

ARTÍCULO

Evaluación sistemática del género *Helcogrammoides* (Blenniformes: Tripterygiidae): Pequeños peces con grandes problemas

Systematic evaluation of the genus *Helcogrammoides* (Blenniformes: Tripterygiidae): Small fishes with big problems

Claudio F. Cornejo^{1*}, Christian M. Ibáñez¹ y Cristián E. Hernández²

¹Departamento de Ecología y Biodiversidad, Facultad de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Andres Bello, República 440, Santiago, Chile. *claudio.cornejo@uandresbello.edu

²Departamento de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

Abstract.- In the Chilean coast, the Tripterygiidae family is represented by two species from the *Helcogrammoides* genus; these were originally described in the *Tripterygion* genus, which is currently distributed in the Mediterranean Sea and northeast Atlantic Ocean. In 1959, Rosenblatt recognizes the differences between these and the other species from *Tripterygion* genus and proposed the *Helcogrammoides* genus. A taxonomic hypothesis has not been evaluated by systematic-phylogenetic approach, which would allow to evolutionarily validate this proposal. To this date, the only comparative analysis with other species of the family, used morphological characters suggesting that the *Helcogrammoides* genus and the *Karalepis* monotypic genus, belonging to the monophyletic tribe Karalepini, which is considered to be monophyletic based on morphological synapomorphies. This study tests Rosenblatt's taxonomic hypothesis, and the monophyly of the Karalepini tribe, through a molecular and morphological phylogenetic approach. The results suggest that the *Helcogrammoides* genus is monophyletic, differing from *Tripterygion*, both morphological and molecular data, thereby, supporting Rosenblatt's hypothesis. At the same time, the molecular analysis and the concatenated molecular and morphological data, groups together the *Karalepis* and the *Tripterygion* genus in a separate clade from the *Helcogrammoides* genus. Thus disproving the monophyly of this tribe and suggesting that the morphological characters that supported the monophyly of Karalepini tribe could correspond to homoplasies that obscure the results of the morphological analysis based on the parsimony criterion, and explain the low *a posteriori* probability of this clade Bayesian analysis.

Key words: Bayesian inference, Karalepini, phylogeny, Blennioidei

Resumen.- La familia Tripterygiidae en las costas de Chile se encuentra representada por dos especies correspondientes al género *Helcogrammoides*; sin embargo, éstas fueron originalmente descritas en el género *Tripterygion* el cual se distribuye actualmente en el Mar Mediterráneo y en el noreste del océano Atlántico. En 1959, Rosenblatt reconoce las diferencias entre estas y las demás especies del género *Tripterygion*, proponiendo el género *Helcogrammoides*. En la actualidad la hipótesis taxonómica no ha sido evaluada en base a aproximaciones sistemáticas filogenéticas que permitan considerar la validez evolutiva de esta propuesta. A la fecha el único análisis comparativo realizado con otras especies de la familia utilizó caracteres morfológicos y sugiere que *Helcogrammoides* pertenecería a la tribu Karalepini junto al género monotípico *Karalepis*, tribu considerada como monofilética en base a las sinapomorfías morfológicas. En este trabajo se evalúa la hipótesis taxonómica de Rosenblatt y la monofilia de la tribu Karalepini mediante aproximaciones filogenéticas basadas en datos moleculares y morfológicos. Los resultados sugieren que el género *Helcogrammoides* es un género monofilético que difiere de *Tripterygion* tanto morfológica como molecularmente, respaldando la hipótesis de Rosenblatt. A su vez el análisis filogenético molecular, y de datos moleculares y morfológicos concatenados, agrupan el género *Karalepis* junto al género *Tripterygion* en un clado separado del género *Helcogrammoides*, refutando la monofilia de la tribu Karalepini y sugiriendo que los caracteres morfológicos que sustentaban la tribu podrían corresponder a homoplasias que oscurecen los resultados del análisis morfológico basado en el criterio de parsimonia y que explican la baja probabilidad *a posteriori* de este clado en el análisis Bayesiano.

Palabras clave: Inferencia Bayesiana, Karalepini, filogenia, Blennioidei

INTRODUCCIÓN

La familia Tripterygiidae comprende especies de peces blenoideos asociados a hábitats rocosos de aguas heladas, templadas, subtropicales y tropicales (Fricke 2002). Son peces óseos que presentan tres aletas dorsales, aletas pélvicas de posición ventral, y que presentan dimorfismo y dicromatismo sexual en la mayoría de las especies (Fricke 2009). En Chile, esta familia está representada por dos especies simpátricas, *Helcogrammoides cunninghami* (Smitt, 1898) y *Helcogrammoides chilensis* (Cancino, 1960). Castillo & Pequeño (1998) señalan la distribución de *H. chilensis* entre Antofagasta (23°39'S 70°24'W) y Talcahuano (36°45'S 73°08'W) mientras que la distribución de *H. cunninghami* es señalada entre Coquimbo (29°53'S 71°15'W) y Tres Montes (46°58'S 75°27'W). Actualmente el límite norte de la distribución de ambas especies ha sido ampliado hasta Lima (William & Springer 2001). Adicionalmente, *H. cunninghami* ha sido reportado en las costas de Argentina entre Puerto Madryn (42°49'S 64°52'W) y Cabo dos Bahías (44°44'S 65°40'W) (Bazterrica *et al.* 2007). Por otra parte, se encuentra una tercera especie en este género, *Helcogrammoides antarcticus* (Tomo 1982), que fue descrita en base a ejemplares colectados en Bahía Paraíso, territorio Antártico. Estas especies fueron originalmente descritas en el género *Tripterygion* Risso, 1872 (William & Springer 2001), que actualmente se distribuye en el Mar Mediterráneo y el noreste del océano Atlántico. Al respecto, Fowler (1945) identificó a *Tripterygion cunninghami* Smitt, 1898 para la costa de Chile, Cancino (1955) describió a *Tripterygion chilensis* en una tesis no publicada, especie que fue posteriormente considerada válida por De Buen (1960) y refrendada en una diagnosis de la familia en Chile por Castillo & Pequeño (1998). Por su parte, Rosenblatt (1959) reconoció las diferencias de estas especies de *Tripterygion* con las demás especies del género, proponiendo el género *Helcogrammoides* en base a su línea lateral continúa y compuesta solo de escamas con poros, la presencia de tentáculos nasales y supraorbitales multifidos y la ausencia de espina anal, el cual albergaría a las especies de *Tripterygion* de Chile. Posteriormente, tanto Gon (1990) como Castillo & Pequeño (1998) avalan la propuesta de Rosenblatt reclasificando a las especies de *Tripterygion* bajo el género *Helcogrammoides*.

A la fecha se han realizado diversos estudios de filogenia en distintos géneros de la familia Tripterygiidae tales como *Tripterygion*, *Helcogramma* McCulloch & Waite, 1918, *Enneapterygius* Rüpell, 1835, y *Karalepis* Hardy, 1984 (Stepien *et al.* 1997, Carreras-Carbonell *et al.* 2005, 2007; Domingues *et al.* 2007, Chiang & Chen

2008, Lin 2009, Lin & Hasting 2013). Sin embargo, estos estudios consideran una escala geográfica limitada o con un bajo número de especies (Lin 2009), razón por la que el género *Helcogrammoides* no ha sido incluido en ellos. Fricke (1994) realizó un estudio cladístico en base a caracteres morfológicos de la familia, identificando 8 linajes, los que actualmente son reconocidos a nivel de tribu (Fricke 2009). Dentro de estas, el género *Helcogrammoides* se encuentra agrupado con el género mono-específico *Karalepis* en la tribu Karalepini, la cual presentaría sólo dos características no exclusivas que la sustentan (Fricke 1994): la línea lateral continua y una cabeza muy reducida. Sin embargo, a la fecha las hipótesis taxonómicas de Rosenblatt y la propuesta de la tribu Karalepini no han sido evaluadas en base a aproximaciones sistemáticas filogenéticas que permitan considerar su validez. El objetivo del presente trabajo fue evaluar ambas hipótesis usando aproximaciones filogenéticas basadas en caracteres morfológicos y moleculares mediante inferencia Bayesiana y Parsimonia, para así aclarar la sistemática de este grupo de peces.

MATERIALES Y MÉTODOS

MORFOLOGÍA

Con la finalidad de evaluar la asignación de las especies chilenas al género *Helcogrammoides* se incluyeron en este estudio a 3 especies de la tribu Tripterygiini [*Enneapterygius etheostoma* (Jordan & Snyder, 1902), *Tripterygion delaisi* (Cardenat & Blache, 1969), *Tripterygion tartessicum* Carreras-Carbonell, Pascual & Macpherson, 2007] y a una de Notoclinini [*Notoclinus compressus* (Hutton, 1872)]. Con la finalidad de evaluar la consistencia monofilética de la tribu Karalepini, se incluyó a la única especie del género *Karalepis* (*Karalepis stewarti* Hardy, 1984). Además, se utilizó como grupo externo a dos especies de la familia Blenniidae [*Scartichthys crapulatus* Williams, 1990 e *Hypsoblennius sordidus* (Bennett, 1828)].

La obtención de medidas morfológicas se realizó mediante la revisión tanto material depositado en la colección de peces del Museo Nacional de Historia Natural de Chile (MNHNCL), como de literatura existente (Tabla 1). Se revisó un total de 26 ejemplares correspondiente a la especie *H. cunninghami*; 30 de *H. chilensis*; 8 ejemplares de *S. crapulatus* y 5 de *H. sordidus* (Tabla 1). Además, a partir de la literatura se recopiló las medidas morfológicas para *E. etheostoma*, *H. antarcticus*, *K. stewarti*, *T. delaisi*, *T. tartessicum* y

Tabla 1. Se muestra la fuente de la cual fueron obtenidas las medidas morfológicas. Las especies examinadas en el MNHNCL se presentan con un asterisco (*) mientras que las especies de las cuales se obtuvo las medidas morfológicas en base a la literatura se presentan con doble asterisco ()** / Shows the source of which were obtained morphological measures. The species examined in the MNHNCL are presented with a simple mark (*), whereas the species from which the morphological measurements were obtained based on the literature are presented with double mark (**)

Especie	Fuente
<i>Helcogrammoides chilensis</i> (Cancino, 1960)*	MNHNCL 5559, 6872, 6873, 7415, 6874, 6888, 6880 y 7421
<i>Helcogrammoides cunninghami</i> (Smitt, 1898)*	MNHNCL 6881, 6883, 6885, 6886, 6882, 6884 y 6889
<i>Helcogrammoides antarcticus</i> (Tomo, 1982)**	Gon, 1990
<i>Enneapterygius theostoma</i> (Jordan & Snyder, 1902)**	Chiang & Chen, 2008
<i>Karalepis stewarti</i> Hardy, 1898**	Fricke, 1994
<i>Tripterygion tartessicum</i> Carreras-Carbonell, Pascual & Macpherson, 2007**	Carreras-Carbonell, Pascual & Macpherson, 2007
<i>Tripterygion delaisi</i> Cardenat & Blache, 1969**	Cardenat J & Blache J, 1969
<i>Notoclinus compressus</i> (Hutton, 1872)**	Fricke, 1994
<i>Scartichthys crapulatus</i> Williams, 1990*	MNHNCL 6411
<i>Hypsoblennius sordidus</i> (Bennett, 1828)*	MNHNCL 5908, 6412, 7423

MNHNCL= Museo Nacional de Historia Natural de Chile

N. compressus (Tabla 1). A partir de las medidas morfológicas obtenidas, tanto para los ejemplares examinados, como para los datos obtenidos desde literatura, se generó una matriz con 32 caracteres morfológicos codificados como binarios (0-1) (Tabla 2).

FILOGENIA MORFOLÓGICA

En base a la matriz binaria de 32 caracteres se reconstruyó la filogenia con inferencia Bayesiana en el programa BayesPhylogenies v 1.1 (Pagel & Meade 2004) utilizando el modelo M2P (la tasa de ganancia y la tasa de pérdida del carácter difieren) seleccionado en base al resultado de Bayes Factor (BF) evaluado en el programa TRACER v1.5 (Rambaut *et al.* 2014), corriendo 4 cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), realizando 5.000.000 de generaciones y quemando el 10% de los árboles. Además, se reconstruyó la filogenia en base al criterio de Máxima Parsimonia (MP) (Parsimonia de Wagner, B&B) en el programa PAUP V.4.0 (Swofford 2002) utilizando 100.000 réplicas de Bootstrap. Para reconocer las sinapomorfías morfológicas de los grupos de interés (género *Helcogrammoides* y tribu Karalepini) se realizó el mapeo de sinapomorfías en el programa TNT v1.5 (Goloboff & Catalano 2016).

EXTRACCIÓN DE ADN, SECUENCIACIÓN Y AMPLIFICACIÓN

A partir de 3 ejemplares de *H. chilensis*, 2 de *H. cunninghami*, uno de *H. sordidus* y uno de *S. crapulatus* recolectados entre Las Cruces (33°30'11,32''S; 71°37'58,97''O) y Valparaíso (33°1'4,12''S; 71°38'20,21''O) en la costa central de Chile, se extrajo ADN genómico desde tejido muscular usando el procedimiento estándar fenol:cloroformo y precipitación con etanol-isomil (Sambrook *et al.* 1989), previa digestión de éstos en una solución compuesta por 800 µL de buffer lisis TE (10mM tris pH 7,5- 1 mM EDTA), 100 µL de detergente Twin 20, y 10 µL de Proteinasa K (20 mg/mL) durante 2 h a 25°C. Una muestra del extracto fue sembrada en gel de agarosa al 1% para corroborar la cantidad y calidad relativa del ADN. Luego se amplificó el gen 12S por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR: Palumbi 1996). Para esto se diseñaron partidores adecuados a los especímenes analizados. Los partidores generados (LBE-06 H, TTTACACATGCA AGTCTCCGCA y LBE-07 L, CACCTTCCGGTACACT TACCATG), fueron utilizados en una concentración de 10 pmol/µL. La amplificación mediante PCR fue realizada en 25 µL de volumen total, que contenía 2 µL de ADN genómico de 5 ng/µL, 12 µL de agua bidestilada (dd H₂O), 3 µL de Buffer PCR 10x, 3 µL de cloruro de magnesio de 50 mM (MgCl₂), 3 µL de

Tabla 2. Codificación de los caracteres morfológicos como datos binarios para los análisis filogenéticos. LE= Longitud estándar / Morphological characters codification as binary data for phylogenetic analysis. LE= Standard length

Número de carácter	Carácter	0	1
1	Longitud cefálica	Inferior al 25% de la LE	Superior al 25% de la LE
2	Longitud preanal	Hasta el 50% de la LE	Superior al 50% de la LE
3	Longitud predorsal	Inferior al 20% de la LE	Superior al 20% de la LE
4	Altura máxima del cuerpo	Menor al 22% de la LE	Superior al 22% de la LE
5	Altura del pedúnculo caudal	Menor al 8% de la LE	Superior al 8% de la LE
6	Diámetro ocular	Menor al 8% de la LE	Superior al 8% de la LE
7	Distancia interocular	Menor al 5% de la LE	Superior al 5% de la LE
8	Base de las espinas dorsales	Menor al 40% de la LE	Superior al 40% de la LE
9	Base de los radios dorsales	Menor al 30% de la LE	Superior al 30% de la LE
10	Número de aletas dorsales	1 Aleta dorsal	3 Aletas dorsales
11	Largo de la aleta pectoral	Inferior al 30% de la LE	Mayor al 30% de la LE
12	Largo de la aleta pélvica	Inferior al 15% de la LE	Mayor al 15% de la LE
13	Base de la aleta anal	Inferior al 45% de la LE	Mayor al 45% de la LE
14	Número de espinas dorsales	Hasta 15	Más de 15
15	Número de radios dorsales	Hasta 15	Más de 15
16	Espina en la aleta anal	Ausente	Presente
17	Radios en la aleta anal	Hasta 20	Más de 20
18	Forma de la aleta caudal	Redonda	Truncada
19	Espinas en la aleta pélvica	Ausente	Presente
20	Radios en la aleta pélvica	2 Radios pélvicos	4 Radios pélvicos
21	Escamas en el cuerpo	Ausentes	Presentes
22	Radios de la aleta pectoral	Solo radios simples	Radios simples y ramificados
23	Forma de la aleta pectoral	Redondeada	Cincelada / Lanceolada
24	Continuidad de la línea lateral	Discontinua	Continua
25	Forma de la línea lateral	Descenso abrupta	Descenso suave
26	Composición de la línea lateral	Poros sensoriales	Poros y túbulos sensoriales
27	Forma de la cabeza	Triangular	Redondeada
28	Posición de la boca	Terminal	Subterminal
29	Cirros nucales	Ausentes	Presentes
30	Forma de los cirros nasales	Simple	Ramificados
31	Número de cirros supraoculares	Solo 1 cirro	Varios cirros
32	Longitud máxima	Inferior a los 10 cm	Superior a los 10 cm

desoxinucleotido de trifosfato de 2,5 nM (dNTP) 0,5 µL de primer L, 0,5 µL de primer H, y 1 µL de Taq DNA polimerasa de 5 u/µL (BIOTOOLS, España). La amplificación por PCR fueron realizadas con el siguiente protocolo de termociclado, en 35 ciclos: Denaturación inicial a 94°C durante 5 min, denaturación a 95°C por 45 s, alineamiento a 61°C por 55 s, extensión a 72°C por 90 s y extensión final a 72°C durante 5 min. El tamaño del producto PCR fue chequeado en un gel de agarosa al 1,5%. Finalmente, el ADN amplificado fue purificado con el kit QIAquick PCR de acuerdo al protocolo del fabricante (Qiagen, USA). La secuenciación se realizó en ambas direcciones (Forward y Reverse) en un secuenciador automático de ADN (Model ABI3100, Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: Polímero POP6, Byg Dye Terminator V.3, voltaje de 12V, temperatura de 50°C y un tiempo de corrido de 7.500 s.

FILOGENIA MOLECULAR

Para el análisis molecular se utilizó la secuencia del gen mitocondrial 12S rRNA obtenidas en este estudio en conjunto con secuencias de GenBank (Tabla 3). La reconstrucción filogenética se realizó en el programa BayesPhylogenies V.1.1 (Pagel & Meade 2004) mediante inferencia Bayesiana utilizando el modelo de sustitución Kimura 2 parámetros (K2P, Kimura 1980), corriendo 4 cadenas MCMC, 5.000.000 de generaciones y quemando el 10% de los árboles guardados. El modelo K2P fue seleccionado en base a su valor de AIC evaluado en el programa MEGA V 7.0 (Kumar *et al.* 2016). Además, se reconstruyó la filogenia en base al criterio de MP (Parsimonia de Wagner) en el programa PAUP V.4.0 (Swofford 2003) utilizando 100.000 réplicas de Bootstrap.

ANÁLISIS DE DATOS CONCATENADOS

Para este análisis, se realizó una matriz particionada de los datos morfológicos y las secuencias del gen mitocondrial 12S rRNA, generando una matriz con una partición para cada tipo de dato, y siendo cada una de estas trabajada en base a los parámetros previamente detallados. Se realizó esta reconstrucción filogenética en base al método Bayesiano en el programa BayesPhylogenies V.1.1 (Pagel & Meade 2004) corriendo 4 cadenas MCMC, con 5.000.000 de generaciones y quemando el 10% de los árboles guardados.

RESULTADOS

El análisis filogenético morfológico en base a la MP reconoció un total de 30 caracteres filogenéticamente informativos. Los análisis filogenéticos morfológicos, tanto MP como Bayesiano, mostraron similar topología. Ambos muestran que el clado correspondiente a la familia Tripterygiidae presenta altos valores de sustento de nodo y probabilidad *a posteriori* (Fig. 1: MP= 100%; PP= 1,0). A su vez la familia Tripterygiidae se subdivide en 2 clados: El primero de los clados agrupa a especies de la subfamilia Tripterygiinae (*Tripterygion tartessicum*, *Enneapterygius etheostoma*, *Tripterygion delaisi*) con *Notoclinus compressus* (subfamilia Notoclininae) como especie hermana. Sin embargo, tanto en este clado, como los nodos internos tienen bajos sustento (< 50% en MP) y probabilidad *a posteriori* (< 0,3 PP). El segundo clado agrupa a los géneros *Karalepis* y *Helcogrammoides* en la denominada tribu Karalepini, el cual muestra valores bajos de sustento (67% en MP) y probabilidad *a posteriori* (0,47 PP). El mapeo de sinapomorfías revela que los caracteres

Tabla 3. Fuente de las Secuencias del gen 12S rRNA utilizadas en los análisis filogenéticos / Source of the 12S rRNA gene sequences used on phylogenetic analysis

Especie	Código de Acceso (GenBank)
<i>Helcogrammoides chilensis</i> (Cancino, 1960)	MF458192; MF458193; MF458194
<i>Helcogrammoides cunninghami</i> (Smitt, 1898)	MF458195; MF458196
<i>Karalepis stewarti</i> (Hardy, 1984)	U90383.1
<i>Enneapterygius etheostoma</i> (Jordan & Snyder, 1902)	U90385.1
<i>Tripterygion delaisi</i> (Cardenat & Blache, 1969)	AJ872171.1; AJ872161.1
<i>Notoclinus compressus</i> (Hutton, 1872)	U90386.1
<i>Hypsoblennius sordidus</i> (Bennett, 1828)	MF458197
<i>Scartichthys crapulatus</i> Williams, 1990	MF458198

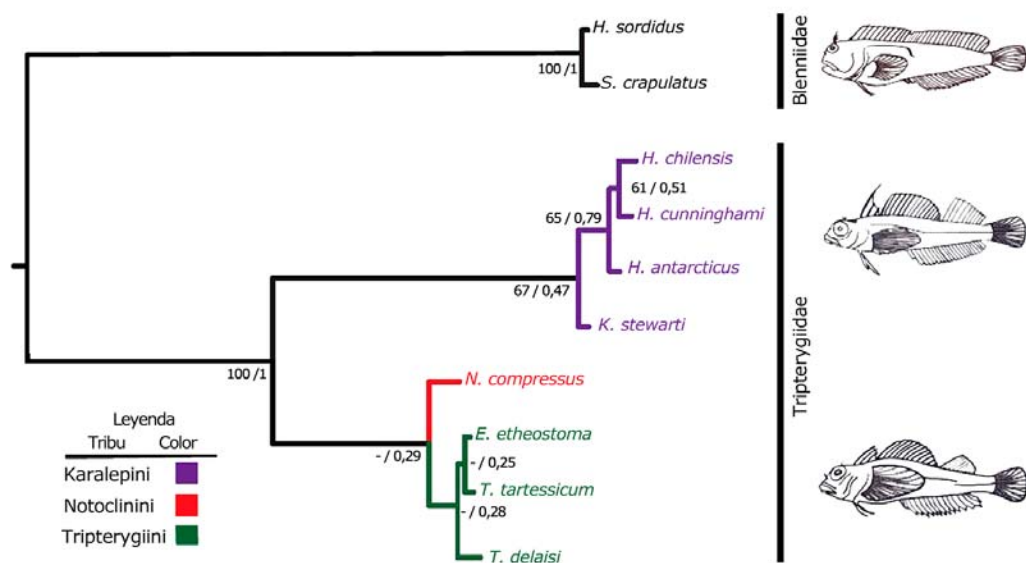


Figura 1. Reconstrucción filogenética basada en caracteres morfológicos bajo inferencia Bayesiana. El primer número antes de cada nodo representa el valor de sustento de Bootstrap en MP y el segundo valor la probabilidad posterior. Los colores de las ramas del árbol señalan las tribus a las cuales pertenecen las especies analizadas (ver leyenda) / Phylogenetic reconstruction based on morphological characters under Bayesian inference. The first number before each node represents the Bootstrap support value of MP and the second the posterior probability value. The colors of the tree branches indicate the tribes to which belong the species analyzed (see legend)

sinapomórficos del clado conformado por el género *Helcogrammoides* corresponden al largo de la aleta pectoral, ausencia de espina en la aleta anal, ausencia de espina en la aleta pélvica, línea lateral compuesta solo de poros sensoriales y cirros nasales ramificados (Tabla 4). Mientras que las sinapomorfías que sustentan a la tribu Karalepini corresponden a la longitud cefálica, la altura del pedúnculo caudal, el diámetro ocular, presentar una línea lateral continua y con un descenso suave desde la cabeza al pedúnculo caudal (Tabla 4).

El análisis filogenético molecular en base a la secuencia del gen 12S rRNA, mediante la MP reconoció un total de 78 sitios filogenéticamente informativos. Los análisis filogenéticos moleculares inferidos mediante inferencia Bayesiana y máxima parsimonia presentaron similar topología, al igual que en el análisis filogenético morfológico, soportan el clado de la familia Tripterygiidae (100% MP y PP= 1,0) (Fig. 2). Si bien en este análisis la familia también se agrupa en 2 clados, a diferencia de los resultados morfológicos, en este caso el género *Helcogrammoides* resulta ser un clado independiente con alto sustento (98% MP) y probabilidad *a posteriori* (PP= 1,0) que no incluye a la especie *Karalepis stewarti* (Fig. 2). De esta forma la tribu Karalepini no sería un

grupo natural y constituiría un clado polifilético. Dentro del clado *Helcogrammoides*, los individuos secuenciados se adscriben a las especies respectivas formando grupos monofiléticos con fuerte sustento (> 98% MP) y probabilidad *a posteriori* (PP= 1,0). Por otra parte, el clado formado por el resto de las especies de la familia se subdivide en 2 clados (PP= 0,79): uno que alberga sólo a *N. compressus*, representante de la subfamilia

Tabla 4. Lista de sinapomorfías para los grupos de interés. LE= Longitud estándar / List of synapomorphies for interest groups. LE= Standard length

Grupo de interés	Sinapomorfías (Número de carácter)
Género <i>Helcogrammoides</i>	Aleta pectoral mayor al 30% de la LE, Ausencia de espina anal, Ausencia de espinas en aletas pélvicas, línea lateral compuesta solo por poros sensoriales y presentan cirros nasales ramificados
Tribu Karalepini	Longitud cefálica inferior al 25% de la LE, Altura del pedúnculo caudal inferior al 8% de la LE, La línea lateral se presenta un descenso suave desde la cabeza al pedúnculo caudal y línea lateral compuesta solo por poros sensoriales

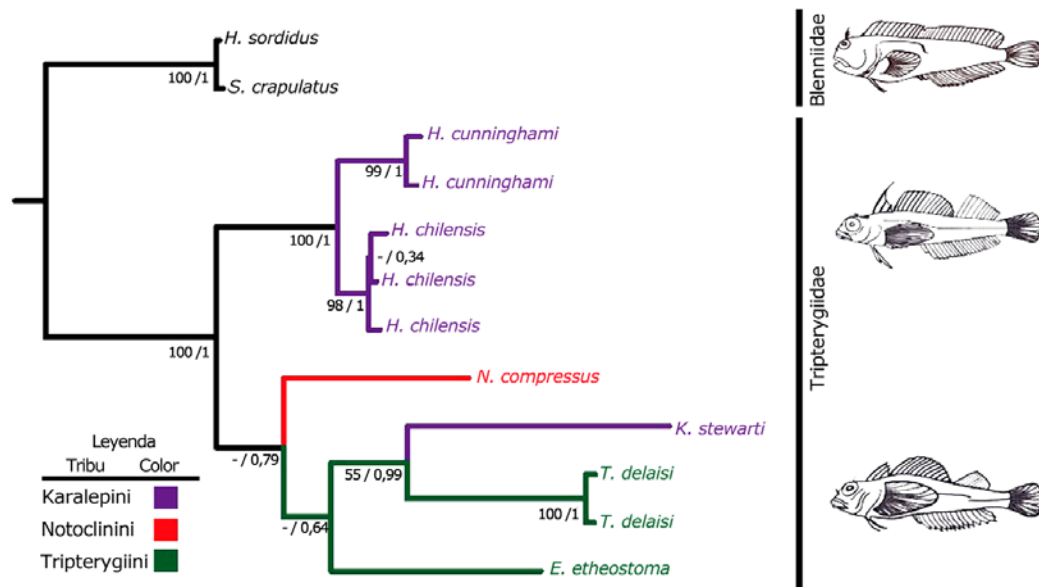


Figura 2. Reconstrucción filogenética basada en caracteres moleculares (12S rRNA) bajo inferencia Bayesiana. El primer número antes de cada nodo representa el valor de sustento de Bootstrap en MP y el segundo valor la probabilidad posterior. Los colores de las ramas del árbol señalan las tribus a las cuales pertenecen las especies analizadas (ver leyenda) / Phylogenetic reconstruction based on molecular characters (12S rRNA) under Bayesian inference. The first number before each node represent the Bootstrap support value of MP and the second the posterior probability value. The colors of the tree branches indicate the tribes to which belong the species analyzed (see legend)

Notoclininae; y el otro clado con un 0,64 de PP incorpora las especies de la tribu Tripterygiini, dentro de este clado la especie *K. stewarti* se presenta como especie hermana de las especies del género *Tripterygion* (55% MP y 0,99 PP).

La reconstrucción filogenética basada en datos morfológicos y genéticos concatenados (Fig. 3), reafirma los resultados de los análisis basados exclusivamente en datos moleculares. Sin embargo, en este caso la probabilidad *a posteriori* en cada nodo es siempre mayor o igual a 0,9, destacando el clado compuesto por las especies del género *Helcogrammoides*, que presentan sólo probabilidades *a posteriori* de 1,0.

DISCUSIÓN

Originalmente las especies del género *Helcogrammoides* fueron clasificadas en el género *Tripterygion* (Williams & Springer 2001), sin embargo, Rosenblatt reconoció las diferencias de estas con el resto de las especies del género, proponiendo el género *Helcogrammoides*. Gon (1990) y Castillo & Pequeño (1998) validaron y reclasificaron las especies en el actual género. Sin embargo, *Helcogrammoides* no fue objeto de estudio de

la sistemática filogenética sino hasta el trabajo filogenético morfológico de Fricke (1994), que sugiere la tribu Karalepini para incluir tanto a *Karalepis stewarti* como a las especies del género *Helcogrammoides*, pero sustentada sólo en dos caracteres lábiles y no exclusivos a esta tribu (*i.e.*, la línea lateral continua y una cabeza muy reducida).

Este estudio constituye el primer análisis sistemático filogenético molecular que intenta dilucidar las asignaciones taxonómicas propuestas para el género *Helcogrammoides*, y los resultados sustentan que el género *Helcogrammoides* es monofilético, difiriendo de *Tripterygion* tanto morfológica como molecularmente, respaldando la hipótesis original de Rosenblatt. A su vez el análisis filogenético molecular, y de datos moleculares y morfológicos concatenados, agrupa el género *Karalepis* junto al género *Tripterygion* en un clado separado del género *Helcogrammoides*, refutando la monofilia de la tribu Karalepini y sugiriendo que los caracteres morfológicos que sustentaban la tribu podrían corresponder a homoplasias que oscurecen los resultados del análisis filogenético morfológico basados en el criterio de parsimonia y que explican la baja probabilidad *a posteriori* de este clado en el análisis Bayesiano.

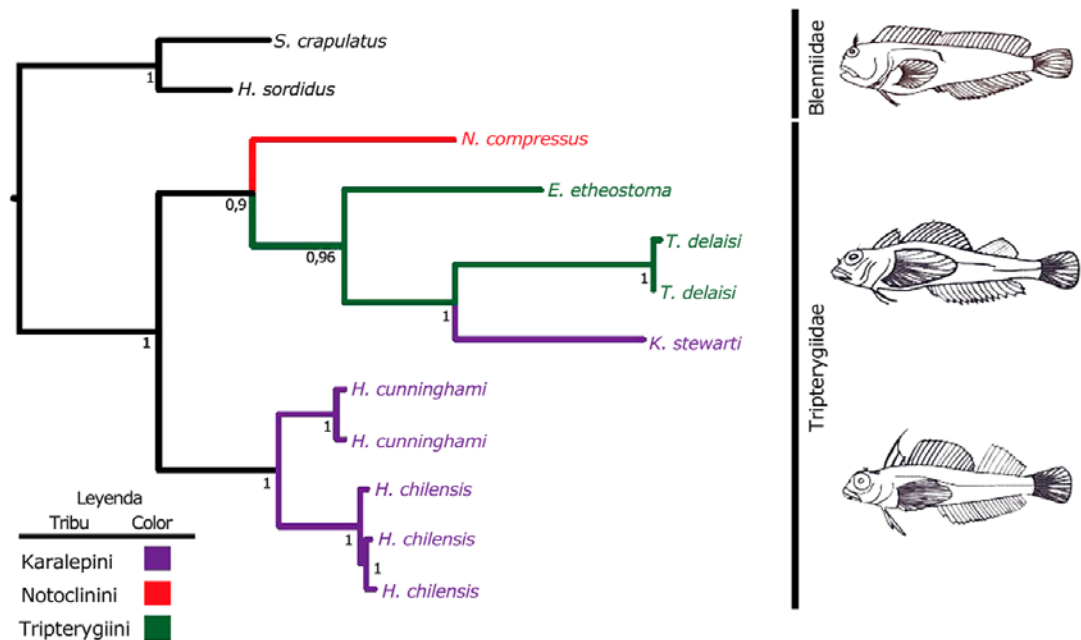


Figura 3. Reconstrucción filogenética basada en los datos morfológicos y moleculares (12S rRNA) concatenados bajo inferencia Bayesiana. El número antes de cada nodo representa el valor de probabilidad posterior. Los colores de las ramas del árbol señalan las tribus a las cuales pertenecen las especies analizadas (ver leyenda) / Phylogenetic reconstruction based on morphological and molecular characters (12S rRNA) concatenated under Bayesian inference. The first number before each node represent the Bootstrap support value of MP and the second the posterior probability value. The colors of the tree branches indicate the tribes to which belong the species analyzed (see legend)

Un avance previo a la clarificación de la taxonomía de *Helcogrammoides* lo logró Castillo & Pequeño (1998), quienes por primera vez sistematizan de modo muy definido las diferencias morfológicas entre las dos especies simpátricas de *Helcogrammoides* que habitan la costa de Chile, resaltando dentro de las medidas morfométricas la longitud pre anal, la altura máxima del cuerpo, la longitud de la aleta pélvica y la altura mínima del pedúnculo caudal. La revisión morfológica de los ejemplares del MNHNCL muestra congruencia en la longitud de la aleta pélvica como una medida que da cuenta de la diferenciación de estas especies. Castillo & Pequeño (1998) señalan como principal diferencia entre ambas especies la espina prolongada en la primera aleta dorsal (1° espina para *H. cunninghami*, 2° espina para *H. chilensis*). Williams & Springer (2001) señalan que el caso de *H. antarcticus* es similar al de *H. cunninghami* (1° espina de la primera aleta dorsal). Sin embargo, basándose en el trabajo de Gon (1990), estos autores señalan que mientras *H. cunninghami* y *H. chilensis* presentan el vientre carente de escamas, *H. antarcticus* presenta escamas cicloideas en su vientre, lo que constituiría una autopomorfía de la especie y por tanto un carácter diagnóstico para diferenciar ambas especies que presentan en común una

prolongada primera espina de la primera aleta dorsal. Sin embargo, sobre la base de: la mala preservación del material tipo de *H. antarcticus* (ver Gon 1990), la ausencia de blenoídeos en Antártica (Williams & Springer 2001), y el hecho que no se ha podido recolectar nuevamente de la localidad tipo (Hüne M, com. pers.)¹, permite sugerir a esta especie como *nomen dubium* (Art. 75 CINZ).

Este trabajo brinda nueva evidencia que sustenta la hipótesis de Rosenblatt (1959), mediante el uso de técnicas filogenéticas en base tanto a caracteres morfológicos como genéticos (Figs. 1-3). Los resultados demuestran que las especies pertenecientes al género *Helcogrammoides* se encuentran debidamente diferenciadas de las especies del género *Tripterygion*, a su vez que *Helcogrammoides* es un grupo monofilético sustentado tanto en análisis morfológicos como genéticos (Morfológico, 65% en MP y 0,79 de PP; Genético, 100% en MP y 1,0 de PP; Concatenado, 1,0 de PP), coincidiendo parte de los caracteres indicados por Rosenblatt (1959) como diagnóstico con los resultados del mapeo de sinapomorfías. Por otra parte, estos

¹Mathias Hüne, 2015. Fundación Ictiológica. <mathiashune@gmail.com>

resultados no sustentan la hipótesis de Fricke (1994) de la existencia de la Tribu Karalepini, dado que tanto caracteres genéticos y datos concatenados muestran fuerte evidencia de que *K. stewarti* no forma parte del clado de los *Helcogrammoides* (Figs. 2 y 3). Si bien, los datos morfológicos muestran la existencia de la Tribu Karalepini (Fig. 1), su probabilidad *a posteriori* es muy baja (0,47), poniendo en cuestionamiento el carácter monofilético de esta tribu sólo basada en caracteres morfológicos no exclusivos y lábiles. Por lo cual, los datos morfológicos podrían estar sujetos a fuertes procesos de convergencia o paralelismos que oscurecen las relaciones filogenéticas, aunque estos caracteres sigan siendo útiles para la clasificación taxonómica. Los resultados de los análisis en base a caracteres genéticos y datos concatenados agrupan al género *Karalepis* con las especies del género *Tripterygion* presentando un valor de sustento de nodo y probabilidad *a posteriori* que indica una alta consistencia de este clado (Genético: 0,94 de PP; Concatenado: 1,0 de PP). Sin embargo, estos resultados deben ser tomados con cautela tanto por el bajo número de especies utilizadas (ver Lin & Hasting 2013), como por el uso de solo un marcador molecular. De hecho, la familia *Tripterygiidae* es una familia que comprende 163 especies albergadas en 31 géneros (Fricke 2009), en este estudio solo fueron incluidas 8 especies de esta familia, representantes de solo 4 géneros. El número de especies incluidas en este estudio es producto de la compatibilidad entre los objetivos de este estudio y el estado del arte para esta familia. La evaluación de la tribu Karalepini requiere la inclusión de *K. stewarti* en el análisis, especie de la cual solo está disponible la secuencia del gen 12S rRNA, siendo por tanto este el primer filtro utilizado en la selección de especies. A su vez, la precaria descripción morfológica de algunas especies de la familia que presentan este gen o la incompatibilidad de la descripción con las medidas morfológicas utilizadas en este estudio actuó como segundo filtro para seleccionar el número de especies, por tanto los resultados estarían sujetos a la influencia del bajo número de especies, lo que puede cambiar los resultados obtenidos mediante la adición de nuevas especies o distintos marcadores moleculares al estudio. Debido a que el gen 12S es muy conservado en peces, solo se secuenció un bajo número de ejemplares (1-3 individuos) de cada una. No obstante, la consistencia de los resultados actuales, invita a revisar exhaustivamente las relaciones filogenéticas de la familia, resaltando la importancia de los caracteres morfológicos para la clasificación taxonómica cuando estos caracteres no estén sujetos a homoplasias, y a enfatizar el uso de

caracteres moleculares para la caracterización sistemática filogenética dado que nos entrega evidencia robusta de la historia evolutiva de la diversa familia *Tripterygiidae*.

AGRADECIMIENTOS

Queremos agradecer al Sr. Augusto Cornejo por facilitar el acceso a los ejemplares examinados en el Museo Nacional de Historia Natural, Santiago, Chile. También queremos dar las gracias a Mathias Hüne (Fundación Ictiológica) por proveer literatura clásica muy atinente al trabajo. La investigación de CEH fue apoyada por los proyectos FONDECYT 1140692 - 1170815, y la Dirección de Relaciones Internacionales, Universidad de Concepción, con el programa de colaboración internacional entre la St. Cloud State University y la Universidad de Concepción.

LITERATURA CITADA

- Bazterrica M, B Silliman, J Hidalgo, C Crain & M Bertness. 2007.** Limpet grazing on a physically stressful Patagonian rocky shore. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 353: 22-34.
- Cancino C. 1955.** Peces de las pozas litorales de Chile Central. Memoria de Profesor de Biología y Química, Facultad de Filosofía y Educación, Universidad de Chile, Santiago, 135 pp.
- Cancino C. 1960.** *Tripterygion chilensis*. En: De Buen F (1960). Los peje-sapos (Familia Gobiesocidae) en Chile. *Revista de Biología Marina* 10(1-3): 69-82.
- Cardenat J & J Blache. 1969.** Description d'une espèce nouvelle *Tripterygion delaisi* sp. nov., provenant de l'île de Gorée (Sénégal) (Pisces, Clinidae), *Bulletin du Muséum National d'Histoire Naturelle; 1ère Série; Tome 41(5):* 1097-1105.
- Carreras-Carbonell J, E Macpherson & M Pascual. 2005.** Rapid radiation and cryptic speciation in Mediterranean triplefin blennies (Pisces: *Tripterygiidae*) combining multiples genes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 37(3): 751-761.
- Carreras-Carbonell J, M Pascual & E Macpherson. 2007.** A review of the *Tripterygion tripterygion* (Risso, 1810) complex, with description of a new species from Mediterranean sea (Teleostei: *Tripterygiidae*). *Scientia Marina* 7(1): 75-86.
- Castillo R & G Pequeño. 1998.** Sinopsis de *Tripterygiidae* de Chile (Osteichthyes: Perciformes). *Gayana Zoología* 62(2): 109-133.
- Chiang M & I Chen. 2008.** Taxonomic review and molecular phylogeny of the triplefin genus *Enneapterygius* (Teleostei: *Tripterygiidae*) from Taiwan, with descriptions of two new species. *The Raffles Bulletin of Zoology, Supplement* 19: 183-201.

- De Buen F. 1960.** Los peje-sapos (Familia Gobiesocidae) en Chile. *Revista de Biología Marina* 10(1-3): 69-82.
- Domingues V, V Almada, R Santos, A Brito & G Bernardi. 2007.** Phylogeography and evolution of the triplefin *Tripterygion delaisi* (Pisces, Blennioidei). *Marine Biology* 150(3): 509-519.
- Fricke R. 1994.** Tripterygiid Fishes of Australia, New Zealand and the Southwest Pacific Ocean (Teleostei), 585 pp. Koeltz Scientific Books, Koenigstein.
- Fricke R. 2002.** Tripterygiid fishes of New Caledonia, with zoogeographical remarks. *Environmental Biology of Fishes* 65: 175-198.
- Fricke R. 2009.** Systematics of the Tripterygiidae (Triplefins). In: Patzner RA, EJ Gonçalves, PA Hastings & BG Kapoor (eds). *The biology of blennies*, pp. 31-67. Science Publishers, Enfield.
- Goloboff P & S Catalano. 2016.** TNT version 1.5, including a full implementation of phylogenetics morphometrics. *Cladistics* 32(3): 221-238.
- Gon O. 1990.** Tripterygiidae. In: Gon O & PC Heemstra (eds). *Fishes of the Southern Ocean*, pp. 400-401. J.L.B. Smith Institute of Ichthyology, Grahamstown.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* 16: 111-120.
- Kumar S, G Stecher & K Tamura. 2016.** MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis V 7.0. *Molecular Biology and Evolution* 33: 1870-1874.
- Lin H-C. 2009.** Evolution of the suborder Blennioidei: Phylogeny and phylogeography of a shallow water fish clade. Thesis PhD, University of California, San Diego, 150 pp. <<http://escholarship.org/uc/item/82c1r9xr>>
- Lin H-C & P Hastings. 2013.** Phylogeny and biogeography of a shallow water fish clade (Teleostei: Blenniiformes). *BMC Evolutionary Biology* 13: 210.
- Pagel M & A Meade. 2004.** A phylogenetic mixture model for detecting pattern heterogeneity in gene sequence or character-state data. *Systematic Biology* 53: 571-581.
- Rambaut A, M Suchard, D Xie & A Drummond. 2014.** Tracer v1.5. <<http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>>
- Rosenblatt R. 1959.** A revisionary study of the Blennioid fish family Tripterygiidae. Ph. D. Thesis, University of California, Los Angeles, 376 pp.
- Sambrook J, E Fritschi & T Maniatis. 1989.** *Molecular cloning: A laboratory manual*, 1626 pp. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Stepien C, A Dillon, D Brooks, K Chase & A Hubers. 1997.** The evolution of Blennioids fishes based on an analysis of mitochondrial 12S rDNA. In: Kocher T & C Stepien (eds). *Molecular systematics of fishes*, pp. 245-270. Academic Press, San Diego.
- Swofford D. 2002.** PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. v. 4.0. Sinauer Associates, Sunderland.
- Tomo A. 1982.** Contribución al conocimiento de la fauna ictiológica del sector Antártico Argentino. *Dirección Nacional del Antártico, Instituto Antártico Argentino, Publicación* 14: 1-242.
- Williams J & V Springer. 2001.** Review of the South American-Antarctic Triplefin fish genus *Helcogrammoides* (Perciformes: Tripterygiidae). *International Journal of Tropical Biology and Conservation* 49: 117-123.

Recibido el 29 de noviembre de 2016 y aceptado el 13 de junio de 2017

Editor: Claudia Bustos D.