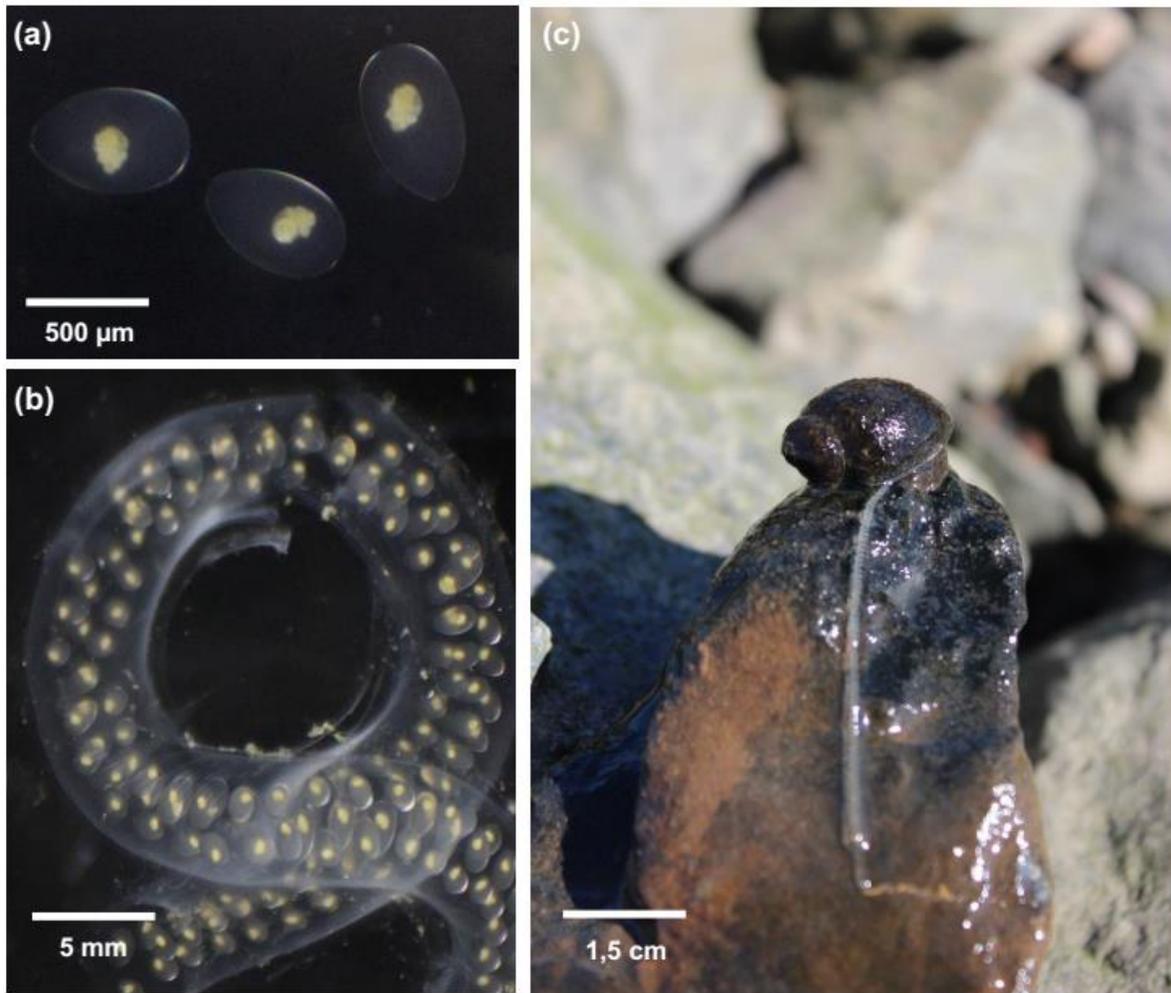


Figura 3. (a) Embriones encapsulados. (b) Masa gelatinosa rodeando embriones encapsulados. (c) Ejemplar adulto de *C. dombeyana* realizando postura de una masa gelatinosa sobre la superficie de una roca.

1.6 HIPÓTESIS

1. Las glaciaciones del Pleistoceno habrían afectado los patrones filogeográficos de *Chilina* en la Patagonia Occidental, lo que se reflejaría en una estructura genética menos marcada en poblaciones distribuidas en áreas previamente glaciadas en comparación a aquellas de zonas no glaciadas.
2. Existe una baja diversidad genética entre las poblaciones distribuidas en el lago Llanquihue (Región de Los Lagos, Chile), debido al origen glacial del sistema.
3. Áreas fuera de la influencia glacial durante el Último Máximo Glacial sirvieron como refugios glaciales para *Chilina*.



1.7 OBJETIVO GENERAL:

Investigar el papel de las glaciaciones del Pleistoceno sobre la estructura filogeográfica del género *Chilina* en la Patagonia Occidental.

1.8 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Inferir las relaciones filogenéticas de las poblaciones del género *Chilina* de la Patagonia Occidental.
2. Estimar el grado de estructuración genética poblacional a través de zonas glaciadas y no glaciadas de la Patagonia Occidental.
3. Comparar la diversidad genética entre poblaciones que habitan zonas que fueron glaciadas y no glaciadas durante el UMG con marcadores mitocondriales y nucleares.



2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 RECOLECCIÓN DE MUESTRAS

Para el desarrollo de esta investigación se utilizaron muestras recolectadas en febrero de 2018 y material depositado en la colección del Laboratorio de Malacología y Sistemática Molecular de la Universidad del Biobío, Chillán. Se escogió como muestra representativa un total de 100 individuos adultos provenientes de 10 cuerpos de agua ($n = 10$ muestras por sitio) repartidos en áreas glaciadas y no glaciadas de la Patagonia Occidental (Figura 4; Tabla 1). Todos los individuos recolectados fueron capturados manualmente de manera aleatoria y posteriormente preservados en etanol absoluto.

Tabla 1. Ubicación geográfica de las localidades en que se muestrearon poblaciones de *Chilina* en la Patagonia Occidental. Se indica también el área a la que pertenecen las muestras: glaciada (G) y no glaciada (NG).

Cuerpo de agua	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)	Región
Río Toltén	Toltén	39°11'15,4"	73°10'42,7"	NG
Estero Camposanto	Curiñanco	39°45'12,2"	73°23'20,8"	NG
Río Chaihuín	Chaihuín	39°58'10,1"	73°34'13,4"	NG
Río Rahue	Osorno	40°34'44,2"	73°08'47,8"	NG
Laguna Huelde	Chiloé	42°35'31,4"	74° 07'05,4"	NG
Lago Llanquihue	Puerto Chico	41°19'28,0"	72°58'20,8"	G
Lago Llanquihue	Llanquihue	41°15'15,0"	73°00'06,5"	G
Río Puelo	Cochamó	41°38'31,1"	72°10'49,3"	G
Río Milagro	Caleta La Arena	41°57'12,6"	72°40'57,3"	G
Río Negro	Hornopirén	41°57'44,3"	72°27'48,5"	G

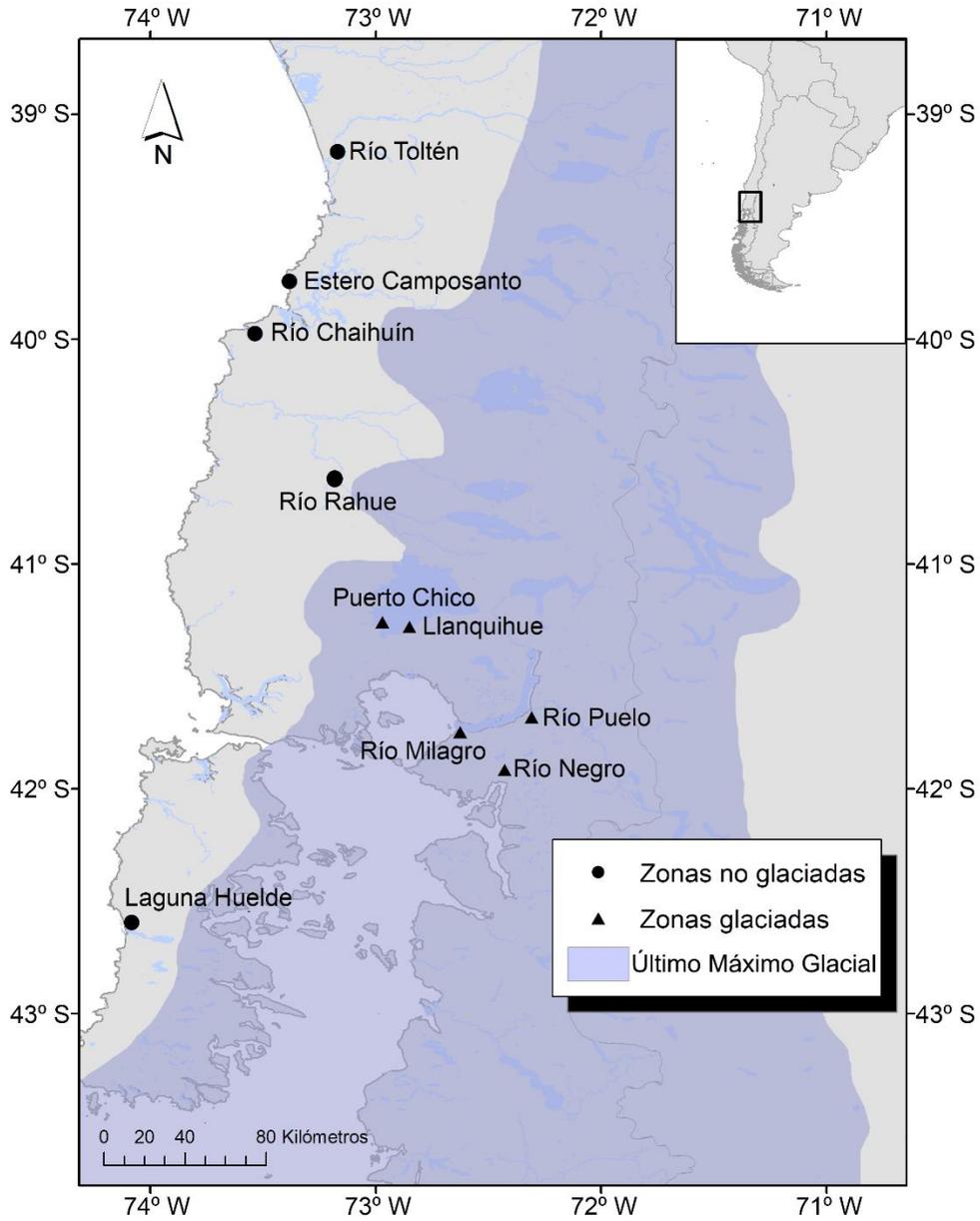


Figura 4. Mapa de los sitios de muestreo de *Chilina* en zonas que estuvieron dentro y fuera de los márgenes del Último Máximo Glacial (triángulos y círculos, respectivamente). El área de color lila representa la extensión glacial del UMG, basado en Hulton *et al.* (2002).

2.2 EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN

Se extrajo ADN genómico a partir de una pequeña muestra de tejido muscular del pie de cada caracol utilizando el método CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) y siguiendo el protocolo de Winnepennickx *et al.* (1993), con ligeras modificaciones. La extracción se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Se amplificaron secuencias parciales de ADN mitocondrial de la subunidad I del gen citocromo c oxidasa I (COI) mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando para ello los partidores LCOI -1490 / HCOI-2198 (Folmer *et al.*, 1994) o partidores de nuevo diseño: COI22 (5'-TGT RTG GTG TGG GTT RGT TG-3') / COI636 (5'-ATT GGA TCT CCC CCT CCA GC-3'), COI57 (5'-TYC TAA TTC GGT TTG AGT TRG-3') / COI624 (5'-CCT CCA GCA GGA TCA AAR AAC-3') y COI69 (5'-TTG AGT TRG GAA CAT CYT TAG T-3') / COI617 (5'-CAG GAT CAA ARA ACC TGG TAT T-3'). El perfil de amplificación constó de una temperatura de desnaturalización inicial de 94 °C durante 3 min, seguida de 40 ciclos de 94 °C durante 30 s, 59 °C durante 30 s, 72 °C durante 40 s y una extensión final a 72 °C durante 7 minutos. Los productos de la amplificación se verificaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% y fueron secuenciados en ambos sentidos por la empresa Macrogen Company, Corea del Sur.

2.3 ALINEAMIENTO Y ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LAS SECUENCIAS DE ADN

Las secuencias resultantes fueron editadas con el programa Bioedit v7.2.5 (Hall, 1999) para obtener las secuencias de consenso de cada individuo (87 en total). Luego estas fueron alineadas con la herramienta accesoria ClustalW (Larkin *et al.*, 2007) con inspección visual posterior, utilizando como referencia dos secuencias de *Chilina* sp. de Chile disponibles en la base de datos GenBank (Tabla 2). Posteriormente, se construyeron árboles filogenéticos para examinar las posibles relaciones filogenéticas intraespecíficas existentes entre ellas, incorporando además 13 secuencias parciales del gen mitocondrial COI de individuos pertenecientes a otras dos localidades de zonas no glaciadas situadas al norte de los 39° de latitud sur, las cuales no han sido analizadas en estudios previos: 5 de río Cruces y 8 de Isla Mocha. Como grupo externo se usaron secuencias COI de especies de *Chilina* distribuidas en Argentina, disponibles en GenBank (Tabla 2). En total se agruparon 117 secuencias con una longitud de alineamiento de 530 sitios nucleotídicos.

Tabla 2. Secuencias de individuos del género *Chilina* extraídas de GenBank e incorporadas en los análisis filogenéticos. Se detalla su procedencia, número de acceso y autores.

Especie	Localidad	Número de acceso	Referencia
<i>Chilina</i> sp.	Chile	EF489382	Klussmann-Kolb <i>et al.</i> (2008)
<i>Chilina</i> sp.	Chile	HQ660030	Dayrat <i>et al.</i> (2011)
<i>C. rushii</i>	Río Uruguay, Argentina	KT820423	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. fluminea</i>	Río de La Plata, Argentina	KT820422	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. gallardoi</i>	Río Uruguay, Argentina	KT820421	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. luciae</i>	Río Uruguay, Argentina	KT820420	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. nicolasi</i>	Río Uruguay, Argentina	KT820419	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. santiagoi</i>	Río Uruguay, Argentina	KT820418	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. megastoma</i>	Río Iguazú, Argentina	KT807839	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. iguazuensis</i>	Río Iguazú, Argentina	KT807838	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. iguazuensis</i>	Río Iguazú, Argentina	KT807837	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. iguazuensis</i>	Río Iguazú, Argentina	KT807836	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. iguazuensis</i>	Río Iguazú, Argentina	KT807835	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. fluminea</i>	Río de La Plata, Argentina	KT807834	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. fluminea</i>	Río de La Plata, Argentina	KT807833	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. fluminea</i>	Río de La Plata, Argentina	KT807832	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)
<i>C. fluminea</i>	Río de La Plata, Argentina	KT807831	Gutiérrez-Gregoric & de Lucia (2016)

Las relaciones filogenéticas de los especímenes de *Chilina* se estimaron con los métodos de Máxima Verosimilitud (ML) e Inferencia Bayesiana (BI). El modelo de evolución molecular utilizado, TPMuf+G, se escogió con los criterios de información de Akaike y Bayesiano, respectivamente, implementados en jModelTest (Posada, 2008). Ambos arrojaron como resultado el mismo modelo de evolución. El análisis ML se llevó a cabo en el software PAUP* v4.0 (Swofford, 2003), cuyo árbol inicial se obtuvo bajo una búsqueda heurística con adición paso a paso, utilizando 1000 repeticiones de adición de secuencia aleatoria y un intercambio de ramas con bisección-reconexión de árboles (TBR). El soporte estadístico de los nodos se evaluó a partir de un análisis bootstrap de 1000 réplicas usando el algoritmo de

búsqueda de adición rápida paso a paso. Por su parte, el análisis de Inferencia Bayesiana se realizó con el programa MrBayes v3.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Para ello, se ejecutaron 2 corridas independientes y simultáneas de cuatro cadenas de Markov Monte Carlo de 10.000.000 iteraciones, cuyos árboles generados fueron muestreados cada 1000 pasos y se calcularon las probabilidades posteriores de cada clado (pp) a partir de los árboles obtenidos tras un periodo de quemado (Burn-in: 25%).

2.4 ESTRUCTURACIÓN GENÉTICA E ÍNDICES DE DIVERSIDAD

Los índices de diversidad molecular estándar (diversidad haplotípica H_d , nucleotídica π , número de haplotipos, frecuencia haplotípica, relación transición/transversión y número de sitios polimórficos) se calcularon con el programa Arlequin v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Estas estimaciones se obtuvieron a partir de cada localidad por separado, así como por grupos (zona no glaciada, zona glaciada y todas las localidades en conjunto). Los valores F_{ST} por pares, así como las distancias genéticas corregidas (corrección gamma) también se calcularon con Arlequin. El modelo evolutivo de sustitución nucleotídica usado para realizar estos análisis se determinó previamente en el programa jModelTest, el cual determinó que el modelo ideal es TPM1uf + G. Sin embargo, dado que en Arlequin no se incluye dicho modelo, se utilizó el modelo de Tamura & Nei. Para examinar la división jerárquica de la variación genética atribuible a la distribución geográfica de los haplotipos, entre zonas y localidades, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) en Arlequin v3.5 y se utilizó el modelo evolutivo Tamura & Nei, al igual que para los análisis previos ejecutados en el mismo programa.

Se construyó una red de haplotipos para estimar las relaciones genealógicas entre las secuencias mediante el método de Median Joining, incorporado en el programa NETWORK v4.6 (Bandelt *et al.*, 1999). Para ello se utilizó un ϵ de 0 y un peso de transiciones-transversiones de 1:3. Asimismo, para reducir la complejidad de la red, se aplicaron las opciones de Contracción en estrella y MP (Polzin & Daneschmand, 2003).

2.5 DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

La historia demográfica de las poblaciones se infirió a partir de las estimaciones de las pruebas de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) y Fs de Fu (Fu, 1997) en el programa Arlequin v3.5, con 10.000 simulaciones. Estas pruebas son métodos estadísticos que tienen por función evaluar si se cumple la hipótesis de evolución de tipo neutral, que puede ser rechazada no solo como consecuencia de selección natural, sino también como producto de eventos demográficos (Ramírez-Soriano *et al.*, 2008).

Luego de realizar las pruebas de neutralidad, se llevó a cabo un análisis de distribución de desajuste (Mismatch Distribution) en Arlequin v3.5 para cuatro conjuntos de datos distintos, con el fin de determinar posibles expansiones demográficas: i) todas las localidades por separado, ii) localidades de la zona no glaciada, iii) localidades de la zona glaciada y iv) todas las localidades en conjunto. Se asume que aquellos que exhiben una curva unimodal experimentaron una expansión poblacional, mientras que las que presentan una curva multimodal han permanecido en equilibrio demográfico (Rogers & Harpending, 1992). Para llevar a cabo estos análisis, se asumió una tasa de mutación por sitio del gen mitocondrial COI de 1,76%, que ha sido calculada para el clado Protostomia, que agrupa a distintos phyla de macroinvertebrados (Wilke *et al.*, 2009). Junto con esto, se evaluó la validez del modelo de expansión a partir de la prueba de bondad de ajuste entre la distribución de desajuste observada y la esperada, usando 1000 réplicas de bootstrap en Arlequin. La distribución de desajuste se basa en la fórmula $\tau = 2\mu t$, donde τ es la fecha de expansión/disminución, medida en tiempos mutacionales, μ es la tasa de mutación por secuencia, por generación y t es el tiempo en años.

Por último, para ahondar aún más en la historia demográfica de las poblaciones, se realizó un análisis de Diagrama de Horizonte Bayesiano (Bayesian Skyline Plot, BSP), implementado en el programa BEAST v1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2007), utilizando el modelo GTR, ya que es el modelo que más se asemeja a TPM1uf+G, escogido por jModelTest y que no se encuentra disponible en BEAST. Se utilizó para ello una tasa de reloj molecular de 1,76% asumiendo un modelo normal. Se realizaron cuatro corridas independientes con una longitud de cadenas MCMC de 10.000.000 y un muestreo cada 1000 generaciones, y aplicando un burn-in de 20%. Finalmente, los resultados del análisis fueron visualizados en el programa Tracer v1.5 (Jakobsson & Rosenberg, 2007).

2.6 SELECCIÓN DE PARTIDORES Y REACCIONES DE AFLP

Se seleccionaron las combinaciones de partidores AFLP que mostraron altos niveles de polimorfismo y un perfil de bandas fácilmente interpretable. Para ello, en una primera etapa se probaron 6 combinaciones en 8 individuos al azar. Las combinaciones cuyos perfiles de bandas cumplieron con los criterios de selección fueron finalmente usadas en las reacciones finales de AFLP (Tabla 3), en que se analizaron 8 de los 10 individuos de cada localidad (a excepción de río Negro, en que se analizaron 7), totalizando 79 (Tabla 1; Fig. 4).

Tabla 3. Partidores utilizados para las reacciones de AFLP.

Partidor	Secuencia
Preselectivo - EA	GACTGCGTACCAATTCA
Preselectivo - MC	GATGAGTCCTGAGTAAC
E-ACC	GACTGCGTACCAATTCACC
E-ACT	GACTGCGTACCAATTCACT
E-ACG	GACTGCGTACCAATTCACG
M-CT	GATGAGTCCTGAGTAACT
M-CC	GATGAGTCCTGAGTAACC
M-CA	GATGAGTCCTGAGTAACA

Los AFLP se obtuvieron siguiendo el protocolo de Vos *et al.* (1995) con algunas modificaciones: 5,5 uL de ADN diluido (1:10) fueron digeridos con 0,1 uL y 0,25 uL de cada enzima de restricción, MseI y EcoRI, respectivamente. Posteriormente se ligaron partidores E y M (1 uL) a los fragmentos de restricción, a 37°C durante 2 horas en un tampón de restricción/ligación (0,37 uL de H₂O, 1,1 uL de T4 buffer, 1,1 uL de NaCl, 0,55 de BSA y 0,025 uL de T4 ligasa). El volumen final de la mezcla fue de 11 uL. Luego, se realizó el PCR preselectivo, utilizando 3 uL de los productos restricción y ligación diluidos en agua ultrapura

(17,35 uL), usando partidores M y E (0,5 uL) sin nucleótidos selectivos en un tampón de amplificación (2,5 uL de Taq Buffer; 0,75 uL de MgCl₂; 0,3 uL de dNTPs y 0,1 uL de Taq polimerasa). Para esto, se realizó un perfil de termociclado de 2 minutos a 94°C, seguido de 25 ciclos de 20 segundos a 94°C, 60 segundos a 60°C, y 2 minutos a 72°C y 30 minutos a 60°C. Por último, en la amplificación selectiva se utilizaron 2,5 uL de productos de la preamplificación diluidos (1:10), usando 0,25 uL de partidor E+3 marcado con un tinte fluorescente (6-FAM, NED o VIC) y 0,625 uL de partidor M+3. Esta amplificación se realizó en una mezcla de reacción que consiste en 7,175 uL H₂O, 1,25 uL de Taq Buffer; 0,375 uL de MgCl₂; 0,125 uL de dNTPs; 0,1 uL de Taq Platinum y 0,1 uL BSA. En este caso, se realizó un perfil de termociclado de 30 ciclos (2 minutos a 94°C, 20 segundos a 66°C, 60 segundos a 66°C, 2 minutos a 72°C y 30 minutos a 60°C). Finalmente, los productos de PCR se separaron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% para su verificación.

2.7 ANÁLISIS DE DATOS AFLP

Los electroferogramas se analizaron en el programa GeneMarker v1.70 (Softgenetics). Se utilizó la configuración predeterminada para detectar bandas de AFLP y calcular su tamaño. Se consideraron sólo aquellas bandas de 50 o más unidades de fluorescencia relativa y un tamaño de 80 a 550 pb. Los resultados se tradujeron en una matriz binaria de presencia/ausencia de bandas por individuo y localidad, en la cual se agruparon los datos de todas las combinaciones de partidores, de tal modo de obtener un fenotipo multilocus para cada individuo. Posteriormente, se estimaron las frecuencias alélicas mediante el método de Lynch & Milligan (1994), implementado en el paquete de datos para Excel “Genalex v6.5” (Peakall & Smouse, 2012). A partir de estas estimaciones, se calculó la diversidad genética de cada localidad a través de tres criterios distintos: número de loci polimórficos, número de bandas privadas y heterocigosidad esperada de Nei. Asimismo, se utilizaron también las frecuencias alélicas para estimar la diferenciación genética entre localidades a partir de las distancias genéticas de Nei.

Para determinar si existe o no estructura poblacional, se utilizó un modelo bayesiano implementado en el paquete de datos GENELAND v4.0.7 (Guilliot *et al.*, 2005) para el entorno R (R v3.4.4; Ihaka & Gentleman, 1996), el cual estima el número probable de poblaciones involucradas en el conjunto de datos, incorporando para ello información genética y geográfica a través de un muestreo de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC). Para llevar a cabo el análisis, se realizaron 10 corridas con 5.000.000 iteraciones de MCMC, que se muestrearon cada 1000 pasos, un periodo burn-in de 4900 y un número de grupos de 1 a 10 (definidos en función del número de localidades consideradas en este estudio), bajo un modelo de frecuencias no correlacionado. Además, se utilizó el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000), bajo un modelo que supone una mezcla y frecuencias alélicas correlacionadas. Se realizaron 10 réplicas con una longitud de la Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC) de 1.000.000 y un periodo burn-in de 100.000 para valores de K de 1 a 10. El número óptimo de clusters se determinó usando el método ΔK de Evanno (Evanno *et al.*, 2005) implementado en Structure Harvester (Earl & Vonholdt, 2012).



3. RESULTADOS

3.1 DIVERSIDAD DEL ADN MITOCONDRIAL

Se obtuvo un alineamiento de 530 sitios nucleotídicos de longitud del gen mitocondrial COI, con 59 sitios polimórficos, de los cuales 48 corresponden a sustituciones de transición, 10 fueron de transversión y uno incluyó ambos tipos de sustitución (relación transición: transversión, aproximadamente 4: 1). Se detectaron 25 haplotipos entre los 81 individuos que conformaron el clado 2 (ver sección 3.2). Del total de haplotipos, aproximadamente el 52% (13 de 25) están representados por un solo individuo, mientras que el 20% (5 de 25) lo está en 5 individuos o más y son considerados haplotipos frecuentes. De estos, sólo dos haplotipos se detectaron en más de una localidad de muestreo: haplotipo (hp) 15 y hp 21, presentes en 25 y 8 individuos, respectivamente, encontrándose sólo el hp 15 en localidades situadas en la zona glaciada y no glaciada de la Patagonia Occidental. Los haplotipos frecuentes presentes en una sola ubicación de muestreo corresponden a hp 1, hp 7 y hp 10, presentes en el río Toltén, en el estero Camposanto y en el río Chaihuín, respectivamente (Tabla 4).

3.2 ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

Los análisis filogenéticos basados en máxima verosimilitud (MV) e inferencia bayesiana (IB) arrojaron topologías similares en las que se distinguieron tres clados principales, pero se diferenciaron en la posición del clado conformado por algunos individuos de Río Rahue, río Chaihuín y río Cruces (Clado 1) y el clado formado por secuencias de especies argentinas de *Chilina* (Clado 3) (Figura 5). En la topología entregada por MV, este último clado divergió primero con respecto al clado 1 y 2, mientras que en el análisis IB el clado 3 se situó como grupo hermano del clado 2. En ambos casos, el clado 1 presentó un elevado soporte estadístico (probabilidad posterior (pp) = 1; bootstrap = 100) y se excluyó de los análisis poblacionales posteriores. El clado 2 se divide a su vez en dos clados (pp = 0,996; bootstrap = 85), el primero conformado principalmente por las poblaciones situadas en la zona no glaciada y algunos individuos de la zona glaciada (río Negro; n = 4, Llanquihue; n =1) y el segundo compuesto principalmente por las poblaciones situadas en la zona glaciada y algunos individuos de la zona no glaciada (río Rahue; n = 5). En el primer clado, la mayoría

de las localidades de la zona no glaciada formaron grupos monofiléticos internos con alto soporte estadístico ($pp > 0,85$; $bootstrap > 85$). Laguna Huelde forma un grupo monofilético ($pp = 0,995$; $bootstrap = 97$), mientras que los individuos de río Negro se agruparon con los de las localidades de río Toltén y río Cruces, formando una politomía con alto soporte estadístico ($pp = 0,983$; $bootstrap = 63$). El clado que agrupa al estero Camposanto y río Chaihuín también forma una politomía y su posición no es del todo clara, aun cuando ambas localidades se anidan dentro del clado no glacial. A pesar de esto, ambos análisis indicaron que Isla Mocha se anida dentro del clado del estero Camposanto ($pp = 0,999$; $bootstrap = 81$). El segundo clado agrupa a los individuos provenientes de localidades con influencia glacial. A diferencia de las localidades no glaciadas, las localidades de la zona glaciada no formaron grupos monofiléticos. La topología del grupo glacial presenta pocos cladogramas, con menor soporte estadístico, y muestra una marcada politomía entre las localidades Puerto Chico, Llanquihue, Río Milagro, río Puelo, y río Rahue, perteneciendo esta última ubicación a la zona no glaciada.

3.3 ANÁLISIS GENÉTICOS POBLACIONALES

La diversidad haplotípica (H_d) para el conjunto de individuos muestreados ($n = 81$) fue de $0,8824 \pm 0,0277$, mientras que la diversidad nucleotídica (π) fue de $0,760510 \pm 0,367722$. La H_d más alta se detectó en la laguna Huelde ($0,7619 \pm 0,1148$), cuerpo de agua ubicado en la Isla Grande de Chiloé, en la zona no glaciada, mientras que las más bajas se encontraron en el lago Llanquihue ($0,2500 \pm 0,1802$), de origen glacial (Tabla 4). Por su parte, la mayor diversidad nucleotídica se detectó en el Río Rahue ($0,603438 \pm 0,353673$), ubicado fuera de los límites del UMG, mientras que el menor valor se encontró en el río Milagro ($0,012201 \pm 0,010470$), ubicado en zona glaciada. En la zona no glaciada, representada por los ríos Toltén, Chaihuín y Rahue, el estero Camposanto y la laguna Huelde, se registró una riqueza haplotípica de 18, así como una alta diversidad haplotípica ($0,9393 \pm 0,0182$) y nucleotídica ($1,011528 \pm 0,494442$), a diferencia de la zona glaciada, representada por los ríos Puelo, Milagro, Negro y lago Llanquihue (Llanquihue y Puerto Chico), cuya riqueza haplotípica es menor, 8, y presentó una menor diversidad haplotípica ($0,6632 \pm 0,0688$) y nucleotídica ($0,276491 \pm 0,138270$). Asimismo, las distancias genéticas corregidas (corrección gamma)

fluctuaron mayormente entre los haplotipos de la zona no glaciada (entre 0,0141 y 13,3309) que entre los haplotipos de la zona glaciada (0,0141 y 11,7198).

De acuerdo a los criterios propuestos por Wright (1978), quien clasificó los rangos de valores de diferenciación genética (F_{ST}) en bajos ($< 0,05$), moderados ($0,05 - 0,15$), altos ($0,15 - 0,25$) y muy altos ($> 0,25$), se observó que los valores de F_{ST} por pares obtenidos (Tabla 5) fueron altos y significativos entre casi todas las localidades, con unas pocas excepciones; por ejemplo, entre río Rahue, río Puelo y río Negro, entre Llanquihue, Puerto Chico, río Milagro y río Negro, entre Puerto Chico, río Milagro y río Puelo y entre río Milagro y río Puelo, cuyas diferencias no fueron significativas ($p > 0,05$) y se concentran principalmente en la zona glaciada. La localidad de río Rahue, en general, presentó bajas diferencias genéticas con respecto a las demás localidades, siendo estas mucho menores con las de la zona glaciada ($F_{ST} = 0,1031 - 0,2854$) que con las de la zona no glaciada ($F_{ST} = 0,6252 - 0,8858$). Exceptuando a río Rahue, las diferencias más altas se encontraron entre las poblaciones de la zona no glaciada ($F_{ST} = 0,6252 - 0,9919$), seguido de las que se encontraron entre las poblaciones de la zona glaciada y no glaciada ($F_{ST} = 0,4495 - 0,9957$), siendo las diferencias encontradas entre las poblaciones de la zona glaciada las más bajas ($F_{ST} = -0,0098 - 0,7603$).

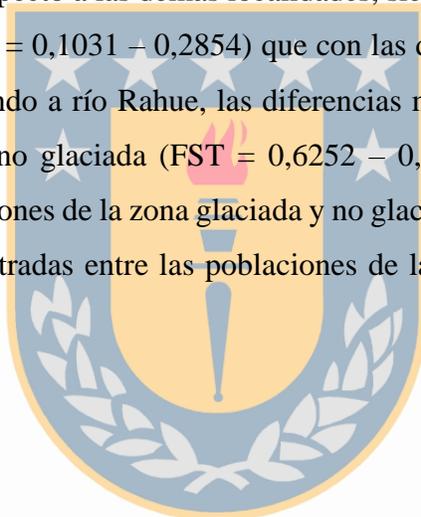


Tabla 4. Tamaño de muestra (N), haplotipos de ADNmt y su frecuencia (entre paréntesis), diversidad haplotípica (Hd) y diversidad nucleotídica (π) de las 10 localidades de *Chilina* sp. Los haplotipos que están presentes en más de una localidad se muestran en negrita. SD = desviación estándar.

Localidad	N	N haplotipos	Haplotipo (n. de individuos)	Hd (SD)	π (SD)
Zona No glaciada	39	18	-	0,939 (0,018)	0,136 (0,070)
Río Toltén	9	4	1(5) 2(1) 3(1) 4(2)	0,694 (0,147)	0,011 (0,009)
Estero Camposanto	9	5	5(1) 6(1) 7(5) 8(1) 9(1)	0,722 (0,159)	0,057 (0,035)
Río Chaihuín	8	3	10(6) 11(1) 12(1)	0,464 (0,200)	0,013 (0,011)
Río Rahue	6	3	13(1) 14(3) 15(2)	0,733 (0,155)	0,081 (0,052)
Laguna Huelde	7	3	16(2) 17(3) 18(2)	0,762 (0,115)	0,013 (0,011)
Zona Glaciada	42	8	-	0,663 (0,069)	0,064 (0,035)
Lago Llanquihue (Puerto Chico)	9	1	15(9)	0	0
Lago Llanquihue (Llanquihue)	8	2	15(7) 19(1)	0,250 (0,180)	0,049 (0,032)
Río Puelo	10	2	20(4) 21(6)	0,533 (0,095)	0,063 (0,038)
Río Milagro	9	3	15(7) 22(1) 23(1)	0,417 (0,191)	0,009 (0,008)
Río Negro	6	3	21(2) 24(3) 25(1)	0,733 (0,155)	0,086 (0,055)
Todas las poblaciones	81	25	-	0,882 (0,028)	0,119 (0,062)

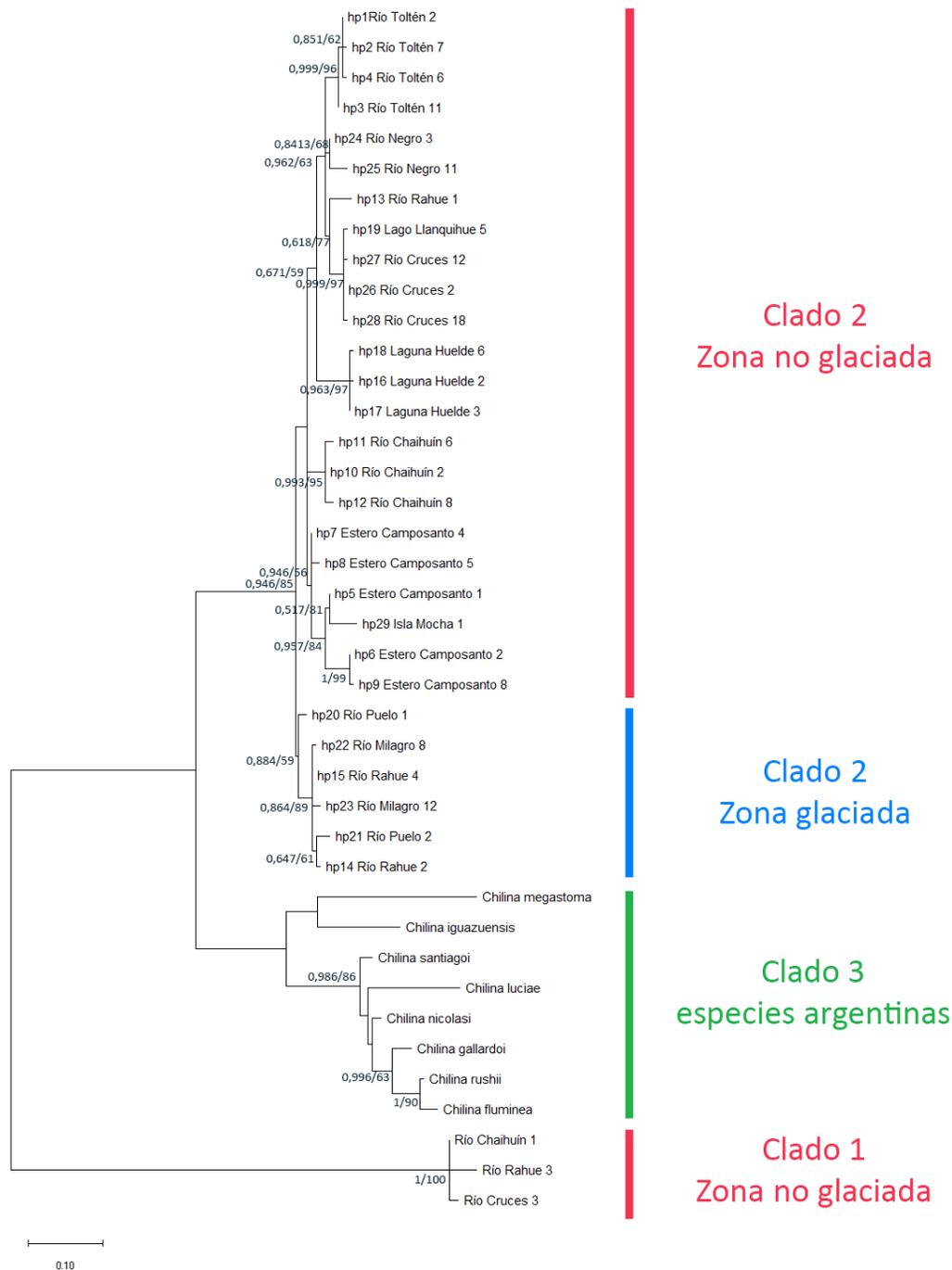


Figura 5. Relaciones filogenéticas basadas en secuencias del gen mitocondrial COI de *Chilina* sp., reconstruidas usando el método de Inferencia Bayesiana. Los números sobre las ramas separados por un slash son probabilidades posteriores bayesianas y valores de bootstrap del análisis de MV, respectivamente.

Tabla 5. Matriz de diferenciación genética (FST) entre localidades de *Chilina* sp., basadas en las frecuencias haplotípicas de ADNmt. Los valores no significativos (> 0,05) están subrayados.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Río Chaihuín	0									
2. Estero Camposanto	0,8045	0								
3. Río Toltén	0,9903	0,9319	0							
4. Laguna Huelde	0,9803	0,9346	0,9919	0						
5. Río Rahue	0,6670	0,6252	0,8858	0,8452	0					
6. Lago Llanquihue (Llanquihue)	0,5424	0,4495	0,8507	0,8078	<u>0,1031</u>	0				
7. Lago Llanquihue (Puerto Chico)	0,9838	0,8534	0,9957	0,9947	0,1812	<u>0,0156</u>	0			
8. Río Milagro	0,9739	0,8642	0,9923	0,9908	0,2418	<u>0,2108</u>	<u>-0,0098</u>	0		
9. Río Puelo	0,8562	0,6997	0,9608	0,9199	<u>0,1569</u>	0,4092	<u>0,0568</u>	<u>0,1114</u>	0	
10. Río Negro	0,7347	0,5939	0,7798	0,8186	<u>0,2854</u>	<u>0,2128</u>	0,7469	0,7603	0,6772	0

3.4 DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

La prueba de neutralidad de Tajima arrojó un valor negativo y significativo para todo el conjunto de localidades, así como también para las localidades de río Toltén y río Chaihuín, de la zona no glaciada, y Llanquihue, de la zona glaciada, mientras que para río Rahue se obtuvo un valor de D positivo y significativo (Tabla 6). Por su parte, la prueba de neutralidad F_s de F_u sólo fue negativo y significativo para el grupo de río Toltén. Estos valores sugieren que los grupos pertenecientes a río Toltén, río Chaihuín y lago Llanquihue, pasaron por un proceso de expansión poblacional luego de un cuello de botella, mientras que río Rahue experimentó un proceso de contracción poblacional reciente, lo cual complementa la información arrojada por los índices de diversidad haplotípica y nucleotídica (alto H_d y alto π), que estiman que ha sido un grupo con una historia evolutiva estable a través del tiempo (Grant y Bowen, 1998). Para corroborar estos resultados y determinar qué localidades han contribuido con la expansión del grupo formado por el total de las secuencias de *Chilina*, se infirió la demografía histórica poblacional de cada localidad mediante el análisis de distribución de desajuste (Figura 6), el cual detectó importantes cambios demográficos históricos. Río Toltén y río Milagro presentaron una distribución unimodal (Tabla 6), con pruebas de bondad de ajuste que no detectaron diferencias significativas de lo observado respecto a lo esperado ($SSD = 0,04$; $p \geq 0,05$ y $SSD = 0,01$; $p \geq 0,05$, respectivamente), lo cual es indicativo de que han experimentado una expansión poblacional hace aproximadamente 45 mil y 16 mil años, respectivamente. Por el contrario, estero Camposanto, río Chaihuín, río Rahue, río Puelo y río Negro presentaron una distribución multimodal, al igual que el grupo conformado por el total de secuencias, cuyas pruebas de bondad de ajuste en este caso sí detectaron diferencias significativas de lo observado con respecto a lo esperado para los grupos de río Chaihuín ($SSD = 0,202$; $p < 0,05$) y río Negro ($SSD = 0,21$; $p < 0,05$), lo cual refleja que sólo estero Camposanto, río Rahue y río Puelo han permanecido en un escenario de equilibrio demográfico a través del tiempo.

El diagrama de Horizonte Bayesiano para el conjunto de localidades de la zona no glaciada indicó que estas se expandieron de forma constante a lo largo del tiempo hasta hace aproximadamente 80 mil años, momento a partir del cual manifestaron un crecimiento demográfico de mayor rapidez que se extendió hasta hace 25 mil años, para luego mantenerse constante hasta el presente (Figura 7a). Por su parte, el diagrama de Horizonte Bayesiano

para la zona glaciada mostró un largo período de expansión demográfica que perduró hasta hace aproximadamente 170 mil años, momento desde donde se observó un periodo de estabilidad demográfica que perdura hasta el presente (Figura 7b). En ninguno de los dos diagramas se observaron cambios demográficos claros durante el Último Máximo Glacial, que se produjo aproximadamente hace 23 - 25 mil años (Sugden *et al.*, 2005).

3.5 RED DE HAPLOTIPOS

La red de haplotipos con el método median-joining mostró una asociación no aleatoria entre los 25 haplotipos, que corresponde en gran medida con su origen geográfico (Figura 8). Los haplotipos de las localidades costeras (río Toltén, estero Camposanto, río Chaihuín y laguna Huelde) están más relacionados entre sí y lo mismo ocurre entre los haplotipos hallados en las localidades de la zona glaciada, con la excepción de los haplotipos 13, 19, 24 y 25. Hubo más haplotipos en la zona no glaciada ($n = 18$) en comparación a la zona glaciada ($n = 8$). El haplotipo más frecuente fue h15, que se encontró en casi todas las localidades de la zona glaciada, además de río Rahue, de la zona no glaciada. Según el análisis de varianza molecular (AMOVA), no se encontraron diferencias significativas entre la zona glaciada y no glaciada ($FCT = 0,18626$; $p = 0,10459$). Por el contrario, las diferencias observadas se deben principalmente a las variaciones genéticas existentes entre las poblaciones dentro de cada zona ($FSC = 0,79769$; $p = 0$), las que son explicadas por un 64,91% de variación, seguido de un 18,63% de variación existente dentro de las poblaciones ($FST = 0,83537$; $p = 0$).

Tabla 6. Pruebas de neutralidad (D de Tajima y Fs de Fu) y parámetros de la Distribución de Desajuste para cada localidad de muestreo.

Localidad	D de Tajima (valor de p)	Fs de Fu (valor de p)	Curva	Tau	SSD (valor de p)
Zona No glaciada	-0,189 (0,482)	-0,57 (0,449)	Multimodal	6,645	0,01 (0,089)
Río Toltén	-0,936 (0,037)	-1,417 (0,002)	Unimodal	0,833	0,041 (0,142)
Estero Camposanto	2,535 (0,096)	1,963 (0,472)	Multimodal	1,215	0,061 (0,437)
Río Chaihuín	-0,121 (0,033)	0,971 (0,269)	Multimodal	0,423	0,202 (0,044)
Río Rahue	0,018 (0,003)	3,996 (0,826)	Multimodal	0	0,237 (0,099)
Laguna Huelde	0,687 (0,287)	-0,056 (0,083)	*	*	*
Zona Glaciada	-0,859 (0,212)	2,853 (0,875)	Multimodal	0,52	0,091 (0,07)
Puerto Chico	-	-	-	-	-
Lago Llanquihue	-1,358 (0)	6,027 (0,938)	*	*	*
Río Puelo	2,228 (0,121)	7,405 (0,955)	Multimodal	0,823	0,398 (0)
Río Milagro	0,025 (0,143)	0,551 (0,167)	Unimodal	0,302	0,012 (0,825)
Río Negro	4,195 (0,089)	4,708 (0,879)	Multimodal	2,272	0,213 (0,021)
Muestra total	-0,333 (0,004)	-0,503 (0,048)	Multimodal	4,888	0,017 (0,123)

(*) El procedimiento de mínimos cuadrados para ajustar la distribución de desajuste del modelo y la distribución observada no convergieron después de 2.000 pasos.

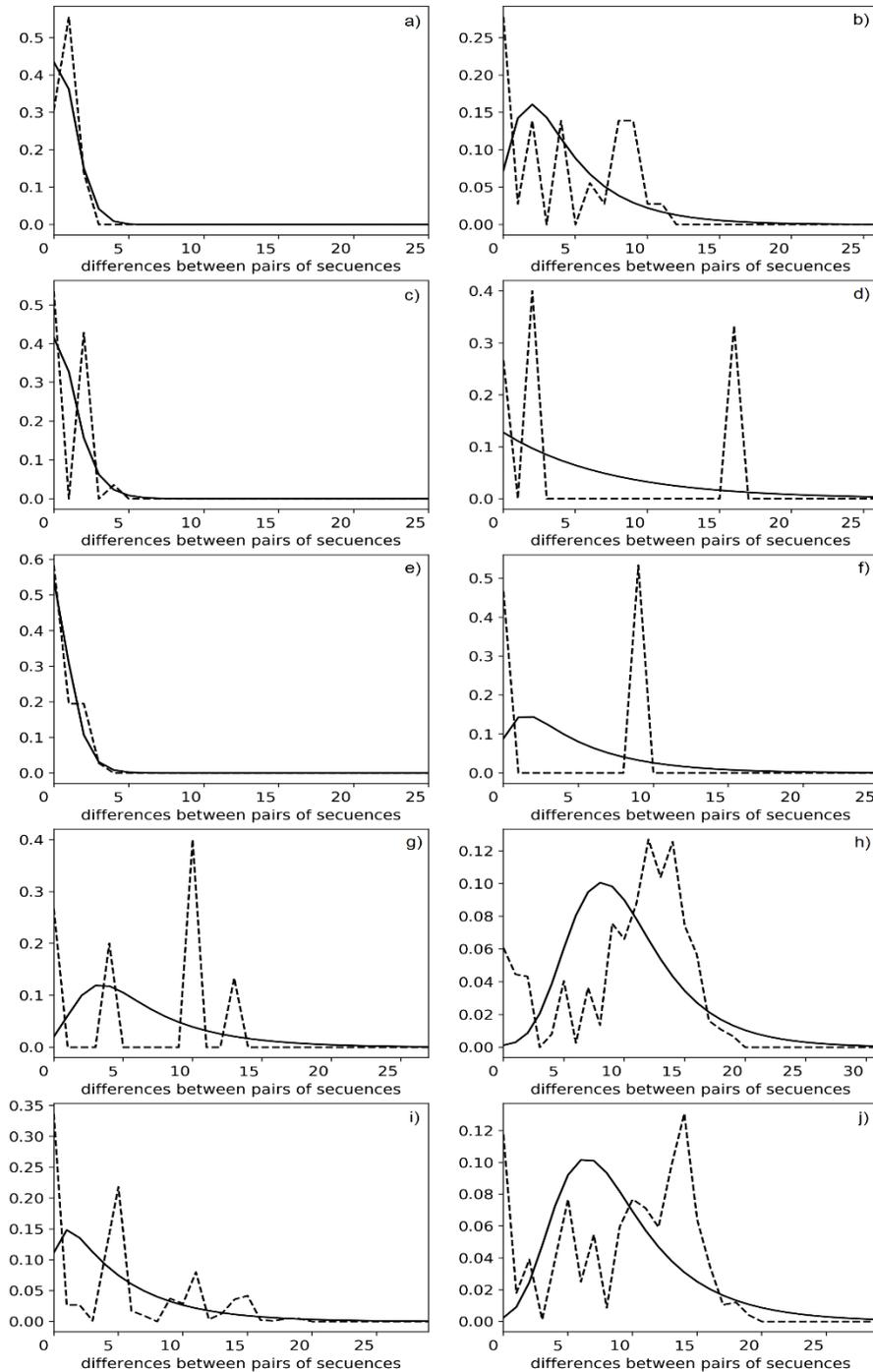


Figura 6. Análisis de distribución de desajustes entre secuencias de ADNmt de *Chilina* en diferentes grupos geográficos: a) río Toltén, b) estero Camposanto, c) río Chaihuín, d) río Rahue, e) río Milagro, f) río Puelo, g) río Negro, h) zona no glaciada, i) zona glaciada, j) todas las secuencias. La línea continua representa la distribución esperada y la línea discontinua representa la distribución observada.

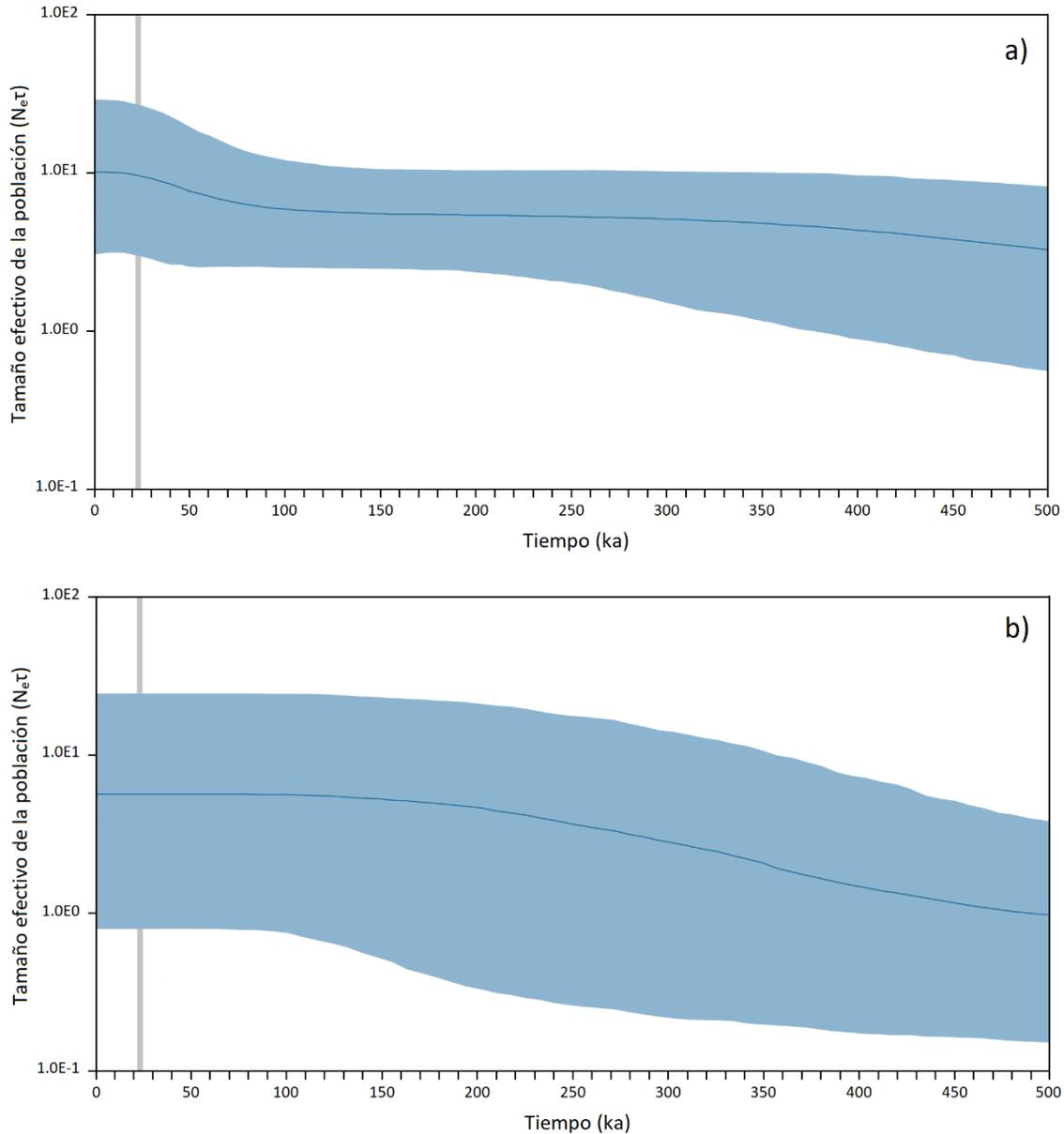


Figura 7. Diagramas de Horizonte Bayesiano (BSP) que representan la demografía histórica de *Chilina* sp. en los últimos 500 mil años, utilizando secuencias del gen mitocondrial COI. a) Demografía histórica derivada del conjunto de localidades de la zona no glaciada. b) Demografía histórica del conjunto de localidades que forman parte de la zona glaciada. El tiempo (Ma) y el tamaño de población efectivo escalado se encuentran representados a lo largo del eje x e y, respectivamente. Las líneas continuas son estimaciones medias y las áreas sombreadas indican regiones con densidades posteriores mayores al 95% (95% HPD). Por su parte, las barras grises representan el periodo de duración del UMG (~23.000 – 25.000 ka).

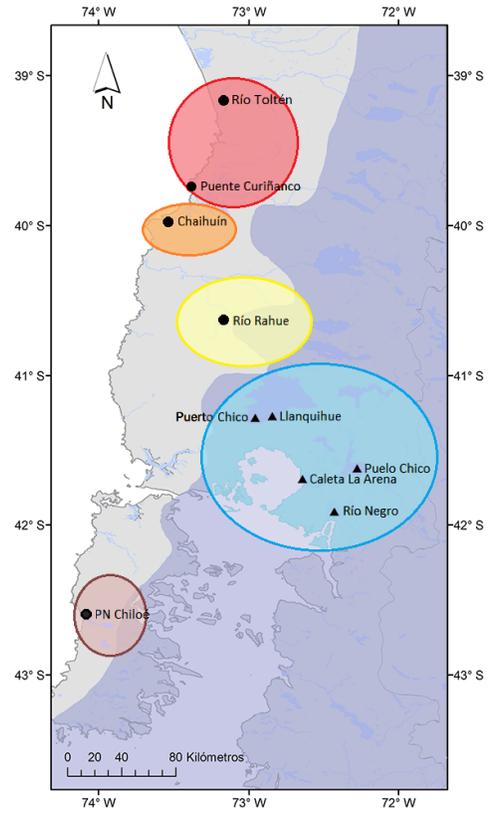
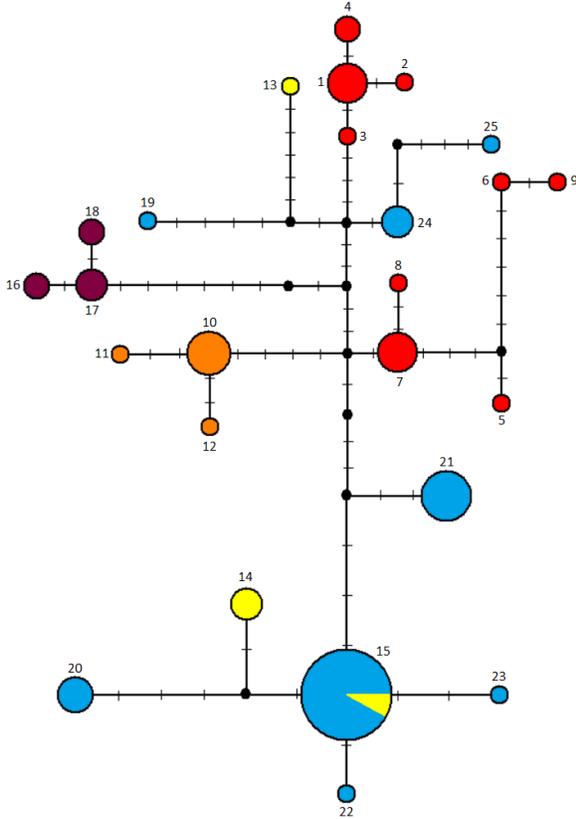


Figura 8. Red de haplotipos del gen mitocondrial COI de 81 individuos de *Chilina* sp. provenientes de diez localidades de muestreo. Cada círculo corresponde a un haplotipo distinto y su tamaño es proporcional a su frecuencia. El número junto a cada círculo corresponde al nombre de cada haplotipo y los colores indican su procedencia geográfica, las que se indican también en el mapa adjunto. El área sombreada en el mapa indica la zona cubierta de hielo durante el Último Máximo Glacial.

3.6 DIVERSIDAD GENÉTICA NUCLEAR

Para analizar los datos de AFLP, de los 79 individuos se excluyeron aquellos que formaron parte del clado que divergió primero en la filogenia (Clado 1, ver sección 3.2) y sólo se consideraron los individuos cuyo ADNmt también fue secuenciado ($n = 59$; Figura 5). Las cuatro combinaciones de cebadores produjeron un total de 1810 loci AFLP (entre 344 y 553 por combinación), de los cuales 1215 resultaron polimórficos (67%) según el criterio del 99%. Cada individuo originó un genotipo multilocus distinto. El porcentaje de loci polimórficos más bajo se presentó en los individuos de río Rahue (28%), mientras que el más alto se presentó en laguna Huelde (53%). Las localidades que mostraron el menor número de bandas privadas fueron Río Toltén y Río Negro, con 5 y 1 cada una, mientras que laguna Huelde mostró el mayor número, 73. Por su parte, la heterocigosidad media esperada para cada localidad varió desde 0,113 para río Rahue a 0,199 en laguna Huelde (Tabla 7). Por último, la matriz de distancias genéticas de Nei mostró que la menor distancia se produjo entre río Toltén y estero Camposanto, entre Puerto Chico y Llanquihue y entre río Milagro y río Puelo, mientras que la mayor distancia genética se presentó entre río Rahue y todas las demás localidades de estudio (Tabla 8).

Tabla 7. Diversidad de los marcadores AFLP en cada una de las 10 localidades muestreadas.

Localidad	N	Loci polimórficos	N bandas privadas	He (DE)
Río Toltén	5	406 (33%)	5	0,123 (0,005)
Esteros Camposanto	7	517 (43%)	37	0,153 (0,006)
Río Chaihuín	6	543 (45%)	37	0,168 (0,006)
Laguna Huelde	7	650 (53%)	73	0,199 (0,006)
Río Rahue	4	344 (28%)	38	0,113 (0,005)
Puerto Chico	7	526 (43%)	9	0,166 (0,006)
Llanquihue	6	520 (43%)	19	0,162 (0,006)
Río Puelo	8	596 (49%)	23	0,181 (0,006)
Río Milagro	6	577 (47%)	17	0,184 (0,006)
Río Negro	3	456 (38%)	1	0,145 (0,006)

Tabla 8. Matriz de distancia genética de Nei entre pares de localidades de *Chilina* sp., calculada con los datos de AFLPs.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1. Río Toltén	0,000									
2. Est. Camposanto	0,031	0,000								
3. Río Chaihuín	0,062	0,054	0,000							
4. Laguna Huelde	0,045	0,048	0,069	0,000						
5. Río Rahue	0,163	0,163	0,163	0,172	0,000					
6. Puerto Chico	0,053	0,057	0,060	0,056	0,167	0,000				
7. Lago Llanquihue	0,057	0,060	0,062	0,066	0,152	0,039	0,000			
8. Río Puelo	0,046	0,055	0,061	0,058	0,149	0,042	0,042	0,000		
9. Río Milagro	0,063	0,070	0,074	0,073	0,147	0,054	0,053	0,040	0,000	
10. Río Negro	0,051	0,056	0,069	0,059	0,118	0,056	0,060	0,046	0,054	0,000

3.7 ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

En el análisis de los datos de AFLPs ($n = 59$), el algoritmo de agrupamiento bayesiano implementado en GENELAND bajo el modelo de frecuencias no correlacionadas, detectó dos grupos principales ($K = 2$; Figura 9). Cada una de las 10 réplicas ejecutadas entregó el mismo resultado, esto es, el número óptimo de poblaciones es 2, siendo la réplica número 8 la de mayor probabilidad ($\text{likelihood} = -38772,97$) y según la cual estas corresponderían a un grupo norte, compuesto por río Toltén y estero Camposanto, y a un grupo sur, conformado por río Chaihuín, río Rahue, lago Llanquihue (Llanquihue y Puerto Chico), río Puelo, río Milagro y río Negro (Figura 9).

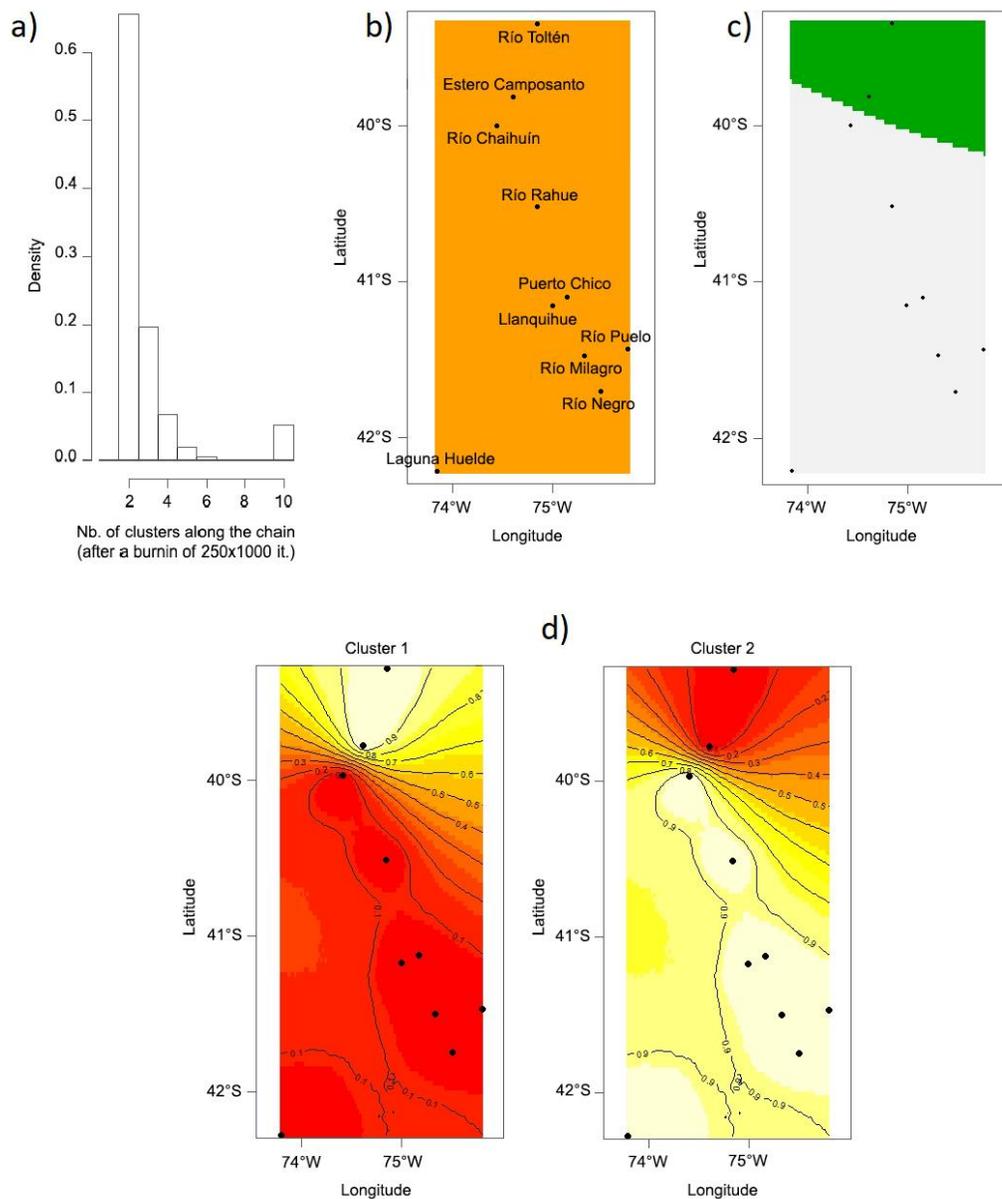


Figura 9. Resultados de GENELAND utilizando el modelo de frecuencias no correlacionadas para datos de AFLP de *Chilina* sp. ($n = 59$). a) Histograma de densidad de probabilidad posterior por número de poblaciones (K), donde la mayor densidad corresponde a $K = 2$, b) Posición relativa de los puntos de muestreo, c) Asignación de los puntos de muestreo a cada cluster y d) Clusters 1 y 2 con sus respectivos puntos de muestreo. En blanco y amarillo se representa una mayor probabilidad de pertenecer a un cluster determinado, mientras que en rojo se muestra una baja probabilidad.

Por su parte, los análisis ejecutados en STRUCTURE con los datos de AFLPs para los mismos 59 individuos utilizados en los análisis anteriores, con 10 réplicas para cada valor de K (que varió entre 2 y 10), mostraron el mayor valor de probabilidad con $K = 3$ (Figura 10a), según el método de Evanno, sugiriendo la existencia de tres poblaciones: (1) río Toltén, estero Camposanto, río Chaihuín y laguna Huelde (2) río Rahue y (3) lago Llanquihue (Llanquihue y Puerto Chico), río Puelo, Río Milagro y río Negro (Figura 10b).

Estos resultados no concuerdan con los entregados por GENELAND, ya que estos últimos agrupan a los individuos de río Toltén y estero Camposanto como una población única, mientras que la configuración de STRUCTURE más óptima, según el criterio de Evanno *et al.* (2005), agrupa a los individuos de ambas localidades junto con los de otras localidades de la zona no glaciada, como río Chaihuín y laguna Huelde. Sin embargo, según este mismo criterio, el valor de K que posee un valor subóptimo de probabilidad de registro es $K = 5$ (Figura 10a), en el cual STRUCTURE es capaz de subdividir esta gran población, y recuperar un cluster conformado por los individuos de río Toltén y estero Camposanto, separado de los de río Chaihuín y laguna Huelde, que se separan formando grupos distintos entre sí (Figura 10c).

Al incluir en el análisis de GENELAND los perfiles de AFLPs de todos los individuos analizados originalmente ($n = 79$), se lograron recuperar también dos agrupaciones, pero esta vez detectando a río Rahue como una única población, y agrupando a las demás localidades de la zona glaciada y no glaciada en una población diferente (Figura 11).

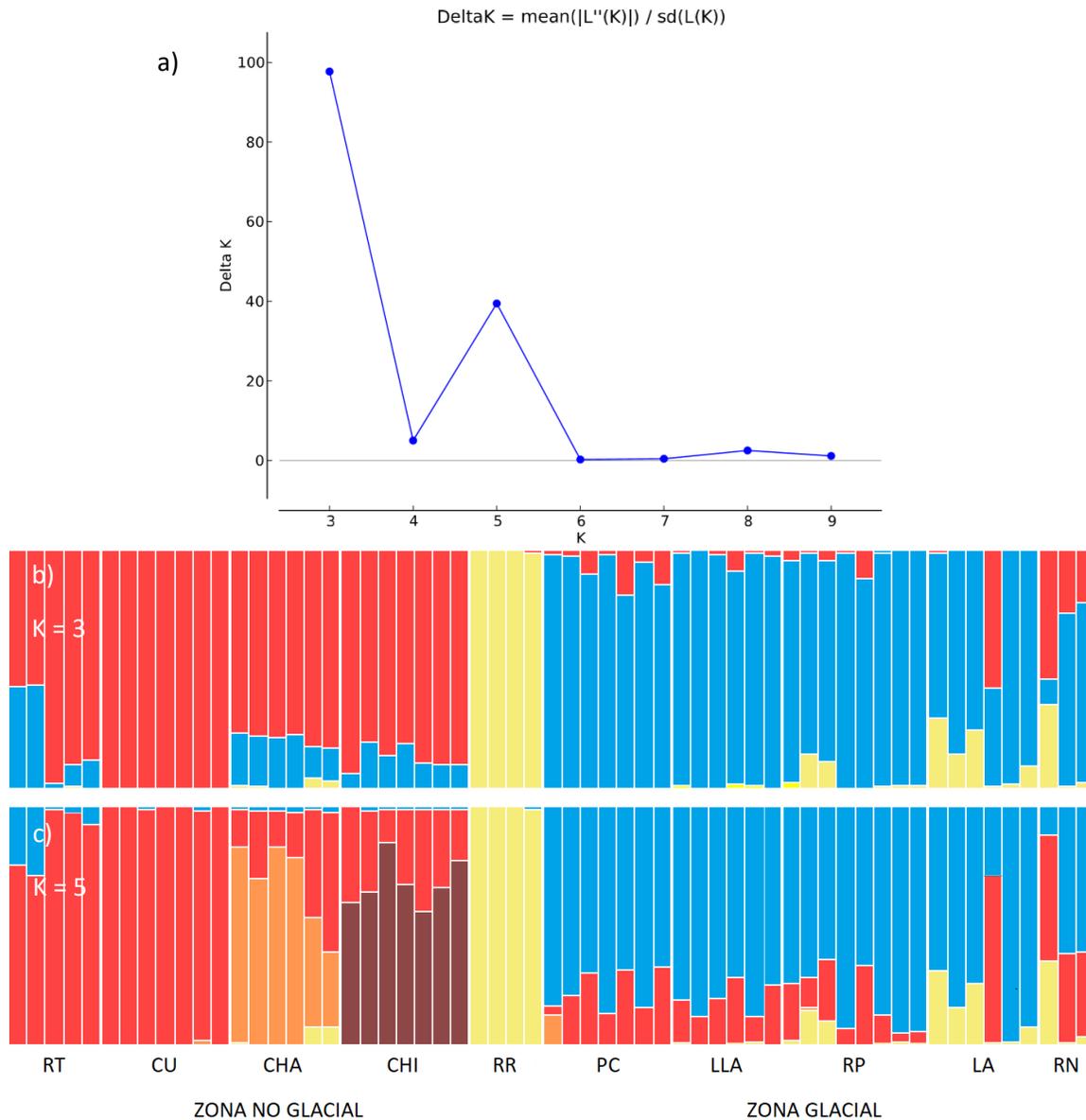


Figura 10. Resultados de STRUCTURE utilizando el modelo de mezcla con frecuencias no correlacionadas para datos de AFLPs de *Chilina* sp. ($n = 59$). a) Gráfico de ΔK para cada K de acuerdo con Evanno *et al.* (2005). b) $K = 3$ y c) $K = 5$. Cada individuo está representado por una línea vertical, que se subdivide en distintos colores. Estos representan a los distintos grupos detectados por el programa, por lo tanto, la fracción de cada color en un individuo indica la probabilidad de pertenecer a un grupo en particular. Los individuos están agrupados según su localidad de origen y según si estas tuvieron o no influencia glacial durante el UMG.

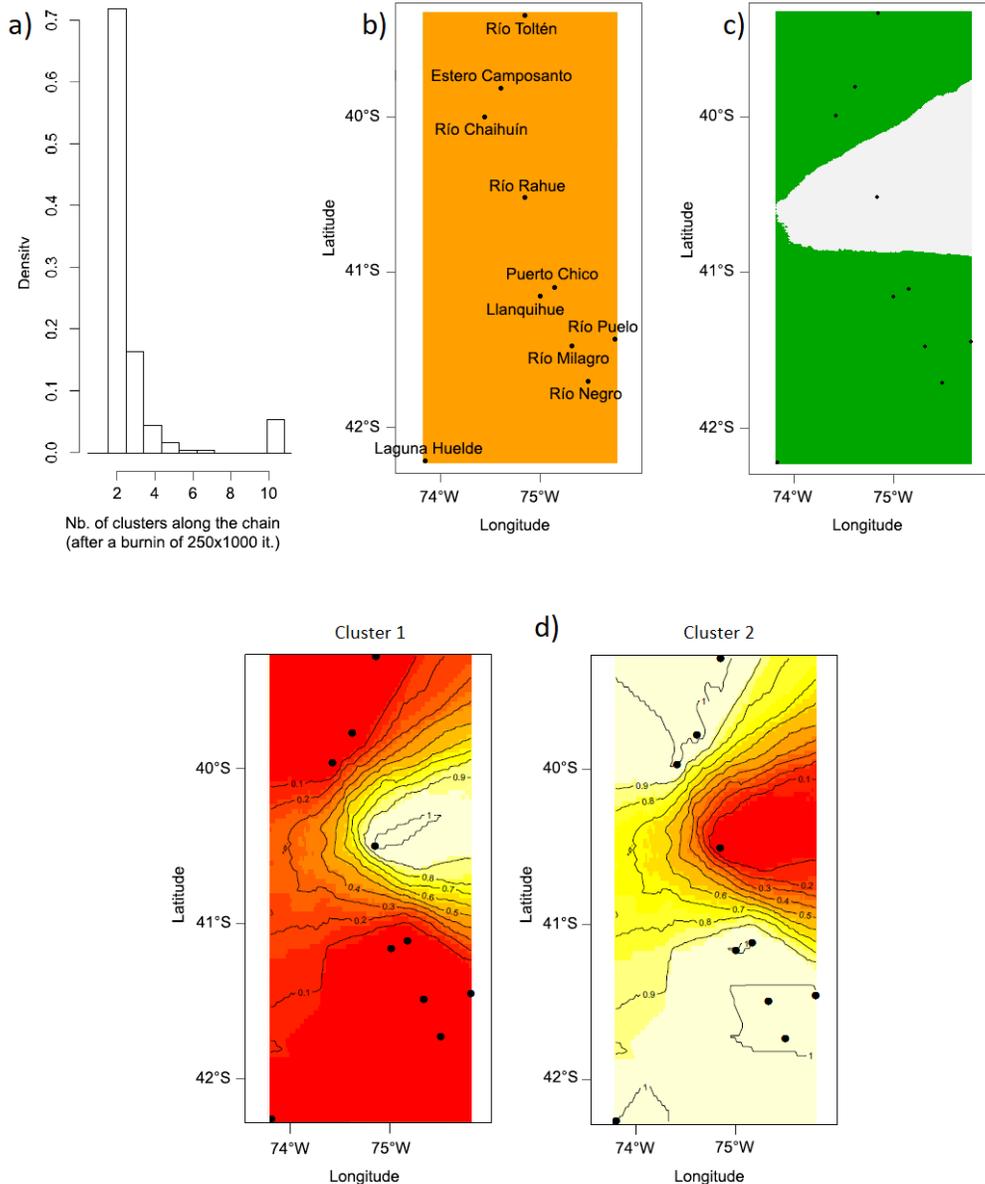


Figura 11. Resultados de GENELAND utilizando el modelo de frecuencias no correlacionadas para datos de AFLPs de *Chilina* sp. (n = 79). a) Histograma de densidad de probabilidad posterior por número de poblaciones (K), donde la mayor densidad corresponde a $K = 2$, b) Posición relativa de los puntos de muestreo, c) Asignación de los puntos de muestreo a cada cluster y d) Clusters 1 y 2 con sus respectivos puntos de muestreo. En blanco y amarillo se representa una mayor probabilidad de pertenecer a un cluster determinado, mientras que en rojo se muestra una baja probabilidad.

4. DISCUSIÓN

4.1 PATRONES FILOGEOGRÁFICOS

La diversidad genética del género *Chilina* en la porción norte de la Patagonia Occidental, estimada con el ADN mitocondrial, refleja actualmente un patrón de distribución marcado por la influencia de las oscilaciones climáticas pleistocénicas. En la zona glaciada se detectó un bajo número de haplotipos, algunos de ellos compartidos entre la mayoría de estas localidades, y una baja diversidad haplotípica y nucleotídica, lo cual indica que las poblaciones de *Chilina* que se encuentran en esta zona presentan una baja variabilidad genética como resultado de los sucesivos avances y retrocesos glaciales. Los árboles filogenéticos muestran sólo dos grupos monofiléticos en la zona glaciada, uno de ellos caracterizado por una marcada politomía, que incluyó las muestras de río Rahue, lago Llanquihue, río Milagro, río Puelo y río Negro, y que fue asignado a la especie *C. llanquihuensis*, de la cual no se tenía registros previos fuera de los márgenes del Lago Llanquihue, su localidad tipo (ver abajo, sección 4.5). El segundo se conformó por individuos de río Negro, que comparten un ancestro común con los de río Toltén y río Cruces.

En la zona no glaciada, en cambio, existe una mayor diversidad genética, lo cual se ve reflejado en el alto número de haplotipos exclusivos repartidos entre las distintas cuencas hídricas, así como en la alta diversidad haplotípica y nucleotídica detectada en ellas. También se advirtió una mayor estructuración filogeográfica en esta zona, evidenciada en el número de grupos monofiléticos con alto soporte estadístico recuperados con los métodos filogenéticos, así como en el mayor número de haplogrupos definidos en la red de haplotipos con el método Median Joining y el mayor número de clusters que se detectaron con los marcadores AFLP. Esta información comprende varios criterios que podrían interpretarse como evidencia de la separación de al menos dos linajes de nivel de especie (De Queiroz, 2007; Leavitt *et al.*, 2015), lo que representa otra distinción con respecto a la zona glaciada y da cuenta de una mayor diversidad. Estas especies poseerían un acotado rango de distribución, ubicadas dentro de una cuenca hidrográfica costera particular, lo que apoyaría lo descrito por Valdovinos (2006), quien sostiene que en general, las especies de moluscos dulceacuícolas del territorio chileno poseen un rango de distribución acotado, asociado a unos

pocos cursos de agua, generalmente contiguos, refiriéndose a la información fragmentada existente hasta ese entonces, incluida la del género *Chilina*, en que sólo se conocían las localidades tipo de cada una de las especies que lo conforman. Parece ser que este patrón se cumple principalmente en los cuerpos fluviales que han estado libres de la influencia glacial, dado que tanto en este como en otros estudios se ha observado que la biota acuática asociada a ellos revela patrones filogeográficos concordantes con su grado de separación, lo cual sugiere que esta ha sido una zona relativamente estable que ha permitido la acumulación de variabilidad genética a lo largo del tiempo, traduciéndose en una mayor diferenciación intra e interespecífica (Xu *et al.*, 2009; Pérez-Lozada *et al.*, 2011). El aislamiento geográfico entre cuencas, a largo plazo, pudo dificultar el flujo génico entre las poblaciones de *Chilina* que, al ser organismos con una limitada capacidad de dispersión, divergieron entre sí; por lo tanto, al igual que como ocurre con otras especies de baja vagilidad, la distribución actual de las especies de *Chilina* en la zona no glaciada de la Patagonia Occidental reflejaría en gran parte su distribución previa al UMG (Jara, 1996; Valdovinos *et al.*, 2010), lo que a su vez indicaría que la diversidad actual del género en esas latitudes refleja uno o más procesos de diversificación anteriores al periodo pleistocénico, como ocurre en el caso de otros taxa acuáticos neotropicales (Ruzzante *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2009). Es necesario recordar que la red hidrográfica de la Patagonia Occidental ha tomado la forma contemporánea luego de diversos eventos tectónicos, volcánicos y orogénicos que han tenido lugar a lo largo del Neógeno; el levantamiento de la cordillera de Los Andes, que comenzó hace aproximadamente 23 Ma (Ramos, 1989; Rodríguez-Tribaldos *et al.*, 2017) dividió los sistemas fluviales que surcaban transversalmente el continente sudamericano de este a oeste, así como a su biota asociada. Este evento dio origen a la ramificación de la red fluvial en su vertiente occidental, lo que eventualmente promovió la diversificación de su biota (Lundberg, 1998).

4.2 REFUGIO GLACIAL

Diversos estudios han mostrado que las poblaciones en áreas que han sido recolonizadas difieren genéticamente de las poblaciones que han actuado como fuente en áreas de refugio (Hewitt, 1996; Provan & Bennett, 2008; Keppel *et al.*, 2012). Generalmente, poseen un

subconjunto de sus genes, lo que se traduce en una menor diversidad genética. Este patrón es el que se observa aquí, pues notablemente los individuos de río Rahue exhiben bajas distancias genéticas con respecto a los de los ríos y lagos de la zona glaciada, y también que compartan el haplotipo 15, lo cual sugiere que río Rahue pudo haber actuado como un refugio glacial y como fuente de biodiversidad para esta área, dado que también se detectó que posee una alta diversidad haplotípica y nucleotídica. Esto sugiere que ha sido un área climáticamente estable a lo largo del tiempo, lo que también se corrobora gracias al análisis de desajustes, que muestra que la población ha permanecido en equilibrio demográfico.

Por otro lado, las distancias genéticas que presentaron los individuos de río Rahue con los que habitan en las cuencas fluviales de la zona no glaciada son mayores, lo cual indica que este río podría estar menos conectado con la red fluvial de la zona no glaciada, a pesar de estar también fuera de los márgenes del UMG. Sin embargo, de igual modo presentan una baja distancia genética con respecto a río Chaihuín y estero Camposanto. Esto podría indicar la existencia de alguna conexión pasada entre los tres cuerpos fluviales, lo cual sería posible a través de una cuenca hidrográfica intermediaria, como podría ser la del río Valdivia, que en el presente posee múltiples ríos tributarios que enriquecen su caudal y que drenan una serie de lagos cordilleranos, formando una extensa red hídrica que pudo haber conectado con cursos de agua de cuencas adyacentes, como la cuenca del río Bueno, a la que pertenece el río Rahue. La complejidad de este entramado hídrico pudo ser aún mayor a comienzos del derretimiento de los glaciares, cuando se formaron enormes paleolagos (McCulloch *et al.*, 2000) que, tal como ocurrió en zonas libres de hielo de la Patagonia Oriental (Rabassa & Clapperton 1990; Clapperton 1993), pudieron influir directamente en la conectividad de los ríos situados en la zona libre de hielo al Oeste de Los Andes, al drenar sus aguas a más de un efluente y al propiciar la ocurrencia de capturas fluviales por el desprendimiento de grandes volúmenes de sedimento, que obstruyeron localmente el flujo libre de los caudales (Burrige *et al.*, 2006). Todo esto pudo haber permitido el flujo génico entre río Rahue y río Valdivia, y desde esta última, hacia el río Chaihuín y estero Camposanto por su cercanía geográfica. La posible existencia de un género cercanamente emparentado a *Chilina* distribuido en río Rahue, río Cruces (perteneciente a la cuenca de río Valdivia) y río Chaihuín (ver abajo, sección 4.4), apoyan esta hipótesis, así como también la presencia de un haplotipo compartido entre río Cruces y lago Llanquihue (hp 19). Sin embargo, es necesario hacer un

estudio más profundo para indagar en los procesos de diversificación que dieron origen a la actual diversidad compartida entre estas cuencas.

Los análisis de los marcadores AFLP se contraponen totalmente con estos resultados, puesto que se detectó que el porcentaje de loci polimórficos y nivel de heterocigosidad más bajos se observaron justamente en río Rahue, lo cual indicaría que dichos individuos presentan poca variabilidad genética. También, se observó que esta cuenca fluvial es la que más se distancia genéticamente de las demás, tanto de la zona glaciada como no glaciada, lo que fue corroborado por el programa STRUCTURE, al agrupar a los individuos de río Rahue en un cluster independiente. Todo esto indicaría que probablemente río Rahue no actuó como un refugio para la zona glaciada y que incluso pudo haber sido afectado por los últimos episodios de avance glacial del Pleistoceno tardío, haciendo que su variabilidad genética disminuyera drásticamente. Sin embargo, es necesario precisar que estos resultados pudieron haber sido influenciados por el bajo número de muestras que se usó para representar al río Rahue, puesto que sólo se consideraron 4 individuos. A pesar de esto, el programa GENELAND logró agrupar a este río junto con las localidades de la zona glaciada, resultado que coincide con los análisis basados en el gen mitocondrial COI.

4.3 DEMOGRAFÍA HISTÓRICA

En la zona no glaciada, tanto río Toltén como río Chaihuín muestran señales consistentes con la ocurrencia de un cuello de botella seguido de una expansión poblacional, según el valor negativo y significativo de la prueba D de Tajima, así como también por los valores entregados por los índices de diversidad (alto H_d y bajo π) y la presencia de haplotipos frecuentes en ambas localidades, hp 1 y hp 10, respectivamente. El análisis de distribución de desajustes también detectó cambios demográficos históricos en río Toltén, pues se observó una distribución unimodal, que confirma que en este río se produjo una expansión poblacional hace aproximadamente 45 mil años, lo que coincidiría con el aumento de temperaturas registrado en el período “interstadial” registrado antes del UMG, hace aproximadamente 45 mil años (Heusser, 1983; Rabassa y Clapperton, 1990; Singer *et al.*, 2004).

En la zona glaciada, también se puede inferir que hubo un cuello de botella seguido de una expansión poblacional, específicamente en el lago Llanquihue, por el valor negativo y significativo de D que arrojó la prueba de Tajima, así como por el alto H_d y bajo π de los índices de diversidad. Lo anterior coincide con dos de las hipótesis planteadas, que sostienen que el UMG tuvo efectos en la variabilidad genética de las poblaciones de *Chilina* en la zona glaciada y a su vez, provocó una baja diversidad genética de *C. llanquihuensis* en el lago Llanquihue.

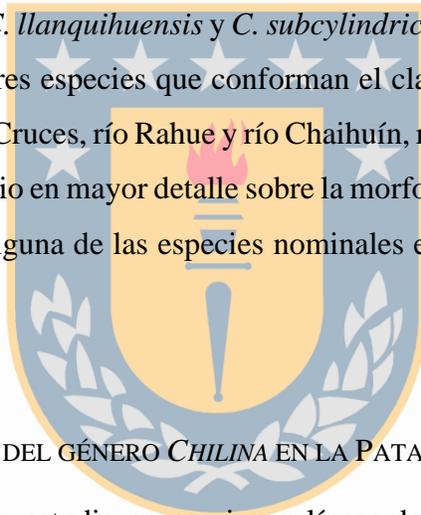
Por su parte, en río Rahue, un valor positivo y significativo de la prueba D de Tajima y una cantidad importante de haplotipos faltantes en la red de haplotipos sugieren una estabilidad demográfica histórica seguida de una contracción poblacional reciente en este cuerpo fluvial. La red de haplotipos también mostró un alto número de pasos mutacionales entre el hp 15 del complejo Llanquihue y los hp 13 de río Rahue y 19 de Llanquihue y río Cruces, lo cual puede ser explicado por dos razones: i) la falta de muestreo en áreas intermedias, entre la cuenca de río Valdivia y río Rahue, y ii) la pérdida de haplotipos provocada por el aumento de la cobertura glacial durante el Pleistoceno tardío, por lo tanto la diversidad que hoy se concentra en esta área podría ser solamente el reflejo de una recolonización y dispersión postglacial desde un área de refugio seguida de una expansión poblacional (Hewitt, 1996). Este último punto es soportado por la distribución de desajuste unimodal observada en río Milagro, lo que indicaría que esta zona experimentó un proceso de expansión poblacional (apoyado por el valor de los índices de diversidad, alto H_d y bajo π) hace aproximadamente 16 mil años, momento comprendido dentro de un período interestadial (Varas Interestade) ocurrido entre la Glaciación Llanquihue II (25 a 20 ka AP) y la Glaciación Llanquihue III (15 a 14 ka AP), en que distintos estudios basados en evidencia palinológica, geomorfológica y de datación por radiocarbono dan cuenta de un aumento de temperatura (Porter, 1981; Rabassa y Clapperton 1990; Denton *et al.*, 1999). Este hecho provocó el derretimiento de los glaciares en tierras bajas, lo que dio origen a la formación de grandes paleolagos y a un entramado hídrico que significó la disponibilidad de hábitats posteriormente recolonizados.

4.4 NUEVO GÉNERO

El género *Chilina*, ampliamente distribuido en América del Sur, ha sido pobremente estudiado desde el punto de vista genético poblacional y sistemático. En Chile se han descrito 30 especies en total (Stuardo, 1961; Sielfield, 2001; Valdovinos 1999, 2006), de las cuales 9 se distribuyen entre los 39° y 42° S: *C. ampullacea* Sowerby, 1838, *C. acuminata* Sowerby, 1874, *C. elegans* von Frauenfeld, 1870, *C. major* Sowerby, 1838 y *C. robustior* Sowerby, 1838 en la cuenca del río Valdivia, *C. iheringi* Marshall, 1933 en el lago Todos los Santos, *C. llanquihuensis* Marshall, 1933 en el lago Llanquihue y *C. subcylindrica* Sowerby, 1874 y *C. bulloides* (d'Orbigny, 1835) en la Isla de Chiloé. El principal inconveniente con las descripciones de estas especies es que están basadas en caracteres morfológicos que dificultan su distinción debido a que su variabilidad intra e interespecífica es desconocida. Esta información es de gran relevancia ya que se han descrito cinco especies en la cuenca del río Valdivia y las variaciones en la concha sobre las que se basaron tales descripciones pueden ser expresiones fenotípicas que no necesariamente reflejen su divergencia genética, sino más bien diferencias en el ambiente.

Los análisis filogenéticos basados en datos de ADN mitocondrial, aunque no incluyen secuencias provenientes de localidades tipo, aun así abarcan sitios cercanos y revelan antecedentes que podrían significar cambios taxonómicos importantes dentro del género *Chilina*. Se detectó un clado tempranamente divergente conformado por secuencias de río Rahue, río Cruces y río Chaihuín que, debido al alto soporte estadístico y la elevada distancia genética que presenta tanto con individuos que cohabitan en dichas cuencas, así como también con individuos de localidades cercanas y con especies distribuidas en territorio argentino, podría corresponder a un género distinto. Esta idea podría tener relación con el tamaño de la concha, ya que, según observaciones personales, los individuos que conformaron este clado tenían una longitud total (medida desde el ápice hasta el extremo del canal sifonal) igual o mayor a 30 mm; por lo tanto, es posible que las especies de caracoles que han sido descritas en estas latitudes y, cuyos adultos poseen un tamaño de concha igual o mayor a 30 mm, deban reasignarse a un género diferente, mientras que aquellas de tamaños inferiores corresponderían al género *Chilina*.

Los ejemplares tipo de las especies distribuidas en Argentina incluidas en los árboles filogenéticos tampoco superan los 30 mm de longitud total (Ituarte, 1997; Lanzer, 1997; Gutierrez-Gregoric & Rumi, 2008; Gutierrez-Gregoric & de Lucia, 2016; Gutierrez-Gregoric 2008; 2010), por lo tanto, se encontrarían bien categorizadas dentro del género *Chilina*, al igual que su clado hermano distribuido en Chile. No obstante, cabría esperar que varias de las especies descritas en Chile hasta la fecha tengan que sufrir un reordenamiento taxonómico. Específicamente, entre los 39° y 42° S, de las nueve especies descritas, al menos cinco podrían corresponder al nuevo género: *C. ampullacea*, *C. major*, *C. robustior*, *C. bulloides* y *C. iheringi*, dada la morfología de la concha de sus ejemplares tipo. Por lo tanto, el número de especies nominales del género *Chilina* descritas hasta la fecha y distribuidas en esta zona parece ser menor si se toma como criterio la longitud de la concha, correspondiendo a *C. acuminata*, *C. elegans*, *C. llanquihuensis* y *C. subcylindrica*. Los alcances de este estudio sugieren que hay al menos tres especies que conforman el clado que diverge primero en la filogenia, distribuidas en río Cruces, río Rahue y río Chaihuín, respectivamente. Sin embargo, es necesario realizar un estudio en mayor detalle sobre la morfología de estos ejemplares para determinar si pertenecen a alguna de las especies nominales existentes, o bien, asignarlas a nuevos taxones.



4.5 DIVERSIDAD DE ESPECIES DEL GÉNERO *CHILINA* EN LA PATAGONIA NORTE OCCIDENTAL

Los resultados de este estudio proporcionan líneas de evidencia que pueden usarse como criterios para la delimitación de tres especies distribuidas entre los 39° y 42° S. Entre estas, se logró identificar sólo a una de las que habían sido descritas en esta zona, *C. llanquihuensis* Marshall, 1933, cuya localidad tipo corresponde al Lago Llanquihue. Su rango de distribución se amplía hasta el río Rahue, con el que conecta en sentido noroeste, y también hasta río Milagro y río Puelo, por el sur, ya que tanto los análisis basados en el gen mitocondrial COI como en los marcadores AFLP mostraron que los ejemplares de estas localidades comparten una historia evolutiva común.

En laguna Huelde, Isla de Chiloé, también se detectó un linaje diferente, respaldado tanto por el soporte estadístico obtenido en los árboles filogenéticos, como también por haberse detectado como un cluster independiente en el análisis de STRUCTURE de los

marcadores multilocus AFLP. Los ejemplares aquí encontrados poseen atributos morfológicos que no coinciden ni con las características conchológicas descritas para *C. subcylindrica* Sowerby, 1874, ni con las de *C. bulloides* d'Orbigny, 1835 (observación personal), únicas especies descritas dentro de la Isla de Chiloé, por lo que este linaje podría corresponder a una nueva especie. La diversidad observada con respecto al continente responde al aislamiento geográfico que sufrió la isla desde hace aproximadamente 7000 años, lo que demuestra cuan efectivo ha sido el Canal de Chacao como barrera geográfica para el flujo génico desde entonces (Vidal *et al.*, 2012; Napolitano *et al.*, 2014; Vidal *et al.*, 2016). No obstante, esta barrera no ha sido permanente, debido a la formación de un puente terrestre que unió a la isla con el continente entre 26000 y 7000 cal. AP, y que permitió el flujo génico de variados taxones (Vidal *et al.*, 2012). Este pudo ser el caso de los caracoles de agua dulce del género *Chilina*, que específicamente en laguna Huelde presentaron una alta diversidad haplotípica y baja diversidad nucleotídica, lo que puede estar reflejando un efecto fundador que dio origen a una población que con el paso del tiempo se logró diferenciar genéticamente de la población original, al quedar geográficamente aislada. Se requiere realizar un estudio más detallado para indagar en los procesos que dieron origen a la divergencia de este clado, así como también las circunstancias que permitieron la llegada de estos caracoles a la isla.

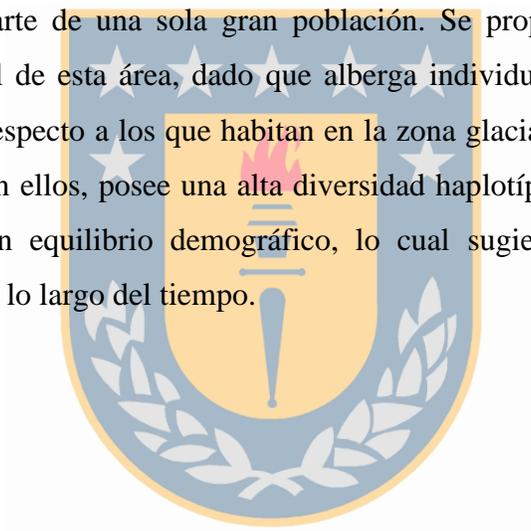
Por último, los individuos de río Chaihuín también formaron un grupo monofilético bien soportado y se agruparon en un cluster independiente en el análisis de STRUCTURE. Estos criterios apoyan la existencia de un linaje de nivel especie que habita en esta cuenca fluvial, que podría tratarse de una especie nueva, o bien, pertenecer a una de las especies nominales del género *Chilina* descritas en la cuenca de río Valdivia (sin considerar aquellas que podrían reasignarse a un nuevo género): *C. acuminata* o *C. elegans*. Si bien, río Chaihuín no forma parte de esta cuenca, pudieron haber tenido una conexión en el pasado, ya que es un curso de agua costero que nace en las cercanías del río Valdivia, en la Cordillera de la Costa, lo que habría facilitado un flujo génico entre ambas. Se requiere hacer un estudio más detallado sobre la diversidad del género *Chilina* presente a lo largo de la cuenca del río Valdivia, incluyendo y contrastando evidencia morfológica y molecular, puesto que comprende una extensa red hídrica en la que confluyen dos ríos principales de distinto origen, el río San Pedro, que drena el agua de una cadena de siete grandes lagos, partiendo desde el Lago Lacar hasta el Lago Riñihue, y el río Cruces, que se origina por la confluencia de

algunos esteros que nacen entre los cerros situados entre los lagos Villarrica y Calafquén. Sobre estos ríos afluyen a su vez una serie de ríos tributarios que añaden mayor complejidad a la arquitectura de drenajes de esta cuenca, lo que podría conducir a una baja conectividad física entre sus ramas y, por lo tanto, entre hábitats dentro de la misma (Gomi *et al.*, 2002; Schwartz *et al.*, 2007; Cook *et al.*, 2011). Esto, junto con la limitada capacidad de desplazamiento que poseen los caracoles del género *Chilina* (Bisol *et al.*, 1994), pudo haber facilitado el desarrollo de procesos de diversificación (e.g. Xu *et al.*, 2009; Nägele & Hausdorf, 2015). Tomando esto en consideración, no es de extrañar que hasta ahora hayan sido descritas cinco especies en la cuenca de este río, lo cual plantea dos escenarios: que una de ellas esté presente también en el río Chaihuín, debido a su cercanía geográfica o bien, dado que río Chaihuín es un cuerpo de agua aislado geográficamente, albergue una especie diferente a las que se encuentran en la cuenca del río Valdivia.



5. CONCLUSIONES

Las glaciaciones pleistocénicas tuvieron un efecto significativo sobre las poblaciones del género *Chilina* en el norte de la Patagonia Occidental. La zona no glaciada alberga una mayor diversidad genética, lo que se ve reflejado en el alto número de haplotipos exclusivos y la alta diversidad haplotípica y nucleotídica que presentan las distintas cuencas hídricas en esta área, así como también en el número de grupos monofiléticos con alto soporte estadístico recuperados con los métodos filogenéticos y en el mayor número de clusters que se detectaron con los marcadores AFLP. Todo esto se traduce en localidades que presentan poblaciones mayormente estructuradas genéticamente, en comparación a lo que ocurre en la zona glaciada, cuyas localidades analizadas presentan individuos con poca diversidad genética y formando parte de una sola gran población. Se propone al río Rahue como potencial refugio glacial de esta área, dado que alberga individuos que exhiben una baja distancia genética con respecto a los que habitan en la zona glaciada, comparte parte de su variabilidad genética con ellos, posee una alta diversidad haplotípica y nucleotídica y a su vez, ha permanecido en equilibrio demográfico, lo cual sugiere que ha sido un sitio climáticamente estable a lo largo del tiempo.



6. REFERENCIAS

- ALLNUT, T.R., NEWTON, A.C., LARA, A., PREMOLI, A., ARMESTO, J., VERGARA, R. & GARDNER, M. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Ecology*, 8: 975–987.
- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, USA.
- BANDELT, H.J., FORSTER, P. & RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16: 37–48.
- 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.
- BERENDZEN, P.B., SIMONS, A.M. & WOOD, R.M. 2003. Phylogeography of the northern hogsucker, *Hypentelium nigricans* (Teleostei: Cypriniformes): genetic evidence for the existence of the ancient Teays River. *Journal of Biogeography*, 30: 1139–1152.
- BINNEY, H.A., WILLIS, K.J., EDWARDS, M.E., BHAGWAT, S.A., ANDERSON, P.M., ANDREEV, A.A., BLAAUW, M., DAMBLON, F., HAESAERTS, P., KIENAST, F., KREMENETSKI, K.V., KRIVONOGOV, S.K., LOZHKIN, A.V., MACDONALD, G.M., NOVENKO, E.Y., OKSANEN, P., SAPELKO, T.V., VALIRANTA, M. & VAZHENINA, L. 2009. The distribution of late-Quaternary woody taxa in northern Eurasia: evidence from a new macrofossil database. *Quaternary Science Reviews*, 28: 2445–2464.
- BISOL, P.M., ALAY, F., GAVILÁN, G.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*, 65: 181–185.
- BÓRQUEZ, J., VALDOVINOS, C. & BRANTE, A. 2015. Intracapsular development in the freshwater gastropod *Chilina dombeiana* (Bruguiere, 1789) (Gastropoda: Hygrophila: Chiliniidae). *Nautilus*, 129(4): 169–171.

- BRACE, R.C. 1983. Observations on the morphology and behaviour of *Chilina fluctuosa* Gray (Chilinidae), with a discussion on the early evolution of pulmonate gastropods. *Philosophical transactions of the Royal Society of London*, 300: 463–491.
- BRUGUIÈRE, J.G. 1789. *Encyclopédie méthodique ou par ordre de matières. Histoire naturelle des Vers, des Mollusques*, Paris. 758 pp.
- BURRIDGE, C.P., CRAW, D. & WATERS, J.M. 2006. River capture, range expansion, and cladogenesis: The genetic signature of freshwater vicariance. *Evolution*, 60: 1038–1049.
- CALDENIUS, C.C. 1932. Las glaciaciones cuaternarias en la Patagonia y Tierra del Fuego. *Geografiska Annaler*, 14: 1–164.
- CLAPPERTON, C.C. 1993. Nature of environmental changes in South America at the last glacial maximum. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 101: 189–208.
- COOK, B.D., KENNARD, M.J., REAL, K., PUSEY, B.J. & HUGHES, J.M. 2011. 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*, 56: 812–827
- D'ORBIGNY, A. 1835-43. *Voyage dans L'Amérique Méridionale* 5 (3 Mollusques). 758 pp.
- DALL, W.H. 1870. On the genus *Pompholyx* and its allies, with a revision of the Limnaeidae of authors. *Annals of the Lyceum of Natural History of New York*, 9(1): 333–361.
- DAYRAT, B., TILLIER, A., LECOINTRE, G. & TILLIER, S. 2001. New clades of euthyneuran gastropods (Mollusca) from 28S rRNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 19: 225–235.
- DE QUEIROZ, K. 2007. Species concepts and species delimitations. *Systematic Biology*, 56: 879–886.
- DENTON, G.H., LOWELL, T.V., MORENO, P.I., ANDERSEN, B.G. & SCHLÜCHTER, C. 1999. Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of Llanquihue Drift in

- the area of the southern Lake District, Seno Reloncaví, and Isla Grande de Chiloé, Chile. *Geografiska Annaler*, 81A: 167–229.
- DYER, B. 2000. Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos*, 19: 77–98.
- DUNCAN, C.J. 1960. The evolution of the pulmonate genital systems. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 134: 601–609.
- DRUMMOND, A. & RAMBAUT, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- EARL, D.A. & VONHOLDT, B.M. 2012. Structure harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359–361.
- EVANNO, G., REGNAUT, S. & GOUDET, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14(8):2611–2620.
- EXCOFFIER, L. & LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564–567.
- FOLMER, O., BLACK, M., HOEH, W., LUTZ, R. & VRIJENHOEK, R. 1994. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5): 294–299.
- FU, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: 915–925.
- FUENTEALBA, C., MORRONE, J. & FIGUEROA, R. 2010. Análisis de endemismo de moluscos dulceacuícolas de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 83: 289–298.
- FREELAND, J.R. 2005. *Molecular Ecology*. London: John Wiley & Sons Ltd.

- GAILLARD, M.C. & DE CASTELLANOS, Z.A. 1976. Mollusca, Gasteropoda, Hydrobiidae. En: Ringuelet, R.A. (Ed.). *Fauna de agua dulce de la República Argentina*. Fundación para la Educación, la Ciencia y la Cultura, Buenos Aires 15: 1–40.
- GOMI, T., SIDLE, R.C. & RICHARDSON, J.S. 2002. Understanding processes and downstream linkages of Headwater systems. *BioScience*, 52: 905–916.
- GUILLIOT, G., MORTIER, F., ESTOUP, A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5(3):712–715.
- GUTIÉRREZ-GREGORIC, D.E. 2008. Estudios morfoanatómicos y tendencias poblacionales en especies de la familia Chiliniidae Dall, 1870 (Mollusca: Gastropoda) en la Cuenca del Plata. Unpublished Thesis, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de La Plata, 174 pp.
- GUTIÉRREZ-GREGORIC, D.E. 2010. Redescription of two endemic species of Chiliniidae (Gastropoda: Basommatophora) from del Plata basin (South America). *Journal of Conchology*, 40: 321–332.
- GUTIÉRREZ-GREGORIC D.E. & RUMI, A. 2008. *Chilina iguazuensis* (Gastropoda: Chiliniidae), new species from Iguazú National Park, Argentina. *Malacologia*, 50(1): 321–330.
- GUTIÉRREZ-GREGORIC, D.E. & DE LUCÍA, M. 2016. Freshwater gastropods diversity hotspots: three new species from the Uruguay River (South America). *PeerJ* 4:e2138.
- GRANT, W.S. & BOWEN, B.W. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation. *Journal of Heredity*, 89 (5):415–26.
- 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.
- HARRY, W.H. 1964. The anatomy of *Chilina fluctuosa* Gray reexamined, with prolegomena on the phylogeny of the higher limnic Basommatophora (Gastropoda: Pulmonata). *Malacologia*, 1: 355–385.

- HAUSDORF, B. & HENNIG, C. 2003. Nestedness of north-west European land snail ranges as a consequence of differential immigration from Pleistocene glacial refuges. *Oecologia*, 135: 102–109.
- HEDRICK, P.W. 2011. *Genetics of populations*. 4th edition. Sudbury, Massachusetts: Jones and Bartlett Publishers, LLC.
- HEUSSER, C.J., HEUSSER, L.E. & LOWELL, T.V. 1999. Paleoecology of The Southern Chilean Lake District-Isla Grande de Chiloé during Middle-late Llanquihue Glaciation and Deglaciation. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*, 81:231–284.
- HEUSSER, C.J., LOWELL, T.V., HEUSSER, L.E., MOREIRA, A. & MOREIRA, S. 2000. Pollen sequence from the Chilean Lake District during the Llanquihue glaciation in marine oxygen isotopes stages 4–2. *Journal of Quaternary Science*, 15: 115–125.
- HEWITT, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 58: 247–276.
- HEWITT, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–914.
- HIGHTON, R. 1995. Speciation in eastern North American salamanders of the genus *Plethodon*. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 26: 576–600.
- HOLLIN, J.T. & SCHILLING, D.H. 1981. Late Wisconsin–Weichselian glaciers and small ice caps. En: Denton, G.H. & Hughes, T.J. (Eds.). *The Last Great Ice Sheets*. Wiley. New York. 179–220 pp.
- HULTON, N.R.J., SUGDEN, D.E., PAYNE, A. & CLAPPERTON, C.M. 1994. Glacier modeling and the climate of Patagonia during the Last Glacial Maximum. *Quaternary Research*, 42: 1–19.
- 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 Science Reviews*, 21: 233–241.
- IHAKA, R. & GENTLEMAN, R. 1996. R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5, 299–314.

- ITUARTE, C.F. 1997. *Chilina megastoma* Hylton Scott, 1958 (Pulmonata: Basommatophora): a study on topotypic specimens. *American Malacological Bulletin*, 14(1) :9–15.
- JAKOBSSON, M. & ROSENBERG, N.A. 2007. Clumpp: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23: 1801–1806.
- JARA, C. 1996. Taxonomía, sistemática y zoogeografía de las especies chilenas del género *Aegla* (Crustacea: Decapoda: Anomura: Aeglidae). Tesis, Escuela de Graduados, Universidad de Concepción, 180 pp.
- JONES, M.T., VOSS, S.R., PTACEK, M.B., WEISROCK, D.W. & TONKYN, D.W. 2006. River drainages and phylogeography: an evolutionary significant lineage of shovel-nosed salamander (*Desmognathus marmoratus*) in the southern Appalachians. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 38: 280–287.
- JÖRGER, K.M., STÖGER, I., KANO, Y., FUKUDA, H., KNEBELSBERBER, T. & SCHRÖDL, M. 2010. On the origin of Acochlidia and other enigmatic euthyneuran gastropods, with implications for the systematics of Heterobranchia. *BMC Evolutionary Biology*. 10(323): 1–20.
- KEPPEL, G., VAN NIEL, K.P., WARDELL-JOHNSON, G.W., YATES, C.J., BYRNE, M., MUCINA, L. & FRANKLIN, S.E. 2012. Refugia: identifying and understanding safe havens for biodiversity under climate change. *Global Ecology and Biogeography*, 21(4), 393–404.
- KIM, I., PHILLIPS, C.J., MONJEAU, J.A., BURNEY, C., NOACK, K, PUMO, D.E., SIKES, R.S. & DOLE, J.A. 1998. Habitat islands, genetic diversity, and gene flow in a Patagonian rodent. *Molecular Ecology*, 7: 667–678.
- KLUSSMANN-KOLB, A., DINAPOLI, A., KUHN, K., STREIT, B. & ALBRECHT, C. 2008. From sea to land and beyond - new insights into the evolution of euthyneuran Gastropoda (Mollusca). *BioMed Central Evolutionary Biology* 8: 57.
- LANZER, R. 1997. *Chilina* (Basommatophora; Chiliniidae) nas lagoas costeiras do Rio Grande do Sul, Brasil: concha, rádula, habitat e distribuicao. *Iheringia*, 82: 93–106.

- LARKIN, M.A., BLACKSHIELDS, G., BROWN, N.P., CHENNA, R., MCGETTIGAN, P.A., MCWILLIAM, H., VALENTIN, F., WALLACE, I.M., WILM, A., LOPEZ, R., THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J. & HIGGINS, D.G. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.
- LEAVITT, S., MOREAU & C., LUMBSCH, H.T. 2015. The dynamic discipline of species delimitation: progress toward effectively recognizing species boundaries in natural populations. En: Upreti DK, Divakar PK, Shukla V, Bajpai R, editors. *Recent Advances in Lichenology: Springer India*; pp. 11–44.
- LUNDBERG, J.G., MARSHALL, L.G., GUERRERO, J., HORTON, B., MALABARBA, M.C.S.L. & WESSELINGH, F. 1998. The stage for Neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. En: Malabarba, L.R., Reis, R.E., Vari, R.P., Lucena, Z.M., Lucena, C.A.S. (Eds.). *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Edipucrs, Porto Alegre. 13–48 pp.
- LYNCH, M. & MILLIGAN, B.G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology*, 3: 91–99.
- MARSHALL, W.B. 1933. New freshwater gastropod molluscs of the Genus *Chilina* of South America. *Proceeding of the United States National Museum*, 82(8): 1–7.
- MCCULLOCH, R.D., BENTLEY, M.J., PURVES, R.S., HULTON, N.R.J., SUGDEN, D.E. & CLAPPERTON, M. 2000. Climatic inferences from glacial and paleoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary Science*, 15: 409–417.
- MUELLNER, A.N., TREMETSBERGER, K., STUESSY, T. & BAEZA, C.M. 2005. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology*, 14: 203–212.
- NÄGELE, K.L. & HAUSDORF, B. 2015. Comparative phylogeography of land snail species in mountain refugia in the European Southern Alps. *Journal of Biogeography*, 42(5): 821–832.

- NAPOLITANO, C., JOHNSON, W.E., SANDERSON, J., O'BRIEN, S.J., HOELZEL, A.R., FREER, R., DUNSTONE, N., RITLAND, K., RITLAND, C.E. & POULIN, E. 2014. Phylogeography and population history of *Leopardus guigna*, the smallest American felid. *Conservation Genetics*, 15(3): 631–653.
- OLMOS, V. & GEORGE-NASCIMIENTO, 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 parasitados? *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 109–118.
- PALMA, R.E., RIVERA-MILLA, E., SALAZAR-BRAVO, J. TORRES-PÉREZ, F., PARDIÑAS, U.F.J., MARQUET, P.A, SPORTONO, A.E. & YATES, T.L. 2005. Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *Journal of Mammalogy*, 86: 191–200.
- PASTOR, A. 2013. Las capturas fluviales: Contextos, causas y consecuencias. Una explicación de los procesos de captura fluvial en distintos contextos geológicos. *Revista de Geografía Espacios*, 3(5): 27–41.
- PASTORINO, M.J. & GALLO, L.A. 2002. Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *Journal of Biogeography*, 29: 1167–1178.
- PEAKALL, R. & SMOUSE, P.E. 2012. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28(19): 2537–2539.
- PÉREZ-LOSADA, M., XU, J., JARA, C.G. & CRANDALL, K.A. 2011. Comparing phylogeographic patterns across the Patagonian Andes in two freshwater crabs of the genus *Aegla* (Decapoda: Aeglidae). En: Held C, Koenemann S, Schubart C.D. (Eds.). *Phylogeography and Population Genetics in Crustacea*. CRC Press, 291–303 pp.
- PILGER, T.J., GIDO, K.B. & PROPST, D.L., WHITNEY, J.E. & TURNER, T.F. 2017. River network architecture, genetic effective size, and distributional patterns predict differences in genetic structure across species in a dryland stream fish community. *Molecular Ecology* 26(10): 2687–2697.

- PILSBRY, H.A. 1911. Non-marine Mollusca of Patagonia. 1896–1899, 3, Zoology, Part V. Princeton University, USA, pp. 513–633.
- PLAM, M., JØRGENSEN, A., KRISTENSEN, T. K. & MADSEN, H. 2008. Sympatric *Biomphalaria* species (Gastropoda: Planorbidae) in Lake Albert, Uganda show homoplasies in Shell morphology. *African Zoology*, 43: 34–44.
- POLZIN, T. & DANESCHMAND, S.V. 2003. On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, 31: 12–20.
- PORTER, S.C. 1981. Pleistocene glaciation in the southern Lake District of Chile. *Quaternary Research*, 16: 263–292.
- POSADA, D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25: 1253–1256.
- PREMOLI, A.C., KITZBERGER, T. & VEBLEN, T.T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, 27: 251–260.
- PRITCHARD, J.K., STEPHENS, M. & DONNELLY, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- PROVAN, J. & BENNETT, K.D. 2008. Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology & Evolution*, 23: 564–571.
- RABASSA, J. & CLAPPERTON, C. 1990. Quaternary glaciations of the southern Andes. *Quaternary Science Reviews*, 9: 153–174.
- RAMÍREZ-SORIANO, A., RAMOS-ONSINS, S.E., ROZAS, J., CALAFELL, F. & NAVARRO, A. 2008. Statistical power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and bottlenecks with recombination. *Genetics*, 179:555–567.
- RAMOS, V.A. 1989. The birth of southern South America. *American Scientist*, 77: 444–450.
- ROGERS, A.R. & HARPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, 9: 552–69.

- ROHLING, R.J. FENTON, M., JORISSEN, F.J., BERTRAND, P., GANSEN, G. & CAULET, J.P. 1998. Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature*, 394: 162–165.
- RODRÍGUEZ-TRIBALDOS, V., WHITE, N.J., ROBERTS, G. & HOGGARD, M.J. 2017. *Spatial and temporal uplift history of South America from calibrated drainage analysis*, Geochemistry, Geophysics, Geosystems.
- RONQUIST, F. & HUELSENBECK, J.P. 2003. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19: 1572–1574.
- RUMI, A., GUTIÉRREZ, D.E., NÚÑEZ, V. & DARRIGRAN, G.A. 2008. Malacología latinoamericana. Moluscos de agua dulce de Argentina. *Revista de Biología Tropical*, 56: 77–111.
- RUZZANTE, D.E., WALDE, S.J., CUSSAC, V.E., DALEBOUT, M., SEIBERT, J., ORTUBAY, S. & HABIT, E. 2006. Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology*, 15: 2949–2968.
- RUZZANTE, D.E., WALDE, S.J., GOSSE, J.C. CUSSAC, V.E., HABIT, E., ZEMLAK, T. & ADAMS, E.D. 2008. Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology*, 17: 2234–2244.
- SCHILTHUIZEN, M. & LOMBAERTS, M. 1994. Population structure and levels of gene flow in the Mediterranean land snail *Albinaria corrugata* (Pulmonata: Clausilidae). *Evolution*, 48: 577–586.
- 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.
- SÉRSIC, A.N., COSACOV, A., COCUCCI, A.A., JOHNSON, L.A., POZNER, R., AVILA, L.J., SITES J.W.JR. & MORANDO, M. 2011. Emerging phylogeographic patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103:475–494.
- SIELFELD, W. 2001. Phylum Mollusca. Guías de Identificación. Universidad Arturo Prat, Iquique, Chile. 15 pp.

- SINGER, B.S., ACKERT, R.P. & GUILLOU, H. 2004. $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$ and K-Ar chronology of Pleistocene glaciations in Patagonia. *Geological Society of America Bulletin*, 116: 434–450.
- SMITH, M.F., KELT, D.A. & PATTON, J.L. 2001. Testing models of diversification in mice in the *Abrothrix olivaceus/xanthorhinus* complex in Chile and Argentina. *Molecular Ecology*, 10: 397–405.
- SOLTIS, D.E., GITZENDANNER, M.A., STRENGE, D.D. & SOLTIS, P.S. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution*, 206: 353–373.
- SOLTIS, D.E., MORRIS, A.B., MCLACHLAN, J.S., MANOS, P.S. & SOLTIS, P.S. 2006. Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*, 15: 4261–4293.
- SOWERBY, G.B. 1838. A descriptive catalogue of the species composing the genus *Chilina* of Gray. *Malacological & Conchological Magazine*: 51–54.
- SOWERBY, G.B. 1874. *Conchologia Iconica*. L. Reeve & Co., London. 19 pp.
- STRAHLER, A.N. & STRAHLER, A.H. 1994. *Geografía Física* (3ª ed.). Omega. Barcelona.
- STUARDO, J. 1961. Contribución a un catálogo de los moluscos chilenos de agua dulce. *Gayana, Zoología* 1: 7–32.
- SUGDEN, D.E., BENTLEY, M.J., FOGWILL, C.J., HULTON, N.R.J., MCCULLOCH, D. & PURVES, R.S. 2005. Late-glacial glacier events in southernmost South America: a blend of ‘northern’ and southern’ hemispheric climatic signals?, *Geografiska Annaler*, 87: 273–288.
- SVERDRUP, H.U., JOHNSON, M.W. & FLEMMING, R.H. 1942. *The oceans-their physics, chemistry, and general biology*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 317 pp.
- SWOFFORD, D.L. 2003. PAUP* 4b10. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Sinauer, Sunderland, MA.

- TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A.G. & COSSONS, 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, 585–95.
- VALDOVINOS, C. 1999. Biodiversidad de moluscos chilenos: Base de datos taxonómica y distribucional. *Gayana*, 63(2): 111–164.
- VALDOVINOS, C. 2006. Estado de conocimiento de los gastrópodos dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, 70(1): 88–95.
- VALDOVINOS, C., MOYA, C. & OLMOS, C. 2005. Moluscos terrestres y dulceacuícolas de la Cordillera de la Costa Chilena. En: Smith, C., Armesto, J. & Valdovinos, C. (Eds.). *Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile*. Editorial Universitaria, Chile, 292–306 pp.
- VALDOVINOS, C., KIESSLING, A., MARDONES, M., MOYA, C., OYANEDEL, A., SALVO, J., OLMOS, V. & PARRA, O. 2010. Distribución de macroinvertebrados (Plecoptera y Aeglididae) en ecosistemas fluviales de la Patagonia chilena: ¿Muestran señales biológicas de la evolución geomorfológica postglacial? *Revista Chilena de Historia Natural*, 83: 267–287.
- VERA-ESCALONA, I., D'ELÍA, G., GOUIN, N., FONTANELLA, F.M., MUÑOZ-MENDOZA, C., SITES, JR. J.W. & 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.
- VIDAL, M.A., MORENO, P.I. & POULIN, E. 2012. Genetic diversity and insular colonization of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaeminae) in north-western Patagonia. *Austral Ecology*, 37: 67–77.
- VIDAL, M.A., IBAÑEZ, S., MORENO, P. I. & POULIN, E. 2016. Phylogeography of a Patagonian lizard and frog: Congruent signature of southern glacial refuges. *Austral Ecology*, 41: 399–408.

- VON FRAUENFELD, G.R. 1865. *Zoologische miscellen. VII.* Bemerkungen über Assiminea und *Chilina* und einge paludinen. Verhandlungen der Zoologisch Botanischen Gesellschaft in Wien 16(1866): 185–199.
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., LEE, VDT, HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J. & KUIPER, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407–4414.
- VUILLEUMIER, B. 1971. Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, 173: 771–780.
- WILKE, T., SCHULTHEIB, R. & ALBRECHT, C. 2009. As time goes by: A simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates*. *American Malacological Bulletin*, 27: 25–45.
- WILLIS, K.J. & WHITTAKER, R.J. 2000. The refugial debate. *Science*, 287: 1406–1407.
- WINNEPENNICKX.B., BACKELAJU, T. & DE WACHTER, R. 1993. Extraction of high molecular weight DNA from molluscs, *Trends in Genetics*, 9: 407.
- XU, J., PEREZ-LOSADA, M., JARA, C.G. & CRANDALL, K.A. 2009. Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Molecular Ecology*, 18: 904–918.
- ZEMPLAK, T.S., HABIT, E.M., WALDE, S.J., BATTINI, M.A., ADAMS, E.D.M. & RUZZANTE, D.E. 2008. Across the southern Andes on fin: glacial refugia, drainage reversals and a secondary contact zone revealed by the phylogeographical signal of *Galaxias platei* in Patagonia. *Molecular Ecology*, 17: 5049–5061.
- ZEMPLAK, T.S., HABIT, E., WALDE, S.J., CARREA, C. & RUZZANTE, D. 2010. Surviving historical Patagonian landscapes and climate: molecular insights from *Galaxias maculatus*. *BMC Evolutionary Biology*, 10: 67.