

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**Estudio sistemático de los complejos de  
lagartijas patagónicas *Liolaemus elongatus*  
y *L. kriegi* (Squamata: *Liolaemus*)**

por

**Lic. Cintia Débora Medina**

**Director/a: Dra. Mariana Morando**

**Centro Nacional Patagónico – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y  
Técnicas (CENPAT - CONICET)**

**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICAS Y NATURALES**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**

**Córdoba, Argentina**

**2015**

## **COMISIÓN ASESORA**

Dra. Cristina Noemí Gardenal, Universidad Nacional de Córdoba

Dr. Adolfo Martino, Universidad Nacional de Río Cuarto

Dra. Mariana Morando, Centro Nacional Patagónico-CONICET

## **DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

Lugar y Fecha:

Calificación:

### **TRIBUNAL**

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

**A mi abuela Aida**

## *Agradecimientos*

A mi directora Mariana Morando por aceptar ser mi directora y guiarme a lo largo de estos años. A mi co-director Luciano Avila por acompañarme al campo a juntar material y asesorarme en la identificación de muchos individuos.

A la Dra. Noemí Gardenal y al Dr. Adolfo Martino por haber aceptado ser parte de mi comisión asesora y haber participado de la elaboración de esta tesis.

Al tribunal Dra. Noemí Gardenal, Dr. Adolfo Martino y Cristián Simón Abdala. En particular a la Dra. Gardenal por dedicar varias horas en mejorar esta tesis.

A mi mamá Inés por estar todos los días, por escucharme, y apoyarme. A mis hermanos Verena y Sebastián por ser parte de mi vida y por los sobrinos hermosos que me dieron, Valentín, Bautista y Agustín.

A mi abuela Aida por ser un ejemplo de mujer, por su fortaleza y su positivismo ante todo. A mis tíos, Yoly y Roberto y a mi prima Evangelina.

A mis amigos Pablo y Cristian, por el apoyo y el compañerismo a través de los años. A mi amiga Celeste por recorrer gran parte del camino conmigo y por aconsejarme siempre.

A mis amigas Eva, Carla, Carmen, Gise, Lucía y Magda. Gracias por todo!

A mis compañeros del Grupo de Herpetología Patagónica Andrea Marín, Cristian Pérez, Florencia Breitman, Ignacio Minoli, Lorena Martínez, Melisa Olave, Natalia Feltrin y Paula Escudero. Especialmente a Florencia por tantas consultas resueltas y tantos manuscritos leídos.

A los profesores de curso que realicé estos años. A Fernando Jaguar por encargarse de mi computadora y “salvarme las papas” tantas tantas veces. A los chicos de la secretaria de Doctorado de la Universidad de Córdoba, Lourdes, Julio, Ivana, Victoria y Eugenia. Al Dr. Jack Sites por haberme recibido en más de una oportunidad. A todos aquellos que de una u otra manera llegaron a leer algunos de mis trabajos, revisándolos y corrigiéndolos, gracias por los aportes para lograr mejorarlo todo. Todos ellos hicieron de este camino algo más liviano y placentero.

Al CONICET por brindarme la beca doctoral, al CENPAT por permitirme realizar el doctorado en sus instalaciones.

Agradezco a D. Janish Alvarez, M. Magnanelli, C. Navarro, D. Pérez, J.C. Acosta, T. Avila, K. Dittmar, M. Hawkins, L. Morando, M. Nicola, R. Otteson, y S. Quiroga por su asistencia en el campo y en el procesado del material. Así como a todo el Grupo de Herpetología Patagónica.

A los que creyeron en mí, los que me apoyaron y los que me dejaron ser.

## *Listado de publicaciones derivadas de la tesis*

### Artículos

7- Avila, L.J., **Medina, C.D.**, Pérez, C.H.F., Sites, Jr., J.W. & Morando, M. Molecular phylogenetic relationships of the *Liolaemus elongatus* clade (Iguania: Liolaemini) and a new species of lizard from an isolated volcanic peak in northern Patagonia. Aceptado. *Zootaxa*

6- **Medina, C.D.**, Avila, L.J. Sites, Jr., J.W. & Morando, M. Molecular phylogeny of the *Liolaemus kriegi* complex (Iguania, Liolaemini). Aceptado. *Herpetologica*

5- **Medina, C.D.**, Avila, L.J. Sites, Jr. J.W. & Morando, M. 2014. Multilocus phylogeography of the *Liolaemus kriegi* complex (Iguania, Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society* 113 (1) 256–269

4- Morando, M., **Medina, C.D.**, Avila, L.J., Pérez, C.H.F., Dawson, A. & Sites, Jr., J.W. 2014. Molecular phylogeny of the New World gecko genus *Homonota* (Squamata: Phyllodactylidae). *Zoologica Scripta* 43 (3) 249–260

3- Breitman, M.F., Minoli, I., Avila, L.J., **Medina, C.D.**, Sites, Jr., J.W. & Morando, M. 2014. Lagartijas de la provincia de Santa Cruz, Argentina: distribución geográfica, diversidad genética y estado de conservación. *Cuadernos de Herpetología* 28 (2): 00–00

2- **Medina, C.D.**, Avila, L.J. & Morando, M. 2013. Análisis morfológico de *Liolaemus buergeri* Werner 1904 (Iguania: Liolaemini). *Cuadernos de Herpetología* 27 (1) 27–34.

1- Avila, L.J., Pérez, C.H.F. **Medina, C.D.** Sites, Jr., J.W. & Morando, M. 2012. A new species of lizard of the *Liolaemus elongatus* clade (Reptilia: Iguania: Liolaemini) from Curi Leuvu River Valley, northern Patagonia, Neuquén, Argentina. *Zootaxa* 3325: 37–52.

### Notas

4- Minoli, I., **Medina, C.D.**, Frutos, N., Morando, M. & Avila, L.J. 2013. A revised geographical range for *Liolaemus elongatus* Koslowsky, 1896 (Squamata: Liolaemini) in Argentina: review of reported and new-data based distribution with new localities. *Acta Herpetologica* 8(2): 159–162.

3- Avila, L.J., **Medina, C.D.** & Morando, M. 2013. *Liolaemus koslowskyi*. Scoliosis and kyphosis. *Herpetological Review* 44(1): 144–145.

2- Avila, L.J., Pérez, C.H.F. & **Medina, C.D.** 2012. *Liolaemus cf. elongatus*. Trauma Survival. *Herpetological Review* 43 (2): 334–335.

1- Pérez, C.H.F., **Medina, C.D.** & Avila, L.J. 2012. *Clelia rustica* (Jan, 1863) (Serpentes: Dipsadidae): Distribution extensión. *Check List* 8(4): 796–797.

# Índice

Resumen.....	1
Summary.....	2
Introducción General .....	3
Objetivo .....	14
Capítulo I.....	15
Filogeografía Multilocus del Complejo de Lagartijas Patagónicas <i>Liolaemus kriegi</i> (Iguania: Liolaemini).....	15
Introducción.....	16
Materiales y Métodos.....	18
Individuos Utilizados .....	18
Extracción de ADN, Amplificación y Secuenciamiento.....	18
Análisis de Árboles de Genes y Redes.....	20
Análisis Filogeográficos.....	21
Análisis Demográficos .....	21
Resultados.....	23
Análisis de Árboles de Genes y Redes.....	23
Análisis Filogeográficos.....	26
Análisis Demográficos .....	27
Discusión .....	29
Historia Filogeográfica.....	29
Implicancias Taxonómicas.....	31
Capítulo II.....	35
Análisis Morfológico del Complejo <i>Liolaemus kriegi</i> (Iguania: Liolaemini).....	35
Introducción.....	36
Materiales y Métodos.....	38



Área de Estudio .....	38
Individuos Utilizados .....	38
Análisis Estadísticos .....	39
Resultados .....	41
Discusión .....	50
Capítulo III .....	53
Filogeografía Multilocus del Complejo de Lagartijas Patagónicas <i>Liolaemus elongatus</i> (Iguania: Liolaemini) .....	53
Introducción .....	54
Materiales y Métodos.....	56
Individuos Utilizados .....	56
Extracción de DNA, Amplificación y Secuenciamiento.....	56
Análisis de Árboles de Genes y Redes.....	58
Análisis Filogeográficos.....	59
Análisis Demográficos .....	59
Resultados.....	61
Análisis de Árboles de Genes y Redes.....	61
Análisis Filogeográficos.....	66
Análisis Demográficos .....	67
Discusión .....	71
Historia Filogeográfica.....	71
Implicancias Taxonómicas.....	77
Capítulo IV .....	79
Análisis Morfológico del Complejo <i>Liolaemus elongatus</i> (Iguania: Liolaemini).....	79
Introducción .....	80
Materiales y Métodos.....	81

Área de Estudio .....	81
Individuos Utilizados .....	81
Análisis Morfológicos .....	81
Análisis Estadísticos .....	82
Resultados .....	84
Discusión .....	92
Capítulo V .....	100
Filogenia Molecular del Grupo de Lagartijas <i>Liolaemus elongatus-kriegi</i> en Base a dos Marcadores Mitocondriales y cinco Nucleares (Iguania, Liolaemini) .....	100
Introducción .....	101
Materiales y Métodos.....	103
Individuos Utilizados .....	103
Genes Utilizados .....	103
Extracción de DNA, Amplificación y Secuenciamiento.....	104
Análisis Filogenéticos .....	104
Resultados.....	112
Análisis Filogenéticos .....	112
Discusión .....	118
Análisis Filogenéticos .....	118
Implicancias Taxonómicas.....	120
Conclusiones Finales .....	123
Bibliografía .....	126
Apéndice I: Muestreo de especímenes – capítulo I .....	139
Apéndice II: Resultados del análisis de SAMOVA –.....	144
capítulo I .....	144
Apéndice III: Resultado del análisis de BSP – capítulo I.....	145

Apéndice IV: Resultado de la red concatenada de genes mitocondriales – capítulo I	147
Apéndice V: Resultado de la filogenia de genes nucleares concatenados – capítulo I	148
Apéndice VI: Muestreo de especímenes – capítulo III.....	149
Apéndice VII: Resultado del análisis de BSP – capítulo III.....	159
Apéndice VIII: Resultado de la red concatenada de genes mitocondriales – capítulo III .....	162
Apéndice IX: Resultado de la filogenia de genes nucleares concatenados – capítulo III .....	163
Apéndice XI: Muestreo de Especímenes .....	164
Apéndice X – Árboles de Genes .....	170

## *RESUMEN*

*Liolaemus* es el género de vertebrados con más número de especies de América del Sur austral. Dentro de *Liolaemus* se reconocen dos grandes subgéneros, *Eulaemus* y *Liolaemus sensu stricto* (SE). Dentro del subgénero *Liolaemus* (SE), denominado también grupo *L. chiliensis*, se han reconocido varios grupos y complejos de especies, uno de los cuales es el grupo *L. elongatus-kriegi* definido en base a caracteres morfológicos. Posteriormente utilizando marcadores moleculares, se diferenciaron tres complejos dentro de este grupo: *L. elongatus*, *L. kriegi* y *L. petrophilus*. El conocimiento del estatus taxonómico de las especies que componen estos complejos es aún limitado y no se ha propuesto una filogenia robusta con marcadores mitocondriales y nucleares que incluya individuos de estos complejos y complejos cercanos con situación taxonómica irresuelta.

El objetivo planteado para esta tesis es estudiar la diversidad y relaciones filogenéticas de los complejos de especies de lagartijas *Liolaemus elongatus* y *L. kriegi*, estudiando en detalle los procesos evolutivos subyacentes. El abordaje metodológico de este trabajo ejemplifica la aproximación conceptual y metodológica de la taxonomía integral, en este caso, combinando tres fuentes de evidencia independientes: morfología (morfometría clásica) y secuencias de ADN (mitocondrial y nuclear).

## SUMMARY

*Liolaemus* is the vertebrate genus with the highest species number of southern South America. Within *Liolaemus* two subgenera are recognized, *Liolaemus sensu strict* (SE) and *Eulaemus*. Within the *Liolaemus* (SE) subgenus, also referred to as *L. chiliensis* group, several groups and species complexes have been recognized, one of which is the *L. elongatus-kriegi* group that was defined based on morphological characteristics. Subsequently using molecular markers, three complexes were distinguished within this group: *L. elongatus*, *L. kriegi* and *L. petrophilus*. Knowledge of the taxonomic status of the species in these three species complexes is still limited, and there is not available a supported phylogeny with mitochondrial and nuclear markers including individuals of these and related complexes with unresolved taxonomic status.

The main goal for this thesis is to study the diversity and phylogenetic relationships of the lizard species complexes *Liolaemus elongatus* and *L. kriegi*, studying in detail the underlying evolutionary processes. The methodological approach of this work exemplifies the conceptual and methodological approach of integrative taxonomy, in this case, combining three independent sources of evidence: morphology (morphometrics) and DNA sequences (mitochondrial and nuclear).

## INTRODUCCIÓN GENERAL

Los biólogos interesados en conservación y macroecología, han mostrado preocupación por la “inflación taxonómica” que se ha generado a partir de estudios sistemáticos (Isaac *et al.*, 2004), donde se diagnostican especies nuevas basadas solamente en algún marcador molecular, frecuentemente secuencias de ADN mitocondrial. A partir de esto, se ha comenzado a proponer de manera más enfática una aproximación que se ha denominando taxonomía integral (e.g. Meiri y Mace, 2007; Padial y De la Riva, 2007). Varias propuestas explícitas se han publicado con el interés en una taxonomía integral (e.g. Alström *et al.*, 2008; Lanzone *et al.*, 2007; Roe y Sperling, 2007; Vieites *et al.*, 2009). Dayrat (2005) propone considerar a las especies como hipótesis, ya que esta conceptualización está fundada en el concepto general de especie que la considera como un linaje de poblaciones (o metapoblaciones) que divergieron separadamente de otros linajes (de Queiroz, 2005). Concebida así, la especie es una categoría de organización biológica en lugar de un rango, y la única propiedad suficiente y necesaria de una especie, es que represente un fragmento evolucionando separadamente de un linaje metapoblacional. Los atributos de las especies utilizados por algunos conceptos para definirlos (monofilia, diagnosticabilidad, potencial de apareamiento, etc.), son propiedades que dependen de la historia evolutiva de un linaje en particular (de Queiroz, 2007) y que nos brindan evidencia acerca de ella. Bajo este concepto, la especie es la única categoría biológica por encima del organismo y la especiación es un proceso de división de linajes; los diferentes caracteres/atributos no se espera que difieran de manera predecible en la mayoría de los casos. Esto se corresponde a una visión de las especies como linajes evolutivos y dentro de este marco es esperable que haya incongruencias entre diferentes líneas de evidencia, por la naturaleza misma de la evolución de diferentes tipos de atributos (Adams *et al.*, 2009).

Desde la genética de poblaciones (e.g. Knowles y Carstens, 2007; Riddle *et al.*, 2008; Templeton, 2001), la filogenética (Edwards y Bensch, 2009) y la ecología (Bond y Stockman, 2008) se han desarrollado teoría y métodos que pueden integrar información a este marco conceptual. Para la taxonomía integral, cuando se nombran especies nuevas, los taxónomos deben presentar diferentes líneas de evidencia para apoyar la hipótesis de que una población está evolucionando independientemente. Por lo tanto, la taxonomía integral rompe el círculo que considera que algunos caracteres son mejores que otros. Cualquier tipo de carácter es igualmente útil y puede ser utilizado para proponer hipótesis de especies. Al integrar diferentes tipos de evidencia, los análisis empíricos, nos permiten

reforzar, rechazar o reconciliar hipótesis, haciendo que la taxonomía sea una actividad científica más confiable. Los taxa de especies avaladas por varias líneas independientes de evidencia y caracteres coincidentes de diversa clase, se pueden considerar hipótesis estables. La taxonomía integral es un nuevo marco conceptual en el cual las especies son hipótesis, y grupos de caracteres independientes se utilizan para construir hipótesis estables de especies (Padial y De La Riva, 2009). Cuando líneas de evidencia diferentes muestran congruencia con respecto a la diferenciación de un linaje de otros, la evidencia de que se trata de una nueva especie es sólida; en casos de incongruencia, la geografía o la selección de hábitat pueden dar evidencia sobre el grado de divergencia de los linajes.

La variación en la historia evolutiva de las especies puede producir varios tipos de incongruencias. Por ejemplo, bajo una fuerte presión de selección natural o sexual, puede haber altas tasas de divergencia morfológicas para ciertos caracteres, entre poblaciones parapátricas que ocupan hábitats diferentes, sin que ello signifique interrupción de flujo génico. Además, algunas especies tienen tasa alta de cambio mientras que otras no (Bromham, 2009; Cooper y Purvis, 2009). Por ejemplo, se mostró que especies aceptadas anteriormente no son necesariamente monofiléticas (Funk y Omland, 2003) y diferentes marcadores moleculares (e.g. genes mitocondriales vs. nucleares) no eran congruentes en los resultados en varios grupos de organismos (revisados en Vogler y Monaghan, 2007). Aunque algunos biólogos se inclinan hacia métodos moleculares para definir límites de especies (e.g. Blaxter, 2003; Hebert *et al.*, 2003), otros se inclinan por una aproximación integral que incluya diferentes líneas independientes de evidencia para apoyar hipótesis de especies más estables (Dayrat, 2005; Will *et al.*, 2005).

En un trabajo reciente de Vieites *et al.* (2009), las diferentes especies candidatas se clasifican en función del grado de concordancia de varias líneas de evidencia: especies candidatas confirmadas, especies no confirmadas o linajes de división profunda. Entre especies/poblaciones cercanamente relacionadas, los patrones de incongruencia se vuelven interesantes en sí mismos, ya que pueden brindar evidencia de procesos evolutivos que originaron y mantienen esos linajes (Knowles y Carstens, 2007; Moritz, 1994; Moritz *et al.*, 1995; Templeton, 2001). Para estudiar procesos, los datos de secuencias y teoría de coalescencia pueden brindar información muy útil, sobre todo cuando se los combina con información de otras fuentes de evidencia al momento de hacer un análisis integrador y poner a prueba hipótesis de especies. Una hipótesis corroborada requiere múltiples líneas

de evidencia concordantes con los patrones de variación observada y para mayor respaldo, demostrar estadísticamente que esta coincidencia no surgió al azar.

*Liolaemus* es el género de vertebrados con más número de especies de América del Sur austral. Se distribuye en una amplia región geográfica ocupando latitudes desde los 13° S (Aguilar *et al.*, 2013) hasta los 52° S (Abdala *et al.*, 2014; Bottari, 1976; Cei, 1986), altitudes desde los 0 msnm hasta más de 5000 m (Aparicio y Ocampo, 2010) y regiones climáticas muy variadas que van desde el desierto más árido del mundo, el Desierto de Atacama en Chile, hasta el bosque húmedo de *Nothofagus* en la región andino-patagónica. Dentro de *Liolaemus* se reconocen dos grandes subgéneros, *Eulaemus* y *Liolaemus* (SE) (Etheridge, 1995; Laurent, 1983; Schulte II *et al.*, 2000). Dentro del subgénero mencionado como *Liolaemus* (SE), denominado también como grupo *L. chiliensis*, se han reconocido varios grupos y complejos de especies, uno de los cuales es el grupo *L. elongatus-kriegi* definido con este nombre por primera vez por Cei (1979) en base a caracteres morfológicos. Posteriormente utilizando marcadores moleculares, Morando *et al.* (2003) diferenciaron tres complejos dentro de este grupo: *L. elongatus*, *L. kriegi* y *L. petrophilus* (también avalados posteriormente por Avila *et al.*[2012]); otros autores (Lobo *et al.*, 2010) reconocen el grupo *L. kriegi* y el grupo *L. elongatus* (= complejos *L. elongatus* + *L. petrophilus sensu* Morando *et al.*[2003]). El grupo más inclusivo *L. elongatus-kriegi* comprende actualmente 22 especies distribuidas en la región Patagónica y noroeste de Argentina, mientras que los límites generales de los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi* estudiados en esta tesis, están establecidos por las cuencas de los ríos Atuel al norte y Deseado al sur (Figura 1) siguiendo la hipótesis de Morando *et al.* (2003).

La historia taxonómica del grupo *L. elongatus-kriegi* comienza con la descripción de la especie que da nombre al mismo, *Liolaemus elongatus* Koslowsky 1896 (Figura 2a). Koslowsky al describir la especie no fijó material tipo ni tampoco una localidad precisa para los estándares actuales, sino que se refirió a la misma como “en el territorio del Chubut cerca de las Cordilleras (oeste de Chubut), donde vive en las grietas de las rocas”. Recién en 2006 Ferraro y Williams fijaron como sintipos tres ejemplares sobrevivientes de la descripción en que se basó Koslowsky, la cual fue hecha sobre 51 ejemplares de Chubut y Neuquén, muchos de los cuales ya no se encuentran en la colección. En 1907 Werner describió a *L. buergeri* (Figura 2b) con localidad tipo en el Planchón de la Cordillera de Curicó en Chile y en 1939 Müller y Hellmich describieron a *L. kriegi* para la localidad de Estancia el Cóndor, cerca de Bariloche (Figura 2c). *Liolaemus ceii* fue descrita en 1971



por Donoso Barros y Cei (Figura 2d) para la localidad de Pampa de Lonco Luan, ese año los mismos autores reconocieron para la meseta de Somuncurá la subespecie *L. elongatus petrophilus*, que aparentemente se encontraba con una distribución geográfica muy restringida.

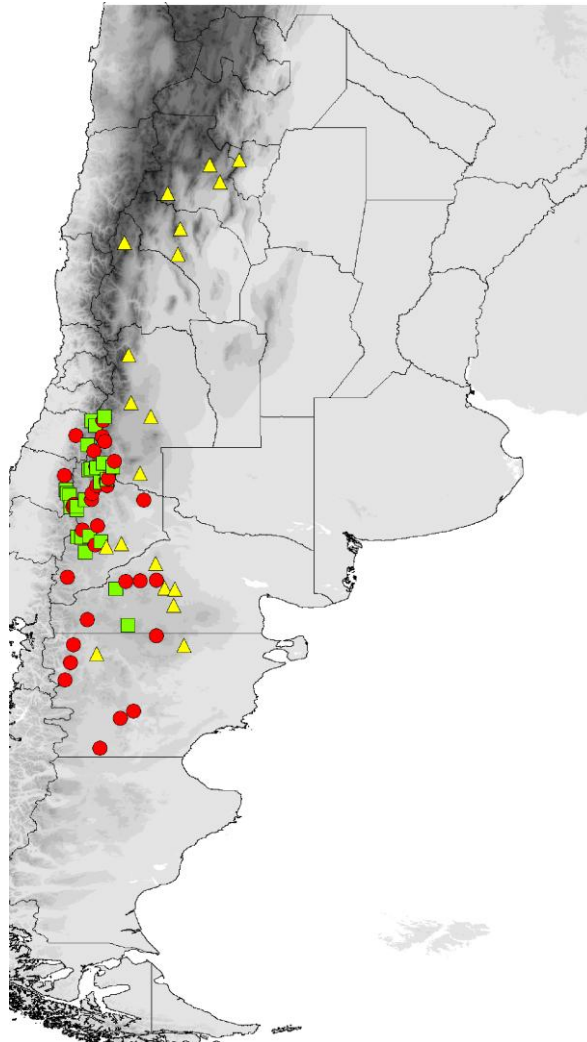


Figura 1.—Mapa mostrando las distribuciones estimativas del grupo *Liolaemus elongatus-kriegi*. Círculos rojos complejo *L. elongatus*, cuadrados verdes complejo *L. kriegi* y triángulos amarillos complejo *L. petrophilus*.

Cei (1974) realizó la primera revisión detallada de lo que se consideraba entonces como una sola especie, *L. elongatus*, con una gran distribución geográfica pero con una serie de poblaciones con cierto grado de diferenciación geográfica, hasta ahora con sólo una reconocida como subespecie. Este primer estudio, utilizando caracteres morfológicos y serológicos analizados dentro de un contexto geográfico, reconoció que la especie nominal incluía no sólo dos subespecies dentro de *L. elongatus* sino que también incluía a una nueva especie en el Sur de Mendoza, *L. austromendocinus* (Cei, 1974).



Figura 2: Fotos de individuos pertenecientes a los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi*: a) *L. elongatus*, b) *L. buergeri*, c) *L. kriegi*, d) *L. ceii*, e) *L. smaug*, f) *L. sp. 6*, g) *L. sp. 7* y h) *L. sp. A*.

Posteriormente Ceï y Avila (1998) cambiaron el estatus subespecífico de *L. petrophilus* y la reconocieron como una especie diferente dentro del grupo *L. elongatus-kriegi*. Ceï (1974) reconocía para ese entonces a *L. elongatus* como un complejo de poblaciones cordilleranas y extracordilleranas que mostraba una clina latitudinal evidente desde el sur hacia el norte, con una disminución del tamaño en largo e incremento de mínima diferencia entre las escamas vertebrales y laterales, entre otros caracteres



morfológicos variables desde Chubut hasta Mendoza. Para ese estadio de conocimiento, la especie se distribuía desde el sur de Chubut hasta San Juan. El año siguiente Cei (1975) extendió el estudio, e incorporó datos serológicos del complejo *L. kriegi* y encontró que este grupo estaba íntimamente relacionado con el complejo *L. elongatus*.

En el año 1979 Hulse describió a *L. capillitas* en base a caracteres morfológicos, (como todas las especies anteriores), para la localidad de Capillitas en la provincia de Catamarca y la consideró como perteneciente al grupo *L. elongatus-kriegi*. En el año 1985 Nuñez y Labra Lillo describieron a *Liolaemus curis* de la localidad Termas del Flaco en la plataforma sur del Río Tinguiririca en Chile; aunque no realizaron análisis morfológicos formales los autores mencionan en base a observaciones personales que si bien *L. curis* es similar a *L. buergeri* (que tiene localidad tipo a 20 km), otros aspectos morfológicos indicaban que *L. curis* podría ser una subespecie de *L. altissimus* (ahora considerada *L. bellii* por Schulte II *et al.*[2000]). Además en el trabajo de revisión de Lobo *et al.*(2010), *L. curis* está incluida dentro del grupo *L. bellii* junto a *L. bellii*, *L. fitzgeraldi* y *L. moradoensis*, por lo que actualmente, aunque no se ha realizado un estudio detallado de *L. curis*, no hay evidencia para considerarla como parte del grupo *L. elongatus-kriegi*.

Nuñez *et al.*(1991) describieron a *L. cristiani* y la asociaron al grupo *L. kriegi*, aunque posteriormente Videla y Cei(1996) la consideraron parte del grupo *L. neuquensis*. En un trabajo filogenético, Lobo (2001) encontró, en base a caracteres morfológicos, una relación estrecha entre *L. cristiani* y *L. capillitas*, mientras que en una filogenia posterior (Lobo, 2005) encontró a *L. cristiani* relacionada al grupo *L. kriegi*, por lo que en la revisión de Lobo *et al.*(2010) se la ubica dentro del grupo *L. elongatus*. Pero por otro lado Cei y Videla (2003) en el trabajo donde describieron *L. flavipiceus* reconocieron dentro del grupo *L. neuquensis* (que es un grupo separado del grupo *L. elongatus*) a *L. cristiani*, *L. thermarum*, *L. flavipiceus*, *L. coeruleus* y *L. neuquensis*; estas dos últimas asignadas al grupo *L. pictus* junto con otros taxa por Lobo *et al.*(2010). De esta manera en la actualidad estudios de diferentes autores que utilizaron caracteres morfológicos, no son congruentes acerca de la afinidad taxonómica de *L. cristiani*. Por lo tanto, en los libros publicados por Cei (1986, 1993) en base a su gran experiencia taxonómica (sin realizar análisis filogenéticos o estadísticos formales), se consideraba un “grupo natural” a *L. austromendocinus*, *L. elongatus elongatus*, *L. elongatus petrophilus* y *L. capillitas* pero separado de otro “grupo natural” conformado por *L. kriegi*, *L. ceii* y *L. buergeri*.



Figura 3: Fotos de individuos pertenecientes a los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi*: a) *L. sp. C*, b) *L. tregenzai*, c) *L. chillanensis*, d) *L. antumalguen*, e) *L. shitan*, f) *L. burmeisteri*, g) *L. choique* y h) *L. sp. B*.

En el año 1996, Videla y Cei describieron *L. thermarum* para la localidad Baños del Azufre en la provincia de Mendoza, basándose principalmente en la presencia/ausencia de poros precloacales en comparación con otras especies del “grupo *chiliensis (sensu lato)*”. Espinoza *et al.* (2000) utilizaron muestras de una localidad diferente a la localidad tipo, que

las adjudicaron a *L. thermarum* (Laguna Niña Encantada, cerca de Las Leñas, Mendoza) para reconocer esta especie como parte del grupo *L. elongatus-kriegi*, aunque Videla y Cei (2003) señalaron que esa muestra no pertenece a *L. thermarum*. Las poblaciones estudiadas por Espinoza *et al.*(2000) se corresponden con la *L. sp. 5* de Morando *et al.*(2003), posteriormente descrita por Abdala *et al.*(2010) como *L. smaug* (Figura 2e). Por lo tanto en la actualidad también se desconoce cuál es la afinidad taxonómica de *L. thermarum*.

En el año 2000, se describió una especie nueva perteneciente al grupo *Liolaemus elongatus-kriegi*: *L. heliodermis*, de Tafí del Valle en Tucumán (Espinoza *et al.*, 2000), en base a tres individuos comparados con otras especies con caracteres morfológicos y patrones de coloración. Si bien estos análisis incluyeron a las especies consideradas hasta el momento como parte de este grupo, el diagnóstico se basó en cinco individuos de cada especie, sin análisis estadísticos; además no se presentó una sinapomorfía que pudiera definir formalmente al grupo *L. elongatus-kriegi*. En este trabajo los autores propusieron que el grupo *L. elongatus-kriegi* comprende no sólo a *L. elongatus*, *L. petrophilus*, *L. austromendocinus*, *L. capillitas* y *L. heliodermis*, sino también a *L. thermarum* (ver más arriba).

Morando *et al.*(2003), realizaron el primer análisis de secuencias de fragmentos de genes mitocondriales de individuos de casi todas las especies (excepto *L. heliodermis*) consideradas dentro del grupo *L. elongatus-kriegi*, y reconocieron tres complejos dentro del mismo: complejo *L. elongatus*, complejo *L. petrophilus*, complejo *L. kriegi*, y dentro de cada uno de ellos encontraron poblaciones de distintas ubicaciones geográficas con suficientes diferencias genéticas como para hipotetizar especies candidatas (Morando *et al.*, 2003). En este estudio se encontró que la especie *L. elongatus* (en sentido amplio), que incluía diversas poblaciones distribuidas desde el suroeste de Chubut hasta sur de Mendoza, conformaban varios haploclados relacionados con altos valores de soporte (*L. sp. 5*, *L. sp. 6* (Figura 2f), *L. sp. 7* (Figura 2g) y la propiamente llamada *L. elongatus*). Este trabajo propuso que las muestras pertenecientes a las poblaciones geográficamente ubicadas al sur del Río Agrio en la provincia de Neuquén, se podían asignar a la especie tipo, *L. elongatus* Koslowsky (1896). El complejo hermano de *L. elongatus* fue el complejo *L. kriegi*, y dentro de éste no se detectaron diferencias entre las especies *L. ceii* y *L. kriegi* que tienen una distribución principalmente simpátrica, y propusieron que podrían ser conespecíficas; además hipotetizaron tres especies candidatas relacionadas a *L. buergeri* (*L. sp. A* (Figura 2h), *L. sp. B* (Figura 3h), *L. sp. C* (Figura 3a), *L. sp. 8* (Figura

3b), ésta última posteriormente descrita como *L. tregenzai* (Pincheira-Donoso y Scolaro, 2007). Avila *et al.* (2004) utilizaron tres marcadores mitocondriales y dos nucleares y los resultados apoyaron la monofilia en estos tres complejos propuestos; sin embargo en los análisis filogenéticos realizados por Lobo (2005) en base a 83 caracteres morfológicos solo encontró evidencia para la monofilia del complejo *L. kriegi*.

En los últimos años, los trabajos de exploración de regiones anteriormente no estudiadas y las revisiones de ejemplares de museos, sumados a estudios taxonómicos y de revisión utilizando tanto caracteres morfológicos como moleculares, se reflejan en la descripción de varias especies nuevas y en el reconocimiento de otras ya descritas como pertenecientes al grupo *L. elongatus-kriegi*. Hasta el momento se han descrito varias especies nuevas como parte del grupo *L. elongatus-kriegi* y para algunas se menciona a cuál complejo dentro del grupo pertenecerían; en algunos casos, las descripciones se realizaron en base a una diagnosis morfológica clásica (e.g. Quinteros *et al.*, 2008), en otros se incluyeron árboles de genes, en general solo mitocondriales (e.g. Avila *et al.*, 2012) pero en otros casos también nucleares (e.g. Avila *et al.*, 2004). Por lo tanto las descripciones de estas especies durante la última década presentaron diferentes niveles de evidencia. A continuación se resumen brevemente en forma cronológica las especies que se fueron incorporando al grupo *L. elongatus-kriegi*.

Espinoza y Lobo (2003) describieron a *L. umbrifer* del departamento de Antofagasta, Catamarca y a *L. dicktracyi* del departamento de Famatina, La Rioja. En el mismo año Cei y Videla (2003) describieron a *L. flavipiceus* del departamento de Malargüe, provincia de Mendoza y la relacionaron con *L. thermarum* y al grupo “*neuquensis*” aunque no realizaron análisis filogenéticos ni comparaciones estadísticas con otras especies. En el año 2004, Avila *et al.* describieron *L. talampaya* del departamento de Felipe Varela, La Rioja y *L. gununakuna* del departamento de Zapala, Neuquén. En este trabajo se hipotetizó una nueva especie candidata dentro de este grupo, *L. sp. 9* del departamento de Tinogasta, Catamarca; que cuatro años después Quinteros *et al.* (2008) describieron como *L. tulkas* junto con la descripción de una segunda especie, *L. parvus* del departamento General Sarmiento, La Rioja. Esta última especie según los autores se correspondería con *L. sp. 4* de Morando *et al.* (2003), ya que tendría una amplia distribución desde La Rioja hasta el norte de Mendoza.

Las especies más recientemente descritas son: *L. chillanensis* (Figura 3c), de Termas de Chillan, Chile (Torres-Pérez *et al.*, 2009); *L. antumalguen* (Figura 3d), del



Volcán Domuyo, Neuquén (Avila *et al.*, 2010); *L. smaug*, de entre Las Loicas y el Volcán Peteroa, Mendoza, *L. shitan* (Figura 3e), de General Roca, Río Negro, *L. choique* (Figura 3g), de Paso el Choique, Mendoza; éstas tres últimas descritas en un trabajo de Abdala *et al.*(2010); *L. burmeisteri* (Figura 3f), de Caepe Malal, Neuquén (Avila *et al.*, 2012), *L. carlosgarini* (Figura 4a), de Laguna del Maule, Chile (Esquerré *et al.*, 2013), *L. riodamas*, de Río de las Damas, Chile (Esquerré *et al.*, 2013) y *L. crandalli* (Figura 4b), del Área Natural Protegida Auca Mahuida, Neuquén (Avila *et al.*, en prensa).

Lobo *et al.*(2010) realizaron una revisión bibliográfica sobre la sistemática del género *Liolaemus*, que en combinación con sus conocimientos personales utilizaron para proponer un arreglo taxonómico de grupos dentro del género. Su propuesta con respecto a las especies del grupo *L. elongatus-kriegi* incluye dos grupos: I-grupo *kriegi*: *L. buergeri*, *L. ceii*, *L. cristiani*, *L. kriegi*; II-grupo *elongatus*: *L. austromendocinus*, *L. elongatus*, *L. flavipiceus*, *L. gununakuna*, *L. parvus*, *L. petrophilus*, *L. punmahuida*, *L. thermarum*, *L. tregenzai* y dentro de este último reconoce un grupo norte que llama grupo *capillitas*: *L. capillitas*, *L. dicktracyi*, *L. heliodermis*, *L. talampaya*, *L. tulkas*, *L. umbrifer*.

A partir de los antecedentes expuestos, se reconoció que el conocimiento sistemático del grupo *Liolaemus elongatus-kriegi* es escaso, tanto de los límites de sus especies como de las relaciones entre ellas, lo que propició el desarrollo del trabajo de esta tesis, que tuvo como grupos focales de estudio dos complejos: *L. elongatus* y *L. kriegi* (*sensu* Morando *et al.*, 2003). El complejo *L. kriegi* (Figura 1) se extiende desde los 37°S (cerca del Paso Vergara en la VII Región, Chile y el departamento de Malargüe, Provincia de Mendoza, Argentina), hasta su límite sur de distribución en el extremo norte de la provincia de Chubut a los 42°S (Morando *et al.*, 2003; Pincheira-Donoso y Nuñez, 2005, Figura 1). Actualmente se considera que este complejo incluye: *L. buergeri*, *L. kriegi* y *L. ceii* (Cei, 1986), éstas dos últimas propuestas como conespecíficas por Morando *et al.* (2003), y muy posiblemente incluye *L. tregenzai*. Además se identificaron tres linajes dentro de este complejo: *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C*; Lobo *et al.* (2010) también considera a *L. cristiani* como parte de este complejo.

El complejo *L. elongatus* se extiende desde los 35°S (cercano a Las Leñas, Provincia de Mendoza Argentina) hasta los 45 °S (cercano al Río Senger, sur de la Provincia de Chubut, Argentina, Figura 1). El trabajo molecular del complejo realizado una década atrás (Morando *et al.*, 2003) identificó como especies pertenecientes al mismo: *L. elongatus* y tres especies candidatas *L. sp. 5*, *L. sp. 6* y *L. sp. 7*. Posteriormente *L. sp. 5* fue descrita

como *L. smaug* por Abdala *et al.*(2010) junto con otras dos especies para este complejo: *L. shitan* y *L. choique*. Finalmente, el trabajo publicado por Torres-Pérez *et al.*(2009) presentó evidencia de una relación filogenética estrecha de *L. chillanensis* con el complejo *L. elongatus*.



Figura 4: Fotos de individuos pertenecientes a los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi*: a) *L. carlosgarini*, b) *L. crandalli*, c) *L. sp. 1*, d) *L. sp. 2*, e) *L. sp. D* y f) *L. sp. 3*.

El conocimiento del estatus taxonómico de las especies que componen los complejos *L. elongatus*, *L. kriegi* y *L. petrophilus* es aún limitado. No se ha desarrollado una filogenia con marcadores mitocondriales y nucleares que incluya individuos de estos complejos y complejos cercanos con situación taxonómica irresuelta.



## *OBJETIVO*

El objetivo planteado para esta tesis fue estudiar la diversidad y relaciones filogenéticas de los complejos de especies de lagartijas *Liolaemus elongatus* y *L. kriegi*. El abordaje metodológico de este trabajo ejemplifica la aproximación conceptual y metodológica de la taxonomía integral, en este caso, combinando tres fuentes de evidencia independientes: morfología (morfometría clásica) y secuencias de ADN mitocondrial y nuclear.

# CAPÍTULO I

## FILOGEOGRAFÍA MULTILOCUS DEL COMPLEJO DE LAGARTIJAS PATAGÓNICAS *LIOLAEMUS KRIEGI* (IGUANIA: LIOLAEMINI)

Versión modificada del trabajo:

**Medina, C.D.**, Avila, L.J. Sites, Jr. J.W. & Morando, M. 2014. Multilocus phylogeography of the *Liolaemus kriegi* complex (Iguania, Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society* 113 (1) 256–269

## INTRODUCCIÓN

El noroeste de la Patagonia (provincias de Neuquén, sur de Mendoza, y oeste de Río Negro en Argentina) es una región geográficamente muy compleja, con montañas que sobrepasan los 4500 msnm, grandes campos volcánicos, cañones profundos y altas mesetas. Estas características son el producto de una historia orogénica Andina larga, acoplada con erupciones volcánicas esporádicas, y una historia de avances y retrocesos glaciares que produjeron cambios climáticos pronunciados a través del último millón de años (Ma) (Martínez y Kutschker, 2011; Rabassa y Clapperton, 1990; Ramos y Folguera, 2011; Ramos y Ghiglione, 2008; Ramos y Kay, 2006). Como resultado, el paisaje es una fisiografía intrincada que probablemente ha fomentado múltiples procesos de divergencia poblacional a través de diferentes escalas geográficas y temporales (Morando *et al.*, 2013), y esto puede explicar el inusual número de especies de lagartijas en la región (Avila *et al.*, 2013; Corbalán *et al.*, 2011).

Durante los últimos 40 años, los estudios de las lagartijas en el sur de Mendoza han revelado un número alto de especies endémicas con rangos geográficos restringidos, con algunos taxa confinados a una sola montaña o meseta. Al menos la mitad de las especies de lagartijas de esta área son endémicas (Corbalán *et al.*, 2011), y ha sido propuesta como el centro del origen para varios géneros de lagartijas, incluyendo *Pristidactylus* Fitzinger, 1843 (Lamborot y Díaz, 1987; Scolaro *et al.*, 2003), *Leiosaurus* Duméril & Bibron 1837, *Diplolaemus* Bell, 1843 (Cei *et al.*, 2003), y *Phymaturus* Gravenhorst, 1838 (Díaz Gómez, 2009; Scolaro *et al.*, 2003). *Liolaemus* es el género con más número de especies en la región, con más de 30 especies distribuidas a lo largo de una banda relativamente estrecha de los Andes desde el sur de Mendoza hasta el noreste de la provincia de Chubut, y también incluyendo a las ecoregiones de los Altos Andes y la estepa Patagónica. Esta diversidad está comprendida por varios grupos, incluyendo el complejo *L. kriegi*, las especies en este complejo están caracterizadas por cuerpos robustos, grandes, usualmente saxícolas, vivíparos y omnívoros (Cei, 1986).

El objetivo de este capítulo es estudiar la estructura genética y sus patrones de variación en el complejo *L. kriegi*. Su distribución se extiende desde los 37°S (cerca del Paso Vergara en la VII Región, Chile y el departamento de Malargüe, Provincia de Mendoza, Argentina), hasta su límite sur de distribución en el extremo norte de la provincia de Chubut a los 42°S (Morando *et al.*, 2003; Pincheira-Donoso y Nuñez, 2005)

(Figura 5). Este complejo tradicionalmente incluía tres especies descritas en base a su morfología, *L. buergeri*, *L. kriegi* y *L. ceii* (Ceii, 1986). Por otro lado, evidencia molecular mostró que *L. tregenzai* puede estar cercanamente relacionada a este complejo (Morando *et al.*, 2003), y en el mismo estudio, que estuvo basado en datos mitocondriales, se identificaron tres linajes dentro de este complejo: *L. sp. A*, *L. sp. B*, y *L. sp. C*, y no obtuvo diferencias entre *L. kriegi* y *L. ceii*. El conocimiento taxonómico de este complejo es aún limitado, los límites de especies no están bien definidos, y no existe un estudio filogeográfico detallado para todas las especies incluidas al presente en este complejo. En este capítulo se examina la estructura genética y los patrones de variación genética del complejo *L. kriegi*, a lo largo de su rango de distribución, incluyendo ocho taxa (cuatro especies descritas y cuatro linajes distintos), basándonos en regiones de dos genes mitocondriales (*cyt-b* y *12S*) y dos nucleares (*BA3* y *KIF24*).

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

### *INDIVIDUOS UTILIZADOS*

Las localidades muestreadas fueron seleccionadas con el objetivo de cubrir el rango de distribución total del complejo *L. kriegi*. Se obtuvieron muestras de los ocho linajes identificados (Figura 5), incluyendo un total de 247 individuos provenientes de 55 localidades desde el sur de Mendoza (35°05'S) hasta la Provincia de Río Negro (41°45'S) en Argentina, y siete localidades de un pequeño rango de distribución en Chile. Los números de *voucher* de los especímenes con su detalle de localidad se encuentran reportados en el Apéndice I. Los especímenes fueron colectados a mano y sacrificados por inyección pericárdica de pentotal sódico. Se extrajeron muestras de hígado para análisis moleculares, los especímenes fueron fijados en formol 20% y luego transferidos a etanol 70%. Los *voucher* de especímenes y tejidos están catalogados en la colección herpetológica Centro Nacional Patagónico en Puerto Madryn (LJAMM-CNP), Argentina (<http://www.cenpat.edu.ar/nuevo/colecciones03.html>). Para este capítulo se incluyeron dos muestras de tejidos de la colección personal de Miguel I. Christie (MIC). Se utilizaron cuatro muestras de *L. elongatus* y *L. petrophilus*, las cuales representan filogenéticamente grupos cercanos y se usó una muestra de *L. bibronii* para enraizar el árbol.

### *EXTRACCIÓN DE ADN, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO*

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción Qiagen® DNeasy® 96 siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Aunque las secuencias mitocondriales han sido el tipo de dato más comúnmente utilizado hasta recientemente para este tipo de análisis (Camargo *et al.*, 2010; Zink y Barrowclough, 2008), la utilización de los marcadores nucleares con variabilidad suficiente como para realizar análisis filogeográficos ha expandido el poder de estos estudios (Brito y Edwards, 2009; Camargo *et al.*, 2010; Leaché *et al.*, 2013). Para este capítulo se secuenciaron dos fragmentos mitocondriales (12S rRNA [12S ~853bp, 29 individuos] y citocromo-b [cyt-b, ~800bp, 247 individuos]) y dos nucleares (un miembro de la familia de las quinesinas 24 [KIF24 ~490 bp, 18 individuos]) y BA3 rRNA [BA3~265 bp, 14 individuos]). Para los protocolos de PCR y secuenciamiento se siguió a Morando *et al.* 2003, Morando *et al.*, 2004 y Noonan y Yoder, 2009 para los fragmentos mitocondriales y nucleares, respectivamente. Todas las secuencias fueron editadas y alineadas usando Sequencher v4.10. (™Gene Codes Corporation Inc.2007) y se verificó a ojo para maximizar bloques de identidad de

secuencia. Los datos faltantes se codificaron como “?” y las secuencias de haplotipos fueron depositadas en GenBank (Apéndice I; Número de Acceso KJ493945 – KJ494247). Se secuenció el fragmento de citocromo-b para los 247 individuos colectados, mientras que para 12S y los dos marcadores nucleares, se seleccionó una submuestra que incluyera distintos representantes genéticos de cada haploclado. La matriz completa de citocromo-b se utilizó para todos los análisis, la matriz completa de 12S se utilizó para obtener una red de genes y los marcadores KIF24 y BA3 fueron utilizados para obtener redes de haplotipos de un gen y una red combinada multilocus de genes nucleares.

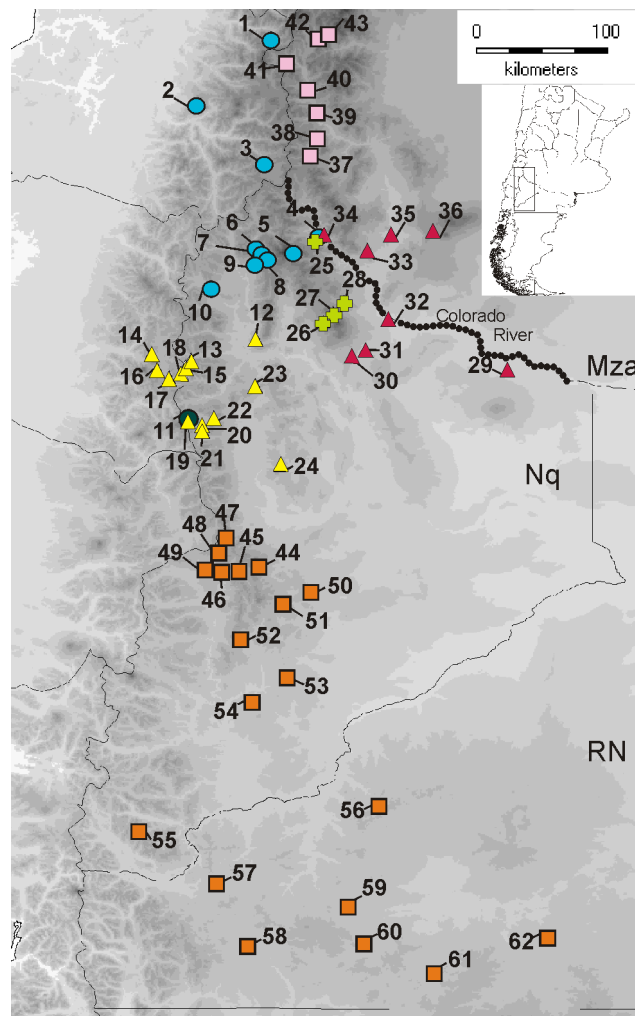


Figura 5: Las localidades muestreadas para el complejo *L. kriegi* están identificadas como sigue: *L. sp. A*, triángulos amarillos (12–24); *L. tregenzai*, círculo verde oscuro (11); *L. sp. C*, cruces verdes (25–28); *L. sp. D*, cuadrados rosas (37–43); *L. sp. B*, triángulos colorados (29–36); *L. kriegi* + *L. ceii*, cuadrados naranjas (44–62); *L. buergeri*, círculos azules (1–10). Nq= Provincia de Neuquén, Mza= Provincia de Mendoza y RN=Provincia de Río Negro. Los números de las localidades se corresponden con aquellos en el Apéndice I.

## ANÁLISIS DE ÁRBOLES DE GENES Y REDES.

Para obtener un árbol del gen citocromo-b, primero se seleccionaron haplotipos no redundantes con DnaSP 5.10 (Librado y Rozas, 2009), y luego se utilizó esta matriz para inferir una genealogía de genes con un método de Inferencia Bayesiana (IB). Previamente, se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajusta para el fragmento de citocromo-b usando el criterio de información Akaike corregido (AICc) en JModelTest v0.1.1 (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008). Los análisis fueron realizados usando el programa MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), se corrieron  $5 \times 10^7$  generaciones, y se utilizaron las muestras de equilibrio (después del 25% de *burn-in*) para generar un árbol de consenso con la regla de la mayoría del 50%; las probabilidades posteriores (PP) fueron consideradas significativas cuando fueron  $\geq 0.95$  (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Con el objetivo de identificar los linajes dentro del complejo *L. kriegi*, se buscaron clados que contuvieran individuos de las localidades tipos de las especies descritas y clados que incluyeran individuos de las localidades asignadas a especies candidatas por Morando *et al.* (2003). Para las matrices completas de los haplotipos de citocromo-b, 12S y de los genes nucleares BA3 y KIF24, previamente separados en fases con programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009), se generaron redes de haplotipos de parsimonia estadística bajo el criterio de probabilidad del 95% usando el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). También se generó una red multilocus convirtiendo la matriz de distancia de los haplotipos de cada gen nuclear por separado en una matriz de organismos utilizando el programa POFAAD v1.03 (Joly y Bruneau, 2006). La reconstrucción de la red de organismos fue luego visualizada utilizando el algoritmo NeighborNet implementado en SplitsTree v4.6 (Huson y Bryant, 2005) siguiendo a Leaché *et al.* (2009). También se realizaron dos análisis extras: 1- se estimó un árbol de genes nucleares concatenados basados en inferencia bayesiana utilizando MrBayes v3.2, se corrieron  $1 \times 10^7$  generaciones, y se utilizaron las muestras de equilibrio (después del 25% de *burn-in*) para generar un árbol consenso con la regla de la mayoría del 50%; las probabilidades posteriores (PP) fueron consideradas significativas cuando fueron  $\geq 0.95\%$  (Huelsenbeck y Ronquist, 2001); 2- una red de genes mitocondriales concatenados bajo el criterio de probabilidad del 95% usando el programa TCS 1.21. Se puso a prueba la recombinación para las regiones de los genes nucleares utilizando RDP v3.44 (Heath *et al.*, 2006; Martin y Rybicki, 2000).

### ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

Se definieron grupos de poblaciones geográficamente homogéneas que son diferenciadas máximamente entre sí ("K"), y se simuló un procedimiento de *annealing* que maximiza la proporción de la varianza genética total debido a diferencias entre grupos, utilizando SAMOVA v1.0 (Dupanloup *et al.*, 2002). Se realizaron análisis con diferentes valores de "K" que van de 2 a 13 (Apéndice II) para la matriz completa de citocromo-b del complejo *L. kriegi*, utilizando 500 procesos independientes de *annealing*. La mejor opción de agrupamiento para cada valor de "K" fue seleccionada basado en el componente entre-grupos ( $F_{CT}$ ) de la varianza genética total. Las distancias genéticas (corregida y no corregida de a pares) entre los linajes previamente estimados en los análisis de árboles de genes, fueron estimados utilizando el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005). Siguiendo el criterio descrito para anfibios por Fouquet *et al.*(2007), que controla las distancias genéticas combinadas con los linajes de distribución alopátrica, se utilizó la distancia no corregida específica de citocromo-b estimada para *Liolaemus* por Martínez, (2012) y Breitman *et al.*(2012), la cual es en promedio es de 3% para comparaciones de a pares. Por lo tanto, las distancias genéticas mayores a 3% de áreas geográficamente aisladas fueron consideradas como evidencia para especies candidatas. Se utilizó la matriz de citocromo-b para estimar tiempos de divergencia entre los principales linajes del complejo *L. kriegi* basado en el modelo evolutivo que mejor se ajusta y se realizó un *Likelihood Ratio Test* (LRT) utilizando el programa JModeltest v0.1.1 (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008) para poner a prueba desviaciones del reloj molecular estricto. Se utilizó la tasa de evolución para el citocromo-b de  $2.23 \times 10^{-2}$  estimada por Fontanella *et al.*(2012) para el clado *Eulaemus* calibrado con un fósil. Luego, se utilizó BEASTv1.6.1 para estimar el árbol de genes bajo un modelo de reloj molecular estricto (Drummond y Rambaut, 2007). Se realizaron dos análisis independientes para 100 millones de generaciones, muestreado cada 1000 generaciones, con un modelo de sustitución nucleotídica HKY + I + G y asumiendo un prior de árbol Yule. El tamaño de muestreo efectivo (ESS) para parámetros estimados y la convergencia fue verificado utilizando Tracer v1.5 (Rambaut y Drummond, 2009).

### ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS

Para cada uno de los linajes principales del árbol del gen mitocondrial, se calculó índices de diversidad molecular básicos: número de secuencias (NS), sitios polimórficos (S), haplotipos (H), diversidad haplotípica ( $H_d$ ) y diversidad nucleotídica ( $P_i$ ). Se



realizaron la prueba de neutralidad de Tajima (1989) y la prueba de Ramos-Onsins y Rozas(2002) para evaluar posibles cambios temporales en el tamaño poblacional; todas las estimaciones fueron calculadas usando el programa DnaSP. También se realizaron corridas de *Bayesian Skyline Plots* (BSP), el cual estima cambios en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo, para *L. buergeri*, *L. kriegi* + *L. ceii* (basado en los resultados del árbol del gen mitocondrial, ver debajo), *L. sp. A*, *L. sp. B* y *L. sp. D*. Se utilizó un reloj molecular estricto con un modelo específico de evolución molecular para cada linaje, y se corrieron  $2 \times 10^7$  iteraciones, muestreadas cada 1000 iteraciones, y se analizó la convergencia de los parámetros con Tracer v1.5 (Rambaut y Drummond, 2009). Estos análisis no se realizaron para *L. tregenzai* debido a su pequeño tamaño muestral.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE ÁRBOLES DE GENES Y REDES

De las 247 secuencias originales se encontraron 122 haplotipos no redundantes para el gen citocromo-b en el complejo *Liolaemus kriegi*. El modelo de sustitución nucleotídica seleccionado por ModelTest que mejor se ajustó fue TPM3uf+I+G (nst=6 rates=gamma). Basado en la matriz de haplotipos, se recuperó un árbol de gen mitocondrial con alto soporte (soporte de probabilidad posterior [PP] =1 para el complejo *L. kriegi* (Figura 6) incluyendo a *L. tregenzai*. Se recuperaron siete linajes con alto soporte dentro de este complejo, cinco de los cuales corresponden a taxa reconocidos previamente: *L. buergeri*, *L. tregenzai*, *L. sp. A*, *L. sp. B* y *L. sp. C* (Figura 6), un linaje diferente que se denominó *L. sp. D*, y el séptimo incluye todas las muestras correspondientes a las terminales de *L. ceii* y *L. kriegi* que están interdigitadas sin diferenciación, por lo tanto el mismo se denominó *L. kriegi + L. ceii*. *Liolaemus sp. C* y *L. sp. D* fueron recuperados como taxa hermanos con soporte alto, pero no hay soporte para ninguna de las relaciones más profundas entre los linajes. Aunque los linajes *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C* fueron previamente propuestos como especies candidatas (Morando *et al.*, 2003), el tratamiento que se les da aquí a estos taxa como unidades *L. sp.* separadas no es un respaldo de su reconocimiento como especies distinta; sino simplemente una propuesta para el estatus de especies candidatas, siguiendo la metodología utilizada por Vieites *et al.* (2009) en anfibios de Madagascar, que merece futuros estudios integrales para evaluar su estatus taxonómico.

Con los datos completos de citocromo-b, se recuperaron cinco redes de haplotipos separadas, con un límite de conexión de 11 pasos, correspondientes a *L. buergeri*, *L. tregenzai*, *L. sp. B*, *L. kriegi + L. ceii* y *L. sp. A + L. sp. C + L. sp. D* (Figura 7). La red D incluye a *L. sp. A*, *L. sp. C* y *L. sp. D*, separados por cinco/seis pasos (Figura 7, panel D); aunque estos linajes están cercanos geográficamente, son alopátricos sobre un paisaje altitudinalmente variable y complejo (variabilidad en sombreado gris en el mapa); además *L. sp. D* está separado de los otros dos linajes por el Río Colorado. También, *L. sp. D* está más cerca geográficamente a *L. buergeri* (Figura 7, panel A) que a *L. sp. A* y *L. sp. C*, y este último linaje está más cerca geográficamente a *L. sp. B* (Figura 7, panel B) que a los otros dos linajes recuperados en la misma red (Figura 7, Panel D).

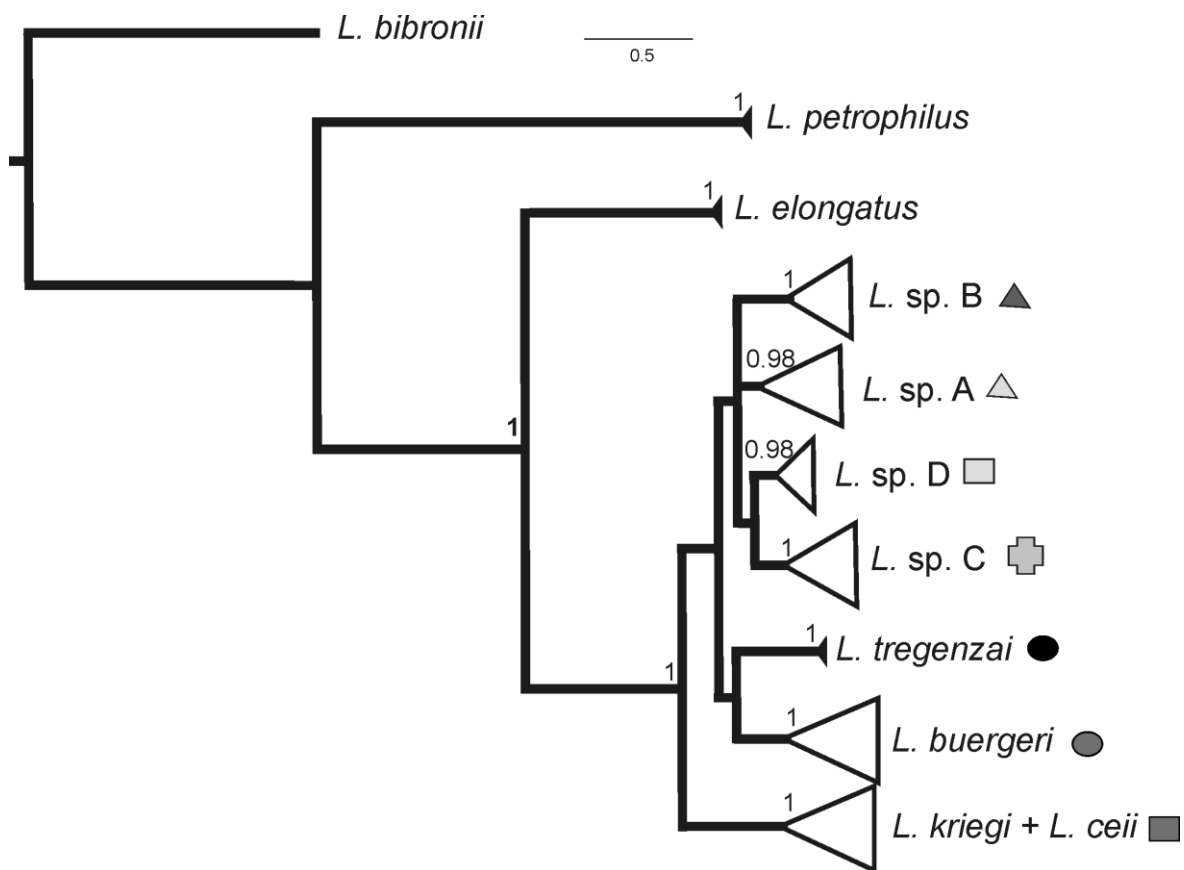


Figura 6: Árbol génico bayesiano consenso (mayoría del 50%) correspondiente al gen citocromo-b. Los números sobre las ramas son valores de probabilidades posteriores y el símbolo sobre cada terminal se corresponde a aquellos en la Figura 5.

Aunque los individuos de las localidades tipo de *L. ceii* y *L. kriegi* no comparten haplotipos (Figura 7, panel E, estrellas), no hay diferenciación aparente entre estas dos especies con este marcador. Para el conjunto de datos de 12S (Figura 8, panel A) se obtuvo una red, con grupos de haplotipos que corresponden aproximadamente a los haploclados de citocromo-b. Las dos redes de genes mitocondriales son totalmente concordantes con la red de genes mitocondriales combinados (Apéndice IV). La red de haplotipos nucleares de BA3 con un límite de conexión de seis pasos (Figura 8, panel C), mostró que casi todos los haplotipos son especie-específicos, pero tres de ellos están compartidos entre algunos taxa: 1-*L. sp. D-L. kriegi + L. ceii*, 2-*L. sp. D-L. sp. A*, 3-*L. sp. A-L. kriegi + L. ceii-L. buergeri*. La red de haplotipos nucleares KIF24 con un límite de conexión de nueve pasos (Figura 8, panel D), mostró que todos los haplotipos son especie-específicos y algunos fueron recuperados por fuera de la red principal, incluyendo todos los de *L. sp. B*, y *L. tregenzai* y dos de *L. sp. A*. Las dos redes de genes nucleares resumen las distancias genéticas promedio entre los especímenes (Figura 8, panel B), tres linajes muestran distancias similares entre ellos: *L. buergeri*, *L. kriegi + L. ceii* y *L. sp. A*, mientras los otros cuatro

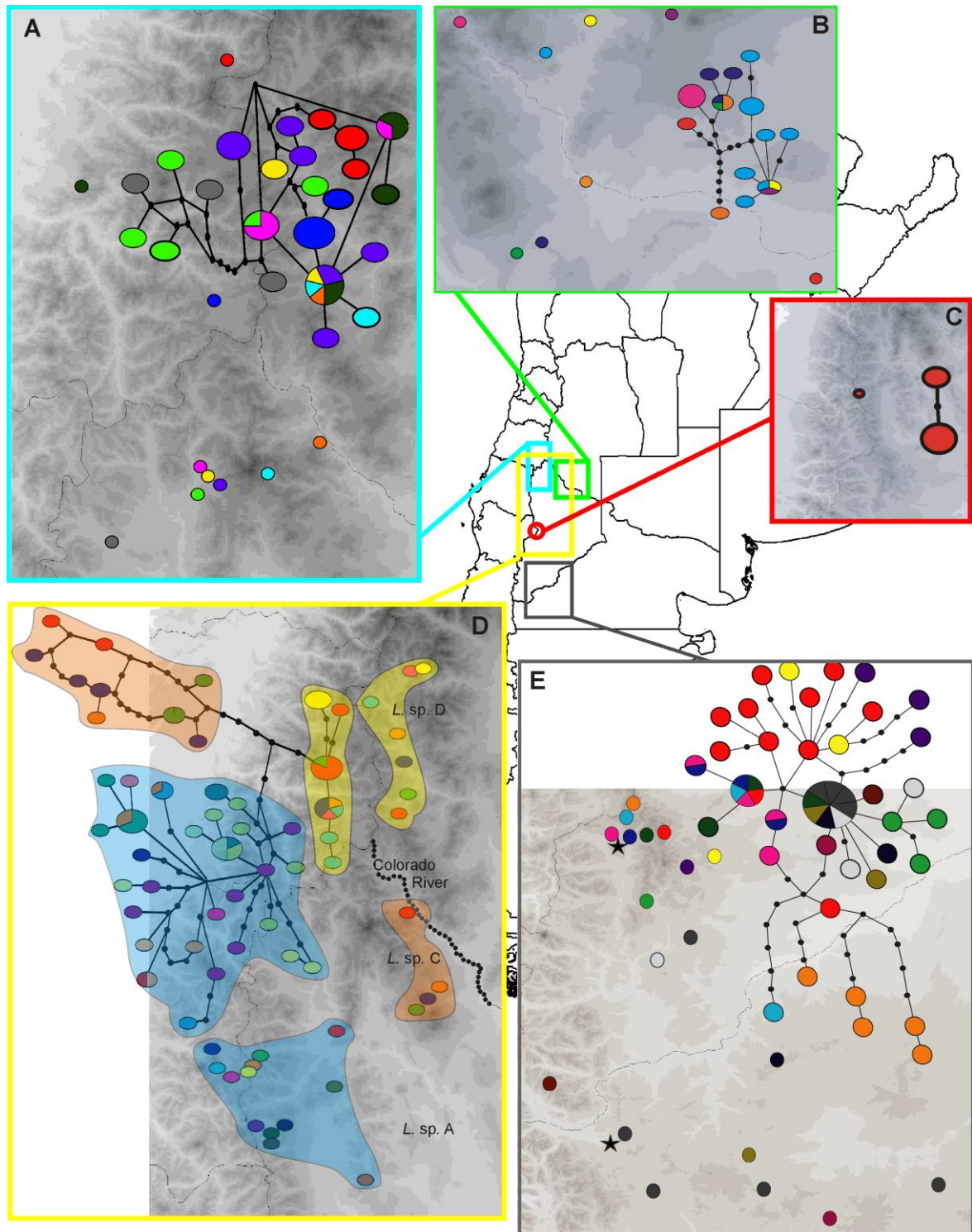


Figura 7: Paneles A al E muestran redes de haplotipos de parsimonia estadística del gen citocromo-b con sus respectivas distribuciones geográficas. Dentro de cada panel se detallan las redes inferidas en relación a la distribución geográfica de los individuos de la muestra. Cada haplotipo está coloreado acorde a la localidad de procedencia de esos ejemplares. A- *L. buergeri*; B- *L. sp. B*; C- *L. tregenzai*; D- *L. sp. A* (sombreado azul), *L. sp. C* (sombreado naranja) y *L. sp. D* (sombreado amarillo) y E- *L. kriegii* + *L. ceii*.

muestran diferentes distancias genéticas entre ellos: *L. tregenzai*, *L. sp. B*, *L. sp. C* y *L. sp. D*. El árbol de genes nucleares concatenados solo recupera a *L. tregenzai* y *L. sp. A* como clados bien soportados (Apéndice V).

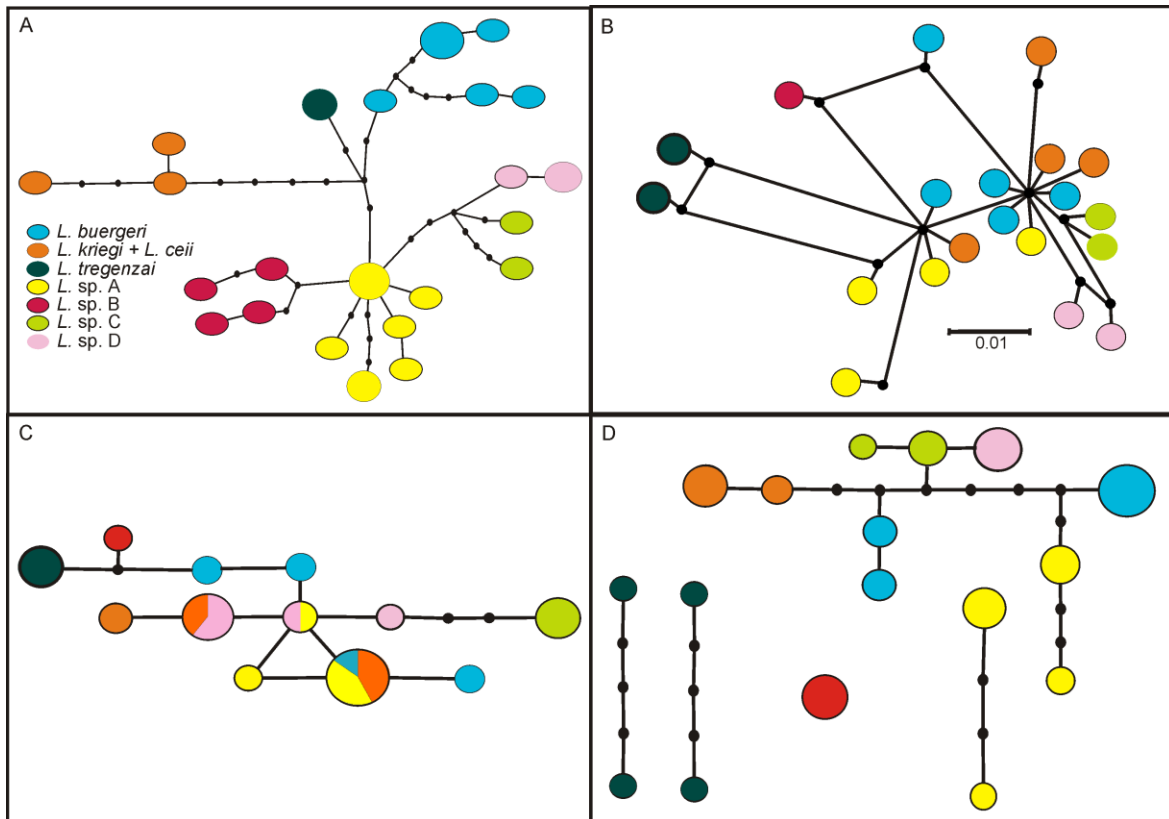


Figura 8: A. Red de haplotipos de parsimonia estadística basada en: A – la región mitocondrial 12S; B – red nuclear multinuclear (BA3 y KIF24); C – red del gen nuclear BA3; D – red del gen nuclear KIF24. Los haplotipos están coloreados según cada linaje reconocido dentro del complejo *L. kriegi*.

#### ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

La partición óptima para la diversidad genética con *Spatial Analysis of Molecular Variance* (SAMOVA) se obtuvo cuando las muestras fueron agrupadas en los siete grupos recuperados en el análisis del árbol de gen del citocromo-b;  $K = 7$  ( $F_{CT} = 0.29882$ , Apéndice II). Los grupos corresponden a *L. buergeri*, *L. kriegi* + *L. ceii*, *L. tregenzai*, *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C* y *L. sp. D*. la Tabla 1 muestra todas las distancias genéticas no corregidas de a pares para los siete linajes reconocidos, *L. kriegi* + *L. ceii* tiene distancias mayores a 3% (min: 3.79, máx.: 4.47) comparado con todos los otros linajes. *Liolaemus tregenzai* tiene distancias mayores a 3% comparado con todos los otros linajes excepto con *L. sp. C* (2.94%). La distancia más chica se encontró entre *L. sp. A*, *L. sp. B* y *L. sp. C* (min: 1.64; 1.77; 2.12; 2.27).

Tabla 1: Arriba de la diagonal: número promedio de las distancias génicas de a pares correspondientes al fragmento del gen mitocondrial citocromo-b, entre los principales linajes del complejo *L. kriegi*; por debajo de la diagonal: promedio de diferencias de a pares corregidos (distancia inter-linaje – distancia intra-linaje).

	<i>L. kriegi</i> + <i>L. ceii</i>	<i>L.</i> <i>tregenzai</i>	<i>L.</i> <i>buergeri</i>	<i>L. sp. B</i>	<i>L. sp. D</i>	<i>L. sp. A</i>	<i>L. sp. C</i>
<i>L. kriegi</i> + <i>L. ceii</i>	---	4.4691	4.056	4.2401	3.8828	3.7883	4.3418
<i>L. tregenzai</i>	3.8727	---	3.4189	3.7029	2.937	3.0918	3.1519
<i>L. buergeri</i>	3.0475	2.7202	---	3.5726	2.9413	2.9441	3.27
<i>L. sp. B</i>	3.3021	3.0747	2.5324	---	2.3768	2.2795	2.7693
<i>L. sp. D</i>	3.2052	2.5692	2.1615	1.6674	---	1.7739	1.6442
<i>L. sp. A</i>	2.9201	2.5334	1.9736	1.3794	1.1343	---	2.1285
<i>L. sp. C</i>	3.4043	2.5242	2.2302	1.800	0.9353	1.229	---

La Figura 9 muestra el árbol de gen del citocromo-b con el tiempo calibrado; el origen del complejo *L. kriegi* es cercano a 1 millón de años, y todos los otros tiempos de divergencia estimados entre los linajes reconocidos se ubican en el Pleistoceno tardío.

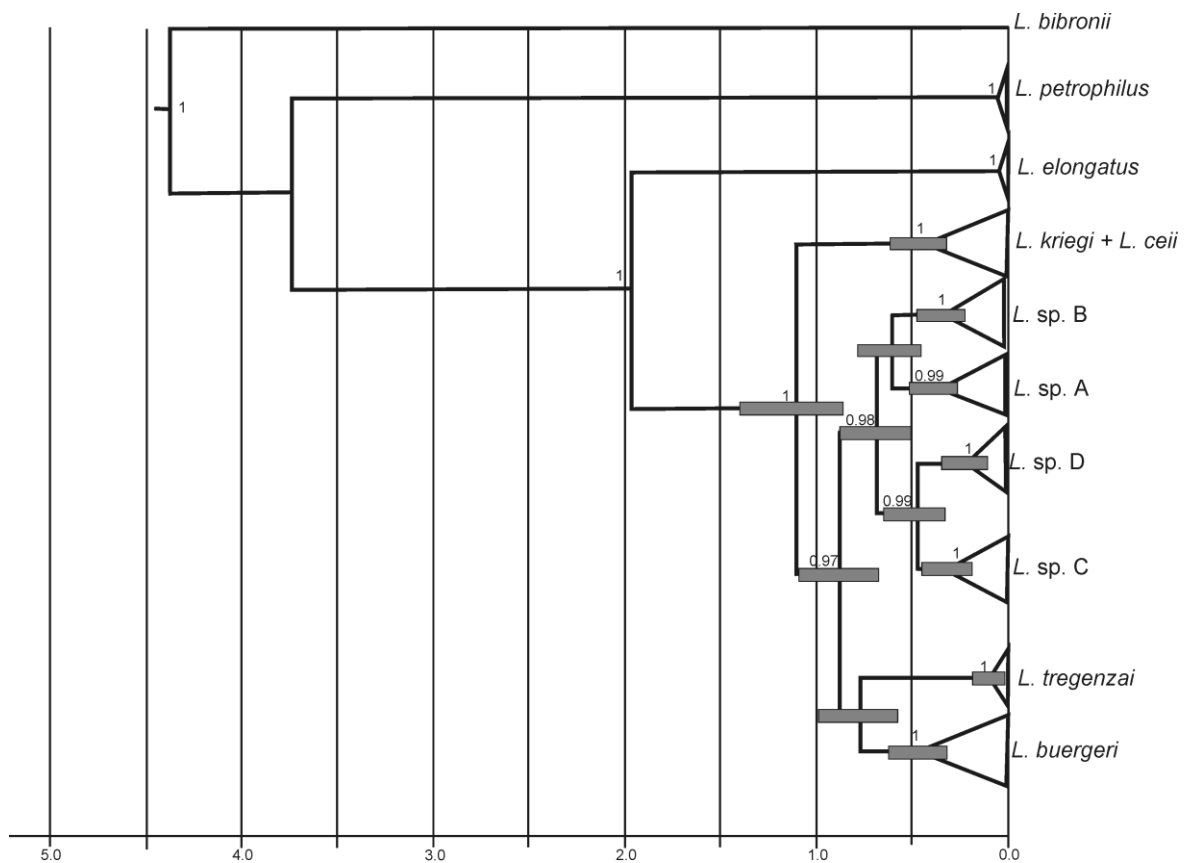


Figura 9: Tiempos de divergencia estimados sobre un árbol de gen de citocromo-b, marcado con gris claro los tiempos de divergencia basados en análisis del BEAST. El eje x está en millones de años (Ma), los números en los nodos son PP >0.95% provenientes del análisis Bayesiano.

#### ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS

El linaje *L. kriegi* + *L. ceii* tuvo el número de secuencias, sitios polimórficos y haplotipos más elevados (Tabla 2). *Liolaemus tregenzai* tuvo el tamaño de muestra más chico, la menor cantidad de sitios polimórficos y haplotipos, y la menor diversidad haplotídica y nucleotídica. *Liolaemus* sp. A mostró la diversidad haplotídica más alta y *L.* sp. C mostró la diversidad nucleotídica más alta. Los únicos linajes que mostraron evidencia de no neutralidad con ambas pruebas Tajima's y Onsin & Rozas fueron *L.* sp. A y *L. kriegi* + *L. ceii*. Con *Bayesian Skyline Plots* (BSP) también se detectó un cambio en el tamaño poblacional para *L. kriegi* + *L. ceii* (Apéndice III) y para *L. buergeri*, para los cuales la prueba de neutralidad no detectó un desvío de la neutralidad. Para *L.* sp. A, *L.* sp. B, *L.* sp. C y *L.* sp. D, no se detectaron cambios en el tamaño poblacional con BSP (Apéndice III).

Tabla 2. Número de secuencias (NS), sitios polimórficos (S), haplotipos (H), diversidad haplotídica (Hd), diversidad nucleotídica (Pi), D de Tajima y valores de *p* asociados, R<sup>2</sup> de Ramos-Onsin & Rozas y valores de *p* asociados. Todos estos estadísticos fueron calculados a partir de un fragmento del gen mitocondrial citocromo b para los principales linajes del complejo *L. kriegi*. El tamaño de la muestra para *L. tregenzai* fue demasiado pequeño como para calcular la prueba de Tajima y la de Ramos-Onsin & Rozas.

Linajes	(NS)	(S)	(H)	(Hd)	(Pi)	D de Tajima	<i>p</i> [D<=Dt]	R <sup>2</sup>	<i>p</i> [R <sup>2</sup> <=Ri]
<i>L. buergeri</i>	44	30	23	0.950	0.0079	-0.7938	0.2246	0.0800	0.1768
<i>L.</i> sp. A	44	46	29	0.960	0.0076	-1.8042	0.0126	0.0474	0.0028
<i>L.</i> sp. B	30	26	13	0.900	0.0082	-0.5879	0.3132	0.0977	0.2702
<i>L.</i> sp. C	12	15	09	0.940	0.0085	0.6178	0.7732	0.1649	0.6446
<i>L.</i> sp. D	18	08	06	0.800	0.0032	-0.2721	0.4244	0.1293	0.4078
<i>L. kriegi</i> + <i>L. ceii</i>	93	58	36	0.840	0.0052	-2.1733	0.0000	0.0292	0.0000
<i>L. tregenzai</i>	06	02	02	0.333	0.0009	---	---	---	---

## DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue estudiar la estructura genética y filogeográfica de todos los linajes reconocidos dentro del complejo *Liolaemus kriegi* utilizando secuencias de dos genes mitocondriales y dos nucleares. Primero, se discute la historia filogeográfica de estos linajes y segundo, se consideran las implicancias taxonómicas y para su conservación a la luz de estudios filogeográficos y biogeográficos que incluyen la distribución de este complejo.

### HISTORIA FILOGEOGRÁFICA

El linaje distribuido más al noroeste del complejo *L. kriegi* es *L. buergeri* (Figura 5), su rango geográfico se expande hacia el sur en la Cordillera de los Andes y en un paisaje topológicamente complejo que incluye altos picos montañosos (2452 m, Figura 5, localidad 4) y valles profundos. El borde este de la distribución de *L. buergeri* está geográficamente cercano a *L. sp. D*, pero separado por la Cordillera de los Andes, mientras que su margen sur está cercano a *L. sp. A*, y su localidad más al este (Figura 5, localidad 4) es parapátrica con *L. sp. B* y *L. sp. C* (localidades 34 y 25 respectivamente). Los individuos de *L. buergeri* fueron recuperados como un grupo cohesivo en el árbol de genes mitocondriales (Figura 6) y en las redes de haplotipos mitocondriales (Figura 7 y 8); las distancias no corregidas de citocromo-b tuvieron un promedio de 3% con todos los otros haploclados (Tabla 1). Esta especie también está caracterizada por una relativa alta diversidad haplotídica y nucleotídica, las pruebas de neutralidad no fueron significativas (Tabla 2), y sólo cambios pequeños en el tamaño efectivo poblacional fueron evidentes en el *Bayesian Skyline Plots* (Apéndice III, BSP). Las estimaciones de tiempos de divergencia sugieren que *L. buergeri* se originó durante el Plioceno tardío, el cual fue impactado por múltiples ciclos glaciares (Rabassa *et al.*, 2005). La evidencia geológica sugiere, sin embargo, que el rango geográfico de esta especie no fue cubierto por hielo, y esta región ha sido hipotetizada como un refugio estable para plantas y vertebrados durante ese tiempo (Sérsic *et al.*, 2011). La “firma” genética detectada para este taxón (estabilidad poblacional, alta diversidad haplotídica y nucleotídica) es congruente con las esperadas para esta hipótesis de refugio. Estos resultados sugieren que las poblaciones ancestrales (finales del Plioceno) de *L. buergeri* persistieron *in situ* durante estos ciclos glaciares, con cambios en el tamaño poblacional principalmente derivados de fluctuaciones en temperatura y humedad, como sugieren Marske *et al.* (2013), Rowe *et al.* (2006) y Stone *et*



*al.* (2012) para ratones e insectos. Esto pudo haber estado asociado con expansiones de rango y subsecuentes contracciones derivadas de los ciclos glaciares, y pueden haber promovido aislamientos periféricos y diferenciación de los otros linajes reconocidos cercanamente relacionados dentro de este complejo.

El linaje que se identificó como *L. sp. D* se distribuye a lo largo de un gradiente norte-sur en el sudoeste de la provincia de Mendoza (Figura 5, cuadrados rosas); *L. sp. C* se distribuye a lo largo del mismo eje longitudinal pero al sur del Río Colorado (Figura 5, cruces verdes), y al sur de este linaje está *L. sp. A* (Figura 5, triángulos amarillos); esta es un área de colinas de baja elevación de los Andes. Estos tres linajes fueron inferidos como independientes en el árbol de gen mitocondrial (Figura 6), y aunque debido al número de pasos mutacionales entre los linajes están incluidos en una sola red con marcadores mitocondriales (Figura 7, panel D y Figura 8, panel A) y nucleares (Figura 8, paneles B, C y D), conforman haplogrupos diferentes en la red. Sus haplotipos nucleares son mayormente exclusivos. Las distancias genéticas no corregidas entre estos tres linajes son las menores dentro del complejo (< 2.13, Tabla 1); *L. sp. D* tuvo el menor número de sitios polimórficos y diversidad nucleotídica, mientras que *L. sp. A* tuvo la diversidad haplotídica más alta y signos significativos de expansión de rango (Tabla 1). Estos resultados son congruentes con otras dos especies (Morando *et al.*, 2003; Morando *et al.*, 2007) co-distribuidas en esta área, para las cuales hay evidencia de expansión de rango. Aunque no se conocen los eventos del pasado que pudieron influir en la distribución actual de estas poblaciones, lo más probable es que después del retiro de la capa de hielo del último máximo glacial estas poblaciones colonizaron nuevas áreas a elevaciones más bajas.

*Liolaemus tregenzai* se encuentra en simpatria con *L. sp. A* en las localidades 11 y 19 (Figura 5). Aunque el tamaño de la muestra de *L. tregenzai* es pequeño (N=6), lo que impidió un análisis detallado, se infirió como un linaje independiente en todos los métodos (Figuras 5, 6, 7 y 8). Esta especie sólo se conoce para su localidad tipo en un pico de montaña (2020 m), por lo que los índices de diversidad bajos (Tabla 2) pueden interpretarse como señal de una pequeña población aislada.

*Liolaemus sp. B* se distribuye a lo largo de ambos márgenes del Río Colorado (Figura 5, triángulos colorados), y se recuperó como un linaje independiente dentro del complejo *L. kriegi* en todos los análisis (Figuras 5, 6, 7 y 8). Este resultado es concordante con un estudio previo basado sólo en marcadores mitocondriales y una sola localidad muestreada (Morando *et al.*, 2003). La apariencia fenotípica de este linaje es casi idéntica a

*L. austromendocinus*, una especie perteneciente al grupo *L. petrophilus*, y un análisis morfométrico mostró diferencias no significativas entre estos dos (Feltrin, 2013). Análisis filogenéticos basados en 16 loci nucleares recuperaron a *L. sp. B* dentro del grupo *L. petrophilus* (Feltrin, 2013), y una de las redes haplotídicas nucleares (Figura 8, panel D) recupera este taxón como exclusivo, mientras que la otra red nuclear (Figura 8, panel C) recupera a *L. sp. B* anidado dentro de la red principal. Este conflicto resultante entre varios marcadores independientes (mitocondriales, nucleares y morfológicos) sugiere un origen híbrido para *L. sp. B* como la explicación más plausible para estos patrones. Las características topográficas complejas de esta área, acoplada con los ciclos climáticos, pueden haber facilitado contacto secundario entre las poblaciones previamente aisladas. Un análisis detallado incluyendo un muestreo geográfico más denso, mayor resolución de los marcadores moleculares y una aproximación de modelado de paleo-nicho, son necesarios para evaluar completamente estas hipótesis alternativas.

*Liolaemus kriegi* + *L. ceii* es el linaje distribuido más al sur, y todos los haplotipos fueron recuperados como linajes bien soportados en el árbol de genes (Figura 6) y como una red separada con datos de citocromo-b (Figura 7, panel E). Las dos redes de genes nucleares (Figura 8, paneles C y D) mostraron que los haplotipos de estos individuos son muy similares o idénticos, y cercanamente relacionados a *L. buergeri*, *L. sp. A* y *L. sp. D*, como también fue mostrado por la red multilocus de distancias (Figura 8, panel B). Todos estos resultados muestran una señal de expansión de rango para este linaje (Tabla 2, Apéndice III), lo cual es congruente con resultados previos en otras lagartijas (*L. elongatus*, Morando *et al.*, 2003; *L. bibronii* haploclado 4, Martínez, 2012) y en una especie de roedor que habita esta área (*Loxodontomys micropus*, haploclado N2, Cañon *et al.*, 2010). El límite de distribución norte de *L. kriegi* + *L. ceii* coincide aproximadamente con los quiebres filogeográficos de plantas y vertebrados propuestos por Sársic *et al.* (2011; Fig. 2A quiebre 5; Fig. 2B, quiebre 4 respectivamente), por lo tanto el aislamiento de este linaje como el más austral del complejo probablemente resultó de procesos que afectaron la biota de la región en modos similares.

#### IMPLICANCIAS TAXONÓMICAS

En complejos de especies cercanamente relacionadas, los métodos de taxonomía tradicional pueden no detectar especies crípticas (Bernardo, 2011; Bickford *et al.*, 2007; Dasmahapatra *et al.*, 2010; Siström *et al.*, 2013), por lo tanto los patrones genéticos son una herramienta útil para la identificación y delimitación de diferentes unidades evolutivas,

especies crípticas, así como para la asignación de especímenes desconocidos a un taxa conocido (e.g. Hebert y Gregory, 2005; Marshall *et al.*, 2011; Pons *et al.*, 2006; Shaffer y Thompson, 2007; Sites Jr. y Marshall, 2004; Vogler y Monaghan, 2007).

Los resultados filogeográficos que se presentan en este capítulo identificaron siete linajes distintos dentro del complejo *L. kriegi*: *L. buergeri*, *L. tregenzai*, *L. kriegi* + *L. ceii*, *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C*, y *L. sp. D*. Todos fueron recuperados como haploclados mitocondriales bien soportados que son cohesivos geográficamente, mayormente alopátricos, y la mayoría son exclusivos con al menos un haplotipo nuclear (KIF24, panel 3). Por lo tanto, la evidencia distribucional y molecular sugieren que los linajes *L. sp. A*, *L. sp. C* y *L. sp. D* pueden representar unidades evolutivas significativas con implicancias para su conservación. Alternativamente pueden representar una misma especie pero con moderada diferenciación morfológica, y alta estructuración poblacional, tanto genética como geográfica. Un muestreo geográfico entre las áreas de distribución de estos linajes es necesario para poner a prueba estas hipótesis.

El estatus taxonómico de *Liolaemus sp. B* es incierto debido a los conflictos en los resultados referentes a los grupos de datos nucleares, mitocondriales y morfológicos. Este linaje puede representar un subgrupo geográfico periférico de *L. austromendocinus* (al cual es morfológicamente muy similar), que en el pasado experimentara una introgresión mitocondrial masiva del linaje *L. buergeri*, o alternativamente puede representar una especie con un origen híbrido.

Morando *et al.* (2003) sugirió basado en datos mitocondriales que *Liolaemus ceii* y *L. kriegi* representaban un solo linaje, y los análisis de este capítulo, que incluyen un muestreo denso de localidades, individuos y marcadores, soportan fuertemente esta hipótesis.

La mayoría de las divergencias dentro de este complejo han ocurrido durante el último medio millón de años, favorecidos más probablemente por la complejidad topológica del paisaje y los ciclos climáticos asociados a los eventos glaciares del Pleistoceno tardío. La distinción genética y geográfica que se detectó para *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C* y *L. sp. D*, asociado con una pequeña pero significativa diferenciación morfológica (Capítulo II de esta tesis, Medina *et al.*, 2013), indican que pueden representar microendemismos, independientemente de si se los considera especies completas bajo el concepto unificado de especies (de Queiroz, 2005), o como linajes significativamente diferenciados dentro de una especie. La visión que estos linajes sugieren, junto con la

hipótesis de introgresión/ hibridización propuesta para *L. sp. D*, refleja cómo los procesos evolutivos pueden ser muy dinámicos, y cómo ellos pueden impactar en los estudios de biodiversidad.

Recientemente se publicó una revisión filogeográfica de plantas y vertebrados terrestres para Patagonia (Sérsic *et al.*, 2011) donde el área de estudio coincide con el área de distribución geográfica del complejo *L. kriegi* y se la describe como una región de alta diversidad genética que probablemente persistió como un refugio durante los ciclos glaciales del Pleistoceno. Estudios más recientes de filogeografía de plantas en otros taxa (*Nassauvia*, Nicola, 2013; *Mulinum spinosum*, Sede *et al.*, 2012) han documentado también haplotipos exclusivos altamente divergentes en esta área, y reconocen la necesidad de estudios detallados con un muestreo denso a través de muchas especies, para documentar completamente el nivel de diversidad dentro de ella. En acuerdo con las aproximaciones filogeográficas, una revisión biogeográfica basada en peces del continente Argentino (López *et al.*, 2005), encontró que aunque la región Patagónica tiene 15 especies de peces, un número relativamente bajo, seis son endémicas, y la mayoría de ellas son endémicas para esta misma área geográfica.

En una escala geográfica y taxonómica más amplia, un análisis de endemismo basado en 426 especies de escarabajos Carabidae (Coleoptera) de Sur América (Casagrande *et al.*, 2009), identificó dentro de la región biogeográfica de la Patagonia cuatro áreas de endemismo, todas las cuales se sobreponen geográficamente con este complejo de lagartijas. Del mismo modo, Domínguez *et al.* (2006) cuantificaron la endemidad en cinco familias de Coleoptera (Carabidae, Curculionidae, Tenebrionidae, Geotrupidae, Scarabaeidae) y una familia de Orthoptera (Tristiridae) distribuida sobre la estepa Patagónica; identificaron áreas endémicas que también son congruentes con la distribución del complejo *L. kriegi*, reforzando la hipótesis de que esta región sería un “hot spot” de biodiversidad, con el porcentaje más alto de áreas de conservación prioritaria e irremplazables de Patagonia (Chehébar *et al.*, 2013), alberga taxa altamente diferenciados de otras áreas de la Patagonia. Los resultados de este capítulo, complementan los estudios mencionados, presentando un esquema de muestreo intensivo que resolvió diferentes linajes evolutivos de origen reciente. Hasta el momento, no hay otros estudios genéticos con un muestro denso de esta área, por lo tanto se recomienda que los investigadores sigan esta aproximación, bajo la predicción de que se encontrarán microendemismos para muchos otros taxa. También, si las especies candidatas están soportadas por líneas

adicionales de evidencia en estudios de “taxonomía integral” (e.g. en *Liolaemus*: Aguilar *et al.*, 2013), entonces, la planificación de la conservación de la biodiversidad tendrá que centrarse en las pequeñas áreas de distribución geográfica de estas especies relativamente jóvenes. Estos resultados tienen importantes implicancias para la conservación, por lo tanto los esfuerzos deben dirigirse a mantener las redes que capturan la diversidad adaptativa dentro de las especies o linajes estrechamente relacionados, así como los procesos ecológicos y evolutivos que generan y sostienen esta diversidad (Crandall *et al.*, 2000).

## CAPÍTULO II

# ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL COMPLEJO LIOLAEMUS KRIEGI (IGUANIA: LIOLAEMINI)

Versión modificada del trabajo:

**Medina, C.D.**, Avila, L.J. & Morando, M. 2013. Análisis morfológico de *Liolaemus buergeri* Werner 1904 (Iguania: Liolaemini). *Cuadernos de Herpetología* 27 (1) 27–34.

## INTRODUCCIÓN

Una pregunta fundamental de la Sistemática es cómo delimitar especies, especialmente cuando éstas pertenecen a un mismo linaje (Sites Jr. y Marshall, 2004). Parte del problema de la delimitación de especies en estos casos, es que la morfología tiene algunas limitantes (por ejemplo cuando una misma especie presenta un alto grado de polimorfismo entre sus poblaciones o cuando dos o más especies presentan convergencia en su morfología). La taxonomía tradicional usualmente basada casi exclusivamente en caracteres de morfología externa o interna, sólo produce morfo-especies (especies establecidas exclusivamente en base a morfología). Durante los últimos 15 años se han desarrollado varios métodos nuevos para delimitar especies y poner a prueba hipótesis de especies (Avice, 2000; Sites Jr. y Marshall, 2004), y muchos científicos han obtenido resultados fuertemente respaldados combinando estos métodos con la taxonomía tradicional. Dado que la complejidad de la biología de las especies requiere que los límites de especies sean estudiados desde perspectivas múltiples y complementarias, una aproximación integral a la taxonomía debería volverse una práctica generalizada (Padial y De la Riva, 2006). En los últimos años comenzó a tener más desarrollo este tipo de aproximación, con el objetivo de integrar los conceptos y métodos básicos de la taxonomía tradicional con nuevos conceptos y metodologías, lo que se ha dado en llamar Taxonomía Integral (*Integrative Taxonomy*, Dayrat, 2005). La taxonomía integral es un marco conceptual en el cual las especies son hipótesis, y para construir hipótesis estables de especies se utilizan grupos de caracteres independientes (Padial y De la Riva, 2007). Además, el nivel de confianza en límites de especies apoyadas por diferentes tipos de datos, es mucho más alto que aquellas soportadas por un solo tipo de evidencia (Dayrat, 2005). Algunos de los problemas de la taxonomía actual no surgen solamente de los métodos utilizados, sino también sobre el nunca terminado debate sobre qué es una especie. Aunque la adopción general entre los taxónomos de un concepto de especie basado en linaje podría ocasionar una inflación taxonómica en ciertos casos; en otros, los estudios detallados e integrales contribuyen a un mejor conocimiento acerca de qué son las especies (Padial y De la Riva, 2007).

Las lagartijas son ampliamente usadas como organismos modelo para estudios evolutivos debido a que su diversidad es indicativa de áreas de endemismo, de alta diversidad genética y de diferentes procesos evolutivos como: selección natural, migración

y deriva génica (Camargo *et al.*, 2010). En el capítulo I de esta tesis se realizó un análisis filogeográfico del complejo *L. kriegi*, basado en dos genes mitocondriales y dos nucleares, y se encontró evidencia de siete linajes: dos corresponden a *L. buergeri* y *L. tregenzai*, cuatro a las especies candidatas *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C* y *L. sp. D* y un linaje que incluye todos los individuos de las especies *L. kriegi* y *L. ceii*. El objetivo de este capítulo es analizar las variaciones morfológicas en base a datos morfométricos y de escamación, entre estos siete linajes: *L. buergeri*, *L. tregenzai*, *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C*, *L. sp. D* y *L. kriegi* + *L. ceii* cercanamente relacionados.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

Se estudiaron individuos provenientes de 62 localidades de todo el rango de distribución geográfica del complejo *Liolaemus kriegi*, incluyendo las provincias de Mendoza, Neuquén y Río Negro en Argentina y la VII y VIII Región Administrativa en Chile. Estas localidades corresponden a toda el área de distribución geográfica conocida para el complejo, excepto localidades de la Sierra del Nevado (Mendoza), citadas por Abdala y Robles (2007). También se incluye la localidad tipo de *L. buergeri* que no estaba considerada en el trabajo de Morando *et al.* (2003).

### INDIVIDUOS UTILIZADOS

Para realizar el estudio morfológico se utilizaron 244 individuos adultos depositados en la colección LJAMM-CNP (<http://200.9.244.24/colecciones03.html>). Los individuos fueron asignados según los resultados del capítulo I de esta tesis, los individuos de *Liolaemus kriegi* y *L. ceii* fueron asignados a cada una de sus localidades tipo y las restantes localidades fueron identificadas como *L. kriegi* + *L. ceii*. La muestra está compuesta por 1)- 28 hembras y 17 machos para *L. buergeri*; 2)- la muestra de *L. kriegi* + *L. ceii* está compuesta por 43 hembras y 55 machos, 3)- tres hembras para *L. tregenzai*; 4)- 21 hembras y 23 machos para *L. sp. A*, 5)- 11 hembras y 11 machos para *L. sp. B*, 6)- nueve hembras y cuatro machos para *L. sp. C*, 7)- ocho hembras y 11 machos para *L. sp. D*.

### Análisis Morfológicos

Para cada ejemplar se registraron dos tipos de caracteres, que usualmente son informativos en otros grupos de especies de *Liolaemus* (Abdala, 2007; Ceii, 1974; Etheridge, 1992; Etheridge y Christie, 2003). Caracteres morfológicos o continuos provenientes de mediciones que representan tamaño corporal: largo hocico-cloaca (LHC): desde el extremo anterior del hocico hasta el borde posterior de las escamas precloacales. Largo tercer dedo anterior (L3DC): longitud de la extremidad anterior desde el codo hasta la uña del tercer dedo. Distancia axila-ingle (DAI): desde la axila de la extremidad anterior derecha hasta la ingle de la extremidad posterior. Largo tibial (LT): largo desde el extremo de la rodilla hasta el extremo del talón. Largo de la cabeza (LC): longitud entre el extremo anterior del hocico hasta la cavidad auricular. Alto de la cabeza (ALCA): alto de la cabeza a la altura de las escamas frontoparietales, el sitio más alto de la cabeza. Largo narina ojo (LNO): longitud entre la narina del lado derecho del cuerpo hasta la comisura del ojo del

mismo lado. Distancia entre narinas (DEN): longitud entre la narina izquierda y la derecha. Largo rostro-interparietal (LRI): longitud entre la escama rostral y la interparietal. El segundo tipo de caracteres fueron conteos de escamas o merísticos, donde se contó el número de escamas entre dos puntos determinados. Escamas alrededor del cuerpo (ALR): número de escamas alrededor del cuerpo a la altura de la mitad del cuerpo. Escamas ventrales (VEN): número de escamas sobre una línea recta ventral imaginaria desde el hocico hasta la línea de la ingle. Escamas dorsales (DOR): número de escamas sobre una línea recta dorsal imaginaria desde el comienzo de las escamas dorsales típicas hasta la línea de la ingle. Los datos morfológicos se registraron con calibre digital de precisión 0.05 mm. Los caracteres de conteo de escamas se realizaron con microscopio estereoscópico.

#### *ANÁLISIS ESTADÍSTICOS*

Para estudiar el grado de dimorfismo sexual de cada uno de los linajes (excepto de *L. tregenzai* que solo presenta 3 individuos), se realizó un MANCOVA de todas las variables en su conjunto, utilizando el programa InfoStat versión 2009 con la variable largo hocico cloaca como co-variable. Al realizarse el MANCOVA para el linaje *L. sp. C*, dado que el número de observaciones menos el número de tratamientos para este taxón es menor o igual que el número de variables, se eliminaron tres variables (largo de la cabeza, distancia axila ingle y largo rostral interparietal) altamente correlacionadas.

Para la comparación entre linajes, se identificaron los grupos a ser comparados de acuerdo al resultado del análisis de dimorfismo sexual. En los linajes que presentan dimorfismo sexual estadísticamente significativos, para la comparación entre linajes se analizan los sexos por separado. Una vez identificados los grupos se realizó un análisis discriminante a fin de visualizar los grandes morfos en el complejo *L. kriegi*.

Posteriormente, se realizó un MANCOVA con largo hocico cloaca como co-variable para estudiar el efecto del tamaño sobre las restantes variables para los linajes *L. buergeri*, *L. sp. A*, *L. sp. C* y *L. sp. D* que mostraban un alto solapamiento (ver resultados). Luego, se realizaron dos análisis, una comparación de medias con contraste posterior (MANCOVA) y un análisis discriminante.

Para el linaje *L. kriegi* + *L. ceii* se identificaron los individuos de cada una de las dos localidades tipo y los individuos correspondientes a las localidades intermedias. Se realizó un MANCOVA con largo hocico cloaca como co-variable, una comparación de medias con contraste posterior (MANCOVA) y un análisis discriminante.

Los análisis estadísticos multivariados se realizaron para todas las variables (tanto continuas como merísticas) de acuerdo a la tendencia de los últimos años en este tipo de estudios (Crochet *et al.*, 2003; Renault *et al.*, 2009; Scolaro *et al.*, 2003).

## RESULTADOS

Los resultados del análisis de dimorfismo sexual (Tabla 3) indican que los linajes *L. buergeri* ( $p < 0.0001$ ), *L. sp. A* ( $p = 0.0043$ ) y *L. kriegi + L. ceii* ( $p < 0.0001$ ) son significativamente dimórficos. En base a estos resultados, los grupos a comparar en el análisis discriminante son: machos de *L. buergeri* (*L. buergeri\_M*), hembras de *L. buergeri* (*L. buergeri\_H*), machos de *L. sp. A* (*L. sp. A\_M*) y hembras de *L. sp. A* (*L. sp. A\_H*), machos de *L. kriegi + L. ceii* (*L. kriegi + L. ceii\_M*) y hembras de *L. kriegi + L. ceii* (*L. kriegi + L. ceii\_H*), machos y hembras de *L. sp. D*, machos y hembras de *L. sp. C*, machos y hembras de *L. sp. B* y las hembras de *L. tregenzai*.

La Figura 10 muestra el resultado del análisis discriminante entre todos los linajes considerados. Los linajes *L. tregenzai* y *L. sp. B* son morfológicamente distintos al resto y entre ellos. Se obtuvo un error del 36%, el porcentaje de variabilidad explicada con los dos primeros ejes canónicos es del 84% (Tabla 4), siendo las variables más explicativas (Tabla 5): largo hocico cloaca, largo de la cabeza y escamas alrededor del cuerpo (para el primer eje canónico) y largo de la cabeza y alto de la cabeza (para el segundo eje canónico).

Tabla 3: Comparación de medias de hembras y machos para todas las variables mediante un MANCOVA para los diferentes linajes: *L. buergeri*, *L. kriegi + L. ceii*, *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C* y *L. sp. D*. Se muestran los valores del estadístico Lambda de Wilks, del estadístico F con sus respectivos grados de libertad y la significancia estadística ( $p$ ) asociados a la prueba de MANCOVA para muestras independientes. Los correspondientes  $p < 0.05$  están marcados en negrita. \* Dado que el número de observaciones menos el número de tratamientos para *L. sp. C*, es menor o igual que el número de variables, se eliminaron tres variables altamente correlacionadas (Largo de la cabeza, Distancia axila ingle y Largo rostral parietal) para realizar esta prueba.

Linaje	Lambda de Wilks	F	gl(num)	gl(den)	p
<i>L. buergeri</i>	0.34	5.73	11	32	<b>&lt;0,0001</b>
<i>L. sp. A</i>	0.45	3.49	11	31	<b>0,0030</b>
<i>L. sp. B</i>	0.26	2.30	11	09	0.1107
<i>L. sp. C</i> *	0.22	1.33	08	03	0,4400
<i>L. sp. D</i>	0.15	3.18	11	06	0,0832
<i>L. kriegi + L. ceii</i>	0.53	6.90	11	85	<b>&lt;0.0001</b>

En el análisis de las medias de los linajes relacionados a *L. buergeri* (*L. buergeri*, *L. sp. A*, *L. sp. C* y *L. sp. D*) se obtuvo una diferencia significativa (MANCOVA,  $p < 0.0001$ ) y en los contrastes *a posteriori* se obtuvo que todos los grupos son significativamente distintos entre sí (Tabla 6a y b). En el análisis discriminante (Tablas 7 y 8, Figura 11) se obtuvo un error total del 38%, el porcentaje de variabilidad explicada con los dos primeros

ejes canónicos es del 80,51%, siendo las variables más explicativas: largo hocico cloaca, largo de la cabeza y largo tibial (para el primer eje canónico) y escamas alrededor del cuerpo (segundo eje canónico).

Tabla 4: Proporción de los autovalores, que representan la variabilidad de los datos en cada una de las direcciones de los autovectores (conjunto de vectores bases para graficar los datos) del análisis de componentes principales para todas las variables y su proporción acumulada, relacionados a la Figura 10. El primer eje canónico (asociado con el mayor de los autovalores), permite visualizar la máxima separación entre los grupos.

Autovalores	%	% acumulado
6.64	70.47	70.47
1.34	14.22	84.69
0.80	8.51	93.19
0.29	3.10	96.30
0.22	2.28	98.58
0.09	1.01	99.59
0.02	0.25	99.84
0.01	0.12	99.96
3.7E-03	0.04	100.00

Tabla 5: Funciones discriminantes: datos estandarizados con la varianzas comunes del análisis discriminante relacionados a la Figura 10. En negrita los valores de las variables más explicativas.

Variable	1	2
Largo hocico cloaca	<b>1.22</b>	-0.28
Largo de la cabeza	<b>-1.19</b>	<b>-1.44</b>
Alto de la cabeza	0.6	<b>1.46</b>
Distancia entre narinas	0.28	0.71
Largo tercer dedo anterior	0.13	0.84
Largo tibial	-0.6	-0.55
Distancia axila-ingle	-7.20E-04	-0.04
Largo narina ojo	-0.39	-0.18
Largo rostro-interparietal	-0.2	-0.01
Escamas dorsales	0.22	0.11
Escamas ventrales	-0.39	-0.47
Escamas alrededor del cuerpo	<b>0.87</b>	-0.38

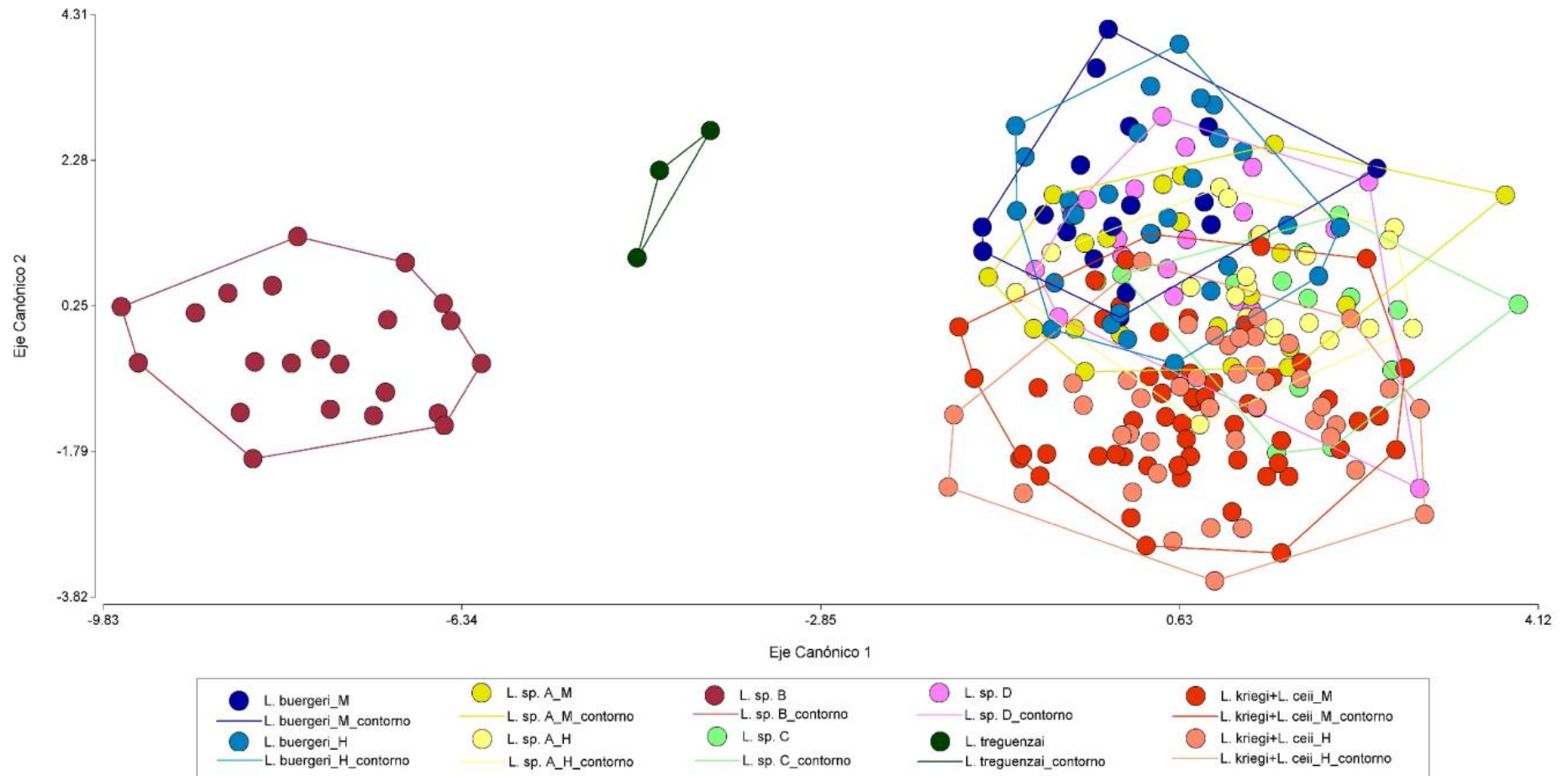


Figura 10: Resultado del análisis discriminante entre los linajes *L. buergeri*, *L. tregenzai*, *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C*, *L. sp. D* y *L. kriegi + L. ceii*. Agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia de dimorfismo sexual.

Tabla 6: Resultados del MANCOVA para los linajes divididos por sexo en los casos en que fueron significativamente dimórficos. a- Se muestran los valores del estadístico Lambda de Wilks, del estadístico F con sus respectivos grados de libertad y la significancia estadística ( $p$ ) asociados a la prueba MANCOVA. b- Contraste *a posteriori*. Letras distintas indican diferencias significativas del contrasta *a posteriori* con un  $p \leq 0.05$ . Largo hocico-cloaca (LHC), largo de la cabeza (LC), alto de la cabeza (ALCA), distancia entre narinas (DEN), largo tercer dedo anterior (L3DC), largo tibial (LT), distancia axila-ingle (DAI), largo narina ojo (LNO), largo rostro-interparietal (LRI), escamas dorsales (DOR), escamas ventrales (VEN), escamas alrededor del cuerpo (ALR).

Tabla 6 a

Fte. de Variación	Lambda de Wilks	F	gl(num)	gl(den)	p
Linajes	0.15	4.09	60	491	<0.0001

Tabla 6 b

Linajes	LHC	LC	ALCA	DEN	L3DC	LT	DAI	LNO	LRI	DOR	VEN	ALR	
<i>L. sp. A_H</i>	86,29	17,02	10,07	3,42	23,80	15,39	38,25	4,18	12,25	103,52	122,38	102,05	A
<i>L. sp. A_M</i>	85	17,64	10,36	3,55	24,28	16,05	35,26	4,32	12,53	101,78	120,39	101,74	B
<i>L. sp. C</i>	89	17,45	10,30	3,49	23,72	15,38	39,61	3,82	12,71	105,92	127,08	103,77	C
<i>L. sp. D</i>	95,05	18,21	10,85	3,57	25,83	16,34	43,57	4,04	13,19	103	124,42	98,21	D
<i>L. buergeri_H</i>	84,25	16,73	09,95	3,51	23,29	14,87	37,32	4,06	12,24	102,93	119,43	96,46	E
<i>L. buergeri_M</i>	90,06	18,64	11,21	3,75	25,13	16,44	37,94	4,34	13,31	101,29	118,06	97,53	F

Tabla 7: Proporción de los autovalores, que representan la variabilidad de los datos en cada una de las direcciones de los autovectores (conjunto de vectores bases para graficar los datos) del análisis de componentes principales para todas las variables y su proporción acumulada, relacionados a la Figura 8. El primer eje canónico (asociado con el mayor de los autovalores), permite visualizar la máxima separación entre los grupos.

Autovalores	%	% acumulado
1.32	49.70	49.70
0.82	30.81	80.51
0.30	11.28	91.79
0.20	7.49	99.28
0.02	0.72	100

Tabla 8: Funciones discriminantes: datos estandarizados con la varianzas comunes del análisis discriminante relacionados a la Figura 8. En **negrita** los valores de las variables más explicativas.

Variable	1	2
Largo hocico cloaca	<b>-2.53</b>	-0.81
Largo de la cabeza	<b>1.43</b>	0.40
Alto de la cabeza	-0.10	-0.02
Distancia entre narinas	0.74	0.55
Largo tercer dedo anterior	0.09	0.52
Largo tibial	<b>1.42</b>	-0.10
Distancia axila-ingle	-0.52	0.08
Largo narina ojo	0.56	-0.22
Largo rostro-interparietal	-0.77	-0.26
Escamas dorsales	-0.16	0.27
Escamas ventrales	-0.28	-0.22
Escamas alrededor del cuerpo	0.21	<b>-1.02</b>



Tabla 9: Resultados del MANOVA para los linajes divididos por sexo en los casos en que fueron significativamente dimórficos. a- Se muestran los valores del estadístico Lambda de Wilks, del estadístico F con sus respectivos grados de libertad y la significancia estadística ( $p$ ) asociados a la prueba MANOVA. b- Contraste *a posteriori*. Letras distintas indican diferencias significativas del contrasta *a posteriori* con un  $p \leq 0.05$ . Largo hocico-cloaca (LHC), largo de la cabeza (LC), alto de la cabeza (ALCA), distancia entre narinas (DEN), largo tercer dedo anterior (L3DC), largo tibial (LT), distancia axila-ingle (DAI), largo narina ojo (LNO), largo rostro-interparietal (LRI), escamas dorsales (DOR), escamas ventrales (VEN), escamas alrededor del cuerpo (ALR).

Tabla 9 a

Fte. de Variación	Lambda de Wilks	F	gl(num)	gl(den)	p
Linajes	1.45	11.20	11	85	<0.0001

Tabla 9 b

Linajes	LHC	LC	ALCA	DEN	L3DC	LT	DAI	LNO	LRI	DOR	VEN	ALR	
<i>L. ceii_H</i>	16.13	9.12	3.19	21.62	13.76	37.07	3.89	11.73	104.27	126.26	101.00	16	A
<i>L. kriegi_M</i>	16.76	9.29	3.19	23.87	15.01	33.80	4.34	11.80	104.79	124.67	104.67	3	B C D E
<i>L. kriegi + L. ceii_H</i>	16.50	9.04	3.11	21.86	14.97	37.06	4.00	11.72	103.79	127.97	103.17	24	B
<i>L. kriegi + L. ceii_M</i>	17.04	9.23	3.12	23.21	15.44	34.71	3.99	11.85	102.33	126.22	103.71	33	C
<i>L. ceii_M</i>	16.68	9.32	3.18	22.31	14.75	34.17	3.89	12.02	103.24	123.87	102.24	19	D
<i>L. kriegi_H</i>	16.78	9.07	3.54	23.31	14.76	36.24	3.50	13.25	114.86	140.63	109.28	3	E

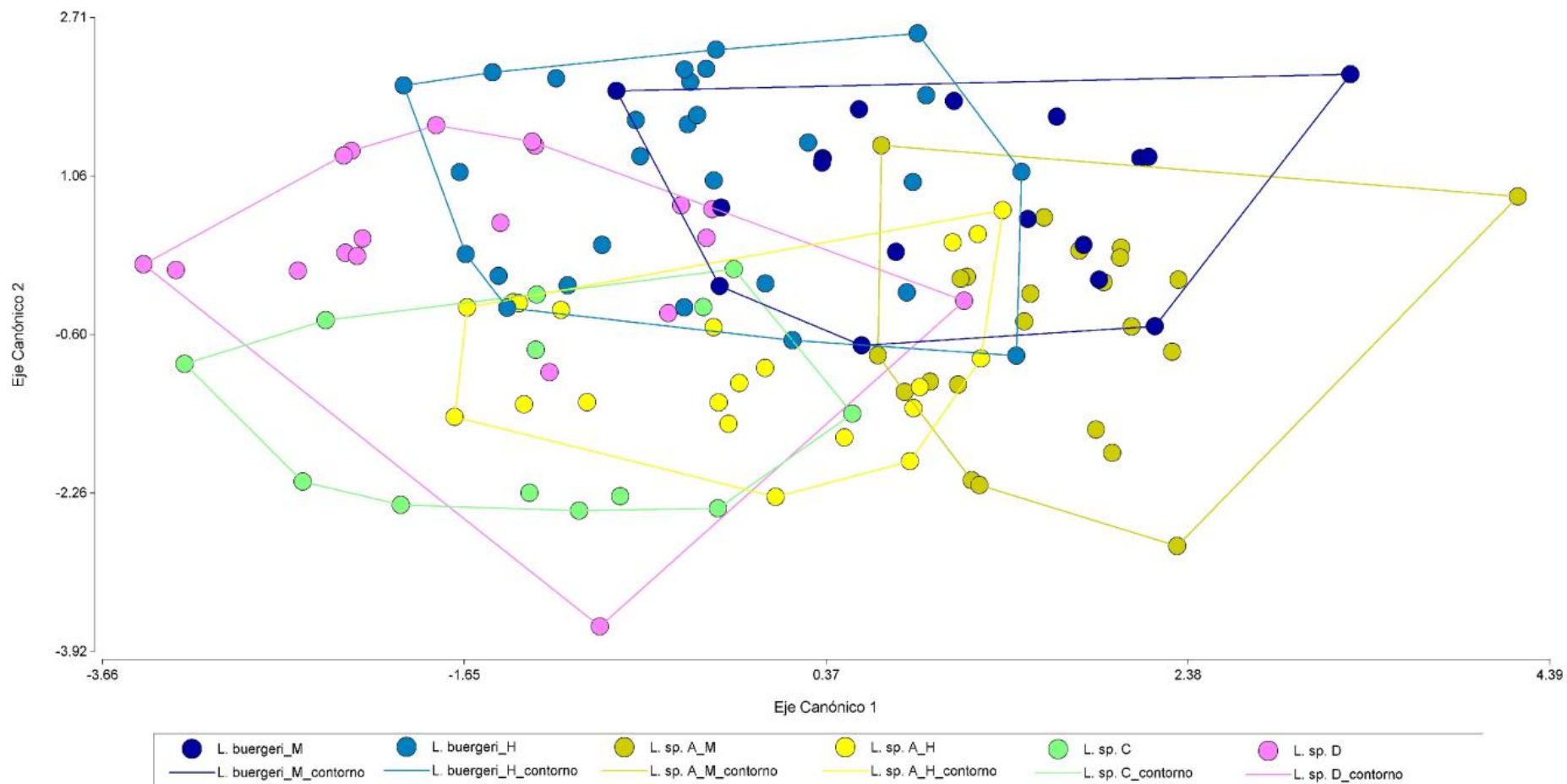


Figura 11: Resultado del análisis discriminante entre los linajes relacionados a *L. buergeri* (*L. buergeri*, *L. sp. A*, *L. sp. C*, *L. sp. D*). Agrupados de acuerdo a la presencia o ausencia de dimorfismo sexual.

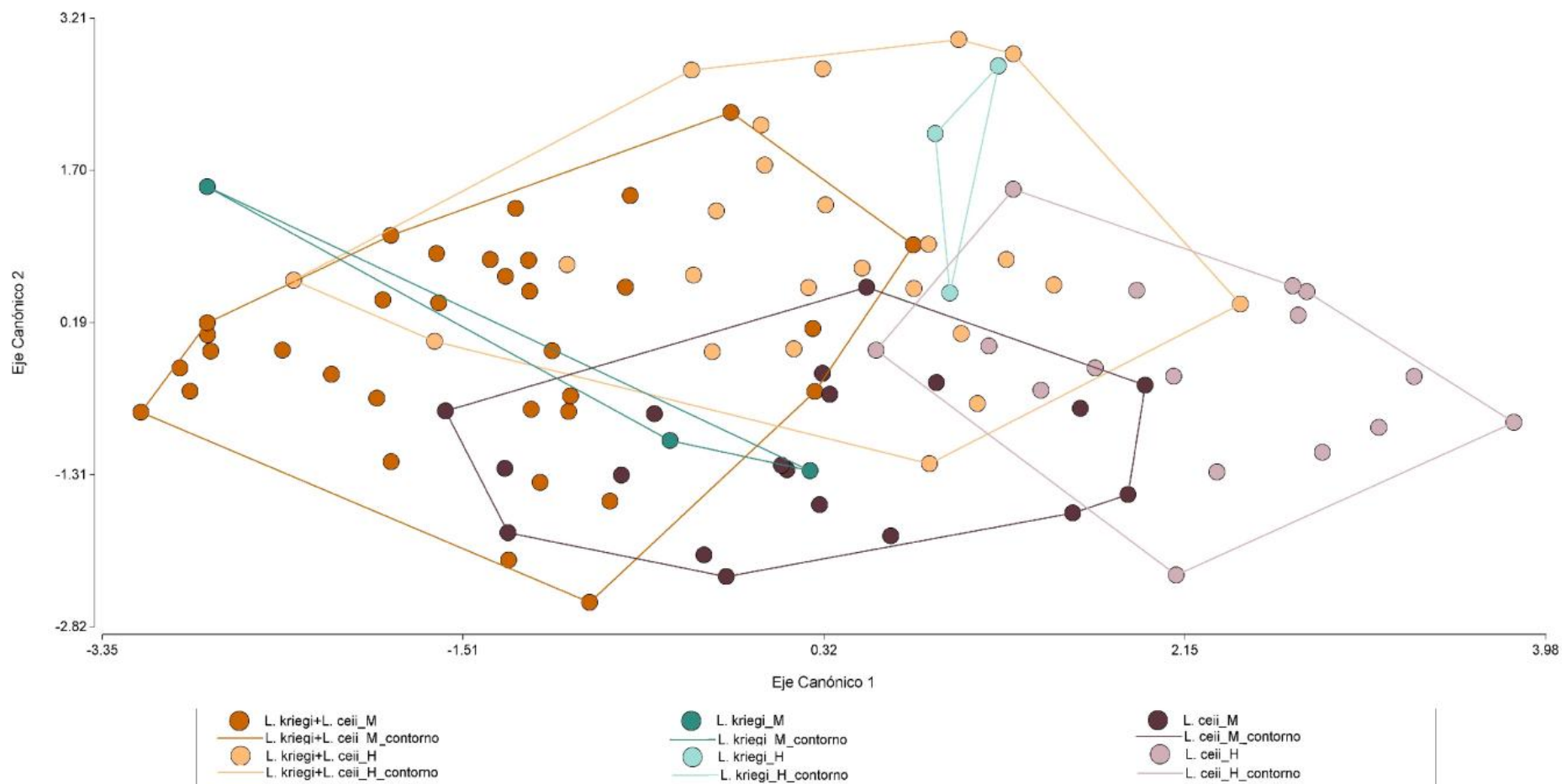


Figura 12: Resultado del análisis discriminante entre las localidades tipo de *L. kriegi* y *L. ceii* y las localidades intermedias presentes para el linaje *L. kriegi* + *L. ceii*.

La Figura 12 muestra el resultado del análisis discriminante del linaje *L. kriegi* + *L. ceii* diferenciados según las localidades tipo de cada una de las especies descriptas y las localidades intermedias. Se obtuvo un error total del 27.5%, el porcentaje de variabilidad explicada con los dos primeros ejes canónicos es del 79% (Tabla 10), siendo las variables más explicativas (Tabla 11): largo hocico cloaca, largo de la cabeza y largo tibial (para el primer eje canónico) y largo hocico cloaca, largo tibial y distancia axila-ingle (segundo eje canónico). En el MANCOVA se obtuvo una diferencia significativa (MANCOVA,  $p < 0.0001$ , Tabla 9 a y b) y en los contrastes *a posteriori* se obtuvo que los individuos de todas las localidades agrupadas son morfológicamente distintos entre sí, excepto por los machos de la localidad tipo de *L. kriegi* que son significativamente distintos a las hembras de la localidad tipo de *L. ceii* pero no presenta diferencias morfológicas significativas con el resto de los individuos de las localidades agrupadas.

Tabla 10: Proporción de los autovalores, que representan la variabilidad de los datos en cada una de las direcciones de los autovectores (conjunto de vectores bases para graficar los datos) del análisis de componentes principales para todas las variables y su proporción acumulada, relacionados a la Figura 12: El primer eje canónico (asociado con el mayor de los autovalores), permite visualizar la máxima separación entre los grupos.

Autovalores	%	% acumulado
1.72	58.42	58.42
0.61	20.59	79.00
0.40	13.59	92.59
0.16	05.49	98.08
0.06	01.92	100

Tabla 11: Funciones discriminantes: datos estandarizados con la varianzas comunes del análisis discriminante relacionados a la Figura 12. En negrita los valores de las variables más explicativas.

Variable	1	2
Largo hocico cloaca	<b>1.43</b>	<b>-1.17</b>
Largo de la cabeza	<b>-2.31</b>	-0.74
Alto de la cabeza	0.43	-1.02
Distancia entre narinas	0.89	0.40
Largo tercer dedo anterior	-0.35	-0.50
Largo tibial	<b>-1.33</b>	<b>1.28</b>
Distancia axila-ingle	0.57	<b>1.48</b>
Largo narina ojo	0.16	0.64
Largo rostro-interparietal	0.30	0.22
Escamas dorsales	0.09	-0.05
Escamas ventrales	0.35	0.73
Escamas alrededor del cuerpo	-0.38	0.14

## DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue analizar las variaciones morfológicas, en base a datos morfométricos y de escamación, entre los linajes del complejo *Liolaemus kriegi* (*L. buergeri*, *L. tregenzai*, *L. sp. A*, *L. sp. B*, *L. sp. C*, *L. sp. D* y *L. kriegi* + *L. ceii*) identificados en el capítulo I, con el fin de aportar una nueva fuente de evidencia, independiente de la molecular, para el análisis del nivel de soporte de estas hipótesis de especies. En primer lugar, los resultados de este trabajo detectan diferencias estadísticamente significativas, en el nivel de dimorfismo sexual entre los linajes estudiados. *Liolaemus buergeri*, *L. sp. A* y *L. kriegi* + *L. ceii* presentan dimorfismo sexual, mientras que *L. sp. B*, *L. sp. C* y *L. sp. D* no presentan diferencias significativas entre machos y hembras con las variables estudiadas (Tabla 3). El dimorfismo sexual es un fenómeno común entre los animales, y las causas más frecuentemente citadas para explicar este fenómeno son selección sexual, selección por fecundidad y causas ecológicas (e.g. partición de recursos, divergencia de nicho) (Andersson, 1994; Shine, 1989). Aunque son necesarios estudios detallados para evaluar cuál de éstas puede ser la causa subyacente del dimorfismo sexual en *L. buergeri*, *L. sp. A* y *L. kriegi* + *L. ceii*, las diferencias entre los sexos en estos linajes son estadísticamente significativas. Desde el punto de vista taxonómico, las diferencias halladas en esta característica son muy útiles para diferenciar estos linajes.

El primer análisis discriminante (Figura 10, Tabla 4 y 5) muestra que los linajes *L. sp. B* y *L. tregenzai* son morfológicamente distintos entre ellos y al resto de los linajes. Esto es concordante con las hipótesis moleculares planteadas para estos linajes. *Liolaemus sp. B* presentó la mitocondria similar al complejo *L. kriegi* pero los genes nucleares se recuperaron dentro del grupo *L. petrophilus*, similar a lo encontrado por Feltrin (2013), en base a análisis morfológicos y genes nucleares. En el capítulo V, que presenta los resultados de una filogenia multilocus, se encontró a *L. tregenzai* como hermano del resto de las especies del complejo *L. kriegi*, contrastante con la posición anidada en que se lo encontró en el análisis de genes mitocondriales del capítulo I.

El análisis comparativo de las medias de los linajes (MANCOVA, Tabla 6a y b) muestra que son significativamente distintos, tanto para los linajes con dimorfismo sexual, como para los que no presentaron dimorfismo. Pero, debido a que en el análisis discriminante (Figura 11, Tabla 7 y 8) se obtuvo un error del 38% promedio para todos los

linajes, a pesar de que los mismos sean significativamente distintos en sus promedios de medidas, la discriminación entre ellos puede ser errónea. A pesar de que en el análisis discriminante (Figura 11) se observan diferentes grados de solapamiento entre los linajes estudiados, se puede apreciar que *L. sp. A* posee el mayor grado de dimorfismo sexual, y que los machos de *L. sp. A* casi no tienen solapamiento con *L. sp. C* y es mínimo con *L. sp. D*. Por otro lado la dispersión de la muestra de *L. sp. C* está casi por completo contenida dentro de la de *L. sp. D*. Cabe destacar que la distribución geográfica de estos linajes es disyunta, con una distancia de 200 km en línea recta, y están separadas por una importante barrera geográfica, que es el valle del Río Barrancas. Por otro lado *L. sp. D*, que se encuentra geográficamente cercana a la localidad tipo de *L. buergeri*, casi no presenta solapamiento con los machos de *L. buergeri* y parcialmente con las hembras de *L. buergeri*. Los machos de *L. buergeri* están parcialmente solapados con las hembras de *L. buergeri* y con los machos de *L. sp. A*, situada a 300 km en línea recta hacia el sur. A pesar de que se podría suponer que estas diferencias tienen alguna relación con las presiones ambientales diferenciales en estas áreas, estudios recientes realizados con especies de *Liolaemus* (Pincheira-Donoso *et al.*, 2009; Schulte II *et al.*, 2004), no encuentran relación entre el hábitat y la morfología. Sin embargo otros estudios en Liolaemini (Tulli *et al.*, 2011) encontraron una relación positiva entre las dimensiones de las extremidades posteriores y la fuerza máxima ejercida; hay otro ejemplo (Luxbacher y Knouft, 2009) donde se demostró una correlación entre las características morfológicas con el nicho ambiental y se pudo inferir que aquellas poblaciones que se encuentran en ambientes similares en la misma región fitogeográfica, posiblemente estén sometidas a presiones de selección semejantes. Por lo tanto, sería interesante en el caso de los linajes estudiados en este trabajo caracterizar sus nichos para evaluar si hay alguna relación entre características morfológicas y nicho.

Según los resultados del MANCOVA (Tablas 9 a y b) entre las dos localidades tipo de *L. ceii* y *L. kriegi* y las localidades intermedias correspondientes a lo que se denominó linaje *L. kriegi* + *L. ceii*, habría una diferencia morfológica significativa entre ellas divididas por sexo, a excepción de los machos de la localidad tipo de *L. kriegi* que serían similares a todos los individuos de las restantes localidades a excepción de las hembras de la localidad tipo de *L. ceii*. De acuerdo a los resultados del análisis discriminante (Figura 12) se puede observar que los individuos machos de la localidad tipo de *L. kriegi* no son tan similares al resto de los linajes como muestra el resultado de MANCOVA (Tabla 9 a y

b), esta diferencia de resultados entre ambos métodos se puede deber al bajo número de machos en la localidad tipo de *L. kriegi* (N=3) y la alta variabilidad comparada con el resto de las poblaciones. Esto implica que los intervalos estimados para la comparación de medias son amplios y se solapan con el resto de las agrupaciones subestimando la diferencia entre ellos.

Cei (1986) afirma que *Liolaemus kriegi* y *L. ceii* serían simpátricas en su rango de distribución; por otro lado en trabajos previamente publicados (Medina *et al.*, 2014; Morando *et al.*, 2003) y según resultados de esta tesis no encontraron diferencias moleculares entre las dos especies descritas. En este capítulo se encontró evidencia de una diferencia morfológica entre las localidades tipo de estas especies y las localidades intermedias de sus rangos de distribución. Estos resultados no permiten realizar aseveraciones concluyentes, ya que *L. ceii* y *L. kriegi* podrían representar dos especies de divergencia reciente, con diferencias leves en su morfología, pero sin variación aun en su información genética; alternativamente, estos dos nombres podrían corresponder a una sola especie con variación morfológica según la localidad.

Con respecto a los linajes relacionados a *L. buergeri* (*L. buergeri*, *L. sp. A*, *L. sp. C* y *L. sp. D*), los resultados de estos análisis morfológicos apoyan, de manera independiente, las hipótesis de especies planteadas en base a datos de secuencias de genes mitocondriales. Bajo el marco conceptual de la taxonomía integral, esta evidencia morfológica le otorga mayor estabilidad a estas hipótesis, avalando que estos linajes podrían constituir linajes que evolucionan independientemente y cada uno posee características particulares e individualizables.

## CAPÍTULO III

### FILOGEOGRAFÍA MULTILOCUS DEL COMPLEJO DE LAGARTIJAS PATAGÓNICAS *LIOLAEMUS ELONGATUS* (IGUANIA: LIOLAEMINI)



## INTRODUCCIÓN

Dentro del subgénero *Liolaemus* (SE), también denominado grupo *L. chiliensis*, se han reconocido varios clados y complejos de especies, uno de los cuales es el grupo *Liolaemus elongatus-kriegi*, que incluye a los complejos *L. elongatus*, *L. kriegi* y *L. petrophilus* (*sensu* Morando *et al.* 2003). El complejo *L. elongatus* comprende especies exclusivamente distribuidas en la región Patagónica, con límites generales establecidos entre las latitudes 35°06'50"S y 45°42'40,5"S. La especie que nomina al grupo es en realidad un clado de varias especies cuya identidad aún es confusa y de situación taxonómica irresuelta, con algunas especies candidatas que fueron propuestas por Morando *et al.* (2003). En ese estudio se encontró que la especie *L. elongatus* que incluye diversas poblaciones distribuidas desde el suroeste de Chubut hasta sur de Mendoza, conforman varios haploclosos relacionados, geográficamente concordantes y con valores de soporte estadístico altos (*L. sp.* 5 –posteriormente descrita como *L. smaug* por Abdala *et al.*, 2010, *L. sp.* 6, *L. sp.* 7 y la propiamente llamada *L. elongatus*). Diversos estudios posteriores (detallados en la introducción general de la tesis), han considerado o sugirieron como parte de este complejo a ocho especies: *L. chillanensis*, *L. burmeisteri*, *L. shitan*, *L. choique*, *L. smaug*, *L. crandalli*, *L. antumalguen* y *L. carlosgarini*. Un caso particular a considerar es *L. parvus* (Quinteros *et al.*, 2008), que fue descrita en base a morfología, y propuesta como parte del grupo *capillitas* (según, Díaz Gómez *et al.*, 2006; Lobo, 2005) pero fenotípicamente es más similar a *L. elongatus* que a los integrantes de este grupo; pero esta similitud morfológica aún no se ha puesto a prueba de manera formal. Por otro lado, estudios en base a secuencias mitocondriales y nucleares, ubican a *L. parvus* dentro del complejo *L. petrophilus* (Avila *et al.*, 2004; Feltrin, 2013; Morando *et al.*, 2003).

Las distribuciones geográficas de las especies descritas y candidatas dentro del complejo *L. elongatus* están solapadas en varias localidades (Figura 13) y tanto el conocimiento de sus límites de especie y de sus relaciones taxonómicas es muy escaso, siendo el único antecedente de estudio filogeográfico, el realizado por Morando *et al.* (2003), hace más de una década atrás.

Este complejo de lagartijas habita principalmente, la zona del noroeste de la Patagonia, la cual es una región geográficamente muy compleja, como se detalló en el capítulo I de esta tesis para el complejo *L. kriegi*, que en general es simpátrico con el complejo *L. elongatus* en las provincias de Río Negro, Neuquén y sur de Mendoza. Debido

a que el paisaje es una fisiografía intrincada, que aumenta su complejidad hacia el norte, es probable que haya facilitado múltiples procesos de divergencia poblacional a través de diferentes escalas geográficas y temporales (Morando *et al.*, 2013); por lo tanto se espera un alto número de especies de lagartijas en esta región (Avila *et al.*, 2013; Corbalán *et al.*, 2011), particularmente en la zona más boreal, correspondiente al norte de Neuquén.

El objetivo general de este capítulo es examinar la estructura genética y sus patrones de variación en el complejo *L. elongatus*, en base a muestras provenientes de todo el rango de distribución. Se incluyeron 12 taxa: nueve especies descritas (*L. chillanensis*, *L. antumalguen*, *L. burmeisteri*, *L. smaug*, *L. carlosgarini*, *L. elongatus*, *L. shitan*, *L. choique*, *L. crandalli*), una en proceso de descripción (*L. sp. 1*, Esquerré, comunicación personal) y dos especies candidatas (*L. sp. 6* y *L. sp. 7*, Morando *et al.*, 2003), para las cuales se secuenciaron dos regiones de genes mitocondriales (citocromo-b y 12S) y dos nucleares (LDAB1D y KIF24).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### INDIVIDUOS UTILIZADOS

Las localidades muestreadas fueron seleccionadas con el objetivo de cubrir el rango de distribución total del complejo *L. elongatus*. Se obtuvieron muestras de los 12 linajes identificados (Figura 13), incluyendo un total de 581 individuos provenientes de 113 localidades desde el sur de Mendoza (35°11'S) hasta el sur de Chubut (45°71'S) en Argentina, y seis localidades de un pequeño rango de distribución en Chile. Para analizar la posibilidad de que *L. parvus* pudiera pertenecer a este complejo, también se incluyeron individuos de su localidad tipo. Los números de *vouchers* de los especímenes con su detalle de localidad se encuentran reportados en el Apéndice VI. Los especímenes fueron colectados a mano y sacrificados por inyección pericárdica de pentotal sódico. Se extrajeron muestras de hígado para análisis moleculares, los especímenes fueron fijados en formol 20% y luego transferidos a etanol 70%. La mayoría de los *vouchers* de especímenes y tejidos están catalogados en la colección herpetológica Centro Nacional Patagónico en Puerto Madryn (LJAMM-CNP), Argentina (<http://www.cenpat.edu.ar/nuevo/colecciones03.html>). Para este capítulo se incluyeron siete muestras de tejidos de la colección personal de Miguel I. Christie (MIC). Se utilizaron seis muestras de *L. petrophilus*, *L. buergeri* y *L. tregenzai* las cuales representan grupos filogeográficamente relativamente cercanos y se usó una muestra de *L. bibronii* para enraizar el árbol.

### EXTRACCIÓN DE DNA, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO

La extracción de ADN se realizó utilizando el kit de extracción Qiagen® DNeasy® 96 siguiendo el protocolo provisto por el fabricante. Para este capítulo se secuenciaron dos fragmentos mitocondriales (12S rRNA [12S ~853bp, 71 individuos, Wiens *et al.*, 2010] y citocromo-b [cit-b, ~800bp, 581 individuos, Kocher *et al.*, 1989]) y dos nucleares (un miembro de la familia de las quinesinas 24 [KIF24 ~417 bp, 56 individuos, Portik *et al.*, 2011]) y un gen nuclear anónimo LDAB1D [LDAB1D ~495 bp, 46 individuos, Camargo, *et al.*, 2012]). Para los protocolos de PCR y secuenciamiento se siguió a Morando *et al.* (2004; 2003) y Noonan y Yoder (2009) para los fragmentos mitocondriales y nucleares, respectivamente. Todas las secuencias fueron editadas y alineadas usando Sequencher v4.10. (™Gene Codes Corporation Inc. 2007), se verificó a ojo para maximizar bloques de identidad de secuencia y los datos faltantes se codificaron como “?”. Se secuenció el

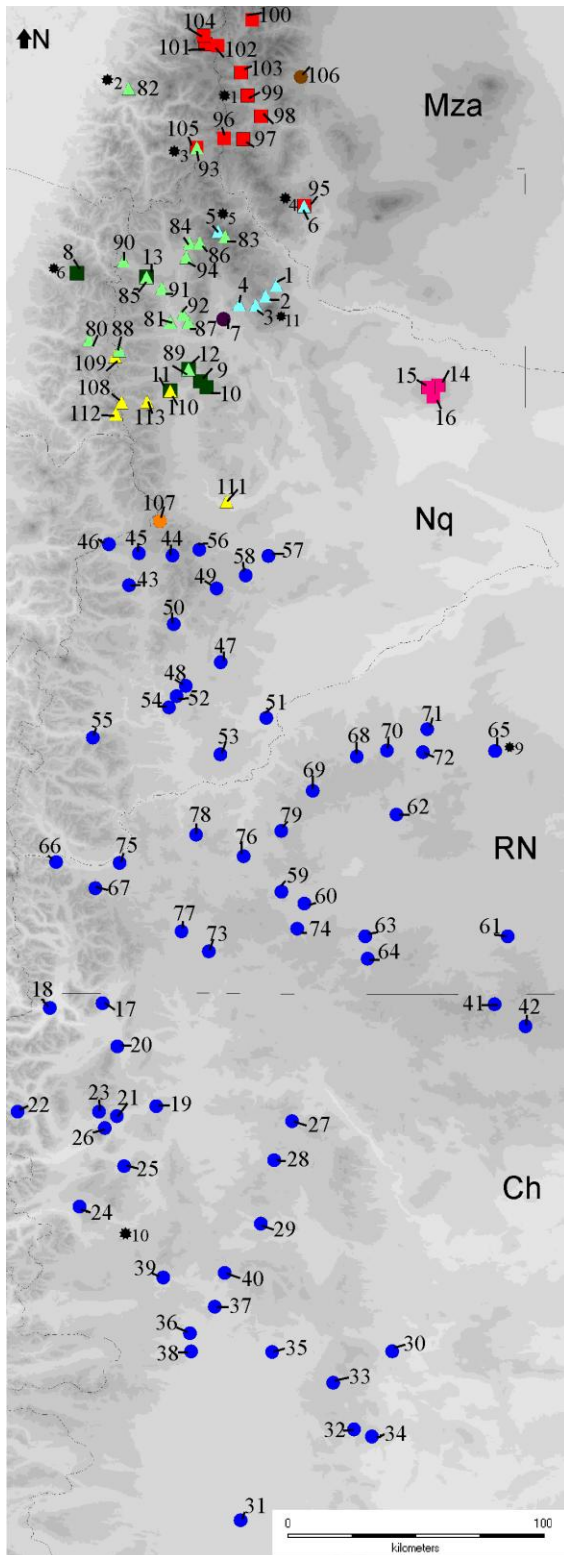


Figura 13: Las localidades muestreadas para el complejo *L. elongatus* están identificadas según los resultados del árbol de citocromo-b (figura 14) de la siguiente manera: *L. antumalguen* + *L. sp. 7*, triángulos celestes (1–6); *L. burmeisteri*, círculo morado (7); *L. chillanensis*, cuadrados verdes oscuros (8–13); *L. crandalli*, cuadrados rosas (14–16); *L. elongatus* + *L. shitan*, círculos azules (17–79); *L. carlosgarini* + *L. sp. 1*, triángulos verdes claros (80–94); *L. smaug*, cuadrados rojos (95–105); *L. sp. 2*, círculo marrón (106); *L. sp. 3*, círculo naranja (107); *L. sp. 6*, triángulos amarillos (108–113). Ch= Provincia de Chubut, Nq= Provincia de Neuquén, Mza= Provincia de Mendoza y RN=Provincia de Río Negro. Los números de las localidades se corresponden con los del Apéndice VI (Los colores coinciden con aquellos en las Figuras 3 & 4). Las localidades tipo ó localidades de especies candidatas aparecen identificadas con un asterisco según, \*1- *L. smaug*, \*2- *L. sp. 1*, \*3- *L. carlosgarini*, \*4- *L. choique*, \*5-*L. antumalguen*, \*6- *L. chillanensis*, \*9- *L. shitan*, \*10- *L. elongatus* (esta localidad tipo es el “territorio del oeste de Chubut”, por lo que se puso el asterisco en un punto estimado) y \*11- *L. sp. 7*.

fragmento de citocromo-b para los 581 individuos colectados, mientras que para 12S y los dos marcadores nucleares, se seleccionó una submuestra que incluyera al menos dos representantes de cada haploclado recuperado en base al gen mitocondrial citocromo-b. La matriz completa de citocromo-b se utilizó para todos los análisis, la matriz completa de 12S se utilizó para obtener una red de haplotipos y los marcadores KIF24 y LDAB1D fueron utilizados tanto para obtener redes de haplotipos de cada gen por separado como una red combinada multilocus de ambos genes nucleares.

#### *ANÁLISIS DE ÁRBOLES DE GENES Y REDES.*

Para obtener un árbol del gen citocromo-b, primero se seleccionaron haplotipos no redundantes con el programa DnaSP 5.10 (Librado y Rozas, 2009), y luego se utilizó esta matriz para inferir una genealogía de genes con un método de inferencia Bayesiana (IB). Previamente, se seleccionó el modelo evolutivo que mejor se ajusta para el fragmento de citocromo-b usando el criterio de información Akaike corregido (AICc) en JModelTest v0.1.1 (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008). Los análisis fueron realizados usando el programa MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), se corrieron  $5 \times 10^7$  generaciones, y se utilizaron las muestras de equilibrio (después del 25% de *burn-in*) para generar un árbol de consenso con la regla de la mayoría del 50%; las probabilidades posteriores (PP) fueron consideradas significativas cuando fueron  $\geq 0.95$  (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Con el objetivo de identificar los linajes dentro del complejo *L. elongatus*, se buscaron haploclados que contuvieran individuos de las localidades tipos de las especies descritas y haploclados que incluyeran individuos de las localidades asignadas a especies candidatas por Morando *et al.* (2003). Para las matrices completas de los haplotipos de citocromo-b, 12S y de los genes nucleares KIF24 y LDAB1D, previamente separados en fases con el programa DnaSP (Librado y Rozas, 2009), se generaron redes de haplotipos de parsimonia estadística bajo el criterio de probabilidad del 95% usando el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000). También se generó una red multilocus convirtiendo la matriz de distancia de los haplotipos de cada gen nuclear por separado en una matriz de organismos utilizando el programa POFAAD v1.03 (Joly y Bruneau, 2006). La reconstrucción de la red de organismos fue luego visualizada utilizando el algoritmo NeighborNet implementado en SplitsTree v4.6 (Huson y Bryant, 2005) siguiendo a Leaché *et al.* (2009). También se realizaron los siguientes análisis: 1- se estimó un árbol de genes nucleares concatenados basados en inferencia bayesiana utilizando MrBayes v3.2, se corrieron  $1 \times 10^7$  generaciones, y se utilizaron las muestras de

equilibrio (después del 25% de *burn-in*) para generar un árbol consenso con la regla de la mayoría del 50%; las probabilidades posteriores (PP) fueron consideradas significativas cuando fueron  $\geq 0.95\%$  (Huelsenbeck y Ronquist, 2001); 2- una red de genes mitocondriales concatenados bajo el criterio de probabilidad del 95% usando el programa TCS 1.21. Se puso a prueba la recombinación para las regiones de los genes nucleares utilizando el programa RDP v3.44 (Heath *et al.*, 2006; Martin y Rybicki, 2000).

#### ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

Se utilizó el programa Arlequin v3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) para calcular las distancias genéticas (corregida y no corregida de a pares) entre los diferentes linajes inferidos en los árboles de genes. Siguiendo el criterio descrito para anfibios por Fouquet *et al.* (2007), que controla las distancias genéticas combinadas con los linajes de distribución alopatrica, se utilizó la distancia no corregida específica de citocromo-b estimada para *Liolaemus* por Martínez (2012) y Breitman *et al.* (2012), la cual es en promedio de 3% para comparaciones de a pares. Por lo tanto, se consideraron como especies candidatas aquellos taxa cuyas distancias genéticas fueron mayores a 3% y provienen de áreas geográficamente aisladas. Se empleó la matriz de citocromo-b para estimar tiempos de divergencia entre los principales linajes del complejo *L. elongatus* con el modelo molecular evolutivo que mejor se ajustó y se realizó un *Likelihood Ratio Test* (LRT) utilizando el programa JModeltest v0.1.1 (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008) para poner a prueba desviaciones del reloj molecular estricto. Se aplicó la tasa de evolución para el citocromo-b de  $2.23 \times 10^{-2}$  estimada por Fontanella *et al.* (2012) para el clado *Eulaemus* calibrado con un fósil. Luego, se utilizó BEASTv1.8.1 para estimar el árbol de genes bajo un modelo de reloj molecular relajado (Drummond y Rambaut, 2007). Se realizaron dos análisis independientes para 100 millones de generaciones, muestreado cada 1.000 generaciones, con un modelo de sustitución nucleotídica GTR + G y asumiendo un prior de árbol Yule. El tamaño de muestreo efectivo (ESS) para parámetros estimados y la convergencia fue verificado utilizando Tracer v1.5 (Rambaut y Drummond, 2009).

#### ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS

Para cada uno de los linajes principales inferidos con el árbol del gen mitocondrial y para el conjunto de los linajes (*L. antumalguen* + *L. chillanensis* + *L. sp. 6a* + *L. sp. 6b*, ver resultados), se calcularon índices de diversidad molecular básicos: número de secuencias (NS), sitios polimórficos (S), haplotipos (H), diversidad haplotídica (Hd) y diversidad nucleotídica (Pi). Se realizaron la prueba de neutralidad de Tajima (1989) y la prueba de

Ramos-Onsins y Rozas (2002) para evaluar posibles cambios temporales en el tamaño poblacional; todas las estimaciones fueron calculadas usando el programa DnaSP. También se realizaron análisis de *Bayesian Skyline Plots* (BSP), el cual estima cambios en el tamaño poblacional efectivo a través del tiempo, para *L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. carlosgarini*, *L. smaug*, *L. elongatus* + *L. shitan*, *L. crandalli* y el conjunto de los linajes (*L. antumalguen* + *L. chillanensis* + *L. sp. 6a* + *L. sp. 6b*). Se utilizó un reloj molecular relajado con un modelo específico de evolución molecular para cada linaje y se corrieron  $2 \times 10^7$  iteraciones, muestreadas cada 1.000 iteraciones, y se analizó la convergencia de los parámetros con Tracer v1.5 (Rambaut y Drummond, 2009). Estos análisis no se realizaron para el resto de los linajes debido a su pequeño tamaño muestral.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS DE ÁRBOLES DE GENES Y REDES

A partir de las 581 secuencias de citocromo-b obtenidas para el complejo *Liolaemus elongatus* se encontraron 249 haplotipos no redundantes. El modelo de sustitución nucleotídica seleccionado por ModelTest que mejor se ajustó fue TIM3+G (nst=6 rates=gamma). Basado en la matriz de haplotipos, se recuperó un árbol de gen mitocondrial con alto soporte (soporte de probabilidad posterior [PP] =0.99) para el complejo *L. elongatus* (Figura 14). Se recuperaron once haploclados principales con soporte estadístico alto dentro de este complejo; cuatro corresponden a especies descritas: *L. chillanensis*, *L. burmeisteri* (Figura 15, panel F), *L. smaug* y *L. crandalli* (Figura 15, panel D); en dos casos, se recuperaron especies descritas sin monofilia recíproca con una especie candidata: *L. carlosgarini* que incluyó los haplotipos de *L. sp. 1* y *L. antumalguen* que incluyó los haplotipos de *L. sp. 7*; dos linajes correspondientes a las especies candidatas que surgen del presente capítulo y se denominaron *L. sp. 2* (Figura 15, panel D) y *L. sp. 3* (Figura 15, panel E), y dos linajes correspondientes a *L. sp. 6* (especie candidata propuesta por Morando *et al.*, 2003), que al no recuperarse como monofilética, se las llama *L. sp. 6a* y *L. sp. 6b*. El último haploclado corresponde a los haplotipos de *L. elongatus* interdigitados con 4 haplotipos de 35 individuos de la localidad tipo de *L. shitan*, por lo tanto este haploclado se denominó *L. elongatus + L. shitan*. Otros individuos asignados a *L. shitan* (en base a fenotipo de coloración negro y cercanía geográfica) de las localidades 71 (2 individuos) y 68 y aledañas (4 individuos) fueron recuperados por fuera del complejo *L. elongatus* en dos regiones diferentes del árbol (Figura 14). Cabe destacar que otros individuos de esa área tuvieron haplotipos que fueron incluidos dentro del haploclado *L. elongatus + L. shitan* (ver Apéndice VI). En base a este resultado, estos seis individuos no fueron incluidos en los análisis filogeográficos subsiguientes. Los haplotipos de los seis individuos colectados en la localidad tipo de *L. choique* (Figura 13, localidades 6/95) fueron recuperados en dos haploclados, dos dentro de *L. antumalguen* y cuatro dentro de *L. smaug* (asteriscos seguidos de 2 y 4 en la Figura 14).





Figura 14: Árbol génico bayesiano consenso (mayoría del 50%) correspondiente al gen citocromo-b. Los números sobre las ramas son valores de probabilidades posteriores. Los asteriscos en los clados *L. antumalguen* + *L. sp. 7* y *L. smaug* representa el número de individuos de *L. choique* recuperados en cada uno de los haploclados mencionados.

Para las relaciones entre estos 11 linajes, solo se obtuvieron valores de soporte alto para tres nodos: 1-*L. elongatus* + *L. shitan* y *L. sp. 3* fueron recuperados como taxa hermanos con soporte alto (PP=0.99); 2-los linajes *L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. sp. 6a* y *L. sp. 6b* fueron recuperados en un haploclado con soporte alto (PP=0.99), 3-hermano de *L. carlosgarini*, también con soporte alto (PP=0.99). El linaje *L. sp. 6* fue previamente propuesto como especie candidata (Morando *et al.*, 2003), el tratamiento que se le da aquí a este taxón y a los linajes *L. sp. 2* y *L. sp. 3*, no es un respaldo de su reconocimiento como especies distintas, sino simplemente una propuesta para el estatus de especies candidatas (Vieites *et al.* 2009) que merece futuros estudios integrales para evaluar su estatus taxonómico.

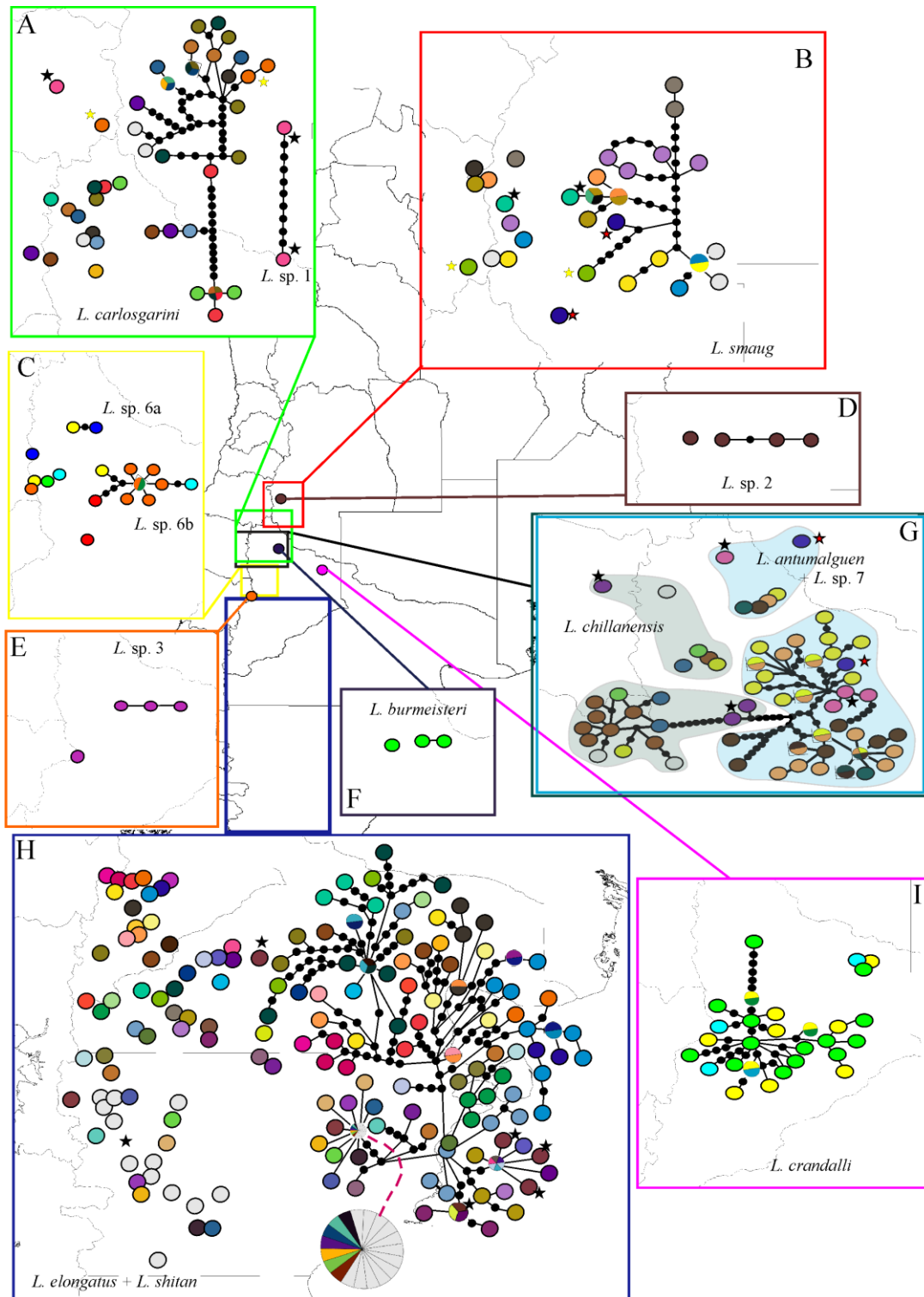


Figura 15: Paneles A al I muestran redes de haplotipos de parsimonia estadística del gen citocromo-b asociadas a sus respectivas distribuciones geográficas. Dentro de cada panel se detallan las redes inferidas en relación a la distribución geográfica. Cada haploclado está coloreado acorde a la localidad de procedencia de esos ejemplares. A- *L. carlosgarini*; B- *L. smaug*; C- *L. sp. 6* (a y b); D- *L. sp. 2*; E- *L. sp. 3*; F- *L. burmeisteri*; G- *L. chillanensis* (sombreado gris) y *L. antumalguen* + *L. sp. 7* (sombreado celeste); H- *L. elongatus* + *L. shitan* e I- *L. crandalli*. Las estrellas rojas de los paneles B y G marcan la localidad tipo de *L. choique*. Las estrellas amarillas de los paneles A y B marcan la localidad tipo de *L. carlosgarini*. Las estrellas negras representan las localidades tipo de: A- *L. sp. 1*, B- *L. smaug*, G- *L. chillanensis* y *L. antumalguen* e H- *L. elongatus* y *L. shitan*.

Los resultados del análisis de redes basado en este mismo fragmento mitocondrial (Figura 15) fueron congruentes con el árbol génico y permitieron analizar con mayor detalle varios aspectos interesantes de este complejo de lagartijas que se detallan a continuación:

Los haplotipos recuperados dentro de *L. carlosgarini* (árbol de Figura 14), formaron dos redes, una correspondiente a los dos haplotipos de la localidad tipo de *L. sp. 1* (Figura 13, localidad 82; Figura 15, panel A, círculo rosa y red separada con dos círculos rosas), que es una especie en descripción por otros autores (Esquerré., comunicación personal) y la otra correspondiente a *L. carlosgarini* (los círculos naranja representan haplotipos de localidad tipo marcados con una estrella amarilla).

Incluidos en la red de *L. smaug* (Figura 15, panel B, los haplotipos provenientes de individuos de la localidad tipo de *L. smaug* están identificados con un círculo verde oscuro y estrella negra), se recuperaron: 1-un haplotipo terminal compartido entre cinco individuos de la localidad tipo de *L. carlosgarini* (Figura 13, localidades 93/105; Figura 15, panel B, círculo verde con estrella amarilla), y 2-un haplotipo terminal compartido entre cuatro individuos provenientes de la localidad tipo de *L. choique* (Figura 13, localidades 6/95; Figura 15, panel B, círculo azul con estrella roja). De manera similar, dentro de la red que incluyó *L. antumalguen* y *L. chillanensis* (Figura 15, panel G, los haplotipos provenientes de individuos de la localidad tipo de *L. antumalguen* están identificados con un círculo rosa y estrella negra y los de la localidad tipo de *L. chillanensis* con círculo violeta y estrella negra), se recuperó un haplotipo compartido por dos individuos de la localidad tipo de *L. choique* (Figura 13, localidades 6/95; Figura 15, panel G, círculo azul con estrella roja). Por lo tanto, los seis individuos colectados en la localidad tipo de *L. choique* (Figura 13, localidades 6/95) fueron recuperados en redes diferentes, dos dentro de *L. antumalguen* (Figura 15, panel G, asterisco rojo) y cuatro dentro *L. smaug* (Figura 15, panel B, asterisco rojo).

Además, en la red *L. antumalguen* + *L. chillanensis* (Figura 15, panel G), se puede observar que los tres haplotipos encontrados en los nueve individuos de la localidad tipo de *L. antumalguen* (Figura 15, panel G, círculos rosa con estrella roja, sombreado celeste) se diferencian solo en una base y por lo tanto se encuentran en un mismo sector de la red y los 32 haplotipos de los 65 individuos colectados en las cuatro localidades correspondientes a *L. sp. 7* (Figura 13, localidades 1 a 4) conforman el resto de la red con sombreado celeste.

En esta misma red (Figura 15, panel G), separados por diez pasos mutacionales, se encuentran los haplotipos correspondientes a *L. chillanensis* (sombreado gris).

*L. sp. 6* se recuperó con dos haploclados en el árbol mitocondrial (Figura 14), en las redes de haplotipos se recuperan dos redes separadas (Figura 15, panel C) una perteneciente a *L. sp. 6a* y otra a *L. sp. 6b*. La red de *L. sp. 6a* presenta dos haplotipos uno de una localidad más al norte y otro de una de las localidades del sur (Figura 15, panel C, círculos azul y amarillo). *L. sp. 6b* presenta los haplotipos de las localidades restantes del sur más un haplotipo de la localidad que también se recuperó en la red de *L. sp. 6a* (Figura 15, panel C, círculo amarillo).

La red graficada en el panel H de la Figura 15, representa a los haplotipos provenientes de los individuos del área de distribución tanto de *L. elongatus* como de *L. shitan*. Si bien los individuos de la localidad tipo de *L. shitan* (Figura 15, panel H, círculo morado con estrella negra) no comparten haplotipos con los individuos de *L. elongatus*, los mismos se recuperan íntimamente relacionados en la misma red.

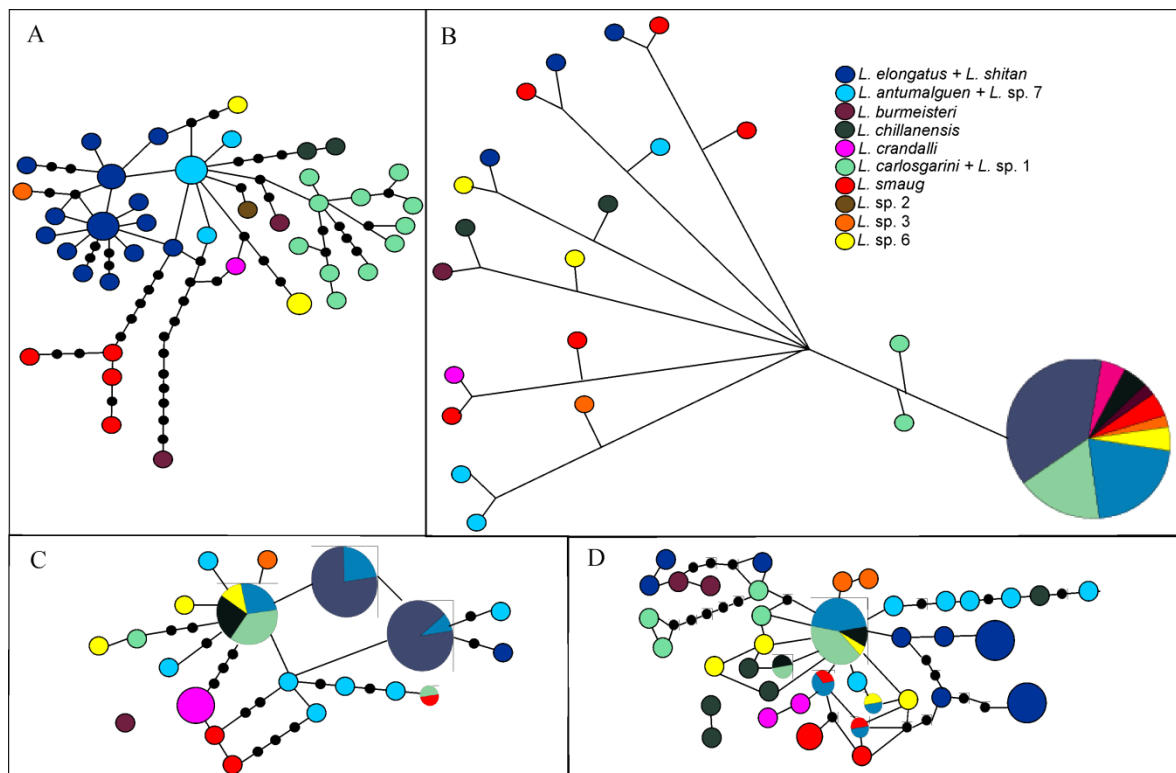


Figura 16: A. Red de haplotipos de parsimonia estadística basada en: A – la región mitocondrial 12S; B – red nuclear multinuclear (LDAB1D y KIF24); C – red del gen nuclear LDAB1D; D – red del gen nuclear KIF24; los haplotipos están coloreados según cada linaje reconocido dentro del complejo *L. elongatus*.

Para el conjunto de datos del fragmento mitocondrial 12S se obtuvo una red (Figura 16, panel A), que muestra una estructuración de los linajes en grupos de haplotipos que se corresponden con los haploclados y redes recuperadas en base al fragmento de citocromo-b (Figuras 14 y 15). Las dos redes de genes mitocondriales son totalmente concordantes con la red de genes mitocondriales combinados (Apéndice VII), en la que se recuperan siete redes y cuatro haplotipos únicos (singletones) correspondientes a los linajes identificados en base a citocromo-b. La red de haplotipos nucleares en base al gen LDAB1D tuvo un límite de conexión de ocho pasos (Figura 16, panel C), y quedó separado de la red un singleton correspondiente a *L. burmeisteri*. Si bien la mayoría de los haplotipos son especie-específicos, cuatro de ellos están compartidos entre algunos taxa: dos haplotipos están compartidos entre *L. elongatus* y *L. antumalguen*, un tercer haplotipo está compartido entre *L. smaug* y *L. carlosgarini*, y un cuarto haplotipo está compartido entre cuatro taxa: *L. carlosgarini*, *L. antumalguen*, *L. chillanensis* y *L. sp. 6*. La red de haplotipos nucleares en base al gen KIF24 tuvo un límite de conexión de nueve pasos (Figura 16, panel D), y mostró que la mayoría de los haplotipos son especie-específicos, pero cinco de ellos están compartidos entre algunos taxa: dos haplotipos están compartidos entre *L. smaug* y *L. antumalguen*, los tres restantes por los siguientes taxa: 1- *L. chillanensis* y *L. carlosgarini*, 2- *L. sp. 6* y *L. antumalguen*, 3- *L. antumalguen*, *L. carlosgarini*, *L. sp. 6* y *L. chillanensis*. En la red multilocus nuclear se resumen las distancias genéticas promedio (de los dos genes nucleares) entre los especímenes (Figura 16, panel B), se encontró que individuos de casi todos los taxa, excepto *L. burmeisteri*, tienen igual distancia entre ellos (círculo grande con nueve colores), mientras que otros individuos de algunos taxa tienen distancias menores dentro de taxa en algunos casos (e.g. círculos azules de *L. antumalguen* en la esquina inferior derecha) que en otros casos son similares para individuos de taxa diferentes. Por lo tanto, este análisis no permitió diferenciar claramente a los taxa que se reconocieron en base a los marcadores mitocondriales. Además, el árbol de genes nucleares concatenados presentó una politomía que incluye tanto todos los linajes del complejo, como algunos grupos hermanos como *L. parvus* y *L. petrophilus* (Apéndice IX); incluso por fuera de la politomía se recuperó el haplotipo de un individuo de *L. chillanensis* y otro de *L. carlosgarini* (Apéndice IX).

#### ANÁLISIS FILOGEOGRÁFICOS

La Tabla 12 muestra todas las distancias genéticas no corregidas de a pares para los once haploclados reconocidos dentro del complejo *L. elongatus* (Figura 14), la mayoría de

las distancias son mayores a 3%, con excepción de *L. chillanensis* vs. *L. antumalguen*: 2,7%, *L. sp. 3* vs. *L. elongatus* + *L. shitan*: 2,93% y *L. sp. 6a* vs. *L. sp. 6b*: 2,96%. El linaje con mayores distancias genéticas comparado con el resto fue *L. smaug*, todas fueron mayores a 5% (min: 5,04, máx.: 6,20).

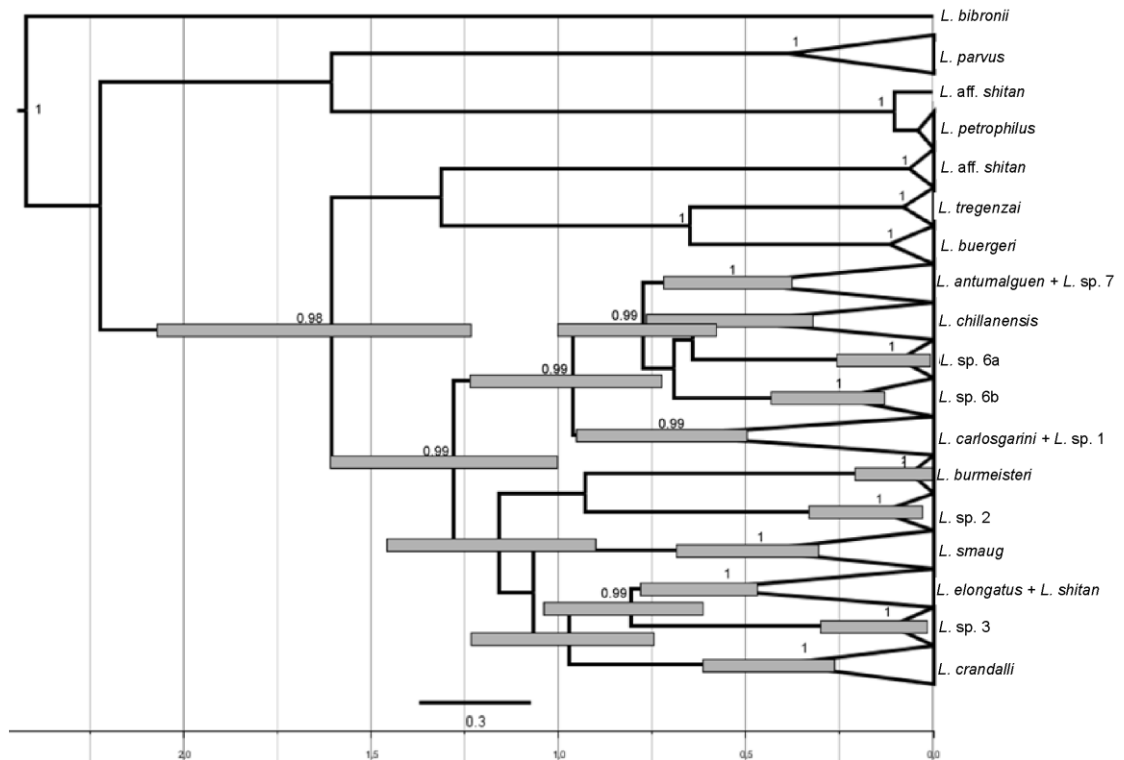


Figura 17: Tiempos de divergencia estimados sobre un árbol de gen de citocromo-b, marcado con gris claro los tiempos de divergencia basados en análisis de BEAST. El eje x está en millones de años (Ma.), los números en los nodos son PP > 0,95% provenientes del análisis Bayesiano.

La Figura 17 muestra el árbol de gen del citocromo-b con el tiempo calibrado; el origen del complejo *L. elongatus* se estimó entre los 1,3 y los 2 millones de años atrás y todos los otros tiempos de divergencia entre los linajes reconocidos se ubicaron en el Pleistoceno tardío.

#### ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS

El linaje *L. sp. 6a* presentó el número de secuencias, sitios polimórficos, haplotipos y diversidad haplotídica más bajos (Tabla 13). *Liolaemus elongatus* + *L. shitan* tiene el mayor tamaño de muestra, y el número de sitios polimórficos y haplotipos fue el más elevado. *Liolaemus crandalli* y la agrupación de cuatro linajes (*L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. sp. 6a* y *L. sp. 6b*) presentaron la diversidad haplotídica más elevada. *Liolaemus burmeisteri* mostró la diversidad nucleotídica más alta. Los únicos linajes que mostraron evidencia de no neutralidad con ambas pruebas, Tajima's y Onsins y Rozas,

fueron *L. elongatus* + *L. shitan* y *L. crandalli*. *Liolaemus chillanensis* se infirió como no neutral con la prueba de Tajima. Con el análisis *Bayesian Skyline Plots* (BSP) se detectó un cambio en el tamaño poblacional en todos los linajes estudiados incluido la agrupación de los linajes: *L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. sp. 6a* y *L. sp. 6b*, siendo el más pronunciado en *L. elongatus* + *L. shitan* (Apéndice VII).

Tabla 12: Arriba de la diagonal: número promedio de las distancias de a pares correspondientes al fragmento del gen mitocondrial citocromo-b, entre los principales haploclosados del complejo *L. elongatus*; por debajo de la diagonal: promedio de diferencias de a pares corregidos (distancia inter-linaje – distancia intra-linaje). Se marcan en negrita los valores de distancias genéticas de a pares mayores a 3%.

Linajes	<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i>	<i>L. burmeisteri</i>	<i>L. chillanensis</i>	<i>L. crandalli</i>	<i>L. elongatus</i> + <i>L. shitan</i>	<i>L. carlosgarini</i> + <i>L. sp. 1</i>	<i>L. smaug</i>	<i>L. sp. 2</i>	<i>L. sp. 3</i>	<i>L. sp. 6a</i>	<i>L. sp. 6b</i>
<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i>	---	<b>4.8656</b>	2.7016	<b>5.1426</b>	<b>4.3119</b>	<b>3.2355</b>	<b>5.0434</b>	<b>4.4839</b>	<b>3.4807</b>	2.9206	<b>3.0998</b>
<i>L. burmeisteri</i>	4.0618	---	<b>5.3481</b>	<b>5.3244</b>	<b>5.5155</b>	<b>5.1957</b>	<b>5.7660</b>	<b>4.9629</b>	<b>4.3209</b>	<b>5.1111</b>	<b>5.6378</b>
<i>L. chillanensis</i>	1.5769	4.8790	---	<b>4.9659</b>	<b>4.7571</b>	<b>3.3449</b>	<b>5.2532</b>	<b>4.8757</b>	<b>4.1777</b>	<b>3.0222</b>	<b>3.1111</b>
<i>L. crandalli</i>	3.9930	4.8303	4.1508	---	<b>4.8773</b>	<b>5.0249</b>	<b>5.3236</b>	<b>5.8232</b>	<b>3.9209</b>	<b>5.6118</b>	<b>4.9534</b>
<i>L. elongatus</i> + <i>L. shitan</i>	2.7367	4.5959	3.5165	3.6118	---	<b>4.7676</b>	<b>6.2042</b>	<b>5.6335</b>	2.9303	<b>5.0644</b>	<b>4.8638</b>
<i>L. carlosgarini</i> + <i>L. sp. 1</i>	1.4713	4.0872	1.9154	3.5704	2.8876	---	<b>5.5555</b>	<b>4.3985</b>	<b>4.0052</b>	<b>3.5873</b>	<b>3.6995</b>
<i>L. smaug</i>	3.6541	5.0322	4.1984	4.2439	4.6989	3.8613	---	<b>5.0838</b>	<b>5.1565</b>	<b>6.0896</b>	<b>5.7760</b>
<i>L. sp. 2</i>	3.6061	4.7407	4.3325	5.2550	4.6399	3.2159	4.2759	---	<b>4.1975</b>	<b>4.9382</b>	<b>5.2016</b>
<i>L. sp. 3</i>	2.7017	4.1975	3.7333	3.4516	2.0354	2.9214	4.4474	4.0000	---	<b>4.6913</b>	<b>4.0768</b>
<i>L. sp. 6a</i>	2.0428	4.8888	2.4790	5.0437	4.0707	2.4046	5.2817	4.6419	4.4938	---	2.9629
<i>L. sp. 6b</i>	2.1397	5.3333	2.4855	4.3029	3.7878	2.4346	4.8858	4.8230	3.7969	2.5843	---



Tabla 13: Número de secuencias (NS), sitios polimórficos (S), haplotipos (H), diversidad haplotídica (Hd), diversidad nucleotídica (Pi), D de Tajima y valores de  $p$  asociados,  $R^2$  de Ramos-Onsins & Rozas y valores de  $p$  asociados. Todos estos estadísticos fueron calculados a partir de un fragmento del gen mitocondrial citocromo-b para los principales haploclosos del complejo *L. elongatus*. Se remarcan en negro los máximos y mínimos de cada columna y los resultados significativos de la prueba de Tajima y expansión de rango ( $R^2$ ).

Linajes	(NS)	(S)	(H)	(Hd)	(Pi)	D de Tajima	$p[D \leq Dt]$	$R^2$	$p[R^2 \leq Ri]$
<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i>	076	056	035	0.9510	0.01029	-1.29419	0.0752	0.0582	0.78600
<i>L. burmeisteri</i>	018	001	002	0.5230	<b>0.09080</b>	1.50518	0.9680	0.2614	0.98305
<i>L. chillanensis</i>	021	024	015	0.9520	0.00959	-0.11134	<b>0.0000</b>	0.1184	0.41100
<i>L. crandalli</i>	036	042	025	<b>0.9710</b>	0.00745	-1.80422	<b>0.0144</b>	0.0513	<b>0.00320</b>
<i>L. elongatus</i> + <i>L. shitan</i>	<b>262</b>	<b>134</b>	<b>100</b>	0.9327	0.01366	-1.77024	<b>0.0056</b>	0.0332	<b>0.01380</b>
<i>L. carlosgarini</i> + <i>L. sp. 1</i>	060	069	028	0.9570	0.01893	-0.46740	0.3620	0.0908	0.38660
<i>L. smaug</i>	044	037	019	0.9410	0.01218	-0.11458	0.5098	0.1057	0.50880
<i>L. sp. 2</i>	008	003	003	0.6790	0.00196	0.58467	0.7794	0.2099	0.37630
<i>L. sp. 3</i>	007	002	003	0.6670	<b>0.00113</b>	-0.27492	0.5132	0.2116	0.21423
<i>L. sp. 6a</i>	<b>004</b>	<b>002</b>	<b>002</b>	<b>0.5000</b>	<b>0.00148</b>	-0.70990	0.6000	0.4330	1.00000
<i>L. sp. 6b</i>	020	012	009	0.8790	0.00370	-0.94209	0.1800	0.0962	0.09218
<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i> + <i>L. sp. 6 a y b</i> + <i>L. chillanensis</i>	121	098	061	<b>0.9760</b>	0.01943	-0.90916	0.1920	0.0648	0.18420

## DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue estudiar, en base a secuencias de dos genes mitocondriales y dos nucleares, la estructura genética y filogeográfica del complejo *Liolaemus elongatus*, incluyendo individuos de toda el área de distribución y de la localidad tipo de *L. parvus*, sugerida como cercanamente relacionada al mismo. El árbol del gen mitocondrial citocromo-b recuperó once haploclados principales, de los cuales seis se pueden asignar a especies descritas (*L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. carlosgarini*, *L. burmeisteri*, *L. smaug*, *L. crandalli*); uno incluyó todas las muestras de *L. elongatus* interdigitadas con las de *L. shitan*; dos haploclados se corresponden con las especies candidatas *L. sp. 2* y *L. sp. 3* y los individuos de *L. sp. 6* fueron recuperados en dos haploclados diferentes. El haploclado *L. carlosgarini* también incluyó los individuos de una especie actualmente en descripción por otros autores (*L. sp. 1*, Esquerré., comunicación personal), y el haploclado *L. antumalguen* incluyó a los individuos de *L. sp. 7*. A continuación, primero se discute la historia filogeográfica del complejo *L. elongatus* y posteriormente se consideran las implicancias taxonómicas.

### HISTORIA FILOGEOGRÁFICA

El haploclado distribuido más al norte en el complejo *L. elongatus* es *L. smaug*, con localidades en Argentina y Chile al norte del Río Colorado (Figura 13, cuadrados rojos, Figura 15, panel B); el mismo incluye haplotipos de individuos de las localidades tipo de tres especies: 1-*L. smaug* en Malargüe, Mendoza (Figura 13, localidad 99, Figura 15, panel B, círculo verde oscuro con estrella negra), 2-*L. carlosgarini* en la VII Región en Chile (Figura 13, localidades 93/105, Figura 15, panel B, círculo verde claro estrella amarilla), y 3-*L. choique* (Figura 13, localidades 6/95, Figura 15, panel B, círculo azul con estrella roja). La red de haplotipos de citocromo-b (Figura 15, panel B) se presenta bastante estructurada y los dos haplotipos provenientes de las localidades tipo de las otras especies, *L. choique* y *L. carlosgarini*, tienen una posición terminal en la misma (estrellas roja y negra), lo que debido a su cercanía geográfica podría indicar flujo génico actual o reciente, aunque no se puede descartar división de linaje incompleta (proceso conocido como ILS por sus siglas en inglés “incomplete lineage sorting”). En las redes nucleares, si bien la mayoría de los haplotipos son exclusivos de *L. smaug*, algunos se recuperan compartidos. Para el marcador nuclear LDAB1D (Figura 16, panel C), haplotipos de la localidad tipo de *L. smaug* se comparten con haplotipos de la localidad tipo de *L. carlosgarini* (Figura 13,

localidades 93 y 99). Para el marcador nuclear KIF24 (Figura 16, panel D), haplotipos del rango de distribución de *L. smaug* (incluyendo haplotipos de la localidad tipo de *L. choique*, Figura 13, localidad 95) se comparten con los haplotipos de los individuos de las localidades 1, 3 y 4 del haploclado *L. antumalguen* (Figura 13, ubicadas al sur del río Colorado). Por lo tanto, con genes mitocondriales como con nucleares no se observa monofilia recíproca entre estas especies, lo que podría explicarse tanto como resultado de división de linaje incompleta como por flujo génico. Es posible que debido a la cercanía geográfica entre *L. smaug* y *L. carlosgarini*, y a que el análisis de *Bayesian Skyline Plot* (BSP) de *L. smaug* mostró un leve incremento en el tamaño poblacional efectivo que puede estar asociado a una expansión de rango muy reciente (Apéndice VII), para este caso se pueda hipotetizar flujo génico. Alternativamente, considerando que los tiempos de divergencia estimados son muy recientes (Figura 17), no se puede descartar que este patrón sea el resultado de división incompleta de linaje. Para el caso de los haplotipos del gen nuclear compartido (Figura 16, panel D, círculos rojos y azules) entre *L. smaug* y *L. antumalguen*, es más probable que el patrón observado sea resultado de ILS, ya que el río Colorado se ha hipotetizado como una posible barrera al flujo génico para lagartijas (Morando *et al.*, 2007); además el tiempo de origen del ancestro de este haploclado se estimó aproximadamente hace medio millón de años, por lo que no se esperaría monofilia recíproca en la mayoría de los marcadores nucleares. El haploclado *L. smaug* es el que presentó las distancias de a pares de citocromo-b más altas con respecto al resto de los haploclos del complejo (Tabla 12), y las diversidades haplotídica y nucleotídica relativamente altas. Los estadísticos no mostraron una desviación de la neutralidad o una expansión de rango significativa (Tabla 13), por lo que en general la evidencia indica una historia de estabilidad, congruente con lo encontrado para otras especies de lagartijas de esta región geográfica (capítulo I de esta tesis, Morando *et al.*, 2007; Olave *et al.*, 2011).

Además de *L. smaug*, el segundo haploclado recuperado al norte del Río Colorado, es *L. sp. 2*, representada por tres haplotipos provenientes de una única localidad al este de *L. smaug*. En el árbol de citocromo-b *Liolaemus sp. 2* se recuperó como monofilética (PP=1) y diferenciada del resto de los linajes del complejo *L. elongatus*. También se recuperó una red de haplotipos separada (Figura 13, panel D) y sus distancias genética de a pares fueron > 3% con respecto al resto de los haploclos; pero no fue posible realizar análisis más detallados debido al bajo tamaño de la muestra.

El norte de la Provincia de Neuquén es una zona topográficamente compleja, surcada con numerosas cadenas montañosas y valles profundos (Martínez y Kutschker, 2011), y alberga varios de los haploclosos identificados dentro del complejo *L. elongatus* (*L. carlosgarini*, *L. chillanensis*, *L. antumalguen* + *L. sp. 7*, *L. burmeisteri* y *L. sp. 6 a y b*). La localidad tipo de *L. carlosgarini* se encuentra en Chile, muy cerca del límite con Argentina (Figura 13, localidades 93/105; Figura 15, panel A, círculo naranja con estrella amarilla), y representa el extremo norte de la distribución de este haplocloso. Como se mencionó más arriba, cinco individuos de la localidad tipo de *L. carlosgarini* comparten un haplotipo dentro de la red de citocromo-b de *L. smaug* (para los cuales se hipotetizó flujo génico más arriba); pero otros dos individuos tenían los haplotipos de posición terminal representados con círculos naranja en la red de *L. carlosgarini* (Figura 13, panel A), que se presenta altamente estructurada. Congruente con esto, sus índices de diversidad son relativamente altos y al igual que para *L. smaug*, se puede inferir una relativa estabilidad poblacional en el tiempo. Las distancias genéticas de a pares del haplocloso *L. carlosgarini* con respecto al resto de los linajes del complejo *L. elongatus* fueron todas superiores al 3%. Si bien el análisis de árbol génico incluyó los haplotipos correspondientes a *L. sp. 1* (Figura 13, localidad 82) incluidos en el haplocloso *L. carlosgarini* (Figura 14), esta especie candidata (en descripción, Esquerré, comunicación personal) se recuperó como una red de citocromo-b separada (Figura 15, panel A, red separada de círculos rosas); por lo que su divergencia parece ser muy reciente. Esta población se encuentra separada de *L. smaug* y de *L. carlosgarini* por valles cordilleranos y se ubica en la parte occidental de la cordillera de los Andes, por lo que su incipiente diferenciación muy posiblemente esté asociada con un aislamiento geográfico.

Al igual que para *L. carlosgarini*, la localidad tipo de *L. chillanensis* se encuentra en Chile, muy cercana del límite con Argentina (Figura 13, localidad 8). Los haplotipos de los individuos de la localidad tipo están separados del resto de los haplotipos por siete pasos mutacionales (Figura 15, panel G, círculos morados con estrella negra), a su vez tienen una posición intermedia entre estos y los haplotipos de *L. antumalguen* y *L. sp. 7* que fueron recuperados todos en una sola red. Las redes nucleares mostraron que con un marcador comparte haplotipo tanto con *L. antumalguen* como con *L. carlosgarini* y *L. sp. 6* (Figura 16, panel C) y con el otro, además de compartir haplotipos con estas especies, también posee haplotipos exclusivos (Figura 16, panel D). Por otro lado, el haplocloso *L. chillanensis* presenta una distancia genética de a pares de citocromo-b menor a 3% (2,7%,

Tabla 1), solo con respecto a *L. antumalguen*, lo que también está indicando su estrecha relación. Si bien la diversidad haplotípica de *L. chillanensis* es alta, la diversidad nucleotídica es baja y menor a la de los haploclosados al norte del Río Colorado, lo que está en concordancia con la señal significativa detectada por Tajima que se aparta de neutralidad (Tabla 13) y el BSP que también muestra una variación en el tamaño poblacional efectivo (Apéndice VII). Hay dos explicaciones posibles para este patrón observado, 1-la divergencia de estos haploclosados es muy reciente y aunque se recuperan como clados diferenciados en el árbol génico (Figura 14), aun no alcanzaron monofilia recíproca en los marcadores nucleares utilizados (Figura 16); 2-es posible que la no neutralidad detectada por la prueba de Tajima y la variación de tamaño poblacional hayan propiciado una zona de contacto reciente y un grado de flujo génico que se evidencia en la conexión detectada en la red de haplotipos (Figura 15, panel G). Es necesario ampliar la muestra a regiones geográficas intermedias entre las poblaciones de estas especies para comprender las historias evolutivas que las relacionan y dieron lugar a los patrones genéticos observados.

Dentro del haploclosado *L. antumalguen* y de la red de citocromo-b (Figura 15, panel G), se infirieron estrechamente relacionados los tres haplotipos (Figura 15, panel G, círculos rosas) de los individuos provenientes de la localidad tipo de esta especie (Figura 13, localidad 5), que fue la única mencionada en su descripción, situada a 2300 m.s.n.m., en el Volcán Domuyo. El resto de los de este sector de la red (sombreado celeste) provienen de las localidades 1 a 4 (Figura 13), correspondientes a *L. sp. 7* (Morando *et al.*, 2003); además de un haplotipo que se encontró en dos individuos de la localidad tipo de *L. choique* (Figura 13, localidades 6/95; Figura 15, panel G, círculo azul con estrella roja). Como se mencionó anteriormente, es necesario realizar mayores muestreos para esclarecer la historia evolutiva en relación a *L. choique*. El patrón observado entre *L. antumalguen* y *L. sp. 7* es congruente con un modelo de especiación peripátrica, donde *L. antumalguen* se pudo haber originado recientemente (Figura 17) como un linaje periférico aislado en la cima del volcán. La población de origen muy posiblemente pudo haber sido *L. sp. 7*, que tiene un rango altitudinal más amplio (1.550-2.250 m.s.n.m.), y que aun se encuentra en el estadio parafilético, incluso con el marcador mitocondrial utilizado. Por otro lado, estos dos taxa presentan una clina morfológica muy marcada con respecto a su patrón general de coloración y tamaño (Avila *et al.*, 2010).

Hacia el sur del área de distribución de los haploclados *L. antumalguen* y *L. chillanensis*, se encuentran las poblaciones asignadas a *L. sp. 6* (a y b) (Figura 13, localidades 108–13, triángulos amarillos), que fue propuesta como especie candidata por Morando *et al.* (2003) para las localidades 108 y 112 (Figura 13). En el árbol de citocromo-b los haploclados *L. antumalguen* y *L. chillanensis* se recuperaron estrechamente relacionados con *L. sp. 6* con alto soporte estadístico (PP=0.99, Figura 14), pero este último linaje no fue recuperado como monofilético. Congruente con esto, los haplotipos de *L. sp. 6* formaron redes separadas con el marcador mitocondrial citocromo-b (Figura 15, panel C) y se recuperaron en lugares diferentes de la red del gen mitocondrial 12S (Figura 16, panel A), igual resultado se encuentra en la red multilocus nuclear (Figura 16, panel A). Con los dos marcadores nucleares tuvieron tanto haplotipos compartidos con *L. antumalguen* y *L. chillanensis* (y con *L. carlosgarini*) como haplotipos únicos (Figura 16, paneles C y D). Además, las distancias genéticas entre estos haploclados son muy cercanas al 3%, aunque *L. sp. 6* (a y b) tuvieron distancias > a 3% con respecto a los otros. Por lo tanto, a pesar del buen muestreo de poblaciones y de individuos realizado para este estudio, a la luz de los resultados, se hace necesario plantear un muestreo más detallado aun para comprender la historia evolutiva y demográfica de estos linajes, ya que la misma parece haber sido muy compleja; posiblemente propiciada por la diversidad topológica del área, con picos altos y valles profundos sumado a los numerosos ciclos climáticos del Pleistoceno (Rabassa *et al.*, 2005).

Dentro de esta misma región geográfica del noroeste de Neuquén, se encuentra la localidad tipo (y la única conocida) de *Liolaemus burmeisteri*, y los haplotipos fueron recuperados como un clado con soporte alto en el árbol del gen mitocondrial citocromo-b (PP=1, Figura 14) y como una red separada (Figura 15, panel D). Los genes nucleares también mostraron evidencia de que este linaje es el más diferenciado del complejo, ya que tuvo haplotipos únicos y no integrados en las redes de los genes nucleares por separado (Figura 16, paneles C y D). Esto estaría indicando una historia filogeográfica aparentemente independiente, aunque debido a su bajo número muestral no se pudieron realizar análisis más detallados.

En el noreste de la provincia de Neuquén, en los departamentos de Pehuenche y Añelo se encuentra el Área Natural Protegida (ANP) Auca Mahuida (Figura 13, localidades 14-16). Esta ANP comprende varios volcanes, entre ellos el que le da el nombre al área. Topográficamente los rangos altitudinales varían desde los 223 m.s.n.m.

hasta los 2.258 m.s.n.m., siendo el pico más alto el del volcán Auca Mahuida. Esta área se encuentra aislada de las cadenas montañosas cordilleranas, y toda la evidencia publicada hasta el presente indica que las lagartijas habitantes de estos volcanes también se encuentran aisladas (Avila *et al.*, 2013; Avila *et al.*, 2011; Martínez y Kutschker, 2011). Los resultados presentados en este capítulo para las poblaciones muestreadas en esta ANP son congruentes con este conocimiento previo, ya que todos los individuos provenientes de dichas poblaciones tuvieron haplotipos que en el árbol de citocromo-b se recuperaron en el haploclado *L. crandalli* con un soporte estadístico alto (Figura 14, PP=1). Asimismo, en los análisis de redes de haplotipos de citocromo-b se recuperó una red separada (Figura 15, panel I), en las redes nucleares presentó solo haplotipos exclusivos (Figura 16, paneles C y D), y las distancias genéticas de a pares fueron todas mayores al 3% (Tabla 12) con respecto a los otros linajes del complejo *L. elongatus*. Esta evidencia sugiere una historia de aislamiento de *Liolaemus crandalli* con respecto al resto de los linajes del complejo, que se ha mantenido al menos durante el pasado reciente. La prueba de Tajima para esta especie detectó una desviación significativa de la neutralidad, que además presentó la mayor diversidad haplotípica (Tabla 13), por lo que es posible que recientemente haya experimentado una expansión poblacional, aunque de acuerdo a los resultados del *Bayesian Skyline Plot* (Apéndice VII) no parece haber sido muy marcada.

Los individuos provenientes de la localidad de Pino Hachado en la provincia de Neuquén (Figura 13, localidad 107), que está muy cercana al extremo norte de la distribución de *L. elongatus*, formaron un haploclado diferenciado (PP = 0.99) hermano a *L. elongatus* (PP = 0.99), que se denominó *L. sp. 3* (Figura 14). Todos los análisis realizados en este capítulo indicaron que estos individuos son diferentes de *L. elongatus*, incluso a nivel de los dos genes nucleares, ya que tuvieron haplotipos exclusivos para ambos genes (Figura 16, C y D). Debido al tamaño escaso de la muestra no se pueden realizar inferencias filogeográficas para este haploclado.

El haploclado del complejo *L. elongatus* de distribución más austral es el que se denominó *Liolaemus elongatus* + *L. shitan* (Figura 13, círculos azules), debido a que los haplotipos de citocromo-b de los individuos de la localidad tipo de *L. shitan* (Figura 13, localidad 65) se recuperaron interdigitados con los del resto de la distribución de *L. elongatus* (Figura 14). Aunque en el pasado se consideraba que la distribución de *Liolaemus elongatus* se extendía desde el sur de Chubut hasta las provincias de Catamarca y La Rioja, el trabajo de Morando *et al.* (2003) señaló que el rango de distribución de esta

especie muy posiblemente sería más acotado llegando sólo hasta el Río Agrio en el centro de Neuquén. En los últimos años, se han descrito especies nuevas en las áreas del norte de Neuquén y Mendoza (Abdala *et al.*, 2012; Avila *et al.*, 2010; Avila *et al.*, 2012; Avila *et al.*, 2011), y una revisión bibliográfica reciente sobre la distribución geográfica de esta especie (Minoli *et al.*, 2013) la ubica en la misma región considerada en este capítulo (Figura 13, círculos azules). En el árbol de citocromo-b este haploclado se recuperó con soporte alto (Figura 14, PP=0.99) y en la red de haplotipos de citocromo-b se recuperó como una red independiente (Figura 15, panel G), donde los haplotipos de la localidad tipo de *L. shitan* tienen posiciones terminales (Figura 15, panel G, tres círculos morados con estrellas negras). Con los genes nucleares no se observó una diferenciación clara de *L. elongatus* + *L. shitan*, ya que con el marcador LDAB1D (Figura 16, panel C), sólo se encontró un haplotipo exclusivo y los otros dos haplotipos son compartidos con *L. antumalguen*, mientras que para el gen nuclear KIF24 si bien se recuperaron ocho haplotipos exclusivos, estos se encuentran en diferentes sectores de la red, dos cercanamente relacionados a *L. burmeisteri*, uno a *L. carlosgarini* y el resto a *L. antumalguen* (Figura 16, panel D). Estos resultados son congruentes con la estimación del tiempo de origen de este haploclado (Figura 17) que es muy reciente, por lo tanto no se espera encontrar monofilia recíproca para la gran mayoría de los marcadores nucleares. Dado que el área de distribución geográfica de este haploclado es la mayor de todo el complejo (Figura 13), estuvo representado por la mayor cantidad de poblaciones y secuencias, que a su vez resultaron con el número de sitios polimórficos y haplotipos más elevado del complejo (Tabla 13). Tanto las pruebas de neutralidad que tuvieron resultados significativos (Tabla 13), como el gráfico del análisis BSP (Apéndice VII) que mostró una modificación del tamaño poblacional efectivo a través del tiempo, permiten inferir que hubo una expansión de rango y/o poblacional reciente, muy posiblemente hacia el extremo sur de su distribución.

#### *IMPLICANCIAS TAXONÓMICAS*

El análisis molecular en base a marcadores mitocondriales del complejo *Liolaemus elongatus* permitió reconocer a *L. burmeisteri*, *L. crandalli*, *L. elongatus*, *L. sp. 2* y *L. sp. 3* como linajes independientes. Por lo tanto, la evidencia presentada aporta mayor apoyo para sus estatus específicos.

Para otros linajes, *L. smaug*, *L. carlosgarini*, *L. antumalguen*, *L. shitan*, *L. sp. 1*, *L. sp. 6* (a y b) y *L. sp. 7* los resultados son congruentes con un grado de diferenciación



incipiente. A su vez, se puede plantear que todos estos taxa podrían representar linajes de diferenciación molecular parcial y relativamente reciente, cuyos límites de especie en base a estos marcadores no alcanzaron la monofilia recíproca. Por otro lado, es posible que los haplotipos compartidos entre estos linajes sean el resultado de flujo génico, actual o reciente, debido a la cercanía geográfica entre estas localidades. Para poder evaluar el límite preciso entre estas especies y el grado de flujo génico, es necesario realizar un muestreo muy detallado alrededor de otras poblaciones del área y utilizar marcadores de microsátélites y/o SNPs.

Por último, para el linaje *L. choique* no se han recuperado haplotipos únicos. Los haplotipos de *L. choique* se han encontrado en los haplocados de *L. smaug* y *L. antumalguen* + *L. sp. 7*. Por lo tanto, si bien *L. smaug* tiene una distribución geográfica cercana a *L. choique*, debido a que no se encontraron haplotipos únicos de *L. choique*, la explicación más plausible de acuerdo a estos resultados, es que no hay evidencia molecular que apoye el estatus de especie independiente de *L. choique*.

En resumen, los resultados de este capítulo presentaron evidencia para el reconocimiento de algunas especies previamente descritas para el complejo *L. elongatus*: *L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. carlosgarini*, *L. burmeisteri*, *L. smaug*, *L. elongatus* y *L. crandalli*; se identificaron cuatro especies candidatas (*L. sp. 1*, *L. sp. 2*, *L. sp. 3*, y *L. sp. 7*), mientras que la evidencia es insuficiente para el estatus de *L. sp. 6* y no se encontró evidencia molecular que avale a las especies *L. choique* y *L. shitan*. Para realizar un estudio integral del complejo *L. elongatus* es necesario incorporar un estudio morfológico detallado de todos estos taxa, que se detalla en el capítulo siguiente.

## CAPÍTULO IV

### ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL COMPLEJO *LIOLAEMUS ELONGATUS* (IGUANIA: LIOLEAMINI)

## INTRODUCCIÓN

En el capítulo III se realizó un análisis filogeográfico del complejo *L. elongatus* basado en dos genes mitocondriales y dos nucleares. Con el marcador mitocondrial citocromo-b se encontraron once linajes principales, cinco de ellos presentaron monofilia recíproca (*L. burmeisteri*, *L. chillanensis*, *L. crandalli*, *L. sp. 2*, *L. sp. 3*), mientras que seis no (*L. smaug*, *L. sp. 6 a*, *L. sp. B*, *L. antumalguen* + *L. sp. 7*, *L. carlosgarini* + *L. sp. 1* y *L. elongatus* + *L. shitan*). Además no se encontró evidencia molecular para diferenciar a *L. choique*, ya que sus haplotipos se identificaron ya sea como parte de *L. smaug* o de *L. carlosgarini* o de *L. antumalguen* + sp. 7. Para estos últimos seis casos se hipotetizó que tanto la hibridización pasada o actual como la división de linaje incompleta pueden ser procesos relacionados a los patrones observados. En las redes realizadas con los marcadores nucleares, si bien algunos haplotipos fueron compartidos entre más de una especie, se observó que *L. burmeisteri*, *L. crandalli*, *L. sp. 2* y *L. sp. 3* tuvieron solamente haplotipos exclusivos, reforzando la hipótesis mitocondrial de que son los taxa con mayor diferenciación molecular del complejo *L. elongatus*. El objetivo de este capítulo es analizar las variaciones morfológicas en base a datos morfométricos y de escamación, entre todos los taxa considerados dentro de este complejo. Debido a que los resultados que se obtienen en base a genes mitocondriales (capítulo III) representan hipótesis de límites de especie que pueden o no ser congruentes con otra fuente de evidencia, como por ejemplo la morfológica, que tradicionalmente se utiliza para la diagnosis y descripción de especies, en este capítulo se planteó una estrategia de dos partes para el análisis morfológico. En la primera instancia las comparaciones se realizaron considerando los resultados mitocondriales del capítulo III y en la segunda instancia las comparaciones se realizaron considerando solamente los individuos de las localidades tipo tanto de las especies descritas como de las especies candidatas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ÁREA DE ESTUDIO

Se estudiaron individuos provenientes de 111 localidades de todo el rango de distribución geográfica conocida del complejo *Liolaemus elongatus*, (Figura 13, capítulo III) incluyendo las provincias de Mendoza, Neuquén, Río Negro y Chubut en Argentina y la VII y VIII Región Administrativa en Chile.

### INDIVIDUOS UTILIZADOS

Para realizar el estudio morfológico se utilizaron 480 individuos adultos depositados en la colección LJAMM-CNP (<http://200.9.244.24/colecciones03.html>). Los taxa a comparar con análisis morfológicos se seleccionaron siguiendo dos criterios: 1-Parte I: los individuos fueron asignados según los resultados del árbol mitocondrial del gen citocromo b del capítulo III (Figura 14), o sea se asignaron a 11 grupos. 2-Parte II: se utilizaron únicamente los individuos provenientes de cada una de las localidades tipo de las especies descritas y propuestas como candidatas en esta tesis y en la bibliografía (Morando *et al.*, 2003). La muestra compuesta por los individuos de las localidades tipo incluye: 1)- una hembra y un macho para *L. antumalguen*; 2)- cinco machos para *L. sp. 7*; 3)- una hembra y cinco machos para *L. choique*; 4)- tres hembras y 14 machos para *L. burmeisteri*; 5)- tres machos para *L. chillanensis*, 6)- 12 hembras y nueve machos para *L. crandalli*; 7)- cuatro hembras y 2 machos para *L. elongatus*; 8)- siete hembras y cinco machos para *L. shitan*; 9)- cinco machos para *L. sp. 1*; 10)- seis machos para *L. carlosgarini*; 11)- una hembra y dos machos para *L. smaug*; 12)- ocho machos para *L. sp. 2*; 13)- ocho hembras y siete machos para *L. sp. 3*; 14)- cinco hembras y 14 machos para *L. sp. 6*.

### ANÁLISIS MORFOLÓGICOS

Para cada ejemplar se registraron los mismos caracteres utilizados en el capítulo II, que usualmente son informativos en otros grupos de especies de *Liolaemus* (Abdala, 2007; Cei, 1974; Etheridge, 1992; Etheridge y Christie, 2003). Caracteres morfológicos o continuos provenientes de mediciones que representan tamaño corporal: Largo hocico-cloaca (LHC): desde el extremo anterior del hocico hasta el borde posterior de las escamas precloacales. Largo tercer dedo anterior (L3DC): longitud de la extremidad anterior desde el codo hasta la uña del tercer dedo. Distancia axila-ingle (DAI): desde la axila de la extremidad anterior derecha hasta la ingle de la extremidad posterior. Largo tibial (LT): largo desde el extremo de la rodilla hasta el extremo del talón. Largo de la cabeza (LC):

longitud entre el extremo anterior del hocico hasta la cavidad auricular. Alto de la cabeza (ALCA): alto de la cabeza a la altura de las escamas frontoparietales, el sitio más alto de la cabeza. Largo narina ojo (LNO): longitud entre la narina del lado derecho del cuerpo hasta la comisura del ojo del mismo lado. Distancia entre narinas (DEN): longitud entre la narina izquierda y la derecha. Largo rostro-interparietal (LRI): longitud entre la escama rostral y la interparietal. El segundo tipo de caracteres fueron conteos de escamas o merísticos, donde se contó el número de escamas entre dos puntos determinados. Escamas alrededor del cuerpo (ALR): número de escamas alrededor del cuerpo a la altura de la mitad del cuerpo. Escamas ventrales (VEN): número de escamas sobre una línea recta ventral imaginaria desde el hocico hasta la línea de la ingle. Escamas dorsales (DOR): número de escamas sobre una línea recta dorsal imaginaria desde el comienzo de las escamas dorsales típicas hasta la línea de la ingle. Los datos morfológicos se registraron con calibre digital de precisión 0.05 mm. Los caracteres de conteo de escamas se realizaron con microscopio estereoscópico.

#### *ANÁLISIS ESTADÍSTICOS*

Parte I: para la comparación entre los once haploclados principales recuperados con el gen mitocondrial citocromo-b (Figura 14, capítulo III), se realizó un análisis discriminante considerando la agrupación de individuos representada por haploclados. Por lo tanto, los grupos comparados fueron: *L. chillanensis*, *L. burmeisteri*, *L. smaug*, *L. crandalli*, *L. sp. 2*, *L. sp. 3*, *L. sp. 6* (considerando los resultados del capítulo III, los individuos de este linaje se analizaron como un grupo), *L. antumalguen* + *L. sp. 7*, *L. carlosgarini* + *L. sp. 1* y *L. elongatus* + *L. shitan*. Posteriormente, se realizó un MANCOVA con Largo hocico cloaca como co-variable para estudiar el efecto del tamaño sobre las variables restantes.

Parte II: se seleccionaron los individuos pertenecientes a las localidades tipo de las especies descritas y a las localidades originales de las propuestas de especies candidatas tanto de esta tesis como de la bibliografía (Morando *et al.*, 2003). En base a este criterio nuevamente se realizó un análisis discriminante y posteriormente un MANCOVA con la variable Largo hocico cloaca como co-variable.

Adicionalmente, en los casos que fue posible se estudió el grado de dimorfismo sexual de cada uno de los taxa considerados según los resultados del capítulo III (excepto *L. sp. 2* para los cuales sólo se contaba con individuos de un sólo sexo), para lo que se realizó un MANCOVA de todas las variables en su conjunto, con la variable largo hocico

cloaca como co-variable. Dado que el número de observaciones menos el número de tratamientos para *L. burmeisteri* y *L. chillanensis*, era menor o igual que el número de variables, en este MANCOVA se eliminaron dos variables (Largo de la cabeza y Largo rostral interparietal) altamente correlacionadas. Este análisis no se realizó para los individuos de cada localidad tipo ya que el tamaño de la muestra por sexo era muy bajo, además en varias localidades sólo había individuos pertenecientes a un sexo. Estos análisis fueron realizados utilizando el programa InfoStat versión 2009 (Di Rienzo *et al.*, 2011).

## RESULTADOS

Parte I: La Figura 18 muestra el resultado del análisis discriminante entre todos los taxa considerados de acuerdo a los haploclosos obtenidos en el árbol génico mitocondrial del capítulo III (Figura 19). El porcentaje de variabilidad explicada con los dos primeros ejes canónicos es del 75% (Tabla 14), el error general fue del 37% y las variables más explicativas fueron (Tabla 15): Largo hocico cloaca, Alto de la cabeza y Largo rostro-interparietal (para el primer eje canónico) y Largo hocico-cloaca y Largo tibial (para el segundo eje canónico). Aunque en general no se detectaron grandes diferencias morfológicas entre los grupos comparados, se puede distinguir que *L. burmeisteri* sólo se solapa con *L. antumalguen* + *L. sp. 7* y parcialmente con *L. elongatus* + *L. shitan*. *Liolaemus crandalli* prácticamente sólo se solapa con *L. elongatus* + *L. shitan*, y *L. sp. 3* también muestra únicamente solapamiento con *L. elongatus* + *L. shitan*. *Liolaemus carlosgarini* + *L. sp. 1* y *L. chillanensis* muestran un alto grado de solapamiento entre ambos y con respecto a *L. smaug*. El análisis MANCOVA de las medias mostró una diferencia significativa ( $p < 0.0001$ ) entre las medias de cada grupo (Tabla 16a) y en los contrastes *a posteriori* se obtuvo que todos los grupos son significativamente distintos entre sí a excepción de *L. carlosgarini* y *L. sp. 1* y *L. chillanensis* que fueron asignados a un mismo grupo (I) (Tabla 16b).

Tabla 14: Proporción de los autovalores relacionados a la Figura 18; los mismos representan la variabilidad de los datos en cada una de las direcciones de los autovectores (conjunto de vectores bases para graficar los datos) del análisis de componentes principales para todas las variables y su proporción acumulada. El primer eje canónico (asociado con el mayor de los autovalores) permite visualizar la máxima separación entre los grupos.

Autovalores	%	% acumulado
2.10	58.1	58.13
0.61	16.8	74.91
0.42	11.6	86.54
0.19	5.24	91.77
0.10	2.88	94.65
0.07	2.06	96.71
0.06	1.67	98.39
0.04	1.14	99.53
0.02	0.47	100

Tabla 15: Funciones discriminantes: datos estandarizados de las varianzas comunes de las variables del análisis discriminante relacionados a la Figura 18. En negrita los valores de las variables más explicativas.

Variable	1	2
Largo hocico cloaca	<b>0.93</b>	<b>-2.11</b>
Largo de la cabeza	-0.38	0.25
Alto de la cabeza	<b>-0.98</b>	-0.55
Ancho de la cabeza	-0.07	0.96
Largo narina ojo	-0.26	0.43
Largo rostro-interparietal	<b>0.81</b>	-0.24
Distancia entre narinas	0.44	-0.19
Alto de la cadera	-0.66	-0.44
Ancho de la cadera	-0.12	0.57
Largo tibial	0.41	<b>1.36</b>
Largo tercer dedo anterior	0.38	-0.01
Distancia axila-ingle	-0.31	0.67
Escamas dorsales	0.29	0.19
Escamas ventrales	0.11	-0.55
Escamas alrededor del cuerpo	-0.07	0.03

Parte II: La Figura 19 muestra el resultado del análisis discriminante entre los individuos de las localidades tipo de las especies descritas y de las localidades de las especies candidatas del complejo *L. elongatus*. El porcentaje de variabilidad explicada con los dos primeros ejes canónicos fue del 57% (Tabla 17), y el error total fue del 12.5%; las variables más explicativas fueron: largo hocico cloaca, alto de la cabeza y escamas ventrales (para el primer eje canónico) y largo hocico cloaca, largo de la cabeza y escamas dorsales (segundo eje canónico) (Tabla 18). En el análisis MANCOVA se obtuvo una diferencia significativa (MANCOVA,  $p < 0.0001$ , Tabla 19a) y en los contrastes *a posteriori* se obtuvo que los individuos de las localidades tipo de *L. shitan*, *L. crandalli*, *L. burmeisteri*, *L. antumalguen*, *L. chillanensis*, *L. choique*, y las localidades de *L. sp. 7*, *L. sp. 1*, *L. sp. 2*, *L. sp. 3* son estadísticamente distintos entre sí y con el resto de los individuos (Tabla 19b). Los individuos de las localidades tipo de *L. smaug* y de *L. carlosgarini* son estadísticamente distintos a los anteriores pero similares entre sí, y a su vez los de *L. smaug* también pertenecen a un grupo diferente al resto, pero que incluye a los individuos de las localidades tipo de *L. sp. 6* y *L. elongatus*. (Tabla 19b).



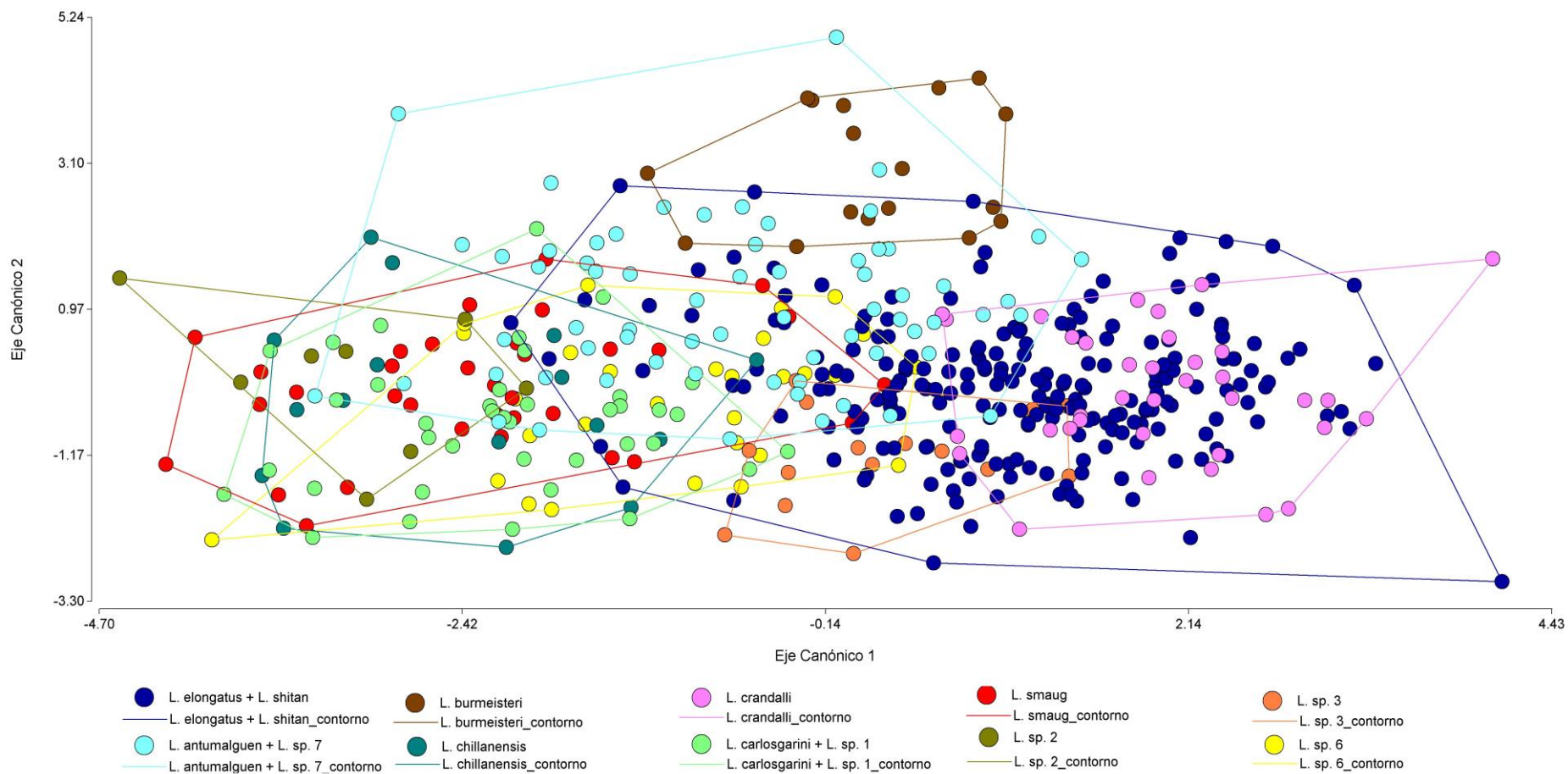


Figura 18: Resultado del análisis discriminante entre los haploclados principales recuperados en el árbol génico mitocondrial del complejo *L. elongatus* presentado en el capítulo III.

Tabla 16: Resultados del MANCOVA para los haploclosos mitocondriales del complejo *L. elongatus*. a- Se muestran los valores del estadístico Lambda de Wilks, del estadístico F con sus respectivos grados de libertad y la significancia estadística (*p*) asociados a la prueba MANCOVA. b- Contraste *a posteriori*. Letras distintas indican diferencias significativas del contraste *a posteriori* con un  $p \leq 0.05$ . Largo hocico-cloaca (LHC), largo de la cabeza (LC), alto de la cabeza (ALCA), distancia entre narinas (DEN), largo tercer dedo anterior (L3DC), largo tibial (LT), distancia axila-ingle (DAI), largo narina ojo (LNO), largo rostro-interparietal (LRI), escamas dorsales (DOR), escamas ventrales (VEN), escamas alrededor del cuerpo (ALR).

Tabla 16 a

Fte. de Variación	Lambda de Wilks	F	gl(num)	gl(den)	p
Haploclosos	0.12	8.96	126	3498	<0.0001

Tabla 16 b

Haploclosos	LC	ACAB	ANCAB	LNO	LRP	DEN	ACAD	ANCAD	LPT	L3DC	DAI	DOR	VEN	ALR	n	
<i>L. elongatus</i> + <i>L. shitan</i>	15.83	7.55	11.53	3.83	11.54	2.85	7.09	09.37	15.22	21.31	32.45	74.89	116.87	77.81	218	A
<i>L. smaug</i>	15.72	8.13	11.90	3.97	11.20	2.58	8.22	09.99	14.55	20.86	34.69	68.66	107.46	73.86	035	B
<i>L. sp. 2</i>	15.99	8.56	12.44	4.22	11.53	2.46	8.84	10.20	14.43	20.20	32.37	68.64	102.68	72.09	008	C
<i>L. sp. 3</i>	15.32	7.62	11.48	3.89	11.17	2.88	7.11	09.06	14.45	20.93	33.04	75.07	118.06	76.42	015	D
<i>L. sp. 6</i>	16.03	8.27	12.10	3.68	11.46	2.75	7.48	09.35	14.83	20.68	33.02	69.61	106.55	76.69	030	E
<i>L. burmeisteri</i>	16.69	7.85	12.47	4.36	11.87	2.71	7.28	10.23	16.72	21.68	32.76	72.99	107.65	75.23	017	F
<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i>	16.19	8.27	12.58	4.01	11.53	2.79	7.55	10.11	15.31	21.42	33.38	71.02	111.15	79.05	066	G
<i>L. crandalli</i>	15.98	7.82	11.61	3.81	11.78	2.89	7.17	09.51	15.83	22.14	32.63	81.41	131.35	83.50	036	H
<i>L. carlosgarini</i> + <i>L. sp. 1</i>	15.95	8.21	11.99	4.03	11.40	2.58	8.19	09.84	14.42	20.39	34.09	71.88	114.11	79.81	039	I
<i>L. chillanensis</i>	15.95	8.50	12.25	3.94	11.31	2.58	8.50	09.69	14.74	20.93	34.41	71.34	112.29	80.12	016	I

En la Tabla 20 se presentan los resultados del análisis de dimorfismo sexual de los haploclados inferidos en árbol génico mitocondrial del capítulo III, comparando las medias de las variables tomadas mediante un MANCOVA, de los haploclados inferidos en árbol génico mitocondrial del capítulo III. *Liolaemus antumalguen* + *L. sp. 7*, *L. carlosgarini* + *L. sp. 1*, *L. crandalli*, *L. smaug*, *L. burmeisteri*, *L. chillanensis* y *L. sp. 6* no presentaron un dimorfismo sexual significativo. Por otro lado para *L. elongatus* + *L. shitan* y *L. sp. 3* se detectó dimorfismo sexual significativo para estas variables.

Tabla 17: Proporción de los autovalores relacionados a la Figura 19; los mismos representan la variabilidad de los datos en cada una de las direcciones de los autovectores (conjunto de vectores bases para graficar los datos) del análisis de componentes principales para todas las variables y su proporción acumulada. El primer eje canónico (asociado con el mayor de los autovalores) permite visualizar la máxima separación entre los grupos.

Autovalores	%	% acumulado
4.86	36.84	36.84
2.7	20.51	57.35
2.04	15.45	72.80
1.29	09.76	82.56
0.82	06.25	88.81
0.43	03.29	92.10
0.34	02.57	94.67
0.26	01.97	96.64
0.24	01.79	98.43
0.11	00.86	99.29
0.06	00.45	99.74
0.02	00.19	99.93
0.01	00.07	100

Tabla 18: Funciones discriminantes datos estandarizados de las varianzas comunes de las variables del análisis discriminante relacionado a la Figura 19. En negrita los valores de las variables más explicativas.

Variable	1	2
Largo hocico cloaca	<b>0.84</b>	<b>-1.77</b>
Largo de la cabeza	-0.37	<b>1.09</b>
Alto de la cabeza	<b>-0.62</b>	-0.53
Distancia entre narinas	0.07	-0.31
Largo tercer dedo anterior	-0.41	0.31
Largo tibial	0.37	-0.09
Distancia axila-ingle	0.35	-0.05
Largo narina ojo	-0.43	-0.57
Largo rostro-interparietal	0.46	0.63
Escamas dorsales	-0.16	<b>1.29</b>
Escamas ventrales	<b>0.70</b>	-0.15
Escamas alrededor del cuerpo	-0.44	0.76

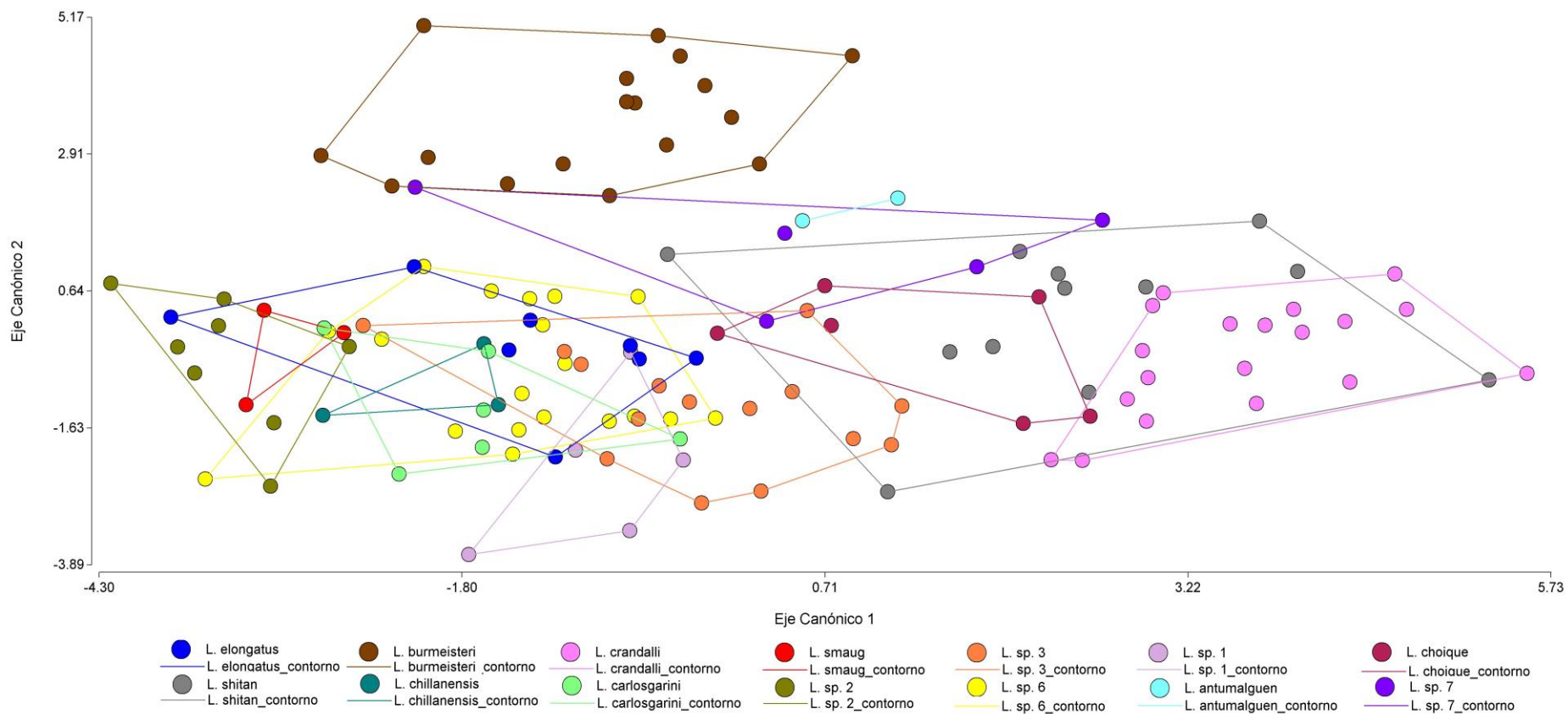


Figura 19: Resultado del análisis discriminante entre los individuos provenientes de cada una de las localidades tipo de las especies descritas y de las localidades de las especies candidatas propuestas dentro del complejo *L. elongatus*.

Tabla 19: Resultados del MANCOVA para los individuos provenientes de cada localidad tipo de las especies descritas y de las especies candidatas. a- Se muestran los valores del estadístico Lambda de Wilks, del estadístico F con sus respectivos grados de libertad y la significancia estadística ( $p$ ) asociados a la prueba MANOVA. b- Contraste *a posteriori*. Letras distintas indican diferencias significativas del contraste *a posteriori* con un  $p \leq 0.05$ . Largo de la cabeza (LC), alto de la cabeza (ALCA), distancia entre narinas (DEN), largo tercer dedo anterior (L3DC), largo tibial (LT), distancia axila-ingle (DAI), largo narina ojo (LNO), largo rostro-interparietal (LRI), escamas dorsales (DOR), escamas ventrales (VEN), escamas alrededor del cuerpo (ALR).

Tabla 19 a

Fte. de Variación	Lambda de Wilks	F	gl(num)	gl(den)	p
Linajes	2.10E-03	4.86	182	984	<0.0001

Tabla 19 b

Especies	LC	ACAB	ANCAB	LNO	LRP	DEN	ACAD	ANCAD	LPT	L3DC	DAI	DOR	VEN	ALR	n	
<i>L. sp. 7</i>	16.35	8.58	13.00	3.82	11.5	3.11	6.89	10.54	15.45	21.52	33.2	72.71	107.0	81.0	05	A
<i>L. shitan</i>	16.09	7.29	11.82	3.89	11.5	2.89	6.84	09.39	15.29	21.86	30.6	71.73	118.0	77.7	12	B
<i>L. sp. 1</i>	16.52	8.78	12.75	3.99	12.0	2.73	8.50	09.41	14.35	21.37	32.9	76.44	113.9	89.8	05	C
<i>L. sp. 2</i>	15.91	8.55	12.40	4.18	11.5	2.46	8.74	10.11	14.24	19.92	32.3	68.78	101.5	72.1	08	D
<i>L. sp. 3</i>	15.24	7.63	11.44	3.83	11.1	2.88	6.99	08.95	14.21	20.56	33.1	75.28	116.4	76.5	15	E
<i>L. crandalli</i>	15.94	7.60	11.59	3.85	11.7	2.79	7.15	09.58	15.96	22.41	32.4	81.05	134.3	84.7	19	F
<i>L. burmeisteri</i>	16.62	7.81	12.42	4.34	11.8	2.70	7.22	10.17	16.62	21.54	32.6	73.01	107.3	75.2	17	G
<i>L. antumalguen</i>	15.18	7.73	12.31	4.25	11.4	2.38	7.79	10.65	17.19	23.23	33.2	66.02	112.1	76.4	02	H
<i>L. chillanensis</i>	16.42	9.12	12.50	4.13	11.6	2.49	8.75	09.08	15.12	21.74	36.6	74.17	114.0	84.5	03	I
<i>L. choique</i>	15.92	7.86	12.11	4.06	11.5	2.69	8.22	10.09	15.46	22.93	34.3	68.12	117.5	80.0	06	J
<i>L. smaug</i>	15.53	7.98	11.74	3.62	10.5	2.51	7.39	09.15	13.93	20.63	34.7	70.93	101.3	72.2	03	K L
<i>L. carlosgarini</i>	15.58	8.24	11.87	3.87	11.1	2.53	7.78	09.45	14.06	20.10	34.5	75.60	113.9	78.9	06	K
<i>L. sp. 6</i>	15.98	8.29	12.26	3.51	11.4	2.74	7.27	09.00	14.60	20.38	32.6	70.40	104.3	78.5	19	L
<i>L. elongatus</i>	15.99	8.11	12.49	3.64	11.3	2.79	7.04	09.22	14.37	20.81	32.5	72.20	102.9	77.0	08	L

Tabla 20: Comparación de medias para todas las variables mediante un MANCOVA para los diferentes haploclosos del complejo *L. elongatus* según el árbol genético del capítulo III. Se muestran los valores del estadístico Lambda de Wilks, del estadístico F con sus respectivos grados de libertad y la significancia estadística (*p*) asociados a la prueba de MANCOVA para muestras independientes. Los correspondientes  $p < 0.05$  están marcados en negrita. \* Dado que el número de observaciones menos el número de tratamientos para *L. chillanensis* y *L. burmeisteri*, es menor o igual que el número de variables, se eliminaron dos variables altamente correlacionadas (largo de la cabeza y largo rostral parietal) para realizar esta prueba.

Haploclosos	Lambda de Wilks	F	gl(num)	gl(den)	p
<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i>	0.7200	01.36	14	050	0.2070
<i>L. carlosgarini</i> + <i>L. sp. 1</i>	0.5300	01.46	14	023	0.2056
<i>L. crandalli</i>	0.5600	01.12	14	020	0.4020
<i>L. chillanensis</i>	0.9800	08.97	12	002	0.1046
<i>L. burmeisteri</i>	0.6100	00.39	12	003	0.8970
<i>L. elongatus</i> + <i>L. shitan</i>	0.5300	12.72	14	202	<b>&lt;0.0001</b>
<i>L. smaug</i>	0.4700	01.56	14	019	0.1818
<i>L. sp. 6</i>	0.2700	02.69	14	014	0.0373
<i>L. sp. 3</i>	0.0028	65.52	11	002	<b>0.0151</b>

## DISCUSIÓN

El objetivo de este capítulo fue analizar las variaciones morfológicas, en base a datos morfométricos y de escamación, por un lado entre los haploclosados inferidos en base al árbol génico mitocondrial del complejo *Liolaemus elongatus* (*L. elongatus* + *L. shitan*, *L. smaug*, *L. sp.2*, *L. sp. 3*, *L. sp. 6*, *L. burmeisteri* y *L. antumalguen* + *L. sp. 7*, *L. crandalli*, *L. carlosgarini* + *L. sp. 1* y *L. chillanensis*, resultados obtenidos en el capítulo III), y por otro considerando solamente los individuos de las localidades tipo de las especies descritas y de las localidades de las especies candidatas propuestas para este complejo.

Ambas aproximaciones detectaron diferencias significativas entre los grupos comparados (Tablas 16a y 19a), en general el conjunto de los diez grupos comparados en base a haploclosados (resultado del árbol génico mitocondrial del capítulo III, Figura 14) presentó un mayor número de grupos morfológicamente distintos (Parte I, Tabla 16b) comparado al análisis del conjunto de los 14 grupos comparados según asignación de especies (o especie candidata) de acuerdo a las localidades tipo. Este último grupo (Parte II, Tabla 19b) presentó un error total menor que el del análisis según los haploclosados comparado con los obtenidos con el grupo de la Parte I.

Específicamente, para la Parte I, se encontró que todos los haploclosados identificados molecularmente en el capítulo III presentaron diferencias morfológicas significativas, a excepción de *L. chillanensis* y *L. carlosgarini* + *L. sp. 1* (Tabla 16b), con un error elevado en el análisis discriminante (Figura 18).

Por otro lado, en la Parte II (utilizando solo los individuos de las localidades tipo de las especies o especies candidatas), se encontró que el error del análisis fue considerablemente menor (12.5% vs 37%, Tablas 16a y 16b), pero el número de grupos que no se diferenció fue mayor que el de la Parte I (*L. smaug*, *L. carlosgarini*, *L. sp. 6* y *L. elongatus*, Tabla 19b).

Al comparar los resultados obtenidos entre estos dos criterios, se detectan varias diferencias notables que se discuten a continuación.

En ambos análisis *L. burmeisteri* se recupera estadísticamente distinto al resto de los linajes o agrupaciones (Figuras 18 y 19, Tablas 16b y 19b); este patrón se repite para *L. crandalli* y *L. sp. 3*. *Liolaemus smaug* y *L. sp. 6* son estadísticamente distintos en el análisis de la Parte I pero no se distinguen significativamente en la Parte II. Lo contrario ocurre para *L. chillanensis* que en los análisis según los resultados moleculares del capítulo

III, se recupera estadísticamente similar a *L. carlosgarini* + *L. sp. 1* (Figuras 18 y 19, Tablas 16b y 19b), pero en los análisis de la Parte II se distingue estadísticamente del resto (Tabla 19b).

*Liolaemus elongatus* + *L. shitan* presentó la nube de puntos con mayor dispersión en los resultados de la Parte I (Figura 18), tanto en comparación con los otros taxa de este análisis, como con la dispersión de las nubes de puntos de estos taxa por separado en el análisis de la Parte II, que fue mucho más reducida (Figura 19). Debido a que en la Parte I, los análisis se realizaron incluyendo individuos de toda el área de distribución de *L. elongatus* y *L. shitan*, que corresponde a una gran extensión geográfica, la de ubicación más austral del complejo, se podría pensar en una correlación positiva entre el tamaño del área de distribución y la variación morfológica. En este sentido, estos resultados concuerdan con los encontrados por Martínez (2012), donde el haploclado de mayor distribución geográfica y el más austral (*L. bibronii* sensu stricto), tiene un rango muy grande de variación morfológica en comparación con otros taxa cercanamente relacionados de distribución geográfica más restringida. Una situación diferente y contrastante se presentó con *L. carlosgarini* + *L. sp. 1*, que es uno de los haploclados de distribución más septentrional, ya que presentó poca dispersión de puntos tanto en la Figuras 18 como en la Figura 19, a pesar de que en esta última se analizaron por separado los dos taxa mencionados; además en el capítulo III se infirió estabilidad poblacional para este haploclado. Por lo tanto, estos dos patrones están en concordancia con otros estudios que observaron que poblaciones de ambientes más estables y menor rango de distribución, presentan menor grado de variación, mientras que poblaciones con mayores rangos de distribución en una variedad de ambientes, con evidencia de dispersión, presentan nuevas variantes fenotípicas (e.g. Thomas *et al.*, 2001). Es esperable que este patrón se continúe encontrando para diferentes grupos de este género, ya que en un trabajo de macroevolución sobre tiempo y modo de evolución en radiaciones evolutivas de lagartijas iguánidas se encontró que *Liolaemus* ha tenido una alta diversificación con altos solapamientos de morfoespacio inclusive entre los grandes subclados (Harmon *et al.*, 2003).

Los resultados del capítulo III no permitieron distinguir claramente con los marcadores moleculares utilizados, algunos taxa del complejo *L. elongatus* que con los resultados del análisis morfológico de la Parte II mostraron diferenciación:

1- *L. elongatus* y *L. shitan* se pueden distinguir significativamente en base a las variables morfológicas utilizadas, en el análisis discriminante *L. elongatus* se recupera a la



izquierda de la nube de puntos mientras que *L. shitan* lo hace a la derecha (Figura 18, *L. elongatus* puntos azules, *L. shitan* puntos grises) sin solapamiento de las nubes de puntos; además fueron asignados a grupos diferentes en la prueba *a posteriori* (Tabla 19b). La localidad tipo de *L. shitan* está ubicada muy cerca del extremo noreste de la distribución de *L. elongatus* (Figura 13, localidad 65, capítulo III), sugiriendo que la distribución de esta especie sería parapátrica. Las variables que más peso tuvieron en esta diferenciación estuvieron relacionadas al tamaño de la cabeza (largo hocico cloaca, largo de la cabeza, alto de la cabeza, Tabla 18) y se ha propuesto que están relacionadas a mejor calidad de dieta (Vanhooydonck *et al.*, 2010); por lo tanto la selección natural en este tipo de caracteres podría estar implicada en la diferenciación fenotípica de los mismos en estas especies. La tasa de cambio fenotípico bajo un régimen selectivo puede ser muy rápida (Adams *et al.*, 2009), mientras que la tasa de cambio de los genes utilizados en el Capítulo III sería neutral. Esta diferencia podría explicar la discordancia encontrada entre estos dos tipos de marcadores. Alternativamente, otros procesos evolutivos no excluyentes entre sí pueden estar involucrados como posibles fuentes de la homogeneidad genética encontrada entre estas especies en el Capítulo III: hibridización o división de linaje incompleta, que son causas muy probables ya que se estima que esta divergencia ocurrió muy recientemente. Tampoco se puede descartar que *L. shitan* sea una variación clinal de *L. elongatus*. Situaciones similares se han estudiado en otras lagartijas del hemisferio norte, por ejemplo Adams *et al.* (2009) encontraron en el género *Phrynosoma*, que la tasa de evolución molecular y morfológica no eran las mismas, algo esperable en general, pero especialmente en divergencias recientes bajo un régimen de selección por algún carácter fenotípico. Por lo tanto, este caso se presenta como un ejemplo más de la necesidad de utilizar el marco conceptual de la Taxonomía Integral para generar hipótesis de especies más estables, ya que la evidencia de algunos aspectos morfológicos de *L. shitan*, (Abdala *et al.*, 2010) no parece ser suficiente para soportar su estatus como una especie distinta a *L. elongatus*.

2- *L. antumalguen* + *L. sp. 7*: si bien debido al tamaño de la muestra de *L. antumalguen* no es posible realizar conclusiones robustas, estos dos taxa fueron ubicados en grupos diferentes (Tabla 19b) y escasamente solapados (Figura 19, *L. antumalguen* puntos turquesa, *L. sp. 7* puntos violeta). Debido a que la localidad tipo de *L. antumalguen* (Figura 13, localidad 5, capítulo III) se encuentra a 2300 msnm en el Volcán Domuyo y geográficamente separada de las localidades propuestas para *L. sp. 7* (Figura 13, puntos 1 a

4, capítulo III), que están a menor elevación, es esperable encontrar diferencias morfológicas, ya que en reptiles escuamados, en general las especies que habitan mayor altitud o latitud tienden a tener menor tamaño corporal, ya que la evidencia indica que siguen la regla inversa de Bergmann (1847; ver Millien *et al.*, 2006 por una síntesis de esta regla en principales grupos de vertebrados y su nivel de soporte). Pero estudios realizados en un grupo limitado de especies del subgénero *Eulaemus* mostraron resultados no concluyentes con respecto a este tema (Cruz *et al.*, 2005; Pincheira-Donoso y Scolaro, 2007). Si bien es necesario ampliar la muestra y realizar análisis más detallados, la diferencia morfológica encontrada, es congruente con la hipótesis planteada en el capítulo III, de que se podría tratar de un caso de especiación parapátrica reciente debido a que una subpoblación colonizó un hábitat particular de altura en el Volcán Domuyo, pero no se puede descartar una variación morfológica clinal muy marcada; por lo tanto son necesarios estudios muy detallados en la zona, con transectas y microsatélites o SNPs para analizar el grado de diferenciación entre estos dos taxa.

3- *L. carlosgarini* + *L. sp. 1*, si bien en el análisis discriminante (Figura 19) presentaron un grado de solapamiento morfológico (*L. carlosgarini* puntos verde claros, *L. sp. 1* puntos lila), en la prueba *a posteriori* (Tabla 19b) se asignaron a grupos diferentes. La localidad tipo de *L. sp. 1* está geográficamente aislada (Figura 13, localidad 82, capítulo III) de las localidades de *L. carlosgarini* y aunque en el árbol génico se recuperaron dentro de un clado, en el análisis de red de haplotipos mitocondriales estos dos taxa formaron redes separadas (Figura 15, panel A, capítulo III). Por lo tanto, si bien la relación filogenética entre estos taxa es muy estrecha, es posible que representen especies incipientes, con un bajo grado de diferenciación morfológica, aunque es necesario aumentar el tamaño de la muestra de *L. sp. 1* para poder realizar análisis más exhaustivos. Una revisión reciente (Bernardo, 2011), muestra que en trabajos realizados en especies crípticas es muy común que la especiación no esté acompañada de diferenciación morfológica, y se ha sugerido que el aparato sensorial humano no siempre es lo suficientemente agudo como para reconocer especies que tal vez sólo se diferencian en escasos caracteres (Fritz *et al.*, 2006). Por lo tanto, este es muy posiblemente un ejemplo más de lo que de Queiroz (2005) se refiere cuando menciona que la mayoría de los conceptos de especie, en realidad se refieren a criterios de diagnosticabilidad, y un linaje puede estar en un estadio de monofilia recíproca con respecto a su hermano para uno de esos criterios, pero de parafilia para otro (discutido desde otra perspectiva en Hey, 2006), y

sin duda estas situaciones constituyen un desafío para el reconocimiento humano de estas especies. En un complejo de especies del mismo subgénero que el complejo *L. elongatus* (*L. bibronii*), que comparte parte del rango de distribución del complejo *L. elongatus*, también se encontró evidencia de varios haploclados diferenciados en base al gen mitocondrial citocromo-b, pero algunos de ellos presentaron escasa o nula diferenciación morfológica estadísticamente soportada (Martínez, 2012). Por lo tanto, este tipo de patrones parece ser un rasgo prevalente de complejos de especies de este género de lagartijas.

4-Relacionado con la discusión del punto tres, el análisis morfológico realizado en la Parte II no permitió distinguir estadísticamente (Tabla 19b) *L. smaug* (en el área de distribución más septentrional del complejo, capítulo III, Figura 13, cuadrados rojos, al norte del Río Colorado), de *L. carlosgarini* (distribuido al sur de *L. smaug* y al sur del Río Colorado, capítulo III, Figura 13, triángulos verdes), y tampoco permitió distinguir *L. smaug* de *L. sp. 6* (distribuido al sur estos linajes, capítulo III, Figura 13, triángulos amarillos) ni de *L. elongatus* (distribución más meridional, capítulo III, Figura 13, círculos azules). En los resultados del capítulo III se encontró que algunos haplotipos provenientes de la localidad tipo de *L. carlosgarini* fueron recuperados dentro del haploclado *L. smaug* (Figura 15, panel B, capítulo III), y los haplotipos nucleares también eran compartidos (capítulo III, Figura 16, paneles C y D), por lo que se hipotetizó que muy posiblemente esto podía deberse a flujo génico actual o reciente (tomando en cuenta la posición topológica de estos haplotipos en las redes), pero que no se podría descartar división incompleta de linaje. Por lo tanto, la similitud morfológica entre *L. carlosgarini* y *L. smaug* es congruente con los resultados moleculares. Esquerré *et al.* (2013) en su descripción de *L. carlosgarini* mencionan la similitud morfológica y proximidad geográfica entre éste y *L. smaug*, pero remarcan sólo tres diferencias entre estas dos especies: *L. smaug* tiene un menor número de escalas alrededor del cuerpo, presencia constante de poros precloacales en machos y dicromatismo sexual; estas dos últimas características no estarían presentes en *L. carlosgarini*. Se encontró evidencia que *L. smaug* tiene un número de escamas menos a *L. carlosgarini* pero esta diferencia no resultó significativa (resultados no mostrados). Con respecto a *L. elongatus* Esquerré *et al.* (2013) mencionan que ambas especies se diferencian en que *L. elongatus* tiene una media de la medida largo hocico cloaca significativamente mayor y un número de escamas alrededor del cuerpo menor y no tienen un mismo patrón de coloración. En base a los datos colectados en este capítulo ambas el

valor del largo hocico cloaca y escamas alrededor del cuerpo fueron mayores para *L. carlosgarini* que para *L. elongatus*, igualmente estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (resultados no mostrados). Estas diferencias marcadas en la descripción de *L. carlosgarini* tampoco son suficientes para una precisa diferenciación entre las especies, principalmente entre *L. smaug* y *L. carlosgarini*. Particularmente hay evidencia que el número de escamas varía tanto entre como dentro de especies de lagartijas, y está correlacionado con variables ecológicas como precipitación, sugiriendo que este carácter puede estar bajo selección para mantener balance de agua en reptiles (Calsbeek *et al.*, 2006). Por lo tanto, para estos casos, nuevamente se presenta como necesario realizar estudios más detallados para dilucidar el grado de diferenciación de estos taxa y evaluar si caracteres morfológicos diagnósticos permiten diferenciarlas; así como aumentar el tamaño de la muestra en estudios futuros. Este caso presenta un ejemplo donde si bien los autores reconocen la amplia similitud morfológica, describen una nueva especie. Una aproximación integral (Padial y De La Riva, 2009; Perkins y Austin, 2009) a la descripción de especies nuevas sería la metodología de elección para este tipo de casos, y así presentar evidencia más robusta al momento de proponer una nueva especie. A su vez, las hipótesis de especies propuestas en base a un marcador mitocondrial que posee una tasa de mutación rápida (Moore, 1995; Pamilo y Nei, 1988), en divergencias recientes, es posible que no haya pasado el suficiente tiempo para una diferenciación morfológica. En ciertos casos, la diversificación genética de especies es mayor a la tasa de cambios morfológicos (Adams *et al.*, 2009; Harmon *et al.*, 2005; Harmon *et al.*, 2003).

Las similitud morfológica entre los individuos de las localidades tipo de *L. elongatus*, *L. carlosgarini*, *L. sp. 6* y *L. smaug*, que en conjunto ocupan casi toda el rango de distribución del complejo *L. elongatus*, está en concordancia con los resultados obtenidos por Schulte *et al.*, (2004) y Pincheira-Donoso *et al.*, (2009) que no encontraron relación entre el hábitat y la morfología en varias especies de *Liolaemus*. Por lo tanto, para estos casos, se esperaría encontrar diferentes nichos ecológicos que difieren estadísticamente, si esta hipótesis planteada por los autores mencionados se mantiene para todos los complejos del género. Esto se presenta como una línea de investigación interesante a seguir para este complejo y que ha demostrado ser muy útil tanto para otros grupos de lagartijas (e.g. Leaché *et al.*, 2009, PNAS), como para salamandras (e.g. Rissler y Apodaca, 2007).

5-En el capítulo III, no se encontró evidencia de diferenciación molecular de *L. choique*, ya que haplotipos de los individuos de su localidad tipo se recuperaron dentro de los haploclosos de *L. smaug* y *L. antumalguen*; pero al analizar morfológicamente los individuos de la localidad tipo de *L. choique* (Parte II), se encontraron diferencias estadísticas entre estos y el resto de las especies o especies candidatas del complejo. Este caso sería un ejemplo similar al de *L. shitan*, que tampoco se pudo diferenciar molecularmente, pero que presentó un grado de diferenciación morfológica con respecto a *L. elongatus*. En la diagnosis de la descripción original de *L. choique* se menciona una diferencia de tamaño con *L. smaug*, una diferencia en el patrón de coloración dorsal y en el dicromatismo sexual y una diferencia en un carácter de escamación; pero hasta el momento no se la ha comparado con *L. antumalguen*. Por lo tanto, las hipótesis elaboradas para el caso de *L. shitan*, se aplican para *L. choique* ya que la evidencia encontrada hasta el momento, no le otorga la robustez necesaria para reconocerlas como especies dentro del marco de la Taxonomía Integral; estos dos taxa podrían ser variaciones clinales; presentar alto grado de flujo génico o división de linaje incompleta o representar especies muy incipientes. Para las diferencias morfológicas observadas se hipotetizó que podrían deberse a diferencias en el ambiente y a presiones selectivas divergentes asociadas a las mismas, pero se ha demostrado que si bien esto puede promover especiación, raramente la completa (Nosil *et al.*, 2009).

En el capítulo III se mencionó que las causas ecológicas son unas de las causas más frecuentes que explican el dimorfismo sexual (Andersson, 1994; Shine, 1989). Dentro de las causas ecológicas se podrían nombrar la partición de recursos o la divergencia de nicho. En este capítulo se encontró dimorfismo sexual significativo para los linajes *L. elongatus* + *L. shitan* y *L. sp. 3*, coincidentemente estos linajes son los que se distribuyen más al sur en el rango de distribución del complejo *L. elongatus* y coincidiendo con Cei (1986) que afirma un escaso dimorfismo sexual para el grupo *L. elongatus-kriegi*. Este resultado de presencia de dimorfismo sexual podría estar relacionado a cambios en el nicho ecológico de esta zona. Desde el punto de vista taxonómico, las diferencias halladas en la presencia y ausencia de dimorfismo sexual son muy útiles para diferenciar estos linajes.

Aunque para algunos casos se mencionó que son necesarios estudios más detallados, los resultados de los análisis morfológicos presentados en este capítulo, ofrecen diferente grado de apoyo a las hipótesis de especies planteadas, tanto en base a su localidad tipo (descripciones morfológicas originales), como las moleculares planteadas en el capítulo III.

La evidencia presentada por estas dos fuentes de evidencia discutidas en su conjunto con respecto al apoyo del estatus taxonómico de los taxa del complejo *L. elongatus*, se puede resumir de la siguiente manera:

A-Seis taxa con grado alto de soporte: 1-*L. elongatus*, 2-*L. crandalli*, 3-*L. burmeisteri*, 4-*L. antumalguen*, y las hipótesis de especies candidatas 5-*L. sp. 2* y 6-*L. sp. 3*.

B-Seis taxa con grado moderado de soporte: 1-*L. chillanensis*, 2-*L. carlosgarini*; 3-*L. smaug*, 4- *L. shitan* y las hipótesis de especie candidatas, 5-*L. sp. 6* y 6-*L. sp. 1*

C-Dos taxa con grado bajo de soporte: 1-*L. choique*, y la hipótesis de especie candidatas 2-*L. sp. 7*.

Bajo el marco conceptual de la taxonomía integral, las hipótesis de especies de los taxa listados en A- tienen mayor estabilidad que las hipótesis de taxa de B-; pero en ambos casos la evidencia presentada hasta el momento avala que los mismos podrían constituir linajes que evolucionan independientemente y cada uno posee características particulares e individualizables. Para las hipótesis de especies planteadas en C- la evidencia presentada hasta el momento, dentro de este marco conceptual no es suficiente, y se recomienda incorporar nueva e independiente fuente de evidencia para evaluar el grado de sustento de estas hipótesis de especies descriptas y candidatas.

## CAPÍTULO V

# FILOGENIA MOLECULAR DEL GRUPO DE LAGARTIJAS *LIOLAEMUS ELONGATUS- KRIEGI* EN BASE A DOS MARCADORES MITOCONDRIALES Y CINCO NUCLEARES (IGUANIA, LIOLAEMINI)

Versión extendida el trabajo:

**Medina, C.D.**, Avila, L.J. Sites, Jr., J.W. & Morando, M. Molecular phylogeny of the *Liolaemus kriegi* complex (Iguania, Liolaemini). Aceptado. *Herpetologica*

## INTRODUCCIÓN

Los sistemáticos tienen una larga historia utilizando ADN mitocondrial para reconstruir filogenias, pero analizar exclusivamente genomas mitocondriales puede ser engañoso y no reflejar el árbol de especies (Brito y Edwards, 2009). Una variedad de procesos pueden ser responsables por la discordancia entre árboles de genes y el árbol de especies, pero la hibridización y/o la división de linaje incompleta son considerados los más comunes (Funk y Omland, 2003). Estos dos procesos pueden dejar señales filogenéticas similares que pueden ser difíciles de distinguir sin líneas independientes de evidencia (Hird y Sullivan, 2009; Joly *et al.*, 2009; Maddison, 1997). La hibridización está más extendida que lo considerado previamente, y las especies de formación reciente y cercanamente relacionadas, son más proclives a la hibridización (Mallet, 2007). Varios casos de hibridización se han reportado en lagartijas (e.g. Leaché *et al.*, 2009; Leaché y McGuire, 2006; McGuire *et al.*, 2007), y específicamente para *Liolaemus* Olave *et al.* (2011) demostró evidencia de hibridización entre dos especies (*L. gracilis* y *L. bibronii*) que pertenecen al mismo gran clado que los taxa focales de esta tesis, grupo *Liolaemus chiliensis*; también se ha hipotetizado hibridización para varios pares de especies de *Liolaemus* (Avila *et al.*, 2006; Camargo, Morando, *et al.*, 2012; Morando *et al.*, 2004). Se espera división de linaje incompleta en especies de divergencia muy rápida y/o un tamaño poblacional efectivo grande, y también se ha reportado en muchos grupos de lagartijas (e.g. Godinho *et al.*, 2005; McGuire *et al.*, 2007), incluyendo especies de *Liolaemus* (Avila *et al.*, 2006; Morando *et al.*, 2004). Estudios complementarios con marcadores nucleares y otros tipos de datos (e.g., morfológicos, modelado de nicho climático), analizados en un contexto geográfico preciso, habitualmente ayudan a distinguir entre estos dos procesos (McGuire *et al.*, 2007; Olave *et al.*, 2011).

Teniendo en cuenta las limitaciones del genoma mitocondrial para recuperar relaciones filogenéticas entre especies, y los procesos mencionados en el párrafo anterior, se ha producido un incremento en el uso de marcadores nucleares múltiples en estudios de historia evolutiva de muchos tipos de organismos (e.g. Avila *et al.*, 2012; Camargo, *et al.*, 2012; Hackett *et al.*, 2008; Stöck *et al.*, 2008). Estos estudios multilocus evitan sesgos asociados con el locus mitocondrial, y tiene en cuenta la heterogeneidad de los árboles de diferentes genes nucleares que puede resultar de la división de linaje incompleto, flujo génico interespecífico, estimación del error, o estocasticidad mutacional (Avice, 1989;



Maddison, 1997; Pamilo y Nei, 1988). Por lo tanto, esta es una aproximación fuertemente preferida para la reconstrucción de historias evolutivas de poblaciones o especies cercanamente relacionadas (Markolf *et al.*, 2011).

Los cuatro primeros capítulos de esta tesis (Capítulos I, II, III y IV) presentaron estudios detallados de los linajes incluidos en los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi* y se presentó y analizó evidencia tanto molecular como morfológica de las especies descritas, especies candidatas previamente propuestas (Morando *et al.*, 2003) y nuevas especies candidatas que surgieron como resultado del desarrollo de esta tesis. En la introducción general se detalló la relación cercana entre los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi* (objeto de estudio en esta tesis) y con un tercer complejo *L. petrophilus*. Estos tres complejos componen el grupo *L. elongatus-kriegi*, para el cual aun no se dispone de una hipótesis filogenética sólida que relacione tanto estos tres complejos, como tampoco la pertenencia o no de algunas especies al mismo. Por lo tanto, en este capítulo el objetivo principal es proveer la primer hipótesis filogenética incluyendo todos los taxa descritos de estos tres complejos (excepto *L. cristiani*), en base a datos multi-locus (cinco genes nucleares y dos mitocondriales), y usando aproximaciones de análisis concatenados tradicionales (Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### INDIVIDUOS UTILIZADOS

Se incluyeron individuos de las localidades tipo de las cuatro especies descritas del complejo *L. kriegi*, las nueve del complejo *L. elongatus* y de las localidades de las nueve especies candidatas de ambos complejos incluidos en sendos análisis filogeográficos de los capítulos I y III. Para completar el análisis filogenético se utilizaron individuos de las diez especies descritas del complejo *L. petrophilus*; colectivamente las localidades muestreadas representan el rango geográfico conocido para estos tres complejos (Figura 20). También se incluyeron individuos de del grupo *L. punmahuida* (*L. punmahuida* y *L. flavipiceus*), considerado hermano del grupo *L. elongatus-kriegi*; se incluyó *L. thermarum*, que algunos autores sugirieron que podría pertenecer al grupo *L. elongatus-kriegi*; otras especies del gran clado *L. chiliensis* con las cuales también podría estar relacionado *L. thermarum* (*L. coerouleus*, *L. neuquensis*), mientras otras especies se incluyeron para tener otros representantes del este gran clado (*L. chiliensis*, *L. bibronii*, *L. pictus*, *L. septentrionalis*). Como grupos externos se utilizaron tres taxa de diferentes grupos del gran grupo *Eulaemus*: *L. archeforus* de la sección *L. lineomaculatus*, a *L. vallecurensis* del grupo *L. montanus* y a *L. rothi* del grupo *L. boulengeri*. Los *vouchers* de especímenes y tejidos están catalogados en la colección herpetológica del Centro Nacional Patagónico en Puerto Madryn (LJAMM-CNP), Argentina (<http://www.cenpat.edu.ar/nuevo/colecciones03.html>). Se utilizaron un total de 142 especímenes; la información detallada se encuentra en la Tabla 21 y Apéndice X.

### GENES UTILIZADOS

Los dos fragmentos mitocondriales amplificados fueron citocromo *b* (709 bp, n=123, Kocher *et al.*, 1989) y 12S (832 bp, n=117, Wiens *et al.*, 2010). Los cinco fragmentos nucleares incluyen tres loci codificantes de proteína [NCL]: EXPH5 (841 bp, n=115), KIF24 (417 bp, n=119), MXRA5 (849 bp, n=114) (Portik *et al.*, 2011); un intrón: BA3 (270 bp, n=108, Waltari y Eduards, 2002) y un locus anónimo [ANL]: LPB4G (627 bp, n=104, Olave *et al.*, 2011). Algunas de las secuencias de las diez especies descritas del complejo *L. petrophilus* (N = 57), fueron tomadas de la tesis de Feltrin (2013), mientras que 99 secuencias de especies de este complejo se obtuvieron dentro del contexto de esta tesis. Se utilizaron dos secuencias de 12S adicionales de Victoriano *et al.*, (2008), las cuales representan a *L. pictus* (Acceso GenBank EU649350.1 y EU649352.1). Para

aquellos individuos en que no se pudo obtener alguna secuencia, se utilizó otro individuo de la misma localidad (Tabla 21).

#### *EXTRACCIÓN DE DNA, AMPLIFICACIÓN Y SECUENCIAMIENTO*

El ADN genómico fue extraído utilizando el kit Qiagen® DNeasy® 96 para animales siguiendo el protocolo del fabricante. Los protocolos para las PCR y secuenciamiento de genes mitocondriales siguió a Morando *et al.*, (2003), mientras que el protocolo para los loci nucleares fueron acordes a Noonan y Yoder (2009). Todas las secuencias (ANL, NPCL, intrón y mitocondrial) fueron editadas utilizando Sequencher v4.8 (™Gene Codes Corporation Inc., 2007), y NPCL fueron traducidas a amino ácidos a fin de verificar que no hubiera codones STOP. Los alineamientos fueron directos por lo que no hubo necesidad de utilizar un software de alineación y los datos faltantes, en todos los casos, se codificaron como “?”. Para cada gen se seleccionó el modelo de evolución que mejor ajusta utilizando JModelTest v0.1.1 (Guindon y Gascuel, 2003; Posada, 2008) utilizando el criterio de información Akaike corregido (Akaike information criterion, AICc, Tabla 22). Se puso a prueba y descartó recombinación para los genes nucleares utilizando RDP: Programa de detección de recombinación (Recombination Detection Program v3.44; Heath *et al.*, 2006; Martin y Rybicki, 2000). Antes de correr los análisis concatenados se evaluó la posibilidad de saturación en la tercer base en el fragmento de citocromo-b por medio de un análisis de Factor Bayesiano en MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003). El primer modelo puesto a prueba fue un modelo no particionado y el segundo fue particionado por codón, para ambos modelos se corrió  $10^{x7}$  generaciones con sus respectivos modelos de evolución seleccionados. Se siguió el mismo procedimiento para los genes nucleares codificantes. En base a estos resultados, se utilizó una matriz combinada con el citocromo-b particionado y 12S y genes nucleares sin particionar.

#### *ANÁLISIS FILOGENÉTICOS*

*Análisis de árboles de genes por separado.*—Se utilizó Inferencia Bayesiana (IB) en el programa MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) para cada uno de los siete genes, el programa se corrió por 10 millones de generaciones y se utilizó Tracer v1.5.0 para evaluar la convergencia.

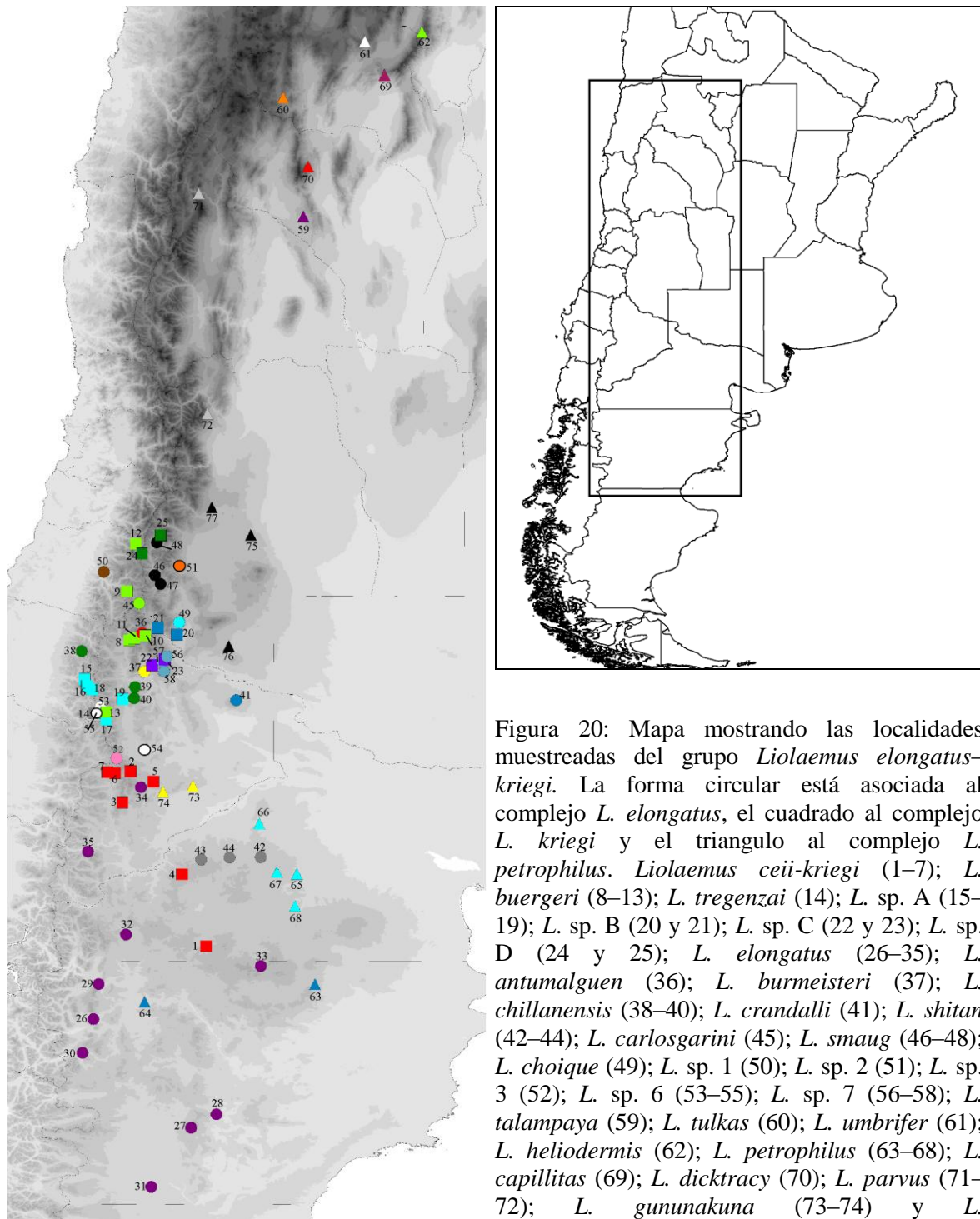


Tabla 21: Detalle de los individuos secuenciados por gen, organizado por complejo o grupo al cual pertenece. En la columna LJAMM-CNP se especifica el número de *voucher* de cada individuo y en las siguientes columnas se completa con asterisco para la secuencia de ese individuo, con otro número de *voucher* en el caso que se haya tenido que utilizar otro individuo de la misma localidad o signo de pregunta en el caso en el que no se pudo obtener secuencia para ese gen.

<i>Especie</i>	LJAMM-CNP	Citocromo-b	12s	BA3	EXPH5	KIF24	LPB4G	MXRA5
<b>Complejo <i>L. kriegi</i></b>								
<i>L. kriegi-ceii</i>	3565	*	*	*	*	*	*	*
	2733	*	*	*	*	?	*	*
	5383	*	*	*	*	*	*	*
	5562	*	*	*	*	*	*	*
	5393	*	*	*	?	*	*	*
	13870	*	*	*	*	*	*	*
	2613	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. buergeri</i>	5313	*	*	*	*	14119	*	*
	14096	*	*	*	*	*	*	*
	6413	*	*	*	*	*	*	*
	6439	*	*	*	?	*	*	*
	5294	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. tregenzai</i>	13908	*	*	*	*	*	*	?
	13918	*	*	*	*	*	*	*
	13913	*	*	*	?	*	?	?
<i>L. sp. A</i>	3433	*	*	*	*	*	*	*
	13991	*	*	*	?	?	*	*
	13907	*	*	*	*	*	*	*
	14152	*	*	*	*	?	*	2532
	5339	*	*	*	*	?	*	*
<i>L. sp. B</i>	5756	*	*	*	?	*	?	?
	2667	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. sp. C</i>	12174	*	*	*	*	*	*	*
	12148	*	*	*	*	*	*	*
	2616	*	*	*	*	*	*	*

<i>L. sp. D</i>	5797	*	*	*	*	*	*	*
	2758	*	*	*	*	*	*	*
<i>Complejo L. elongatus</i>								
<i>L. elongatus</i>	2128	*	*	?	?	*	*	*
	9060	*	*	?	*	*	*	*
	9100	*	*	?	*	*	*	*
	3675	*	*	*	*	*	*	*
	3578	*	*	*	3575	*	*	*
	3047	*	*	*	3046	*	*	3715
	3492	*	*	*	*	*	*	*
	10975	*	*	*	*	*	*	*
	8078	*	*	*	*	*	*	*
	12987	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. antumalguen</i>	6155	*	*	*	?	*	*	*
	6167	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. burmeisteri</i>	7637	*	*	*	?	*	*	*
	7644	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. chillanensis</i>	14041	*	*	*	5327	*	*	5327
	14042	*	*	11305	11305	*	11305	11305
<i>L. crandalli</i>	12220	*	*	*	*	*	*	*
	12225	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. shitan</i>	6853	*	*	*	*	*	*	*
	1915	*	*	*	*	*	*	*
	5532	*	*	*	*	*	*	*
	5537	*	*	*	*	*	*	*
	13498	*	*	*	*	*	*	*
	13527	*	*	?	*	*	*	?
<i>L. carlosgarini</i>	14061	*	*	*	*	*	*	*
	14064	*	*	?	*	*	*	*
	3435	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. smaug</i>	2679	*	*	*	*	*	*	*

	7916	*	*	*	*	*	*	*
	2764	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. choique</i>	7767	*	*	*	*	*	?	*
	7768	*	*	*	*	*	?	*
	7771	*	*	*	*	*	?	*
	7772	*	?	?	*	*	?	*
	7770	*	*	*	7769	*	*	*
<i>L. sp. 1</i>	14075	*	*	*	*	*	*	*
	14076	*	*	*	*	14073	*	*
<i>L. sp. 2</i>	7994	*	*	*	*	*	8000	8000
	7995	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. sp. 3</i>	13887	*	?	*	*	*	*	*
	MIC1642	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. sp. 6</i>	13899	*	*	13902	13902	*	*	13902
	4446	*	*	*	*	*	*	*
	2522	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. sp. 7</i>	5225	*	*	*	*	*	*	*
	2602	*	*	*	*	*	*	*
	2693	*	*	*	*	*	*	*
	10442	*	*	*	*	*	*	*
Complejo <i>L. petrophilus</i>								
<i>L. talampaya</i>	1980	*	*	*	*	*	*	*
	2737	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. tulkas</i>	4219	*	*	*	*	*	*	*
	4227	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. umbrifer</i>	5031	*	*	*	*	*	*	*
	5032	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. heliodermis</i>	8569	*	*	*	*	*	?	*
<i>L. petrophilus S</i>	5481	*	*	*	*	*	*	*
	8861	*	?	?	*	?	*	*
<i>L. petrophilus N</i>	6982	*	*	*	*	*	*	*

	11224	*	*	?	*	*	*	11122
	11355	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. capillitas</i>	2786	*	*	*	*	*	*	2789
	2788	*	*	2789	*	*	*	*
<i>L. dicktracy</i>	5816	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. parvus</i>	2706	*	2705	*	2762	*	*	2762
	2711	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. gununakuna</i>	10403	*	*	*	*	*	*	*
	2690	*	*	*	*	*	*	*
	4443	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. austromendocinus</i>	2716	*	*	*	?	*	*	*
	5147	*	*	*	*	*	*	*
	10574	*	*	*	*	*	*	*
Grupo <i>L. punmahuida</i>								
<i>L. flavipiceus</i>	7906	*	*	*	*	*	*	*
	7907	*	*	*	*	*	?	*
<i>L. punmahuida</i>	2626	*	*	*	*	*	*	?
	2649	*	*	*	*	*	*	*
Taxa de otros grupos								
<i>L. chiliensis</i>								
<i>L. chiliensis</i>	14360	*	942	*	*	?	?	*
	14361	*	?	*	*	?	?	?
<i>L. bibronii</i>	8212	*	*	*	*	*	8211	*
	9896	*	*	*	*	*	9897	8211
<i>L. pictus</i>	14359	*	EU649350.1	*	*	*	*	*
	14343	*	EU649352.1	*	*	*	*	*
<i>L. septentrionalis</i>	14099	*	*	*	*	*	*	*
	14100	*	*	*	*	*	*	*
<i>L. coeroueus</i>	14206	*	?	*	*	*	*	*
	978	*	*	*	*	*	?	*
	979	*	?	*	*	*	?	?



<i>L. neuquensis</i>	980	*	*	*	*	*	?	?
	985	*	*	?	?	?	?	?
<i>L. thermarum</i>	14130	*	*	*	?	*	*	*
	14170	*	*	*	*	*	*	*
Grupos externos								
<i>Sección</i>								
<i>L. lineomaculatus</i>								
<i>L. archeforus</i>	9238	*	*	*	*	*	?	*
	9240	*	*	*	*	*	?	*
<i>Grupo</i>								
<i>L. montanus</i>								
<i>L. vallecurensis</i>	2713	*	*	*	*	*	?	*
	2714	*	*	*	*	*	?	*
<i>Grupo</i>								
<i>L. boulengeri</i>								
<i>L. rothi</i>	3091	*	*	?	*	*	?	*
	3092	*	*	?	*	*	?	*

*Análisis de árboles de genes combinados.*—Con el fin de explorar un amplio rango de escenarios, se corrieron análisis concatenados para tres conjuntos de datos diferentes: 1— los marcadores mitocondriales combinados, 2 – los marcadores nucleares combinados, y 3 – todas las regiones de los genes combinadas, excepto para los genes mitocondriales de *L. sp. B* (para el cual se hipotetiza una introgresión antigua o hibridización, Capítulo I). Debido a que frecuentemente, las probabilidades posteriores Bayesianas son bastante diferentes a los valores de *bootstrap* de Máxima Verosimilitud (ML), también se implementó el programa RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006) para obtener valores de soportes de *bootstrap*, basado en 1,000 replicas rápidas y el modelo de evolución GTRGAMMA para todos los genes. Para los tres conjuntos de datos se implementaron los métodos IB y ML. Los análisis Bayesianos se realizaron utilizando el programa MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003), y las muestras de equilibrio, evaluadas con Tracer v1.5.0, fueron utilizadas para generar un árbol de consenso por regla del 50% de mayoría; las probabilidades posteriores (PP) fueron consideradas significativas cuando fueron  $\geq 0.95$  (Huelsenbeck y Ronquist, 2001). Los análisis de los *bootstraps* de ML fueron realizados con el programa RAxML v7.0.4 (Stamatakis, 2006), basado en 1.000 análisis rápidos de *bootstrap* y el modelo de evolución GTRGAMMA.

## RESULTADOS

### ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

En la Figura 21 se muestra el resultado de la inferencia Bayesiana para el primer grupo de datos: 1–marcadores mitocondriales combinados; en la Figura 22, se muestra el árbol consenso Bayesiano para el segundo grupo de datos: 2 –marcadores nucleares combinados, y en la Figura 23 los correspondientes a: 3 – todas las regiones de los genes combinadas; en todos los casos se muestran los valores de soporte de *bootstraps* de Máxima Verosimilitud. El árbol de genes mitocondriales (Figura 21) recuperó tres haploclados principales que se corresponden con los tres complejos del grupo *L. elongatus-kriegi*: *Liolaemus kriegi* (IB=1/ML=100), *L. elongatus* (IB=1/ML=-) y *L. petrophilus* (IB=1/ML=93), incluyendo 25 especies descritas y nueve especies candidatas, con un alto soporte (IB=1/ML=98). Los complejos *Liolaemus kriegi* y *L. elongatus* se recuperaron como hermanos con alto soporte (IB=1/ML=100). Un haploclado con dos individuos de *L. shitan* no se recuperó como parte de ninguno de estos dos haploclados sino como hermano de los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi* con alto soporte (IB=1/ML=100). La mayoría de las especies fueron recuperadas como haploclados con alto soporte, con la excepción de *L. talampaya*, *L. umbrifer*, *L. elongatus*, *L. shitan* y las especies candidatas *L. sp. 6* y *L. sp. 7*. Dentro de cada uno de los tres haploclados principales, la mayoría de las relaciones mostraron resolución con valores de soporte altos. El grupo *L. punmahuida* (IB=1/ML=99) se recuperó como hermano del grupo *L. elongatus-kriegi*. Cabe destacar que *L. thermarum* no se recuperó dentro del grupo *L. elongatus-kriegi*, sino relacionado a otras especies del clado *L. chiliensis*, *L. tregenzai* se recuperó dentro del complejo *L. kriegi* y *L. parvus* dentro del complejo *L. petrophilus*.

El árbol concatenado de genes nucleares (Figura 22) si bien presentó notables diferencias topológicas con respecto al árbol de genes mitocondriales (Figura 21), la mayoría de ellas no tiene soporte estadístico. Por lo tanto, a continuación se discuten aquellas incongruencias con soporte estadístico alto. En primer lugar no se recuperó la monofilia de los complejos *L. elongatus* y *L. petrophilus* y el complejo *L. kriegi* sólo tuvo soporte alto con *bootstrap* (95%) (IB = 0.87). La especie candidata *L. sp. B* se recuperó anidada en el complejo *L. petrophilus* y no en el complejo *L. kriegi* como se la había recuperado en el árbol concatenado mitocondrial (Ver también Apéndice XI, árboles de genes). En este árbol de genes nucleares, *L. tregenzai* se recuperó estrechamente

relacionado con *L. flavipiceus* (0,98/99%) del grupo *L. punmahuida* (y no en el complejo *L. kriegi* como en el árbol mitocondrial, Fig. 21). En concordancia con el árbol de genes mitocondriales, *L. thermarum* no se recuperó como parte del grupo *L. elongatus-kriegi*.

Tabla 22: Resumen de cada gen con el detalle de la naturaleza de cada gen, el modelo de evolución mejor ajustado seleccionado con JModelTest (utilizando el criterio de información Akaike corregido), tasa de variación de la distribución gamma a través de los sitios y el resultado de la prueba de recombinación: prueba realizada con RDP para los genes nucleares (R).

Gen	Naturaleza	Modelo de Evolución	Base	Nst	Tasa	R
Citocromo- <i>b</i>	Mitocondrial codificante	HKY+I+G	0.3518	2	Gamma	-
			0.3194			
			0.0885			
			0.2403			
12S	Mitocondrial ribosomal	GTR+I+G	0.2058	6	Gamma	-
			0.1853			
			0.2500			
			0.3590			
BA3	Intrón nuclear	JC	Equal	1	Equal	NO
MXRA5	Codificante nuclear	HKY+G	0.3294	2	Gamma	NO
			0.1822			
			0.2073			
			0.2811			
LPB4G	Anónimo nuclear	HKY+G	Equal	6	Gamma	NO
EXPH5	Codificante nuclear	GTR+G	0.2513	6	Gamma	NO
			0.1783			
			0.2052			
			0.3652			
KIF24	Codificante nuclear	TrNef+G	Equal	6	Gamma	NO

En el árbol concatenado con los marcadores mitocondriales y nucleares se recuperó un clado con un soporte alto (Figura 23, IB=1/ML=99) que incluye los tres complejos *L. kriegi*, *L. elongatus*, y *L. petrophilus*, pero sólo éste último se recuperó con soporte alto (1/0,98), mientras que el complejo *L. kriegi* solo tuvo soporte con *bootstrap* (96%) (IB = 0.81). El grupo *L. punmahuida* se recuperó como hermano del grupo *L. elongatus-kriegi* con soporte alto (IB = 1, ML = 100%). Las posiciones de *L. tregenzai* y *L. parvus* se recuperaron dentro de los complejos *L. kriegi* y *L. petrophilus* respectivamente, resultados similares a las del árbol mitocondrial (Figura 21). Los complejos *L. elongatus* y *L. petrophilus* se recuperaron dentro de un clado con soporte alto (IB=1/ML=100), resultado contrastante con el del árbol mitocondrial, donde el complejo *L. elongatus* se recuperó como hermano del complejo *L. kriegi* (Figura 21). Dentro del complejo *L. kriegi* cada uno de las especies descritas o candidatas se recuperaron como monofiléticas. Las especies

del complejo *L. petrophilus* que no se recuperaron como monofiléticas fueron *L. austromendocinus*, *L. sp. B*, *L. talampaya*; mientras para el complejo *L. elongatus* la mayoría de las especies no se recuperaron como monofiléticas (*L. choique*, *L. smaug*, *L. elongatus*, *L. antumalguen*, *L. sp. 7*, *L. sp. 6* y *L. carlosgarini*), a excepción de *L. burmeisteri*, *L. crandalli*, *L. shitan* y *L. sp. 1*.

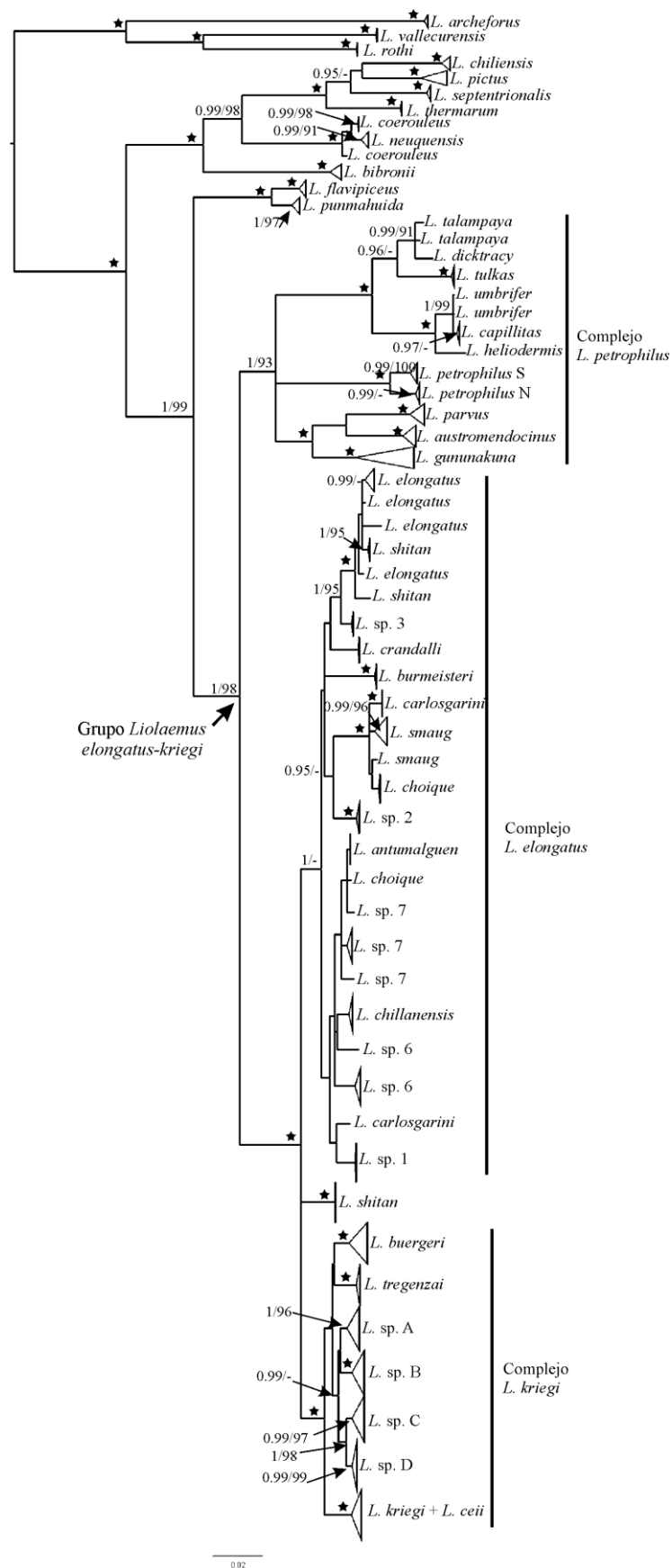


Figura 21: Árbol concatenado mitocondrial Bayesiano. Las estrellas en los nodos representan: IB=1 y ML=100%.



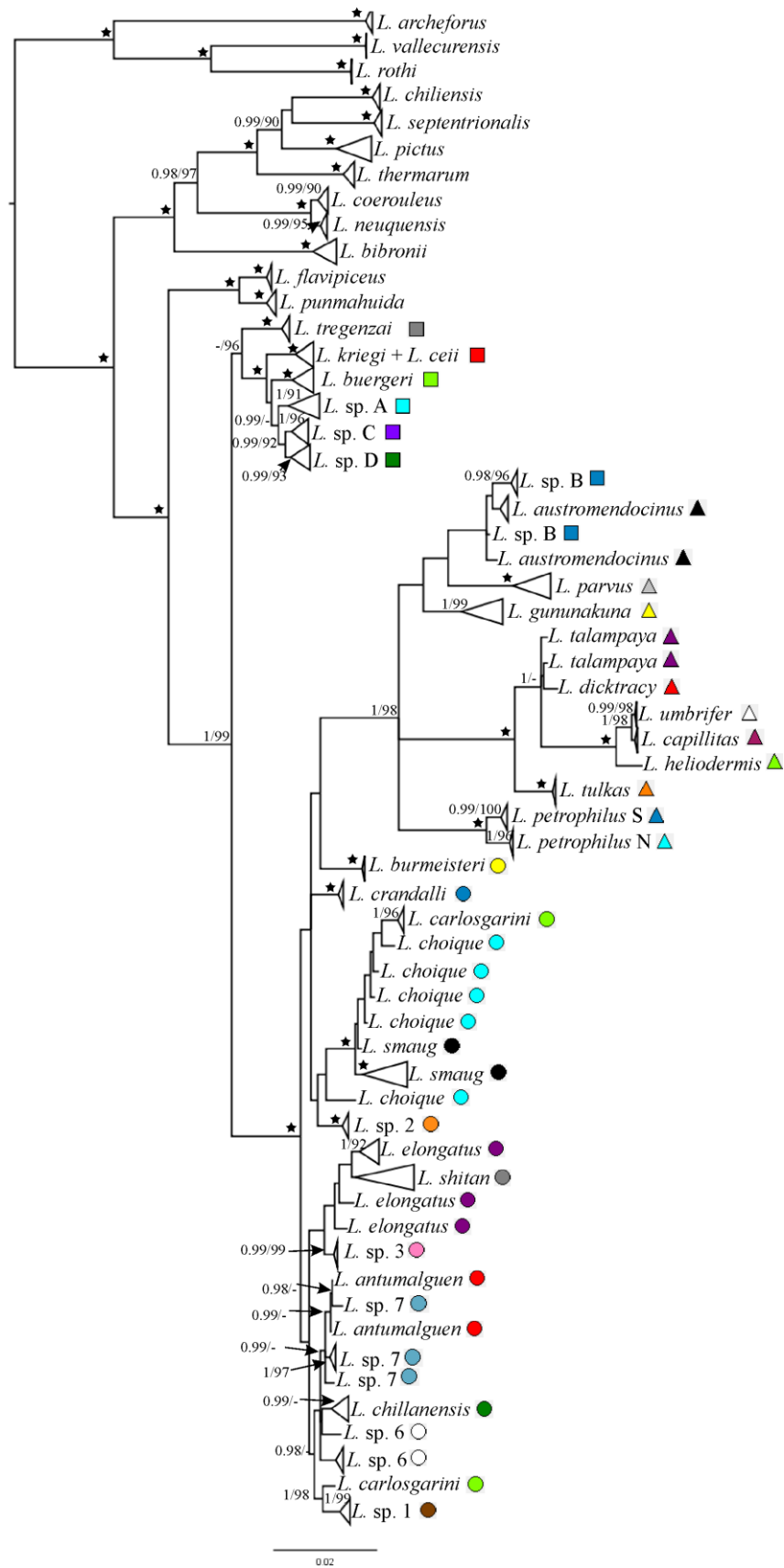


Figura 23: Árbol concatenado mitocondrial y nuclear Bayesiano. Las estrellas en los nodos representan: IB=1 y ML=100%. Los símbolos al lado de las especies se corresponden con los utilizados en la Figura 20.



## DISCUSIÓN

### ANÁLISIS FILOGENÉTICOS

El objetivo de este capítulo fue presentar la primer filogenia integral multilocus del grupo *L. elongatus-kriegi*, incluyendo todos los linajes reconocidos e implementando métodos tradicionales concatenados utilizando las aproximaciones de Inferencia Bayesiana y Máxima Verosimilitud.

El grupo *Liolaemus elongatus-kriegi* (Figuras 21, 22 y 23), que incluye los complejos *L. elongatus*, *L. kriegi* y *L. petrophilus* (23 especies descritas y nueve especies candidatas) se recuperó como monofilético con soporte alto en el árbol mitocondrial (Figura 21) y en el árbol combinado de todos los datos (Figura 23); pero no se encontró una hipótesis robusta para las relaciones filogenéticas entre los tres complejos. Tanto en el árbol mitocondrial (Figura 21) como en el árbol combinado de todos los datos (Figura 23), se encontró el complejo *L. punmahuida* como hermano del grupo *Liolaemus elongatus-kriegi*, mientras que en el árbol nuclear se recuperó un clado con estos cuatro complejos sin clara resolución de las relaciones entre los mismos (Figura 22).

La monofilia del complejo *L. kriegi* fue recuperada en los tres árboles con soporte alto a moderado (Figuras 21, 22 y 23) incluyendo las tres especies descritas (*L. kriegi*, *L. ceii*, *L. buergeri*) y las tres especies candidatas (*L. sp. A*, *L. sp. C*, *L. sp. D*). El árbol mitocondrial concatenado también incluyó a *L. tregenzai* y *L. sp. B* dentro del complejo *L. kriegi*, mientras que el árbol de fragmentos nucleares concatenados incluyó a *L. sp. B* dentro del complejo *L. petrophilus* y a *L. tregenzai* en el complejo *L. punmahuida* junto a *L. punmahuida* y *L. flavipiceus* (Figura 22). Los resultados contrastantes y con soporte alto entre el árbol mitocondrial y el nuclear para *L. tregenzai* permiten hipotetizar dos procesos que pudieron haber dado lugar al mismo: 1-estocasticidad del marcador mitocondrial, o 2-hibridización interespecífica antigua. Será necesaria la inclusión de un número alto de marcadores nucleares para obtener evidencia que indique cuál de estos mejor es la hipótesis con más sustento. Para el caso de *L. sp. B*, los resultados contrastantes entre tipos de marcadores están en concordancia con resultados previos (Capítulo I, Feltrin, 2013; Medina *et al.*, 2014; Morando *et al.*, 2003); las hipótesis posibles son las mismas que las enumeradas para *L. tregenzai* que se discutieron en extenso en el Capítulo I. En cuanto a la topología de las relaciones de las especies del complejo *kriegi*, comparando lo obtenido en el capítulo I con los de este capítulo, resultaron congruentes.

El complejo *L. elongatus* fue recuperado como monofilético solamente en el árbol mitocondrial (Figura 21) y en el árbol combinado total (Figura 23), la mitad de las especies pertenecientes al mismo se recuperaron como monofiléticas. La especie recientemente descrita, *L. shitan*, en el árbol de marcadores mitocondriales concatenados se recuperó en dos clados diferentes (Figura 21), uno hermano de *L. elongatus* y el otro en una politomía con los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi*. En el árbol de marcadores nucleares concatenados (Figura 22) se recuperaron todos los individuos en un solo clado anidado entre los individuos de *L. elongatus*. En el árbol de marcadores mitocondriales y nucleares concatenados que se muestra en la Figura 23 (Topología bayesiana con los soportes de IB y ML) se recuperó a *L. shitan* anidado con los individuos de *L. elongatus*, pero en el árbol de ML la posición de dos individuos de *L. shitan* es similar a la encontrada en la Figura 21 (Topología de árbol bayesiano para los marcadores mitocondriales concatenados) para los mismos individuos. En el capítulo III se discutieron tres posibles causas para este patrón de individuos de *L. shitan* que tienen distintas ubicaciones en el árbol mitocondrial, y en este capítulo se sumó evidencia de monofilia a nivel nuclear.

Las restantes especies del complejo *L. elongatus* que no presentaron monofilia a nivel mitocondrial tampoco lo hicieron a nivel nuclear, esto está en concordancia con lo hallado en las redes de haplotipos mitocondriales del capítulo III, donde haplotipos de individuos de localidades tipos se recuperaban anidados en redes de otras especies descritas, como es el caso de *L. carlosgarini*, *L. choique* y *L. shitan*. Los resultados de las redes de haplotipos mitocondriales del capítulo III podría tomarse como evidencia de flujo génico entre algunas de las especies del complejo *L. elongatus*, lo cual viola los presupuestos de los métodos filogenéticos, que se traduce en problemas para la estimación de las filogenias; debido a las divergencias recientes de estos linajes, muy posiblemente también la división incompleta de linaje sea un proceso responsable para los patrones observados en los genes de en estas especies. Para refinar el estatus del complejo *L. elongatus* se deberá ampliar el número de genes secuenciados, principalmente genes nucleares de tasa de mutación rápida, como por ejemplo intrones, y para analizar el grado de flujo génico inter-específico realizar análisis de microsatélites. Otra opción muy valiosa sería incorporar datos de SNPs para poder delimitar especies, metodología que ha sido demostrada como muy útil para los geckos forestales de África occidental (Complejo *Hemidactylus fasciatus*, Leaché *et al.*, 2014).

El complejo *L. petrophilus* se recuperó como monofilético en el árbol mitocondrial (Figura 21) y en el árbol combinado (Figura 23). Dentro de este complejo, *L. talampaya* no se recuperó como monofilética en ninguno de los árboles, y siempre estuvo asociada a *L. dicktracy* (Figuras 21, 22 y 23). En todos los árboles se recuperó con soporte alto el grupo *capillitas* (Lobo, 2010) integrado por: *L. talampaya*, *L. dicktracy*, *L. tulkas*, *L. umbrifer*, *L. capillitas* y *L. heliodermis*, que son las de la distribución más al norte del complejo *L. petrophilus* (Figura 20). Las dos especies de distribución central (*L. austromendocinus*, *L. gununakuna*) y los dos linajes de la especie de distribución más austral de este complejo, *L. petrophilus*, se recuperaron como linajes independiente (Figuras 21, 22 y 23), en el primer caso, solo soportadas estadísticamente en el árbol mitocondrial (Figura 21), mientras que en el último en todos los árboles. Por lo tanto esta diferenciación en tres linajes dentro del complejo *L. petrophilus* tiene una concordancia geográfica, y será necesario incorporar más marcadores para realizar estimaciones de divergencia y explorar posibles factores involucrados en la diversificación de los ancestros de estos linajes.

#### IMPLICANCIAS TAXONÓMICAS

En base a los resultados de este capítulo y teniendo en cuenta los resultados de los capítulos I a IV de esta tesis, se propone la siguiente composición taxonómica:

#### Grupo *Liolaemus elongatus-kriegi*

##### Complejo *L. kriegi*

*L. buergeri*

*L. ceii-kriegi* \*

*L. sp. A*

*L. sp. B*

*L. sp. C*

##### Complejo *L. elongatus*

*L. antumalguen*

*L. burmeisteri*

*L. carlosgarini*

*L. choique* \*

*L. chillanensis*

*L. crandalli*

*L. elongatus*

*L. shitan*

*L. smaug*

*L. sp. 1*

*L. sp. 2*

*L. sp. 3*

*L. sp. 6 \**

*L. sp. 7 \**

Complejo *L. petrophilus*

*L. austromendocinus*

*L. gununakuna*

*L. petrophilus N*

*L. petrophilus S*

*L. capillitas*

*L. dicktracyi*

*L. heliodermis*

*L. talampaya*

*L. tulkas*

*L. umbrifer*

*Incertae sedis*

*L. tregenzai*

*L. parvus*

*L. sp. B*

\* Especies para las cuales en esta tesis no se encontró evidencia suficiente como para considerarlas válidas. En el caso de *L. ceii-kriegi*, no se puede diferenciar estos dos taxa.

Los resultados del presente capítulo presentaron la primera hipótesis filogenética multilocus para el grupo *L. elongatus-kriegi*, incluyendo todas las especies que lo componen. Si bien esta hipótesis constituye un avance importante para el conocimiento taxonómico del grupo, aun hay varios aspectos que no están resueltos. Por lo tanto, en el futuro será necesario incluir un número mayor de marcadores moleculares de diversa naturaleza que permitirá la implementación de otras aproximaciones analíticas (SNPs, microstatelites).

## CONCLUSIONES FINALES

El objetivo planteado para esta tesis fue estudiar la diversidad y relaciones filogenéticas de los complejos de especies de lagartijas *Liolaemus elongatus* y *L. kriegi*. El abordaje metodológico de este trabajo ejemplifica la aproximación conceptual y metodológica de la taxonomía integral (Dayrat, 2005), en este caso, combinando tres fuentes de evidencia independientes: morfología (morfometría clásica), secuencias de ADN mitocondrial y de ADN nuclear.

En el marco conceptual de la taxonomía integral, cuando se nombran especies nuevas, los taxónomos deben presentar diferentes líneas de evidencia para apoyar la hipótesis de que una población está evolucionando independientemente. Con esta metodología cualquier tipo de carácter es igualmente útil y puede ser utilizado para proponer hipótesis de especies. Al integrar diferentes tipos de evidencia, los análisis empíricos, nos permiten reforzar, rechazar o reconciliar hipótesis, haciendo que la taxonomía sea una actividad científica más confiable. Al inicio de esta tesis para el complejo *L. kriegi* se conocían tres especies (*L. buergeri*, *L. kriegi* y *L. ceii*) y tres especies candidatas (*L. sp. A*, *L. sp. B* y *L. sp. C*), y para el complejo *L. elongatus* dos especies (*L. elongatus* y *L. chillanensis*) y tres especies candidatas (*L. sp. 5*, *L. sp. 6* y *L. sp. 7*). A lo largo de la elaboración de esta tesis diferentes autores han descrito siete especies pertenecientes al complejo *L. elongatus* (*L. antumalguen*, *L. choique*, *L. shitan*, *L. smaug*, *L. burmeisteri*, *L. carlosgarini*, *L. crandalli*). Como resultado de los análisis filogeográficos realizados para estos dos complejos de especies en los capítulos I y III, se ha propuesto una especie candidata para el complejo *L. kriegi* (*L. sp. D*) y tres para el complejo *L. elongatus* (*L. sp. 1*, *L. sp. 2* y *L. sp. 3*).

- ✓ Para el complejo *L. kriegi* se encontró soporte tanto con datos moleculares como morfológicos para el reconocimiento de casi todos los linajes propuestos, a excepción de *L. sp. B* que, debido a su posible origen híbrido, debería replantearse su estatus taxonómico.
- ✓ No se encontró sustento para la hipótesis de las especies nominales *L. kriegi* y *L. ceii*, ya que ni la evidencia molecular ni la morfológica permitieron identificarlas; por lo tanto sería muy útil sumar líneas de evidencia adicionales como modelado de nicho climático, características ecológicas o reproductivas, o diferenciación en

señales químicas de reconocimiento. La hipótesis taxonómica con mayor soporte en base a la evidencia de esta tesis, es la de que son conespecíficas.

- ✓ Las especies candidatas *L. sp. A*, *L. sp. C* y *L. sp. D* mostraron señales de evolución independiente pero de origen reciente. Las especies *L. buergeri* y *L. tregenzai* presentaron un valor alto de soporte ya que todas las líneas de evidencia las avalan como linajes independientes.
- ✓ En el complejo *L. elongatus* mientras que algunas especies presentaron apoyo alto con varias líneas de evidencia (*L. elongatus*, *L. burmeisteri*, *L. antumalguen* y *L. crandalli*, *L. sp. 2*, *L. sp. 3*), otras tuvieron apoyo moderado (*L. chillanensis*, *L. carlosgarini*, *L. smaug*, *L. shitan*, *L. sp. 1*, *L. sp. 6*), y algunas bajo (*L. choique*, *L. sp. 7*), ya que no se pudieron diferenciar claramente con al menos dos tipos de datos independientes.

En el análisis filogenético de los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi* los resultados mostraron concordancia con la composición de los complejos analizados en los primeros cuatro capítulos, con algunas excepciones notables.

- ✓ El complejo *L. kriegi* se infirió como un clado con soporte alto pero los genes nucleares indican que *L. tregenzai* pertenece al grupo *L. punmahuida*.
- ✓ El complejo *L. elongatus* sólo se infirió como monofilético con soporte alto en el árbol mitocondrial.
- ✓ El complejo *L. petrophilus* se infirió como monofilético, pero los genes nucleares parecen indicar que *L. parvus* no formaría parte de este complejo.
- ✓ Cabe destacar que *L. thermarum* no se infirió dentro del grupo *L. elongatus-kriegi*, sino más cercanamente relacionado al grupo *L. pictus*.
- ✓ Las relaciones filogenéticas entre los tres complejos fueron diferentes según la aproximación utilizada. En el árbol mitocondrial los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi* son hermanos, mientras que en el árbol de genes nucleares las relaciones entre los tres complejos no tienen apoyo estadístico; en el árbol combinado el complejo *L. petrophilus* se recuperó monofilético, pero dentro de un clado que incluye todos los linajes del complejo *L. elongatus*, y el complejo *L. kriegi* como hermano de estos dos. Por lo tanto, las relaciones entre estos tres complejos aun no están resueltas.

Debido a que muchos de los linajes del grupo *L. elongatus-kriegi* tienen un origen relativamente reciente (especialmente los complejos *L. elongatus* y *L. kriegi*), es necesario incluir más marcadores nucleares que representen una muestra de todo el genoma, implementando una metodología del tipo de polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphisms*, SNP) para poder estudiar tanto algunos límites de especies como para dilucidar más detalladamente las relaciones filogenéticas entre estos complejos como entre las especies que los componen. Muy posiblemente para esclarecer algunos límites de especies, también sea necesario incorporar marcadores microsatélites para estudiar el grado de flujo génico y así inferir si sus destinos evolutivos siguen vías independientes o no.



## BIBLIOGRAFÍA

Abdala, C. S. (2007). Phylogeny of the *boulengeri* group (iguania: Liolaemidae, *liolaemus*) based on morphological and molecular characters. *Zootaxa*, 1538, 1–84.

Abdala, C. S., Acosta, J. L., Acosta, J. C., Álvarez, B. B., Arias, F., Avila, L. J., et al. (2012). Categorización del estado de conservación de las lagartijas y anfisbenas de la república argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 26.

Abdala, C. S., Quinteros, A. S., Scrocchi, G. J., y Stazzonelli, J. C. (2010). Three new species of the *Liolaemus elongatus* group (iguania: Liolaemidae) from Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 24.

Abdala, C. S., y Robles, C. (2007). *Liolaemus buergeri*. Argentina: Mendoza province. *Herpetological Review*, 38, 101.

Abdala, C. S., y Quinteros, A. S. (2014). Los últimos 30 años de estudios de la familia de lagartijas más diversa de Argentina. Actualización taxonómica y sistemática de Liolaemidae. *Cuadernos de Herpetología*, 28, 55–82.

Adams, D. C., Berns, C. M., Kozak, K. H., y Wiens, J. J. (2009). Are rates of species diversification correlated with rates of morphological evolution? *Proceedings of the Royal Society.*, 276, 2729–2738.

Aguilar, C., Wood Jr., P. L., Cusi, J. C., Guzman, A., Huari, F., Lundberg, M., et al. (2013). Integrative taxonomy and preliminary assessment of species limits in the *Liolaemus walkeri* complex (Squamata, Liolaemidae) with descriptions of three new species from peru. *ZooKeys*, 364, 47–91.

Alström, P., Rasmussen, P. C., Olsson, U., y Sundberg, P. (2008). Species delimitation based on multiple criteria: The spotted bush warbler *Bradypterus thoracicus* complex (Aves: Megaluridae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 154, 291–307.

Andersson, M. (1994). *Sexual selection*. New Jersey: Princeton University Press.

Aparicio, J., y Ocampo, M. (2010). *Liolaemus* grupo montanus etheridge, 1995 (Iguania–Liolaemidae). *Cuadernos de Herpetología*, 24.

Ashton, K. G., y Feldman, C. R. (2003). Bergmann's rule in non avian reptiles: Turtles follow it, lizards and snakes reverse it. *Evolution*, 57, 1151–1163.

Avila, L. J., Medina, C. D., Perez, C. H. F., Sites Jr, J. W., y Morando, M. (En prensa). Molecular phylogenetic relationships of the *Liolaemus elongatus* clade (Iguania: Liolaemini) and a new species of lizard from an isolated volcanic peak in northern patagonia *Zootaxa*.

Avila, L. J., Morando, M., Perez, C. H. F., y Sites Jr., J. W. (2004). Phylogenetic relationships of lizards of the *Liolaemus petrophilus* group (Squamata, Liolaemidae), with description of two new species from western Argentina. *Herpetológica*, 60, 187–203.

Avila, L. J., Morando, M., Pérez, D., y Sites Jr, J. W. (2010). A new species of the *Liolaemus elongatus* clade (reptilia: Iguania: Liolaemini) from Cordillera del Viento, northwestern Patagonia, Neuquén, Argentina. *Zootaxa*, 2667, 28–42.

Avila, L. J., Morando, M., y Sites Jr., J. W. (2006). Congeneric phylogeography: Hypothesizing species limits and evolutionary processes in patagonian lizards of the *Liolaemus boulengeri* group (Squamata: Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society*, 89, 241–275.

Avila, L. J., Olave, M., Perez, C. H. F., Perez, D. R., y Morando, M. (2013). Molecular phylogenetic relationships of the *Liolaemus rothi* complex and a new species of lizard from Auca Mahuida volcano (Squamata: Liolaemini). *Zootaxa*, 3608, 221–238.

Avila, L. J., Perez, C. H. F., Medina, C. D., Sites, J., J.W., y Morando, M. (2012). A new species lizard of the *Liolaemus elongatus* clade (Squamata: Iguania: Liolaemini) from Curi Leuvu River Valley, northern Patagonia, Neuquén, Argentina. *Zootaxa*, 3325, 37–52.

Avila, L. J., Pérez, C. H. F., Pérez, D. R., y Morando, M. (2011). Two new mountain lizard species of the *Phymaturus* genus (Squamata: Iguania) from northwestern Patagonia, Argentina. *Zootaxa*, 2924, 1–21.

Avise, J. C. (1989). Gene trees and organismal histories: A phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43, 1192–1208.

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Cambridge, Massachusetts & London, England.: Cambridge: Harvard University Press.

Bergmann, C. (1847). Über die verhältnisse der wärmeökonomie der thiere zu ihrer grösse. *Göttinger Studien*, 3, 595–708.

Bernardo, J. (2011). *A critical appraisal of the meaning and diagnosability of cryptic evolutionary diversity, and its implications for conservation in the face of climate change*: Cambridge University Press, The Systematics Association: Cambridge, UK.

Bickford, D., Lohman, D. J., Sodhi, N. S., Ng, P. K. L., Meier, R., Winker, K., et al. (2007). Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 22, 148–155.

Blaxter, M. (2003). Molecular systematics: Counting angels with DNA. *Nature*, 421, 122–124.

Bond, J. E., y Stockman, A. K. (2008). An integrative method for delimiting cohesion species: Finding the population-species interface in a group of californian trapdoor spiders with extreme genetic divergence and geographic structuring. *Systematic Biology*, 57, 628–646.

Bottari, C. (1976). Poblaciones altitudinarias aisladas de *Liolaemus elongatus* del Volcán Payun Liso. Relaciones taxoserológicas y biogeográficas con el conjunto *elongatus-austromendocinus* del sudeste arido de Mendoza [Argentina]. *Deserta*.

Breitman, M. F., Avila, L. J., Sites Jr., J. W., y Morando, M. (2012). How lizards survived blizzards: Phylogeography of the *Liolaemus lineomaculatus* group (Liolaemidae) reveals multiple breaks and refugia in southern patagonia and their concordance with other codistributed taxa. *Molecular Ecology*, 21, 6068–6085.

Brito, P. H., y Edwards, S. V. (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135, 439–455.

Bromham, L. (2009). Why do species vary in their rate of molecular evolution? *Biology Letters*, 5, 401–404.

Calsbeek, R., Knouft, J., y Smith, T. (2006). Variation in scale numbers is consistent with ecologically based natural selection acting within and between lizard species. *Evolutionary Ecology*, 20, 377–394.

Camargo, A., Avila, L. J., Morando, M., y Sites Jr., J. W. (2012). Accuracy and precision of species trees: Effects of locus, individual, and base pair sampling on inference of species trees in lizards of the *Liolaemus darwini* group (Squamata, Liolaemidae). *Systematic Biology*, 61, 272–288.

Camargo, A., Morando, M., Avila, L. J., y Sites Jr., J. W. (2012). Species delimitation with abc and other coalescent-based methods: A test of accuracy with simulations and an empirical example with lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae). *Evolution*, 66, 2834–2849.

Camargo, A., Sinervo, B., y Sites Jr., J. W. (2010). Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology*, 19, 3250–3270.

Cañon, C., D'Elía, G., Pardiñas, U. F. J., y Lessa, E. P. (2010). Phylogeography of *Loxodontomys micropus* with comments on the alpha taxonomy of *Loxodontomys* (Cricetidae: Sigmodontinae). *Journal of Mammalogy*, 91, 1449–1458.

Casagrande, M. D., Roig-Juñent, S., y Szumik, C. (2009). Endemismo a diferentes escalas espaciales: Un ejemplo con carabidae (Coleoptera: Insecta) de América del Sur austral. *Revista chilena de historia natural*, 82, 17–42.

Cei, J. M. (1974). Revision of the Patagonian iguanids of the *Liolaemus elongatus* complex. *Journal of Herpetology*, 8, 219–229.

Cei, J. M. (1975). Herpetología patagónica. El conjunto evolutivo de *Liolaemus elongatus*: Análisis serológico. *Physis (Sec. C)*, 34, 203–208.

Cei, J. M. (1979). The Patagonian herpetofauna. In W. E. Duellman (Ed) *The south american herpetofauna: Its origin, evolution, and dispersal.*: Museum of Natural History. The University of Kansas.

Cei, J. M. (1986). Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. *Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Monografie*, 4, 1–527.

Cei, J. M. (1993). Reptiles del noroeste, nordeste y este de la Argentina. *Museo Regionale di Scienze Naturali di Torino, Monografie*, 14, 1–949.

Cei, J. M., y Avila, L. J. (1998). Reconocimiento de la categorías de especies para *Liolaemus petrophilus* (Squamata, Tropiduridae, Liolaeminae). *FACENA*, 14, 75–80.

Cei, J. M., Scolaro, J. A., y Videla, F. (2003). A taxonomic revision of recognized Argentine species of the leiosaurid genus *Diplolaemus* (Reptilia, Squamata, Leiosauridae). *FACENA*, 19, 87–106.

Cei, J. M., y Videla, F. (2003). A new species of *Liolaemus* lacking precloacal pores in males from the Andean south-eastern mountains of Mendoza province, Argentina. (Liolaemidae,

Iguania, Lacertilia, Reptilia). *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino*, 20, 275–290.

Clement, M., Posada, D., y Crandall, K. A. (2000). Tcs: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9, 1657–1659.

Cooper, N. P., y Purvis, A. (2009). What factors shape rates of phenotypic evolution? A comparative study of cranial morphology of four mammalian clades. *Journal for evolutionary biology*, 22, 1024–1035.

Corbalán, V., Tognelli, M. F., Scolaro, J. A., y Roig-Juñent, S. A. (2011). Lizards as conservation targets in Argentinean Patagonia. *Journal for Nature Conservation*, 19, 60–67.

Crandall, K. A., Bininda-Emonds, O. R. P., Mace, G. M., y Wayne, R. K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology & Evolution*, 15, 290–295.

Crochet, P.-A., Geniez, P., y Ineich, I. (2003). A multivariate analysis of the fringe-toed lizards of the *Acanthodactylus scutellatus* group (Squamata: Lacertidae): Systematic and biogeographical implications. *The Linnean Society of London, Zoological Journal of the Linnean Society.*, 137, 117–155.

Cruz, F. B., Fitzgerald, L. A., Espinoza, R. E., y Schulte, J. A. (2005). The importance of phylogenetic scale in tests of Bergmann's and Rapaport's rules: Lessons from a clade of South American lizards. *Journal for evolutionary biology*, 1–16.

Chehébar, C., Novaro, A., Iglesias, G., Walker, S., Funes, M., Tammone, M., et al. (2013). *Identificación de áreas de importancia para la biodiversidad en la estepa y el monte de patagonia: ErreGé & Asociados.*

Dasmahapatra, K. K., Elias, M., Hill, R. I., Hoffman, J. I., y Mallet, J. (2010). Mitochondrial DNA barcoding detects some species that are real, and some that are not. *Molecular Ecology Resources*, 10, 264–273.

Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society.*, 85, 407–415.

de Queiroz, K. (2005). A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Sciences.*, 56, 196–215.

de Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879–886.

Di Rienzo, J., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., y Robledo, y. C. (2011). Infostat versión 2011. *Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.* URL <http://www.infostat.com.ar>.

Díaz Gómez, J. M. (2009). Historical biogeography of *Phymaturus* (Iguania: Liolaemidae) from Andean and Patagonian South America. *Zoologica Scripta*, 38, 1–7.

Díaz Gómez, J. M., y Lobo, F. (2006). Historical biogeography of a clade of *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) based on ancestral areas and dispersal-vicariance analysis (DIVA). *Papéis Avulsos de Zoologia (São Paulo)*, 46, 261–274.

Domínguez, M. C., Roig-Juñent, S., Tassin, J. J., Ocampo, F. C., y Flores, G. E. (2006). Areas of endemism of the Patagonian steppe: An approach based on insect distributional patterns using endemism analysis. *Journal of Biogeography*, 33, 1527-1537.

Donoso Barros, R., y Cei, J. M. (1971). New lizards from patagonian volcanic table-lands of Argentina. *Journal of Herpetology*, 5, 89–95.

Drummond, A. J., y Rambaut, A. (2007). Beast: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.

Dupanloup, I., Schneider, S., y Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11, 2571–2581.

Edwards, S. V., y Bensch, S. (2009). Looking forwards or looking backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 2930–2933.

Espinoza, R. E., y Lobo, F. (2003). Two new species of *Liolaemus* lizards from northwestern Argentina: Speciation within the northern subclade of the *elongatus* group (Iguania: Liolaemidae). *Herpetológica*, 59, 89–105.

Espinoza, R. E., Lobo, F., y Cruz, F. B. (2000). *Liolaemus heliodermis*, a new lizard from northwestern Argentina with remarks on the content of the *elongatus* group (Iguania: Tropiduridae). *Herpetológica*, 56, 507–516.

Esquerré, D., Núñez, H., y Scolaro, J. A. (2013). *Liolaemus carlosgarini* and *Liolaemus riodamas* (Squamata: Liolaemidae), two new species of lizards lacking precloacal pores, from andean areas of central Chile. *Zootaxa*, 3619, 428–452.

Etheridge, R. (1992). A new psammophilus lizard of the genus *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from northwestern Argentina. *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino*, 10, 1–19.

Etheridge, R. (1995). Redescription of *Ctenoblepharis adspersa* Tschudi, 1845, and the taxonomy of Liolaemidae (Reptilia, Squamata, Tropiduridae). *American Museum Novitates*, 3142, 1–34.

Etheridge, R., y Christie, M. I. (2003). Two new species of the lizard genus *Liolaemus* (Squamata: Liolaemidae) from northern Patagonia, with comments on *Liolaemus rothi*. *Journal of Herpetology*, 37, 325–341.

Excoffier, L., Laval, G., y Schneider, S. (2005). Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, 1, 47.

Feltrin, N. 2013. Conservadurismo o divergencia de nicho filogenético: Especies patagónicas del grupo *petrophilus* (Squamata: *Liolaemus*) como caso de estudio. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.

Ferraro, D. P., y Williams, J. D. (2006). Material tipo de la colección de herpetología del museo de La Plata, Buenos Aires, Argentina. *Cuadernos de Herpetología*, 19, 19–36.

Fontanella, F. M., Olave, M., Avila, L. J., Sites Jr., J. W., y Morando, M. (2012). Molecular dating and diversification of the south American lizard genus *Liolaemus* (subgenus *Eulaemus*)

based on nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 164, 825–835.

Fouquet, A., Gilles, A., Vences, M., Marty, C., Blanc, M., y Gemmell, N. J. (2007). Underestimation of species richness in neotropical frogs revealed by mtDNA analyses. *PLoS one*, 2, e1109.

Fritz, U., d'Angelo, S., Pennisi, M. G., y Valvo, M. L. (2006). Variation of Sicilian pond turtles, *Emys trinacris*-What makes a species cryptic? *Amphibia-Reptilia*, 27, 513–529.

Funk, D. J., y Omland, K. E. (2003). Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 34, 397–423.

Godinho, R., Crespo, E. G., Ferrand, N., y Harris, D. J. (2005). Phylogeny and evolution of the green lizards, *Lacerta* spp. (Squamata: Lacertidae) based on mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Amphibia-Reptilia*, 26, 271–285.

Guindon, S., y Gascuel, O. (2003). A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Systematic Biology*, 52, 696–704.

Hackett, S. J., Kimball, R. T., Reddy, S., Bowie, R. C. K., Braun, E. L., Braun, M. J., et al. (2008). A phylogenomic study of birds reveals their evolutionary history. *Science*, 320, 1763–1768

Harmon, L. J., Kolbe, J. J., Cheverud, J. M., y Losos, J. B. (2005). Convergence and the multidimensional niche. *Evolution*, 59, 409–421.

Harmon, L. J., Schulte II, J. A., Larson, A., y Losos, J. B. (2003). Tempo and mode of evolutionary radiation in iguanian lizards. *Science*, 301.

Heath, L., Van der Walt, E., Varsani, A., y Martin, D. (2006). Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *Journal of Virology*, 80, 11827–11832.

Hebert, P. D., y Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 852–859.

Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., y de Waard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society.*, 270, 313–321. Hey, J., Waples, R. S., Arnold, M. L., Butlin, R. K., y Harrison, R. G. (2003). Understanding and confronting species uncertainty in biology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 18, 597–603.

Hird, S., y Sullivan, J. (2009). Assessment of gene flow across a hybrid zone in red-tailed chipmunks (*Tamias ruficaudus*). *Molecular Ecology*, 18, 3097–3109.

Huelsenbeck, J. P., y Ronquist, F. (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*, 17, 754–755.

Hulse, A. C. (1979). A new *Liolaemus* (Sauria, Iguanidae) from the high Andes of Argentina, with ecological comments. *Annals of Carnegie Museum*, 48, 203–209.

Huson, D. H., y Bryant, D. (2005). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, 23, 254–267.

Isaac, N. J., Mallet, J., y Mace, G. M. (2004). Taxonomic inflation: Its influence on macroecology and conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19, 464–469.

Joly, S., y Bruneau, A. (2006). Incorporating allelic variation for reconstructing the evolutionary history of organisms from multiple genes: An example from *Rosa* in North America. *Systematic Biology*, 55, 623–636.

Joly, S., McLenachan, P. A., y Lockhart, P. J. (2009). A statistical approach for distinguishing hybridization and incomplete lineage sorting. *The American Naturalist*, 174, 54–70.

Knowles, L. L., y Carstens, B. C. (2007). Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56, 887–895.

Kocher, T. D., Thomas, W. K., Meyer, A., Eduards, S. V., Pääbo, S., Villablanca, F. X., et al. (1989). Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: Amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 86, 6196–6200.

Koslowsky, J. (1896). Sobre algunos reptiles de Patagonia y otras regiones Argentinas. *Revista del Museo de la Plata*, Tomo V II

Lambrot, M., y Díaz, N. F. (1987). A new species of *pristidactylus* (sauria: Iguanidae) from central Chile and comments on the speciation in the genus. *Journal of Herpetology*, 21, 29–37.

Lanzone, C., Ojeda, R. A., y Gallardo, M. H. (2007). Integrative taxonomy, systematics and distribution of the genus *Eligmodontia* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) in the temperate monte desert of Argentina. *Mammalian Biology*, 5, 299–312.

Laurent, R. F. (1983). Contribución al conocimiento de la estructura taxonómica del género *Liolaemus* wiegmanni (Iguanidae). *Boletín de la Asociación Herpetológica Argentina*, 1, 15–18.

Leaché, A. D., Fujita, M. K., Minin, V. N., y Bouckaert, R. R. (2014). Species delimitation using genome-wide SNP data. *Systematic Biology*, 63, 534–542.

Leaché, A. D., Koo, M. S., Spencer, C. L., Papenfuss, T. J., Fisher, R. N., y McGuire, J. A. (2009). Quantifying ecological, morphological, and genetic variation to delimit species in the coast horned lizard species complex (*Phrynosoma*). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106, 12418–12423.

Leaché, A. D., y McGuire, J. A. (2006). Phylogenetic relationships of horned lizards (*Phrynosoma*) based on nuclear and mitochondrial data: Evidence for a misleading mitochondrial gene tree. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 39, 628–644.

Leaché, A. D., Palacios, J. A., Minin, V. N., y Bryson Jr., R. W. (2013). Phylogeography of the Trans-Volcanic bunchgrass lizard (*Sceloporus bicanthalis*) across the highlands of south-eastern Mexico. *Biological Journal of the Linnean Society*, 110, 852–865.

Librado, P., y Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451–1452.

Lobo, F. (2001). A phylogenetic analysis of lizards of the *Liolaemus chiliensis* group (Iguania: Tropicuridae). *Herpetological Journal*, 11, 137–150.

Lobo, F. (2005). Las relaciones filogenéticas dentro del grupo *chiliensis* (Iguania: Liolaernidae: *Liolaemus*): Sumando nuevos caracteres y taxones. *Acta zoológica lilloana*, 49, 65–87.

Lobo, F., Espinoza, R. E., y Quinteros, S. (2010). A critical review and systematic discussion of recent classification proposals for liolaemid lizards. *Zootaxa*, 2549, 1–30.

López, H. L., Miquelarena, A. M., y Labrador, J. S. (2005). Biogeografía de los peces continentales de la argentina. *Regionalización biogeográfica en Latinoamérica y tópicos afines*, 509–550.

Luxbacher, A. M., y Knouft, J. H. (2009). Assessing concurrent patterns of environmental niche and morphological evolution among species of horned lizard (*Phrynosoma*). *Journal of Evolutionary Biology*, 22, 1669–1678.

Maddison, W. P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46, 523–536.

Mallet, J. (2007). Hybrid speciation. *Nature*, 446, 279–283.

Markolf, M., Brameier, M., y Kappeler, P. M. (2011). On species delimitation: Yet another lemur species or just genetic variation? *BMC Evolutionary Biology*, 11, 216.

Marshall, D. C., Hill, K. B., Cooley, J. R., y Simon, C. (2011). Hybridization, mitochondrial DNA phylogeography, and prediction of the early stages of reproductive isolation: Lessons from New Zealand cicadas (Genus *Kikihia*). *Systematic Biology*, 60, 482–502.

Marske, K. A., Rahbek, C., y Nogués-Bravo, D. (2013). Phylogeography: Spanning the ecology-evolution continuum. *Ecography*, 36, 001–013.

Martin, D., y Rybicki, E. (2000). Rdp: Detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16, 562–563.

Martínez, L. E. 2012. Métodos empíricos para delimitar especies: El complejo *Liolaemus bibronii* (Squamata: Liolaemini) como ejemplo. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba.

Martínez, O. A., y Kutschker, A. (2011). The ‘rodados patagónicos’ (patagonian shingle formation) of eastern patagonia: Environmental conditions of gravel sedimentation. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 336–345. McGuire, J. A., Linkem, C. W., Koo, M. S., Hutchison, D. W., Lappin, A. K., Orange, D. I., et al. (2007). Mitochondrial introgression and incomplete lineage sorting through space and time: Phylogenetics of crotaphytid lizards. *Evolution*, 61, 2879–2897.

Medina, C. D., Avila, L. J., y Morando, M. (2013). Hacia una taxonomía integral: Poniendo a prueba especies candidatas relacionadas a *Liolaemus buergeri* Werner 1907 (Iguania: Liolaemini) mediante análisis morfológicos. *Cuadernos de Herpetología*, 27, 27–34.

Medina, C. D., Avila, L. J., Sites Jr., J. W., y Morando, M. (2014). Multilocus phylogeography of the patagonian lizard complex *Liolaemus kriegi* (Iguania: Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society*, 113, 256–269.

Meiri, S., y Mace, G. M. (2007). New taxonomy and the origin of species. *PLoS Biology*, 5, e194.



Minoli, I., Medina, C. D., Frutos, N., Morando, M., y Avila, L. J. (2013). A revised geographical range for *Liolaemus elongatus* Koslowsky, 1896 (Squamata: Liolaemini) in Argentina: Review of reported and new-data based distribution with new localities. *Acta Herpetologica*, 8, 159–162.

Moore, W. S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: Mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution*, 718–726.

Morando, M., Avila, L. J., Baker, J., y Sites Jr., J. W. (2004). Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): Evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58, 842–861.

Morando, M., Avila, L. J., y Sites Jr., J. W. (2003). Sampling strategies for delimiting species: Genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean–Patagonian South America. *Systematic Biology*, 52, 159–185.

Morando, M., Avila, L. J., Turner, C. R., y Sites Jr., J. W. (2007). Molecular evidence for a species complex in the patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43, 952–973.

Morando, M., Avila, L. J., Perez, C. H. F., Hawkins, M. A., y Sites Jr., J. W. (2013). A molecular phylogeny of the lizard genus *Phymaturus* (Squamata, Liolaemini): Implications for species diversity and historical biogeography of southern South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 66, 694–714.

Moritz, C. (1994). Defining ‘evolutionarily significant units’ for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 373–375.

Moritz, C., Lavery, S., y Slade, R. (1995). Using allele frequency and phylogeny to define units for conservation and management. *American Fisheries Society Symposium*, 17, 249–262.

Müller, L., y Hellmich, W. (1939). *Liolaemus*-arten aus den westlichen argentinien. Iii. Ueber *Liolaemus kriegi*, eine neue *Liolaemus*-art aus des gegend der lago Nahuel Huapi. *Zoologischer Anzeiger*, 127, 44–47.

Nicola, M. V. 2013. Filogeografía y patrones de variación morfológica en el rango geográfico y climático de *Nassauvia* subgénero *Strongyloma* (Asteraceae, Nassauvieae) *Biology*. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.

Noonan, P. B., y Yoder, A. E. (2009). Anonymous nuclear markers for malagasy plated lizards (*Zonosaurus*). *Molecular Ecology Resources*, 9, 402–404.

Nosil, P., Harmon, L. J., y Seehausen, O. (2009). Ecological explanations for (incomplete) speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 24, 145–156.

Núñez, H., y Labra Lillo, A. (1985). *Liolaemus curis*, a new lizard from the los Andes range, central Chile. *Copeia*, 3, 556–559.

Núñez, H., Navarro, J., y Loyola, J. (1991). *Liolaemus maldonadae* y *Liolaemus cristiani*, dos especies nuevas de lagartijas para Chile (Reptilia, Squamata). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural, Chile*, 42, 79–88.

Olave, M., Martinez, L. E., Avila, L. J., Sites Jr., J. W., y Morando, M. (2011). Evidence of hybridization in the Argentinean lizards *Liolaemus gracilis* and *Liolaemus bibronii* (Iguania: Liolaemini): An integrative approach based on genes and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61, 381–391.

Padial, J. M., y De la Riva, I. (2007). Taxonomic inflation and the stability of species lists: The perils of Ostrich's behavior. *Systematic Biology*, 55, 859–867.

Padial, J. M., y De La Riva, I. (2009). Integrative taxonomy reveals cryptic amazonian species of *Pristimantis* (Anura: Strabomantidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 155, 97–122.

Pamilo, P., y Nei, M. (1988). Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution*, 5, 568–583.

Perkins, S. L., y Austin, C. C. (2009). Four new species of *Plasmodium* from New Guinea lizards: Integrating morphology and molecules. *Journal of Parasitology*, 95, 424–433.

Pincheira-Donoso, D., Hodgson, D. J., Stipala, J., y Tregenza, T. (2009). A phylogenetic analysis of sex-specific evolution of ecological morphology in *Liolaemus* lizards. *Ecological Research*, 24, 1223–1231.

Pincheira-Donoso, D., y Nuñez, H. (2005). *Las especies chilenas del genero liolaemus wiegmanni, 1834 (iguania: Tropiduridae: Liolaeminae)*. *Taxonomia, sistematica y evolucion*. Museo Nacional de Historia Natural.

Pincheira-Donoso, D., y Scolaro, J. A. (2007). Iguanian species-richness in the Andes of boreal Patagonia: Evidence for an additional new *Liolaemus* lizard from Argentina lacking precloacal glands (Iguania, Liolaeminae). *Zootaxa*, 1452, 55–68.

Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., et al. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595–609.

Portik, D. M., Wood, P. L., Grismer, J. L., Stanley, E. L., y Jackman, T. R. (2011). Identification of 104 rapidly-evolving nuclear protein-coding markers for amplification across scaled reptiles using genomic resources. *Conservation Genetics Resources*, 4, 1–10.

Posada, D. (2008). Jmodeltest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253–1256.

Quinteros, A. S., Abdala, C. S., Díaz Gómez, J. M., y Scrocchi, G. J. (2008). Two new species of *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) of central west Argentina. *South American Journal of Herpetology*, 3, 101–111.

Rabassa, J., y Clapperton, C. M. (1990). Quaternary glaciations of the southern Andes. *Quaternary Science Reviews*, 9, 153–174.

Rabassa, J., Coronato, A. M., y Salemme, M. (2005). Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences*, 20, 81–103.

Rambaut, A., y Drummond, A. J. (2009). Tracer v1.4, available from <http://beast.Bio.Ed.Ac.Uk/tracer>

Ramos-Onsins, S. E., y Rozas, J. (2002). Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology and Evolution*, 19, 2092–2100.

Ramos, V. A., y Folguera, A. (2011). Payenia volcanic province in the Southern Andes: An appraisal of an exceptional Quaternary tectonic setting. *Journal of Volcanology and geothermal Research*, 201, 53–64.

Ramos, V. A., y Ghiglione, M. C. 2008. Tectonic evolution of the Patagonian Andes. In J. Rabassa (Ed) *Developments in quaternary sciences* pp. 57–71): Elsevier.

Ramos, V. A., y Kay, S. 2006. Overview of the tectonic evolution of the southern central Andes of Mendoza and Neuquén (35–39° latitude). In A. Basu & M. E. Bickford (Eds) *Evolution of an Andean Margin: A tectonic and Magmatic View from the Andes to the Neuquén Basin (35 degrees-39 degrees s lat)*. Colorado, USA.: The Geological Society of America, Inc.

Renoult, J. P., Geniez, P., Bacquet, P., Benoit, L., y Crochet, P.-A. (2009). Morphology and nuclear markers reveal extensive mitochondrial introgressions in the Iberian Wall Lizard species complex. *Molecular Ecology*, 18, 4298–4315.

Riddle, B. R., Dawson, M. N., Hadley, E. A., Hafner, D. J., Hickerson, M. J., Mantooth, S. J., et al. (2008). The role of molecular genetics in sculpting the future of integrative biogeography. *Progress in Physical Geography*, 32, 173–202.

Rissler, L. J., y Apodaca, J. J. (2007). Adding more ecology into species delimitation: Ecological niche models and phylogeography help define cryptic species in the black salamander (*Aneides flavipunctatus*). *Systematic Biology*, 56, 924–942.

Roe, A. D., y Sperling, F.A. (2007). Population structure and species boundary delimitation of cryptic *Dioryctria* moths: An integrative approach. *Molecular Ecology*, 16, 3617–3633.

Ronquist, F., y Huelsenbeck, J. P. (2003). Mr bayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.

Rowe, K. C., Heske, E. J., y Paige, K. N. (2006). Comparative phylogeography of eastern chipmunks and white-footed mice in relation to the individualistic nature of species. *Molecular Ecology*, 15, 4003–4020.

Scolaro, J. A., Videla, F., y Cei, J. (2003). Algunos modelos de especiación geográfica que interpretan aspectos de la diversidad herpetológica andino-patagónica. *Historia Natural (Segunda Serie)*, 2, 73–83.

Scolaro, J. A., Videla, F., Puig, S., y Marcus, A. (2007). Diferencias morfológicas y status taxonómico de las especies simpátricas *Liolaemus coeruleus* y *Liolaemus neuquensis* (Reptilia: Iguania: Liolaemidae). *Multequina*, 16, 53–63.

Schulte II, J. A., Losos, J. B., Cruz, F. B., y Núñez, H. (2004). The relationship between morphology, escape behaviour and microhabitat occupation in the lizard clade *Liolaemus* (Iguanidae: Tropidurinae: Liolaemini). *Journal for evolutionary biology*, 17, 408–420.

Schulte II, J. A., Macey, J. R., Espinoza, R. E., y Larson, A. (2000). Phylogenetic relationships in the iguanid lizard genus *Liolaemus*: Multiple origins of viviparous reproduction

and evidence for recurring andean vicariance and dispersal. *Biological Journal of the Linnean Society*, 69, 75–102.

Sede, S. M., Nicola, M. V., Pozner, R., y Johnson, L. A. (2012). Phylogeography and palaeodistribution modelling in the Patagonian steppe: The case of *Mulinum spinosum* (Apiaceae). *Journal of Biogeography*, 39, 1041–1057.

Sérsic, A. N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Jonson, L. A., Pozner, R., Avila, L. J., et al. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 475–494.

Shaffer, T. L., y Thompson, F. R. (2007). Making meaningful estimates of nest survival with model-based methods. *Studies in Avian Biology*, 34, 84–95.

Shine, R. (1989). Ecological causes for the evolution of sexual dimorphism: A review of the evidence. *Quarterly Review of Biology*, 419–461.

Sistrom, M., Donnellan, S. C., y Hutchinson, M. N. (2013). Delimiting species in recent radiations with low levels of morphological divergence: A case study in australian *Gehyra* geckos. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 68, 135–143.

Sites Jr., J. W., y Marshall, J. C. (2004). Operational criteria for delimiting species. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 35, 199–227.

Stamatakis, A. (2006). Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688–2690.

Stöck, M., Dubey, S., Klütsch, C., Litvinchuk, S. N., Scheidt, U., y Perrin, N. (2008). Mitochondrial and nuclear phylogeny of circum-Mediterranean tree frogs from the *Hyla arborea* group. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 1019–1024.

Stone, G. N., Lohse, K., Nicholls, J. A., Fuentes-Utrilla, P., Sinclair, F., Schönrogge, K., et al. (2012). Reconstructing community assembly in time and space reveals enemy escape in a western palearctic insect community. *Current Biology*, 22, 532–537.

Tajima, F. (1989). The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics*, 123, 597–601.

Templeton, A. R. (2001). Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Molecular Ecology*, 10, 779–791.

Thomas, C. D., Bodsworth, E. J., Wilson, R. J., Simmons, A. D., Davies, Z. G., Musche, M., et al. (2001). Ecological and evolutionary processes at expanding range margins. *Nature*, 411, 577–581.

Torres-Pérez, F., Méndez, M. A., Benavides, E., Moreno, R. A., Lamboroto, M., Palma, R. E., et al. (2009). Systematics and evolutionary relationships of the mountain lizard *Liolaemus monticola* (Liolaemini): How morphological and molecular evidence contributes to reveal hidden species diversity. *Biological Journal of the Linnean Society*, 96, 635–650.

Vanhooydonck, B., Cruz, F. B., Abdala, C. S., Azócar, D. L. M., Bonino, M. F., y Herrel, A. (2010). Sex-specific evolution of bite performance in *Liolaemus* lizards (Iguania: Liolaemidae): The battle of the sexes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101, 461–475.

Victoriano, P. F., Ortiz, J. C., Benavides, E., y Adams, B. J. (2008). Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology*, 17, 2397–2416.

Videla, F., y Cei, J. M. (1996). A new peculiar *Liolaemus* species of the "*chiliensis*" phyletic group from the volcanic Cordilleran landscapes of Southern Mendoza province, Argentina (Iguania, Lacertilia, Reptilia). *Bolletino del Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino*, 14, 505–516.

Vieites, D. R., Wollenberg, K. C., Andreone, F., Köhler, J., Glaw, F., y Vences, M. (2009). Vast underestimation of Madagascar's biodiversity evidence by an integrative amphibian inventory. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*, 106, 8267–8272.

Vogler, A. P., y Monaghan, M. T. (2007). Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45, 1–10.

Waltari, E., y Eduards, S. V. (2002). Evolutionary dynamics of intron size, genome size, and physiological correlates in archosaurs. *The american naturalist*, 160, 539–552.

Werner, F. 1907. Sobre algunos lagartos nuevos clasificados i descritos. In O. Bürger (Ed) *Estudios sobre reptiles chilenos*. (p. 149—155). Chile: Anales de la Universidad de Chile.

Wiens, J. J., Kuczynski, C. A., Arif, S., y Reeder, T. W. (2010). Phylogenetic relationships of phrynosomatid lizards based on nuclear and mitochondrial data, and a revised phylogeny for *Sceloporus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54, 150–161. Will, K. W., Mishler, B. D., y Wheeler, Q. D. (2005). The perils of DNA barcoding and the need for integrative taxonomy. *Systematic Biology*, 54, 844–851.

Zink, R. M., y Barrowclough, G. F. (2008). Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. *Molecular Ecology*, 17, 2107–2121.

## APÉNDICE I: MUESTREO DE ESPECÍMENES – CAPÍTULO I

Lista de especímenes secuenciados en el capítulo I, localidades muestreadas y coordenadas geográficas. La columna de haplotipos corresponde a números que los distintos haplotipos. Los números de localidades se corresponden con los de la Figura 6.

Especímenes	LJAMM-CNP/MIC	Altitud	Longitud	Latitud	Localidades	Haplotipos
<i>L. buergeri</i>	14119–20, 14122, 14166–7	2231	-70.5161	-35.1355	(1) Chile; VII Región; Curicó; Camino a El Planchón, 6.3 km empalme camino a Pichuante-Paso Vergara.	42, 46, 47
	14086–90	1415	-71.0445	-35.5994	(2) Chile; VII Región; Talca; Cerro El Peine.	34, 39, 40
	3436–8, 14054, 14095–7	2210	-70.562	-36.0169	(3) Chile; VII Región; Talca; Laguna del Maule.	38, 41
	6156	2452	-70.1801	-36.534	(4) Argentina; Neuquén; Chos Malal; Volcán Domuyo.	39
	6413–4	2500	-70.3612	-36.6462	(5) Argentina; Neuquén; Minas; Paso Malo, Arroyo Domuyo.	39, 106
	5310, 13963–5	1694	-70.6098	-36.6257	(6) Argentina; Neuquén; Minas; Ailinco.	33, 34
	5266–7	1889	-70.5846	-36.6597	(7) Argentina; Neuquén; Minas; Las Olletas. 7 Km N Aguas Calientes.	39, 75
	6420–1, 6423, 6432–3, 6439–41	2095	-70.5407	-36.6892	(8) Argentina; Neuquén; Minas; Arroyo Covunco, cerca de Puente de Carrizo.	39, 107, 108, 109, 110
	5264, 5294–6, 5312–3	1786	-70.6251	-36.7281	(9) Argentina; Neuquén; Minas; 14 Km S Aguas Calientes.	33, 74, 76, 80, 81
	5298–300	1451	-70.9386	-36.8969	(10) Argentina; Neuquén; Minas; Ruta Provincial 45. 23 Km NW empalme Ruta Provincial 43.	77, 78, 79

<i>L. ceii-kriegi</i>	2447–9, 2632, 2729, 2733–4, 13942, 14154–6, 14207, 14209, MIC 1218–9	1694	-70.6005	-38.8751	(44) Argentina, Neuquén, Picunches, Primeros Pinos	16, 28, 44, 45, 53, 54, 57, 60, 62, 63 ,64
	14153, 14205	1703	-70.7399	-38.9026	(45) Argentina, Neuquén, Aluminé, 18 km W Primeros Pinos	16, 52
	13869–73, 13877	1543	-70.8552	-38.904	(46) Argentina, Neuquén, Aluminé, Pampa de Lonco Luan	16, 17, 18
	13929–34, MIC 1641	1514	-70.83	-38.6597	(47) Argentina, Neuquén, Picunches, Pino Hachado	24, 25, 26, 27, 122
	13944–5	1600	-70.8806	-38.7666	(48) Argentina, Neuquén, Picunches, Camino a Pino Hachado	16, 29
	2606–13, 2638–9	1614	-70.9783	-38.8866	(49) Argentina, Neuquén, Aluminé, Pampa de Lonco Luan, 12 Km E Río Litrán	16, 17, 18, 59
	5353, 5393–4, 8733	1186	-70.2227	-39.0437	(50) Argentina, Neuquén, Zapala, 22 Km SW Zapala	89, 94
	8057–9	1401	-70.4295	-39.1351	(51) Argentina, Neuquén, Catán Lil, 9.5 km SW entrada SW Parque Nacional Laguna Blanca	116, 117, 118
	5380, 5382–3	1125	-70.7318	-39.3875	(52) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Arroyo La Jardinera	90, 91, 92
	11281–6	1142	-70.4	-39.6571	(53) Argentina, Neuquén, Catán Lil, 49.0 NE San Ignacio	3
	8914–5, 12163–5	1139	-70.6471	-39.8277	(54) Argentina, Neuquén, Catán Lil, El Salitral	3, 11, 120
	MIC 1112	1600	-71.45	-40.75	(55) Argentina, Neuquén, Los Lagos, 1.5km W Cerro de las Ardillas	121
	5561–3, 11113	1247	-69.7498	-40.5679	(56) Argentina, Río Negro, El Cuy, 20 Km S Mencue	3, 97

	14301-2	1025	-70.8974	-41.1194	(57) Argentina, Río Negro, Pilcaniyeu, Dina Huapi	3
	3498-9, 3501, 3503	1123	-70.6773	-41.5617	(58) Argentina, Río Negro, Ñorquinco, 2.5 km N de Chenqueniye	3
	3593-7	1074	-69.9697	-41.2815	(59) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, 44 km W Ingeniero Jacobacci, 10 km E Clemente Onelli	3, 73
	2154, 2336-7	1141	-69.8591	-41.5416	(60) Argentina, Río Negro, Ñorquinco, 1 Km Nw Ojo de Agua	3
	219, 3073, 3083, 3565-8, 5544	1162	-69.3596	-41.7524	(61) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, 57 km S Ingeniero Jacobacci	3, 96
	173-4, 3379	887	-68.5573	-41.502	(62) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, 40 Km SE Maquinchao	3
<i>L. sp. A</i>	6462	1406	-70.6203	-37.2515	(12) Argentina; Neuquén; La Primavera, 14 km S Andacollo.	112
	14184	1605	-71.0781	-37.4027	(13) Argentina; Neuquén; Ñorquín; 8.3 km W Moncol.	30
	3433	1435	-71.3587	-37.3587	(14) Chile; VIII Región; Bío Bío; Laguna de la Laja.	72
	14187-8	2029	-71.1168	-37.4537	(15) Argentina; Neuquén; Ñorquín; 19 km W Moncol.	48, 49
	13987-92	1419	-71.32	-37.4721	(16) Chile; VIII Región; Biobío; Laguna de la Laja, Los Barros.	35, 36, 37
	14148, 14152, 14189	1489	-71.2343	-37.5284	(17) Chile; VIII Región; Biobío; Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros.	36, 43
	14195-7	1586	-71.1462	-37.4954	(18) Chile; VIII Región; Biobío; Paso Pichachen, 20.2 km E Los Barros.	43, 50, 51
	13904-7	2020	-71.101	-37.8198	(19) Argentina; Neuquén; Ñorquín; W Termas de Copahue, 1 km de la salida.	19, 20, 21
	13956-8	1524	-71.0015	-37.8664	(20) Argentina; Neuquén; Ñorquín; Monco.	30, 31, 32



	2532-3, 2663-4	1690	-70.9977	-37.9008	(21) Argentina; Neuquén; Ñorquín; 5 Km E Caviahue, enfrente del Lago Caviahue.	20, 58
	3286-93	1491	-70.9189	-37.8158	(22) Argentina; Neuquén; Ñorquín; Cascada del Río Agrio.	20, 66, 67, 68, 69, 70, 71
	5324, 5328-32, 5339	1566	-70.6268	-37.5851	(23) Argentina; Neuquén; Ñorquín; 20 Km S El Cholar.	82, 83, 84, 85, 86, 87, 88
	5388	1463	-70.444	-38.141	(24) Argentina; Neuquén; Loncopue; 23,9 Km SE Loncopue.	93
<i>L. sp. B</i>	8694, 8701	738	-68.8443	-37.4692	(29) Argentina; Neuquén; Pehuenches; Cuesta del León	119
	7758	1400	-69.9445	-37.3767	(30) Argentina; Neuquén; Pehuenches; Laguna Auquinco.	4
	11321-3	1233	-69.8476	-37.3348	(31) Argentina; Neuquén; Pehuenches; Ruta Provincial 9, 6.1 km N empalme Ruta Provincial 7	4, 5, 6
	11327-9	798	-69.6871	-37.1093	(32) Argentina; Neuquén; Pehuenches; 20 km E Buta Ranquil.	4, 7
	1216, 2441, 2443-4, 2667-8, 5719-22, 5756	1615	-69.8372	-36.6325	(33) Argentina; Mendoza; Malargüe; 5 Km N Ranquil Norte.	10, 55, 56, 98, 99, 100, 101
	12170-6, 12341	1406	-70.1519	-36.5214	(34) Argentina; Neuquén; Chos Malal; (Circuito Cochico), entre Huinganco y Butaco.	12
	5716	1112	-69.6651	-36.5126	(35) Argentina; Mendoza; Malargüe; Puente El Zampal.	98
	7962	2134	-69.3708	-36.488	(36) Argentina; Malargüe; Mendoza; Volcán Payun Liso.	98
<i>L. sp. C</i>	6159-60	2375	-70.1971	-36.5428	(25) Argentina; Neuquén; Chos Malal; Volcán Domuyo.	104, 105

	12140, 12148–50	2012	-70.145	-37.1299	(26) Argentina; Neuquén; Chos Malal; Entrada “Área Natural Protegida Tromen”, Laguna Los Barros.	8, 9
	10446–8	2252	-70.0748	-37.0655	(27) Argentina; Neuquén; Chos Malal; El Escorial.	1, 2
	7660	1810	-69.9995	-36.9888	(28) Argentina; Neuquén; Pehuenches; Arroyo Butaco.	113
<i>L. sp. D</i>	7893–4, 7896–9	1987	-70.2336	-35.9583	(37) Argentina; Mendoza; Malargüe; 17.3 km E Paso Pehuenche, 23 km W Las Loicas.	114, 115
	MIC1602	1700	-70.1904	-35.8437	(38) Argentina; Mendoza; Malargüe, Termas de Cajón Grande.	114
	2744, 2747	1550	-70.2022	-35.6508	(39) Argentina; Mendoza; Malargüe; Mallines Colgados.	61
	5808	1856	-70.2477	-35.4875	(40) Argentina; Mendoza; Malargüe; Arroyo El Montañés, 43 km S Termas del Azufre.	61
	5796–8	2279	-70.4135	-35.2972	(41) Argentina; Mendoza; Malargüe; 11.4 km S Termas del Azufre.	61, 102, 103
	2682	2900	-70.1694	-35.1138	(42) Argentina; Mendoza; Malargüe; 16 Km W Las Leñas.	61
	2754–5, 2757–8	1600	-70.1086	-35.0988	(43) Argentina; Mendoza; Malargüe; 7 Km N Las Leñas.	65
<i>L. tregenzai</i>	13908, 13910, 13912, 13918–9, MIC 1134	2020	-71.101	-37.8198	(11) Argentina; Neuquén; Ñorquín; W Termas de Copahue.	22, 23

## APÉNDICE II: RESULTADOS DEL ANÁLISIS DE SAMOVA –

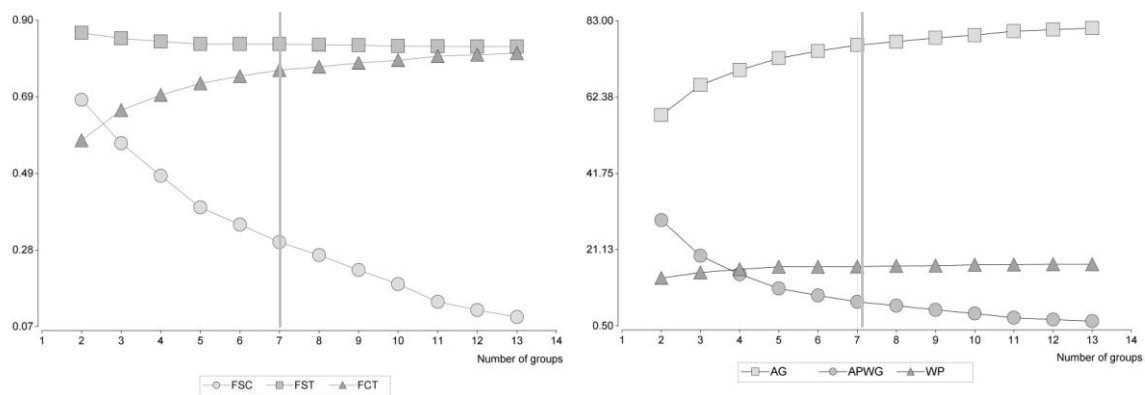
### CAPÍTULO I

Resultados del análisis de SAMOVA para el complejo *Liolaemus kriegi*

Tabla con los valores de SAMOVA: variación entre grupos de poblaciones ( $F_{CT}$ ); variación entre poblaciones dentro de los grupos ( $F_{SC}$ ); variación entre poblaciones entre grupos ( $F_{ST}$ ) y valores de AMOVA, porcentaje de la varianza genética total explicada por cada nivel de variación: entre grupos de poblaciones (AG); entre poblaciones dentro de los grupos (APWG); dentro de poblaciones (WP).

Número de grupos	$F_{CT}$	$F_{SC}$	$F_{ST}$	AG	APWG	WP
2	0.68431	0.86571	0.57461	57.46	29.11	13.43
3	0.56623	0.85079	0.65602	65.6	19.48	14.92
4	0.47856	0.84207	0.69712	69.71	14.49	15.79
5	0.3929	0.83538	0.72884	72.88	10.65	16.46
6	0.34621	0.83523	0.74798	74.8	8.73	16.48
7	0.29882	0.83496	0.76462	76.46	7.03	16.5
8	0.2636	0.8331	0.77335	77.34	5.97	16.69
9	0.22339	0.83213	0.78384	78.38	4.83	16.79
10	0.18502	0.82986	0.79124	79.12	3.86	17.01
11	0.13729	0.82921	0.80203	80.2	2.72	17.08
12	0.1151	0.82835	0.80603	80.6	2.23	17.16
13	0.09566	0.82833	0.81017	81.02	1.82	17.17

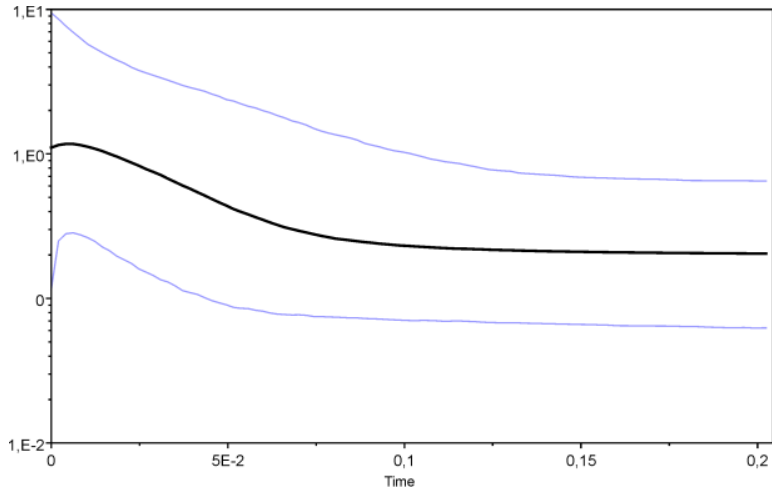
Las Figuras muestran las curvas con los valores de  $F_{CT}$ ,  $F_{SC}$  y  $F_{ST}$  en el panel izquierdo, y los valores de AG, APWG y WP en el panel derecho, para cada grupo numérico (K). Las líneas verticales corresponden a K=7, la cual marca el comienzo de la meseta en las curvas de  $F_{CT}$  y de AG.



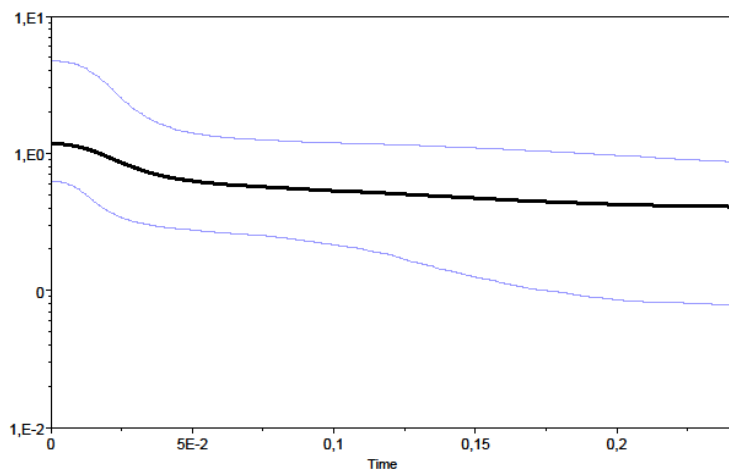
### APÉNDICE III: RESULTADO DEL ANÁLISIS DE BSP – CAPÍTULO I

Resultados de los análisis de *Bayesian Skyline Plot* (BSP)

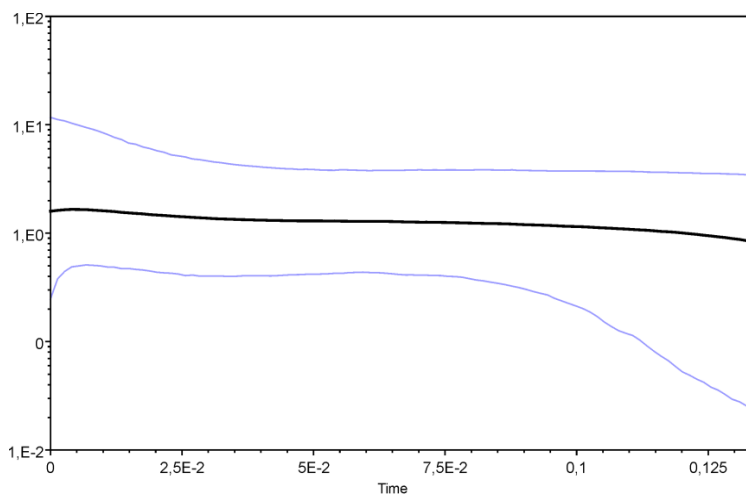
*Liolaemus buergeri*



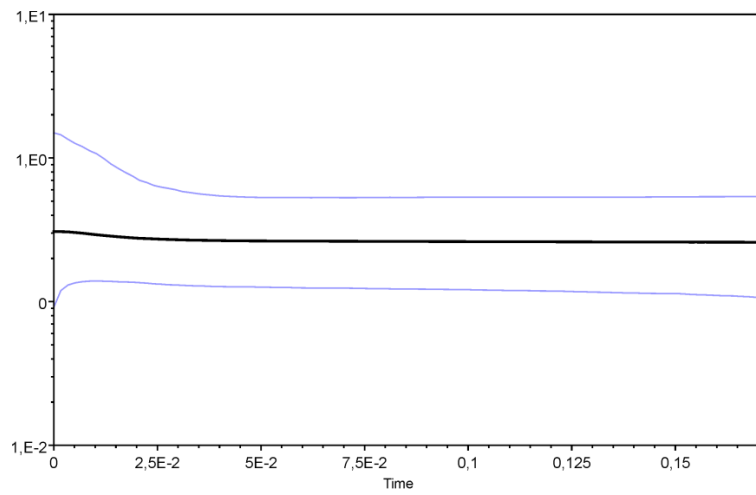
*Liolaemus kriegi* + *L. ceii*



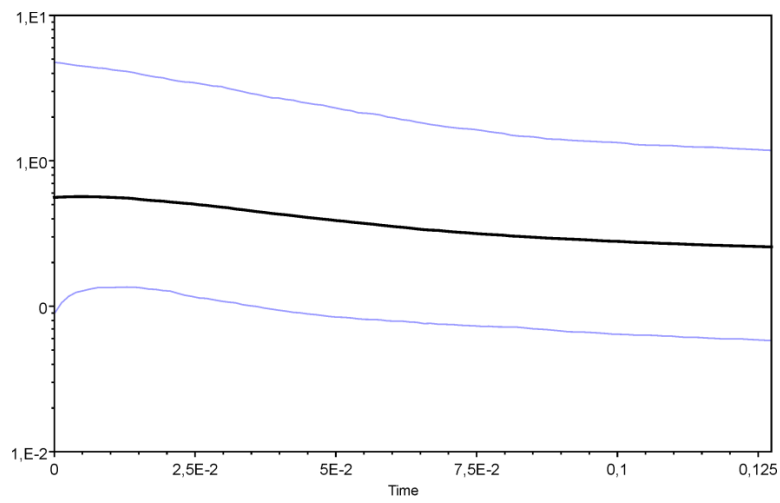
*Liolaemus* sp. A



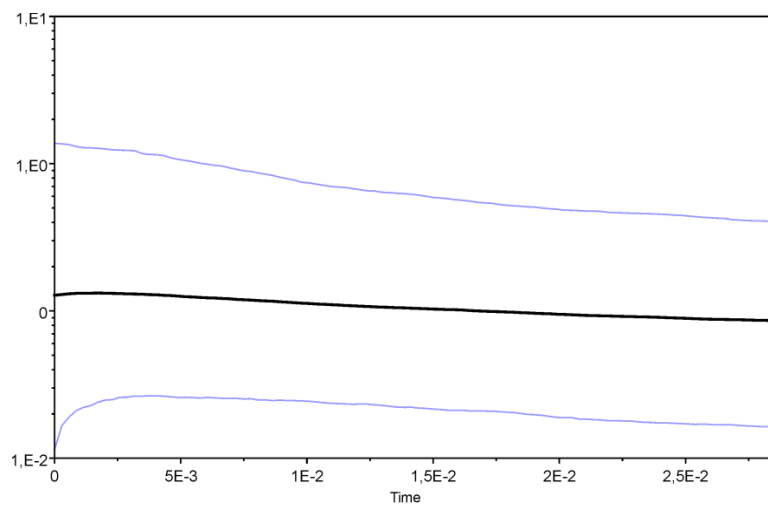
*Liolaemus sp. B*



*Liolaemus sp. C*



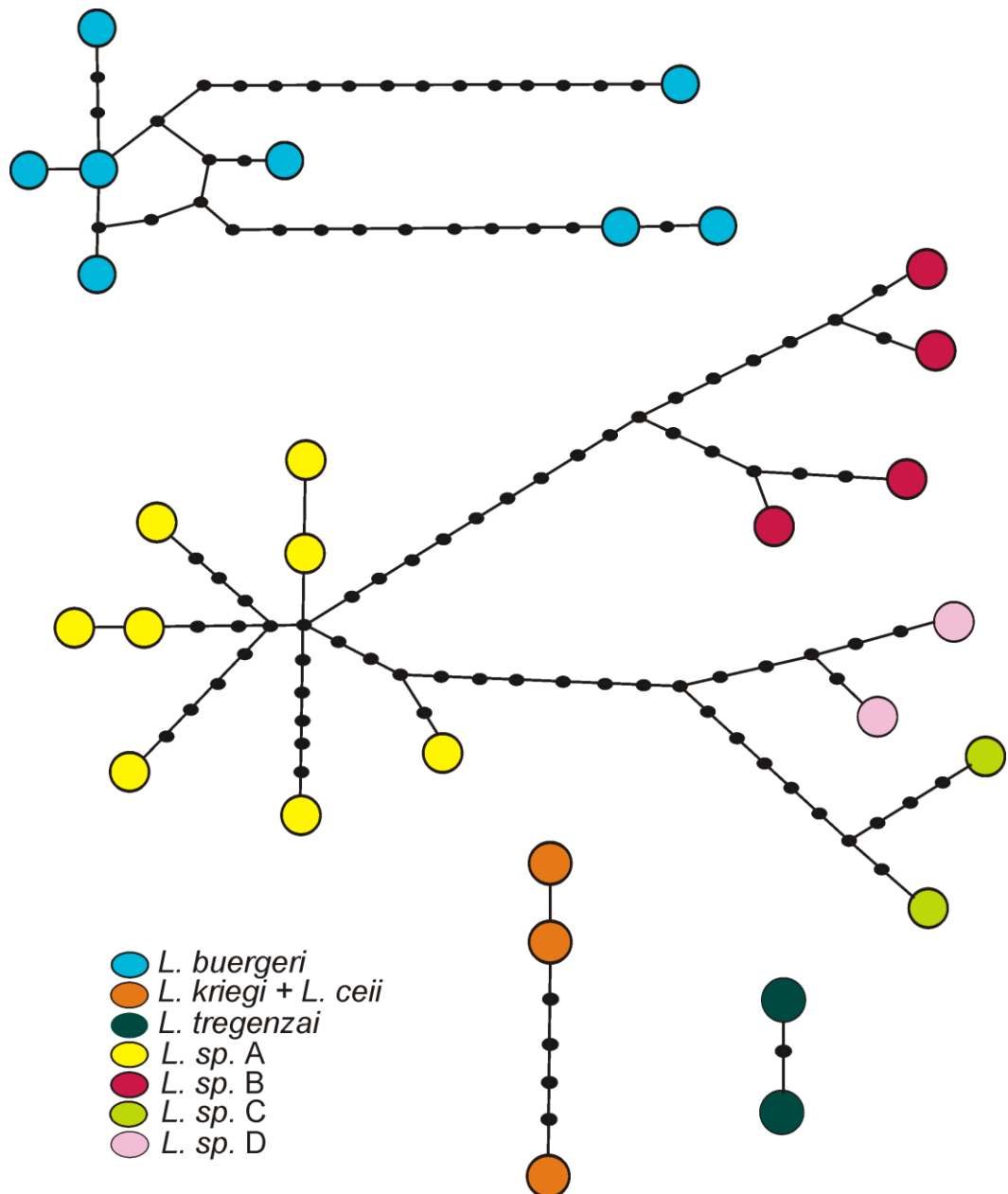
*Liolaemus sp. D*



## APÉNDICE IV: RESULTADO DE LA RED CONCATENADA DE GENES

### MITOCONDRIALES – CAPÍTULO I

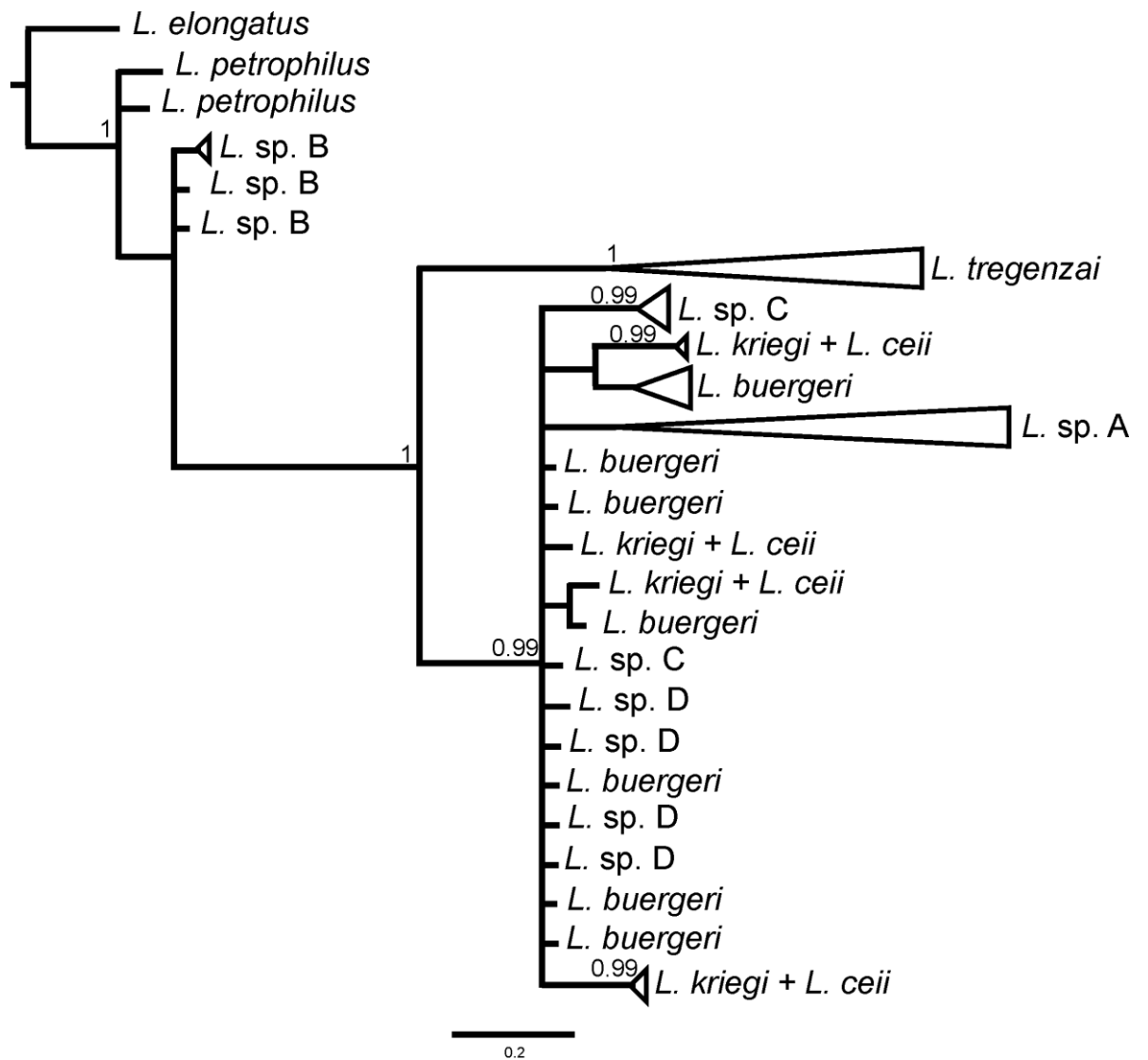
Redes de parsimonia estadística de haplotipos basadas en la región mitocondrial 12 S y el fragmento citocromo – b concatenados. Los haplotipos se encuentran coloreados para cada linaje reconocido dentro del complejo *L. kriegi*.



## APÉNDICE V: RESULTADO DE LA FILOGENIA DE GENES NUCLEARES

### CONCATENADOS – CAPÍTULO I

Árbol bayesiano de genes nucleares concatenados con el consenso de 50% de mayoría, mostrando las relaciones entre los linajes dentro del complejo *L. kriegi*. Los números sobre las ramas corresponden a las probabilidades posteriores (PP) > 0.95.



## APÉNDICE VI: MUESTREO DE ESPECÍMENES – CAPÍTULO III

Lista de especímenes estudiados en el capítulo III, localidades muestreadas y coordenadas geográficas. La columna de haplotipos corresponde a los números que identifican los haplotipos diferentes. Los números de localidades se corresponden con los de la Figura 13.

Especímenes	LJAMM-CNP/MIC	Altitud	Longitud	Latitud	Localidad	Haplotipos
<i>L. antumalguen</i> + <i>L. sp. 7</i>	5213–19, 5225–28, 7661–69, 7720–21	1810	-69.9995	-36.9888	1) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 37, cruce en arroyo Butaco	4, 8, 118, 120, 122, 159, 160, 161, 162, 163, 219, 220, 221, 222
	2599–05, 10449–57	2252	-70.0748	-37.0655	2) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 37. 15 Km N Los Barros	4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 34, 118, 119, 120, 121, 122
	2470–71, 2473, 2553–54, 2622–25, 2693–4, 7693, 10440–43, 12136–39, 12152–53	2012	-70.145	-37.1299	3) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 37, entrada Área Natural Protegida Tromen	3, 4, 5, 33, 34, 36, 111, 117, 123
	5232–34, 5236–37	1556	-70.2628	-37.1243	4) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 2 Leuto Caballo	4, 117, 164
<i>L. burmeisteri</i>	6154–55, 6161, 6167–69, 6171–73	2375	-70.4112	-36.606	5) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Volcán Domuyo, ladera este	207, 208, 209
	7767, 7769	2000	-69.8028	-36.4300	6) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 221, 12 km N Calmuco	223
	5238–44, 7636–45, 7647	1100	-70.3733	-37.2309	7) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 41. 7 Km S Caepe Malal	165, 166
<i>L. chillanensis</i>	14037–42	1700	-71.4099	-36.9045	8) Chile, VIII Región, Ñuble, Termas de	74, 75



					Chillan	
	11301–02, 11305–11	1253	-70.5424	-37.672	9) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 4, 5.3 km E El Huecu	25, 26, 28, 29, 30, 31, 32
	11303	1483	-70.4993	-37.713	10) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 4, 11.9 km SE El Huecu	27
	5346–47	1283	-70.7564	-37.7395	11) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 21, 9,5 Km	178, 179
	5327	1566	-70.6268	-37.5851	12) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 21. 20 Km S El Cholar.	173
	5333–34	1374	-70.9177	-36.9327	13) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 45. 28.5 Km NW empalme Ruta Provincial 43.	174, 175
<i>L. crandalli</i>	12158–60, 12218–26, 13401, 13976	1560	-68.858	-37.7018	14) Argentina, Neuquén, Pehuenches, Área Natural Protegida Auca Mahuida	16, 37, 38, 39, 41, 42, 43, 44, 45, 61
	12295, 12299, 13386–87	1851	-68.9308	-37.7171	15) Argentina, Neuquén, Pehuenches, Área Natural Protegida Auca Mahuida	38, 47, 59
	10370–71, 10470–72, 10553, 12302–03, 13404, 14242–45, 13388–89, 14238–40	1557	-68.8941	-37.7813	16) Argentina, Neuquén, Añelo, Auca Mahuida, empalme a Riscos Altos con camino a Punta del Castillo	1, 2, 13, 14, 15, 16, 45, 48, 49, 60, 62, 91, 92, 93, 94
<i>L. elongatus + L. shitan</i>	15248–49	796	-71.2331	-42.0674	17) Argentina, Chubut, Cushamen, Cañadón de los Ensueños, El Maitén	101, 102
	15253–54	230	-71.606	-42.101	18) Argentina, Chubut, Cushamen, La Playita, Parque Nacional Lago Puelo	103
	8852	806	-70.8522	-42.7956	19) Argentina, Chubut, Cushamen, Ruta Provincial 12, 9.1 km E Embarcadero La Cancha	241
	3452, 3672–75,	723	-71.1283	-42.3733	20) Argentina, Chubut, Cushamen, Ruta	140, 155

3711-14, 7489-90				Provincial 15, 1.2 km W empalme Ruta Nacional 40	
8890	819	-71.1317	-42.8659	21) Argentina, Chubut, Cushamen, Ruta Provincial 40, 2 km N entrada Aeropuerto Esquel	51
13286-87	580	-71.8338	-42.8340	22) Argentina, Chubut, Futalaufquen, 10 km Villa Futalaufquen	51, 58
3631-32	1401	-71.2580	-42.8343	23) Argentina, Chubut, Futaleufú, 13 km NE Esquel	51
3574-80	717	-71.3956	-43.5057	24) Argentina, Chubut, Futaleufú, Ruta Provincial 17, 8.8 km SE Corcovado	51, 152
8871	918	-71.0795	-43.2199	25) Argentina, Chubut, Futaleufú, Ruta Provincial 34, 20.7 km W empalme Ruta Nacional 40	51
2128, 2156-57, 2262	740	-71.2178	-42.9503	26) Argentina, Chubut, Futaleufú, Ruta Nacional 40, Km 1530, 17 Km S Esquel	51
13129-30	987	-69.8923	-42.9015	27) Argentina, Chubut, Languiño, Ruta Provincial 13, 5 km N Laguna Blanca	51
6177-78, 6180	970	-70.0189	-43.1775	28) Argentina, Chubut, Languiño, Ruta Nacional 25, 5 km W Colan Conhue, Cuesta del Paisano	51, 210
3898, 8873-76, 12926-27	723	-70.1126	-43.6263	29) Argentina, Chubut, Languiño, Ruta Provincial 62, 15.2 km N El Molle	50, 51, 242
3715-16, 3831, 9100, 9110-14	560	-69.1905	-44.5173	30) Argentina, Chubut, Paso de Indios, Ruta Provincial 24, 110 km S Paso de Indios	51
3046-47	576	-70.2636	-45.7112	31) Argentina, Chubut, Río Senguer, Ruta Provincial 20, 23 Km W Los Manantiales	51
9075-78	652	-69.4608	-45.0691	32) Argentina, Chubut, Sarmiento, Buen Pasto	51, 244

9059-66	891	-69.6081	-44.7395	33) Argentina, Chubut, Sarmiento, Ruta Provincial 23, 87.8 km SE empalme Ruta Provincial 20	51
9087-92	854	-69.3337	-45.1194	34) Argentina, Chubut, Sarmiento, Ruta Provincial 23, Sierra del Castillo	51, 245
8197	796	-70.0398	-44.5225	35) Argentina, Chubut, Tehuelches, Cerro Ferarroti	51
3911-12, 3917-18	654	-70.6216	-44.3890	36) Argentina, Chubut, Tehuelches, Ruta Nacional 40, 19.6 km	51, 157
3049, 6145-46	642	-70.4457	-44.2022	37) Argentina, Chubut, Tehuelches, Ruta Nacional 40, 22 km S Gobernador Costa	51
3906-08	638	-70.6135	-44.5185	38) Argentina, Chubut, Tehuelches, Ruta Nacional 40, 45.0 km SW empalme Ruta Provincial 20	51, 156
3934	766	-70.8038	-44.0066	39) Argentina, Chubut, Tehuelches, Ruta Provincial 19, 2.7 km empalme Ruta Nacional 40, 16 km W Gobernador Costa	51
4681, 4683	797	-70.3681	-43.9736	40) Argentina, Chubut, Tehuelches, Ruta Provincial 53, 40 km S empalme Ruta Nacional 25	51
10975	1407	-68.4593	-42.0750	41) Argentina, Chubut, Telsen, Ruta Provincial 67, 11.2 km S limite Rio Negro-Chubut	17
7514	1402	-68.2399	-42.2307	42) Argentina, Chubut, Telsen, Ruta Provincial 67, camino a Talagapa, 53.1 km N Gan Gan	218
15138, 15140	1041	-71.0488	-39.1130	43) Argentina, Neuquén, Aluminé, Ruta Provincial 11, 5 km E Laguna Pulmari	99, 100
1216, 1443, 14204	1703	-70.7399	-38.9026	44) Argentina, Neuquén, Aluminé, Ruta	35, 90

2545-47, 2661-62	1614	-70.9783	-38.8866	Provincial 13, 18 km W Primeros Pinos 45) Argentina, Neuquén, Aluminé, Ruta Provincial 13. Pampa de Lonco Luan, 12 Km E Río Litrán	115, 116, 124
14203	1761	-71.1906	-38.8223	46) Argentina, Neuquén, Aluminé, Volcán Batea Mahuida	89
11277-79	1142	-70.4000	-39.6571	47) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Ruta Nacional 40, 49.0 NE San Ignacio, Bajada Las Carpas	22, 23, 24
8758, 8917	1139	-70.6471	-39.8277	48) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Camino vecinal, 2 km W Ruta Nacional 40	184, 243
8052, 8077-78, 8081-90	1401	-70.4295	-39.1351	49) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Ruta Provincial 46, 9.5 km SW entrada SW Parque Nacional Laguna Blanca	189, 232, 233, 234, 235, 236, 237, 238, 239, 240
5354, 5384-86	1125	-70.7318	-39.3875	50) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Ruta Provincial 46. Arroyo La Jardinera. 25 Km E Rahue.	182, 184, 185, 186
MIC 1646	491	-70.0782	-40.0526	51) Argentina, Neuquén, Collón Curá, R.N. 237, Huayquimil, 31 km S Piedra del Águila	18
11250, 11260-61	1028	-70.7125	-39.9001	52) Argentina, Neuquén, Collón Curá, San Ignacio, Ruta Nacional 40	19, 20, 21
14274-76	1069	-70.4023	-40.3107	53) Argentina, Neuquén, Collón Curá, Ruta Nacional 237, Laguna del Toro	95, 96, 97
6463-64	986	-70.7663	-39.9797	54) Argentina, Neuquén, Collón Curá, Ruta Nacional 40, La Rinconada	19, 214
12984-89	1420	-71.3057	-40.1932	55) Argentina, Neuquén, Lacar, Los Pendientes, Cerro Chapelco	55, 56, 57
2445, MIC 1162	1519	-70.5511	-38.8619	56) Argentina, Neuquén, Picunches, Ruta Provincial 13, Primeros Pinos	107, 246

MIC 1164	1100	-70.0625	-38.9061	57) Argentina, Neuquén, Zapala, Ruta P. 13, 12 Km W, 1 Km N Estación Zapala	188
5355, 5391-92	1186	-70.2227	-39.0437	58) Argentina, Neuquén, Zapala, Ruta Provincial 46, 22 Km SW Zapala	183, 188, 189
3598	1074	-69.9697	-41.2815	59) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta Nacional 23, 44 km W Ingeniero Jacobacci, 10 km E Clemente Onelli	46
3547-48, 3581-83	942	-69.8084	-41.3653	60) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta Nacional 23	148, 153, 154
6227-28, 6237	1165	-68.3698	-41.5969	61) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta Provincial 5, 22 km NW El Cain	149
6809-12, 11097	1145	-69.1566	-40.7366	62) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta provincial 6, 8.4 km S Colan Conue	18, 46, 216
3570-73	995	-69.377	-41.5966	63) Argentina, Río Negro, 25 de mayo, Ruta Provincial 76, 37 km S empalme Ruta Nacional 23	149
3537-45	1140	-69.3609	-41.7553	64) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta Provincial 76, 57 km S empalme Ruta Nacional 23	149, 150, 151
1562, 1583, 2433-35, 2723-26, 6792-97, 6853-54	1000	-68.4588	-40.2869	65) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta Provincial 8. 17 Km S San Antonio del Cuy	46, 104, 105, 132
12943, 12948-49	789	-71.5654	-41.0723	66) Argentina, Río Negro, Bariloche, Parque Nacional Nahuel Huapi	52
3051-52, 3054, 3056-57, 4871-72, 12969-71	1371	-71.2875	-41.2568	67) Argentina, Río Negro, Bariloche, Valle del Challhuaco, Bariloche	53, 54, 136, 137

5532, 5535–36, 13328–29, 13527	1094	-69.4383	-40.3253	68) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 67. 19,2 Km NE Mencue	46, 195
5559–60	1247	-69.7498	-40.5679	69) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 67. 20 Km S Mencue	196, 197
13517, 13519	1110	-69.2242	-40.2841	70) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 67, 22.8 km W Chasicó, 4 km W Carriyegua	65
7024	935	-68.9396	-40.1328	71) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 74, 20 km SW Aguada Guzmán	46
6801–02, 6823, 6843–44, 7070–72, 12259–60, 13501–03	988	-68.9692	-40.2956	72) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 74, Paraje Chasicó	46, 64, 197
3514–17	875	-70.4841	-41.7032	73) Argentina, Río Negro, Ñorquinco, Río Chico (Estación Cerro Mesa)	146
2139, 3531–33	1105	-69.8594	-41.5423	74) Argentina, Río Negro, Ñorquinco, Ruta Provincial 6, 2.2 km NE Ojos de Agua	106, 148
14299	954	-71.1157	-41.0778	75) Argentina, Río Negro, Pilcaniyeu, Ruta Nacional 23, Dina Huapi	98
5424, 5449–50	786	-70.2383	-41.0305	76) Argentina, Río Negro, Pilcaniyeu, Ruta Provincial 23. 2,3 Km SE Comallo	190, 194
3489–97, 3500	1123	-70.6773	-41.5617	77) Argentina, Río Negro, Ñorquinco, Ruta Nacional 40, 2.5 km N de Chenqueniye	141, 142, 143, 144, 145, 146, 147
5428, 5431–35, 8682	1096	-70.5745	-40.8787	78) Argentina, Río Negro, Pilcaniyeu, Ruta Nacional 40. 2,7 Km S Ea. San Pedro	191, 192, 193
5621–26, 5644	1265	-69.971	-40.8526	79) Argentina, Río Negro, Pilcaniyeu,	18, 198, 199, 200, 201,

					Ruta Provincial 67, 3.5 km N Cañadón Chileno	202, 203
<i>L. carlosgarini</i> + <i>L. sp. 1</i>	14026–31	1413	-71.3238	-37.3761	80) Chile, VIII Región, Biobío, R.N. 237, Huayquimil, 31 km S Piedra del Águila	72, 73
	14182–83	1211	-70.749	-37.2494	81) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 57, 8 km N Guañaco	84, 85
	14071, 14073–76	1415	-71.0445	-35.5994	82) Chile, VII Región, Talca, Cerro El Peine, Parque Nacional Altos del Lircay	77, 78
	6411–12, 6456, MIC 1633	2500	-70.3612	-36.6462	83) Argentina, Neuquén, Minas, Paso Malo, Arroyo Domuyo	211, 249
	5303–09	1779	-70.6121	-36.6906	84) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 43. 2 Km S Aguas Calientes	82, 169, 171, 172
	5335–36, 5338	1374	-70.9177	-36.9327	85) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 45	169, 176, 177
	6408–09, 6427–28, 6418, 6455	2095	-70.5407	-36.6892	86) Argentina, Neuquén, Minas, Paso Malo, Arroyo Covunco	169, 212, 213
	6467–68	1406	-70.6203	-37.2515	87) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 43, La Primavera, 14 km S Andacollo	215
	14147, 14185	2029	-71.1168	-37.4537	88) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 6, 19 km W Moncol	81
	5325–26	1566	-70.6268	-37.5851	89) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 21. 20 Km S El Cholar.	80
	6465–66, 14140, 14179, 14181	1498	-71.0813	-36.8172	90) Argentina, Neuquén, Minas, Lagunas de Epulafquen	80
	5349–50	1255	-70.8095	-37.0113	91) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 45. 6,5 Km Oeste Las Ovejas	80, 82, 83, 181
	5245–46	1262	-70.6611	-37.1941	92) Argentina, Neuquén, Minas, Andacollo	167
	3434–35	2210	-70.562	-36.0166	93) Chile, VII Región, Talca, Laguna	138, 139

del Maule						
	5252–53, 5255–56, 5261–62, 12161, 14135, 14173–74	1586	-70.637	-36.792	94) Argentina, Neuquén, Minas, Ruta Provincial 43, 10 km N Varvarco	40, 79, 82, 168, 169, 170
<i>L. smaug</i>	7768, 7770–72	2000	-69.8028	-36.43	95) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 221, 12 km N Calmuco	224
	MIC 1606, MIC 1628	2400	-70.3688	-35.9536	96) Argentina, Mendoza, Malargüe, puente Termas de Cajón Grande	247, 248
	7887–92, 7895	1987	-70.2336	-35.9583	97) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Nacional 145, 17.3 km E paso Pehuenche, 23 km W Las Loicas	225, 226, 227
	7916–17	1573	-70.1069	-35.7966	98) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Nacional 145, 3.3 km S Las Loicas	227, 228
	2677–79, 2750–51	1676	-70.2022	-35.6508	99) Argentina, Mendoza, Malargüe, Mallines Colgados, Arroyo El León y Río Grande	125, 126, 133, 134
	2680–81, 2738–39, 2764	2900	-70.1694	-35.1138	100) Argentina, Mendoza, Malargüe, 16 Km W Las Leñas, camino a Valle Hermoso	127, 128
	5782, 5789–91, 14199–200	2427	-70.5005	-35.2879	101) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 226, 1 km N Termas del Azufre	87, 88, 204
	5799–01, 5803, 5805	2279	-70.4135	-35.2972	102) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 226, 11.4 km S Termas del Azufre	88, 205
	5809–10	1856	-70.2477	-35.4875	103) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 226, Arroyo El Montañés, 43 km S Termas del Azufre	87, 206
	14171	2467	-70.5146	-35.2268	104) Argentina, Mendoza, Malargüe, Paso Vergara, 3 km E limite Argentina-	87

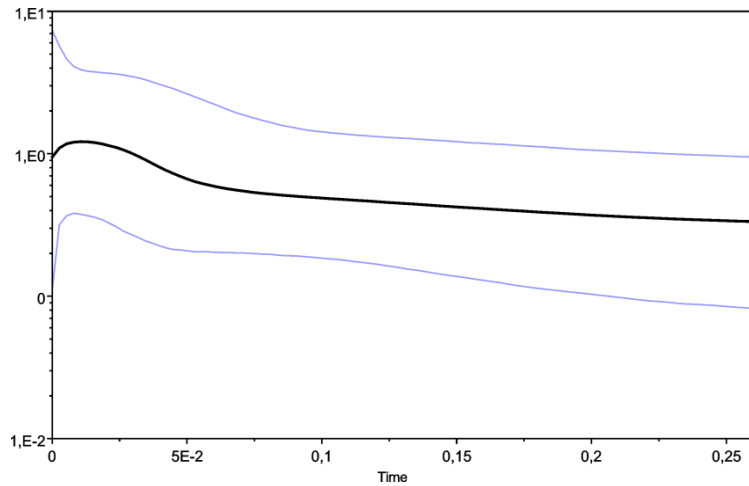


					Chile	
	14061–65	2210	-70.562	-36.0166	105) Chile, VII Región, Talca, Laguna del Maule	76
<i>L. sp. 2</i>	7993–8000	1802	-69.8258	-35.518	106) Argentina, Mendoza, Malargüe, camino a Castillos de Pincheira	229, 230, 231
<i>L. sp. 3</i>	13883–88, MIC 1642	1514	-70.83	-38.6597	107) Argentina, Neuquén, Picunches, Pino Hachado	67, 68, 69
<i>L. sp. 6</i>	13899–02, 13921, 13923	2020	-71.101	-37.8198	108) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Termas de Copahue	70, 71
	14198	1586	-71.1462	-37.4954	109) Chile, VIII Región, Biobío, Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 20.2 km E de Los Barros	86
	5348	1283	-70.7564	-37.7395	110) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 21, 9,5 Km, camino a Grupo Venado de las Damas	180
	4444–45	711	-70.3576	-38.5214	111) Argentina, Neuquén, Picunches, Las Lajas. Ruta Provincial 26, Km 19.	158
	2454–57, 2518–22	1690	-71.1408	-37.9008	112) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 26, 5 Km E Caviahue, frente Lago Caviahue,	108, 109, 110, 112, 113, 114
	3298–02	1491	-70.9189	-37.8158	113) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Cascada del Rio Agrio	110

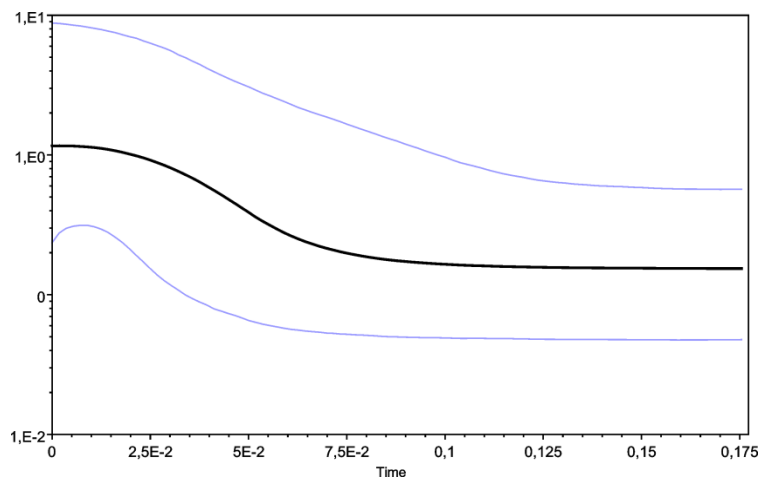
## APÉNDICE VII: RESULTADO DEL ANÁLISIS DE BSP – CAPÍTULO III

Resultados de los análisis de *Bayesian Skyline Plot* (BSP)

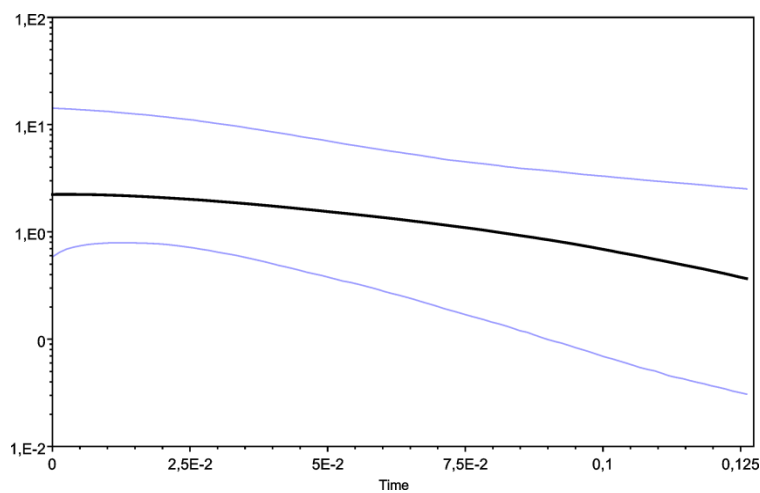
*Liolaemus antumalguen* + *L. sp. 7*



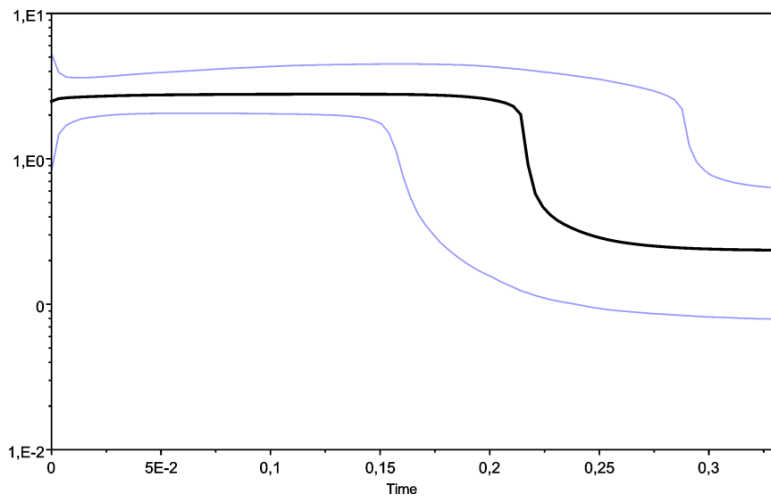
*Liolaemus chillanensis*



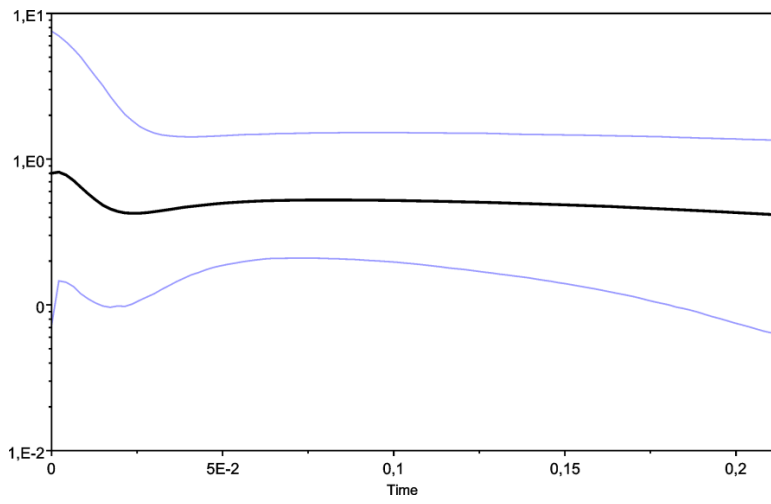
*Liolaemus crandalli*



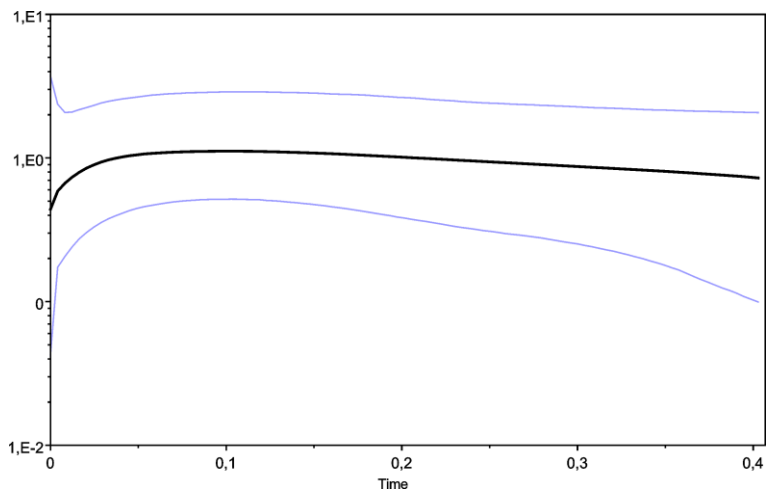
*Liolaemus elongatus* + *Liolaemus shitan*



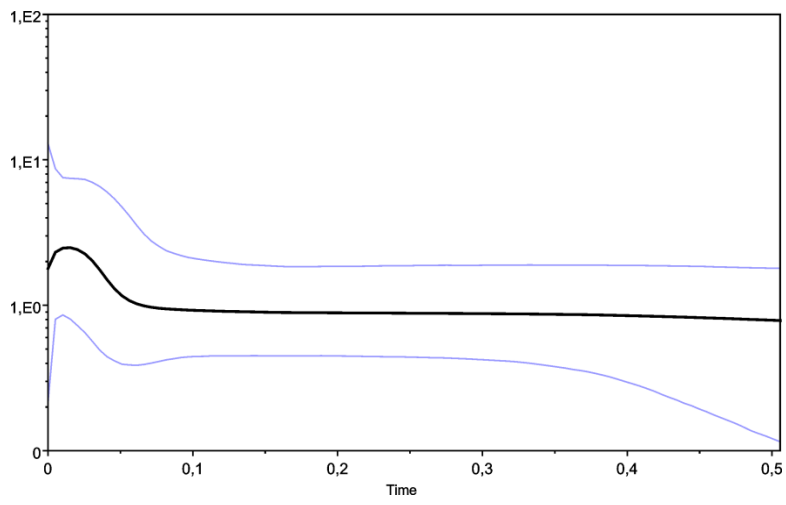
*Liolaemus smaug*



*Liolaemus carlosgarini* + *L. sp. 1*



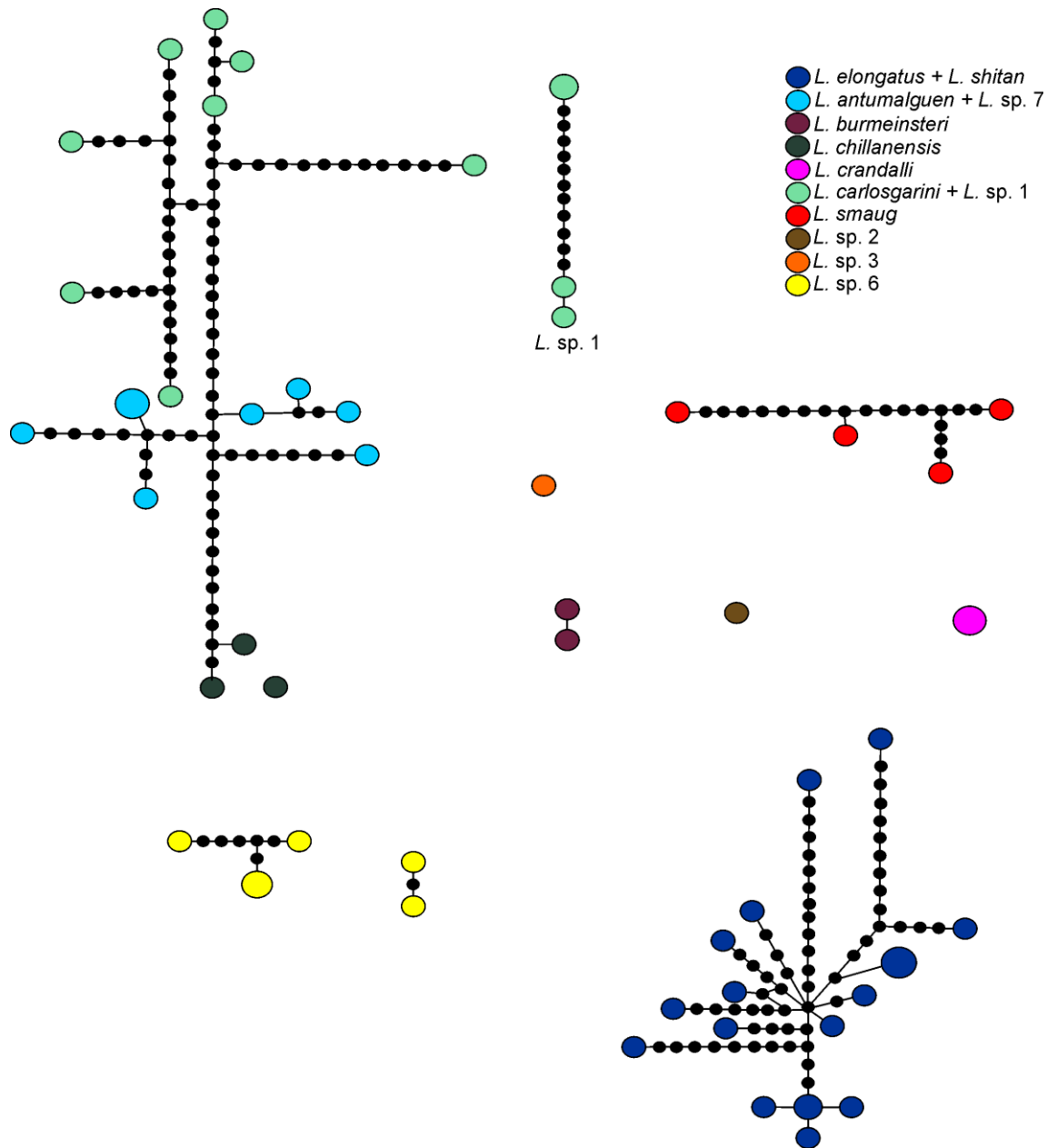
*Liolaemus chillanensis* + *Liolaemus antumalguen* + *L. sp. 7* + *Liolaemus sp. 6a* +  
*Liolaemus sp. 6b*



## APÉNDICE VIII: RESULTADO DE LA RED CONCATENADA DE GENES

### MITOCONDRIALES – CAPÍTULO III

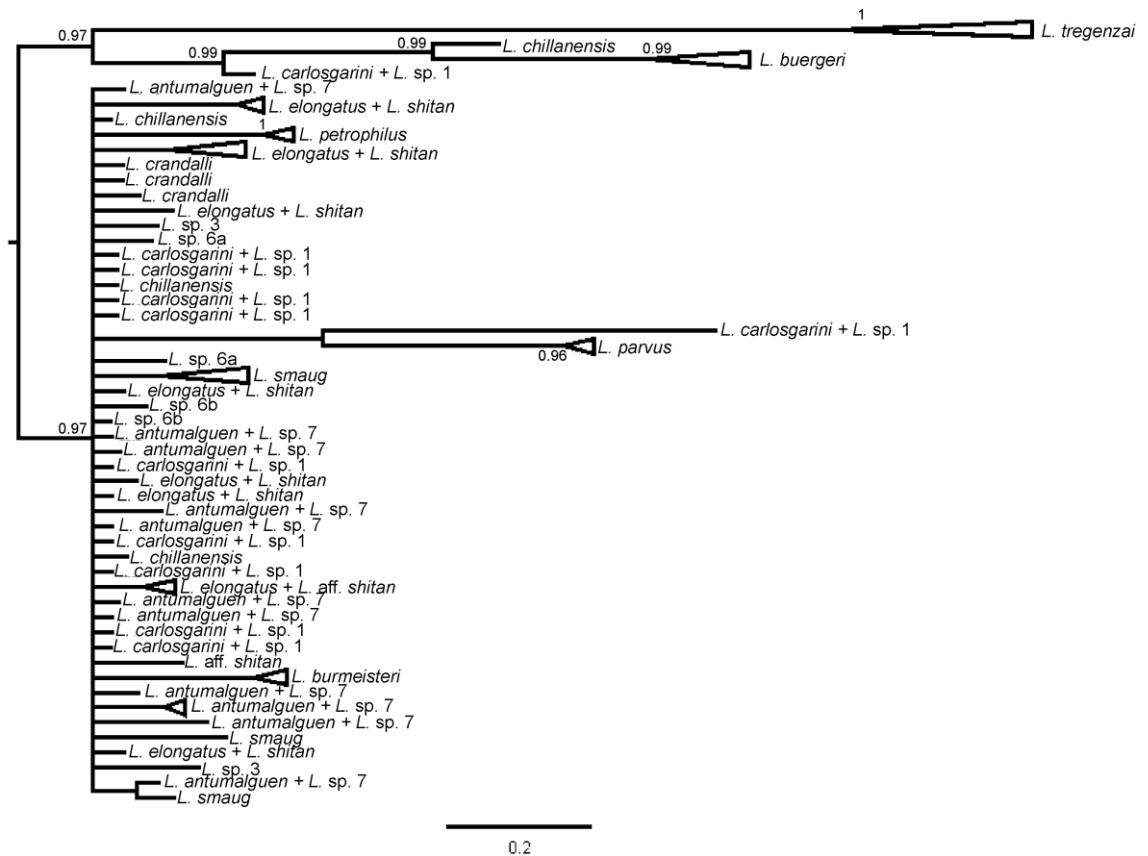
Redes de parsimonia estadística de haplotipos basadas en la región mitocondrial 12 S y el fragmento citocromo - b concatenados. Los haplotipos se encuentran coloreados para cada linaje reconocido dentro del complejo *L. elongatus*.



# APÉNDICE IX: RESULTADO DE LA FILOGENIA DE GENES NUCLEARES

## CONCATENADOS – CAPÍTULO III

Árbol bayesiano de genes nucleares concatenados con el consenso de 50% de mayoría, mostrando las relaciones entre los linajes dentro del complejo *L. elongatus*. Los números sobre las ramas corresponden a las probabilidades posteriores (PP) > 0.95.



## APÉNDICE XI: MUESTREO DE ESPECÍMENES

Lista de especímenes secuenciados para este capítulo, localidades muestreadas, altitud y coordenadas geográficas. Los números de localidades se corresponden con los de la Figura 20.

Especímenes	LJAMM-CNP/MIC	Altitud	Longitud	Latitud	Localidades
<i>L. ceii-kriegi</i>	3565	1162	-69.3596	-41.7524	(1) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, 57 km S Ingeniero Jacobacci
	2733	1694	-70.6005	-38.8751	(2) Argentina, Neuquén, Picunches, Primeros Pinos
	5383	1125	-70.7318	-39.3875	(3) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Arroyo La Jardinera
	5562	1247	-69.7498	-40.5679	(4) Argentina, Río Negro, El Cuy, 20 Km S Mencue
	5393	1186	-70.2227	-39.0437	(5) Argentina, Neuquén, Zapala, 22 Km SW Zapala
	13870	1543	-70.8552	-38.9040	(6) Argentina, Neuquén, Aluminé, Pampa de Lonco Luan
	2613	1614	-70.9783	-38.8866	(7) Argentina, Neuquén, Aluminé, Pampa de Lonco Luan, 12 Km E Río Litrán
<i>L. buergeri</i>	5294, 5313	1786	-70.6251	-36.7281	(8) Argentina; Neuquén; Minas; 14 Km S Aguas Calientes.
	14096	2210	-70.562	-36.0169	(9) Chile; VII Región; Talca; Laguna del Maule.
	6413	2500	-70.3612	-36.6462	(10) Argentina; Neuquén; Minas; Paso Malo, Arroyo Domuyo.
	6439	2095	-70.5407	-36.6892	(11) Argentina; Neuquén; Minas; Arroyo Covunco, cerca de Puente de Carrizo.
	14119	2231	-70.5161	-35.1355	(12) Chile; VII Región; Curicó; Camino a “El Planchón”, 6.3 km empalme camino a Pichuante-Paso Vergara.
	2532	1690	-70.9977	-37.9008	(13) Argentina; Neuquén; Ñorquín; 5 Km E Caviahue, enfrente del Lago Caviahue.
<i>L. tregenzai</i>	13908, 13918	2020	-71.1010	-37.8198	(14) Argentina; Neuquén; Ñorquín; W Termas de Copahue.
<i>L. sp. A</i>	3433	1435	-71.3587	-37.3587	(15) Chile; VIII Región; Bío Bío; Laguna de la Laja.
	13991	1419	-71.3200	-37.4721	(16) Chile; VIII Región; Biobío; Laguna de la Laja, Los Barros.

	13907	2020	-71.1010	-37.8198	(17) Argentina; Neuquén; Ñorquín; W Termas de Copahue, 1 km de la salida.
	14152	1489	-71.2343	-37.5284	(18) Chile; VIII Región; Biobío; Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros.
	5339	1566	-70.6268	-37.5851	(19) Argentina; Neuquén; Ñorquín; 20 Km S El Cholar.
<i>L. sp. B</i>	2667, 5756	1615	-69.8372	-36.6325	(20) Argentina; Mendoza; Malargüe; 5 Km N Ranquil Norte.
	12174	1406	-70.1519	-36.5214	(21) Argentina; Neuquén; Chos Malal; (Circuito Cochico), entre Huinganco y Butaco.
<i>L. sp. C</i>	12148	2012	-70.1450	-37.1299	(22) Argentina; Neuquén; Chos Malal; Entrada “Área Natural Protegida Tromen”, Laguna Los Barros.
	2615		-70.0352	-37.0347	(23) Argentina; Neuquén; Chos Malal; 15 Km N Los Barros.
<i>L. sp. D</i>	5797	2279	-70.4135	-35.2972	(24) Argentina; Mendoza; Malargüe; 11.4 km S Termas del Azufre.
	2758	1600	-70.1086	-35.0988	(25) Argentina; Mendoza; Malargüe; 7 Km N Las Leñas.
<i>L. elongatus</i>	2128	0740	-71.2178	-42.9503	(26) Argentina, Chubut, Futaleufú, Ruta Nacional 40, Km 1530, 17 Km S Esquel
	9060	0891	-69.6081	-44.7395	(27) Argentina, Chubut, Sarmiento, Ruta Provincial 23, 87.8 km SE empalme Ruta Provincial 20
	9100	0560	-69.1905	-44.5173	(28) Argentina, Chubut, Paso de Indios, Ruta Provincial 24, 110 km S Paso de Indios
	3675	0723	-71.1283	-42.3733	(29) Argentina, Chubut, Cushamen, Ruta Provincial 15, 1.2 km W empalme Ruta Nacional 40
	3578, 3575	0717	-71.3956	-43.5057	(30) Argentina, Chubut, Futaleufú, Ruta Provincial 17, 8.8 km SE Corcovado
	3046–47	0576	-70.2636	-45.7112	(31) Argentina, Chubut, Río Senguer, Ruta Provincial 20, 23 Km W Los Manantiales
	3492	1123	-70.6773	-41.5617	(32) Argentina, Río Negro, Ñorquinco, Ruta Nacional 40, 2.5 km N de Chenqueniye
	10975	1407	-68.4593	-42.0750	(33) Argentina, Chubut, Telsen, Ruta Provincial 67, 11.2 km S limite Río Negro-Chubut
	8078	1401	-70.4295	-39.1351	(34) Argentina, Neuquén, Catán Lil, Ruta Provincial 46, 9.5



	12987	1420	-71.3057	-40.1932	km SW entrada SW Parque Nacional Laguna Blanca
<i>L. antumalguen</i>	6155, 6167	2375	-70.4112	-36.6060	(35) Argentina, Neuquén, Lacar, Los Pendientes, Cerro Chapelco
<i>L. burmeisteri</i>	7637, 7644	1100	-70.3733	-37.2309	(36) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Volcán Domuyo, ladera este
<i>L. chillanensis</i>	14041–42	1700	-71.4099	-36.9045	(37) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 41. 7 Km S Caepe Malal
	5327	1566	-70.6268	-37.5851	(38) Chile, VIII Región, Ñuble, Termas de Chillan
	11305	1253	-70.5424	-37.6720	(39) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 21. 20 Km S El Cholar.
<i>L. crandalli</i>	12220, 12225	1560	-68.8580	-37.7018	(40) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 4, 5.3 km E El Huecu
<i>L. shitan</i>	1915, 6853	1000	-68.4588	-40.2869	(41) Argentina, Neuquén, Pehuenches, Área Natural Protegida Auca Mahuida
	5532, 5537, 13527	1094	-69.4383	-40.3253	(42) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Ruta Provincial 8. 17 Km S San Antonio del Cuy
	13498	0988	-68.9692	-40.2956	(43) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 67. 19,2 Km NE Mencue
<i>L. carlosgarini</i>	3435, 14061–64	2210	-70.5620	-36.0166	(44) Argentina, Río Negro, El Cuy, Ruta Provincial 74, Paraje Chasicó
<i>L. smaug</i>	2679	1676	-70.2022	-35.6508	(45) Chile, VII Región, Talca, Laguna del Maule
	7916	1573	-70.1069	-35.7966	(46) Argentina, Mendoza, Malargüe, Mallines Colgados, Arroyo El León y Río Grande
	2764	2900	-70.1694	-35.1138	(47) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Nacional 145, 3.3 km S Las Loicas
<i>L. choique</i>	7767-8, 7770–72	2000	-69.8028	-36.4300	(48) Argentina, Mendoza, Malargüe, 16 Km W Las Leñas, camino a Valle Hermoso
<i>L. sp. 1</i>	14073, 14075–76	1415	-71.0445	-35.5994	(49) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 221, 12 km N Calmuco
					(50) Chile, VII Región, Talca, Cerro El Peine, Parque Nacional Altos del Lircay

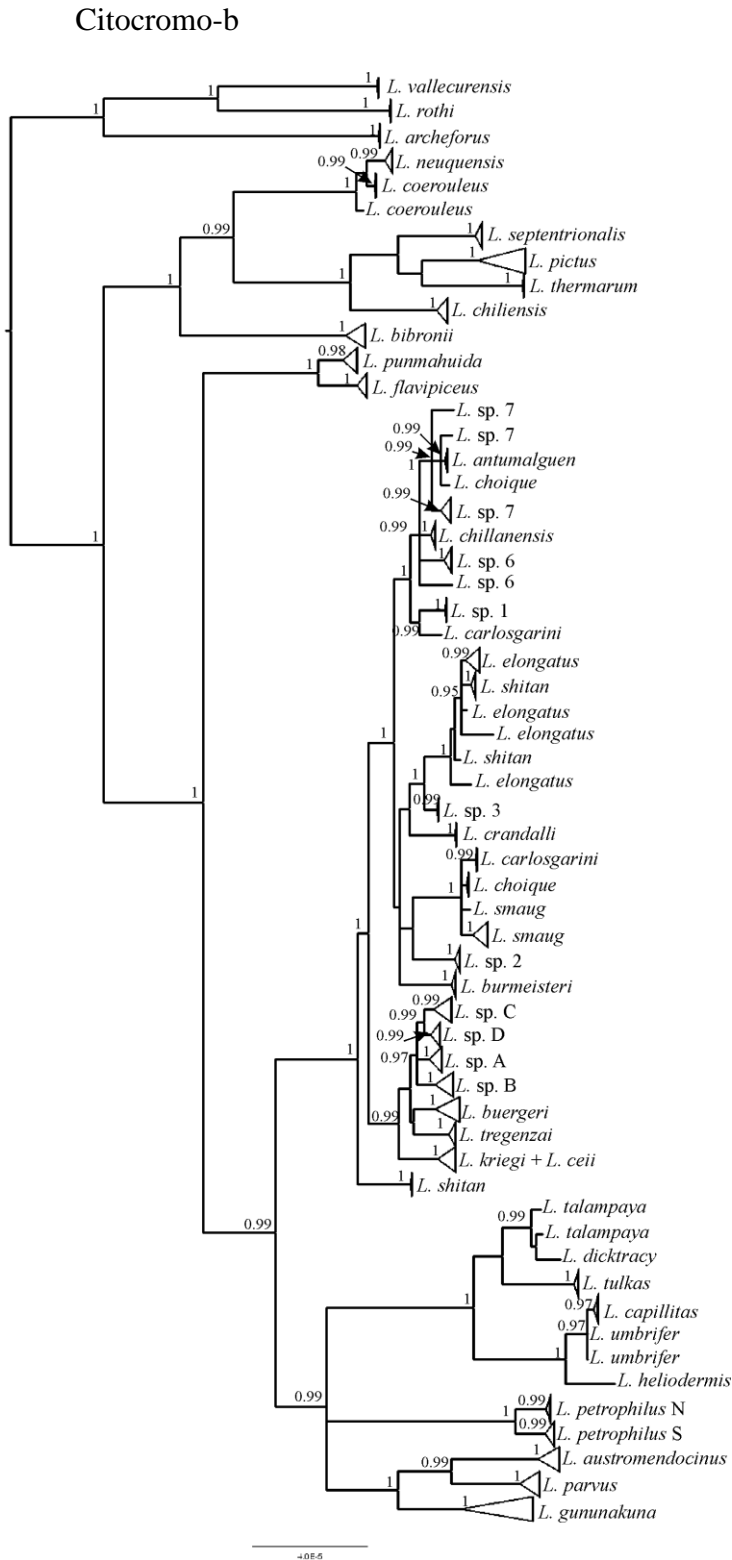
<i>L. sp. 2</i>	7994–5, 8000	1802	-69.8258	-35.5180	(51) Argentina, Mendoza, Malargüe, camino a Castillos de Pincheira
<i>L. sp. 3</i>	13887, MIC 1642	1514	-70.8300	-38.6597	(52) Argentina, Neuquén, Picunches, Pino Hachado
<i>L. sp. 6</i>	13899–02	2020	-71.1010	-37.8198	(53) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Termas de Copahue
	4446	0711	-70.3576	-38.5214	(54) Argentina, Neuquén, Picunches, Las Lajas. Ruta Provincial 26, Km 19.
	2522	1690	-71.1408	-37.9008	(55) Argentina, Neuquén, Ñorquín, Ruta Provincial 26, 5 Km E Caviahue, frente Lago Caviahue,
<i>L. sp. 7</i>	5225	1810	-69.9995	-36.9888	(56) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 37, cruce en arroyo Butaco
	2602	2252	-70.0748	-37.0655	(57) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 37. 15 Km N Los Barros
	2693	2012	-70.1450	-37.1299	(58) Argentina, Neuquén, Chos Malal, Ruta Provincial 37, entrada Área Natural Protegida Tromen
<i>L. talampaya</i>	1980, 2737	1300	-67.7555	-29.7461	(59) Argentina, La Rioja, Felipe Varela, Parque Nacional Talampaya
<i>L. tulkas</i>	4219, 4227	3071	-68.0843	-27.7873	(60) Argentina, Catamarca, Tinogasta, Chaschuil
<i>L. umbrifer</i>	5031, 5032	3170	-66.7386	-26.8633	(61) Argentina, Catamarca, Belén, 1,5 km N entrada S Quebrada de Randolpho
<i>L. heliodermis</i>	8569	2939	-65.7976	-26.7102	(62) Argentina, Tucumán, Tafí del Valle, Ruta Provincial 307, km 90
<i>L. petrophilus sur</i>	5481	0893	-67.5666	-42.3768	(63) Argentina, Chubut, Telsen, Ruta Provincial 4, 56.9 km W Telsen
	8861	0524	-70.3722	-42.6640	(64) Argentina, Chubut, Languiño, Ruta Provincial 12, 3 km E puente sobre Río Gualjaina
<i>L. petrophilus norte</i>	11355	0749	-67.8599	-40.5613	(65) Argentina, Río Negro, 9 de Julio, Ruta Provincial 67, 9.7 km N Sierra Colorada
	6982	0840	-68.4790	-39.7338	(66) Argentina, Río Negro, El Cuy, Cerro Policía
	11224	1156	-68.1886	-40.5325	(67) Argentina, Río Negro, 25 de Mayo, Sierra de Queupuniyeu
	11122	0857	-67.8907	-41.0877	(68) Argentina, Río Negro, 9 de Julio, Ruta Provincial 8, 34,8

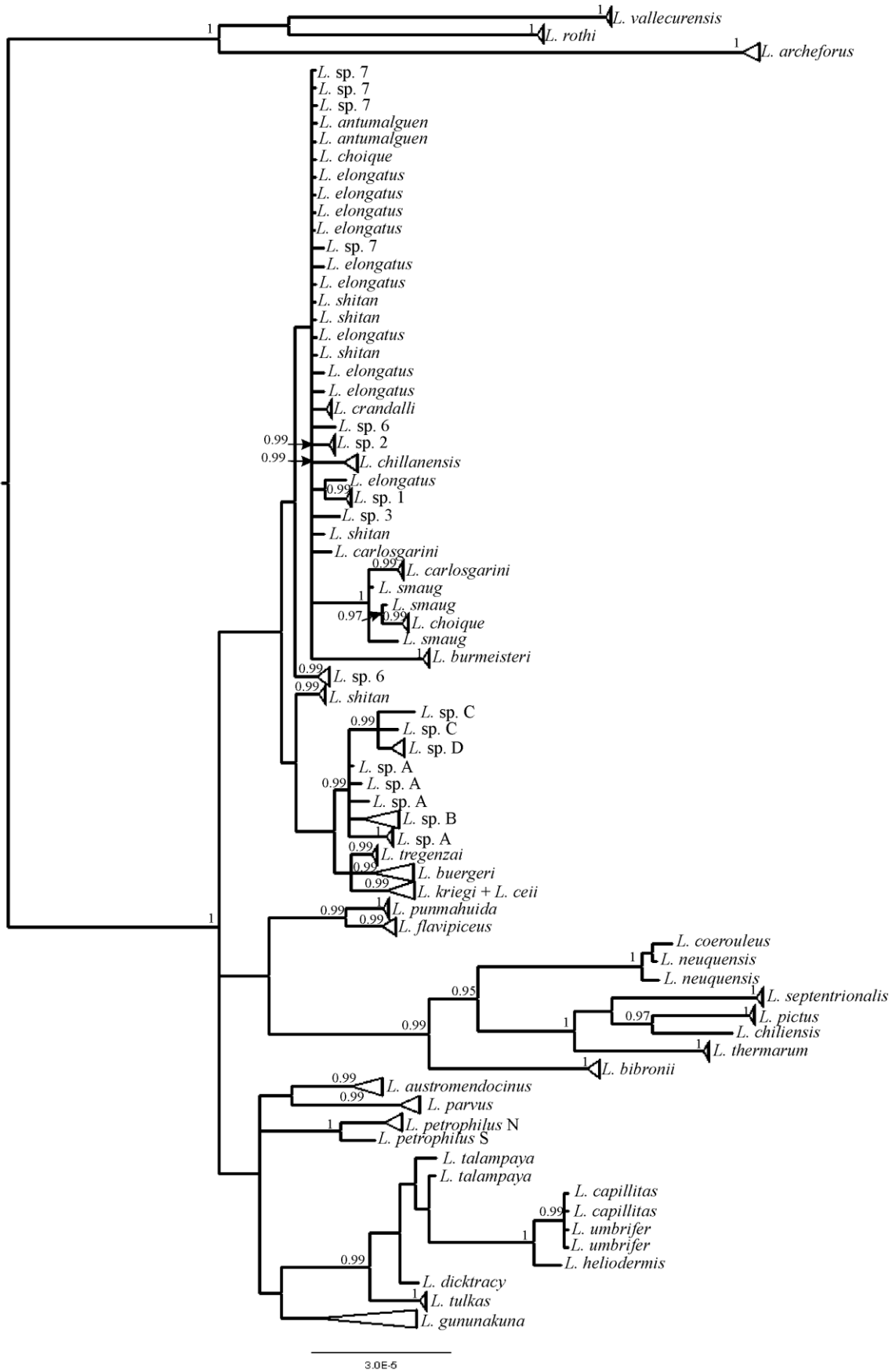
					km S Los Menucos
<i>L. capillitas</i>	2786, 2788-89	2910	-66.4140	-27.4206	(69) Argentina, Catamarca, Andalgalá, Ruta Provincial 47, entre Km 34 y Km 39
<i>L. dictracyi</i>	5816	2888	-67.6786	-28.9296	(70) Argentina, La Rioja, Famatina, 24 km NW Alto del Carrizal
<i>L. parvus</i>	2705-6	3585	-69.4808	-29.3725	(71) Argentina, San Juan, Iglesia, Quebrada Honda
	2711, 2762	2418	-69.3372	-32.9983	(72) Argentina, Mendoza, Lujan de Cuyo, Vallecitos
<i>L. gununakuna</i>	2690, 10403	0803	-69.5747	-39.1110	(73) Argentina, Neuquén, Zapala, 2 km E La Amarga, 11 km E empalme Ruta Provincial 34
	4443	0830	-70.0655	-39.2050	(74) Argentina, Neuquén, Zapala, Ruta Nacional 40, 40 Km S Zapala
<i>L. austromendocinus</i>	2716	1353	-68.6233	-34.9913	(75) Argentina, Mendoza, San Rafael, 9.5 Km N El Nihuil
	5147	1202	-68.9858	-36.8180	(76) Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Provincial 180, 12.4 Km S La Matancilla
	10574	1830	-69.2656	-34.5388	(77) Argentina, Mendoza, San Carlos, La Faja, Ruta Provincial 101, 2.5 km S Arroyo Hondo
<i>L. flavipiceus</i>	7906-07	2562	-70.3913	-35.9798	Argentina, Mendoza, Malargüe, Ruta Nacional 145, paso Pehuenche
<i>L. punmahuida</i>	2626, 2649	3000	-70.1408	-37.1044	Argentina, Neuquén, Chos Malal, Parque Provincial Laguna Tromen
<i>L. chiliensis</i>	14360	0921	-71.3163	-40.0731	Argentina, Neuquén, Huiliches, Lago Lolog
	942	0980	-71.3380	-40.1683	Argentina, Neuquén, Lacar, 1 Km E Curri Huinca, 3 Km E San Martín de los Andes
<i>L. bibronii</i>	14361	1515	-71.2686	-40.2504	Argentina, Neuquén, Lacar, Estancia Chapelco
	8211-12	0840	-66.4736	-41.2844	Argentina, Río Negro, Valcheta, Aguada del Toro
	9896	0014	-65.8391	-47.7149	Argentina, Santa Cruz, Deseado, 5.5. km N Puerto Deseado
<i>L. pictus</i>	9897	0134	-66.6221	-47.8503	Argentina, Santa Cruz, Deseado, Ruta Provincial 47, 55.4 km SW Tellier, 3 km S puente
	14359	0868	-71.3499	-40.1666	Argentina, Neuquén, Huiliches, Lago Queñi, Parque Nacional Lanin

	EU649350.1-52.1	1468	-73.0333	-37.7833	Chile, IX Región, Nahuelbuta
	14343	0592	-71.8333	-42.8333	Argentina, Chubut, Futaleufú, Parque nacional Los Alerces
<i>L. septentrionalis</i>	14099-100	1415	-71.7066	-35.5994	Chile, VII Región, Talca, Cerro El Peine, Parque Nacional Altos del Lircay
<i>L. coerouleus</i>	14206	1703	-70.7399	-30.9026	Argentina, Neuquén, Aluminé, Ruta Provincial 13, entre Kilka y Primeros Pinos
	978	1760	-70.8158	-38.9013	Argentina, Neuquén, Aluminé, Ruta Provincial 13, 17.5 Km W Primeros Pinos
	979	1760	-70.8158	-38.9013	Argentina, Neuquén, Aluminé, Ruta Provincial 13, 17.5 Km W Primeros Pinos
<i>L. neuquensis</i>	980	2050	-71.0927	-37.8325	Argentina, Neuquén, Ñorquín, Laguna Las Mellizas
	981	2050	-71.0927	-37.8325	Argentina, Neuquén, Ñorquín, Laguna Las Mellizas
	985	2050	-71.0927	-37.8325	Argentina, Neuquén, Ñorquín, Laguna Las Mellizas
<i>L. thermarum</i>	14130-70	2467	-70.5146	-35.2268	Argentina, Mendoza, Malargüe, Paso Vergara
<i>L. archeforus</i>	9238-40	1353	-71.1075	-46.9643	Argentina, Santa Cruz, Lago Buenos Aires, Meseta del Lago Buenos Aires
<i>L. vallecurensis</i>	2713-14		-69.4247	-29.4030	Argentina, San Juan, Iglesia, Llanos de La Lagunita
<i>L. rothi</i>	3091-92	0797	-71.3102	-41.1334	Argentina, Río Negro, Bariloche, Bariloche

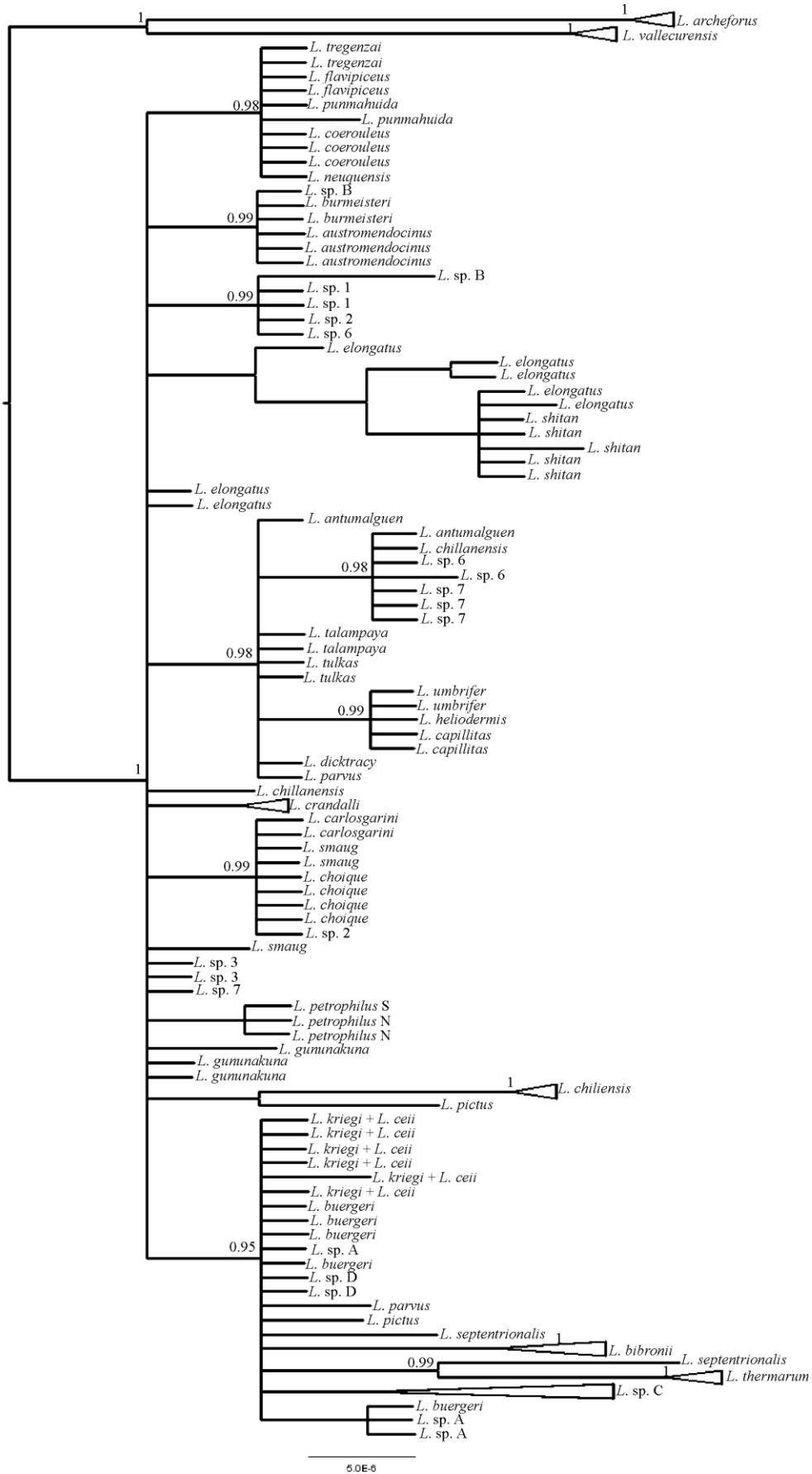
## APÉNDICE X – ÁRBOLES DE GENES

Detalle de los árboles de genes para cada uno de los fragmentos de genes secuenciados para el capítulo V. En los nodos los valores de probabilidad posterior el análisis bayesiano.

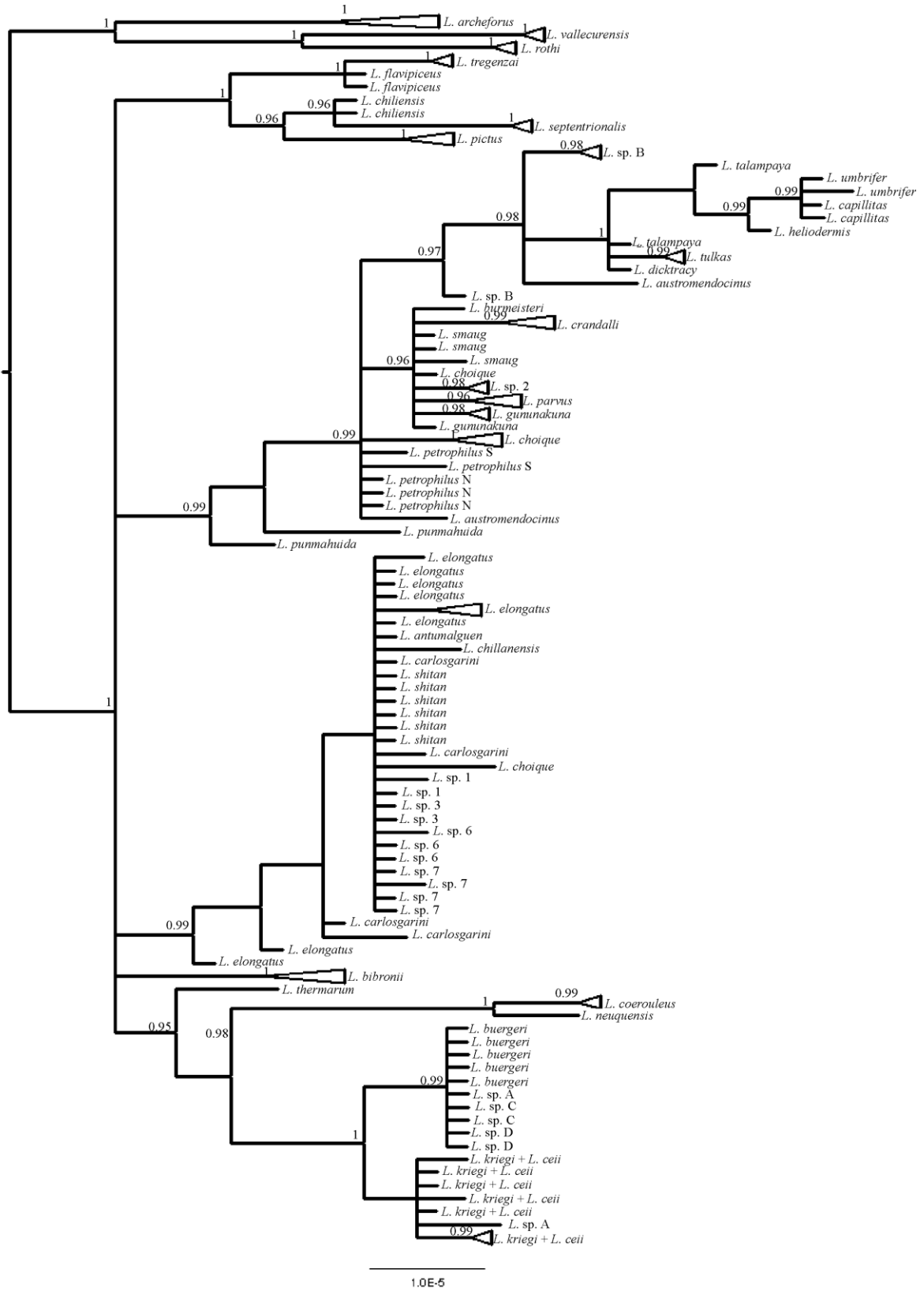




BA3

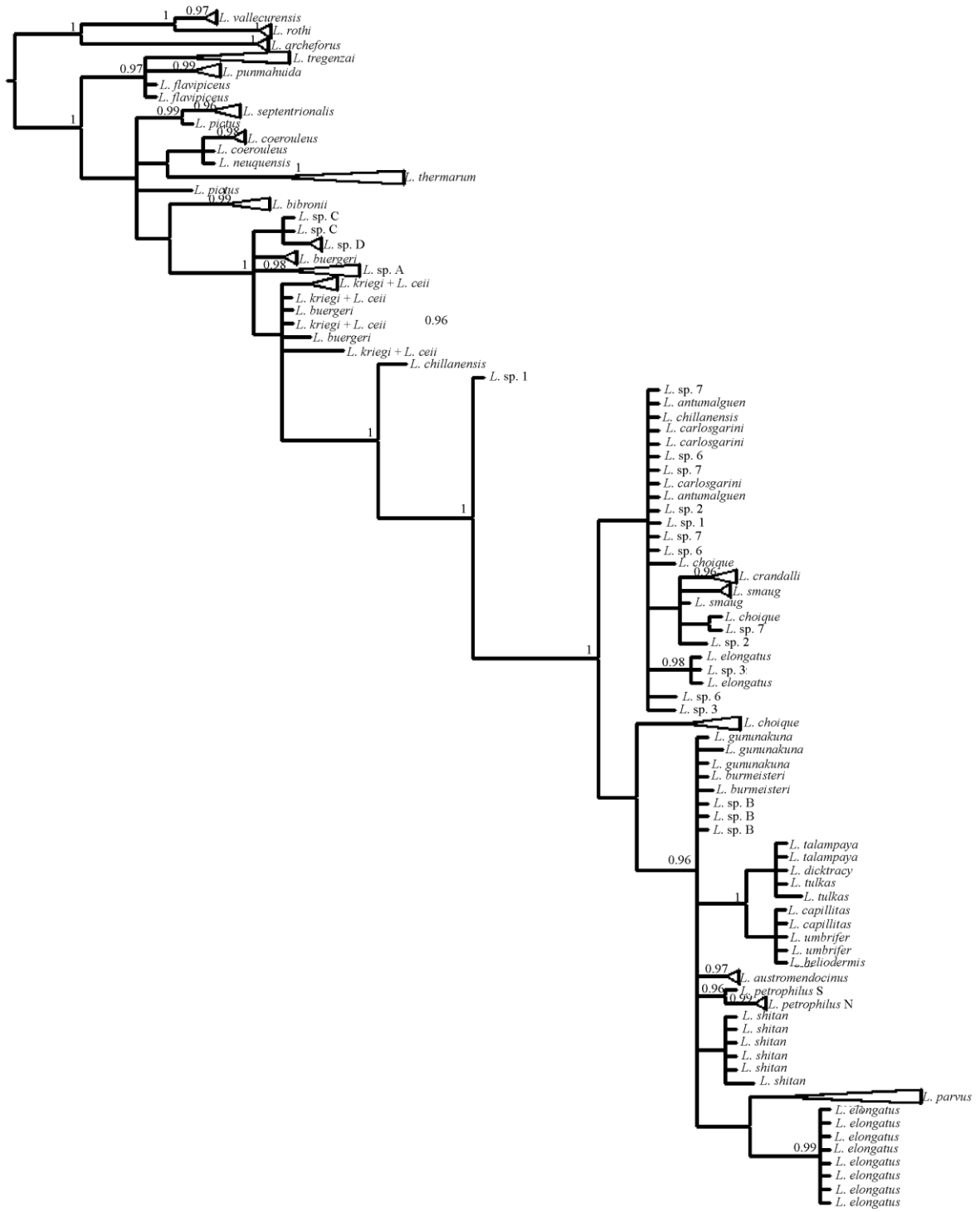


EXPH5



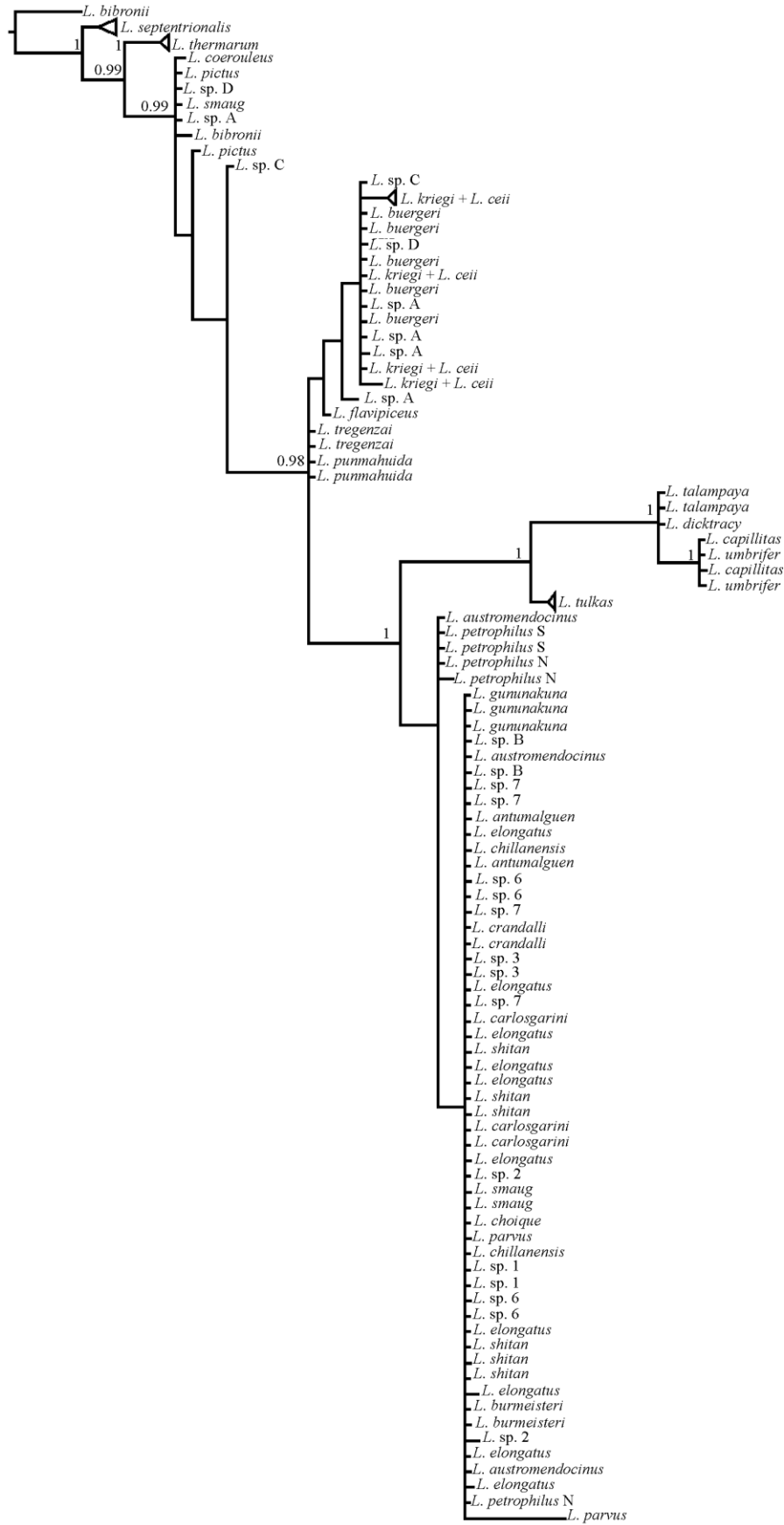


KIF24



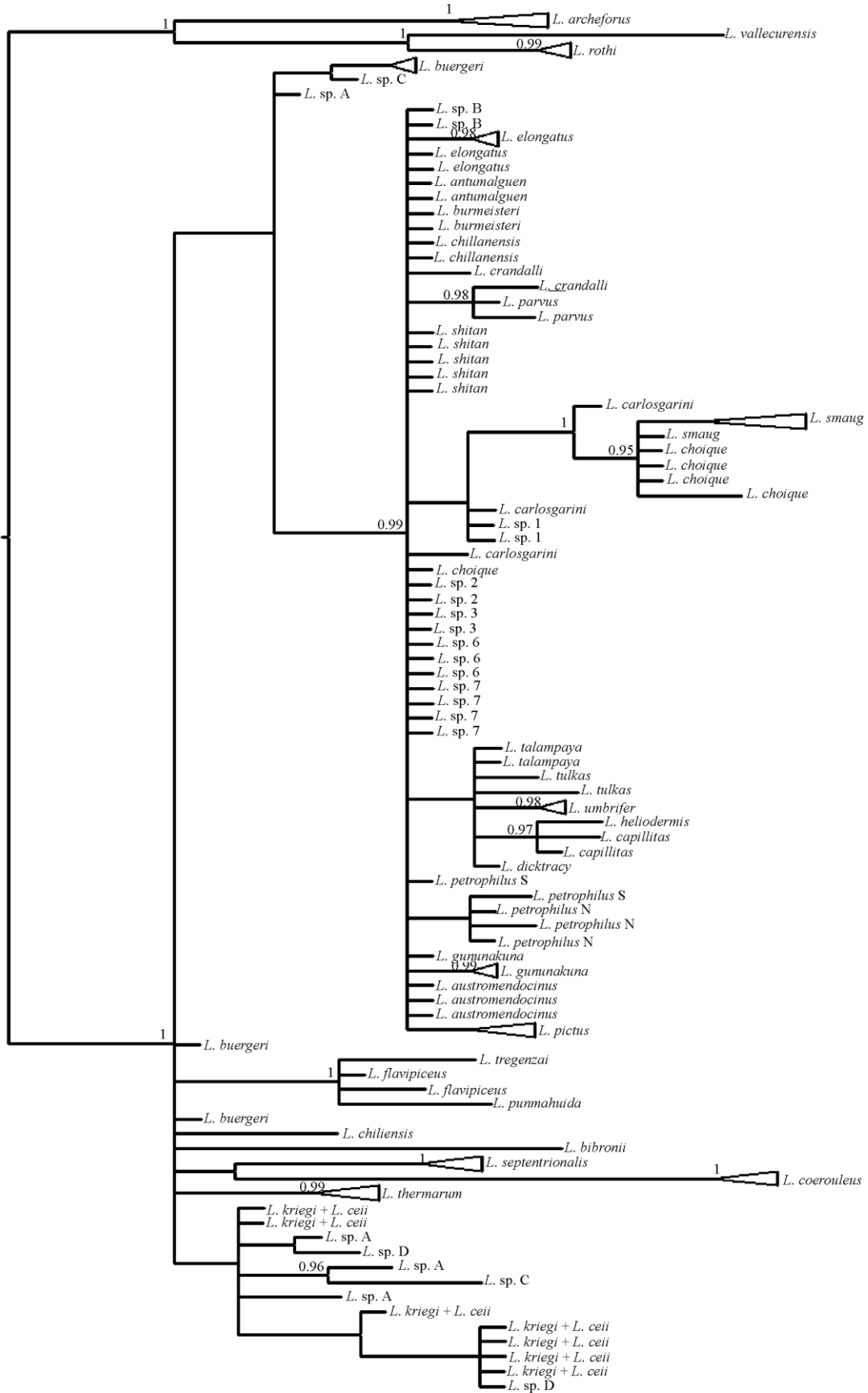
2.0E-5

LPB4G



2.0E-5

MXRA5



9.0E-6