

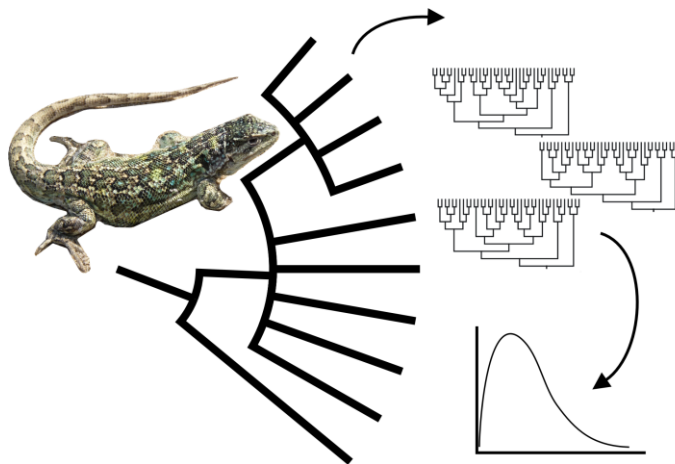
CENPAT  
CONICET



Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
Universidad Nacional de Córdoba

**PATRONES PARAFILETICOS Y PROCESOS EVOLUTIVOS  
SUBYACENTES EN LOS GRUPOS DE LAGARTIJAS  
PATAGONICAS *BOULENGERI* & *ROTHI* (SQUAMATA:  
*LIOLAEMUS*)**

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas



MELISA OLAVE  
ALUMNA

MARIANA MORANDO  
DIRECTORA

Córdoba, Argentina  
año 2014

# Comisión Asesora

**Dra. Patricia Mirol.** Museo Bernardino Rivadavia, Buenos Aires, Argentina.

**Dr. Raúl Gonzalez Ittig,** Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.

**Dra. Mariana Morando,** Centro Nacional Patagónico, Chubut, Argentina.

## Defensa Oral y Pública

Lugar y fecha:

Calificación:

## Tribunal

Firma y aclaración: .....

Firma y aclaración: .....

Firma y aclaración: .....

# Agradecimientos

Se agradece a todas las personas que colaboraron directa e indirectamente con esta tesis doctoral. En especial a mis directores Mariana Morando y Luciano Avila, por abrir las puertas a innumerables oportunidades de desarrollo profesional y personal. A todos los miembros actuales y pasados del Grupo de Herpetología Patagónica: Andrea Marin, Arley Camargo, Cintia Medina, Cristian Pérez, Florencia Breitman, Ignacion Minoli, Lorena Martinez, Mónica Kozykariski, Natalia Feltrin, Nicolas Frutos y Paula Escudero.

A diferentes personas que tuve el gusto de conocer durante cursos, congresos y viajes relacionados con esta tesis. Especialmente a Jack Sites, quien colaboró de gran manera con la redacción y métodos analíticos realizados aquí. A la Universidad de Brigham Young y a las personas que conocí allí: Ana Almendra, Fernanda Werneck, Rafael Leite, Cesar Aguilar, Pedro Victoriano, Justin Bagley y Eduardo Castro. A otras personas con quienes coincidimos en viajes a Utah: Marcela Nicola y Andrea Cosacov. A las personas que conocí durante el SISG 2011: Rima Thapa, Feiyian Yoong y Paloma Martinez. A Lacey Knowles y su laboratorio en la Universidad de Michigan: Dea Thomaz, Qixin He, Lucy Tran, Carlos Muñoz, Diego Alvarado. A otras personas con quienes coincidí en Michigan: Pamela Patricia y Mauricio Santos. A Julio Rozas y su laboratorio, y a todas las personas que conocí en la Universitat de Barcelona, especialmente a Eduard Sola, por su ayuda en discusiones y comentarios realizados en los contenidos de esta tesis.

A mi familia que me acompañó durante estos cinco años, en especial a mis padres Marisa y Oscar, a mis hermanos Juan Manuel, Rocío y Juan Ignacio, a Juan Pablo y a todos mis amigos, muchos de los cuales ya he mencionado y sumo a Romina Silva, Andrea Ferreyra, Marlene Bär Lamas, Pamela Albizu, Andrea Corro, Perla Carrizo, Miguel Corro, Anabel Calderon, Daniel Silva, Rocío Varisco, Larisa Varisco. A toda la gente que conforma y conformó el Grupo Scout Alte. Zar de Trelew, por ayudarme a encontrar mi vocación y ser apoyo constante e incondicional. ¡Muchas gracias!

# Publicaciones derivadas de esta tesis

2014 (*en revisión*). **Olave M.**, L.J. Avila, J.W. Sites Jr. and M. Morando. Statistical phylogeography of the South American lizard complexes *boulengeri-rothi*: testing hybridization hypothesis. *Molecular Ecology*.

2014 (*en revisión*). **Olave M.**, L.J. Avila, J.W. Sites Jr. and M. Morando. Detecting hybridization by likelihood calculation of gene tree extra lineages given explicit models. *Systematic Biology*.

2014 (*en prensa*). **Olave M.**, L.J. Avila, J.W. Sites Jr. and M. Morando. Model-based approach to test hard polytomies in the South American lizard genus *Liolaemus* (Liolaemini, Squamata). *Zoological Journal of the Linnean Society of London*.

2014. **Olave M.**, L.J. Avila, J.W. Sites Jr. and M. Morando. Multilocus phylogeny of the widely distributed South American lizard clade *Eulaemus* (Liolaemini, *Liolaemus*). *Zoologica Scripta*. doi: 10.1111/zsc.12053.

# Índice

Abreviaturas .....	1
Resumen .....	2
Summary .....	3
Introducción General .....	4
Hipótesis .....	7
Objetivos .....	7
Capítulo 1: Relaciones filogenéticas del subgénero <i>Eulaemus</i> .	
Introducción .....	9
Materiales y métodos .....	11
Resultados y discusión .....	16
Capítulo 2: El desafío de la filogenia de <i>Eulaemus</i> : poniendo a prueba la hipótesis de radiación rápida.	
Introducción .....	32
Materiales y métodos .....	34
Resultados y discusión .....	38
Capítulo 3: Nuevo método para detectar hibridación estimando la verosimilitud de un conjunto de árboles de genes observados dado un modelo.	
Introducción .....	43
Materiales y métodos .....	45
Resultados .....	50
Discusión .....	53
Capítulo 4: Filogeografía estadística de los complejos <i>boulengeri</i> y <i>rothi</i> : poniendo a prueba la hipótesis de hibridación en un enfoque basado en modelos.	
Introducción .....	60
Materiales y métodos .....	61
Resultados .....	66
Discusión .....	72
Capítulo 5: La diversidad oculta del género <i>Liolaemus</i> : variabilidad genética y morfológica del complejo <i>rothi</i> .	
Introducción .....	77
Materiales y métodos .....	79
Resultados .....	83
Discusión .....	87

Conclusiones Generales .....	90
Bibliografía .....	93
Apéndice A .....	107
Apéndice B .....	119
Apéndice C .....	127

## Abreviaturas

---

SVL	largo hocico-cloaca ( <i>snout-vent length</i> , distancia desde la nariz al margen posterior de las escamas precloacales).
AGD	distancia axila-ingle ( <i>axila-groin distance</i> , distancia entre la inserción de la extremidad anterior y el tórax, hasta la parte frontal del inicio de la extremidad posterior).
HaL	largo de la mano ( <i>hand length</i> , distancia entre la base de la palma y la parte terminal del tercer dígito).
RUL	largo del radio ( <i>radius-ulna length</i> , distancia entre la mano y codo).
HL	largo del húmero ( <i>humerus length</i> , distancia entre el final del radio y el hombro).
FoL	largo del pie ( <i>foot length</i> , distancia entre la base del talón y la base del final del cuarto dígito).
TFL	largo de la tibia ( <i>tibio-fibula length</i> , medido desde la rodilla hasta el ángulo interno con el pie).
FL	largo del fémur ( <i>femur length</i> , desde la rodilla hasta la inserción en la pelvis).
KKD	distancia entre rodillas ( <i>knee-knee distance</i> , distancia entre las rodillas en ángulo recto con el abdomen).
VLM	línea vertebral de melanismo ( <i>vertebral line melanism</i> , forma de las manchas dorsales).
NSLVL	número de manchas a la izquierda de la línea vertebral ( <i>number of spots at the left vertebral line</i> ).
NSRVL	número de manchas a la derecha de la línea ( <i>vertebral number of spots at the right vertebral line</i> ).
PWSVL	presencia de mancha blanca debajo de las manchas de VLM ( <i>resence of a white spot below VLM spots</i> ).
PVM	melanismo paraventral ( <i>pareventral melanism</i> )
NLPS	número de manchas paraventrales izquierdas ( <i>number of left paraventral spots</i> ).
PWSPL	presencia de mancha blanca debajo de las manchas PVM ( <i>presence of a white spot below PVM spots</i> ).
ML	presencia de línea media ( <i>mean line</i> , entre MLV y MPV).
SM	melanismo escapular ( <i>scapular melanism</i> , manchas a los lados del cuerpo entre el cuello y los hombros).
GM	melanismo gular ( <i>gular melanism</i> ).
VM	melanismo ventral ( <i>ventral melanism</i> ).
VC	color ventral ( <i>ventral color</i> ).
FM	melanismo anterior ( <i>forelimb melanism</i> ).
HM	melanismo posterior ( <i>hindlimb melanism</i> ).

---

# Resumen

Existen diferentes procesos que pueden explicar la discordancia entre árboles de genes y de especies. Por un lado, la división de linaje incompleta (ILS) lleva a la retención de polimorfismos ancestrales y explica la mezcla de haplotipos entre especies o poblaciones distintas, pero la hibridación también produce patrones similares, siendo que resulta en haplotipos de un grupo que son compartidos con un grupo distinto y que difieren de los haplotipos de otras poblaciones conespecíficas. Si se utilizan marcadores moleculares que estuvieron involucrados en estos eventos (ILS o hibridación) para análisis filogenéticos o filogeográficos, darán una visión diferente de la historia poblacional de la que darían marcadores que no muestran evidencia de introgresión. Se han propuesto algunos métodos analíticos que permiten diferenciar entre ILS e hibridación, varios de ellos en el marco de la filogeografía estadística, pero distinguir entre ambos aún continúa constituyendo un gran desafío en biología evolutiva.

*Liolaemus* es un género de lagartijas muy diversificado en América del Sur Austral, del cual se describieron ~257 especies, aunque se ha sugerido en múltiples publicaciones que la diversidad real de *Liolaemus* se encuentra subestimada. Esto se debe a que durante mucho tiempo se consideraron especies únicas, en algunos casos con gran distribución geográfica y amplia variación cromática y morfológica, las que en realidad constituyen complejos de especies. Este es el caso de las especies descritas como *Liolaemus boulengeri* y *Liolaemus rothi*, para los cuales se han descrito actualmente cinco especies del complejo *boulengeri* y seis del complejo *rothi*. Por otro lado, no existe consenso entre publicaciones que permitan reconocer las relaciones filogenéticas dentro del subgénero *Eulaemus*, tanto dentro como entre grandes grupos y en el último caso, se han observado patrones parafiléticos que involucran especies de estos dos complejos. Esto puede deberse a representaciones taxonómicas incompletas o la necesidad de incorporar mayor cantidad de datos. En base a otros estudios previos de complejos de *Liolaemus*, es claro que los límites de especies en este género aún no están bien definidos, y la división incompleta de linajes y la introgresión han sido propuestas como explicaciones plausibles para algunos de los diseños observados.

En esta tesis se propone estudiar las relaciones filogenéticas dentro de uno de los subgéneros (*Eulaemus*, 144 especies), así como también estudiar las posibles causas de la parafilia observada entre los complejos *boulengeri* y *rothi*.



# Summary

Different processes could explain gene tree discordance. On the one hand, incomplete lineage sorting (ILS) could lead to the retention of ancestral polymorphism, and closely related species could show mixed haplotypes. On the other hand the hybridization is a phenomenon that could produce similar patterns of gene tree discordance. Different analytical method to differentiate between both has been proposed, but arriving to conclusions still challenging.

The lizard genus *Liolaemus* is a widely distributed group, endemic of South America. It is composed for 257 species, but several publications have suggested that its diversity is underestimated. Since the past years, many new species has been described. For the particular case of *Liolaemus boulengeri* and *Liolaemus rothi*, both have been described as widely distributed species with high morphologic variation among populations, and later they were proposed as species complexes and many new species have been described (the *boulengeri* complex: five species; the *rothi* complex: six species).

On the other hand, there is no consensus among publication about the phylogenetic relationships among and within main clades of the *Liolaemus* genus. This could be due incomplete taxonomic sampling and/or not enough loci. For example, Avila et al. (2006), recovered different populations of the *boulengeri* and *rothi* complexes as paraphyletic, showing that the species limits are not clear here, and that ILS and hybridization could be plausible explanation.

Here, I study the phylogenetic relationships of one of the subgenus (*Eulaemus*, 121 species), as well as possible causes of the observed parafyly between the *boulengeri* and *rothi* complexes.

# Introducción General

Actualmente es clara la distinción entre un “árbol de un gen” y un “árbol de las especies” (Maddison 1997), y se sabe que estos pueden ser diferentes entre sí. Esta discordancia puede deberse a diferentes procesos evolutivos y poblacionales, tales como la división al azar de polimorfismos ancestrales, que da lugar a la “división de linaje incompleta” (*incomplete lineage sorting*, ILS), así como también a la hibridación de especies, transferencia horizontal y duplicación génica. ILS ocurre por retención de polimorfismos ancestrales, explicando la mezcla de haplotipos entre especies o poblaciones distintas (Tajima 1983; Neigel y Avise 1986; Nei 1987; Pamilo y Nei 1988; Maddison 1997; Knowles 2009), ya sean de divergencia reciente o con tamaños poblacionales muy grandes (Leaché y Rannala 2011). La división de linaje elimina los polimorfismos ancestrales en el tiempo, de manera tal que las especies hermanas eventualmente se vuelven monofiléticamente recíprocas; pero se espera que sea incompleta cuando la tasa de división de linaje o especiación excede la tasa de división estocástica de los alelos polimórficos dentro de los linajes (Sullivan et al. 2002). En general, se espera que con mayores tamaños poblacionales y tiempos de divergencia menores, el impacto de ILS sea mayor (Rosenberg 2013).

Por otro lado, la hibridación da lugar a la introgresión de genes de un grupo de poblaciones diferenciadas en otro (*i.e.* la incorporación de genes foráneos en un nuevo sistema poblacional reproductivamente integrado; Ferris et al. 1983; Rieseberg y Wendel 1993). Es decir, la introgresión resulta en haplotipos de un grupo que son compartidos con un grupo distinto y que difieren de los haplotipos de otras poblaciones conespecíficas. Si se utilizan marcadores moleculares que estuvieron involucrados en estos eventos para análisis filogenéticos o filogeográficos, darán una visión diferente de la historia poblacional de la que darían marcadores que no muestran evidencia de introgresión (Harrison 1991). En estos casos, también se espera que la filogenia de los alelos muestreados difiera de la filogenia de especies (Rosenberg 2002; Degnan y Rosenberg 2009; Knowles 2009).

Distinguir entre ILS e introgresión constituye actualmente un gran desafío en biología evolutiva. Esto se debe a que estos dos procesos involucran patrones similares en los árboles de genes, aunque pueden predecirse diferentes diseños espaciales; por lo tanto se pueden utilizar análisis filogenéticos de genes individuales para plantear hipótesis. Por ejemplo, si hubo una hibridación reciente, se espera que los alelos introgresados sean más comunes en las zonas de contacto y en áreas geográficas que están a distancias de dispersión relativamente cortas de las localidades simpátricas; mientras que los polimorfismos ancestrales se deberían detectar a aproximadamente iguales frecuencias en todo el rango de distribución (Barbujani et al. 1994). Sin embargo, estas observaciones sólo permiten plantear las hipótesis, las que posteriormente

deben ser evaluadas en un marco estadístico; pero los métodos propuestos para evaluar la probabilidad de cada una son escasos (e.g. Gerald et al. 2011; Joly et al. 2009).

La filogeografía estadística, fue propuesta por Knowles y Maddison (2002) para describir una aproximación basada en modelos que hacen tanto relaciones estadísticas explícitas entre procesos, como predicciones y pruebas que incorporan una diversidad de procesos e historias. Estos autores, presentaron dos ejemplos sobre cómo poner a prueba hipótesis biogeográficas históricas y uno de cómo estimar parámetros bajo esta aproximación estadística, que considera la aleatoriedad de los procesos genéticos poblacionales y ofrece una forma explícita de valorar el nivel de confianza en una conclusión específica. Con la expansión reciente de la teoría de la coalescencia, la filogeografía estadística representa un cambio de la interpretación tradicional *a posteriori* de patrones, hacia poner a prueba hipótesis basadas en modelos que son definidos *a priori*, lo cual presenta nuevos desafíos (Knowles 2004). La aleatoriedad inherente a los procesos de coalescencia descritos, especialmente para poblaciones/especies recientemente divergentes, tiene consecuencias significativas para poner a prueba hipótesis históricas y es uno de los aspectos metodológicos más desafiantes para la filogeografía estadística (Nielsen y Beaumont 2009).

*Liolaemus* es un género de lagartijas muy diversificado en América del Sur Austral, del cual se describieron formalmente ~257 especies (Abdala y Quinteros 2014). Actualmente se reconocen dos grandes clados con categoría de subgéneros (*Liolaemus* [sensu stricto] y *Eulaemus*; Schulte et al. 2000). En particular, dentro del clado *Eulaemus*, no existe consenso entre publicaciones que permitan reconocer las relaciones filogenéticas, tanto dentro como entre grandes grupos (Olave et al. 2014 a). Esto puede deberse tanto a representaciones taxonómicas incompletas o la necesidad de incorporar mayor cantidad de datos, en particular, múltiples loci que permitan reconstruir árboles de especies (Knowles 2009). A niveles más inclusivos, muchos de los grupos dentro de *Eulaemus* incluyen complejos de especies que durante mucho tiempo fueron consideradas como especies únicas, en algunos casos con gran distribución geográfica y amplia variación cromática y morfológica. Este es el caso de las especies descritas como *Liolaemus boulengeri* y *Liolaemus rothi*. *Liolaemus boulengeri* (Koslowsky 1898), fue considerada como una especie ampliamente distribuida con algunas variaciones geográficas en morfología y coloración (Cei 1986); su distribución original se extendió a lo largo de casi 1.200 km desde el sur de la provincia de Mendoza hasta el centro de la provincia de Santa Cruz. Durante la última década, algunas de estas poblaciones fueron descritas formalmente como especies nuevas, *L. tehuelche* y *L. inacayali* (Abdala 2003), y *L. senguer* (Abdala 2005), dejando *L. boulengeri* restringido a un área esteparia subcordillerana entre el suroeste de Río Negro y noroeste de Chubut y noreste de Santa Cruz; mientras que una nueva especie, *L. telsen*,

inicialmente considerada miembro del complejo *darwinii* es en realidad parte de este grupo (Abdala 2007).

Por otro lado, *L. rothi* (Koslowsky 1898), también descrita como una única especie ampliamente distribuida, inicialmente como una especie que habita los “territorios de Neuquén” (Koslowsky 1898), y descrita con variaciones geográficas en morfología y coloración. Posteriormente también se reconoció como un complejo de especies cuasi crípticas varias de las cuales se describieron en la última década: *L. sagei* (Etheridge y Christie 2003); *L. loboii* (Abdala 2003); *L. hermannunezi* (Pincheira et al. 2007); *L. tromen* (Abdala et al. 2012); *L. sitesi* (Avila et al. 2013). Entonces, al momento el complejo *rothi* incluye seis especies descritas, y la distribución original de *L. rothi* fue nuevamente modificada al oeste de la provincia de Neuquén extendiéndose hacia el sureste, alcanzando Río Negro y Chubut (Etheridge y Christie 2003). Actualmente se reconoce a *L. rothi* como una especie ovípara, que habita en las estepas (*Stipa* sp., con *Adesmia*, *Baccharis*, *Mulinum*, *Senecio*), en valles, pendientes y plateaus de 700-1800 m, cuya distribución se solapa con la de las especies del complejo *boulengeri* (Etheridge y Christie 2003).

El trabajo de Avila et al. (2006), está basado en secuencias de genes, principalmente mitocondriales, y recupera diferentes poblaciones de *L. boulengeri* y *L. rothi* como claramente parafiléticas, resultado que también fue encontrado por Abdala (2007) utilizando morfología y una secuencia de un gen mitocondrial. En base a otros estudios previos de complejos de *Liolaemus*, es claro que los límites de especies en este género aún no están bien definidos, y que la división incompleta de linajes y la introgresión son explicaciones plausibles para algunos de los diseños observados (Avila et al. 2006; Morando et al. 2004; 2007; Bretiman et al. 2011; Olave et al. 2011; Medina et al. 2013). En este caso, basado en observaciones de morfotipos generales, no hay dudas que con individuos adultos, *L. rothi* y las especies relacionadas (complejo *rothi*) son muy diferentes a *L. boulengeri* y a las especies relacionadas (complejo *boulengeri*; Fig. 1); pero estos complejos no se recuperan como monofiléticos utilizando caracteres moleculares (Avila et al. 2006), y tampoco incluyendo morfología (Abdala 2007). El trabajo de Avila et al. (2006) sugiere que los patrones observados pueden ser debidos a introgresión histórica, pero no descartan la posibilidad de contacto secundario entre poblaciones de estas especies.

A partir de estos antecedentes, es evidente que los límites de especie de los complejos *boulengeri* y *rothi*, son muy diferentes que las definiciones nominales y en el contexto de esta diversidad escondida, el diseño de muestreo aún es inadecuado, tanto en términos de localidades, como de individuos y fuentes de evidencia. Estas observaciones, sumadas a las discordancias entre las relaciones filogenéticas propuestas para el subgénero *Eulaemus*, revelan

la importancia de la incorporación de otras especies, representantes de grupos relacionados, para el estudio integral de estos complejos de especies focales.



Figura 1: Fotografías de ejemplares de *L. rothi* (izquierda) y *L. boulengeri* (derecha).

### *Hipótesis*

Las posibles causas de parafilia observada en el árbol del gen mitocondrial de lagartijas del subgénero *Eulaemus*, involucran dos hipótesis (no excluyentes): (i) división de linaje incompleta y/o (ii) introgresión.

### *Objetivos*

1. Proponer una hipótesis filogenética del clado *Eulaemus*, basada en caracteres de secuencias nucleares y mitocondriales, incluyendo representantes de todos los clados incluidos en el mismo, para poder estudiar de manera integral, las posibles causas de los patrones parafiléticos observados con marcadores mitocondriales entre especies/poblaciones de los complejos *boulengeri* y *rothi*.
2. Estudiar la dinámica poblacional de los complejos *boulengeri* y *rothi*, utilizando marcadores moleculares, para poder hipotetizar procesos evolutivos y demográficos que tuvieron un rol en los patrones parafiléticos (mtADN) observados.
3. Si la evidencia indica zonas de contacto e hibridación entre poblaciones de los complejos *boulengeri* y *rothi*, incorporar caracteres morfológicos, para contrastar con los datos moleculares.



**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Córdoba**

## **CAPÍTULO 1: RELACIONES FILOGENÉTICAS DEL SUBGÉNERO EULAEMUS**

---

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas

**MELISA OLAVE**  
**ALUMNA**

**MARIANA MORANDO**  
**DIRECTORA**

# Introducción

En general América del Sur constituye un área biológicamente poco conocida (Beheregaray 2008) y este es el caso particular de las lagartijas del género *Liolaemus*, que es un grupo endémico de la mayor parte templada del continente. Su distribución geográfica involucra regímenes climáticos muy diversos, que van desde el desierto de Atacama (Sur de Perú) hasta los bosques templados de *Nothofagus* en Tierra del Fuego (Ceï 1986; Donoso-Barros 1966; Etheridge 1995; Etheridge y De Queiroz 1988; Lobo 2001). *Liolaemus* incluye aproximadamente 257 especies descritas (Abdala y Quinteros 2014), pero un estudio molecular sugirió que el número de especies de *Liolaemus* podría ser superior a 320 si los científicos continúan incorporando nuevos métodos e investigando regiones poco conocidas (Morando et al. 2003).

Durante los últimos diez años se describieron aproximadamente 65 especies nuevas y en varios trabajos filogeográficos se propusieron 79 especies candidatas (Morando et al. 2003, 2004, 2007; Breitman et al. 2012; Avila et al. 2004; Medina et al. 2013).

*Liolaemus* ha sido foco de muchos estudios filogenéticos, principalmente basados en morfología y ADN mitocondrial (e.g. Schulte et al. 2000; Avila et al. 2004; Espinoza et al. 2004; Morando 2004; Cruz et al. 2005; Lobo 2005; Abdala 2007), y en algunos casos también se utilizaron algunos marcadores nucleares, aunque los muestreos taxonómicos fueron muy limitados (e.g. Morando et al. 2004; Avila et al. 2006; Breitman et al. 2011; Fontanella et al. 2012). Un gran aporte fue dado por Camargo et al. (2012) publicaron una filogenia multilocus de un grupo de *Liolaemus* (grupo *darwinii*) basada en 20 marcadores (18 nucleares) para 16 de las 18 especies reconocidas en este grupo, representando en ese momento la filogenia inferida con la mayor cantidad de datos moleculares disponibles.

Si bien existe un consenso general para reconocer dos subgéneros dentro de *Liolaemus* (*Liolaemus* [*sensu stricto*] y *Eulaemus*), se han publicado resultados muy diferentes para explicar las relaciones entre los grupos dentro de cada subgénero. Para el caso particular del subgénero *Eulaemus* (144 especies descritas hasta Enero 2013), la mayoría de los estudios publicados concuerdan en reconocer dos grandes grupos dentro de este subgénero: la sección *L. lineomaculatus* (Schulte et al. 2000; 21 especies) y la sección *L. montanus* (Schulte et al. 2000; 124 especies) (e.g. Schulte et al. 2000; Morando et al. 2004; Avila et al. 2006; Abdala 2007; Fontanella et al. 2012; Pyron et al. 2013). Sin embargo, no existe consenso en las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos reconocidos en la sección *L. montanus* (resumido en la Figura 1): serie *anomalus* (Abdala 2007; siete especies), grupo *darwinii* (Etheridge 1993; 20

especies), grupo *montanus* (Etheridge 1995; 59 especies), grupo *wiegmannii* (Etheridge 1995; 12 especies); y la serie *melanops* que incluye los complejos *boulengeri* (Avila et al. 2006; cinco especies) y *rothi* (Avila et al. 2006; seis especies), y los grupos *donosobarrosi* (Avila et al. 2006; cinco especies) y *fitzingerii* (Avila et al. 2006; nueve especies).

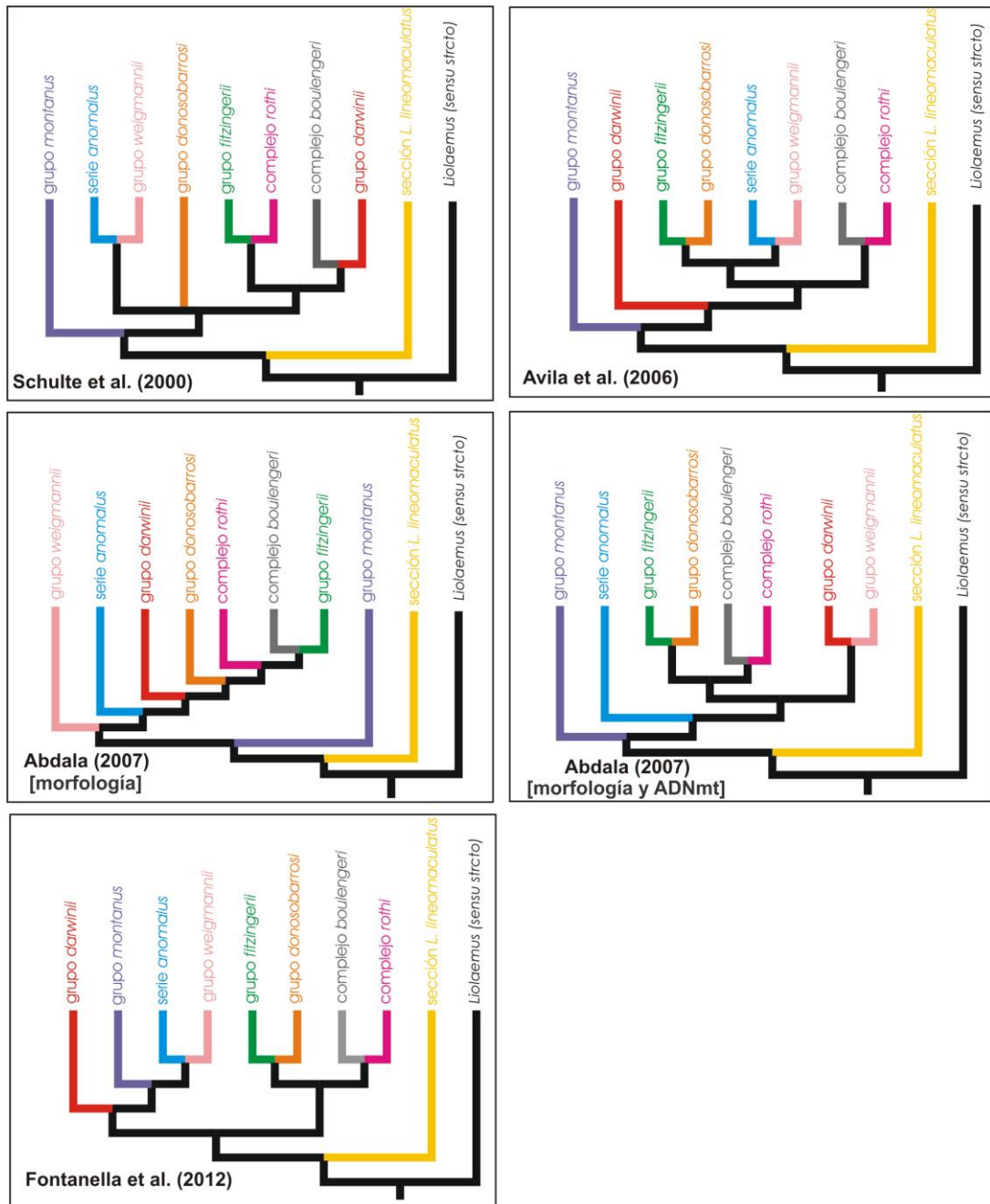


Figura 1: Ejemplos más recientes de relaciones filogenéticas propuestas entre los grandes grupos reconocidos dentro del subgénero *Eulaemus*.

La mayoría de los estudios sistemáticos realizados en *Eulaemus* fueron basados en un solo locus mitocondrial (ADNmt) o en concatenar múltiples loci (e.g. Schulte et al. 2000; Morando et al. 2004; 2008; Cruz et al. 2005; Avila et al. 2006; Fontanella et al. 2012; Pyron et al. 2013). Al concatenar loci de herencia independiente, solo se estima un árbol y se asume que



todos los genes deben reconstruir el mismo árbol (Maddison 1997). Sin embargo, se sabe que cada árbol de gen puede representar una historia evolutiva independiente y diferente de otros genes y del árbol de las especies. Nuevos métodos desarrollados recientemente, permiten estimar “árboles de especies” al tener en cuenta la segregación estocástica de múltiples loci independientes (Knowles 2009; Knowles y Kubatko 2010). Esto permite utilizar información relevante y consecuentemente, los métodos de inferencia de árboles de especies son más precisos en escenarios más desafiantes respecto del análisis tradicional de matrices concatenadas (Leaché y Ranala 2011).

En este capítulo, se presentan nuevas hipótesis de relaciones filogenéticas para el subgénero *Eulaemus*, basadas en 188 individuos y 14 loci representando diferentes partes del genoma (ADNmt, loci anónimos nucleares [ANL] y loci nucleares codificantes para proteínas [NPCL]), usando dos métodos de inferencia de árboles de especies: \*BEAST (Drummond y Rambaut 2007) y MDC (Than y Nakhleh 2009). También se comparan estos resultados con los obtenidos con una matriz concatenada tradicional. Se incluyen representantes de todos los grandes grupos reconocidos: muestreo completo de la sección *L. lineomaculatus* (21 especies) y la serie *melanops* (26 especies), y representantes de la serie *anomalous* (3 de 7 especies), *wiegmannii* (7 de 12 especies), *darwinii* (7 de 20 especies), y el grupo *montanus* (7 de 59 especies). Las matrices utilizadas representan el conjunto de datos moleculares más grande utilizado hasta el momento para estudiar las relaciones filogenéticas del subgénero *Eulaemus*.

## Materiales y métodos

### *Trabajo de campo*

Se incluyeron un total de 186 terminales del subgénero *Eulaemus* y dos de *Liolaemus* (como grupo externo para enraizar los árboles), principalmente muestreados en Argentina, con un pequeño número de Chile y Brasil (Fig. 2).

Los especímenes fueron colectados a mano o con el uso de horquetas, sacrificados con inyección pericárdica de tiopental sódico Abbot®/Pentovet®, diseccionados para extraer muestras de hígado o músculo para el estudio molecular, fijados con 10-20% de formaldehído, y posteriormente transferidos a etanol al 70%. Las muestras de tejidos están conservadas en freezer con 96% de etanol. Los Especímenes voucher se encuentran depositados en la colección herpetológica LJAMM-CNP del Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Argentina (CENPAT-CONICET, <http://www.cenpat.edu.ar/nuevo/colecciones03.html>), y en el museo Bean Life Science,

Brigham Young University (BYU;  
<http://mlbean.byu.edu/ResearchCollections/Collections/ReptilesandAmphibians.aspx>)

(Apéndice A).

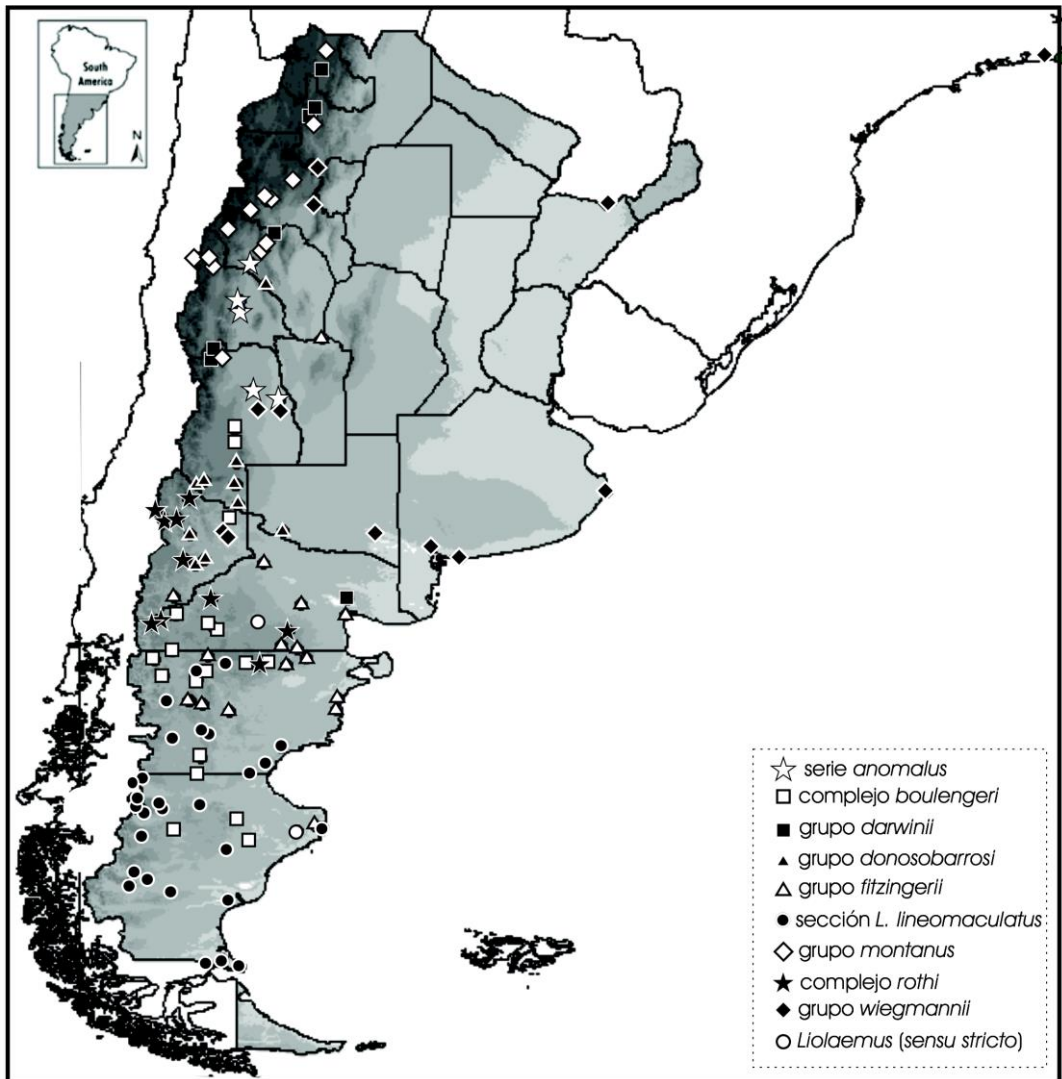


Figura 2: Mapa de los puntos de colecta de los individuos utilizados en los análisis.

### Trabajo de laboratorio

Se secuenciaron dos genes mitocondriales, cuatro loci anónimos nucleares (ANL) y ocho loci codificantes para proteínas (NPCL), un total de 14 genes (8,808 pb; Tabla 1). Las secuencias están depositadas en GenBank (Número de acceso KF966660-KF969205). El material genómico fue extraído usando Qiagen® DNeasy® 96 Tissue Kit siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Para reacciones de PCR se implementó el protocolo de Morando et al. (2003, 2004) para genes mitocondriales (citb [~800 bp] y 12S [~818 bp]), Camargo et al. (2012) para los cuatro ANL (A1D [~776 bp], A12D [~802 bp], A4B [~495 bp] y A9C [~758 bp]), y para los ocho NPCL (EXPH5 [~901 bp], KIF24 [~535 bp], MXRA5 [~848 bp], [Portik et al. 2012],

DNAH3 [~535 bp], PRLR [~501 bp], PNN [~902 bp], SNCAIP [~467 bp] [Townsend et al. 2008], CMOS [~530 bp] [Wiens et al. 1999]).

Los genes nucleares fueron amplificados usando ciclos de PCR descritos por Noonan y Yoder (2009), con reacciones de condiciones estándares (por muestra: 2 µl dNTPs (1.25 mM), 2 µl 5x Taq buffer, 1 µl cada cebador (10 µM), 1 µl MgCl (25 mM), y 0.1 µl Taq DNA polimerasa (5 U/µl; Promega Corp., Madison, WI); 14 ml volumen total de la reacción). Las secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher v4.8. (™Gene Codes Corporation Inc. 2007) y alineadas usando el programa MAFFT (Kato et al. 2002). Los genes codificantes de proteínas fueron traducidos a aminoácidos para corroborar que no existan errores de codones. Para el caso del gen *cit-b* no se consideró la 3ra posición del codón, dado que se encontraba saturada. Para cada gen se seleccionaron los modelos de evolución más adecuados utilizando el programa JModeltest v0.1.1 (Posada 2008), usando el criterio de Akaike corregido (AICc). Para los genes nucleares se descartó recombinación, usando el programa RDP (Martin y Rybicki 2000; Heath et al. 2006).

#### *Análisis filogenéticos*

*Diseño de estudio.* Se incluyeron dos especies de *Liolaemus* (*sensu stricto*) como grupos externos: *L. petrophilus* y *L. bibronii*. Para la inferencia del árbol basado en genes concatenados (188 terminales, 14 loci) se utilizó el programa MrBayes v3.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para ello se corrieron dos análisis independientes de  $10 \times 10^6$  generaciones de MCMC y cuatro cadenas por análisis, muestreando la estimación de los parámetros cada 1.000 generaciones (*burnin* 25%). Además se utilizaron dos métodos novedosos de inferencia de árboles de especies: el método “*Minimizing Deep Coalescence*” (MDC) con el algoritmo *dynamic programming* (DP) implementado en el paquete Phylonet (Than y Nakhleh 2009) y el programa \*BEAST 1.6.2 (Heled y Drummond 2010). El enfoque MDC toma árboles de genes previamente inferidos y estima el árbol de especies más parsimonioso, al minimizar el costo de coalescencias profundas de los árboles de genes dentro de los posibles árboles de especies. El algoritmo incorporado en Phylonet es rápido y fácil de utilizar, especialmente con matrices de grandes dimensiones, como es este el caso. Por otro lado, \*BEAST es un método Bayesiano que toma secuencias de ADN para inferir árboles de genes individuales, y a partir de estos, el árbol de especie. Se espera que su resultado sea más preciso que el de MDC (Leaché y Rannala 2011), aunque \*BEAST conlleva una demanda computacional muy alta. Posiblemente por este motivo, no fue posible obtener convergencia en el análisis utilizando la matriz completa (188 terminales, 14 loci; ver sección de “*Árboles de especies y el desafío de la filogenia de*

*Eulaemus*” en la Discusión). Por lo tanto, sólo se presenta el resultado de la matriz completa usando el enfoque de MDC, así como también utilizando una matriz concatenada tradicional.

Se desarrolló un diseño de estudio de las relaciones filogenéticas (resumido en la Tabla 1), para el cual se seleccionaron dos especies representantes (incluyendo dos individuos por especie) de los grandes grupos recuperados consistentemente en el análisis de MDC y de matriz concatenada. La reducción de la matriz, permitió a \*BEAST estimar un árbol de especies con el objetivo de estudiar las relaciones entre los grandes grupos. Posteriormente se particionó la matriz completa (Tabla 2), en análisis por separado de las siguientes particiones: 1- sección *L. lineomaculatus*, 2- sección *L. montanus* (conformada por: la serie *anomalus*, los grupos *wiegmannii*, *montanus*, *darwinii* y dos representantes de la serie *melanops*), y 3-serie *melanops* (compuesta por: los complejos *boulengeri* y *rothi*, los grupos *fitzingerii* y *donosobarrosi* y un representante de *L. wiegmannii*). Al incluir dos especies de la serie *melanops* en el análisis de la sección *L. montanus*, se contemplan todos los linajes descendientes, minimizando el impacto en la estimación del árbol de especies. Para el caso del análisis de la serie *melanops* se debieron realizar numerosos análisis independientes hasta obtener convergencia y buenos niveles de ESS. Como estrategia para conseguirlo, se subdividieron *a priori* representantes de las especies *L. rothi*, *L. loboii*, *L. tehuelche* y *L. boulengeri*, siendo que puede aliviarse el impacto de discordancia de árboles de genes intraespecie. Notese que el impacto de subdivisión intraespecífica en la reconstrucción topológica de \*BEAST es baja (Olave et al. 2014 b). Las especies que fueron seleccionadas para representar los grandes grupos son las siguientes: sección *L. lineomaculatus* = *Liolaemus magellanicus*, *L. baguali*; (2) grupo *wiegmannii* = *L. multimaculatus*, *L. wiegmannii*; (3) grupo *darwinii* = *L. ornatus*, *L. grosseorum*; (4) serie *anomalus* = *L. lentus*, *L. pseudoanomalus*; (5) grupo *montanus* = *L. andinus*, *L. famatinae*; (6) complejo *rothi* = *L. rothi*, *L. sagei*; (7) complejo *boulengeri* = *L. boulengeri*, *L. senguer*; (8) grupo *fitzingerii* = *L. canqueli*, *L. melanops*; (9) grupo *donosobarrosi* = *L. puelche*, *L. donosobarrosi*; y como grupo externo = *L. petrophilus*, *L. bibronii*.

Se utilizó \*BEAST v1.6.2 para cada una de estas particiones, y se corrieron  $500 \times 10^6$  generaciones de MCMC y se muestreo la estimación de los parámetros cada 50.000 generaciones (*burnin* 10%). La convergencia se diagnosticó por observación de valores de ESS mayores a 200.

*Árboles de genes.* Se realizaron inferencias Bayesianas con cuatro análisis independientes y dos cadenas por análisis, por  $10 \times 10^6$  generaciones de MCMC y el muestreo para la estimación de los parámetros fue cada 1.000 generaciones (*burnin* 25%). Estos árboles de genes fueron usados como *input* para el análisis de MDC.

Para cuantificar la discordancia de árboles de genes, se calcularon las distancias entre árboles de genes usando los métodos de Penny y Hendy (1985) y Kuhner y Felsenstein (1994), implementados en la función `dist.topo` de la librería “ape” de R. El primer método estima las distancias topológicas estrictas, y el segundo incluye el largo de ramas. También se utilizó el paquete Phylonet para calcular el costo de coalescencias profundas observados entre cada árbol de gen y el árbol de especies estimado, utilizando la matriz completa. Para los tres métodos implementados, valores iguales a cero indican perfecta congruencia entre árboles y valores mayores indican aumento de incongruencia.

*Filogenia de la sección L. lineomaculatus.* Se analizó en \*BEAST una matriz de 8,715 bp, incluyendo 52 individuos y 13 genes (se excluyó el locus MXRA5, por presentar un porcentaje alto de entradas faltantes [ $> 25\%$ ]). Se incluyeron especies candidatas que fueron previamente incluidas en Breitman et al. (2011). Se respetó la numeración, nombrándolas con un “B” al inicio (por ejemplo, en referencia a *L. sp. 4* en Breitman et al [2011], se nombró *L. sp. B4*). Se incluyeron dos individuos por especie en la mayoría de los casos.

*Filogenia de la sección L. montanus.* Se analizó en \*BEAST una matriz incluyendo representantes de la serie *anomalus*, los grupos *darwinii*, *wiegmannii* y *montanus* como grupos focales y *L. rothi* representando la serie *melanops* (14 loci, 57 individuos; 9,436 bp). Se dividió el complejo *wiegmannii* en *L. wiegmannii (sensu stricto)* y *L. wiegmannii “1 a 3”*, siguiendo a Avila et al. (2009), y se incorporó una nueva especie candidata: *L. wiegmannii 4*. Se incluyeron dos y tres individuos por especie en la mayoría de los casos.

*Filogenia de la serie melanops.* Se analizó en \*BEAST una matriz incluyendo los complejos *rothi* y *boulengeri* y los grupos *donosobarrosi* y *fitzingerii* como grupos focales, y tres individuos de la especie *L. wiegmannii* como grupos externos. Se utilizó una matriz de 82 terminales y 14 loci (9,260 bp). Se incluyeron dos y tres individuos por especie en la mayoría de los casos.

#### *Estimación de tiempos de divergencia*

Se estimaron los tiempos de divergencia de los grandes grupos de *Eulaemus* utilizando la matriz parcial (40 taxa, 14 loci). Siguiendo a Breitman et al. (2011) y Fontanella et al. (2012), se calibró usando un fósil de *Liolaemus* (Albino 2008), datado en 20 millones de años y siguiendo la recomendación de Ho (2007) se utilizó una distribución normal con desvío estándar de 0.13. Este fósil se ubicó en la divergencia de ambos subgéneros (*Eulaemus* y *Liolaemus [sensu stricto]*). Este análisis también devuelve la estimación de las tasas de mutaciones para cada gen.

# Resultados y discusión

*Filogenia de Eulaemus.* El resultado de MDC utilizando la matriz completa (188 terminales, 14 loci) se ilustra en las Figuras 2 (sección *L. lineomaculatus*) y 3 (sección *L. montanus*). Cabe destacar que el gran árbol representado en las Figuras 2 y 3 se dividió por cuestiones prácticas, pero ambas corresponden a un único árbol resultante del análisis con MDC. En la Figura 5 A se ilustra el resultado del análisis con la matriz concatenada y una representación del resultado de MDC en presenta en la Figura 5 B.

En ambos análisis se recuperaron los grandes clados reconocidos dentro el subgénero: la serie *anomalus*, el complejo *boulengeri*, el grupo *darwinnii*, el grupo *donosobarrosii*, el grupo *fitzingerii*, la sección *L. lineomaculatus*, el grupo *montanus*, el complejo *rothi*, y el grupo *wiegmannii*. Sin embargo, existen discordancias entre las relaciones filogenéticas de estos grandes clados en ambos análisis; en particular dentro de la sección *L. montanus*, siendo que la sección *L. lineomaculatus* se recuperó como hermana de éste en ambos análisis. Dentro del grupo *montanus*, se recuperaron (grupo *montanus* + (serie *anomalus* + grupo *wiegmannii*)) y este clado hermano a (grupo *darwinnii* + (complejo *rothi*, complejo *boulengeri* + (grupo *donosobarrosii* + grupo *fitzingerii*))). Casi todas las relaciones entre grandes grupos están estadísticamente altamente soportadas (PP = 1), con excepción de los complejos *boulengeri* y *rothi* (PP = 0,77).

Por otro lado, en el resultado de MDC (Fig. 5 B) la serie *anomalus* se recuperó como hermana al grupo *wiegmannii*, y este clado como hermano de ((grupo *donosobarrosii* + grupo *fitzingerii*) + ((grupo *darwinnii* + complejo *rothi*) + (grupo *montanus* + complejo *boulengeri*))).

La Figura 5 C muestra los resultados del análisis de \*BEAST utilizando la matriz reducida de representantes de los grupos principales (dos especies por gran grupo, dos individuos por especie; 40 terminales y 14 loci). En este análisis, también se recuperaron como monofiléticos los grandes grupos, con buen soporte estadístico (PP = 1), con excepción del complejo *boulengeri* y el grupo *donosobarrosii*. Concordante a los resultados mencionados anteriormente, la sección *L. lineomaculatus* se recuperó como hermana de la serie *montanus* (PP = 1). Sin embargo, se observan discordancias entre las relaciones inferidas entre los grupos principales con respecto a los resultados de MDC y la matriz concatenada. Dentro de la sección *L. montanus*, se recuperó la serie *melanops* (complejo *rothi* + complejo *boulengeri* + grupo *fitzingerii* + grupo *donosobarrosii* group), pero las relaciones entre estos clados no están resueltas (PP < 0,47). Además las relaciones entre la serie *anomalus*, los grupos *wiegmannii*, *darwinnii*, y *montanus* no están resueltas, dados los bajos soporte de las probabilidades posteriores (PP < 0,75).

Matriz	Largo total	n	ADNmt			ANL				NPCL						
			citb	12s	A1D	A4B	A9C	A12D	CMOS	DNAH3	EXPH5	KIF24	MXRA5	PNN	PRLR	SNCAIP
Subgénero <i>Eulaemus</i>	8,808 bp	188	528 bp s. s. 285	810 bp s. s. 302	749 bp s. s. 202	759 bp s. s. 117	411 bp s. s. 97	411 bp s. s. 205	481 bp s. s. 68	639 bp s. s. 64	811 bp s. s. 165	470 bp s. s. 126	827 bp s. s. 110	887 bp s. s. 109	431 bp s. s. 100	417 bp s. s. 65
Sección <i>L. lineomaculatus</i>	8,715 bp	52	GTR+I+G	SYM+G	HKY+G	K80+G	K80+G	HKY+G	HKY+I+G	HKY+I+G	HKY+G	K80+G	HKY+G	HKY+I+G	JC	JC+G
Sección <i>L. montanus</i>	9,436 bp	57	791 bp GTR+I+G	870 bp GTR+I+G	761 bp HKY+G	515 bp HKY+I	725 bp HKY+I	673 bp HKY+G	481 bp HKY+I	740 bp HKY+I	817 bp HKY+G	491 bp HKY+G	-	904 bp HKY+I	453 bp HKY+G	494 bp HKY+I
Serie <i>melanops</i>	9,260 bp	82	710 bp HKY+I+G	806 bp GTR+G	768 bp HKY+G	422 bp HKY+I	757 bp HKY+G	743 bp GTR+G	522 bp HKY+I	696 bp HKY+I	836 bp HKY+G	497 bp HKY+I+G	847 bp HKY+G	900 bp HKY+I+G	468 bp HKY+I	463 bp HKY+G
			805 bp GTR+G	805 bp HKY+I+G	770 bp HKY+G	417 bp HKY+G	742 bp K80+I+G	636 bp GTR+G	505 bp HKY+I	641 bp GTR+I	850 bp HKY+G	496 bp HKY+I+G	835 bp HKY+I	893 bp HKY+I	443 bp HKY+G	421 bp K80+G

Tabla 1: Resumen de las matrices utilizadas en el diseño de estudio. Se detallan los modelos de evolución molecular seleccionados según el criterio de AICc. Para la matriz completa del subgénero *Eulaemus* se detalla el número de sitios segregantes (s.s.).

Matriz	Dimensiones	Análisis realizado
Subgénero <i>Eulaemus</i>	N = 188; 14 loci	MDC, concatenado
Sección <i>L. lineomaculatus</i>	N = 52; 13 loci	*BEAST
Sección <i>L. montanus</i>	N = 61; 14 loci	*BEAST
Serie <i>melanops</i>	N= 82; 14 loci	*BEAST

Tabla 2: Diseño de estudio. Se particionaron las matrices para realizar análisis independientes en el programa \*BEAST: la sección *L. lineomaculatus*, la sección *L. montanus* (conformada por: la serie *anomalus*, los grupos *wiegmannii*, *montanus*, *darwinii* y la serie *melanops*), y la serie *melanops* (conformada por: los complejos *boulengeri* y *rothi*, y los grupos *fitzingerii* y *donosobarrosi*).

El costo de coalescencias profundas se presenta en la Tabla 3, y las distancias calculadas para los árboles de genes en la Tabla 4. Se observa un alto grado de discordancia, con valores muy lejanos a cero.

Los resultados de la estimación de los tiempos de divergencia se muestran en la Figura 5 C y las tasas de mutación de los genes en la Tabla 5. Se estimó la divergencia de ambos subgéneros (*Eulaemus* y *Liolaemus* [*sensu stricto*]) en 19,63 ma (11,63-19,33). El grupo *wiegmannii* divergió hace 10,14 ma (7,13-13,3) y posteriormente se observan internodos muy cortos (cortos tiempos de especiación) para el resto de los grupos. Por ejemplo en menos de un millón de años, la serie *anomalus* y el grupo *darwinii* divergieron en menos de 0,5 ma (9,43 ma [6,73-12,49] a 8,99 ma [5,4-10,57]). Este resultado indica un corto tiempo de divergencia entre la mayoría de los grupos principales de *Eulaemus*. Cuando los tiempos de divergencia son cortos (Tablas 3 y 4), se espera un alto grado de discordancia entre los árboles de genes (ver sección *Árboles de especies y el desafío de la filogenia de Eulaemus*).

Locus	Coalescencias profundas
12S	123
CMOS	122
DNA	242
H3	
EXPH	197
5	
KIF24	243
A12D	340
A1D	228
A4B	242
A9C	139
MXR	125
A5	
PNN	117
PRLR	164
SNCA	122
IP	
cit-b	201

Tabla 3: Costo de coalescencias profundas entre los árboles de genes y el árbol estimado por MDC utilizando la matriz completa de 188 taxa y 14 loci.



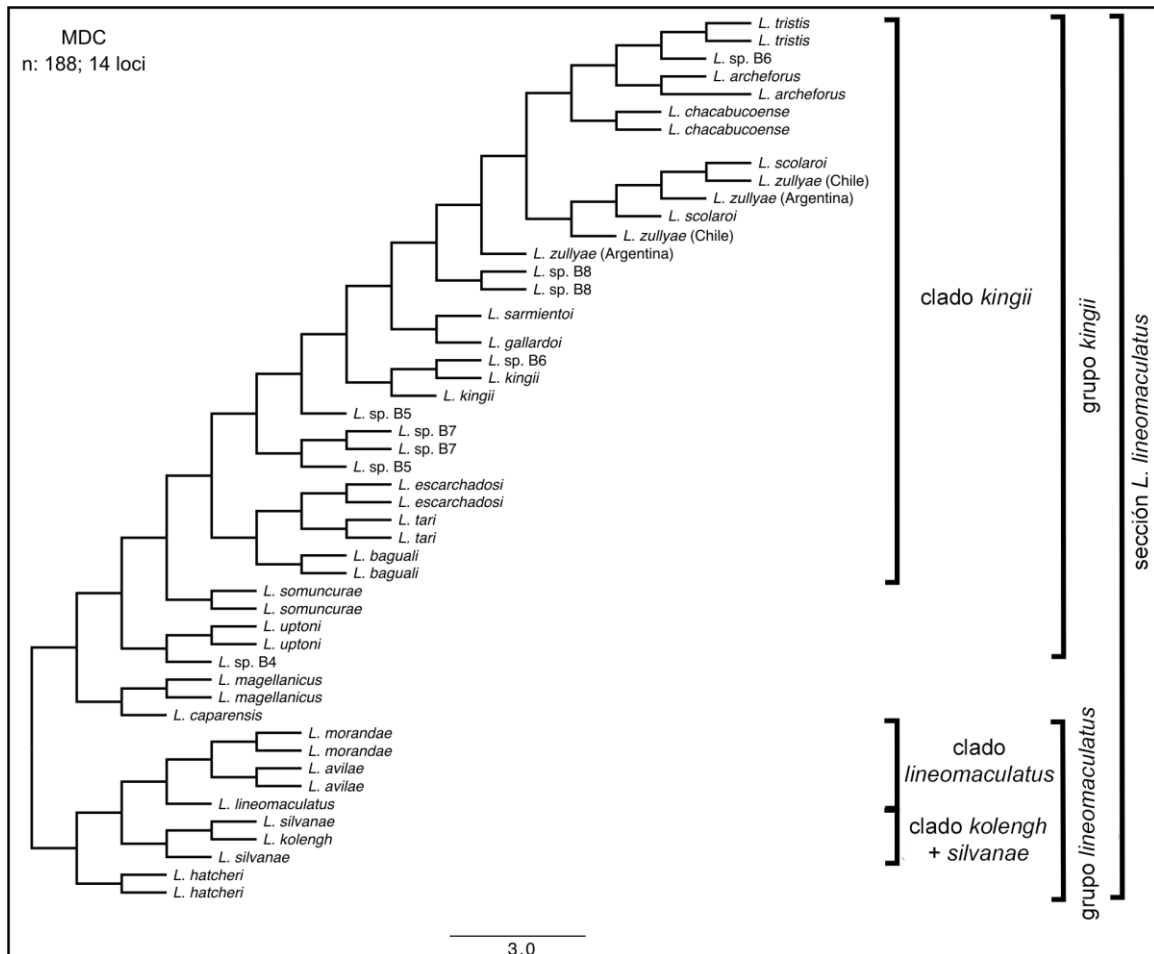


Figura 3: Resultado de MDC utilizando la matriz completa de 14 loci y 188 terminales. En esta figura se ilustra ampliada la sección *L. lineomacultus*.

locus	12S	CMOS	DNAH3	EXPH5	KIF24	A12D	A1D	A4B	A9C	MXRA5	PNN	PRLR	SNCAIP	cit-b
12S	-	157	161	179	173	176	173	178	173	167	160	161	160	166
CMOS	23.659	-	46	90	76	83	70	73	70	62	63	66	55	153
DNAH3	28.316	16.909	-	90	78	85	72	71	66	60	65	64	51	149
EXPH5	24.796	14.637	21.869	-	110	119	110	117	108	94	93	96	91	175
KIF24	26.391	17.642	24.252	21.838	-	109	96	97	94	84	85	90	83	161
A12D	27.654	16.906	23.741	21.799	23.857	-	97	108	95	93	96	97	94	170
A1D	27.586	16.725	23.471	21.738	23.579	22.098	-	93	86	82	89	84	79	159
A4B	25.354	11.512	20.239	18.571	20.341	19.985	19.416	-	91	83	88	85	76	168
A9C	26.027	12.952	21.056	19.308	21.483	20.046	19.578	1.702	-	74	79	86	73	161
MXRA5	26.005	11.639	20.572	1.782	18.186	20.262	20.016	16.232	17.075	-	73	78	63	151
PNN	22.236	15.511	22.825	18.739	20.413	22.335	22.433	19.067	19.474	18.438	-	73	64	154
PRLR	24.897	14.464	22.036	18.724	21.958	2.105	21.363	17.734	19.286	18.583	19.141	-	63	155
SNCAIP	22.925	12.447	20.699	17.462	2.122	2.102	20.679	1.676	17.819	16.827	1.658	1.781	-	154
cit-b	22.264	14.419	22.035	19.684	20.407	21.243	21.175	17.927	18.582	17.898	19.304	19.336	18.862	-

Tabla 4: Distancias calculadas entre árboles de genes, usando Penny y Hendy (1985; celdas blancas) y Kuhner y Felsenstein (1994; celdas grises).

Locus	Tasa de mutación (s/ma)
cit-b	0.019355 ( $\pm 0.000034639$ ) HPD: 0.013099 – 0.0263359
12S	0.006339 ( $\pm 0.0000095782$ ) HPD: 0.0042601 – 0.0084861
CMOS	0.000879215 ( $\pm 0.0000025418$ ) HPD: 0.00052709 – 0.0012697
DNAH3	0.00076162 ( $\pm 0.0000023663$ ) HPD: 0.0004473 – 0.0010827
EXPH5	0.0012955 ( $\pm 0.000002806$ ) HPD: 0.00085449 – 0.0017507
KIF24	0.0019021 ( $\pm 0.0000035705$ ) HPD: 0.0012063 – 0.0025878
A12D	0.0026373 ( $\pm 0.0000061488$ ) HPD: 0.0015289 – 0.0038698
A1D	0.001765 ( $\pm 0.00000377775$ ) HPD: 0.0010673 – 0.0025142
A4B	0.0035965 ( $\pm 0.000012311$ ) HPD: 0.001806 – 0.0059404
A9C	0.0017753 ( $\pm 0.0000032789$ ) HPD: 0.001967 – 0.0024185
MXRA5	0.00077525 ( $\pm 0.0000023498$ ) HPD: 0.000488 – 0.0010812
PNN	0.00081714 ( $\pm 0.000002345$ ) HPD: 0.00052669 – 0.001122
PRLR	0.00132228 ( $\pm 2.9225 \times 10^{-6}$ ) HPD: 0.00085565 – 0.0018254
SNCAIP	0.0010351 ( $\pm 2.6589 \times 10^{-6}$ ) HPD: 0.00063883 – 0.0014966

Tabla 5: Tasas de mutación estimadas para cada locus por millón de años (s/ma). La columna de la derecha muestra la media (arriba a la izquierda), el desvío estandar (arriba a la derecha) y la probabilidad de máxima densidad (*highest probability density*, HPD) del 95%.

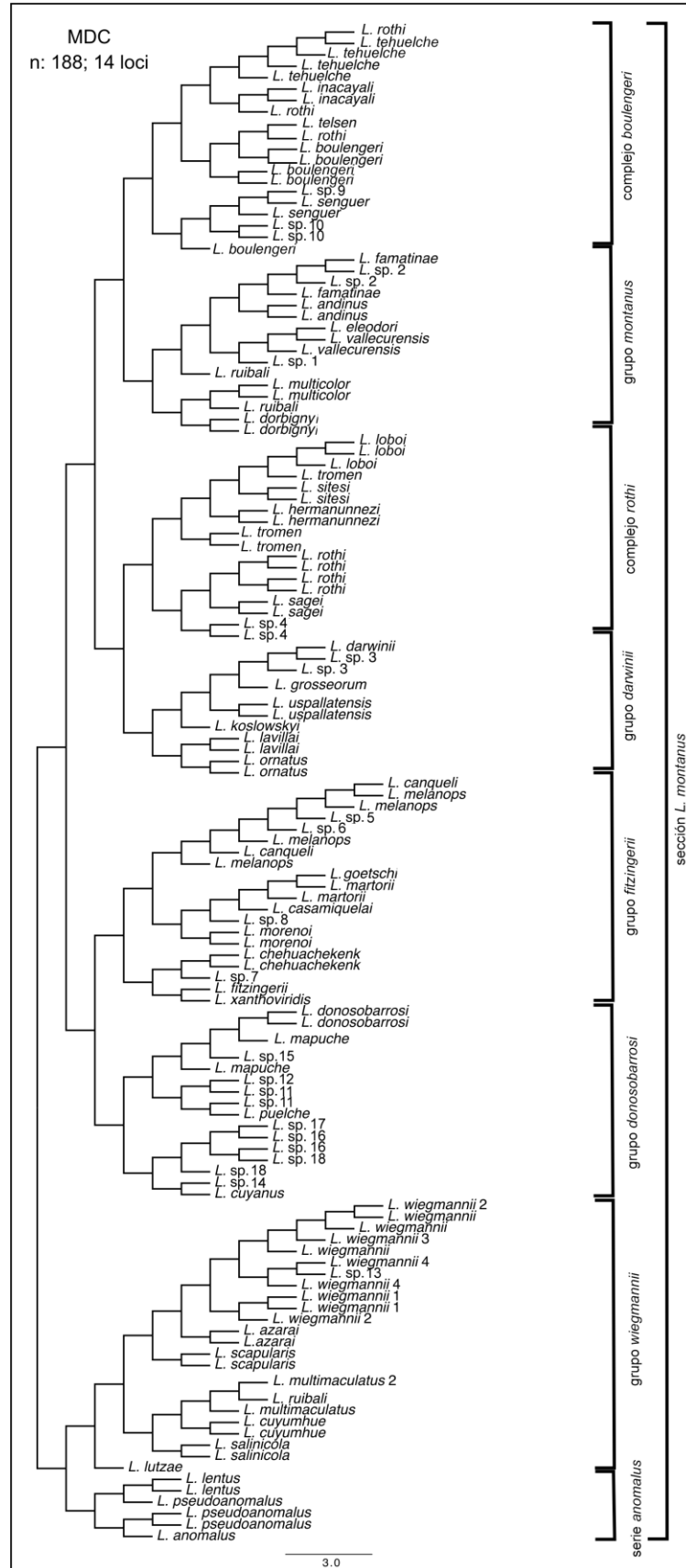


Figura 4: Resultado de MDC utilizando la matriz completa de 14 loci y 188 terminales. En esta figura se ilustra ampliada la sección *L. montanus*.

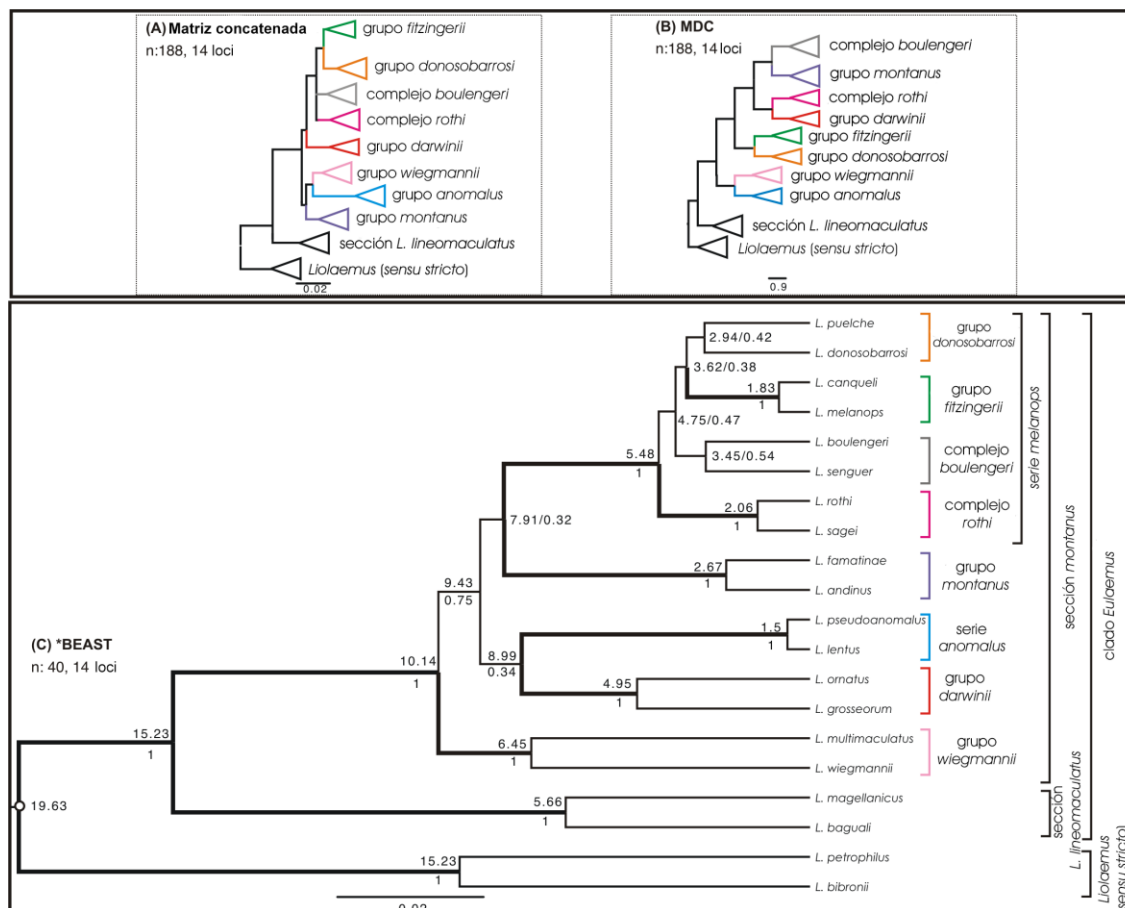


Figura 5: Resultados obtenidos con (A) la matriz completa concatenada en MrBayes; (B) el resultado de MDC representado esquemáticamente (tomado de las Figuras 3 y 4); (C) el resultado dado por \*BEAST utilizando la matriz reducida de dos especies por cada gran grupo. En esta última se representan los soportes de los nodos debajo y arriba el tiempo de divergencia estimado.

*Filogenia de la sección L. lineomaculatus.* La sección *L. lineomaculatus* es el grupo dentro de *Eulaemus* con distribución más austral, alcanzado Tierra del Fuego (Fig. 2). Las especies de la sección *L. lineomaculatus* se distribuyen a través de paisajes extremadamente heterogéneos con temperaturas anuales oscilando entre los  $-20^{\circ}\text{C}$  a más de  $40^{\circ}\text{C}$ . Durante su evolución el clado experimentó un pasado geológico complejo, incluyendo el levantamiento de los Andes, vulcanismo, introgresiones marinas y múltiples ciclos glaciares (Breitman et al. 2011).

El resultado de la inferencia de \*BEAST se muestra en la Figura 6. Para nombrar las especies candidatas, se siguió la numeración de Breitman et al. (2011) asignando una “B” delante del número correspondiente. Se nombraron los clados estadísticamente altamente soportados, incluyendo: los clados *zullyae* (PP = 0,97) y *sarmientoi* (PP = 1), y el grupo *hatcheri* (PP = 0,94). Se recuperaron los tres grandes clados previamente reconocidos con evidencia tanto molecular como morfológica (Breitman et al. 2011; 2013): los grupos *kingii* (Ce 1986), *lineomaculatus* (Etheridge 1995) y *magellanicus* (Breitman et al. 2011), mientras que el grupo *lineomaculatus* se recuperó con soporte estadístico bajo (PP = 0,78). El estudio filogenético de Breitman et al (2011) se basó en siete loci nucleares y dos mitocondriales, incluyendo un individuo por especie. Se utilizó el método de inferencia de árboles de especie del programa

BEST, así como también una matriz concatenada tradicional. Con este último análisis se recuperaron soportes altos en la mayoría de las relaciones inferidas, pero con soporte mucho menor en el caso de BEST. Siguiendo a Brito y Edwards (2009), Breitman et al. (2011) sugirió que el agregar más loci, individuos o pares de bases (Knowles 2009) podría mejorar el soporte de los nodos en la inferencia de árboles de especies (ver también Camargo et al. 2012). En este trabajo, se amplió la matriz de Breitman et al. (2011), incluyendo el doble de individuos (dos individuos por especie en la mayoría de los casos) y un número mayor de loci (N = 14). Los resultados demuestran una topología concordante con la propuesta por Breitman et al. (2011), pero con un soporte mayor en gran parte de los nodos. En particular, el análisis de \*BEAST resolvió las relaciones entre los grandes clados *magellanicus*, *lineomaculatus* y *kingii* (comparado con la figura 3 de Breitman et al. 2011). También aquí se recupera el clado *sarmientoi* dentro del clado *kingii*.

Sin embargo, el análisis de MDC recuperó el grupo *magellanicus* como hermano del grupo *kingii*, así como también al clado *sarmientoi* como parafilético. También la especie *L. sp. B4* fue recuperada como taxón hermano de *L. uptoni*, mientras que \*BEAST lo ubica dentro del grupo *kingii*. Esta última discrepancia fue también recuperada por Breitman et al. (2011) entre el análisis concatenado y el de BEST. Ellos hipotetizaron que hibridización e introgresión asimétrica de ADNmt es una explicación para este patrón, dadas las discordancias entre los árboles mitocondriales y nucleares. La parafilia mitocondrial podría indicar hibridación pasada o presente entre especies (Funk y Omland 2003), y esto podría explicar las diferentes topologías observadas entre métodos. Este proceso también fue sugerido (Morando et al. 2004, 2007) y documentado (Olave et al. 2011) en otros grupos de *Liolaemus* (*L. gracilis* y *L. bibronii*), y requiere de estudios paraticulares para arribar a una conclusión.

*Filogenia de la sección L. montanus.* El análisis de \*BEAST recuperó la mayoría de los grandes grupos con buen soporte estadístico (Fig. 7) incluyendo la serie *anomalus* [PP = 1], el grupo *darwinii* [PP = 0,99] y el grupo *montanus* [PP = 0,99]. La excepción es el grupo *wiegmannii*, que se recuperó como parafilético, con una especie de Brasil, *L. lutzae*, como hermana de (grupo *wiegmannii* I + (grupo *wiegmannii* II + grupo *montanus*)). Sin embargo, se recuperó el grupo *wiegmannii* como monofilético en el análisis de MDC (Fig. 4), así como también en el caso de la matriz concatenada (Fig. 5 A). Algunos estudios basados en morfología (Etheridge 1995; 2000; Abdala 2007), ADNmt (Avila et al. 2009; Schulte et al. 2000), morfología + mtDNA (Espinoza et al. 2004), y ADNmt + ADNn (Fontanella et al. 2012; Pyron et al. 2013), también recuperaron al grupo *wiegmannii* como monofilético. Sólo un estudio basado en datos de comportamiento, recuperó al grupo *wiegmannii* como parafilético (Halloy et al. 1998). Dados los resultados de MDC y que la mayoría de los trabajos publicados al momento sostienen la monofilia del grupo *wiegmannii*, se hipotetiza que este es un grupo monofilético. Probablemente el resultado de \*BEAST es un artificio generado por los altos niveles de incongruencia de árboles de genes, o bien un alto número de terminales que complica el análisis (N = 57).

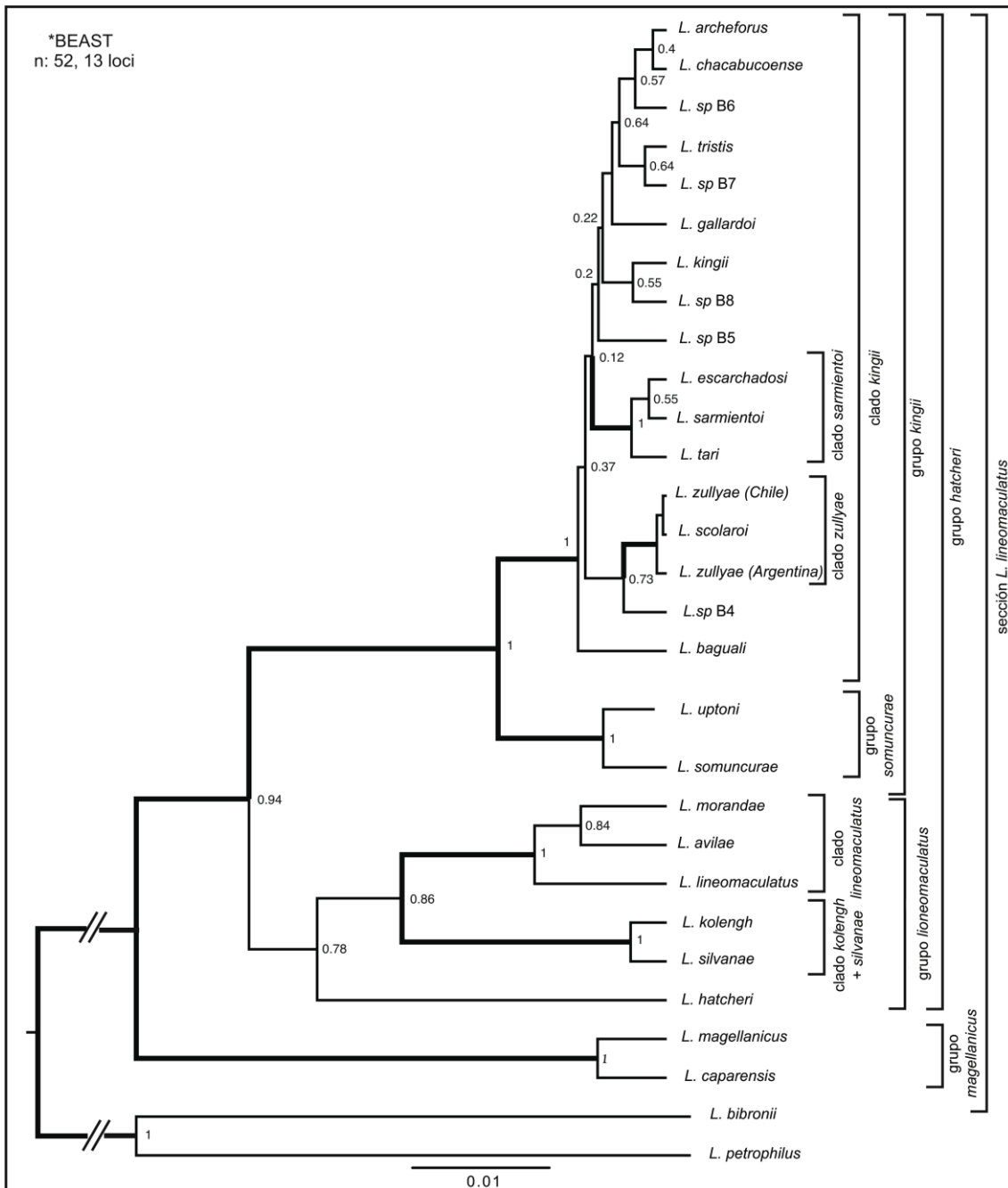


Fig. 6: Resultado de la inferencia realizada por \*BEAST para la sección *L. lineomaculatus*.

El grupo *wiegmanni* incluye 12 especies descritas, todas ellas estrictamente arenícolas, distribuidas en Argentina, desde la Patagonia al norte Argentino (Fig. 2), extendiéndose por las costas de Uruguay y Brasil, acercándose a Río de Janeiro. No existe al momento un estudio filogenético incluyendo todas las especies.

Ambos análisis, \*BEAST y MDC, recuperaron el grupo *montanus* como monofilético (PP = 0,99), en concordancia con estudios previos (Schulte et al. 2000; Espinoza et al. 2004; Avila et al. 2006; Abdala 2007; Fontanella et al. 2012; Pyron et al. 2013). Este grupo incluye 59 especies,

distribuidas desde el centro de Argentina hacia el este de Chile, al norte atravesando Bolivia, hasta alcanzar Perú, siguiendo la línea de los Andes (Quinteros y Abdala 2011). Este grupo incluye especies que llegan a vivir a los 5.176 m sobre el nivel de mar (Aparacio y Ocampo 2010). Similar al grupo *wiegmannii*, no existe al momento un estudio filogenético publicado que incluya más de unas pocas especies del grupo *montanus*. Aquí también se presenta un pequeño número de especies representado el grupo (siete especies descriptas y dos candidatas), por lo que estudios específicos de este grupo son necesarios para evaluar su historia evolutiva.

La serie *anomalus* incluye siete especies descriptas, para las cuales la biología general es desconocida dado que este clado tiene una distribución restringida, de densidades poblacionales aparentemente bajas y coloración muy críptica, lo que las hace difíciles de encontrar en el campo. Estas especies, de distribución centro-este argentino, usualmente viven en ambientes salinos y altas elevaciones caracterizadas por vegetación poco espesa (Abdala 2007). Aquí se recuperó la serie *anomalus* en concordancia con la propuesta de Abdala (2007) y Abdala y Heredia (2013). *Liolaemus lentus* y *L. anomalus* son recuperadas como especies hermanas, y *L. pseudoanomalus* como hermana de estas, en el análisis de \*BEAST; sin embargo, estas relaciones son poco soportadas (PP = 0,49). El resultado de MDC muestra a *L. pseudoanomalus* como parafilético.

El grupo *darwinii* se distribuye en los desiertos áridos de la región del Monte del centro y noreste de Argentina (Fig. 1). Camargo et al. (2012) propusieron una filogenia para este grupo, incluyendo 16 de las 20 especies descriptas y 20 loci, por lo que aquí sólo se incluyeron seis especies representantes del mismo. Se recuperaron dos clados (*L. lavillai* + *L. ornatus*) y (*L. sp. 3* + *L. darwinii*) (Fig. 6; PP = 1 y PP = 0,99 respectivamente), lo cual es concordante con los resultados de Camargo et al. (2012).

No se recuperó buen soporte en la mayoría de los grandes grupos de *Eulaemus* incluidos en esta partición. El resultado de \*BEAST recuperó (*wiegmannii* + *montanus*) con buen soporte (PP = 0,98; Fig. 7), pero esta relación es discordante con el resultado de MDC (Fig. 4). Se recuperó a *L. rothi* (representando la serie *melanops*) como hermano al grupo *darwinii*, y este grupo como hermano a la serie *anomalus*, pero con bajo soporte (PP = 0,4 y 0,78 respectivamente).

*Filogenia de la serie melanops.* La serie *melanops* se recuperó como parafilética en el resultado de MDC. Sin embargo, se recuperó con buen soporte en el análisis de \*BEAST, tanto utilizando la matriz reducida (Fig. 5C) como la matriz completa (Fig. 8). También se recuperó como monofilética en el análisis concatenado tradicional (Fig. 5A).



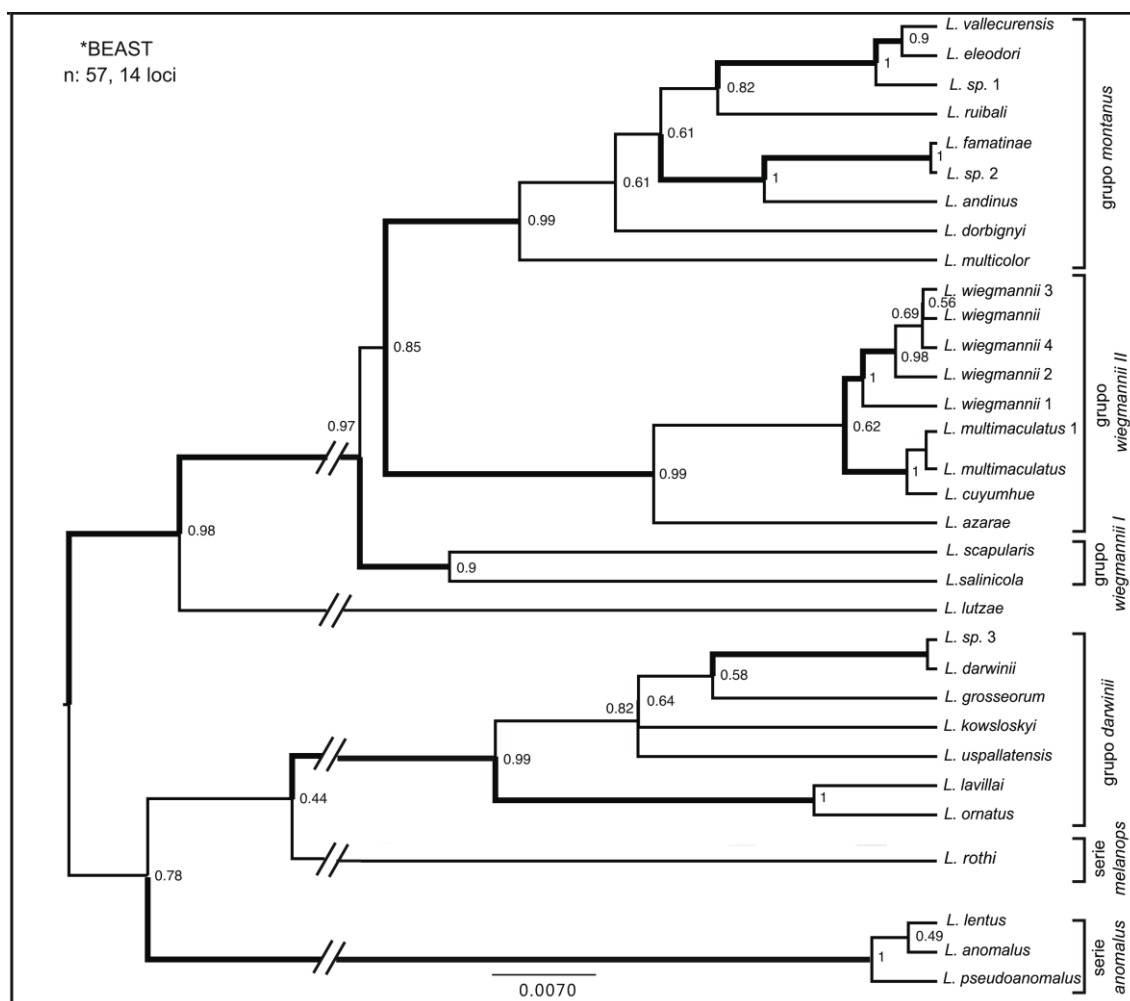


Figura 7: Resultado de la inferencia realizada por \*BEAST para la sección *L. montanus*.

El grupo *donosobarrosi* incluye cinco especies descritas, distribuidas en el noreste de Argentina, mientras que grupo *fitzingerii* incluye nueve especies descritas distribuidas en el norte de la región del Monte, área de la Meseta de Somuncurá, atravesando la típica estepa Patagónica hasta la provincia de Santa Cruz (Fig. 2; Avila et al. 2006). Estudios previos recuperaron los grupos *donosobarrosi* y *fitzingerii* como monofiléticos (Avila et al. 2006; Fontanella et al. 2012; Pyron et al. 2013), pero Abdala (2007) recuperó al grupo *donosobarrosi* como parafilético. Aquí se recuperaron ambos grupos como monofiléticos con alto soporte estadístico en todos los análisis realizados (PP = 0,99 y 0,97, para el grupo *donosobarrosi* y *fitzingerii* respectivamente).

El complejo *boulengeri* fue previamente reconocido como una única especie distribuida a lo largo de una distancia de ~120 km desde el noroeste al sudeste patagónico. Esta región representa un paisaje ecológico y topográficamente complejo. Esta especie se caracterizaba con una extensa variación en morfología y coloración (Ceï 1986). Sin embargo, estudios posteriores basados en un mejor muestreo geográfico e incorporando nuevos datos identificaron la existencia

de al menos cinco especies conformando el complejo *boulengeri*, y varias otras fueron propuestas como especies candidatas.

Similar al complejo *boulengeri*, originalmente *L. rothi* fue reconocida como una única especie con extensa variación morfológica, y estudios posteriores (Ceï 1986) reconocieron la existencia de al menos cinco especies, conformando el complejo *rothi*. Los complejos *boulengeri* y *rothi* tienen una distribución parapátrica, con el complejo *rothi* alcanzando el noroeste patagónico y el complejo *boulengeri* extendiéndose hacia el sureste (Fig. 2).

Los análisis de árboles de especies recuperaron ambos complejos como parafiléticos (Fig. 4 y 8), con *L. rothi* anidado dentro del complejo *boulengeri* en el análisis de MDC (Fig. 4), y *L. telsen* y *L. tehuelche* (miembros del complejo *boulengeri*) anidados dentro del complejo *rothi*, con alto soporte en el resultado arrojado por \*BEAST (PP = 0,97 y 0,99 respectivamente). Estudios previos basados en morfología (Abdala 2007), y en ADNmt (Avila et al. 2006), también reportaron extensa parafilia entre ambos complejos. La parafilia en árboles de genes puede ser producto del efecto de división de linaje incompleta (“*incomplete lineage sorting*”; ILS) o hibridación (Funk y Omland 2003). El caso particular de hibridación fue detectado en otras especies dentro de *Liolaemus* (*L. gracilis* y *L. bibronii*; Olave et al. 2011), y para los complejos *boulengeri* y *rothi* los análisis realizados en el capítulo 4 de esta tesis, también sugieren hibridación. Esto podría explicar porque \*BEAST falla en resolver la monofilia de ambos complejos, incluso al incluir individuos de todas las especies descriptas al momento y un conjunto de secuencias de ADN relativamente grande (= 14 loci). Sin embargo, en este capítulo sólo se plantea hibridación como una hipótesis plausible, y el tema se retoma en detalle, con análisis estadísticos apropiados para arribar a alguna conclusión en el capítulo 4.

Alternativamente, es posible que la matriz empleada actualmente sea problemática para \*BEAST, dado su gran tamaño (= 82 individuos y 14 loci) asociado a la gran discordancia de árboles de genes (Tablas 3 y 4).

#### *Árboles de especies y el desafío de la filogenia de Eulaemus.*

En este capítulo se utilizaron dos programas de inferencia de árboles de especies (\*BEAST y MDC), así como también una matriz concatenada tradicional. Los métodos de árboles de especies tienen en cuenta la segregación estocástica de cada gen independiente. A pesar de haber utilizado la matriz de secuencias más grande disponible al momento (188 taxa, 14 loci), se encontró ciertas limitaciones en resolver relaciones entre grandes grupos de *Eulaemus*, en particular dentro de la serie *melanops*, y en algunos casos para las relaciones más inclusivas dentro de ellos.

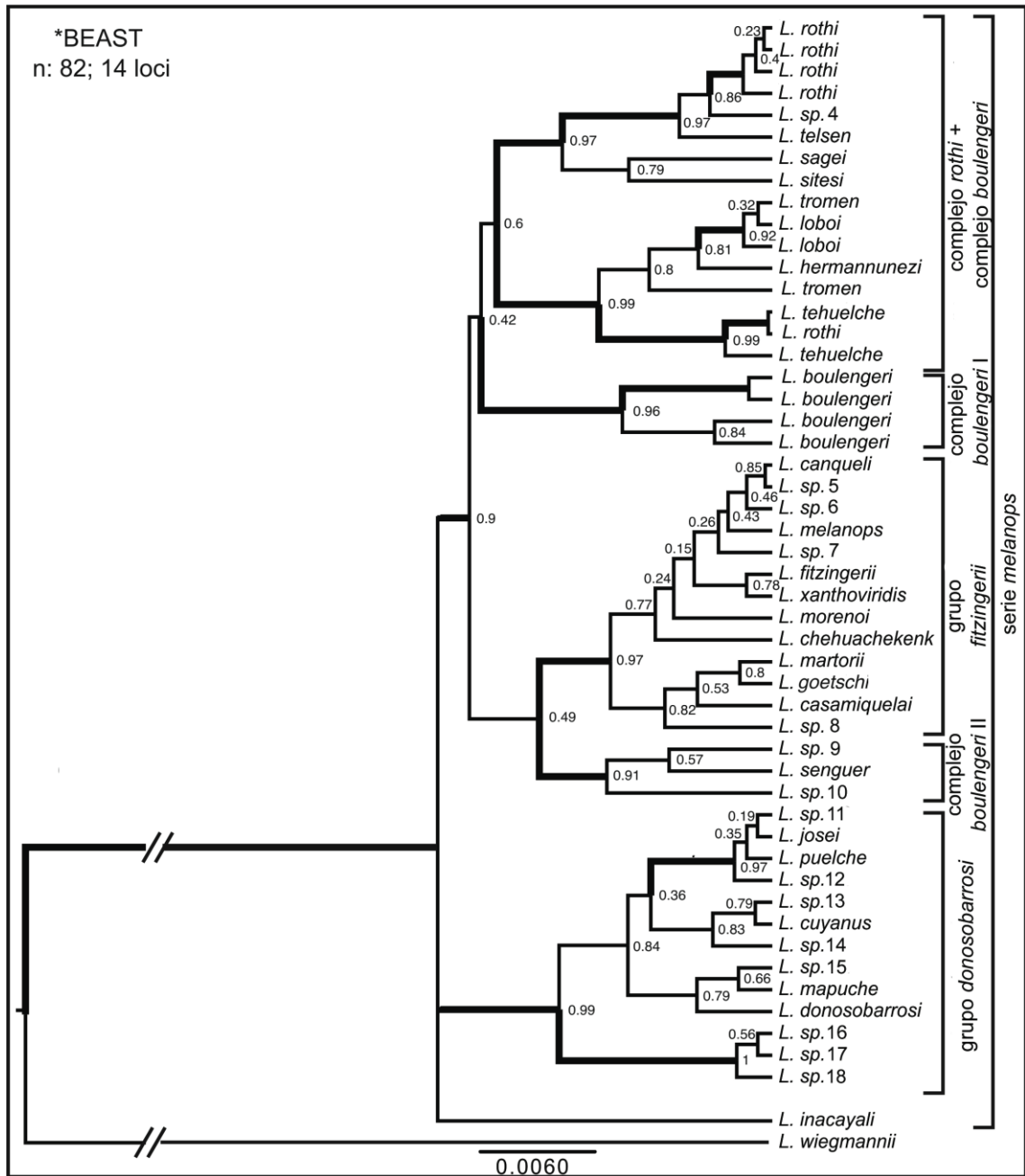


Figura 8: Resultado de la inferencia realizada por \*BEAST para la serie *melanops*.

Sumar datos (taxa y loci) puede ayudar a resolver las relaciones entre los grandes grupos; sin embargo, el agregar más individuos y loci también aumenta el número de parámetros a ser estimados, y a su vez puede aumentar la discordancia entre árboles de genes debido a ILS. La estimación de árboles de especies se vuelve entonces un desafío mayor (Than y Nahkleh 2010).

Los niveles de impacto de ILS dependen del tiempo de divergencia ( $\tau$ ) y el tamaño poblacional ( $N_e$ ), donde tamaños menores de  $\tau$  y mayores de  $N_e$  incrementan ILS (Knowles y Carstens 2007; Yang y Rannala 2010; Leaché y Rannala 2011). Los árboles Bayesianos mostraron ramas muy cortas (Fig. 5 A y C; 7 y 8), lo que podría indicar un corto tiempo de

divergencia. Esto podría indicar un escenario difícil de estudiar por métodos filogenéticos actuales. En un escenario complicado (i.e. alto impacto de ILS), los métodos de reconstrucción filogenética son propensos a fallar en reconstruir las relaciones reales, pero se espera que los métodos de árboles de especies funcionen mejor (Leaché y Rannala 2011), ya que contemplan en su modelo la segregación estocástica de cada gen.

Las discordancias utilizadas hasta aquí no permiten arribar a una conclusión robusta para explicar las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos de *Eulaemus*. Esto puede deberse a las grandes discordancias de árboles génicos (Tablas 3 y 4), que complican la estimación de los árboles a los programas empleados. Por esto, se concluye que las relaciones filogenéticas entre los grandes grupos de *Eulaemus* constituyen un enigma no resultado. La conclusión de este capítulo se ilustra en la Figura 9, mostrando politomías para reflejar la incertidumbre en la evolución del subgénero *Eulaemus*.

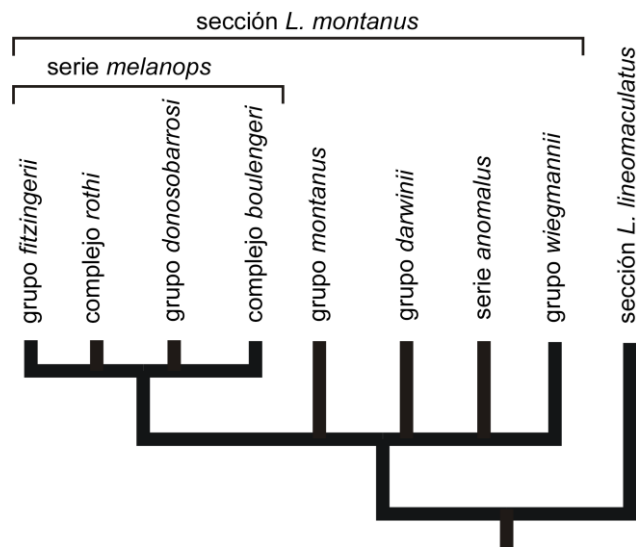


Figura 9: Esquema que refleja la conclusión incierta, al momento, de las relaciones filogenéticas del subgénero *Eulaemus*.



**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Córdoba**

**CAPÍTULO 2: EL DESAFÍO DE LA FILOGENIA DE**  
***EULAEMUS*: PONIENDO A PRUEBA LA HIPÓTESIS DE**  
**RADIACIÓN RÁPIDA**

---

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas

**MELISA OLAVE**  
**ALUMNA**

**MARIANA MORANDO**  
**DIRECTORA**

# Introducción

Una de las principales incumbencias de la sistemática es estimar las relaciones entre las especies en un contexto evolutivo (Knowles y Kubatko 2010). Durante las últimas dos décadas se ha incrementado la incorporación de marcadores moleculares en esta disciplina (Knowles 2009) para estudiar la historia evolutiva de una gran variedad de organismo, y hasta muy recientemente la aproximación más frecuente consistía en utilizar uno o muy pocos genes reconstruir una filogenia que se asumía como la historia evolutiva de las especies. Sin embargo, nuevos métodos permitieron de reconstrucción de “árboles de especies”, basados en teoría de coalescencia, capaces de considerar que cada árbol de gen puede ser diferente entre sí y a su vez con la filogenia de las especies (e.g., \*BEAST: Drummond y Rambaut 2007; BEST: Liu y Pearl 2007; BUCKy: Ané et al. 2007; MDC: Maddison y Knowles 2006; Than y Nakhleh 2009; STEM: Kubatko et al. 2009). Estos análisis son computacionalmente desafiantes, pero permiten resolver el problema de la concatenación de genes en una super matriz.

A pesar de que los estudios filogenéticos multilocus se han incrementado en los últimos años, inferir la historia evolutiva de algunos grupos continua siendo un objetivo difícil. La falta de resolución de los árboles filogenéticos generalmente se representa como politomías, y se asume que el sumar datos (individuos y loci) podría resolver esas relaciones. Estos son los casos de lo que se denomina politomías blandas (*soft polytomies*); en cambio, existen otros casos, donde agregar más datos no permite resolver las relaciones, lo que se conoce como politomías duras (*hard polytomies*). Este último caso, refiere a la divergencia de tres o más linajes tan cercanas en tiempo que sólo algunos o ningún estado de carácter evolucionó claramente, lo que no permite reconstruir su orden de aparición. En este caso particular de radiación rápida de linajes, agregar más datos no permite resolver la politomía (McCracken y Sorenson 2005).

En estos casos de politomías duras, si son acompañadas de suficiente tiempo post-radiación, lo que permite la divergencia de los caracteres, se espera que los árboles de genes estén bien resueltos pero con altas discordancias entre ellos. Esto se debe a que cada genealogía de gen tiene una historia de ancestro-descendencia independiente. Por ejemplo, si se consideran tres linajes (sp 1, sp 2 y sp 3) compartiendo el ancestro común más cercano (MRCA), entonces son posibles tres topologías diferentes: ((sp 1 + sp 2) + sp 3), ((sp 1 + sp 3) + sp 2), y ((sp 2 + sp 3) + sp 1); y es esperable que, bajo neutralidad, el 33% de los árboles de genes independientes soporten cada una de las tres posibles topologías (McCracken y Sorenson 2005). Por lo tanto, los árboles de genes individuales pueden estar bien resueltos y con buen soporte estadístico, y no proveer señal alguna de politomías duras; pero mostrar topologías incongruentes entre sí.

La inferencia filogenética para clados caracterizados por radiaciones rápidas es uno de

los problemas más desafiantes para esta disciplina. Leaché y Rannala (2011) evaluaron la precisión de diferentes métodos de árboles de especies (BEST, BUCKy y STEM), así como también de los análisis concatenados tradicionales (Bayesiano y de máxima parsimonia) dados diferentes escenarios evolutivos. Ellos encontraron que bajo un escenario más desafiante (cortos internodos [ $\tau$ ] y grandes tamaños poblacionales [ $N_e$ ]), todos los métodos muestran poca precisión en recuperar la filogenia real. Las politomías duras constituyen uno de estos escenarios desafiantes (donde  $\tau$  tiende a cero), por lo que se espera que diferentes métodos recuperen topologías erróneas, e incluso diferentes entre sí (Whitfield y Lockhart 2007).

Recientemente se han propuesto nuevas aproximaciones metodológicas para evaluar hipótesis filogenéticas alternativas, basándose en modelos explícitos, donde se simulan datos bajo escenarios alternativos y se comparan con los datos reales para evaluar la probabilidad de las observaciones dados los modelos (e.g. Steel y Storer 2006; Carstens y Richards 2007; Knowles et al. 2007; Richards et al. 2007; Audzijonyte y Vrijenhoek 2010). Este tipo de enfoques, permite incorporar historias evolutivas complejas, involucrando combinaciones de diferentes procesos (e.g. divergencia de poblaciones, flujo génico, cambios en el tamaño poblacional efectivo [ $N_e$ ] y segregación estocástica de genes), para cualquier número de poblaciones e individuos (e.g., Carnaval et al. 2009; Cornuet et al. 2008; Fagundes et al. 2007; Gray et al. 2008; Hickerson et al. 2009; Muster et al. 2009; Voight et al. 2005). A pesar de estas ventajas evidentes, este tipo de método nunca fue utilizado hasta el momento para estudiar politomías duras.

En el capítulo 1 se utilizaron 14 loci y 188 representantes del subgénero *Eulaemus* para reconstruir la filogenia del clado, sin poder arribar a una conclusión robusta en cuanto a las relaciones entre los grandes grupos reconocidos dentro del subgénero. Los diferentes métodos recuperaron topologías distintas, muy posiblemente esto se debe a la gran discordancia entre los árboles de genes. Además se observaron tiempos de especiación muy cortos a niveles de los internodos entre estos clados principales (Figura 5 C del capítulo 1). Concordante con estudios anteriores (Abdala 2007; Avila et al. 2006; Fontanella et al. 2012; Morando et al. 2004; Schulte et al. 2000), la sección *L. lineomaculatus* (21 especies) se recuperó en posición basal, sin embargo, las relaciones dentro de la sección *L. montanus* (124 especies) permanecen inciertas, tanto para los resultados obtenidos en esta tesis, como también dada la gran discordancia entre diferentes propuestas de relaciones filogenéticas publicadas (e.g. Schulte et al. 2000; Avila et al. 2006; Abdala 2007; Fontanella et al. 2012).

Todos estos patrones observados hacen plausible la idea de que la sección *montanus* haya experimentado una radiación rápida de linajes tan cercana en el tiempo, que el patrón observado en los árboles constituya una o más politomías duras. Esto podría explicar el alto

grado de discordancia observado entre publicaciones previas y entre los resultados obtenidos en el capítulo 1.

En este capítulo se pone a prueba estadísticamente la hipótesis de polímitas duras dentro de la sección *montanus* incluyendo también hipótesis alternativas que describen topologías previamente propuestas, usando un método novedoso basado en modelos explícitos.

## Materiales y métodos

### *Exploración de los datos*

Se exploró el nivel de información de los 14 loci utilizados para descartar falta de información para inferencia filogenética. Se utilizaron dos métodos diferentes: 1-el algoritmo de likelihood-mapping (Strimmer y Haeseler 1997) incluido en Tree-puzzle (Schmidt et al. 2002) y 2-se implementó el programa estadístico desarrollado por Xia et al. (2003), implementado en DAMBE (Xia y Xia 2001) para explorar el grado de información de los genes. Este método estima la probabilidad de saturación de un locus y devuelve dos índices (Iss e Iss.c); donde Iss < Iss.c indica que el locus tiene señal filogenética importante, por lo que es útil para análisis filogenéticos.

### *Modelos propuestos*

Se tomaron hipótesis filogenéticas previamente propuestas para explicar la evolución de *Eulaemus* (Fig. 1) tanto por otros autores como la inferida en el capítulo 1 con el método \*BEAST, todas ellas se utilizaron para poner a prueba estadísticamente la probabilidad de los datos (árboles de genes empíricos) dadas las distribuciones de coalescencias profundas esperadas bajo cada modelo. Por lo tanto, se consideraron ocho modelos diferentes (Fig. 1) describiendo la diversificación de los clados. Cinco de estos modelos están publicados: 1-Fontanella et al. (2012) [dos loci mitocondriales + dos loci nucleares, 2153 bp]; 2 y 3-Abdala (2007) [morfología (128 caracteres) y morfología + ADNmt (1776 bp)]; 4-Avila et al. (2006) [3 loci mitocondriales + 2 loci nucleares, 3287 bp]; y 5-Schulte et al. (2000) [ADNmt, 1710 bp]. También se sumó la topología propuesta por \*BEAST (Figura 5C, capítulo 1) y dos modelos describiendo una y dos politomías duras dentro la sección *L. montanus*. La más antigua de estas politomías duras incluye la serie *anomalus*, los grupos *darwinii*, *montanus* y *wiegmannii* y la serie *melanops*; y la radiación más reciente incluye los complejos *boulengeri* y *rothi* y los grupos *donosobarrosi* y *fitzingerii* (Fig. 9 del capítulo 1). Los modelos 6 a 8 (Fig. 1) incluyeron



los tiempos de divergencia obtenidos con BEAST (capítulo 1; Fig. 5C). Las politomías duras se dataron al momento en que los linajes coalescen. Por lo tanto, la radiación más antigua habría ocurrido hace unos 10.14 ma y la más reciente hace 5.48 ma. Se usaron 13 árboles de genes para estos análisis, habiendo solo incluido el locus mitocondrial 12S, ya que sólo se permiten los árboles de genes independientes.

Los procedimientos realizados para la evaluación de los modelos se describen en la Fig. 2. Se utilizó Mesquite 2.74 (Maddison y Maddison 2010) para simular 1.000 árboles de genes (Fig. 2, paso 1) para cada uno de los 13 genes y en cada uno de los ocho modelos propuestos (Fig. 1). Posteriormente se compararon los 1.000 árboles de genes simulados para cada locus, contra los modelos propuestos, para obtener una estimación de la distribución del costo de coalescencias profundas esperadas dado cada modelo (Fig. 2, paso 2). Las coalescencias profundas representan una forma de medir la discordancia entre los árboles de genes y el árbol de especies cuando la ancestría común de una sola copia de un locus se extiende más hacia atrás en el tiempo que el tiempo de especiación. Las coalescencias profundas son calculadas como el número de linajes extras al contar el número de diferencias discretas una vez que el árbol de genes fue considerado dentro del árbol de especies. Si los datos empíricos caen fuera del intervalo de confianza del 95%, entonces el costo de coalescencias profundas observado no es esperado dado el modelo propuesto, rechazando la hipótesis (Fig. 2, paso 3).

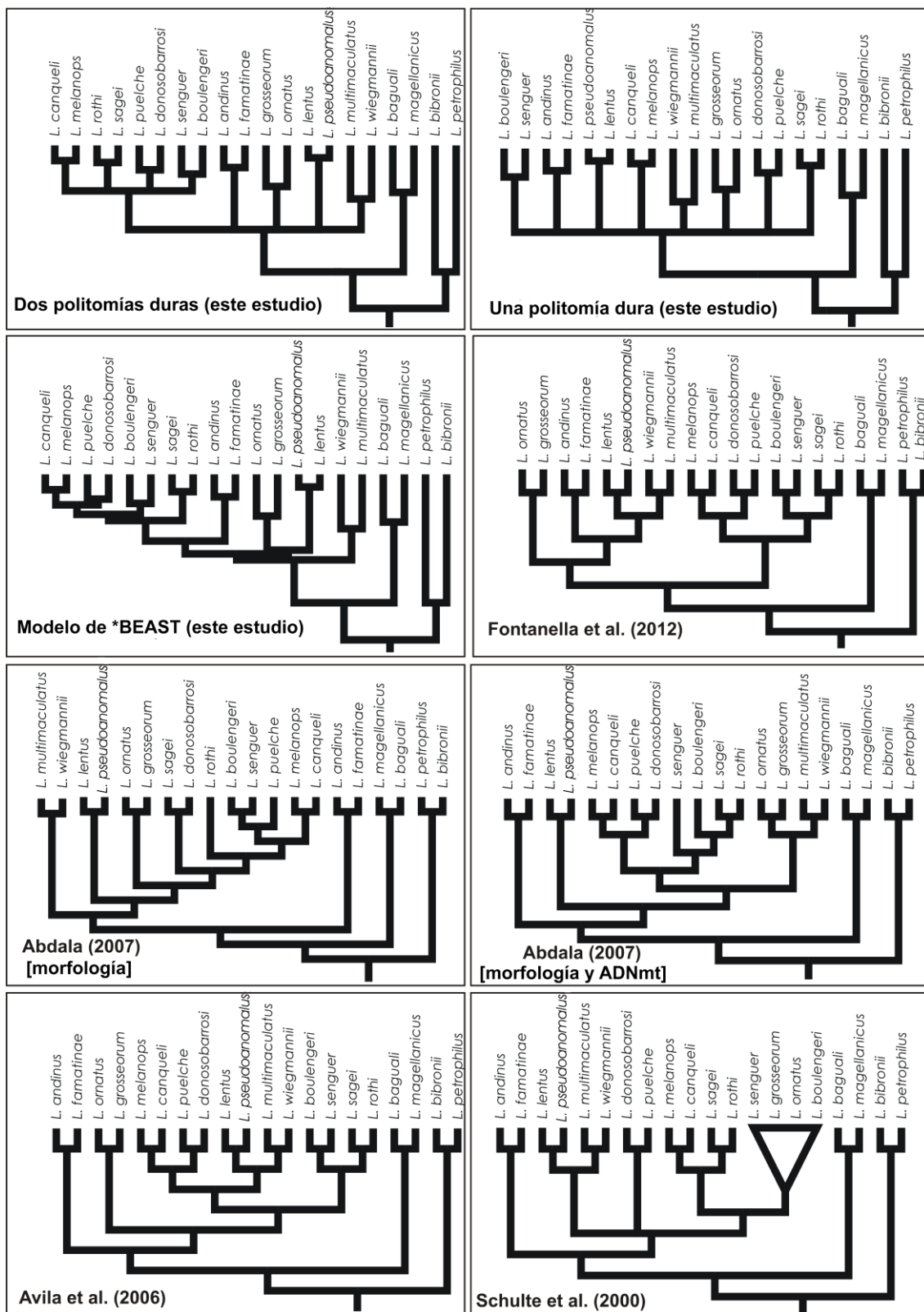


Figura 1: Descripción de los ocho modelos propuestos para explicar las relaciones de filogenéticas de los grandes grupos de *Eulaemus*.

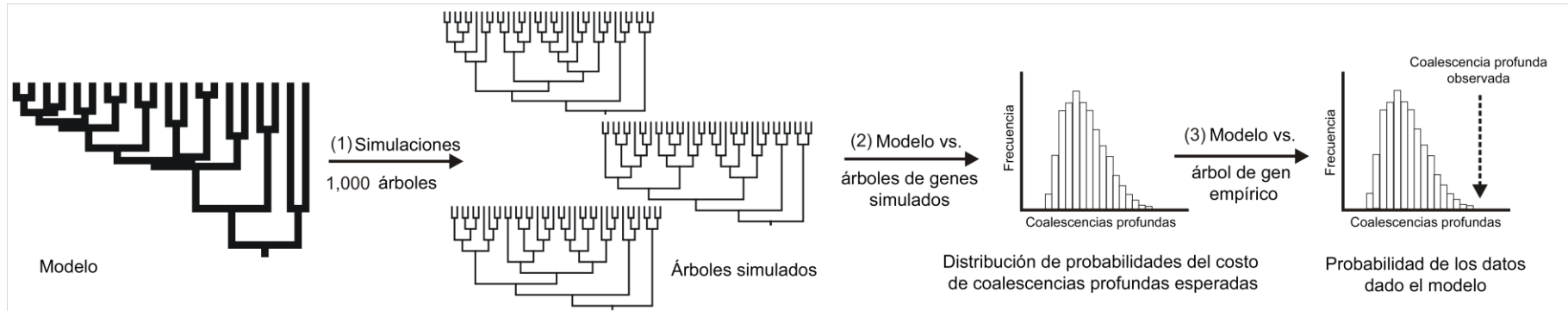


Figura 2: Descripción de la metodología utilizada. Se construyeron los modelos en Mesquite v2.74 y se simularon 1.000 árboles de genes para cada uno de los 13 loci (paso 1). Posteriormente se compararon los árboles simulados con el modelo y se obtuvo una distribución de coalescencias profundas esperadas (paso 2). Finalmente, se obtuvo el costo de coalescencias profundas observadas, al comparar los árboles de genes reales con el modelo propuesto, obteniendo la probabilidad de los datos dado el modelo. Si las observaciones empíricas caen dentro del intervalo del 95% de confianza, significa que el locus soporta ese modelo. Por lo contrario, se rechaza la hipótesis.

## Resultados y discusión

Ambos métodos empleados para explorar el grado de información de los genes mostraron altas señales filogenéticas. Tree-puzzle mostró que entre el 65.2% y el 93.6% de cada locus muestra “*tree-likeness*”, un árbol bien resuelto, indicando buen nivel de información de los loci. Por otro lado, los valores de Iss e Iss.c mostraron que los genes no están saturados y tienen alta señal filogenética (valor  $p < 0.05$ ;  $Iss < Iss.c$ ).

Los resultados de las pruebas de hipótesis realizadas se muestran en la Fig. 3. Se encontró soporte parcial para cada hipótesis. El modelo más soportado corresponde al que incluye dos politomías duras (nueve loci), seguido del modelo que representa una politomía dura (ocho loci). La topología propuesta por Schulte et al. (2000) y la inferida por \*BEAST (este estudio) fueron soportadas por siete loci. También se encontró soporte de seis loci para las topologías propuestas por Avila et al. (2006) y Fontanella et al. (2012), de cinco loci para la de Abdala (2007; morfología + ADNmt), y finalmente cuatro loci soportaron la topología propuesta por Abdala (2007; morfología).

Los estudios previos mostraron extensa incongruencia entre las topologías propuestas (eg. Schulte et al. 2000; Espinoza et al. 2004; Etheridge 1995; 2000; Abdala 2007; Avila et al. 2006; Fontanella et al. 2012), pero su muestreo de taxa y de datos eran parciales, y los análisis siguieron una aproximación de concatenación de datos, por lo tanto su falta de congruencia podría haberse debido a alguna de estas circunstancias. En el capítulo 1 se trabajó con un total de 14 loci y 188 terminales, representando la matriz de datos moleculares más grande disponible al momento para estudiar la evolución de *Eulaemus*. Además, se emplearon dos métodos de inferencia de árboles de especies (\*BEAST y MDC) y un método tradicional de matriz concatenada. Los resultados mostraron grandes discordancias entre las topologías inferidas por cada método, sin poder arribar a una propuesta robusta de la historia evolutiva de *Eulaemus*.

Las politomías son generalmente usadas para representar incertidumbre en las relaciones filogenéticas (politomías blandas). Sin embargo, también podrían representar casos de divergencia simultánea de varios linajes (politomías duras). Distinguir entre politomías duras y blandas involucra evaluar el por qué del bajo soporte en los nodos, para ello es necesario considerar: (i) si los datos son suficientemente informativos; (ii) si los datos son altamente conflictivos entre sí; (iii) si los métodos filogenéticos utilizados son apropiados; (iv) si los datos son insuficientes (Whitfield y Lockhart 2007).

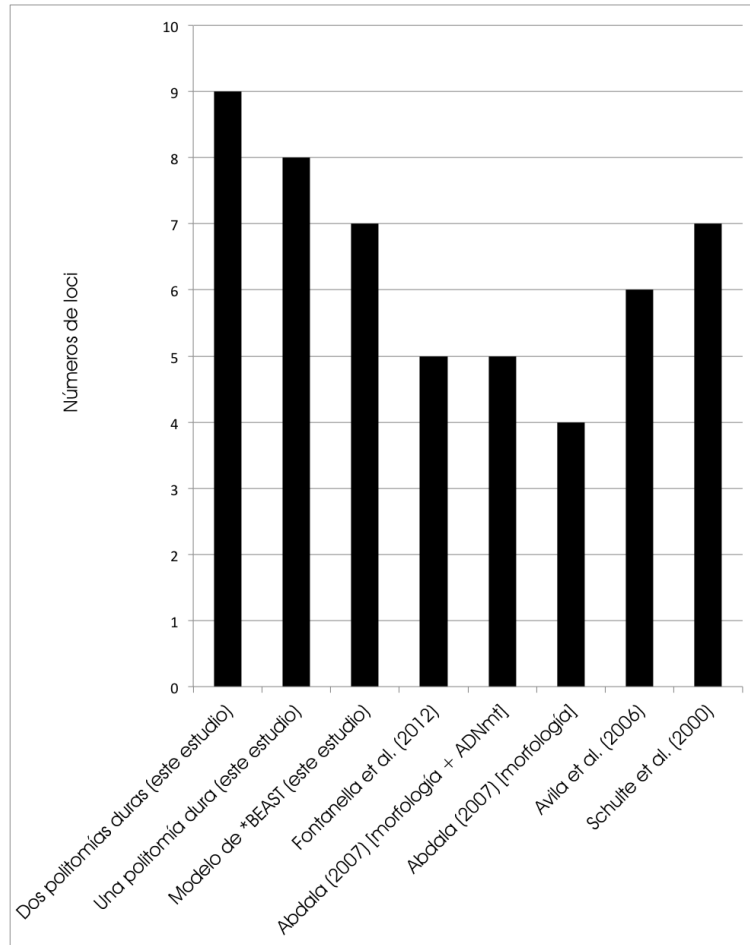


Figura 3: Número total de loci que apoyan diferentes modelos, después de simular 1.000 árboles de genes para cada locus por modelo y comparar las distribuciones esperadas con las observaciones empíricas. Se muestra el número de loci que apoyaron cada modelo (dentro del 95% de confianza).

Para descartar (i), se exploró el grado de información de las secuencias empleadas, usando dos métodos *likelihood-mapping* y un índice de saturación y señal filogenética. Los resultados mostraron que todos los loci empleados contienen señal filogenética alta. Además se incluyeron loci de diferente naturaleza, con diferentes tasas de sustitución, sean más altas (12S y cyt-b), intermedia (KIF24, A12D, A1D, A4B, A9C) o baja (EXPH5, PRLR, SNCAIP, CMOS, DNAH3, MXRA5, PNN). En otros trabajos publicados con lagartijas, combinaciones similares de loci generalmente recuperaron árboles bien resueltos (e.g. Benavides et al. 2009; Sinclair et al. 2010; Breitman et al. 2011; Camargo et al. 2012; Werneck et al. 2012). Además, Camargo et al. (2012) demostró que la precisión de los métodos Bayesianos mejora significativamente cuando se usan múltiples loci de diferentes tasas de mutación.

Para minimizar los efectos de (ii) y (iii), se utilizaron novedosos métodos de inferencia de árboles de especies (\*BEAST y MDC) que modelan el conflicto entre árboles de genes, basándose en teoría de coalescencia. En particular el método de \*BEAST se espera que tenga el mejor funcionamiento en un escenario desafiante (Leaché y Rannala 2011).

Finalmente, teniendo en cuenta (iv) se incluyó la matriz molecular más grande utilizada al momento para estudiar *Eulaemus* (188 terminales, 14 loci).

Después de considerar estos puntos, se puso a prueba la hipótesis de radiación simultánea de linajes dentro de la sección *L. montanus*. Se propusieron dos modelos incluyendo una y dos politomías duras (con tiempos de divergencia estimados de 10.14 ma y 5.58 ma), contra otros cinco modelos previamente publicados y uno propuesto por la inferencia de \*BEAST. Se observó soporte parcial para todos los modelos (Fig. 3), siendo el más soportado el modelo que representa dos politomías duras (nueve loci), seguido por el modelo que involucra una única politomía dura (ocho loci). Sin embargo, también se encontró soporte parcial para los demás modelos propuestos.

Las politomías duras son reconocidas por internodos muy cortos, en las que los descendientes tienen la misma probabilidad de recibir un alelo (McCracken y Sorenson 2005). Esto implica que cuando se analizan múltiples loci independientes, se espera encontrar soporte parcial para cada una de las topologías posibles, lo que justificaría haber encontrado soporte parcial para todas las topologías propuestas. A medida que el largo de los internodos incrementa, la proporción de árboles de genes se vuelve más congruente con la historia de las especies.

Las pruebas realizadas en este capítulo sugieren que el modelo de dos politomías duras describe el escenario más plausible para describir la evolución de *Eulaemus*. Sin embargo, la diferencia entre una y dos politomías corresponde a un único locus y esta diferencia podría reflejar incertidumbre en el soporte estadístico real entre ambos. El modelo de dos politomías duras es el más soportado (nueve loci) y dado que la serie *melanops* se recuperó como monofilética con mayor tiempo de especiación (2.43 ma [7.91 – 5.48]; Fig. 5C capítulo 1), se acepta este modelo como la hipótesis más probable.

Si la hipótesis de radiación simultánea de linajes es la historia verdadera para el subgénero, entonces se espera la incongruencia reportada entre los estudios previamente publicados: todos encontraron diferentes topologías bien resueltas, dependiendo de la información utilizada.

Los métodos filogenéticos están diseñados para buscar dicotomías en los árboles, por lo que no existe método filogenético adecuado para estudiar radiaciones simultáneas de linajes. Más aún, los métodos concatenados tradicionales tienden a inflar el soporte de los nodos (Belfiore et al. 2008), lo que puede ocultar la señal de conflicto de los árboles de genes. Sin embargo, enfoques basados en modelos explícitos proveen nuevas posibilidades analíticas (Knowles 2009), y aquí se presenta por primera vez que esta metodología puede ser utilizada para estudiar radiaciones simultáneas de linajes.

Estos resultados sugieren que el árbol filogenético más probable de *Eulaemus* debe ser dibujado con dos politomías. Si esto es cierto, la predicción involucra que agregar más secuencias, incluso SNPs o genomas completos, no resolverá los internodos del subgénero (Delsuc et al. 2005; Rokas y Carroll 2006; Whitfield y Loackhart 2007).

### *Radiación y cambios geoclimáticos*

Los tiempos de divergencia de ambos subgéneros (*Eulaemus* – *Liolaemus* [*sensu stricto*]), fueron datados en el Mioceno temprano (19.63 ma), cercanos al levantamiento de los Andes (~23 ma; Ramos 1989). La radiación más antigua de *Eulaemus* fue datada a principios del Mioceno tardío (10.14 ma), un período coincidente con el incremento en abundancia y diversidad de las plantas xéricas (Asteraceae, Chenopodiaceae, Convolvulaceae, Anacardiaceae [*Schinopsis*], Goodeniaceae, Cyperaceae, Poaceae, Fabaceae, Caesalpinioideae, y Mimosoideae). Este aumento de diversidad de plantas se propuso que estuvo asociado a un óptimo climático de ese momento (Iglesias et al. 2011). Es posible que el incremento de disponibilidad de hábitats haya favorecido también la posibilidad de diversificación de la sección *L. montanus*.

La segunda radiación dentro del clado *Eulaemus* fue datada en el Mioceno – Plioceno temprano, hace 5.48 ma. IncurSIONES marinas en muchas regiones de las líneas costeras y levantamiento tectónico que ocurrieron durante ese tiempo pueden haber contribuido a la fragmentación del hábitat, promoviendo divergencia simultánea entre poblaciones aisladas (Rabassa et al. 2005). En América del Sur, entre el Mioceno y el Plioceno cambios paleoclimáticos y eventos geológicos pueden haber generado presiones selectivas que modelen la historia evolutiva de las especies del sur, adaptadas a climas templados (Báez y Scillato Yané 1979; Markgraf et al. 1995). Este puede haber sido el caso de las lagartijas *Liolaemus*, quizás promoviendo los dos eventos de radiaciones rápidas propuestos aquí.



**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Córdoba**

**CAPÍTULO 3: NUEVO MÉTODO PARA DETECTAR  
HIBRIDACIÓN ESTIMANDO LA VEROSIMILITUD DE UN CONJUNTO  
DE ÁRBOLES DE GENES OBSERVADOS DADO UN MODELO**

---

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas

**MELISA OLAVE**  
**ALUMNA**

**MARIANA MORANDO**  
**DIRECTORA**



# Introducción

Es común que los árboles de genes difieran entre sí y también respecto al árbol de las especies. Las explicaciones de esta variación son comúnmente atribuidas a coalescencias profundas (proceso también conocido como división de linaje incompleto [*incomplete lineage sorting*, ILS]), así también como a otros procesos evolutivos como hibridación, transferencia horizontal de genes y duplicaciones (Maddison 1997; Funk y Omland 2003). Las coalescencias profundas ocurren debido a la segregación estocástica y persistencia de los genes durante el proceso de especiación (Fig. 1); y el impacto de ILS es mayor con menores tiempos de especiación y tamaños poblacionales mayores ( $N_e$ ; Leaché y Rannala 2011). Esta segregación estocástica de loci independientes ha sido incorporada en modelos matemáticos basados en teoría de coalescencia, en la cual la historia evolutiva de un conjunto de muestras se estudia con una aproximación hacia atrás en el tiempo (Kigman 1982; Tajima 1983; Takahata y Nei 1985; Pamilo y Nei 1988; Wakeley 2008).

Muchos estudios se han enfocado en las propiedades de las coalescencias profundas (e.g. Rosenberg 2003; Degnan y Salter 2005; Degnan y Rosenberg 2006; Rosenberg y Tao 2008; Degnan y Rosenberg 2009; Than y Rosenberg 2013; Rosenberg 2013). Tal como se detalló en el capítulo 2 de esta tesis, las nuevas metodologías basadas en coalescencia, utilizan modelos explícitos para poner a prueba hipótesis utilizadas para explicar la evolución de los diferentes organismos (ver también Richard et al. 2007). Esta aproximación es posible debido a que se espera que los tiempos de coalescencia de los alelos sean mayores a los de la divergencia de las especies (Fig. 1). Entonces, una manera de cuantificar la discordancia entre árboles de genes se basa en calcular el costo de coalescencias profundas de un árbol génico dado dentro del árbol de las especies, y esto se hace contando el número de “linajes extras” (Fig. 1), tal como lo propuso Maddison (1997; ver también Than y Nakhleh 2009; Than y Rosenberg 2011; 2013).

Si bien las coalescencias profundas han sido ampliamente estudiadas como la principal fuente de discordancia de árboles de genes, otros procesos podrían contribuir a la discordancia observada. En particular, la hibridación es un proceso que actualmente se considera más común de lo que originalmente se pensó (Mallet 2005; 2007), y que puede contribuir a esta fuente de variación. Se han realizado algunos avances para estimar los efectos de hibridación sobre la discordancia esperada de árboles de genes (e.g. Buckley et al. 2006; Maureira-Butler et al. 2008; Joly et al. 2009; Blanco-Pastor et al. 2012). Estas metodologías asumen un modelo estrictamente coalescente como hipótesis nula, y las desviaciones de los valores esperados se atribuyen a

hibridación, es decir, que los modelos no incluyen hibridación de manera explícita. Otros aportes (Gerald et al. 2011) han logrado evaluar la probabilidad de la hipótesis de hibridación, extendiendo el modelo de Meng y Kubatko (2009), para incluir los efectos de flujo génico en presencia de ILS.

En el capítulo 1 se mostró que los complejos *Liolaemus boulengeri* y *rothi* se recuperaron como parafiléticos en el análisis de árbol de especies. Además, Abdala (2007) y Avila et al. (2006) reportaron parafilia para estos complejos, tanto en base a datos moleculares como morfológicos respectivamente. En el capítulo 1 se sugirió que la hibridación es una posible explicación para este patrón. Para ello, en este capítulo se propone un nuevo método para poner a prueba la hipótesis de hibridación para ser usado en el análisis de los complejos *boulengeri* y *rothi* (capítulo 4). El método consiste en evaluar la verosimilitud (*likelihood*) de diferentes modelos, incluyendo varios niveles de flujo génico y comparando el número de linajes extras. Esta metodología consiste en proponer un modelo, simular un conjunto de árboles de genes e inferir la distribución de linajes extras esperados dado el modelo y calcular la función de verosimilitud de los datos reales dado el modelo.

A pesar de que se han propuesto metodologías similares (Buckley et al. 2006, Joly et al. 2009), el objetivo de este capítulo es presentar una mejora para este tipo de aproximaciones, permitiendo poner a prueba explícitamente la hipótesis de hibridación, incorporando flujo génico a los modelos y calculando la verosimilitud de los datos. Además se desarrolló un conjunto de funciones en lenguaje de R para paralelizar el funcionamiento de los programas, realizar las simulaciones, calcular la verosimilitud y devolver el modelo seleccionado a través de una prueba de *likelihood ratio test*.

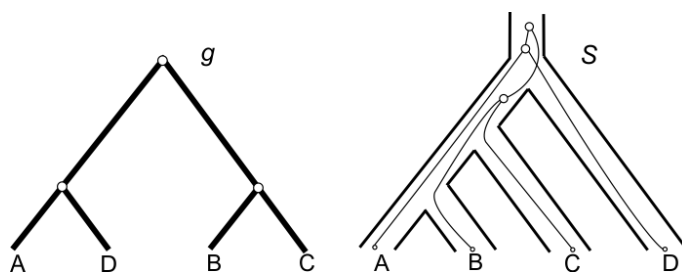


Figura 1: Ejemplo de coalescencia profunda, tomado de Than y Rosenberg (2011). El árbol de gen ( $g$ ) a la izquierda se mapea dentro del árbol de especies ( $S$ ) de la derecha. El número de linajes extras se cuenta según la sumatoria  $n_e - c_e - 1$ ; donde  $n_e$  es el total de ramas internas ( $e$ ) y  $c_e$  es el número de nodos internos en  $e$ .

# Materiales y métodos

## *Metodología implementada*

Este enfoque involucra inferir una distribución de linajes extras esperados dado un modelo para calcular la verosimilitud de los datos reales (i.e. árboles de genes). La secuencia de pasos (i) a (iii) que describen debajo y se muestran en la Figura 2.

- i. *Construcción del modelo*: el modelo propuesto incluye la topología y largo de ramas del árbol de especies ( $S$ ) en unidades coalescentes ( $t/N_e$ : donde  $t$  son las generaciones y  $N_e$  el tamaño poblacional efectivo) para cualquier número de especies dado, en un marco coalescente, y que potencialmente puede incluir cualquier magnitud de un parámetro de migración ( $M = N_e m$ ; donde  $m$  es la proporción de individuos que migran) entre dos o más especies ocurriendo a cualquier tiempo dado durante la historia de especiación.
- ii. *Inferencia de los linajes extras esperados dado el modelo*: un conjunto de  $H$  árboles de genes son simulados siguiendo el modelo descrito en (i). Para este punto se utilizó el programa *ms* (Hudson 2002) para simular 10.000 árboles de genes. Se cuenta el número de linajes extras necesarios para reconciliar cada árbol de gen simulado con el árbol de especies  $S$ , proveyendo una distribución del número de linajes extras esperados. Se utilizó el paquete Phylonet (Than y Nakhleh 2009) para contar los linajes extras.
- iii. *Verosimilitud de los datos reales*: suponiendo un conjunto de árboles de genes independientes ( $g = g_1, g_2 \dots g_N$ ) para  $N$  loci, y suponiendo que el vector  $g$  resume el número de linajes extras requeridos para reconciliar cada árbol de gen con el árbol de especies  $S$  con parámetro de migración  $M$ . Entonces los datos son  $n_1, n_2 \dots n_j$  donde  $n_i$  denota el número de árboles de genes en la muestra de  $N$  loci que requieren  $i$  linajes extras para reconciliarse con el árbol de especies  $S$  con parámetro de migración  $M$ .

Entonces, el vector  $(n_1, n_2, \dots, n_j)$  es una muestra de una distribución multinomial con probabilidad dada por  $p$  en  $N$  pruebas, por lo cual la función de verosimilitud se calcula como:

$$L(n_1, n_2, \dots, n_j | S, M) = \frac{N!}{n_1! n_2! \dots n_j!} p_1^{n_1} p_2^{n_2} \dots p_j^{n_j}$$

Suponiendo que el vector  $p = p_1, p_2 \dots p_j$  denota la probabilidad de varios números de linajes extras (e.g.  $p_i$  la probabilidad de que cada árbol de gen generado desde el árbol de especies  $S$  con parámetro de migración  $M$  requiere  $i$  linajes extras). Suponiendo también que el vector  $h = h_1, h_2, \dots, h_j$  describe el número de linajes extras que se requieren para reconciliar cada árbol de gen en  $g$  con el árbol de especies  $S$  con parámetro de migración  $M$ , entonces  $p$  puede ser estimado como  $\hat{p} = \frac{h_1}{H}, \frac{h_2}{H}, \dots, \frac{h_j}{H}$ .

- iv. Selección del modelo: se evalúa el nivel de significancia de la diferencia del likelihood calculado para cada modelo, utilizando la prueba de *likelihood ratio test*. En primer lugar se calcula:

$$G = 2 (\ln L_{MLE} - \ln L_0)$$

Donde  $L_{MLE}$  es el *likelihood* de mayor valor entre los modelos estudiados y  $L_0$  es el *likelihood* de la hipótesis nula ( $M = 0$ ). Una vez calculado  $G$  se realiza una prueba de chi cuadrado con un grado de libertad.

Se desarrollaron un conjunto de funciones en R para paralelizar el funcionamiento de los programas y automatizar estos pasos mencionados; la descripción de las funciones se resume en el cuadro 1.

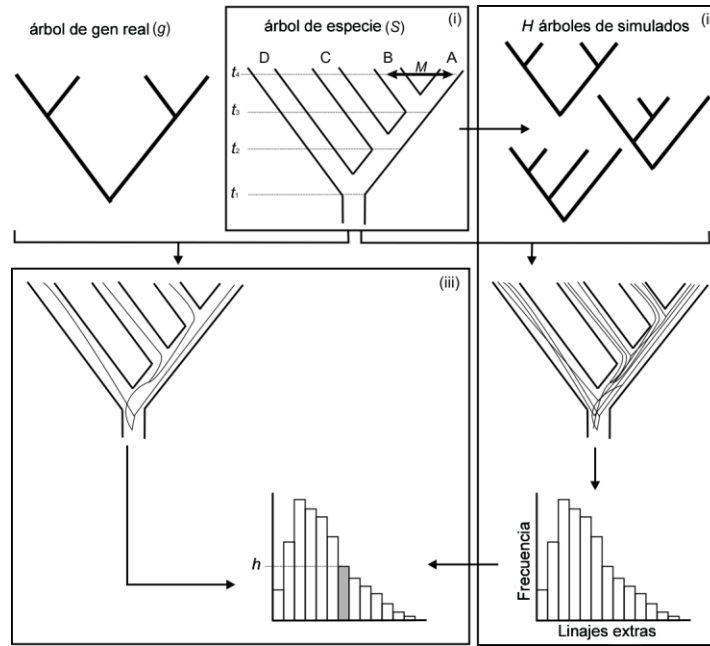


Figura 2: Descripción de la metodología utilizada. El primer paso (i) corresponde a proponer un modelo, incluyendo coalescencia, una topología y largo de ramas de un árbol de especies ( $S$ ), una magnitud del parámetro  $M$  y un tiempo de ocurrencia. Entonces, se simulan  $H$  árboles de genes y se calcula el número de linajes extras entre los árboles simulados y el árbol de especies  $S$ , obteniendo una distribución de linajes extras esperados (paso ii). Finalmente, en el paso (iii), se cuenta el número de linajes extras del árbol de gen real dentro del árbol de especies  $S$  y se compara con la distribución obtenida en (ii). El número de árboles simulados que coinciden exactamente con el mismo número de linajes extras obtenidos en el árbol de gen  $g$ , es igual a  $n$ . Entonces,  $n/H$  es aproximadamente la probabilidad de observar el número de linajes extras en los datos reales dado el modelo ( $S, M$ ).

Función	Uso
get.Imap	Construcción de objeto “Imap”, describiendo la asociación de individuos-especies. Esto se realiza en el mismo formato requerido por *BEAST.
get.topo2ms	Toma un árbol de especies en formato newick (topología y largo de ramas) y lo traduce en la forma requerida por el programa <i>ms</i> . Esta función permite incluir cualquier número de especies dadas. También permite corregir el largo de ramas para los casos de loci haploides y uniparentales (como la mitocondria).
gf.code2ms	Toma una especificación de nivel de flujo génico (parámetro $M$ , tiempo y especies involucradas) provista por el usuario y lo traduce en los requerimientos de <i>ms</i> .
getTaxa2ms	Toma una matriz de secuencias fasta y devuelve un vector conteniendo el número de individuos por especie requerido por el programa <i>ms</i> . Esto resuelve el problema de las entradas faltantes, contando el número de individuos por especie por matriz de secuencias.
ms	Ejecuta el programa <i>ms</i> .
writePhyloImap	Toma un Imap (en formato de *BEAST) y lo convierte en el formato requerido por Phylonet.
sptree.vs.genetrees	Toma un conjunto de árboles de genes y un árbol de especie y ejecuta Phylonet para contar el número de linajes extras. Devuelve un histograma de frecuencias.
getLikelihood	Compara un árbol de gen dado con una distribución dada de linajes extras esperados y devuelve el logaritmo natural de la verosimilitud calculada.

Cuadro 1: Lista de funciones desarrolladas en R para permitir la automatización de la metodología. Estas funciones requieren instalar la librería *Analysis of Phylogenetics and Evolution* (ape; Paradise et al. 2004).

### *Evaluación de la metodología*

*Simulaciones.* Para evaluar la precisión del método en detectar hibridación en presencia de ILS, se realizaron un total de 25 análisis replicados bajo diferentes escenarios y combinaciones de loci (un total de 6.000 análisis). El estudio de simulaciones incluyó dos especies focales (A y B) y dos especies extras (C y D); nótese que detectar flujo génico entre especies hermanas representa un escenario más complicado que el de especies más distantes. Se consideraron dos árboles de cuatro taxa, incluyendo uno simétrico y otro asimétrico que se generaron usando Mesquite v2.74 (Maddison y Maddison 2010).

Se espera que desde las  $5N_e$  generaciones a lo largo del árbol de especies (aquí  $N_e$  es el número de cromosomas), dos linajes coalescan (y entonces, los árboles de genes y el árbol de especie sean congruentes). Por tal motivo se fijó el tiempo de divergencia de las especies focales (A y B) en  $0.66N_e$ ,  $1.33N_e$  y  $2.66N_e$ , para profundidades totales de  $2N_e$ ,  $4N_e$  y  $8N_e$ . Estos escenarios representan condiciones más y menos desafiantes, respectivamente (Degnan y Rosenberg 2009). Las genealogías coalescentes fueron generadas para cinco y diez individuos por especie para cada árbol de especie, usando el programa *ms* (Hudson 2002), bajo un modelo de tamaño poblacional constante y no recombinación entre loci. Las secuencias de ADN se simularon con el programa Seq-Gen (Rambaut y Grassly 1997) bajo un modelo HKY de sustitución de nucleótidos, con un radio de transición-transversión de 3,0, y una distribución gamma 0,8, y la frecuencia de los nucleótidos se especificó en A = 0,3, C = 0,2, T = 0,3 y G = 0,2. Se generaron 500 pares de bases con  $\theta = 0,01$ . Los árboles de genes fueron reconstruidos utilizando el método de distancia *neighbor-joining* implementado en PAUP v4 (Swofford 2002).

Se simuló un modelo estrictamente coalescente ( $M = 0$ ), así como también diferentes magnitudes del parámetro migración entre las especies focales (A y B), correspondientes a  $M = 0.5$ , 1, 2 y 5 de A hacia B, describiendo mayor y menor tasa de flujo génico entre especies. Se simularon eventos recientes de migración, correspondientes a tiempos 0,1, 0,25 y 0,5 en unidades coalescentes, desde los terminales al pasado, para los tiempos totales 2, 4 y  $8N_e$  respectivamente. Se generaron matrices de datos combinados en cinco, diez, 20 y 30 loci.

Los datos simulados se analizaron siguiendo los pasos listados en la Fig. 2. Para cada uno de estos, se evaluó la verosimilitud de un total de cinco modelos diferentes, considerando  $M = 0, 0.5, 1, 2$  y  $5$ . Ya que el interés se basa en detectar flujo génico entre especies cuando está presente, cualquier magnitud de  $M$  estimada se considera un resultado satisfactorio.

*Datos reales.* Se analizó un conjunto de datos reales para evaluar el funcionamiento de la metodología para detectar flujo génico. Se utilizó la matriz publicada por Olave et al. (2011) que corresponde a lagartijas argentinas (*Liolaemus gracilis* y *L. bibronii*). Para estas especies se detectó hibridación utilizando tres genes nucleares y dos mitocondriales, además de datos morfológicos en un marco filogeográfico integral. Se estimaron dos posibles valores para  $M = 1.7$  y  $2.64$  y se demuestra a continuación que es posible detectar hibridación usando esta metodología, con un conjunto modesto de datos reales.

Se estimó un árbol de especies utilizando el programa \*BEAST v1.6.2 (Heled y Drummond 2010), usando cinco loci (dos mitocondriales y tres nucleares) y 16 individuos de *L. bibronii* y 18 de *L. gracilis*, además de tres especies utilizadas como grupos externos. El análisis se corrió por 100 millones de generaciones, muestreando la estimación de los parámetros cada 10.000 generaciones (*burnin* 10%). Se diagnosticó la convergencia por observación de valores de ESS de los parámetros mayores a 200. Esta estimación provee cuatro árboles de genes (los loci mitocondriales estiman el mismo árbol de gen). Dado que se incluyen individuos híbridos en la estimación de árboles de especies, se espera que el largo de ramas de *L. gracilis* y *L. bibronii* sea subestimado (Leaché et al. 2014). Esto es debido a que \*BEAST asume que toda la discordancia de los árboles de genes es debido solamente a coalescencias profundas y flujo génico post-divergencia, conlleva una subestimación de los tiempos de divergencia. Por lo tanto, se evaluó el impacto de usar una matriz completa (i.e. incluyendo muestras híbridas), y los efectos de remover las especies de las muestras asumidas como híbridas (i.e. muestras con mitocondria introgresada) para la estimación de árboles de especies.

El largo de las ramas del árbol de especies estimado fue convertido a unidades coalescentes usando el programa *ms* (largo de ramas de  $ms = 4N_e$  generaciones). Esto se consiguió multiplicando el largo de las ramas por el parámetro poblacional  $\frac{1}{\theta}$  ( $\theta = 4N_e\mu$ ; donde  $\mu$  es la tasa de mutación) para los genes nucleares simulados, y para los genes mitocondriales se multiplicó por  $\frac{4}{\theta}$ . Se utilizó el

programa Lamarc v2.1.8 (Kuhner 2006) para estimar los valores de  $\theta$  en una inferencia Bayesiana de 31.000 pasos de MCMC, con *burnin* del 10%. Se diagnosticó convergencia por los valores de  $ESS > 200$ .

Se comparó la verosimilitud de siete y nueve modelos diferentes para la matriz completa y sin híbridos, respectivamente. Se incluyó la combinación de parámetros  $M = 0, 1, 7$  y  $2, 64$  y los tiempos de migración  $t = 0, 01, 0, 02, \text{ y } 0, 04N_e$  para el caso de la matriz completa (divergencia del grupo focal estimada en  $0, 08N_e$ ;  $\theta = 0, 020639$ ) y  $t = 0, 01, 0, 25, 0, 5, \text{ y } 0, 75$  para el caso de la matriz sin híbridos (divergencia del grupo focal estimada en  $1N_e$ ;  $\theta = 0, 0212$ ).

El modelo fue seleccionado utilizando la prueba de *likelihood ratio test*. Para inferir la distribución de linajes extras de cada modelo se simularon 10.000 árboles de genes. Además se simularon distribuciones independientes para cada locus, para prevenir errores de estimaciones dadas entradas faltantes (esto no fue necesario en el estudio de simulaciones, ya que no había datos faltantes).

## Resultados

### *Inferencia de los linajes extras esperados*

Se siguieron los pasos (i) y (ii) descritos en la Fig. 2 y se generaron los gráficos de densidades basados en 10.000 árboles de genes simulados. Las Fig. 3 y 4 muestran los resultados obtenidos para el árbol asimétrico y simétrico, respectivamente. Estos gráficos muestran que el número esperado de linajes extras para cada modelo estudiado. Los gráficos de densidad para los árboles simétrico y asimétricos son muy similares, con una pequeña desviación que incrementa el número de linajes extras esperados en el caso del árbol simétrico.

Como es esperado, los gráficos de densidad muestran que al aumentar el largo total del árbol (de 2 a  $8N_e$ ), se disminuyó la varianza. Este patrón también se observó al decrecer el número de individuos de cinco a diez por especie. Asimismo, al disminuir la profundidad total del árbol (de 8 a  $2N_e$ ), la curva de la distribución se convirtió en una similar a la normal, y por otro lado, incrementar el parámetro  $M$ , resultó en una desviación de la distribución y desplazamiento en el eje  $x$ , lo que incrementó la media y la varianza. Incrementar el número de individuos de cinco a diez tuvo un impacto incipiente cuando el nivel de ILS es bajo (escenario con árboles de largo total



$\geq 4N_e$ ) y para el caso del parámetro  $M = 5$  mostró una clara separación entre las curvas representando cinco y diez individuos.

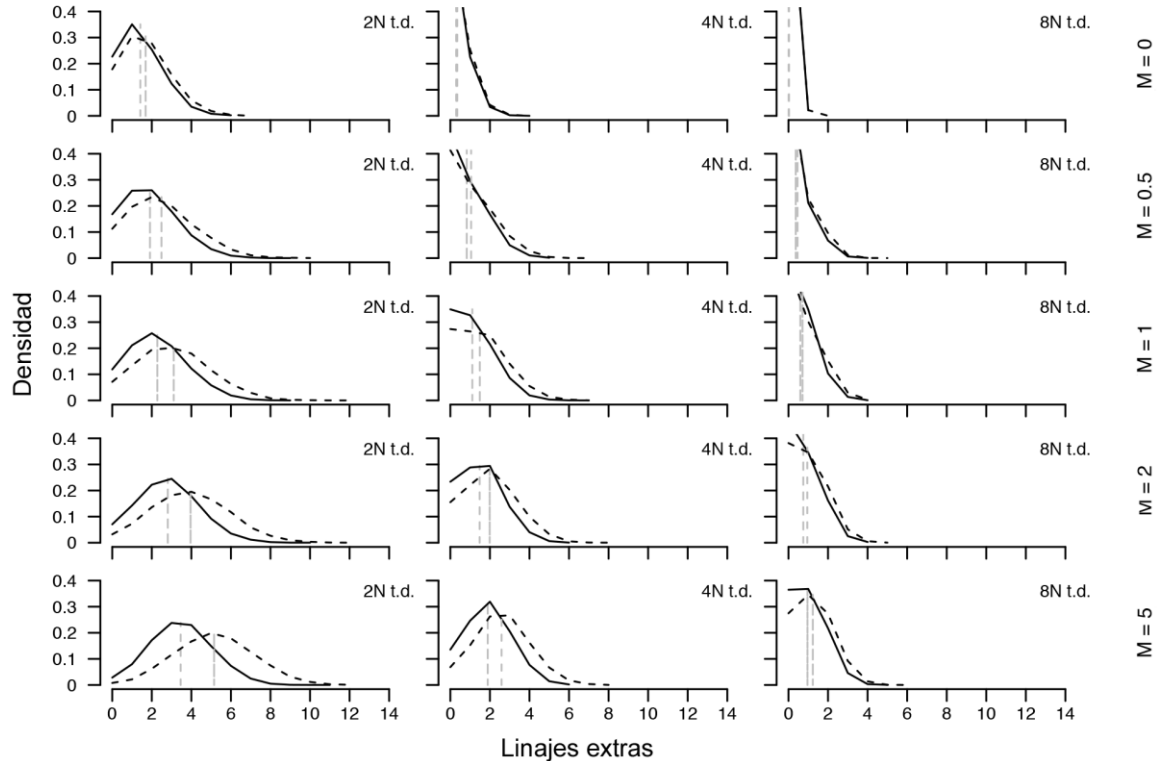


Figura 3: Gráficos de densidad de la distribución de linajes extras para el árbol asimétrico, obtenidos a partir de 10.000 árboles simulados. El eje x corresponde al número de linajes extras, el eje y corresponde a la densidad de muestras. Las diferentes profundidades del árbol se muestran en las columnas (t.d.) y los diferentes valores de  $M$  se muestran en las filas. Las matrices de cinco individuos por especie se muestran en líneas continuas y de diez individuos en líneas punteadas. Las líneas verticales corresponden a las medias calculadas para cada distribución.

#### *Precisión en detectar hibridación*

*Simulaciones.* Los resultados de las simulaciones se representan en las Figuras 4 (árbol asimétrico) y 5 (árbol simétrico). Los resultados para ambos árboles son similares, siendo el caso del árbol asimétrico algo mejor para el caso del escenario más desafiante ( $= 0,66N_e$ ;  $M = 1$ ).

En las condiciones modeladas con gran impacto de ILS ( $= 0,66N_e$ ) y valores de los parámetros bajos ( $0,5 < M < 1$ ), detectar flujo génico cuando está presente, fue más sencillo con matrices más grandes incluyendo 30 loci. Con mayores valores de  $M$  ( $\geq 2$ ), de diez individuos por especie y cinco loci fueron suficientes para obtener buenos resultados en  $>90\%$  de los casos (Fig. 4 y 5).

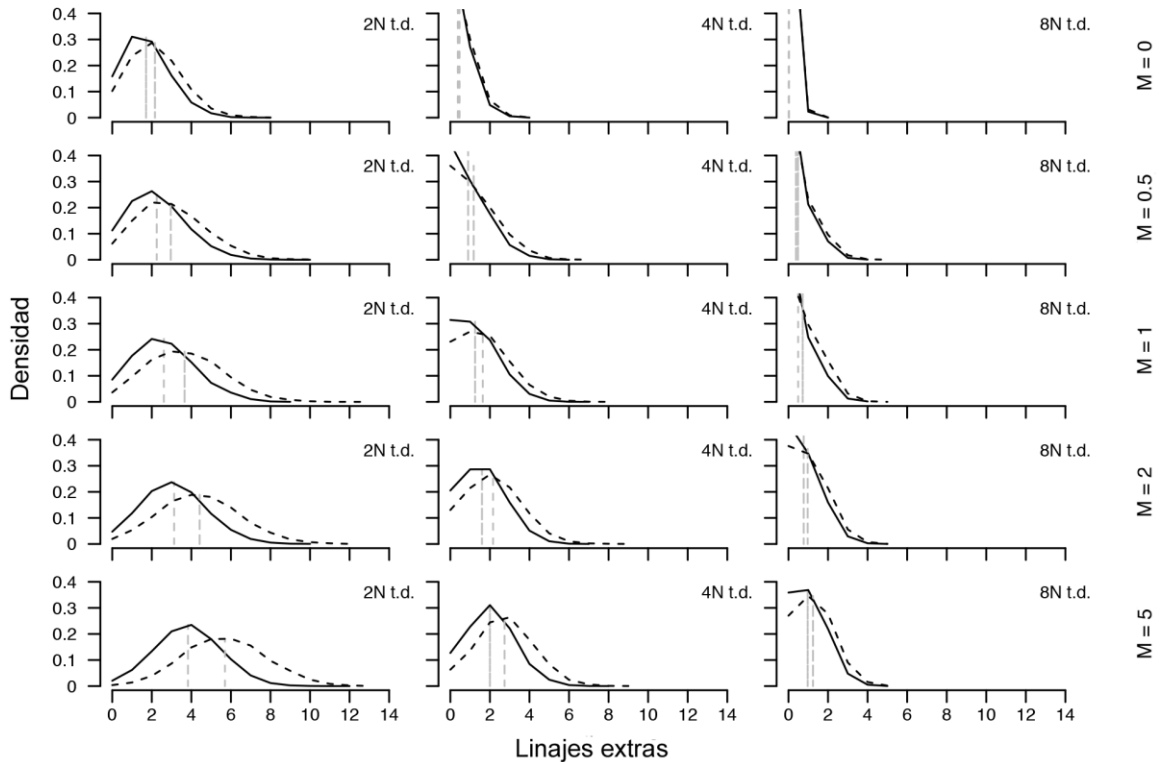


Figura 4: Gráficos de densidad de la distribución de linajes extras para el árbol simétrico, obtenidos a partir de 10.000 árboles simulados. El eje x corresponde al número de linajes extras, el eje y corresponde a la densidad de muestras. Las diferentes profundidades del árbol se muestran en las columnas (t.d.) y los diferentes valores de  $M$  se muestran en las filas. Las matrices de cinco individuos por especie se muestran en líneas continuas y de diez individuos en líneas punteadas. Las líneas verticales corresponden a las medias calculadas para cada distribución.

Bajo escenarios más favorables ( $\geq 1,33N_e$ ), se encontró que la señal de flujo génico puede ser detectada para  $>90\%$  de los análisis que se replicaron para este estudio, incluyendo bajos valores de  $M$  ( $=0,5$ ), y que estos resultados se mantuvieron para las matrices más chicas de cinco loci y cinco individuos por especie.

*Datos reales.* La Tabla 1 muestra los valores de verosimilitud y los resultados de la prueba de *likelihood ratio test* para los datos reales de *L. gracilis* y *L. bibronii*. El método recuperó  $M > 0$  como el resultado más probable para ambos casos de matriz completa y sin híbridos. El modelo seleccionado para el caso de la matriz completa fue  $M = 2,64$  y  $t = 0,01$ , y  $M = 1,7$  y  $t = 0,01$  para el caso de la matriz sin híbridos.

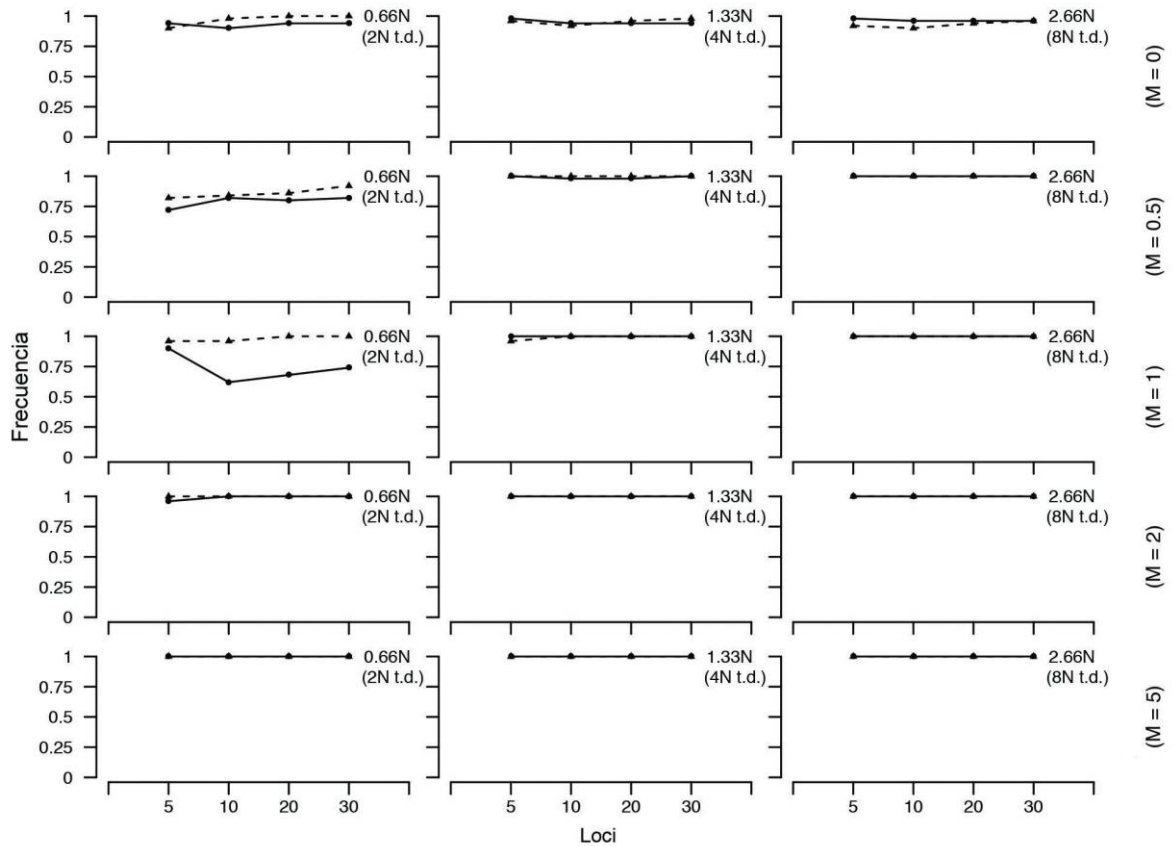


Figura 5: Frecuencia de los resultados exitosos entre los 25 análisis replicados por cada escenario estudiado, para el caso del árbol asimétrico. El eje x corresponde al número de loci utilizando y el eje y a la proporción de resultados exitosos. Diferentes valores de divergencia de las especies focales y de profundidad total del árbol (t.d.) se muestran en las columnas, y los diferentes valores para  $M$  se muestran en las filas. Matrices de cinco individuos por especie se muestran en líneas continuas y de diez individuos por especie en líneas punteadas.

## Discusión

### *Precisión, limitaciones y direcciones futuras*

El método nuevo propuesto en este capítulo mostró muy buen funcionamiento en detectar flujo génico. En general, se demostró que una matriz modesta de un pequeño número de individuos por especie y cinco loci fueron suficientes para detectar hibridación (Figs. 5 y 6).

Resultó evidente que detectar valores pequeños del parámetro  $M$  se vuelve un escenario más desafiante cuando el impacto de ILS es mayor (al reducir la profundidad del árbol [t.d.]; Figs. 5 y 6), pero es posible obtener buenos resultados al incluir matrices más grandes (diez individuos por especie, diez loci). En escenarios más favorables de  $2,66N_e$ , cinco individuos y cinco loci fueron suficientes para detectar  $M > 0$  cuando está presente, en  $>90\%$  de los análisis replicados (Figs. 5 y

6). El método mostró su menor capacidad para los casos del árbol simétrico, probablemente dado que la varianza del número de linajes extras fue un poco mayor (Fig. 4). A pesar de que la divergencia entre las especies focales A y B se mantuvo igual en ambos árboles (simétrico y asimétrico), la divergencia de las especies no focales fueron diferentes. La topología del árbol asimétrico es  $(D + (C + (A + B)))$ , mientras que la topología del árbol simétrico es  $((C + D) + (A + B))$ . La divergencia de C y D ocurre más recientemente en el tiempo en el árbol simétrico, lo que incrementa la probabilidad de ILS, dando lugar a un escenario un poco más desafiante. Estos resultados sugieren que incrementar el número de especies no focales puede disminuir la eficacia del método, por lo que se recomienda restringir el número de grupos externos.

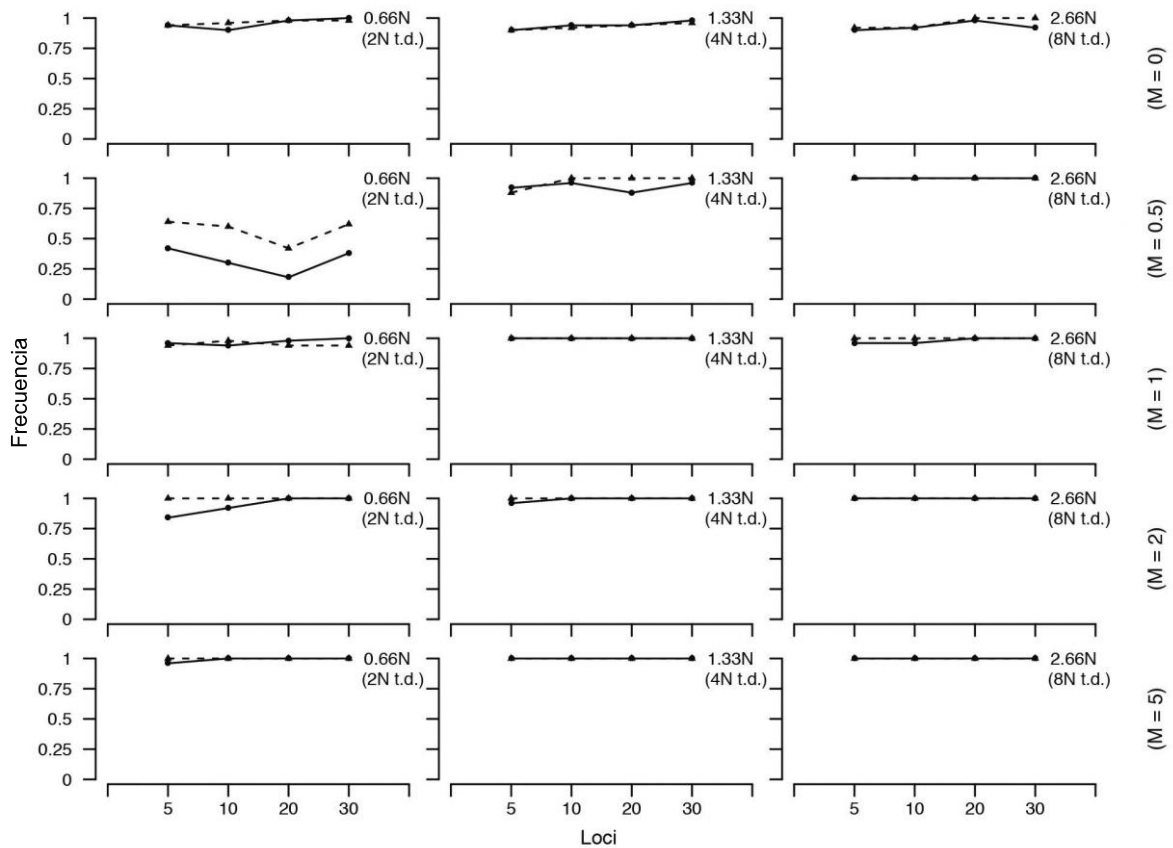


Figura 6: Frecuencia de los resultados exitosos entre los 25 análisis replicados por cada escenario estudiado, para el caso del árbol simétrico. El eje x corresponde al número de loci utilizando y el eje y a la proporción de resultados exitosos. Diferentes valores de divergencia de las especies focales y de profundidad total del árbol (t.d.) se muestran en las columnas y los diferentes valores para  $M$  se muestran en las filas. Matrices de cinco individuos por especie se muestran en líneas continuas y de diez individuos por especie en líneas punteadas.

Matriz	$M$	$t$	ln verosimilitud	
Completa	0	-	-29,5300	
	1,7	0,01	-13,3850	
		0,02	-14,0253	
		0,04	-15,6835	
		2,64	0,01	-12,2532
	2,64	0,02	-12,4610	
		0,04	-13,8941	
		<i>Likelihood ratio test: 4,1465 x10<sup>-09</sup></i>		
	Sin híbridos	0	-	-46,8811
1,7		0,01	-10,8451	
		0,25	-26,1016	
		0,50	-30,5512	
		0,75	-46,1574	
2,64		0,01	-12,1573	
		0,25	-25,8643	
		0,50	-28,5602	
		0,75	-45,9541	
<i>Likelihood ratio test: 2,0749 x10<sup>-17</sup></i>				

Tabla 1: Resultados del análisis de datos reales.

Los resultados del análisis de datos reales, detectaron hibridación entre *L. gracilis* y *L. bibronii*. La estimación del parámetro  $M$  reveló dos posibles valores dependiendo de la matriz utilizada (completa = 2,64 y sin híbridos = 1,7). Si bien se encontró discordancia en la estimación de  $M$ , el método detectó exitosamente  $M > 0$  utilizando ambas matrices.

Buckley et al. (2006) propuso un método que contempla la discordancia de árboles de genes, dados modelos estrictamente coalescentes. Este modelo asume que violar la hipótesis nula de los valores esperados, indica hibridación. Este método es similar al propuesto por Joly et al. (2009), que estima y compara distancias genéticas de secuencias de dos especies con la predicción de un modelo estrictamente coalescente. En este caso, las desviaciones de la hipótesis nula también son atribuidas a flujo génico.

Un método que ha ganado popularidad es el algoritmo de ABBA/BABA, el cual busca excesos de variantes compartidas derivadas (Green et al. 2010). Para ello, considera un alelo ancestral “A” y uno derivado “B”, y basado en la predicción de que dos SNPs particulares,

denominados “ABBA” y “BABA”, deberían tener potencialmente la misma frecuencia bajo un escenario de ILS sin flujo génico, un exceso de ABBA es interpretado como una señal de flujo génico. Este método es computacionalmente eficiente y constituye una manera útil de analizar datos genómicos. Sin embargo, como no se pone a prueba explícitamente flujo génico, el método fue criticado por Martin et al. (2013) bajo el argumento de que un exceso de variantes compartidas derivadas puede darse por efecto de estructuración poblacional.

En este capítulo se propone una nueva perspectiva, incluyendo: (i) usar el concepto de linajes extras como una forma de medir la discordancia entre árboles de genes, dado ILS y flujo génico, (ii) calcular la verosimilitud de los árboles de genes reales dado un modelo, y (iii) seleccionar el mejor modelo usando la prueba de *likelihood ratio test*. También se provee un conjunto de funciones escritas en lenguaje de R para automatizar el proceso de simulaciones y evaluación de las hipótesis (cuadro 1).

Mesquite (Maddison y Maddison 2010) es un programa muy utilizado en biología evolutiva, que permite simular, estimar el número de linajes extras y devolver un histograma de frecuencia de los linajes extras esperados. Es decir, este programa permite realizar la mayor parte de los pasos realizados por las funciones de R desarrolladas aquí. Sin embargo, la combinación de ms y Phylonet paralelizados permiten arribar a resultados de manera mucho más rápida y eficiente que Mesquite. Este avance provee la opción de evaluar mayor número de modelos y simular mayor cantidad de árboles para mejorar la precisión de la estimación de las distribuciones.

La metodología presentada en este capítulo presenta importantes ventajas, pero también se detectaron ciertas limitaciones. Por ejemplo, si bien la topología del árbol de especie puede poner a prueba para modelos diferentes, el árbol de especies híbridas que se utilizó aquí se asumió como una topología conocida. Esto constituye un aspecto importante para el método, porque estimar un árbol de especies incluyendo muestras híbridas con los programas disponibles tiene un impacto importante en el largo de las ramas y la topología (ver Leaché et al. 2014). Aunque este método se detectó como robusto a las violaciones de este supuesto (resultados reales; Tabla 1), esto sigue siendo una desventaja. Estimar un árbol de especies al mismo tiempo que estimar el parámetro  $M$  sería un punto importante para desarrollar, pero también involucra un problema complicado de resolver ya que implica explorar un espacio de posibilidades filogenéticas para maximizar la verosimilitud. Por ahora, se observa que el método es prometedor en este punto, donde las simulaciones mostraron muy buen funcionamiento, es fácil de implementar y al tomar árboles de genes como archivos de ingreso, funciona rápido.

A partir de este capítulo surgen nuevas preguntas, sugiriendo la necesidad de continuar explorando el funcionamiento del método. Por ejemplo, es esperable que si el flujo génico ocurrió más distantes en el tiempo de divergencia de las especies, sea más sencillo detectar  $M > 0$ . Sería interesante evaluar que tan atrás en el tiempo puede haber ocurrido algún evento de flujo génico y tener capacidad de detectarlo. Por otro lado, pueden evaluarse modelos más complejos, como por ejemplo cambios en el  $N_e$  a lo largo del tiempo, combinados con flujo génico. Esto sería algo importante de evaluar, dado que cambios en el  $N_e$  afectan el número esperado de linajes extras. Sin embargo, modelos más complejos incluyendo cambios en el  $N_e$  y  $M$  pueden oscurecer los resultados, porque se esperan los mismos patrones dada la interacción de ambos parámetros: incrementar tanto  $N_e$  como  $M$  resultará en mayor impacto de ILS, haciendo complicada la distinción entre ambos procesos. También puede explorarse el efecto de agregar más especies que hibriden. Para este caso, se predice que será más sencillo detectar al menos un  $M > 0$ , pero aún necesita ser explorada la precisión en detectar múltiples especies hibridando.

#### *Linajes extras y flujo génico*

El término “coalescencias profundas” fue introducido por Maddison (1997) como equivalente a ILS, para referirse a la coalescencia de dos alelos más atrás en el tiempo comparado con el evento de especiación. Maddison sugirió que el costo de coalescencias profundas puede ser cuantificado por el número de linajes extras, e introdujo la idea de un árbol filogenético que minimice el número de linajes extras si la fuente de discordancia es atribuida exclusivamente a coalescencias profundas. Posteriormente Than y Nahkleh (2009) desarrollaron un algoritmo capaz de contar los linajes extras e inferir una filogenia al minimizar el número de coalescencias profundas (*minimizing deep coalescences*, MDC), implementado en el paquete Phylonet (ver también Zhang 2011 para otro algoritmo). Entre otras aplicaciones, contar el número de linajes extras permitió poner a prueba diferentes modelos, y explicar la evolución de diferentes organismos atribuyendo la fuente de variación a ILS (e.g. capítulo 2; Knowles et al. 2007).

Hasta el momento, contar el número de linajes extras ha sido atribuido a coalescencias profundas. En este capítulo, se demostró que también es una forma útil de inferir la discordancia de árboles de genes esperada por la combinación de ILS y flujo génico. Esto es posible porque incluir flujo génico en el modelo resulta en un incremento en el número de linajes extras que se cuentan (Figs. 3 y 4), y provee una perspectiva nueva al asumir el número de linajes extras no sólo estrictamente como una función de las coalescencias profundas.

Los conflictos entre árboles de genes son usualmente vistos como obstáculos en estudios evolutivos, pero perspectivas nuevas sugieren que el conflicto de los árboles de genes provee una oportunidad de obtener información de los procesos que modelaron los genomas de los organismos (Degnan y Rosenberg 2009). Muchos estudios han usado el conflicto entre genealogías de genes para inferir parámetros poblacionales ancestrales, como el tamaño poblacional y los tiempos de divergencia (Meng y Kubatko 2009; Than et al. 2006), y para examinar el proceso de divergencia de las especies (Ebersberger et al. 2007; Innan y Watanabe 2006). Sin embargo, muchos programas atribuyen la discordancia de árboles de genes a ILS, e incorporar otros procesos posibles constituye un desafío en biología evolutiva. Además, detectar hibridación tiene implicancias importantes en el diseño de planes de conservación, así también como para ayudar a entender el origen y mantenimiento de la variación genética de las especies en un marco evolutivo integral (Knowles 2009).





**Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales**  
**Universidad Nacional de Córdoba**

**CAPÍTULO 4: FILOGEOGRAFÍA ESTADÍSTICA DE LOS  
COMPLEJOS BOULENGERI Y ROTH: PONIENDO A PRUEBA LA  
HIPÓTESIS DE HIBRIDACIÓN EN UN ENFOQUE BASADO EN  
MODELOS**

---

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas

**MELISA OLAVE**  
**ALUMNA**

**MARIANA MORANDO**  
**DIRECTORA**

# Introducción

Desde hace varias décadas, las lagartijas han sido consideradas organismos modelo de estudio en ecología y evolución, y más recientemente también se las ha considerado como organismos modelo para estudios de filogeografía y de especiación (revisados en Camargo et al. 2010). En particular, el género *Liolaemus* ha sido foco de numerosos estudios realizados en estas disciplinas en la última década; algunos de los cuales han detectado una variedad de procesos evolutivos muy interesantes, como los son la división de linaje incompleta (*incomplete lineage sorting*, [ILS]) entre especies cercanamente relacionadas (Morando et al. 2004; 2007; Avila et al. 2006; Breitman et al. 2011; Camargo et al. 2012; Medina et al. 2013), así como también entre los principales clados dentro de uno de los subgéneros (*Eulaemus*, capítulo 2). Para este último caso, en el capítulo 2 se demostró, a través del estudio utilizando modelos explícitos y simulaciones, que el escenario evolutivo con mayor apoyo estadístico por los múltiples loci estudiados, corresponde a dos eventos de radiaciones de linajes simultáneos (datados hace 10.14 ma y 5.48 ma).

Además, un proceso evolutivo muy interesante, como lo es la hibridación interespecífica, se ha demostrado entre las especies *L. gracilis* y *L. bibronii* a partir de estudios multilocus y morfológico en un marco filogeográfico integral (Olave et al. 2011; capítulo 3). Este proceso también fue sugerido para muchos otros grupos (Morando et al. 2004; Breitman et al. 2011; Medina et al. 2013; Olave et al. 2014), incluyendo los complejos de especies *boulengeri* y *rothi*, para los cuales Avila et al. (2006) reportaron extensa parafilia mitocondrial. Para este último caso, también Abdala (2007) recuperó parafilia entre ambos complejos basado en caracteres morfológicos. Por otro lado, también en el capítulo 1 se observó extensa parafilia en el árbol de especies (Fig. 8 del capítulo 1), lo que llevó a sugerir estudios más detallados acerca de las posibles causas de esta discordancia.

La hibridación es una explicación posible para el conflicto de árboles de genes con respecto al árbol de especies (Maddison 1997; Funk y Omland 2003), pero para el caso de especies cercanamente relacionadas, como es el caso de los grupos dentro de *Liolaemus*, el proceso de ILS (también conocido como coalescencias profundas; Maddison 1997) también es una explicación plausible. Distinguir entre estos dos procesos constituye un desafío, dado que se esperan patrones similares. En principio, se pueden realizar algunas observaciones cualitativas al contemplar el árbol de gen mitocondrial, ya que su naturaleza haploide y estrictamente materna,

lleva a que su tamaño poblacional sea cuatro veces menor que un locus nuclear. Entonces, el genoma mitocondrial tiene una probabilidad menor de sufrir los efectos de ILS, relativo a un gen nuclear (Funk y Omland 2003). Por esto, si se observa introgresión de haplotipos mitocondriales se plantea la idea de una posible hibridación, sea actual o antigua. Sin embargo, estas observaciones no son concluyentes, y es necesario evaluar estadísticamente la validez de estas hipótesis. Por ello, en el capítulo 3 se describió una metodología nueva para evaluar la probabilidad de flujo génico interespecífico. El método consiste en proponer y evaluar un conjunto de modelos diferentes, incluyendo topología de un árbol de especies, largo de las ramas, y un parámetro  $M$ , describiendo un evento de flujo génico. El método se basa en calcular la verosimilitud de diferentes modelos propuestos, y utilizar la prueba de *likelihood ratio test* para determinar la significancia de la diferencia de la verosimilitud de los modelos estudiados.

En este capítulo se expandió la matriz empleada por Avila et al. (2006), quien hipotetizó hibridación entre los complejos *boulengeri* y *rothi* como posible explicación para la introgresión mitocondrial, y se implementó el método descrito en el capítulo 3, para poner a prueba con modelos explícitos la hipótesis de hibridación propuesta para estos complejos. Se incluyeron un total de 14 loci y 127 individuos representando todas las especies descritas de ambos complejos ( $n = 11$ ). La elaboración de este capítulo, permitió incluir una discusión acerca del rol de la hibridación en el género *Liolaemus*.

## Materiales y métodos

### *Trabajo de campo*

Se incluyeron un total de 127 individuos representando todas las especies descritas de los complejos *boulengeri* y *rothi* (complejo *boulengeri*: *L. boulengeri*, *L. senguer*, *L. inacayali*, *L. telsen*, *L. tehuelche*; complejo *rothi*: *L. sagei*, *L. hermannunezi*, *L. tromen*, *L. sitesi*, *L. lobo*, *L. rothi*), colectados principalmente en Argentina, con un pequeño número de Chile (Fig. 1). Los especímenes fueron colectados a mano o con el uso de horquetas, sacrificados con inyección pericárdica de tiopental sódico Abbot®/Pentovet®, diseccionados para extraer muestras de hígado o músculo para el estudio molecular, fijados con 10-20% de formaldehído, y posteriormente transferidos a etanol al 70%. Las muestras de tejidos están conservadas en freezer con 96% de etanol. Los especímenes *voucher* se encuentran depositados en la colección herpetológica LJAMM-CNP del Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Argentina

(CENPAT-CONICET, <http://www.cenpat.edu.ar/nuevo/colecciones03.html>), y en el museo Bean Life Science, Brigham Young University (BYU; <http://mlbean.byu.edu/ResearchCollections/Collections/ReptilesandAmphibians.aspx>) (Apéndice B).

#### *Trabajo de laboratorio*

Se secuenciaron dos genes mitocondriales (cit-b y 12S), cuatro anónimos nucleares (ANL: A1D; A4B; A9C y A12D) y ocho loci codificantes de proteínas (NPCL: EXPH5, KIF24, MXRA5, DNAH3, PRLR, PNN, SNCAIP, CMOS), un total de 14 genes (10.049 bp). La amplificación se realizó según los pasos descriptos en el capítulo 1. Las secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher v4.8. (™Gene Codes Corporation Inc. 2007) y alineadas usando el programa MAFFT (Kato et al. 2002). Los genes codificantes de proteínas fueron traducidos a aminoácidos para corroborar que no existan errores de codones. Para los genes nucleares se descartó recombinación, usando el programa RDP (Martin y Rybicki 2000; Heath et al. 2006).

#### *Inferencia del árbol mitocondrial*

Se reconstruyó un árbol mitocondrial incluyendo 127 individuos, usando el programa BEAST 1.6.2 (Heled y Drummond 2010). Se corrió un análisis de  $10 \times 10^6$  generaciones de MCMC, muestreando la estimación de los parámetros cada 1.000 generaciones (*burnin* 10%). La convergencia se diagnosticó con la observación de los valores ESS mayores a 200.

#### *Inferencia del árbol filogenético*

En el análisis de árbol de especies se incluyeron como candidatos a híbridos las cuatro especies en las cuales se detectó parafilia mitocondrial. Estas especies son *L. rothi*, *L. boulengeri*, *L. telsen* and *L. tehuelche* (ver hipótesis filogeográficas en la sección de resultados). Este árbol de especies fue utilizado como modelo en la puesta a prueba de la hipótesis de hibridación. La restricción de grupos no focales se determinó dada la recomendación descripta en el capítulo 3 de no incluir demasiadas grupos externos, a fin de mejorar la precisión del método. Dado que la hibridación puede llevar a inferencias topológicas erróneas (Leaché et al. 2014); se eliminaron los posibles híbridos con mitocondria introgresada (de la especie *L. rothi*), para evitar errores

potenciales en la inferencia del árbol de especie. De todas maneras, se mantuvo un buen número de representantes de la especie (= 34), lo cual resulta satisfactorio para el funcionamiento de \*BEAST. Se utilizaron los 14 loci para realizar la inferencia con \*BEAST (Heled y Drummond 2010) por  $500 \times 10^6$  generaciones de MCMC y muestreando la estimación de los parámetros cada 10.000 generaciones (*burnin* 10%). La convergencia fue diagnosticada por la observación de los valores de ESS de los parámetros mayor a 200.

### Hipótesis de hibridación

Para poner a prueba la hipótesis de hibridación se siguieron los pasos listados en el capítulo 3. Se emplearon 13 árboles de genes (*cit-b* y 12S fueron usados para reconstruir el mismo árbol génico) y 93 muestras de *L. rothi*, *L. boulengeri*, *L. telsen* and *L. tehuelche*.

*Construcción del modelo.* Se evaluaron un total de diez modelos, ilustrado en la Fig. 1. Se corrigió el largo de ramas resultado de \*BEAST multiplicando por  $1/\theta$  ( $\theta = 4N_e\mu$ ;  $N_e$  donde  $N_e$  es el tamaño poblacional efectivo y  $\mu$  la tasa de mutación), para el caso de los genes nucleares, y por  $4/\theta$  para el caso del árbol mitocondrial. Para estimar  $\theta$ , se utilizó el programa Lamarc v2.1.8 (Kuhner 2006), con una inferencia Bayesiana de 31.000 pasos de MCMC (*burnin* 10%). Se diagnosticó la convergencia con la observación de valores de ESS mayores a 200.

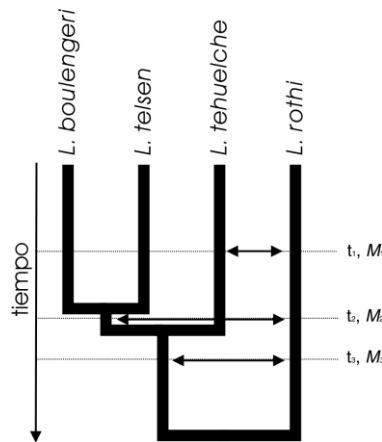


Figura 1: Ilustración del modelo general que describe la topología y los parámetros de flujo génico ( $M_1$ ,  $M_2$  y  $M_3$ ). La topología y el largo de las ramas son constantes en los diferentes modelos, y los parámetros de migración varían en  $M_1 = 0, 1, 2, 3, 4$  y  $5$ .

Se emplearon tres parámetros  $M$  ( $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3$ ), como se muestra en la Fig. 1. El modelo más simple corresponde a  $M_1$ ,  $M_2$ ,  $M_3 = 0$  (estrictamente coalescente); y modelos más complejos corresponden a  $M_1$  y  $M_2 = 1; 2; 3; 4; 5$ , y dejando  $M_1$  y  $M_2 = 0$  y  $M_3 = 2; 4$ . Por lo tanto, se

evaluaron un total de diez modelos con diferentes valores de flujo génico para los taxa: 1-*L. rothi* y *L. tehuelche*; 2-*L. rothi* y el ancestro común de *L. boulengeri* + *L. telsen*; 3-*L. rothi* y el ancestro común de *L. tehuelche*, *L. boulengeri* + *L. telsen* (ver hipótesis filogeográficas de la sección de resultados).

*Inferencia de la distribución de linajes extra esperados.* Se utilizó el programa *ms* (Hudson 2002) para simular 10.000 árboles de genes por locus para inferir la distribución de linajes extra dado el modelo propuesto. Se utilizó el programa Phylonet (Than y Nahkleh 2009) para contar los linajes extra.

*Selección del modelo.* Se realizó una prueba de *likelihood ratio test* entre el modelo que maximiza la verosimilitud versus la hipótesis nula ( $M_1, M_2, M_3 = 0$ ).

#### *Estimación del tiempo de hibridación*

Si la parafilia mitocondrial observada resulta de hibridación, datar los tiempos de coalescencia de la mitocondria podría ayudar a aproximar la ocurrencia de hibridación. Se espera que esta estimación resulte en datar la coalescencia más profunda en tiempo de la ocurrencia del evento de hibridación (ver Edwards y Beerli 2000). Sin embargo, esto puede ser interpretado como el tiempo más antiguo posible para la introgresión mitocondrial.

Entonces, se tomaron como *prior* las tasas de sustitución estimadas para los genes mitocondriales en el capítulo 1, y se utilizó BEAST 1.6.2 y un reloj estricto para cada región mitocondrial independiente, estimada usando una distribución gamma. Para el caso de 12S el valor inicial se calibró en 0,006339; shape = 1; scale = 0,009, lo que lleva a una mediana aproximada de 0,006339. Para el caso de cit-b se calibró un valor inicial de 0,019355; shape = 1; scale = 0,0174, lo que lleva a una mediana aproximada a 0,019355. Se utilizó el proceso Yule como *prior* del modelo, se corrió un análisis de  $100 \times 10^6$  generaciones de MCMC, y se muestrearon parámetros cada 10.000 intervalos (*burnin* 10%). Se diagnosticó convergencia por la observación de valores de ESS > 200.

#### *Comparaciones morfológicas*

Se comparó la morfología de los individuos que mostraron parafilia mitocondrial con respecto al resto de las especies. Se colectaron datos morfológicos para un total de 118 muestras (18 individuos of *L. boulengeri*, nueve de *L. telsen*, 23 de *L. tehuelche* y 68 de *L. rothi*). Datos

los resultados del árbol mitocondrial (Fig. 2), se separaron los individuos de *L. rothi* que mostraron parafilia mitocondrial en dos grupos: i.mt (i) y i.mt (ii). Los individuos del grupo i.mt (i) corresponden a los taxa recuperados como hermanos a *L. telsen* y *L. boulengeri*, y los del grupo i.mt (ii) corresponden a los taxa recuperados como hermanos a *L. tehuelche*.

Se incluyeron diez variables morfométricas: largo hocico-cloaca (*snout-vent length*, **SLV**, distancia desde la nariz al margen posterior de las escamas precloacales), distancia axila-ingle (*axila-groin distance*, **AGD**, distancia entre la inserción de la extremidad anterior y el tórax, hasta la parte frontal del inicio de la extremidad posterior), largo de la mano (*hand length*, **HaL**, distancia entre la base de la palma y la parte terminal del tercer dígito), largo del radio (*radius-ulna length*, **RUL**, distancia entre la mano y codo), largo del húmero (*humerus length*, **HL**, distancia entre el final del radio y el hombro), largo del pie (*foot length*, **FoL**, distancia entre la base del talón y la base del final del cuarto dígito), largo de la tibia (*tibio-fibula length*, **TFL**, medido desde la rodilla hasta el ángulo interno con el pie), largo del fémur (*femur length*, **FL**, desde la rodilla hasta la inserción en la pelvis) y distancia entre rodillas (*knee-knee distance*, **KKD**, distancia entre las rodillas en ángulo recto con el abdomen).

También se incluyeron variables de patrones de coloración: línea vertebral de melanismo (*vertebral line melanism*, **VLM**, forma de las manchas dorsales), número de manchas a la izquierda de la línea vertebral (*number of spots at the left vertebral line*, **NSLVL**), número de manchas a la derecha de la línea (*vertebral number of spots at the right vertebral line*, **NSRVL**), presencia de mancha blanca debajo de las manchas de VLM (*resence of a white spot below VLM spots*, **PWSVL**), melanismo paraventral (*paraventral melanism*, **PVM**), número de manchas paraventrales izquierdas (*number of left paraventral spots*, **NLPS**), presencia de mancha blanca debajo de las manchas PVM (*presence of a white spot below PVM spots*, **PWSPL**), presencia de línea media (*mean line*, **ML**, entre MLV y MPV), melanismo escapular (*scapular melanism*, **SM**, manchas a los lados del cuerpo entre el cuello y los hombros), melanismo gular (*gular melanism*, **GM**), melanismo ventral (*ventral melanism*, **VM**), color ventral (*ventral color*, **VC**), melanismo anterior (*forelimb melanism*, **FM**), melanismo posterior (*hindlimb melanism*, **HM**).

Para evaluar las diferencias en morfología se utilizó el programa Infostat y se calcularon los estadísticos resumen de cada grupo de variables. Se realizaron pruebas multivariadas para los caracteres cuantitativos. En primer lugar se realizó un MANOVA y contrastes de Hotteling, y posteriormente un análisis discriminante. Para las variables cualitativas, se utilizó el programa R, siguiendo a Escudero et al. (2012), se realizaron pruebas de chi cuadrado de Pearson con 5.000 permutaciones de Markov, posterior a construir tablas de contingencia.

# Resultados

## Hipótesis filogeográficas

La Figura 2 ilustra el árbol mitocondrial inferido. Se recuperaron dos clados principales con alto soporte: el complejo *boulengeri* y el complejo *rothi*. La mayoría de las 11 especies se recuperaron como monofiléticas, pero *L. rothi* fue recuperado como polifilético, anidado dentro del complejo *boulengeri*. Un linaje mitocondrial se encuentra conformado por 15 individuos dentro de un clado no resuelto con *L. telsen* y *L. boulengeri*, y anidado dentro de *L. telsen* se recuperó un individuo de *L. rothi*. También seis muestras de *L. rothi* fueron recuperadas como clado hermano de *L. tehuelche*, más dos individuos de *L. rothi* anidados dentro de *L. tehuelche*.

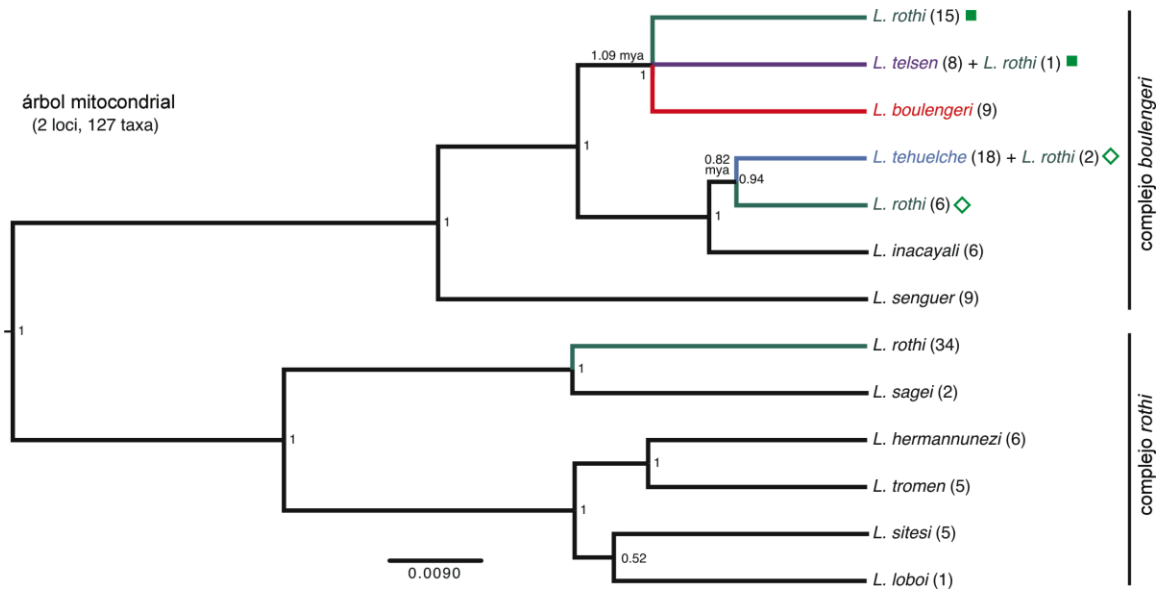


Figura 2: árbol mitocondrial de los complejos *boulengeri* y *rothi* (127 taxa, 2 loci mitocondriales). Se identifica con cuadrados verdes los individuos morfológicamente identificados como *L. rothi* dentro de *L. telsen* y *L. boulengeri*, y los individuos hermanos a *L. tehuelche* con rombos de bordes verdes.

Las seis especies del complejo *rothi* están completamente resueltas y todos los nodos altamente soportados con excepción del clado (*L. lobo* + *L. sitesi*). Un grupo de 34 ejemplares de *L. rothi* fueron recuperados como grupo hermano de *L. sagei*, con alto soporte (Fig. 2). En resumen, el árbol mitocondrial recupera los individuos de morfología *L. rothi* en cinco nodos; la mayoría de los individuos fue recuperado como un grupo dentro del complejo *rothi*, y los restantes 22 individuos anidados dentro del complejo *boulengeri*.



La Figura 3 muestra el solapamiento de las distribuciones geográficas de *L. rothi*, *L. telsen*, *L. tehuelche* y *L. boulengeri*. En particular, *L. rothi* tiene la distribución más grande y se superpone con *L. tehuelche* en el noroeste de su rango, con *L. boulengeri* en el centro-oeste y con *L. telsen* hacia el este. Los individuos de *L. rothi* que exhiben la mitocondria relacionada con el complejo *boulengeri* fueron colectados a lo largo de diferentes puntos de la distribución de *L. rothi*. Esta distribución parapátrica asociada con los haplotipos mitocondriales mezclados, sugieren reciente hibridación como una hipótesis plausible. Específicamente, los patrones observados sugieren que la introgresión mitocondrial puede haber ocurrido entre *L. rothi* y *L. boulengeri*, *L. telsen* y *L. tehuelche*.

Los tiempos de divergencia estimados (Fig. 2) proveen valores cercanos para la coalescencia de la mitocondria en ambos casos para la parafilia observada. La estimación de la coalescencia de la mitocondria de *L. rothi* con *L. telsen* y *L. boulengeri* fue datada en 1.09 ma (HPD: 0.23 – 3.16); y con *L. tehuelche* en 0.82 ma (HPD: 0.15-2.27).

Entonces, las hipótesis que se plantean evaluar correspondientes a la Fig. 1 son:

H<sub>0</sub>: Toda la discordancia de árboles de genes se debe a ILS ( $M_{1,2,3} = 0$ ).

H<sub>1</sub>: Flujo génico entre *L. rothi* y *L. tehuelche* ( $M_1 > 0$ ).

H<sub>2</sub>: Flujo génico entre *L. rothi* y el ancestro común de (*L. boulengeri* + *L. telsen*) ( $M_2 > 0$ ).

H<sub>3</sub>: Una combinación de H<sub>1</sub> y H<sub>2</sub>, con  $M_1 > 0$  y  $M_2 > 0$ .

H<sub>4</sub>: Flujo génico entre *L. rothi* y el ancestro común de *L. tehuelche*, *L. telsen* y *L. boulengeri*, con  $M_3 > 0$ .

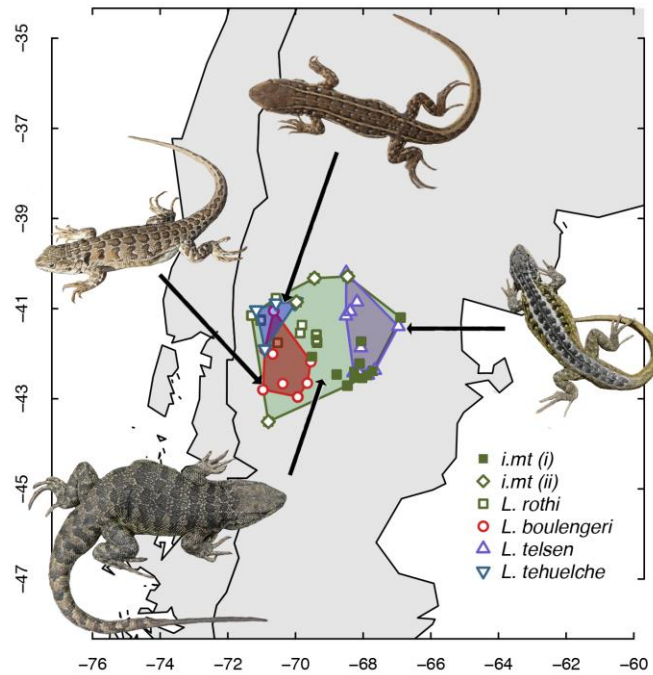


Figura 3: Mapa de distribución de las especies focales en la prueba de hibridación. La distribución solapada entre *L. rothi* y *L. tehuelche*, *L. telsen* y *L. boulengeri*. Las muestras con posible introgresión mitocondrial se muestran con cuadrados verdes y rombos (en concordancia con el árbol mitocondrial de la Fig. 2).

### Hipótesis de hibridación

Los resultados de verosimilitud de cada modelo se muestran en la Tabla 1. Cada modelo con  $M_1$  y  $M_2 > 0$  muestra una verosimilitud mayor con respecto a un modelo estrictamente coalescente. Modelos incluyendo  $M_3 > 0$ , muestran una verosimilitud igual que un modelo más simple de ILS.

El método detecta hibridación entre *L. rothi* y *L. tehuelche*, así como también entre *L. rothi* y el ancestro común de *L. telsen* y *L. boulengeri* como la explicación más probable para el grado discordancia de árboles de genes. El modelo seleccionado es  $M_1 = 5$ ;  $M_2 = 5$ ;  $M_3 = 0$  ( $\ln l = -80,7780$ ;  $\text{likelihood ratio test} = 3,7041 \times 10^{-61}$ ).

Modelo			Ln verosimilitud
$M_1$	$M_2$	$M_3$	
0	0	0	-256,8426
0	1	0	-254,1757
1	0	0	-223,6613
1	1	0	-220,6944
2	2	0	-157,5218
3	3	0	-153,6301
4	4	0	-149,8078
5	5	0	-120,7271
0	0	1	-256,8426
0	0	4	-256,8426

*Likelihood ratio test*: 3,7041 x10<sup>-61</sup>

Tabla 1: Resultado del cálculo de verosimilitud y selección de modelos siguiendo la prueba de *likelihood ratio test*. El modelo seleccionado se muestra en celdas grises.

### Comparaciones morfológicas

Los estadísticos resumen se muestran en la Tabla 2. *Liolaemus rothi* tiene una media mayor para la mayoría de las variables morfométricas. El resultado de la prueba MANOVA corresponde a resultados significativos (valor  $p < 0,001$ ;  $F = 3.722$ ) y la prueba de contraste de Hotteling se muestran en la Tabla 2. Las tres especies del complejo *boulengeri* (*L. telsen*, *L. tehuelche* y *L. boulengeri*) fueron recuperadas como grupos separados (llamados grupo “C”), mientras que *L. rothi* constituye un grupo solapado con i.mt (ii) (grupo “A”). El grupo “B” se conforma por i.mt (i) y i.mt (ii).

El gráfico resultante del análisis discriminante muestra nubes de puntos solapados entre la mayoría de los grupos, con cierto nivel de separación entre *L. rothi* y las muestras con mitocondria introgresada (i.mt [i] and [ii]), con respecto al complejo *boulengeri* (Fig. 4). Los centroides de los grupos se resumen en la Tabla 4, y la prueba de clasificación cruzada se muestra en la Tabla 4. Mientras que la mayoría de los individuos fueron clasificados con su grupo original propuesto, todos los grupos muestran alguna proporción de error de clasificación. Por ejemplo, algunas de las muestras de *L. rothi* fueron clasificadas como especies parte del complejo *boulengeri*, con una muestra de *L. rothi* asociada a *L. tehuelche*, *L. boulengeri* y *L. telsen*, mientras que no infirió el caso recíproco. Además, los individuos de los grupos i.mt (i) e i.mt (ii) se mezclaron entre sí, al igual que con *L. rothi*.

La prueba de chi-cuadrado para las variables cualitativas de patrones de coloración mostraron valores no significativos para las diferencias entre los grupos i.mt (i) y (ii), así como también para la comparación de estos con *L. rothi*, *L. boulengeri*, *L. telsen* y *L. tehuelche* (Tabla 5). Por otro lado, se encontraron valores significativos para la diferencia observada entre *L. rothi* y las especies del complejo *boulengeri*.

Entonces, los grupos i.mt (i) e i.mt (ii) muestran una tendencia a mostrar valores intermedios basado en los caracteres cualitativos de patrones de coloración, con características más similares a *L. rothi* basado en los caracteres cuantitativos estudiados aquí.

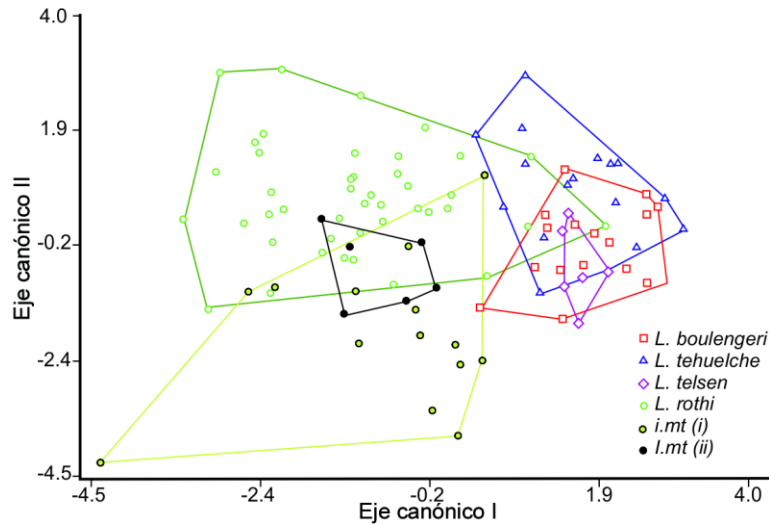


Figura 4: Gráfico resultante del análisis discriminante para las variables cualitativas.

Especies/grupo	variables													n	clase	
	SVL	AGD	HaL	RUL	HL	FoL	TFL	FL	KKD	NSLVL	NSRVL	NLPS	NRPS			
i.mt (i)	77,57	36,81	12,06	13,37	11,55	21,68	15	14,94	34,2	7,71	7,79	6,86	7,21	14		B
i.mt (ii)	73,54	35,74	11,26	12,25	10,93	20,54	12,72	13,3	29,87	8,5	8,5	7,67	8	6	A	B
<i>L. rothi</i>	75,16	36,67	12,02	13,43	11,74	20,91	14,86	15,66	32,75	8,51	8,44	7,47	7,4	43	A	
<i>L. telsen</i>	59,87	29,36	8,96	9,89	9	16,17	11,11	10,81	25,99	10,17	10,17	9	9,33	6		C
<i>L. tehuelche</i>	63,94	31,28	9,33	10,29	9	16,9	11,84	11,89	26,74	10,59	10,59	10,06	10,18	17		C
<i>L. boulengeri</i>	56,76	26,57	8,64	9,4	8,14	15,91	10,8	10,45	24,38	10,24	10,24	9,41	9,71	17		C

Tabla 2: Estadísticos resumen y resultado de la prueba de contraste de Hotteling ( $\alpha = 0,05$ ;  $df = 98$ ) para las variables cuantitativas. Las columna de “clase” corresponden a las asociaciones de los grupos.

Especies/grupo	Centroides	
	Axis 1	Axis 2
i.mt (i)	-0,81	-1,88
i.mt (ii)	-0,84	-0,69
<i>L. rothi</i>	-1,18	0,61
<i>L. telsen</i>	1,61	-0,67
<i>L. tehuelche</i>	1,61	0,75
<i>L. boulengeri</i>	1,77	-0,27

Tabla 3: Coordenadas de los centroides estimados en el análisis discriminante

Grupo	i.mt (i)	i.mt (ii)	<i>L. rothi</i>	<i>L. telsen</i>	<i>L. tehuelche</i>	<i>L. boulengeri</i>	Total	Error (%)
i.mt (i)	12	0	1	0	0	1	14	14,29
i.mt (ii)	2	2	2	0	0	0	6	66,67
<i>L. rothi</i>	2	3	34	2	1	1	43	20,93
<i>L. telsen</i>	0	0	0	5	0	1	6	16,67
<i>L. tehuelche</i>	0	0	0	0	14	3	17	17,65
<i>L. boulengeri</i>	0	0	0	1	1	15	17	11,76
Total	16	5	37	8	16	21	103	20,39

Tabla 4: Tabla de clasificación cruzada del análisis discriminante. Las filas representan los grupos proveídos *a priori* y en las columnas las asignaciones basadas en el análisis discriminante. La proporción de error de asignación se muestra en la columna Error (%).

Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Chi-cuadrado	Valor-p
<i>L. rothi</i>	<i>L. boulengeri</i>		60,5519	0,0002***
<i>L. rothi</i>	<i>L. telsen</i>		42,6945	0,0006***
<i>L. rothi</i>	<i>L. tehuelche</i>		43,3627	0,0018**
i.mt (i)	i.mt (ii)	<i>L. rothi</i>	7,8111	0,9998
i.mt (i)	i.mt (ii)	<i>L. boulengeri</i>	25,17	0,2877
i.mt (i)	i.mt (ii)	<i>L. telsen</i>	8,8445	0,9418
i.mt (i)	i.mt (ii)	<i>L. tehuelche</i>	21,7962	0,6123
i.mt (i)	i.mt (ii)		5,8218	0,9016

Tabla 5: Resultado de la prueba de chi cuadrado de Pearson para las variables cualitativas

## Discusión

### *División de linaje incompleta (ILS) vs. hibridación*

En este capítulo se exploró la verosimilitud de diferentes hipótesis para explicar la discordancia de los árboles de genes en los complejos *boulengeri* y *rothi*. Avila et al. (2006) fueron los primeros en observar este patrón en un árbol mitocondrial y propusieron hibridación como posible explicación. La parafilia mitocondrial puede guardar la señal de hibridación durante la historia evolutiva de los taxa. Esto se debe a la herencia estrictamente materna y a la naturaleza haploide de la mitocondria, lo cual lleva a que su tamaño poblacional efectivo sea cuatro veces

menor que la de los genes nucleares (Funk y Omland 2003), por lo que se reduce la probabilidad de ILS (Leaché y Rannala 2011). Además, el genoma mitocondrial se hereda como un bloque ligado no recombinante, por lo que incluir cualquier gen del mismo en análisis filogenéticos, referirá al mismo árbol. Entonces, una vez que la mitocondria introgreza en otro linaje diferente, es retenida durante el tiempo que los híbridos descendientes se reproduzcan.

La observación de discordancia entre árboles de genes y de especies puede ser explicada por diferentes procesos. Para organismos como las lagartijas, ILS e hibridación pueden ser posibles explicaciones, especialmente para especies de divergencia reciente, como es el caso que se presentada en este capítulo, donde se utilizó la metodología presentada en el capítulo 3 para evaluar la verosimilitud de diferentes modelos, incluyendo ambas fuentes de variación. Los resultados mostraron que cada modelo que incluyó  $M_1$  y  $M_2 > 0$  resultó en una explicación más probable que un modelo estrictamente coalescente (Tabla 1).

La introgresión mitocondrial fue datada hace 1.09 ma y 0.82 ma para los dos nodos en el árbol mitocondrial (Fig. 2). Esta estimación da una idea aproximada de cuando pudo haber ocurrido el evento de hibridación. También se encontraron haplotipos mitocondriales de divergencia más reciente a nivel más inclusivo de los nodos, en los cuales una muestra de *L. rothi* fue recuperada dentro del clado de *L. telsen* y dos muestras dentro de *L. tehuelche*. Esto sugiere que flujo génico reciente o actual puede ser posible entre estas especies, lo cual es también factible dada la distribución simpátrica (Fig. 3). Sin embargo, se espera que el tiempo de coalescencia de un solo gen ocurra más atrás en el tiempo que la divergencia de las especies (Edwards y Beerli 2000), principio que también se aplica para este caso de hibridación. Por otro lado, también se espera que el tiempo de desviación sea relativamente bajo, dado que la mitocondria tiene un tamaño poblacional menor comparado a los genes nucleares. En este capítulo, la conclusión principal se basa en una señal fuerte de flujo génico entre *L. rothi* y tres especies del complejo *boulengeri* (*L. tehuelche*, *L. boulengeri* and *L. telsen*), la cual se estima que ocurrió hace 1.08 ma atrás.

#### *Comparaciones morfológicas*

Se comparó la morfología de las muestras introgresadas con las especies focales. Los análisis multivariados de las variables cuantitativas mostraron que las muestras híbridas son generalmente más similares a *L. rothi* que a las especies del complejo *boulengeri*. Sin embargo, estas muestras híbridas no difieren significativamente en coloración a ninguna de las especies

focales. Esto sugiere que las muestras híbridas guardan un fenotipo tendiente a intermedio entre las posibles especies parentales. Olave et al. (2011) encontraron resultados similares en el fenotipo de los individuos híbridos detectados entre *L. gracilis* y *L. bibronii* (parte del subgénero *Liolaemus* [*sensu stricto*]). Dada la herencia estrictamente materna de la mitocondria, y que en el amplio muestreo realizado solo se encontraron individuos de *L. rothi* con ADNmt relacionado al complejo *boulengeri*, es claro que las hembras del complejo *boulengeri* se cruzaron con machos de *L. rothi*, dado que no se encontró evidencia para el cruce recíproco. Olave et al. (2011) también encontraron en este sentido, patrones similares de asimetría, donde la principal evidencia de introgresión corresponde a apareamientos de machos de *L. bibronii* con hembras de *L. gracilis*. Estos autores destacan como posibles explicaciones la acción de selección natural y/o selección sexual conduciendo este sistema de apareamiento, dada la diferencia de tamaño corporal encontrada entre ambas especies (siendo *L. bibronii* > *L. gracilis*). Se propone que los machos de *L. bibronii* pueden haber tenido una ventaja selectiva o bien haber sido seleccionados por hembras de *L. gracilis*, dado su mayor tamaño corporal. En este capítulo, también se encontró diferencias en el tamaño corporal entre *L. rothi* y las especies del complejo *boulengeri* (Tabla 2), y una explicación similar puede aplicarse para este caso. Estudios futuros podrían evaluar estas dos hipótesis (selección natural o sexual), a través de estudios de comportamiento en el campo y laboratorio.

#### *El rol de la hibridación en Liolaemus*

Al momento se han reportado fuertes señales de hibridación entre especies del complejo *boulengeri* y el complejo *rothi* (este capítulo) y entre *L. gracilis* y *L. bibronii* (Olave et al. 2011; capítulo 3). Además, el proceso de hibridación fue sugerido para numerosos grupos dentro del género *Liolaemus* (Morando et al. 2004; Breitman et al. 2011; Camargo et al. 2012; Medina et al. 2013), los cuales deben ser evaluados formalmente. Todos estos casos de diferentes clados dentro de *Liolaemus*, sugieren que la hibridación puede ser un fenómeno expandido dentro del género. Es entonces cuando surge la pregunta de por qué las múltiples especies de *Liolaemus* no desarrollan aislamiento reproductivo completo.

Las especies dentro de *Liolaemus* tienden a ser más generalistas que especialistas, y aparentemente a conservar su morfología en los diferentes linajes (Abdala et al. 2014). Organismos menos especializados son más tolerantes a los cambios climáticos y, más probablemente, capaces de desplazarse y encontrar nuevas áreas donde establecerse. Entonces,



organismos generalistas tienen una ventaja sobre los especialistas en ambientes fluctuantes y heterogéneos (Lanchier y Neuhauser 2006; Jansson y Dyneius 2002). La Patagonia es un ejemplo de área heterogénea, con un pasado geoclimático complejo. Algunos linajes de *Liolaemus* parecen haber sobrevivido en áreas de refugio (e.g. Breitman et al. 2012, algunos revisados en Sársic et al. 2011) durante los ciclos glaciales y haberse expandido en nuevas regiones cuando el clima se volvió óptimo (e.g. Olave et al. 2011). Consecuentemente, las especies de *Liolaemus* han experimentado decrecimientos consecutivos en variación genética durante los ciclos glaciales (e.g. Olave et al. 2011; Breitman et al. 2012). En este sentido, la hibridación podría jugar un rol importante en la estrategia de supervivencia del género, beneficiándolo en dos niveles: (1) al incrementar la variabilidad genética después de cuellos de botella ocurridos y/o (2) al contribuir a mantener la biología generalista, al rápidamente producir híbridos con fenotipos intermedios.

Dada la gran diversidad del género, el escaso conocimiento taxonómico y la importancia atribuida a la hibridación en la evolución animal (Mallet 2005; 2007), *Liolaemus* ofrece un modelo muy interesante para realizar estudios evolutivos con importantes implicancias.



Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales  
**Universidad Nacional de Córdoba**

**CAPÍTULO 5: DIVERSIDAD OCULTA DEL GÉNERO *LIOLAEMUS*:  
VARIABILIDAD GENÉTICA Y MORFOLÓGICA DEL COMPLEJO  
*ROTHI***

---

Tesis de doctorado en Ciencias Biológicas

**MELISA OLAVE  
ALUMNA**

**MARIANA MORANDO  
DIRECTORA**

# Introducción

Desde hace más de un siglo, el género *Liolaemus* despertó interés entre los herpetólogos (e.g. Fitzinger 1826; Wiegmann 1834; Donoso-Barros 1966; Laurent 1984; 1992; Cei 1986; Etheridge 1995), aunque su estudio se intensificó progresivamente en los últimos 30 años, llevando a la descripción de gran cantidad de especies nuevas. El descubrimiento de la insospechada diversidad del género, fue posible en parte debido a estudios más detallados incorporando zonas geográficas poco estudiadas, así como también a la incorporación de datos moleculares (Morando et al. 2003; 2004; 2007; 2008; Avila et al. 2006; Breitman et al. 2011; Medina et al. 2013; Olave et al. 2014). Actualmente, *Liolaemus* constituye el segundo género de lagartijas más diverso del mundo (257 especies; Abdala y Quinteros 2014), aunque se sabe que se encuentra ampliamente subestimado, y predicciones del número real de especies, lo llevarían a ocupar el primer lugar en cuanto a diversidad (Morando et al. 2003). Esto se debe a que muchas especies fueron inicialmente descritas bajo una amplia distribución geográfica y alto polimorfismo poblacional (e.g. Koslowsky 1986) y estudios posteriores reconocieron esas poblaciones como especies diferentes. Estas decisiones de elevar poblaciones a categoría de especies, se llevaron adelante en marco de un paradigma contemporáneo, donde puede entenderse a las especies bajo un concepto más complejo que grupos aislados reproductivamente o morfológicamente divergentes. Si bien se han propuesto numerosos conceptos de especies (ver Mayden 1997 quien enumera 24 conceptos de especies), de Queiroz (1998) se refiere al “problema de las especies” explicando que estos conceptos propuestos constituyen en realidad criterios para *evaluar* su existencia, y poco después (de Queiroz 2005) propone el concepto unificador de especies, para referirse a linajes que evolucionan de manera independiente de otros. En este sentido, una especie no necesariamente debe ser distinguible fenotípicamente, diagnosticable, monofilética, estar reproductivamente aislada o ser ecológicamente divergente, para ser considerada como tal. Este concepto de especie ha ganado popularidad y es el que se adoptó como base en este capítulo, principalmente dado que este concepto permite tener una visión integradora en un marco evolutivo.

Existen diferentes programas diseñados para reconocer especies (Sites y Marshall 2004; Carstens et al. 2013), algunos recientemente propuestos tienen en cuenta el concepto de de Queiroz (2005), están basados en ADN y modelos coalescentes y buscan identificar linajes que evolucionen independientemente. En particular, los datos moleculares se han

expandido rápidamente como fuente principal de información (Knowles 2009; Edward y Knowles 2013). Con métodos coalescentes las especies pueden ser reconocidas a pesar de la discordancia de árboles de genes y antes de que la monofilia recíproca sea alcanzada (Knowles y Carstens 2007). Entre los programas disponibles al momento, el programa *Bayesian Phylogenetic and Phylogeography* (bpp; Yang y Rannala 2010; Rannala y Yang 2013) ha ganado popularidad, siendo que a mostrado muy buenos resultados en los primeros estudios con simulaciones (Yang y Rannala 2010; Camargo et al. 2012 b; Rannala y Yang 2013; Zhang et al. 2014; pero ver Olave et al. 2014 b).

Es importante tener en cuenta que, si bien los datos moleculares proveen información valiosa para este campo, es de suma importancia el integrar datos de diferentes naturaleza (Dayrat 2005), siendo que se han reconocido grandes problemas dentro de la sistemática si se trabaja exclusivamente con una única fuente de información (Edward y Knowles 2013; Olave et al. 2014 b). Los datos morfológicos y geográficos también pueden proveer información útil en esta disciplina (e.g. Zapata y Jiménez 2012) y prevenir errores de tipo I en la delimitación de especies (Olave et al. 2014 b). Aún más, incorporando otras fuentes de información pueden elaborarse hipótesis que expliquen la diversidad genética, morfológica y geográfica en un marco evolutivo integral. Por ejemplo, el estudio de la morfología provee evidencia de fuerzas evolutivas específicas que pueden actuar sobre las especies. En los últimos años se han desarrollado modelos de cambio fenotípico para explicar la evolución morfológica de los linajes, como el movimiento Browniano (también conocido como “caminata aleatoria”), sobre el cual se puede predecir el grado de diferenciación morfológica esperada simplemente por azar a lo largo del árbol de especies. Además también se puede ajustar a los datos (árbol filogenético y datos comparativos) distintos modelos de evolución direccional que combinan efectos aleatorios con procesos selectivos agrupados bajo el nombre de modelos Ornstein-Uhlenbeck (OU) (Butler y King 2004). Estos modelos pueden predecir los patrones esperados cuando la morfología evoluciona hacia óptimos adaptativos y representan desvíos de la evolución al azar. Luego de ajustar estos distintos modelos mediante técnicas de máxima verosimilitud, se puede utilizar diferentes métodos para la selección de modelos y elegir el más probable que explique el patrón evolutivo morfológico.

En este capítulo se estudiaron dos especies candidatas del complejo *rothi*, una de ellas propuesta en el capítulo 1 y otra tomada de Morando (2004), y se evaluó la hipótesis de que estos linajes evolucionen independientemente de otros (i.e. nuevas especies) ya

descriptos formalmente. Las especies candidatas son a simple vista similares morfológicamente a otras especies cercanamente relacionadas (Fig. 1). Una de ellas (*L. sp. M 34*; en referencia a Morando [2004] quien la denominó *L. sp. 34*) fue colectada al Norte de Neuquén en zonas altas de la cordillera de los Andes, y la otra (*L. sp. 4*) del centro de la provincia de Neuquén.

Además, se estudió la evolución morfológica de todo el complejo *L. rothi*, evaluando la probabilidad de diferentes modelos de evolución morfológica que describen cambios fenotípicos en los linajes. Para ello, se infirió un árbol de especies utilizando 14 marcadores moleculares y 97 individuos representando las seis especies descriptas del complejo y las dos especies candidatas. Se utilizó el programa bpp para evaluar las probabilidades posteriores de la existencia de especies diferentes. Finalmente, se comparó la morfología de las especies candidatas con respecto a las otras especies descriptas.

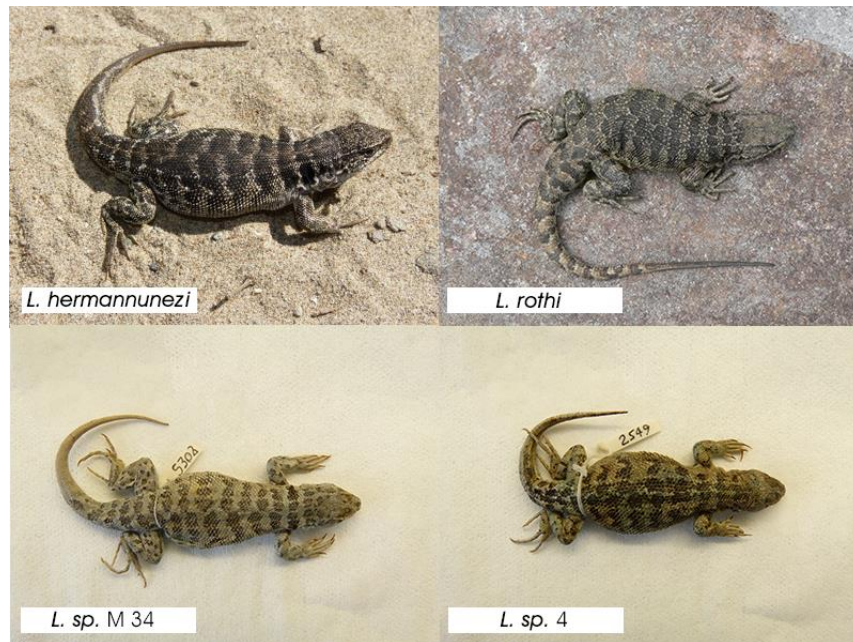


Figura 1: Fotografías de las especies candidatas *L. sp. M 34* y *L. sp. 4* y dos especies cercanamente relacionadas del complejo *rothi* (*L. hermannunezi* y *L. rothi* respectivamente).

## Materiales y métodos

### *Trabajo de campo*

Se incluyeron en los análisis de este capítulo todas las muestras para las cuales se cuentan con datos morfológicos y moleculares en su conjunto, lo cual abarca un total de 97

terminales representando las seis especies del complejo *rothi* (*L. lobo*, *L. hermannunezi*, *L. rothi*, *L. sagei*, *L. sitesi* y *L. tromen*) así como también dos especies candidatas. Para el caso de *L. sp. M 34* se cuentan con 19 ejemplares colectados, mientras que para el *L. sp. 4* sólo se dispone de tres individuos. Se destaca que el método bpp es robusto en sus resultados cuando se involucra incluso un individuo por especie si la cantidad de marcadores es grande (= 10 loci para un escenario de alto impacto de división de linaje incompleta =  $0.4N_e$ ; Yang y Rannala 2010). Al mismo tiempo, el número de muestras es adecuado para el análisis de evolución morfológica (Harmon 2008). Sin embargo, se reconoce la limitación para las comparaciones morfológicas (estadística multivariada) y se presenta este capítulo como un avance que demuestra la necesidad de coleccionar más individuos para la descripción de las especies como tales.

Los especímenes fueron colectados a mano o con el uso de horquetas, sacrificados con inyección pericárdica de tiopental sódico Abbot®/Pentovet®, diseccionados para extraer muestras de hígado o músculo para el estudio molecular, fijados con 10-20% de formaldehído, y posteriormente transferidos a etanol al 70%. Las muestras de tejidos están conservadas en freezer con 96% de etanol. Los especímenes *voucher* se encuentran depositados en la colección herpetológica LJAMM-CNP del Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Argentina (CENPAT-CONICET, <http://www.cenpat.edu.ar/nuevo/colecciones03.html>), y en el museo Bean Life Science, Brigham Young University (BYU; <http://mlbean.byu.edu/ResearchCollections/Collections/ReptilesandAmphibians.aspx>). (Apéndice C).

### *Trabajo de laboratorio*

Se secuenciaron dos genes mitocondriales (*cit-b* y *12S*), cuatro anónimos nucleares (ANL: A1D; A4B; A9C y A12D) y ocho loci codificantes de proteínas (NPCL: EXPH5, KIF24, MXRA5, DNAH3, PRLR, PNN, SNCAIP, CMOS), un total de 14 genes (10.013 bp). La amplificación se realizó según los pasos descriptos en el capítulo 1. Las secuencias fueron editadas usando el programa Sequencher v4.8. (™Gene Codes Corporation Inc. 2007) y alineadas usando el programa MAFFT (Kato et al. 2002). Los genes codificantes de proteínas fueron traducidos a aminoácidos para corroborar que no existan errores de

codones. Para los genes nucleares se descartó recombinación, usando el programa RDP (Martin y Rybicki 2000; Heath et al. 2006).

### *Inferencia del árbol filogenético*

Se utilizaron los 14 loci para 97 individuos y se realizó la inferencia con \*BEAST (Heled y Drummond 2010) por  $100 \times 10^6$  generaciones de MCMC y muestreando la estimación de los parámetros cada 10.000 generaciones (*burnin* 10%). La convergencia fue diagnosticada por la observación de los valores de ESS de los parámetros mayor a 200.

### *Estimación de tiempos de divergencia*

Se utilizaron como *priors* las tasas de sustitución estimadas para los genes en el capítulo 1, y se utilizó BEAST 1.6.2 y un reloj estricto para cada gen, estimado usando una distribución gamma. La Tabla 1 muestra los detalles de las distribuciones de los *priors* utilizados. Se utilizó el proceso Yule como *prior* del modelo, se corrió un análisis de  $100 \times 10^6$  generaciones de MCMC, y se muestrearon parámetros cada 10.000 intervalos (*burnin* 10%). Se diagnosticó convergencia por la observación de valores de ESS > 200.

Locus	Valor inicial	Escala
12S	0,006339	0,0090
cit-b	0,019355	0,0174
CMOS	0,000879215	0,0012
DNAH3	0,00076162	0,0011
EXPH5	0,0012955	0,0015
KIF24	0,0019021	0,0016
LDA12D	0,0026373	0,0038
LDA1D	0,001765	0,0025
LDA4B	0,0035965	0,0050
LDA9C	0,0017753	0,0025
MXRA5	0,00077525	0,0011
PNN	0,00081714	0,0012
PRLR	0,001322	0,002
SNCAIP	0,0010351	0,0015

Tabla 1: Detalle de calibración del *prior* de las tasas de sustitución. Forma de la curva para todos los casos =1.

### *Delimitación de especies*

Se evaluó la probabilidad de la existencia de dos nuevas especies dentro del complejo *L. rothi*. Para ello, se utilizó el programa bpp v2.0 (Yang y Rannala 2010; Rannala y Yang 2013). Este programa muestrea de una distribución posterior de modelos

de límites de especies usando una cadena de MCMC reversible (rjMCMC). Para ello, el usuario provee el árbol guía y una distribución gamma como *prior* de los parámetros  $\tau$  (largo de ramas) y  $\theta$  ( $= N_e\mu$ ; donde  $N_e$  es el tamaño poblacional efectivo y  $\mu$  la tasa de mutación). El programa toma el árbol guía y colapsa los nodos internos (llevando  $\tau = 0$ ) y calcula la probabilidad posterior de que cada valor de  $\tau$  sea igual o distinto de cero (i.e. la existencia de nodos diferentes). Si cada  $\tau \neq 0$ , se infiere que los linajes evolucionan independientemente. El programa asume no recombinación entre locus, loci independientes, no flujo génico entre especies y que las secuencias de ADN evolucionan neutralmente. Se utilizó como *prior* una distribución para los parámetros  $\theta$  y  $\tau = G(1,1000)$ , lo que lleva a una media de 0,001. Se observó que los valores de finetunes (coeficientes que indican el grado de salto de cadenas de MCMC) se mantuvieron entre 0,15 y 0,7 durante el análisis (según recomendación del manual del programa). Se realizó un análisis de MCMC de 50.000 generaciones, muestreando cada 5.000 pasos (10% *burnin*). La convergencia se diagnosticó por observación de valores de ESS  $> 200$  para los parámetros muestreados. Se realizaron análisis independientes para los dos grandes clados recuperados en el análisis de árbol de especies (C1 y C2, ver resultados).

### *Comparaciones morfológicas*

Se comparó la morfología de las especies candidatas con respecto a las seis especies descritas del complejo *rothi*, armando dos grupos según fueron inferidos en el análisis de árbol de especies (C1 y C2; ver resultados). Se incluyeron las nueve variables morfométricas y 16 variables de patrones de coloración descritas en el capítulo 4. Para evaluar las diferencias en morfología se utilizó el programa Infostat y se calcularon los estadísticos resumen de cada grupo de variables. Se realizaron pruebas multivariadas para los caracteres cuantitativos. Se realizó un MANOVA y contrastes de Hotteling. Para las variables cualitativas, se utilizó el programa R, siguiendo a Escudero et al. (2012), se realizaron pruebas de chi cuadrado de Pearson con 5.000 permutaciones de Markov, posterior a construir tablas de contingencia.

### *Evolución morfológica*

Se tomaron las variables morfométricas y el árbol de especies y se utilizó el paquete GEIGER (Harmon et al. 2008) implementado en R para evaluar la verosimilitud



de diferentes modelos de evolución fenotípica. Se estudiaron un total de cinco modelos: Brownian motion (BM), Ornstein-Uhlenbeck (OU), Early-burst (EB), trend y kappa. La Caja 1 describe cada uno de ellos. Se utilizó el criterio AICc para seleccionar el modelo.

BM	Modelo Browniano (Felsenstein 1973), el cual asume que la correlación entre los caracteres es proporcional al tiempo de ancestría común de las especies. Es decir, describe evolución con pasos al azar, dependiente de la filogenia.
OU	Modelo Ornstein-Uhlenbeck (Butler y King 2004), el cual describe pasos aleatorios con una tendencia central.
EB	Modelo Early-burst (Harmon et al. 2010), también llamado el modelo ACDC (acelerado-desacelerado). Este modelo involucra tasas de evolución que se incrementan o decrecen exponencialmente en el tiempo.
trend	Es un modelo de difusión que involucra una tendencia lineal de cambio de la tasa del carácter en el tiempo (tasas mayores o menores).
kappa	Modelo que involucra cambios en los caracteres en la especiación, donde la divergencia de los caracteres está relacionado con el número de eventos de especiación entre dos especies.
Caja 1: Descripción de los modelos evaluados en el análisis de evolución morfológica.	

## Resultados

### *Árbol de especies*

El árbol de especies obtenido en el análisis de \*BEAST y los resultados de la estimación de tiempos de divergencia, se representa en la Figura 2. Se observa la conformación de dos clados principales dentro del complejo (C1 y C2), cuya divergencia se dató en 4,59 ma. El C1 se encuentra conformado por *L. hermannunezi*, *L. loboi*, *L. tromen* y *L. sp. M 34*; y el C2 conformado por *L. rothi*, *L. sagei*, *L. sitesi* y *L. sp. 4*. La especie candidata *L. sp. 1* se recuperó como hermana a *L. hermannunezi*, aunque el soporte de esta relación es baja (PP = 0,31). La divergencia entre ambos linajes se dató en 1,48 ma atrás. Por otro lado, la especie *L. sp. 4* se recuperó como hermana a *L. rothi* con buen soporte estadístico (PP = 1), con una divergencia estimada de 1,89 ma.

La Figura 3 muestra el árbol de especies sobre un mapa ubicando las distribuciones geográficas de las mismas. Se observa que el C1 tiene una distribución más hacia el noroeste (Norte de Neuquén), mientras que el C2 se distribuye principalmente hacia el sureste (Oeste y centro de Neuquén y centro oeste de Río Negro). Se observa que *L. sp. M 34* fue colectada cercana a la distribución de *L. hermannunezi* (su especie hermana), en zona montañosa (cordillera de los Andes). Por otro lado, *L. sp. 4* no se solapa en distribución con *L. rothi* (su especie hermana).

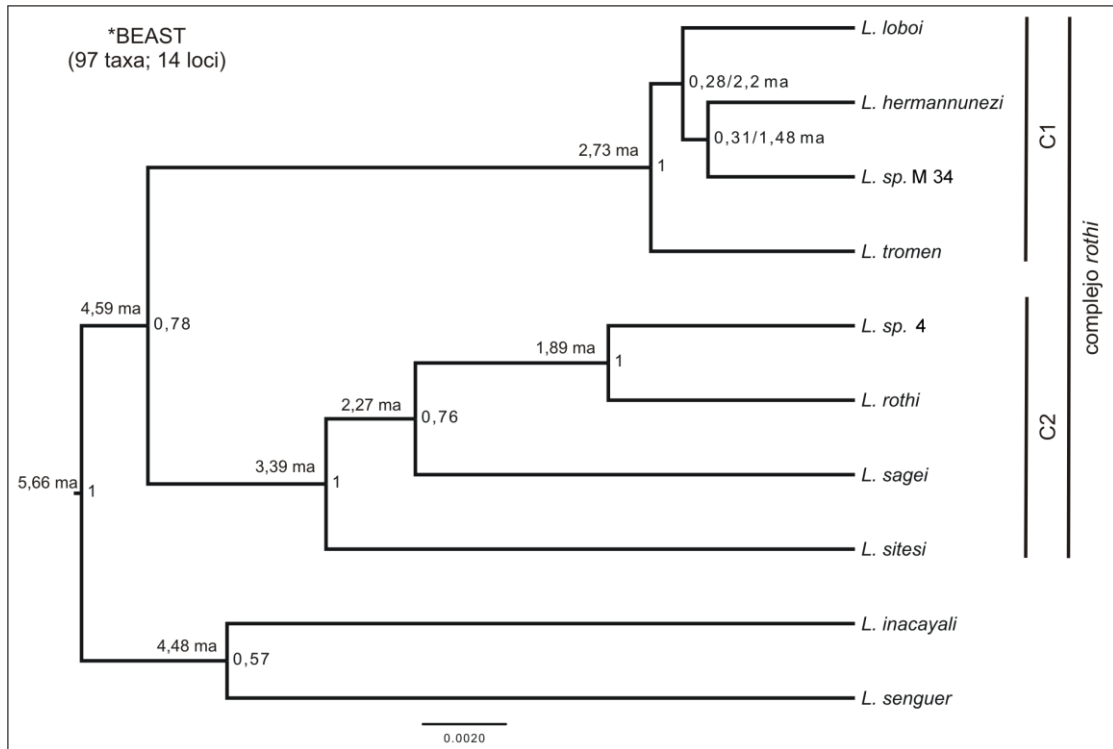


Figura 2: Árbol de especies estimado para el complejo *L. rothi*, utilizando 14 loci y 97 taxa. Los tiempos de divergencia se detallan por encima de las ramas internas.

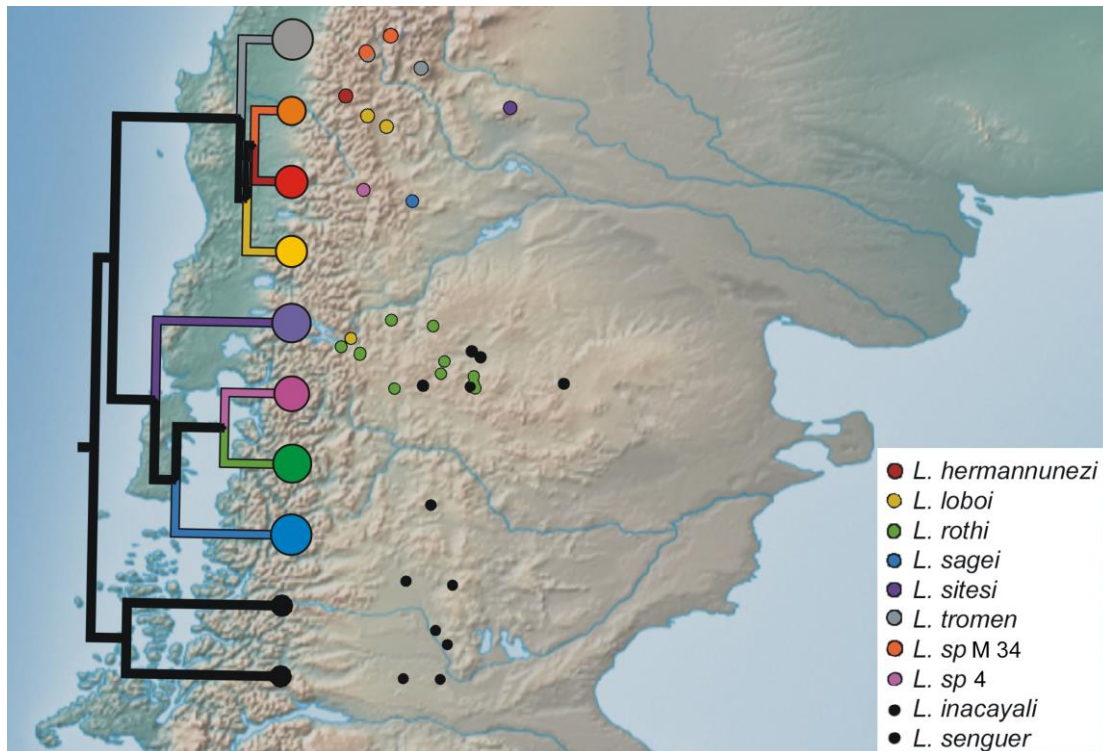


Figura 3: Árbol de especies y mapa de los puntos de colecta. El tamaño de los puntos del árbol son proporcionales al tamaño corporal medio de la especie (basado en el largo hocico-cloaca [SVL]).

*Delimitación de especies y comparaciones morfológicas*

En el análisis de datos moleculares, el programa bpp detectó la evolución independiente de los linajes *L. sp. M 34* y *L. sp. 4*, sugiriendo que constituyen especies diferentes. Ambos resultados fueron soportados por una PP = 1. Se detectaron diferencias significativas en las variables cuantitativas empleadas en análisis de MANOVA ( $p < 0.01$ , para ambos clados). Sin embargo, la prueba de contrastes de Hotelling muestra un claro solapamiento entre las especies candidatas *L. sp. M 34* y *L. sp. 4* con respecto a las especies del mismo clado (Tablas 2 y 3). Se observa que *L. sp. M 34* conforma un grupo “B” junto con *L. hermannunezi* (Tabla 2), así como *L. sp. 4* conforma un grupo “B” con *L. sitesi* y *L. sagei* (Tabla 3). Por otro lado, la prueba de chi cuadrado para las variables cualitativas arrojó diferencias no significativas entre los patrones de coloración de las especies candidatas con respecto a las otras especies del complejo ( $p > 0.5$  para todos los casos). Es decir, no es posible diferenciar claramente *L. sp. M 34* y *L. sp. 4* del resto de las especies del C1 y C2 respectivamente, por las variables de morfometría y patrones de coloración utilizadas.

*Evolución morfológica*

Se estudió la evolución de las variables de morfometría en función de la filogenia. En la Figura 3 se muestra el tamaño medio de las especies para la variable SVL (largo hocico-cloaca). Se puede observar que las especies del C1 tienden a presentar medias menores en SVL, respecto de aquellas del C2. La excepción la constituye *L. tromen* que presentó el mayor valor para SVL (= 80.8 cm). Se prosiguió a evaluar estadísticamente esta observación y los resultados de AICc se muestran en la Tabla 4. Se seleccionó el modelo simple Browniano para tres variables (HaL, FL y KKD) y el modelo trend para explicar la evolución de seis variables (SVL, AGD, RUL, HL, FoL y TFL). Esto indica que se detectó una tendencia, en seis de las nueve variables morfométricas estudiadas, a experimentar cambios en las tasas lineales de evolución en el tiempo (incremento y decrecimiento), desviándose de lo esperado por simple azar. Los resultados mostraron una tendencia al decrecimiento en morfometría para *L. hermannunezi*, *L. sitesi* y *L. sp. M 34*, y un aumento involucrando las especies del C2.

Especies	variables													n	clase
	SVL	AGD	HaL	RUL	HL	FoL	TFL	FL	KKD	NSLVL	NSRVL	NLPS	NRPS		
<i>L. tromen</i>	80,7	38,3	11,2	13,3	12,0	20,8	14,9	15,6	34,2	8,0	7,7	7,2	6,7	4	A
<i>L. hermannunezi</i>	65,2	30,2	10,0	11,4	9,6	18,7	12,9	12,8	29,7	8,2	8,0	8,2	8,0	4	B
<i>L. sp. M 34</i>	57,1	25,9	9,0	9,5	8,4	16,5	10,9	11,6	25,1	9,3	9,4	8,7	8,6	19	B
<i>L. lobo</i>	62,8	29,5	9,9	10,3	9,1	18,4	12,1	12,1	27,3	9,7	9,7	8,8	8,7	7	C

Tabla 2: Estadísticos resumen y resultado de la prueba de contraste de Hotteling (alfa = 0,05; df = 98) para las variables cuantitativas. Las columna de “clase” corresponden a las asociaciones de los grupos.

Especies	variables													n	clase
	SVL	AGD	HaL	RUL	HL	FoL	TFL	FL	KKD	NSLVL	NSRVL	NLPS	NRPS		
<i>L. sitesi</i>	76.41	35.18	11.44	13.03	11.13	20.68	14.19	14.73	33.17	10.20	10.00	9.80	9.80	5	A B
<i>L. rothi</i>	76.47	37.11	12.23	13.72	11.98	21.36	15.14	16.00	33.42	8.21	8.18	7.09	7.03	33	A
<i>L. sp. 4</i>	69.71	32.16	9.86	11.48	9.85	17.54	12.72	13.15	29.25	9.00	10.00	8.33	9.67	3	B
<i>L. sagei</i>	78.80	35.82	10.86	13.63	11.06	21.32	14.00	16.09	35.03	11.00	10.50	9.50	9.50	2	B

Tabla 3: Estadísticos resumen y resultado de la prueba de contraste de Hotteling (alfa = 0,05; df = 98) para las variables cuantitativas. Las columna de “clase” corresponden a las asociaciones de los grupos.

Variables	Modelos				
	BM	OU	EB	trend	kappa
SVL	94,81	84,26	84,32	83,80	84,05
AGD	74,28	69,46	69,48	69,34	69,48
HaL	30,55	34,83	34,83	34,83	34,83
RUL	46,85	47,03	47,06	46,78	47,06
HL	44,88	44,38	44,40	44,19	44,40
FoL	66,78	53,39	53,41	53,22	53,41
TFL	50,16	47,94	47,96	47,75	47,96
FL	45,67	48,71	48,71	48,70	48,71
KKD	64,53	65,66	65,69	65,45	65,67

Tabla 4: Resultado de la evaluación de diferentes modelos de evolución fenotípica. Se muestra el valor calculado para AICc. Los modelos seleccionados se muestran en celdas grises.

## Discusión

### *La diversidad oculta del género Liolaemus: variabilidad genética vs. morfológica*

En este capítulo se evaluó la existencia de dos especies candidatas del complejo *L. rothi*. El programa bpp detectó evolución independiente de estas especies candidatas (PP = 1), basándose en secuencias de ADN (14 loci). También se infirió un tiempo relativamente largo de especiación, comparable a otras especies descritas dentro del género (capítulo 1; Fontanella et al. 2012), resultando en 1,48 ma para *L. sp. M 34* y 1,89 para de *L. sp. 4*, respecto a sus respectivas especies hermanas (*L. hermannunezi* y *L. rothi*). Los resultados de análisis de ADN resultaron concluyentes en reconocer dos especies nuevas en el complejo *L. rothi* (PP = 1). Por otro lado, las comparaciones morfológicas mostraron que *L. sp. M 34* y *L. sp. 4* no pueden diferenciarse claramente respecto de otras especies en cuanto a su fenotipo, incluyendo variables de morfometría y de patrones de coloración (Tablas 2 y 3).

En el análisis de evolución morfológica, considerando la filogenia de las especies, se observó tendencia de cambio en las tasas de evolución para seis de las nueve variables morfométricas estudiadas, rechazando un modelo de evolución azaroso (BM). Esto puede esperarse en escenarios donde la selección actúe incrementando y decreciendo tasas de cambio en caracteres, lo cual explicaría el no encontrar diferencias significativas entre las comparaciones morfológicas realizadas. Las especies del norte (C1) aparentemente tienden a mantener un tamaño corporal menor respecto de las especies distribuidas más hacia el

sureste (C2). Si estos resultados son ciertos, el tamaño corporal conservado es producto de procesos no aleatorios (i.e. selección), con lo cual constituirían una adaptación de las especies. El tamaño corporal es un carácter que es fundamental en la biología de los animales, y covaria con los componentes ecológicos, fisiológicos y la historia de la vida como la fecundidad, la eficiencia metabólica y la termorregulación (Sookias et al. 2012). El tamaño corporal tiene interacciones complejas en la adecuación (*fitness*) de los individuos (LaBarbera 1989). Un mayor tamaño corporal suele mejorar el éxito en obtener alimento, territorio y en el apareamiento (Hone y Benton 2005), pero al mismo tiempo, aumenta la susceptibilidad a la extinción, a la predación, disminuye la fecundidad y requiere más recursos por individuos. Por esto, la evolución de un carácter fenotípico como el tamaño corporal es altamente probable que se condicione con el ambiente que ocupen las especies. Las especies del C1 se ubican en zonas altas de la cordillera y pre cordillera de los Andes. Por ejemplo, la localidad tipo de *L. hermannunezi* se ubica entre el cruce de Argentina y Chile (lado Chileno), a más de 1.500 msnm. A estas latitudes, la cordillera de los Andes, en sus alturas, constituye un ambiente inhóspito, caracterizado por los vientos fuertes y bajas temperaturas (Garreaud 2009). Para este caso particular, es posible que las especies del C1 se encuentren bajo altas presiones de selección, lo cual promueva a conservar una morfología particular que resulte en un óptimo adaptivo, entre ellos, un tamaño corporal reducido.

Otros trabajos han encontrado que hay una gran variabilidad en las tasas de evolución morfológica de algunos taxa intensamente estudiados (e.g. Cooper y Purvis 2009). En este capítulo, se observa una tasa de cambio molecular más alta que el cambio morfológico, siendo que las especies *L. sp. M 34* y *L. sp. 4* son detectables en análisis de ADN, pero no pueden ser diagnosticables por las variables morfológicas empleadas aquí. La existencia de especies que no pueden ser claramente reconocidas en función de su morfología (i.e. crípticas), puede deberse a la tendencia a estasis morfológica dadas presiones de selección que reducen o eliminan cambios morfológicos. En este último caso, hay evidencia que indica que habitar en ambientes extremos puede limitar los cambios fenotípicos (Bickford et al. 2006). De hecho, la existencia de más de la mitad de las especies crípticas descritas responde a zonas templadas, a pesar de que dos tercios de la diversidad del planeta se ubica en los trópicos (Willig et al. 2003). Es decir, las especies crípticas constituyen un fenómeno que resulta plausible en ambientes de este tipo.

La incorporación de marcadores moleculares ha permitido reconocer gran parte de la biodiversidad de una gran variedad de taxa que previamente no fue detectada con métodos tradicionales (Knowles 2009). Aunque la diversidad real del género *Liolaemus* no es conocida aún, muchos trabajos, como el realizado en esta tesis, conducen a acercarnos un poco más a su compleja e interesante realidad.

# Conclusiones generales

Numerosas hipótesis de relaciones filogenéticas fueron propuestas para el subgénero *Eulaemus*, sean basándose en caracteres morfológicos o secuencias de ADN de un único gen o de múltiples loci. Estas propuestas, concuerdan en reconocer la existencia de dos grandes grupos hermanos: la sección *lineomaculatus* y la sección *montanus*. Sin embargo, en particular dentro de la sección *montanus* (124 especies), no existe consenso sobre las relaciones filogenéticas de los grandes grupos que lo conforman: grupos *montanus*, *darwinii* y *wiegmannii* y series *anomalus* y *melanops*. Este problema se atendió en el capítulo 1, donde se realizaron inferencias filogenéticas utilizando novedosos métodos de árboles de especies, así como también de utilizando una matriz concatenada tradicional, e incluyendo la matriz de datos moleculares más grande disponible al momento para el subgénero *Eulaemus* (14 loci, 188 terminales). En este capítulo no fue posible arribar a una conclusión robusta sobre las relaciones de los grandes grupos, siendo que los diferentes métodos recuperaron diferentes relaciones. Los resultados de los análisis Bayesianos, mostraron ramas cortas a niveles de los internodos ancestrales, sugiriendo un escenario altamente desafiante para las reconstrucciones filogenéticas, ya que se espera alta discordancia entre árboles génicos. Ante estos patrones, una hipótesis plausible a ser evaluada, la constituye la posibilidad de ancestros comunes compartidos entre los diferentes grandes grupos antes mencionados. Este fue el tema central del capítulo 2, donde se evaluó la hipótesis de radiación rápida involucrando los ancestros de las especies de la sección *montanus*. A partir de los resultados allí obtenidos, se concluye que la hipótesis más probable para explicar las relaciones entre ellos, corresponde a dos politomías duras, una de las cuales fue datada hace 10.14 ma atrás y que implica que los grupos *montanus*, *darwinii* y *wiegmannii* y series *anomalus* y *melanops* comparten un ancestro común más cercano. Por otro lado, el mismo caso fue concluido para *donosobarrosi* y *fiztingerii* y los complejos *boulengeri* y *rothi* (datado hace 5.48 ma atrás). Arribar a esta conclusión no sólo permite explicar las grandes discordancias entre las publicaciones sistemáticas del grupo de los últimos 20 años, sino que también permiten contribuir al conocimiento de la forma en que las especies son capaces de diversificarse. Así también, permite avanzar en el conocimiento de cómo han evolucionado estos grupos de vertebrados de América del Sur, sobre la cual actualmente se conoce muy poco.

Otro problema que atendió esta tesis, refiere a estudiar la parafilia mitocondrial previamente reportada por Avila et al. (2006), para los complejos *boulengeri* y *rothi*. En organismos como las lagartijas, existen dos posibles causas que pueden producir parafilia en árboles de genes: (i) división de linaje incompleta (ILS), la cual resulta por simple azar en la



segregación estocástica de los genes durante los eventos de especiación, (ii) hibridación, que corresponde a ocurrencia de flujo génico posterior a los eventos de especiación. Estas dos posibilidades no son excluyentes, y producen patrones similares en los árboles génicos, con lo que distinguir entre ambas resulta un desafío en biología evolutiva.

En el capítulo 3 se presentó y evaluó la eficacia de un nuevo método que puede ser utilizado para detectar hibridación, en presencia de ILS. Esta metodología muestra un buen rendimiento utilizando matrices de datos modestas (5 a 10 individuos por especie, y 5 a 10 loci), incluso bajo escenarios desafiantes de alto impacto de ILS y bajos niveles de flujo génico. En el capítulo 4 se utilizó este método para evaluar la probabilidad de flujo génico entre especies de los complejos *boulengeri* y *rothi*. Los resultados fueron concluyentes: se detectaron altos niveles de flujo génico entre las especies *L. tehuelche* y *L. rothi*, así como también entre *L. rothi* y el ancestro común de *L. boulengeri* y *L. telsen*. Las comparaciones morfológicas revelaron que los descendientes de híbridos poseen un morfología tendiente a intermedia entre las especies parentales, aunque más similar a *L. rothi*.

En particular, el capítulo 3 constituye un gran avance al proponer un nuevo método que puede aplicarse tanto en otros grupos de lagartijas, como en una larga lista de otros organismos eucariotas, donde la división de linaje incompleta y la hibridación sean hipótesis plausibles para explicar patrones observados. Por otro lado, el capítulo 4 contribuye al conocimiento de los mecanismos evolutivos que promueven y mantienen la diversidad genética actual, como un nuevo ejemplo que demuestra que la hibridación es un fenómeno más común de lo que antes se pensaba. De hecho, para el caso particular de *Liolaemus*, la hipótesis de flujo génico interespecífico fue sugerido en numerosos otros grupos dentro del género, y corroborar este nuevo caso, es disparador de nuevas preguntas referidas al rol de la hibridación en el género *Liolaemus*.

Por último, en el capítulo 5 se evaluó la existencia de dos nuevas especies dentro del complejo *rothi*, comparando la evolución molecular y morfológica del grupo. En este capítulo, se utilizó un programa de limitación de especies que trabaja en un marco coalescente. Los resultados moleculares demostraron, con altas probabilidades, que las especies candidatas *L. sp. M 34* y *L. sp. 4* constituyen dos linajes que evolucionan independientemente y que habrían divergido hace 1.48 y 1.89 ma atrás, respectivamente. Sin embargo, los resultados de las comparaciones morfológicas no lograron separar estas especies candidatas de otras dentro del grupo. Se detectó también la influencia de fuerzas no aleatorias que modelan la evolución fenotípica del complejo *rothi*. En este sentido, los resultados demuestran que el no observar una divergencia morfológica contrastante a la molecular, puede referir a presiones de selección que mantienen en un óptimo adaptativo a las especies involucradas.

La gran diversidad del género ha llamado la atención a muchos investigadores de las últimas décadas, siendo que gran cantidad de nuevas especies fueron descritas. Esto fue posible principalmente a la incorporación de datos moleculares, que permitió observar la gran diversidad genética del género, que no es tan clara a nivel morfológico. Las lagartijas de este género han sido asociadas a una biología generalista más que especialista, probablemente dado que habitan en ambientes fluctuantes y heterogéneos. En general se sabe, que el habitar en gran diversidad de ambientes, así como las condiciones climáticas extremas, ejercen presiones de selección en las cuales organismos generalistas resultan tener un grado de adecuación mayor, tal como se propone en el capítulo 5. Por otro lado, en esta tesis se propone evaluar en un futuro la idea de que la hibridación pueda constituir una estrategia evolutiva, la cual permita generar fenotipos intermedios y conservados, promoviendo la exitosa condición generalista de *Liolaemus*.

# Bibliografía

- Abdala C.S. 2003. Cuatro nuevas especies del género *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae), pertenecientes al grupo *boulengeri*, de la Patagonia, Argentina. *Cuadernos de Herpetología* (1–2), 3–32.
- Abdala C.S. 2005. Dos nuevas especies del género *Liolaemus* (Iguania: Liolaemidae) y redescipción de *Liolaemus boulengeri* (Koslowsky, 1898). *Cuadernos de Herpetología* 18: 3-33.
- Abdala C.S. 2007. Phylogeny of the *boulengeri* group (Iguania: Liolaemidae, *Liolaemus*). *Zootaxa* 1538: 1-84.
- Abdala C.S. 2012. Taxonomic study and morphology based phylogeny of the patagonic clade *Liolaemus melanops* group (Iguania: Liolaemidae), with the description of three new taxa. *Zootaxa* 3163: 1–32
- Abdala C.S., Juarez Heredia V.I. 2013. Taxonomía y filogenia de un grupo de lagartosamezados: El grupo de *Liolaemus anomalus* (Iguania: Liolaemidae). *Cuadernos de Herpetología* 27: 109–153.
- Abdala C.S., 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: 1-28.
- Abdala V., Tulli M.J., Russel A.P., Powell G.L., Cruz B.F. 2014. Anatomy of the Crus and Pes of Neotropical iguanian lizards in relation to habitat use and digitally based grasping capabilities. *The Anatomical Record* doi: 10.1002/ar.22851.
- Akaike H. 1973. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In B. N. Petrov and F. Csaki (Eds.), *Second international symposium on information theory* (pp. 267-281). Budapest: Academiai Kiado.
- Albino A.M. 2008. Lagartos iguanios del Colhuehuapense (MiocenoTemprano) de Gaiman (provincia del Chubut, Argentina). *Ameghiniana* 45: 775-782.
- Ané C., Larget B., Baum D.A., Smith S.D., Rokas A. 2007. Bayesian estimation of concordance among gene trees. *Molecular Biology and Evolution* 24: 412.426.
- Aparacio J., Ocampo M. 2010. *Liolaemus* grupo *montanus* Etheridge, 1995 (Iguania – Liolaemidae). *Cuadernos de Herpetología* 24: 133–135.

- Avila L.J., Morando M., Sites J.W. Jr. 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., Morando M., Perez C.H.F., Sites J.W. Jr. 2004. Phylogenetic relationships of lizards of the *Liolaemus petrophilus* group (Squamata, Liolaemidae), with description of two new species from western Argentina. *Herpetologica* 60: 187–203.
- Avila L.J., Morando M., Perez D.R., Sites J.W. Jr. 2009. A new species of *Liolaemus* from Añelo sand dunes, Northern Patagonia, Neuquén, Argentina, and molecular phylogenetic relationships of the *Liolaemus wiegmanni* species group (Squamata, Iguania, Liolaemini). *Zootaxa*, 2234, 39–55.
- Avila L.J. Olave M., Perez C.H.F., Perez D.R., 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.
- Audzijonyte A., Vrijenhoek R. 2010. When gaps really are gaps: statistical phylogeography of hydrothermal vent invertebrates. *Evolution* 64: 2369-2384.
- Baez A.M., ScillatoYané G.J. 1979. Late Cenozoic environmental changes in temperate Argentina. In: W.E. Duellman (Ed.), *The South American Herpetofauna: its origin, evolution, and dispersal*. Museum of Natural History. The University of Kansas. Monograph No. 7. pp. 141-156.
- Barbujani G., Nasidze I.S., Whitehead G.N. 1994. Genetic diversity in the Caucasus. *Human Biology*, 66: 639-668.
- Beheregaray L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754–3774.
- Belfiore N.M., Liang L., Moritz C. 2008. Multilocus phylogenetics of a rapid radiation in the genus *Thomomys* (Rodentia: Geomyidae). *Systematic Biology* 57: 294-310.
- Benavides E., Baum R., Snell H.M., Snell H.L., Sites J.W. Jr. 2009. Island biogeography of Galápagos lava lizards (Tropiduridae: *Microlophus*): species diversity, arrival times, and colonization within the archipelago. *Evolution* 63: 1606-1626.
- Bickford D., Lohman D.J., Sodhi N.S., Ng P.K.L., Meier R., Winker K., Ingram K.K., Das I. 2006. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 148-155.
- Blanco-Pastor J.L., Vargas P., Pfeil B. 2012. Coalescent simulation reveal hybridization and incomplete lineage sorting in Mediterranean linaria. *PloS one*, 7: 1-16.

- Breitman M.F., Avila L.J., Sites J.W. Jr., Morando M. 2011. Lizards from the end of the world: Phylogenetic relationships of the *Liolaemus lineomaculatus* section (Squamata: Iguania: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 59: 364-376.
- Breitman M.F., Avila L.J., Sites J.W. Jr., 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 co-distributed taxa. *Molecular Ecology* 25: 6068–6085.
- Breitman M.F., Morando M., Avila L.J. 2013. Past and present taxonomy of *Liolaemus lineomaculatus* section (Liolaemidae): is the morphological arrangement hypothesis valid?. *Zoological Journal of the Linnean Society* 168: 612–668.
- Brito P.H., Edwards S.V. 2009. Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica* 135: 439-455.
- Buckley T., Cordeiro M., Marshall D., Simon C. 2006. Differentiating between hypotheses of lineage sorting and introgression in New Zealand cicadas (*Maoricicada dugdale*). *Systematic Biology* 55: 411–425.
- Butler MA, King A. 2004. Phylogenetic Comparative Analysis: A Modeling Approach for Adaptive Evolution. *The American Naturalist* 164: 683–695.
- Camargo A., Sinervo B., Sites J.W. Jr. 2010. Lizards as model organisms for linking phylogeographic and speciation studies. *Molecular Ecology* 19: 3250–3270.
- Camargo A., Avila L.J., Morando M., Sites J.W. Jr. 2012 a. 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., Avila L.J., Morando M., Sites J.W. Jr. 2012 b. 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., Werneck P.F., Morando M., Sites J.W. Jr., Avila L.J. 2013. Quaternary range and demographic expansion of *Liolaemus darwini* (Squamata:Liolaemidae) in the Monte Desert of Central Argentina using Bayesian phylogeographic and ecological niche modeling. *Molecular Ecology*, doi: 10.1111/mec.12369.
- Carnaval A., Hickerson M.J., Haddad C.F.B., Rodrigues M.T., Moritz C. 2009. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785-789.

- Carstens B.C., Richards C.L. 2007. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution* 61: 1439-1454.
- Carstens B.C., Pelletier T.A., Reid N.M., Salter J.D. 2013. How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology* 22:4369–4383.
- Cei J.M. 1986. Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina. *Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas*.
- Cruz F.B., Fitzgerald L.A., Espinoza R.E., Schulte J.A. II. 2005. The importance of phylogenetic scale in tests of Bergmann's and Rapoport's rules: lessons from a clade of South American lizards. *Journal of Evolutionary Biology* 18: 1559–1574.
- Cooper N.P., Purvis A. 2009. *Journal of Evolutionary Biology*, 22: 1024–1035.
- Cornuet J.M., Santos F., Beaumont M.A., Robert C.P., Marin J.M., Balding D.J., Guillemaud T., Estoup A. 2008. Inferring population history with DIY ABC: a user-friendly approach to approximate Bayesian computation. *Bioinformatics* 24: 2713-2719.
- Dayrat B. 2005. Toward integrative taxonomy. *Biological Journal of the Linnean Society* 85: 407–415.
- de Queiroz K. 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. Pages 57–75 in D.J. Howard and S.H. Berlocher, eds., *Endless Forms. Species and Speciation*. Oxford University Press, Oxford, England, UK. 470 pp.
- de Queiroz K. 2005 b. A unified concept of species and its consequences for the future of taxonomy. *Proceedings of the California Academy of Science* 56:196–215.
- Degnan J.H., Rosenberg N.A. 2006. Discordance of species trees with their most likely gene trees. *PLoS Genetics* 3: 762–768.
- Degnan J.H., Rosenberg N.A. 2009. Gene tree discordance, phylogenetic inference and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 332-340.
- Degnan J.H., Salter L. 2005. Gene tree distributions under the coalescent process. *Evolution* 59: 24–37.
- Delsuc F., Brinkmann H., Philippe H. 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature* 6: 361-375.
- Drummond A.J., Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214.

- Donoso-Barros R. 1966. Reptiles de Chile. Santiago: Universidad de Chile.
- Ebersberger I., Galgoczy P., Taudien S., Taenzer S., Platzer M., von Haeseler A. 2007. Mapping human genetic ancestry. *Molecular Biology and Evolution* 24: 2266–2276.
- Edwards S.V., Beerli P. 2000. Perspective: gene divergence, population divergence and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. *Evolution* 54: 1839-1854.
- Edwards D.L., Knowles L.L. 2014. Species detection and individual assignment in species delimitation: can integrative data increase efficacy? *Proceedings of the Royal Society B* 20132765. <http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.2765>.
- Escudero P.C., Minoli I., Frutos N., Avila L.J., Morando M. 2012. Estudio comparativo de melanismo en lagartijas del grupo *Liolaemus fitzingerii* (Liolaemini:Liolaemus). *Cuadernos de Herpetología* 26: 79-89.
- Espinoza R.E., Wiens J.J., Tracy C.R. 2004. Recurrent evolution of herbivory in small, cold-climate lizards: breaking the ecophysiological rules of reptilian herbivory. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 101: 16819-16824.
- Etheridge R. 1993. Lizards of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Iguania: Tropiduridae) in northern Argentina. *Museo Regionale di Scienze Naturali Bollettino* 119: 137–199.
- Etheridge R. 1995. Redescription of *Ctenoblepharys adspersa*, Tschudi, 1845, and the taxonomy of Liolaeminae (Reptilia: Squamata: Tropiduridae). *American Museum Novitates* 3142: 1–34.
- Etheridge R. 2000. A review of lizards of the *Liolaemus wiegmanni* Group (Squamata, Iguania, Tropiduridae). And a history of morphological change in the sand-dwelling species. *Herpetological Monographs* 14: 293–352.
- Etheridge R., 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.
- Etheridge R., de Queiroz, K. (1988) A phylogeny of Iguanidae. *In*: Estes, R. & Pregill, G. (Ed.), *Phylogenetic Relationships of the Lizard Families, Essays Commemorating Charles L. Camp*. Stanford University Press, Stanford, 283–368.
- Fagundes NJR, Ray N, Beaumont M, Neuenschwander S, Salzano FM, Bonatto SL and Excoffier L. 2007. Statistical evaluation of alternative models of human evolution. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 104: 17614-17619.

- Ferris S.D., Sage R.D., Huang C.M., Nielsen J.T., Ritte U., Wilson A.C. 1983. Flow of mitochondrial DNA across a species boundary. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 80: 2290–2294.
- Fitzinger L.J. 1826. Neue classification der reptilian nach ihren natürlichen Verwandtschaften: nebst einer Verwandtschafts-Tafel und einem Verzeichnisse der reptilian-sammlung des K.K. Zoologischen Museums zu Wien. J.G. Heubner, Vienna.
- Funk D.J., Omland K.E. 2003. Species-level paraphyly and polyphyly: frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 34: 397–423.
- Fontanella F.M., Olave M., Avila L.J., Sites J.W. Jr., 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. doi:10.1111/j.1096-3642.2011.00786.x.
- Garreaud R.D. 2009. The Andes climate and weather. *Advances in Geoscience* 7: 1–9.
- Gerald D., Gibbs H.L., Kubatko L. 2011. Estimating hybridization in the presence of coalescence using phylogenetic intraespecific sampling. *BMC Evolutionary Biology*, 11:291.
- Gray DA, Huang H, Knowles LL. 2008. Molecular evidence of a peripatric origin for two sympatric species of field crickets (*Gryllus rubens* and *G. texensis*) revealed from coalescent simulations and population genetic tests. *Molecular Ecology* 17: 3826-55.
- Green R.E. et al. 2010. A draft of the Neandertal genome. *Science* 328: 710-722.
- Halloy M., Etheridge R., Burghardt G.M. 1998. To bury in sand Phylogenetic relationships among lizard species of the *boulengeri* Group, *Liolaemus* (Reptilia: Squamata: Tropiduridae), based on behavioral characters. *Herpetological Monographs* 12: 1–37.
- Harmon L. J., Weir J., Brock C., Glor R. E., Challenger W. 2008. GEIGER: investigating evolutionary radiations. *Bioinformatics* 24: 129 – 131.
- Harrison R. 1991. Molecular changes at speciation. *Annual Review in Ecology and Systematics* 22: 281–308.
- Heath L., van der Walt E., Varsani A., Martin D.P. 2006. Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *Journal Virol* 80: 11827-11832.
- Heled J., Drummond A.J. 2010. Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data. *Molecular Biology and Evolution* 27: 570-580.



- Hickerson M.J. et al. 2009. 20 years after Avise et al. 1987: comparative phylogeography fulfilling original promise by integrating with emerging fields. *Molecular Phylogenetics Evolution* 54: 291-301.
- Ho S.Y.M. 2007. Calibrating molecular estimates of substitution rates and divergence times in birds. *Journal of Avian Biology* 38: 409-414.
- Hone D.W.E., Benton M.J. 2005 The evolution of large size: how does Cope's rule work? *Trends in Ecology and Evolution* 20: 4 – 6 doi:10.1016/j.tree.2004.10.012.
- Hudson R.R. 2002. Generating samples under a Wright-Fisher neutral model. *Bioinformatics* 337-338.
- Iglesias A.R., Artabe A.E., Morel E.M. 2011. The evolution of Patagonian climate and vegetation from the Mesozoic to the present. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 409-422.
- Innan H., Watanabe H. 2006. The effect of gene flow on the coalescent time in the human-chimpanzee ancestral population. *Molecular Biology and Evolution* 23: 1040–1047.
- Jansson R., Dynesius M. 2002. The fate of clades in a world of recurrent climatic change: Milankovitch oscillations and evolution. *Annual Review of Ecology and Systematics* 33: 741-777.
- Joly S., McLenachan P.A., Lockhart P.J. 2009. A statistical approach for distinguishing hybridization and incomplete lineage sorting. *The American Naturalist* 174: 54–70.
- Katoh K., Misawa K., Kuma K., Miyata T. 2002. MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Research* 30: 3059–3066.
- Kingman J.F.C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes and their Application* 13: 235-248.
- Knowles L.L. 2004. The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology* 17: 1–10.
- Knowles L.L. 2009. Statistical Phylogeography. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics*, 40: 593–612.
- Knowles L.L., Carstens B.C., Keat M.L. 2007. Coupling genetic and ecological-niche models to examine how past population distributions contribute to divergence. *Current Biology* 17: 1–7.
- Knowles L.L., Kubatko L.S. 2010. Estimating species trees: practical and theoretical aspects. Wiley, Blackwell.

- Knowles L.L., Maddison W.P. 2002. Statistical Phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623–2635
- Koslowsky J. 1898. Enumeración sistemática y distribución geográfica de los reptiles argentinos. *Revista del Museo de La Plata* 8: 161–200.
- Kubatko L., Carstens B.C., Knowles L.L. 2009. STEM: Species Tree Estimation using Maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics* 25: 971-973.
- Kuhner M.K. 2006. Lamarc 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics* 22: 768-770.
- Kuhner M.K., Felsenstein J. 1994. Simulation comparison of phylogeny algorithms under equal and unequal evolutionary rates. *Molecular Biology and Evolution* 11: 459–468.
- LaBarbera M. 1989 Analyzing body size as a factor in ecology and evolution. *Annual Review in Ecology and Systematics* 20: 97 – 117 doi:10.1146/annurev.es.20.110189.000525.
- Lanchier B., Neuhauser C. 2006. A spatially explicit model for competition among specialists and generalists in a heterogeneous environment. *The Annals of Applied Probability* 26: 1385-1410.
- Laurent R.F. 1984. On some iguanid genera related to or previously confused with *Liolaemus Wiemann*. *Journal of Herpetology* 18: 357-373.
- Laurent R.F. 1992. On some overlooked species of the genus *Liolaemus Wiegmann* (Reptilia: Tropiduridae) from Perú. *Breviora* 494: 1-33.
- Leaché A.D., Rannala B. 2011. The accuracy of species tree estimation under simulation: A comparison of methods. *Systematic Biology* 60: 126-37.
- Leaché A.D., Harris R.B., Rannala B., Yang Z. 2014. The influence of gene flow on species tree estimation: a simulation study. *Systematic Biology* 63: 17–30.
- Liu L., Pearl D.K. 2007. Species trees from gene trees: reconstructing Bayesian posterior distributions of a species phylogeny using estimated gene tree distributions. *Systematic Biology* 56: 504-514.
- Lobo F. 2001. A phylogenetic analysis of lizards of the *Liolaemus chiliensis* group (Iguania: Tropiduridae). *Herpetological Journal* 11: 137–150.
- Lobo F. 2005. Las relaciones filogenéticas dentro del grupo *chiliensis* (Iguania: Liolaemidae: *Liolaemus*): sumando nuevos caracteres y taxones. *Acta Zoológica Lilloana* 49: 67–89.
- Maddison W. 1997. Gene trees in species trees. *Systematic Biology* 46:523–536.
- Maddison, W.P., L.L. Knowles. 2006. Inferring phylogeny despite incomplete lineage sorting.

- Sys. Biol. 55: 21-30.
- Maddison, W.P., D.R. Maddison. 2010. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis. Version 2.74. Available at <http://mesquiteproject.org>.
- Mallet J (2005) Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20, 229–237.
- Mallet J (2007) Hybrid speciation. *Nature* 446, 279–283.
- Markgraf V, McGlone M, Hope G. 1995. Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems— a southern perspective. *Trends Ecol. Evol.* 10: 143-149.
- Martin, D. & Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16, 562-563.
- Martin S.H., J.W. Davey, C.D. Jiggins. 2013. Evaluating the use of ABBA-BABA statistics to locate introgressed loci. bioRxiv doi: 10.1101/001347
- Maureira-Butler I.J., Pfeil B.E., Muangprom A., Osborn T.C., Doyle J.J. 2008. The reticulate history of *Medicago* (Fabaceae). *Systematic Biology* 57:466–482.
- Mayden R.L. 1997. A hierarchy of species, species concepts and individuation in the natural world. *Fish and Fisheries* 3: 171-196.
- McCracken K.G., Sorenson M.D. 2005. Is homoplasy or lineage sorting the source of incongruent mtDNA and nuclear gene trees in the stiff-tailed ducks (*Nomonyx-Oxyura*)?. *Systematic Biology* 54: 35-55.
- Medina CD, Avila LJ, 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.
- Meng C., Kubatko L.S. 2009. Detecting hybrid speciation in the presence of incomplete lineage sorting using gene tree incongruence: a model. *Theoretical Population and Biology* 75: 35–45.
- Morando M. 2004. *Sistemática y filogenia de grupos de especies de los géneros Phymaturus y Liolaemus (Squamata: Tropiduridae: Liolaeminae) del oeste y sur de Argentina*. Unpublished D. Phil. Thesis, Universidad Nacional de Tucumán, Argentina.
- Morando M., Avila L.J., Sites J.W. Jr. 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., Baker, J. & Sites, J.W., Jr. 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., Turner C., Sites J.W. Jr. 2007. Molecular evidence for species complex in the Patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 952–73.
- Morando M., Avila L.J., Turner C., Sites J.W. Jr. (2008). Phylogeography between valleys and mountains: the history of *Liolaemus koslowskyi* (Squamata, Liolaemini). *Zoologica Scripta* 37: 603-638.
- Muster C., Maddison W.P., Uhlmann S., Berendonk T.U., Vogler A.P. 2009. Arctic-alpine distributions metapopulations on a continental scale? *The American Naturalist* 173: 313-326.
- Nei M. 1987. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia Univ. Press, New York.
- Neigel J.E., Avise J.C. 1986. *En: E. Nevo y S. Karlin, eds. Evolutionary processes and theory*. Acad Press, N.Y.
- Nielsen R., Beaumont M.A. 2009. Statistical inferences in phylogeography. *Molecular Ecology*. 18:1034–1047.
- Noonan B., Yoder A.D. 2009. Anonymus nuclear markers for Malagasy plated lizards (*Zonosaurus*). *Molecular Ecology Resource* 9: 402-402.
- Olave M., Avila L.J., Sites J.W. Jr., Morando M. 2011. Evidence of hybridization in the Argentinean lizard *Liolaemus gracilis* and *Liolaemus bibronii* (Iguani:Liolaemini): An integrative approach based on genes and morphology. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 381–391.
- Olave M., Avila L.J., Sites J.W. Jr., Morando M. 2014 a. Multilocus phylogeny of the widely distributed South American lizard clade *Eulaemus* (Liolaemini, *Liolaemus*). *Zoologica Scripta* doi: 10.1111/zsc.12053.
- Olave M., Sola E., Knowles L.L. 2014 b. Upstream analyses create problems with DNA-based Bayesian species delimitation. *Systematic Biology* 63: 263-271. doi: 10.1093/sysbio/syt106.
- Olave M., Avila L.J., Sites J.W. Jr., Morando M. (*en revisión a*). Model-based approach to test hard polytomies in the *Eulaemus* clade of the most diverse South American lizard genus *Liolaemus* (Liolaemini, Squamata). *Zoological Journal of the Linnean Society*.

- Olave M., Avila L.J., Sites J.W. Jr., Morando M. (*en revisión b*) Detecting hybridization by likelihood calculation of gene tree extra lineages given explicit models. *Systematic Biology*.
- Pamilo P., Nei M. 1988. Relationships between gene trees and species trees. *Molecular Biology and Evolution* 5: 568-583.
- Penny D., Hendy M.D. 1985. The use of tree comparison metrics. *Systematic Zoology* 34: 75–82.
- Pincheira-Donoso D., Scolaro J.A., Schulte J.A. II. 2007. The limits of polymorphism in *Liolaemus rothi*: Molecular and phenotypic evidence for a new species of the *Liolaemus boulengeri* clade (Iguanidae, Liolaemini) from boreal Patagonia of Chile. *Zootaxa* 1452: 25-42.
- Posada D. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253–1256.
- Portik D., Wood P.L. Jr., Grismer J.L., Stanley E.L., Jackman, T.R. 2012. Identification of 104 rapidly-evolving nuclear protein-coding markers for amplification across scaled reptiles using genomic resources. *Conservation Genetic Resources* 4: 1-10.
- Pyron R.A., Burbrink F.T., Wiens J.J. 2013. A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC Evolutionary Biology* 2013: 13-93.
- Rabassa J., Coronato A.M., 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 Science* 20: 81- 103.
- Rambaut A., Drummond A.J. 2009. Tracer v1.5. Available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Rambaut A., Grassly N. 1997. SeqGen: An application for the Monte Carlo simulation of DNA sequence evolution along phylogenetic trees. *Computational Applications in Bioscience* 13: 235-238.
- Ramos V. 1989. The birth of southern South America. *The American Scientist* 77: 444-450.
- Rannala B., Yang Z. 2013. Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. *Genetics* 194: 245–253.
- Richards C.L., Carstens B.C., Knowles L.L. 2007. Distribution modeling and statistical phylogeography: An integrative framework for generating and testing alternative biogeographic hypotheses. *Journal of Biogeography* 34: 1833-1845.

- Rieseberg L., Wendel J. 1993. Introgression and its consequences in plants. In: R.G. Harrison, editor. Hybrid zones and the evolutionary process. New York: Oxford University Press. p. 70–109.
- Rokas A., Carroll S.B. 2006. Bushes in the Tree of Life. *PLoS Biology* 4: 1899-1904.
- Ronquist F., Huelsenbeck J.P. 2003. MrBayes version 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosenberg N.A. 2002. The probability of topological concordance of gene trees and species trees. *Theoretical Population Biology* 61: 225–247.
- Rosenberg N.A. 2003. The shapes of neutral gene genealogies in two species: probabilities of monophyly, paraphyly, and polyphyly in a coalescent model. *Evolution* 57: 1465–1477.
- Rosenberg N.A., Tao R. 2008. Discordance of species trees with their most likely gene trees: the case of five taxa. *Systematic Biology* 57: 131–140.
- Rosenberg N.A. 2013. Discordance of species trees with their most likely gene trees: a unifying principle. *Molecular Biology and Evolution* 30(12):2709-2713. doi:10.1093/molbev/mst160
- Quinteros S.A., Abdala C.S. 2011. A new species of *Liolaemus* of the *Liolaemus montanus* section (Iguania: Liolaemidae) from Northwestern Argentina. *Zootaxa* 2789: 35–48.
- Schmidt H.A., Strimmer K., Vingron M., Von Haeseler A. 2002. TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing. *Bioinformatics* 18: 502-504.
- Schulte J.A. II, Macey J.R., Espinoza R.E., 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.
- Sérsic A.N., Cosacov A., Cocucci A.A., Johnson L.A., Pozner R., Avila L.J., Sites J.W. Jr., Morando M. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 475-494.
- Sinclair E.A., Pramuk P.B., Bezy R.L., Crandall K.A., Sites J.W. Jr. 2010. DNA evidence for nonhybrid origins of parthenogenesis in natural populations of vertebrates. *Evolution* 64: 1346-57.
- Sites J.W. Jr., Marshall J.C. 2004. Operational criteria for delimiting species. *Annual Review in Ecology and Systematics* 35: 199–227.

- Sookias R.B., Butler R.J., Benson R.B.J. 2012. Rise of dinosaurs reveals major body-size transitions are driven by passive processes of trait evolution. *Proceedings of the Royal Society of London B* 279: 2180–2187.
- Steele C.A., Storfer A. 2006. Coalescent-based hypothesis testing supports multiple Pleistocene refugia in the Pacific Northwest for the Pacific giant salamander (*Dicamptodon tenebrosus*). *Molecular Ecology* 15: 2477-2487.
- Strimmer K., Von Haeseler A. 1997. Likelihood-mapping: A simple method to visualize phylogenetic content of a sequence alignment. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 94: 6815-6819.
- Sullivan J.P., Lavaqué S., Hopkins C.D. 2002. Discovery and phylogenetic analysis of a riverine species flock of African electric fishes (Mormyridae: Teleostei). *Evolution* 56: 597–616.
- Swofford D. L. 2002. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Tajima F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437–460.
- Takahata N., Nei M. 1985. Gene genealogy and variance of interpopulational nucleotide differences. *Genetics* 110: 325–344.
- Than C., Nakhleh L. 2009. Species tree inference by minimizing deep coalescences. *PLoS Computational Biology* 5: e1000501. doi:10.1371/journal.pcbi.1000501
- Than C., Nakhleh L. 2010. Inference of parsimonious species phylogenies from multi-locus data by minimizing deep coalescences. In: *Estimating Species Trees: Practical and Theoretical Aspects*, L.L. Knowles and L.S. Kubatko (eds.), Wiley-VCH, 79-98.
- Than C.V., Rosenberg N.A.. 2011. Consistency properties of species tree inference by minimizing deep coalescences. *Journal of Computational Biology* 18: 1–15.
- Than C.V., Rosenberg N.A. 2013. Mathematical properties of the deep coalescence cost. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* 10: 61-72.
- Townsend T.M., Alegre R.E., Kelley S.T., Wiens J.J., Reeder T.W. 2008. Rapid developmental of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: an example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 47: 129–142.
- Voight B.F., Adams A.M., Frisse L.A., Qian Y., Hudson R.R., Di Rienzo A. 2005. Interrogating multiple aspects of variation in a full resequencing data set to infer human population size changes. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 102: 18508-13.

- Wakeley J. 2007. Coalescent Theory: an Introduction. New York: Roberts and Company Publishers.
- Wakeley J. 2008. Coalescent theory: an introduction. Greenwood Village (CO): Roberts and Company.
- Werneck F.P., Gamble T., Colli G.R., Rodrigues M. T., Sites J. W. Jr. 2012. Deep diversification and long-term persistence in the South American “dry diagonal”: Integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution* 66: 3014-3034.
- Whitfield J.B., Lockhart P.J. 2007. Deciphering ancient rapid radiations. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 258–265.
- Wiegmann A. 1834. *Herpetologica mexicana. Seu descriptio amphibiorum Novae Hispaniae, quae itineribus comitis de Sack, Fernando Deppe, et Chr. Schiede. Vol. 1. Saurorum species.* Berlin.
- Wiens J.J., Reeder T.W., Montes de Oca A.N. 1999. Molecular phylogenetics and evolution in sexual dichromatism among population of the Yarrow’s spiny lizard (*Sceloporus jarrovi*). *Evolution* 53: 1884–1897.
- Willig M.R. et al. 2003. Latitudinal gradients of biodiversity: pattern process, scale, and synthesis. *Annual Review in Ecology Evolution and Systematics* 34: 273–309
- Xia X., Xia Z. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.
- Xia X., Zheng X., Salemi M., Chen L., Wang Y. 2003. An index of substitution saturation and its application. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 26: 1-7.
- Yang Z., Rannala B. 2010. Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA* 107: 9264–9269.
- Zapata F., Jiménez I. 2012. Species delimitation: inferring gaps in morphology across geography. *Systematic Biology* 61: 179–194.
- Zhang L. 2011. From gene trees to species trees II: species tree inference by minimizing deep coalescence events. *IEEE/ACM Transactions in Computational Biology and Bioinformatics* 8: 1685-1691.
- Zhang C., Rannala B., Ziheng Y. (*en prensa*). Bayesian species delimitation can be robust to guide tree inference errors. *Systematic Biology*.



Apéndice A: Detalle de individuos utilizando en el capítulo 1.

Número de colección (LJAMM)	Especie	Provincia	Departamento	Localidad	Coordenadas
<i>Liolaemus (sensus stricto)</i>					
9896	<i>Liolaemus bibronii</i>	Santa Cruz	Deseado	Ruta Provincial 47, 55.4 km SW Tellier	47°51' S 66°37' W
9897	<i>Liolaemus bibronii</i>	Santa Cruz	Deseado	Ruta Provincial 47, 55.4 km SW Tellier	47°51' S 66°37' W
11121	<i>Liolaemus petrophilus</i>	Rio Negro	9 de Julio	Ruta Provincial 8, 34,8 km S Los Menucos	41°05' S 67°53' W
11122	<i>Liolaemus petrophilus</i>	Rio Negro	9 de Julio	Ruta Provincial 8, 34,8 km S Los Menucos	41°05' S 67°53' W
<i>Eulaemus</i>					
<i>lineomaculatus</i> section					
9238	<i>Liolaemus archeoforus</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Puesto Lebrun 27.3 km, Buenos Aires Plateau	46°57' S 71°06' W
9240	<i>Liolaemus archeoforus</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Puesto Lebrun 27.3 km W, Lago Buenos Aires Plateau	46°57' S 71°06' W
9275	<i>Liolaemus avilae</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Meseta Lago Buenos Aires, 18.7 SW Puesto Lebrun	47°05' S 71°01' W
9277	<i>Liolaemus avilae</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Meseta Lago Buenos Aires, 18.7 SW Puesto Lebrun	47°05' S 71°01' W
9394	<i>Liolaemus baguali</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	Sierra del Bagual, road 1 km E Ruta Nacional 40	49°24' S 71°29' W
9395	<i>Liolaemus baguali</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	Sierra del Bagual, road 1 km E Ruta Nacional 40	49°24' S 71°29' W
9388	<i>Liolaemus caparensis</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	Meseta basáltica Punta del Lago, 7 km N Estancia Punta del Lago	49°34' S 72°02' W
13049	<i>Liolaemus chacabucoense</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Ruta Provincial 41, 35.3 km E Paso Roballos	47°11' S 71°35' W
13050	<i>Liolaemus chacabucoense</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Ruta Provincial 41, 35.3 km E Paso Roballos	47°11' S 71°35' W

7163	<i>Liolaemus escarchadosi</i>	Santa Cruz	Corpen Aike	Ruta Nacional 288, 1 km E junction Ruta Nacional 3, 24 km W Puerto Santa Cruz	50°03' S 68°53' W
9340	<i>Liolaemus escarchadosi</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	Ruta Provincial 65, 43.5 km W junction Ruta Provincial 17	49°46' S 70°43' W
9446	<i>Liolaemus gallardoii</i>	Santa Cruz	Río Chico	Estancia Cerro Beltza, 12 km N Ruta Provincial 37	47°59' S 71°40' W
9454	<i>Liolaemus gallardoii</i>	Santa Cruz	Río Chico	Estancia Cerro Beltza, 12 km N Ruta Provincial 37	47°59' S 71°40' W
9491	<i>Liolaemus hatcheri</i>	Santa Cruz	Río Chico	Estancia Cerro Beltza, 12 km N Ruta Provincial 37	47°59' S 71°40' W
9489	<i>Liolaemus hatcheri</i>	Santa Cruz	Río Chico	Estancia Cerro Beltza, 12 km N Ruta Provincial 37	47°59' S 71°40' W
9776	<i>Liolaemus kingi</i>	Santa Cruz	Deseado	5.5 km N Puerto Deseado	47°42' S 65°50' W
326	<i>Liolaemus kingii</i>	La Rioja	Castro Barros	Ruta Provincial 7, 6 Km E Anillaco	66°52' S 28°47' W
7300	<i>Liolaemus kolengh</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Camino a Los Antiguos, 15.6 a 21 km N paso Roballos	47°01' S, 71°48' W
7471	<i>Liolaemus lineomaculatus</i>	Santa Cruz	Deseado	5.5 km N Puerto Deseado by sea-side road	47°43' S 65°50' W
9n	<i>Liolaemus magellanicus</i>	Santa Cruz	Guer aike	Reserva Provincial Cabo Vírgenes,	51°59' S 69°05' W
6724	<i>Liolaemus magellanicus</i>	Santa Cruz	Guer aike	Cañadon Lucacho, 8 km N of Faro	52°14' S 68°30' W
9258	<i>Liolaemus morandae</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Laguna de los Gendarmes, Ruta Provincial 45, 87.6 km NW Perito Moreno	46°05' S 71°40' W
9678	<i>Liolaemus morandae</i>	Chubut	Escalante	Ruta Provincial 37, 2.5 km W junction Ruta Nacional 3	45°37' S 67°41' W
7201	<i>Liolaemus sarmientoi</i>	Santa Cruz	Guer Aike	Laguna Azul, Reserva Geológica Provincial Laguna Azul	52°04' S 69°34' W
7206	<i>Liolaemus sarmientoi</i>	Santa Cruz	Guer Aike	Laguna Azul, Reserva Geológica Provincial Laguna Azul	52°04' S 69°34' W
13033	<i>Liolaemus scolaroi</i>	XI Region de Aysen	Chile Chico	4 km NE entrance to Reserva Jeinimeni, 1 km NE Río Jeinimeni	46°48' S 71°58' W
13034	<i>Liolaemus scolaroi</i>	XI Region de Aysen	Chile Chico	4 km NE entrance to Reserva Jeinimeni, 1 km NE Río Jeinimeni	46°48' S 71°58' W

9221	<i>Liolaemus silvanae</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Puesto Lebrun 27.3 km W, Lago Buenos Aires Plateau	46°57' S 71°06' W
9222	<i>Liolaemus silvanae</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Puesto Lebrun 27.3 km W, Lago Buenos Aires Plateau	46°57' S 71°06' W
6911	<i>Liolaemus somuncurae</i>	Río Negro	9 de Julio	65.6 km police station El Rincón	41°23' S 66°57' W
6914	<i>Liolaemus somuncurae</i>	Río Negro	9 de Julio	65.6 km police station El Rincón	41°23' S 66°57' W
9407	<i>Liolaemus tari</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	Punta del Lago Basaltic Plateau	49°34' S 72°02' W
9408	<i>Liolaemus tari</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	Punta del Lago Basaltic Plateau	49°34' S 72°02' W
9618	<i>Liolaemus tristis</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Ruta Provincial 39, 7.5 km N Estancia La Maria,	46°58' S 69°47' W
9619	<i>Liolaemus tristis</i>	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Ruta Provincial 39, 7.5 km N Estancia La Maria	46°58' S 69°47' W
8426	<i>Liolaemus uptoni</i>	Chubut	Gastre	Ruta provincial 4, 58,3 km W Gan Gan	42°23' S 68°56' W
10944	<i>Liolaemus uptoni</i>	Chubut	Gastre	Ruta Provincial 4, 59.3 km W Gan Gan	42°23' S 68°56' W
7391	<i>Liolaemus zullyae</i>	Santa Cruz	Lago Argentino	4 km N Estancia Altavista	49°11' S 71°52' W
8894	<i>Liolaemus zullyae</i>	Chubut	Senguer	Ruta Nacional 40, 26 km N Alto Río Senguer	44° 48' S 70°42' W
13137	<i>Liolaemus zullyae</i>	XI Region de Aysen	Chile Chico	17 km NE entrance to Reserva Jeinimeni,	46°46' S 71°48' W
13039	<i>Liolaemus zullyae</i>	XI Region de Aysen	Chile Chico	17 km NE entrance to Reserva Jeinimeni,	46°46' S 71°48' W
13040	<i>Liolaemus zullyae</i>	XI Region de Aysen	Chile Chico	17 km NE entrance to Reserva Jeinimeni,	46°46' S 71°48' W
<i>montanus</i> section					
<i>anomalus</i> group					
12851	<i>Liolaemus anomalus</i>	Mendoza	Santa Rosa	Ruta Provincial 153, 30 km S Las Catitas	33°33' S 68°04' W

13163	<i>Liolaemus lentus</i>	Rio Negro	General Roca	Salitral North of Ingeniero Huergo	33°56' S 67°14' W
13164	<i>Liolaemus lentus</i>	Rio Negro	General Roca	Salitral North of Ingeniero Huergo	33°56' S 67°14' S
2300	<i>Liolaemus pseudoanomalus</i>	La Rioja	Felipe Varela	Ruta Provincial 26, 3 Km N Pagancillo.	29°30' S 68°07' W
10909	<i>Liolaemus pseudoanomalus</i>	San Juan	Jachal	Río Las Lajas	31°00' S 68°29' W
10911	<i>Liolaemus pseudoanomalus darwinii</i> group	San Juan	Jachal	16 km W Mogna, Sierra de Morado	30°41' S 68°29' W
10391	<i>Liolaemus darwinii</i>	Río Negro	San Antonio	Gran Bajo del Gualicho. 42,4 Km NW San Antonio Oeste	40°20' S 65°02' W
4046	<i>Liolaemus grosseorum</i>	Mendoza	Malargüe	Ruta Provincial 180, 28.1 Km N south entrance to La Matancilla	36°37' S 68°36' W
4159	<i>Liolaemus koslowskyi</i>	La Rioja	Famatina	Ruta Nacional 40, km 657	28°32' S 67°22' W
4428	<i>Liolaemus lavillai</i>	Salta	La Poma	Ruta Nacional 40, 2 km N La Poma	24°41' S 66°11' W
12735	<i>Liolaemus lavillai</i>	Salta	La Poma	Ruta Nacional 40, 13 km N La Toma	24°36' S 66°11' W
12019	<i>Liolaemus ornatos</i>	Jujuy	Cochinoca	Ruta Nacional 40, 58.8 km S junction Ruta Nacional 9	23°16' S 65°49' W
12021	<i>Liolaemus ornatos</i>	Jujuy	Cochinoca	Ruta Nacional 40, 58.8 km S junction Ruta nacional 9	23°16' S 65°49' W
4459	<i>Liolaemus uspallatensis</i>	Mendoza	Las Heras	Ruta Nacional 7, 4 Km W Uspallata	32°36' S 69°24' W
12500	<i>Liolaemus uspallatensis</i>	Mendoza	Las Heras	Los Tambillos	32°23' S 69°23' W
	<i>montanus</i> group				
543	<i>Liolaemus andinus</i>	Catamarca	Tinogasta	11 Km W Chaschuil, coast of Río Chaschuil	27°48' S 68°07' W
544	<i>Liolaemus andinus</i>	Catamarca	Tinogasta	11 Km W Chaschuil, coast of Río Chaschuil	27°48' S 68°07' W

5019	<i>Liolaemus dorbigny</i>	Catamarca	Belén	North entrance of Quebrada de Randolpho	26°51' S 66°45' W
5002	<i>Liolaemus dorbigny</i>	Catamarca	Belén	North entrance of Quebrada de Randolpho	26°51' S 66°45' W
2709	<i>Liolaemus eleodori</i>	San Juan	Iglesia	La Ortiguita	29°22' S 69°28' W
2033	<i>Liolaemus famatinae</i>	La Rioja	Famatina	Close of Estación 8, Mina La Mejicana	29°00' S 67°44' W
2034	<i>Liolaemus famatinae</i>	La Rioja	Famatina	Close of Estación 8, Mina La Mejicana	29°00' S 67°44' W
12006	<i>Liolaemus multicolor</i>	Jujuy	Cochinoca	Ruta Provincial 7, 4.2 km NW Abra Pampa	22°41' S 65°43' W
12047	<i>Liolaemus multicolor</i>	Salta	Rosario de Lerma	Camino Nevado del Acay, 5 km S Estacion Muñano	24°59' S 66°09' W
2369	<i>Liolaemus ruibali</i>	San Juan	Iglesia	Ruta Provincial 436, Alto del Colorado	30°37' S 69°05' W
12464	<i>Liolaemus ruibali</i>	Mendoza	Las Heras	Sierra de Villavicencio	32°29' S 69°05' W
650	<i>Liolaemus vallecurensis</i>	San Juan	Iglesia	Campamento Minero Compañía Aguilar, Valle del Cura	29°20' S 69°58' W
2698	<i>Liolaemus vallecurensis</i>	San Juan	Iglesia	Llanos de La Lagunita	28°55' S 67°40' W
	<i>wiegmannii</i> group				
LG1092	<i>Liolaemus azarai</i>	San Cosme Damian (Paraguay)	Itapuá	Dunas del NE Yacyretá island (Paraná river)	27°34' S 56°41' W
LG1095	<i>Liolaemus azarai</i>	San Cosme Damian (Paraguay)	Itapuá	Dunas del NE Yacyretá island (Paraná river)	27°34' S 56°41' W
5753	<i>Liolaemus cuyumhue</i>	Neuquén	Añelo	Ruta Provincial 7, 28.7 km N Añelo	38°11' S 69°01' W
3690	<i>Liolaemus cuyumhue</i>	Neuquén	Añelo	Ruta Provincial 7, 23 km NW Añelo	38°13' S 68°57' W
916862	<i>Liolaemus lutzae</i>	Río de Janeiro (Brasil)		Cabo Frío	22°52' S 42°01' W

4464	<i>Liolaemus multimaculatus</i>	Buenos Aires	Monte Hermoso	Between Monte Hermoso y Pehuen Co	38°59' S 61°23' W
LM2	<i>Liolaemus multimaculatus</i> "2"	Buenos Aires	La costa	Punta Medanos	36°53' S 56°40' W
2375	<i>Liolaemus salinicola</i>	Catamarca	Tinogasta	10 Km N Medanitos	27°28' S 67°35' W
2374	<i>Liolaemus salinicola</i>	Catamarca	Tinogasta	10 Km N Medanitos	27°28' S 67°35' W
12698	<i>Liolaemus scapularis</i>	Tucumán	Tafi del Valle	Anjuana, Ruta Nacional 40, 12.5 km N junction Ruta Provincial 357	26°24' S 65°59' W
12699	<i>Liolaemus scapularis</i>	Tucumán	Tafi del Valle	Anjuana, Ruta Nacional 40, 12.5 km N junction Ruta Provincial 357	26°24' S 65°59' W
10925	<i>Liolaemus wiegmannii</i>	La Pampa	Hucal	Ruta Nacional 154, 40.1 km S junction Ruta Nacional 35	38°09' S 64°06' W
10926	<i>Liolaemus wiegmannii</i>	La Pampa	Hucal	Ruta Nacional 154, 40.1 km S junction Ruta Nacional 35	38°09' S 64°06' W
10927	<i>Liolaemus wiegmannii</i>	La Pampa	Hucal	Ruta Nacional 154, 40.1 km S junction Ruta Nacional 35	38°09' S 64°06' W
4300	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "1"	Catamarca	Andalgalá	Agua de las Palomas	27°37' S 66°07' W
4299	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "1"	Catamarca	Andalgalá	Agua de las Palomas	27°37' S 66°07' W
4039	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "2"	Mendoza	La Paz	Ruta Nacional 146, km 276	34°17' S 67°14' W
4040	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "2"	Mendoza	La Paz	Ruta Nacional 146, km 276	34°17' S 67°14' W
3099	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "3"	Buenos Aires	Bahía Blanca	Bahía Blanca	38°38' S 62°18' W
12771	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "4"	Mendoza	San Rafael	Ruta Provincial 153, 2 km S Aristides Villanueva	34°14' S 67°54' W
12772	<i>Liolaemus wiegmannii</i> "4"	Mendoza	San Rafael	Ruta Provincial 153, 2 km S Aristides Villanueva	34°14' S 67°54' W
	<i>melanops</i> series				
	<i>boulengeri</i> complex				

3612	<i>Liolaemus boulengeri</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Provincial 12 y embarcadero La Cancha	42°47' S 70°57' W
3610	<i>Liolaemus boulengeri</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Provincial 12 y embarcadero La Cancha	42°47' S 70°57' W
7084	<i>Liolaemus boulengeri</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Provincial. 4, 23.3 km Cushamen	42°00' S 70°40' W
10942	<i>Liolaemus boulengeri</i>	Chubut	Gastre	Ruta Provincial 4, 59.3 km W Gan Gan	42°39' S 68°98' W
13134	<i>Liolaemus boulengeri</i>	Chubut	Languiño	Ruta Provincial 13, 5 km N Laguna Blanca	42°54' S 69°53' W
2818	<i>Liolaemus inacayali</i>	Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 7 Km N Ingeniero Jacobacci	41°13' S 69°24' W
11103	<i>Liolaemus inacayali</i>	Río Negro	25 de Mayo	Ruta Nacional 23, 22.3 km E Ingeniero Jacobacci	41°18' S 69°17' W
9180	<i>Liolaemus senguer</i>	Chubut	Río Senguer	Ruta Nacional 26, 22.3 km NW junction Ruta Provincial 18	45°57' S 69°52' W
2187	<i>Liolaemus senguer</i>	Chubut	Río Senguer	Ruta Provincial 20, 23 Km W Los Manantiales, 576 msnm	45°27' S 69°45' W
5461	<i>Liolaemus tehuelche</i>	Río Negro	Pilcaniyeu	Ruta Nacional 40. 2,7 Km S Ea. San Pedro	40°52' S 70°34' W
5462	<i>Liolaemus tehuelche</i>	Río Negro	Pilcaniyeu	Ruta Nacional 40. 2,7 Km S Ea. San Pedro	40°52' S 70°34' W
12964	<i>Liolaemus tehuelche</i>	Neuquén	Los Lagos	Empalme Ruta Nacional 237 y Ruta Nacional 231	41°01' S 71°09' W
12967	<i>Liolaemus tehuelche</i>	Neuquén	Los Lagos	Empalme Ruta Nacional 237 y Ruta Nacional 231	41°01' S 71°09' W
5530	<i>Liolaemus telsen</i>	Chubut	Telsen	Ruta Provincial 4, 65,5 Km W Telsen	42°22' S 67°39' W
8693	<i>Liolaemus telsen</i>	Chubut	Telsen	Ruta Provincial 67, 10 km N Gan Gan	42°25' S 68°16' W
	<i>donosobarrosi</i> group				
4155	<i>Liolaemus cuyanus</i>	La Rioja	Famatina	Ruta Nacional 40, Km 657, 9 Km E Pituil	28°32' S 67°22' W
5051	<i>Liolaemus donosobarrosi</i>	Mendoza	Malargüe	Ruta Provincial 180. 15 Km S La Cortadera	36°39' S 68°40' W

5076	<i>Liolaemus donosobarrosi</i>	Mendoza	Malargüe	Ruta Provincial 180. 15 Km S La Cortadera	36°39' S 68°40' W
5718	<i>Liolaemus josei</i>	Mendoza	Malargüe	Ruta Nacional 40, Puente El Zampal	36°30' S 69°39' W
4530	<i>Liolaemus mapuche</i>	Neuquén	Añelo	Ruta 8 a 23 km N Añelo	38°13' S 68°57' W
4531	<i>Liolaemus mapuche</i>	Neuquén	Añelo	Ruta 8 a 23 km N Añelo	38°13' S 68°57' W
5758	<i>Liolaemus puelche</i>	Mendoza	Malargüe	Ruta Nacional 40, 3.2 km N Ranquil Norte	36°38' S 69°49' W
5759	<i>Liolaemus puelche</i>	Mendoza	Malargüe	Ruta Nacional 40, 3.2 km N Ranquil Norte	36°38' S 69°49' W
	<i>fitzingerii</i> group				
4665	<i>Liolaemus canqueli</i>	Chubut	Paso de Indios	Ruta Nacional 25, 5 km W Pampa de Agnia	43°44' S 69°42' W
2200	<i>Liolaemus canqueli</i>	Chubut	Paso de Indios	Ruta Provincial 53, between 7-20 Km SE Paso de Indios	43°56' S 68°50' W
2947	<i>Liolaemus casamiquelai</i>	Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 7 Km N Ingeniero Jacobacci	41°13' S 69°24' W
5628	<i>Liolaemus chehuachekenk</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Provincial 13, 8 km N El Molle	42°10' S 69°32' W
5629	<i>Liolaemus chehuachekenk</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Provincial 13, 8 km N El Molle	42°10' S 69°32' W
4891	<i>Liolaemus fitzingerii</i>	Santa Cruz	Deseado	1 km W Tellier	47°39' S 66°03' W
5203	<i>Liolaemus goestchi</i>	Río Negro	Gral. Roca	25 Km N de Roca	39°11' S 67°43' W
2561	<i>Liolaemus martorii</i>	Río Negro	San Antonio	Las Grutas. Playa Piedra Colorada	40°50' S 65°07' W
8323	<i>Liolaemus martorii</i>	Río Negro	Valcheta	Ruta provincial 62, 4 km N Nahuel Niyeu	40°28' S 66°32' W
13553	<i>Liolaemus melanops</i>	Chubut	Telsen	Ruta Provincial 8, 82.6 km NW junction Ruta Provincial 4, Quele Curá	42°14' S 66°20' W
2934	<i>Liolaemus melanops</i>	Chubut	Telsen	Ruta Provincial 8, Quele Curá	42°13' S 66°21' W



6017	<i>Liolaemus melanops</i>	Río Negro	Valcheta	24 km W Cona Niyeu, road to El Cain	41°49' S 67°10' W
6007	<i>Liolaemus melanops</i>	Río Negro	Valcheta	Ruta Provincial 8	41°58' S 66°38' W
11246	<i>Liolaemus morenoi</i>	Neuquen	Collon Curá	Ruta Nacional 40, 2 km S Cerrito Piñon	40°17' S 70°38' W
6477	<i>Liolaemus morenoi</i>	Neuquén	Collón Curá	Ruta Nacional 40, 2 km S Cerro Piñon	40°17' S 70°38' W
2284	<i>Liolaemus xanthoviridis</i>	Chubut	Ameghino	Ruta Provincial 1, 1 Km S Dos Pozos, 25 msnm	43°54' S 65°24' W
2420	<i>Liolaemus xanthoviridis</i>	Chubut	Ameghino	Ruta Provincial 1, 12 Km S Ea. Dos Naciones	43°32' S 65°20' W
	<i>rothi</i> complex				
14192	<i>Liolaemus hermannunezi</i>	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E Los Barros	37°31' S 71°14' W
14194	<i>Liolaemus hermannunezi</i>	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E Los Barros	37°31' S 71°14' W
11341	<i>Liolaemus tromen</i>	Neuquen	Ñorquin	Ruta Provincial 4, 14.4 km SE El Huecu	37°43' S 70°29' W
12154	<i>Liolaemus tromen</i>	Neuquen	Chos Malal	Ruta Provincial 37, 29.2 km N junction Ruta Nacional 40	37°07' S 70°08' W
12155	<i>Liolaemus tromen</i>	Neuquen	Chos Malal	Ruta Provincial 37, 29.2 km N junction Ruta Nacional 40	37°07' S 70°08' W
1217	<i>Liolaemus lobo</i>	Neuquén	Los Lagos	Ruta Nacional 231, 1 km W junction Ruta Nacional 237	41°01' S 71°09' W
3295	<i>Liolaemus lobo</i>	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Río Agrio	37°48' S 70°55' W
3296	<i>Liolaemus lobo</i>	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Río Agrio	37°48' S 70°55' W
2163	<i>Liolaemus</i> sp 12	Río Negro	Ñorquinco	Ruta Provincial 6, 31 Km N Ñorquinco	47°46' S 70°37' W
3091	<i>Liolaemus rothi</i>	Río Negro	Bariloche	Bariloche	41°09' S 71°18' W
3092	<i>Liolaemus rothi</i>	Río Negro	Bariloche	Bariloche	41°09' S 71°18' W

5531	<i>Liolaemus rothi</i>	Río Negro	El Cuy	Ruta Provincial 67. 19,2 Km NE Mencue	40°19' S 69°26' W
6888	<i>Liolaemus rothi</i>	Chubut	Telsen	Ruta provincial 4, between 20 and 50 km E Gan Gan	42°28' S 67°51' W
12995	<i>Liolaemus rothi</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Nacional 40, Km 1862	42°18' S 71°17' W
13013	<i>Liolaemus rothi</i>	Chubut	Cushamen	Ruta Nacional 40, Km 1862	42°18' S 71°17' W
8730	<i>Liolaemus sagei</i>	Neuquén	Zapala	Ruta Provincial 46, NE entrance Parque Nacional Laguna Blanca	39°02' S 70°16' W
8731	<i>Liolaemus sagei</i>	Neuquén	Zapala	Ruta Provincial 46, NE entrance Parque Nacional Laguna Blanca	39°02' S 70°16' W
12243	<i>Liolaemus sitesi</i>	Neuquen	Pehuenches	Sierra Auca Mahuida, 25.9 km S junction Ruta Provincial 6	37°42' S 68°51' W
12334	<i>Liolaemus sitesi</i>	Neuquen	Pehuenches	Sierra Auca Mahuida, 25.9 km S junction Ruta Provincial 6	37°42' S 68°51' W
	especies candidatas				
9183	<i>Liolaemus</i> sp B4	Chubut	Languiñeo	Ruta Nacional 40, 16.1 km S Tecka	43°37' S 70°50' S
9205	<i>Liolaemus</i> sp B5	Chubut	Escalante	Estacion Holdich	45°57' S 68°11' W
9202	<i>Liolaemus</i> sp B5	Chubut	Escalante	Ruta Nacional 3, 70.2 km SW Garayalde	45°07' S 67°08' W
13053	<i>Liolaemus</i> sp B6	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Ruta Provincial 41, 35.3 km E Paso Roballos	47°11' S 71°35' W
13055	<i>Liolaemus</i> sp B6	Santa Cruz	Lago Buenos Aires	Ruta Provincial 41, 35.3 km E Paso Roballos	47°11' S 71°35' W
9814	<i>Liolaemus</i> sp B7	Santa Cruz	Magallanes	Ruta Provincial 77, 77.7 km NW junction Ruta Provincial 25	48°24' S 68°56' W
9999	<i>Liolaemus</i> sp B7	Santa Cruz	Magallanes	Ruta Provincial 77, 77.7 km NW junction Ruta Provincial 25	48°24' S 68°56' W
8898	<i>Liolaemus</i> sp B8	Chubut	Paso de Indios	Ruta Provincial 23, 65.1 km E junction Ruta Provincial 20	44°35' S 69°41' W
9190	<i>Liolaemus</i> sp B8	Chubut	Paso de Indios	Ruta Provincial 23, 77.6 km E junction Ruta Provincial 20	44°39' S 69°36' W

12555	<i>Liolaemus</i> sp 1	La Rioja	Vinchina	Ruta Macopma; 76. 6.3 km S Laguna Brava	28°24' S 68°51' W
5825	<i>Liolaemus</i> sp 2	La Rioja	Famatina	24 km SW Alto del Carrizal, road to Mina La Mejicana	28°55' S 67°40' W
5826	<i>Liolaemus</i> sp 2	La Rioja	Famatina	24 km NW Alto del Carrizal, road to Mina La Mejicana	28°55' 67°40' W
12907	<i>Liolaemus</i> sp 3	Mendoza	San Rafael	Ruta Nacional 144, 0.5 km NE junction Ruta Provincial 180	34°51' S 26°84' W
12894	<i>Liolaemus</i> sp 3	Mendoza	San Rafael	Ruta Provincial 179, 21 km S El Nihuil	35°11' S 68°41' W
2548	<i>Liolaemus</i> sp 4	Neuquén	Aluminé	Ruta Provincial 13. Pampa de Lonco Luan	38°53' S 70°58' W
2550	<i>Liolaemus</i> sp 4	Neuquén	Aluminé	Ruta Provincial 13. Pampa de Lonco Luan	38°53' S 70°58' W
9049	<i>Liolaemus</i> sp 5	Chubut	Languineo	Ruta Provincial 62, 58.9 km E junction Ruta Nacional 46	43°35' S 70°09' W
13149	<i>Liolaemus</i> sp 6	Chubut	Biedma	Cerro Avanzado	42°50' S 64°52' W
5581	<i>Liolaemus</i> sp 7	Chubut	Telsen	Ruta Provincial 4, 5.4 Km W Telsen	42°26' S 67°00' W
2431	<i>Liolaemus</i> sp 8	Río Negro	El Cuy	El Cuy	31°54' S 65°49' W
12928	<i>Liolaemus</i> sp 9	Chubut	Languiñeo	Ruta Nacional 25, entrada a Los Pocitos de Quichaura	43°38' S 70°06' W
10132	<i>Liolaemus</i> sp 10	Santa Cruz	Deseado	Ruta Provincial 12, 25.8 km N junction Ruta Provincial 49	47°26' S 68°34' W
10084	<i>Liolaemus</i> sp 10	Santa Cruz	Deseado	Ruta Provincial 75, 2.8 km W junction Ruta Provincial 87	48°08' S 68°12' W
5761	<i>Liolaemus</i> sp 11	Mendoza	Malargue	Ruta Nacional 40, Puente El Zampal	36°30' S 69°39' W
5763	<i>Liolaemus</i> sp 11	Mendoza	Malargue	Ruta Nacional 40, Puente El Zampal	36°30' S 69°39' W
7953	<i>Liolaemus</i> sp 12	Mendoza	Malargüe	Ruta Provincial 186, 25.5 km NE Mina Ethel, 4 km S puesto Marfil	35°55' S 68°36' W
12565	<i>Liolaemus</i> sp 13	San Juan	Valle Fertil	Ruta Provincial 510, 1 km W junction Ruta Nacional 76	30°12' S 67°40' W

2178	<i>Liolaemus</i> sp 14	La Pampa	Puelén	7 Km NE Casa de Piedra	38°07' S 67°06' W
5135	<i>Liolaemus</i> sp 15	Mendoza	Malargüe	Ruta Provincial 180. 59 Km W Gobernador Ayala	37°17' S 68°33' W
4472	<i>Liolaemus</i> sp 16	Neuquén	Zapala	Mina de Bentonita, 40 Km S Zapala	39°12' S 69°56' W
4473	<i>Liolaemus</i> sp 16	Neuquén	Zapala	Mina de Bentonita, 40 Km S Zapala	39°12' S 69°56' W
2644	<i>Liolaemus</i> sp 17	Neuquén	Zapala	6 Km NW La Amarga	37°06' S 70°08' W
2597	<i>Liolaemus</i> sp 18	Neuquén	Zapala	6 Km NW La Amarga	39°04' S 69°37' W
2596	<i>Liolaemus</i> sp 18	Neuquén	Zapala	6 Km NW La Amarga	39°04' S 69°37' W

Apéndice B: Detalle de individuos utilizando en el capítulo 4. Los individuos de *L. rothi* que mostraron mitocondria introgresada se encuentran señalados con rombos (◆) y cuadrados (■) en concordancia con la simbología implementada en el capítulo 4 (Fig. 2 y 3).

Especie	Número de colección (LJAMM)	de	Provincia	Departamento	Localidad	Coordenadas
<i>L. boulengeri</i>	10942		Chubut	Gastre	RP 4, 59.3 km W Gan Gan	42°39' S 68°98' W
	13120		Chubut	Languiño	Laguna Blanca, RP 13 entre Colan Conhue y Paso del Sapo	42°57' S 69°55' W
	13123		Chubut	Languiño	Laguna Blanca, RP 13 entre Colan Conhue y Paso del Sapo	42°57' S 69°55' W
	13124		Chubut	Languiño	Laguna Blanca, RP 13 entre Colan Conhue y Paso del Sapo	42°57' S 69°55' W
	3485		Río Negro	Ñorquinco	1 km S de Estacion Ñorquinco, camino vecinal hacia Cushamen	41°53' S 70°54' W
	3610		Chubut	Cushamen	RP 12 y embarcadero La Cancha	42°47' S 70°57' W
	3710		Chubut	Paso de Indios	RP 27, 14.2 km S El Sombrero y RP 53	44°15' S 68°15' W
	7084		Chubut	Cushamen	RP 4, 23.3 km Cushamen	42°00' S 70°40' W
	8847		Chubut	Languiño	RP 12, 3 km E puente sobre Río Gualjaina, camino a Piedra Parada	42°39' S 70°22' W
	<i>L. inacayali</i>	11103		Río Negro	25 de Mayo	RN 23, 22.3 km E Ingeniero Jacobacci
12277			Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 10 km N Ingeniero Jacobacci	41°43' S 69°25' W
12284			Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 10 km N Ingeniero Jacobacci	41°43' S 69°25' W
2175			Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 7 Km NE de Mamuel Choique, 1013 msnm	41°42' S 70°07' W
2818			Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 7 Km N Ingeniero Jacobacci	41°13' S 69°24' W
6258			Río Negro	9 de Julio	RP 5, 7.2 km E de El Cain	41°41' S 68°04' W

<i>L. senguier</i>	12288	Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 10 km N Ingeniero Jacobacci	41°43' S 69°25' W
	13067	Chubut	Río Senguier	RN 40, empalme RN 260, camino a Lago Blanco	45°56' S 70°24' W
	13077	Chubut	Río Senguier	RN 40, 26.5 km N empalme RN 26	45°14' S 69°56' W
	13097	Chubut	Languiño	Establecimiento 6 Hermanos, 10 km N NE empalme RN 25	43°26' S 70°00' W
	13099	Chubut	Languiño	Establecimiento 6 Hermanos, 10 km N NE empalme RN 25	43°26' S 70°00' W
	2187	Chubut	Río Senguier	RP 20, 23 Km W Los Manantiales, 576 msnm	45°27' S 69°45' W
	9027	Chubut	Tehuelches	RP 23, camino a Estancia Los Flamencos, a 3.6 km E empalme RP 20	44°32' S 70°21' W
	9040	Chubut	Paso de Indios	RP 23, 65.1 km E empalme RP 20, caminno a Estancia Los Flamencos	44°35' S 69°41' W
	9180	Chubut	Río Senguier	RN 26, 22.3 km NW empalme RP 18	45°57' S 69°52' W
	<i>L. tehuelche</i>	12964	Neuquén	Los Lagos	Empalme RN 237 (ex RN 40 y RN 231, N km N Río Limay
12967		Neuquén	Los Lagos	Empalme RN 237 (ex RN 40) y RN 231, 2 km N Río Limay	41°01' S 71°09' W
3481		Río Negro	Ñorquinco	1 a 2 km S de Estacion Ñorquinco, camino vecinal hacia Cushamen	41°53' S 70°54' W
3482		Río Negro	Ñorquinco	1 a 2 km S de Estacion Ñorquinco, camino vecinal hacia Cushamen	41°53' S 70°54' W
3483		Río Negro	Ñorquinco	1 a 2 km S de Estacion Ñorquinco, camino vecinal hacia Cushamen	41°53' S 70°54' W
5461		Río Negro	Pilcaniyeu	RN 40. 2,7 Km S Ea. San Pedro	40°52' S 70°34' W
5462		Río Negro	Pilcaniyeu	RN 40. 2,7 Km S Ea. San Pedro	40°52' S 70°34' W
5627		Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
5655		Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W

	5656	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5657	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5658	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5659	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5660	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5661	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5662	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5663	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
	5664	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 2 km N Cañadon Chileno, 37 km NE Comallo	40°52' S 70°01' W
<i>L. telsen</i>	10968	Río Negro	9 de Julio	RP 8, 17.5 km N Limite Rio Negro-Chubut	41°86' S 68°05' W
	5530	Chubut	Telsen	RP 4, 65,5 Km W Telsen	42°22' S 67°39' W
	6262	Río Negro	9 de Julio	RP 8, 17.9 km N limite Chubut-Río Negro	41°51' S 68°04' W
	6877	Río Negro	9 de Julio	65.6 km destacamento policial El Rincon	41°23' S 66°57' W
	6922	Chubut	Telsen	RP 67, aprox. 10 km N Gan Gan	42°25' S 68°16' W
	6923	Chubut	Telsen	RP 67, aprox. 10 km N Gan Gan	42°25' S 68°16' W
	6939	Chubut	Telsen	RP 4, 92 km W Telsen aprox. 40 km E Gan Gan	42°28' S 67°51' W
	8693	Chubut	Telsen	RP 67, 10 km N Gan Gan	42°25' S 68°16' W
<i>L. hermannunezi</i>	14149	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros (República de Chile)	37°42' S 71°14' W

	14150	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros (República de Chile)	37°42' S 71°14' W	
	14151	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros (República de Chile)	37°42' S 71°14' W	
	14192	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros (República de Chile)	37°42' S 71°14' W	
	14193	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros (República de Chile)	37°42' S 71°14' W	
	14194	VIII Región	Biobío	Paso Pichachen, 10 km E de Los Barros (República de Chile)	37°42' S 71°14' W	
<i>L. loboi</i>	1217	Neuquén	Los Lagos	RN 231, 1 Km O empalme RN 237, 900 msnm	41°01' S 71°09' W	
<i>L. rothi</i>	■	10963	Río Negro	9 de Julio	RP 8, 2.9 km S empalme RP 5, 14.9 km S El Cain	41°73' S 68°05' S
	■	11528	Chubut	Telsen	RP 67, 17.7 km N Gan Gan (2 km desvío a Cañada Leona)	42°24' S 68°15' W
	■	11532	Chubut	Telsen	RP 67, 17.7 km N Gan Gan (2 km desvío a Cañada Leona)	42°24' S 68°15' W
	12932	Río Negro	Bariloche	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 19.5 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche	41°14' S 71°01' W	
	12939	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 21,9 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche	41°15' S 71°01' W	
	12940	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 21,9 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche	41°15' S 71°01' W	
	12941	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 21,9 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche	41°15' S 71°01' W	
	◆	1760	Río Negro	25 de Mayo	RP 8, 17 Km S San Antonio del Cuy	40°17' S 68°27' W
	◆	1880	Río Negro	25 de Mayo	RP 8, 17 Km S San Antonio del Cuy	40°17' S 68°27' W
	2134	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 1 Km NW Ojo de Agua	41°32' S 69°51' W	
	◆	2163	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 31 Km N Ñorquinco	47°46' S 70°37' W
	2236	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 1 Km NW Ojo de Agua	41°32' S 69°51' W	



	2237	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 1 Km NW Ojo de Agua	41°32' S 69°51' W
	3065	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 57 km S Ingeniero Jacobacci	41°45' S 69°21' W
	3091	Río Negro	Bariloche	Bariloche	41°09' S 71°18' W
	3092	Río Negro	Bariloche	Bariloche	41°09' S 71°18' W
	3093	Río Negro	Bariloche	Bariloche	41°09' S 71°18' W
■	3383	Río Negro	9 de Julio	RP 5, 3.3 km S empalme RP 8	41°44' S 68°03' W
◆	3476	Chubut	Laguineo	RN 40, 2 km S entrada a Tecka en empalme con RP 62	43°30' S 70°48' W
	3523	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 10.2 km W entrada a Río Chico (Estación Cerro Mesa)	41°45' S 70°31' W
	3524	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 10.2 km W entrada a Río Chico (Estación Cerro Mesa)	41°45' S 70°31' W
	3525	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 10.2 km W entrada a Río Chico (Estación Cerro Mesa)	41°45' S 70°31' W
	3554	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	41°34' S 69°23' W
	3555	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	41°34' S 69°23' W
	3556	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	41°34' S 69°23' W
	3557	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	41°34' S 69°23' W
	3558	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	41°34' S 69°23' W
	3560	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 49.5 km S empalme RP 23	41°41' S 69°23' W
	3563	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 57 km S empalme RN 23	41°45' S 69°21' W
	3564	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 57 km S empalme RN 23	41°45' S 69°21' W

	3584	Río Negro	25 de Mayo	RN 23, cerro frente Estancia Huanuluan, 25.1 km W Ingeniero Jacobacci	41°21' S 69°48' W
■	4457	Río Negro	Valcheta	Meseta de Somuncurá	41°11' S 66°53' W
■	5458	Chubut	Telsen	RP 4, 0.8 km E Gan Gan	42°31' S 68°15' W
■	5464	Chubut	Telsen	RP 4. 20.4 Km E Gan Gan	42°32' S 68°01' W
◆	5531	Río Negro	El Cuy	RP 67. 19,2 Km NE Mencue	40°19' S 69°26' W
	5545	Río Negro	25 de Mayo	RP 76. 48 Km S Ing. Jacobacci	41°42' S 69°22' W
	5546	Río Negro	El Cuy	RP 67. 20 Km S Mencue	41°42' S 69°22' W
◆	5587	Río Negro	El Cuy	RP 67. 19,2 Km NE Mencue	40°19' S 69°26' W
	5607	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
	5608	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
	5609	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
	5610	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
	5611	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
◆	5612	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
	5613	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
	5614	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno	40°51' S 69°58' W
■	5640	Chubut	Telsen	RP 4, 70.7 km W Telsen	42°22' S 67°42' W
■	6049	Chubut	Gastre	Sector Puesto Viejo, Proyecto Navidad, 3 km S RP 4, 40 km W Gan Gan	42°27' S 68°46' W

■	6100	Río Negro	Valcheta	Meseta de Somuncurá, Cerro Corona	41°11' S 66°53' W
■	6834	Chubut	Cushamen	RP 13, 17.7 km S límite Chubut y Río Negro	42°04' S 69°30' W
◆	6862	Río Negro	25 de Mayo	RP 8, 81.4 km N Los Menucos, 18 km S San Antonio del Cuy	40°17' S 68°27' W
■	6888	Chubut	Telsen	RP 4, entre 20 y 50 km E de Gan Gan	42°28' S 67°51' W
	8683	Río Negro	Pilcaniyeu	RN 40, cerro Alto	40°46' S 70°34' W
	8684	Río Negro	Pilcaniyeu	RN 40, cerro Alto	40°46' S 70°34' W
■	8925	Chubut	Telsen	RP 67, 16.3 km N Gan Gan	42°41' S 68°27' W
■	8930	Chubut	Telsen	RP 67, 16.3 km N Gan Gan	42°41' S 68°27' W
■	8931	Chubut	Telsen	RP 67, 16.3 km N Gan Gan	42°41' S 68°27' W
■	8933	Chubut	Telsen	RP 67, 16.3 km N Gan Gan	42°41' S 68°27' W
<i>L. sagei</i>	8730	Neuquén	Zapala	RP 46, 17.8 km SW empalme RN 40, entrada NE Parque Nacional Laguna Blanca	39°02' S 70°16' W
	8731	Neuquén	Zapala	RP 46, 17.8 km SW empalme RN 40, entrada NE Parque Nacional Laguna Blanca	39°02' S 70°16' W
<i>L. sitesi</i>	12243	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6	37°42' S 68°51' W
	12328	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6	37°42' S 68°51' W
	12329	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6	37°42' S 68°51' W
	12330	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6	37°42' S 68°51' W
	12334	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6	37°42' S 68°51' W
<i>L. tromen</i>	12154	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna	37°07' S

			Los Barros	70°08'W
12155	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna	37°07' S
			Los Barros	70°08'W
12156	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna	37°07' S
			Los Barros	70°08'W
12339	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna	37°07' S
			Los Barros	70°08'W
6153	Neuquén	Chos Malal	Volcán Domuyo, ladera este	36°93' S
				70°91' W

Apéndice C: Detalle de individuos utilizados en los análisis del capítulo 5.

Especie	Número de colección (LJAMM)	Provincia	Departamento	Localidad	Coordenadas
<i>L. hermannunezi</i>	14149	VIII Región (Chile)	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E de Los Barros	37°31' S 71°14' W
	14150	VIII Región (Chile)	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E de Los Barros	37°31' S 71°14' W
	14151	VIII Región (Chile)	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E de Los Barros	37°31' S 71°14' W
	14192	VIII Región (Chile)	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E de Los Barros	37°31' S 71°14' W
	14193	VIII Región (Chile)	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E de Los Barros	37°31' S 71°14' W
	14194	VIII Región (Chile)	Biobío	Paso Pichachen, Ruta Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E de Los Barros	37°31' S 71°14' W
<i>L. loboi</i>	1217	Neuquén	Los Lagos	RN 231, 1 Km O enpalme RN 237, 900 msnm	41°01' S 71°09' W
	3295	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Rio Agrio	37°48' S 70°55' W
	3296	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Rio Agrio	37°48' S 70°55' W
	3297	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Rio Agrio	37°48' S 70°55' W
	5345	Neuquén	Ñorquin	RP 21. 15 Km N Loncopue	37°58' S 70°38' W
	6471	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Rio Agrio	37°48' S 70°55' W
	6472	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Rio Agrio	37°48' S 70°55' W
	6475	Neuquén	Ñorquin	Cascada del Rio Agrio	37°48' S 70°55' W
<i>L. rothi</i>	2134	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 1 Km Nw Ojo de Agua, 1141 msnm	41°32' S 69°51' W
	2236	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 1 Km NW Ojo de Agua, 1141 msnm	41°32' S

---

2237	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 1 Km NW Ojo de Agua, 1141 msnm	69°51' W 41°32' S
3065	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 57 km S Ingeniero Jacobacci	69°51' W 41°45' S
3091	Río Negro	Bariloche	Bariloche	69°21' W 41°09' S
3092	Río Negro	Bariloche	Bariloche	71°18' W 41°09' S
3093	Río Negro	Bariloche	Bariloche	71°18' W 41°09' S
3523	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 10.2 km W entrada a Rio Chico (Estacion Cerro Mesa)	71°18' W 41°45' S
3524	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 10.2 km W entrada a Rio Chico (Estacion Cerro Mesa)	70°31' W 41°45' S
3525	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 10.2 km W entrada a Rio Chico (Estacion Cerro Mesa)	70°31' W 41°45' S
3554	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	70°31' W 41°34' S
3555	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	69°23' W 41°34' S
3556	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	69°23' W 41°34' S
3557	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	69°23' W 41°34' S
3558	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 35 km S empalme RN 23, al S de Ingeniero Jacobacci	69°23' W 41°34' S
3560	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 49.5 km S empalme RP 23	69°23' W 41°41' S
3563	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 57 km S empalme RN 23	41°45' S 69°21' W
3564	Río Negro	25 de Mayo	RP 76, 57 km S empalme RN 23	41°45' S 69°21' W
3584	Río Negro	25 de Mayo	RN 23, cerro frente Estancia Huanuluan, 25.1 km W Ingeniero Jacobacci	41°21' S 69°48' W
5545	Río Negro	25 de Mayo	RP 76. 48 Km S Ing. Jacobacci	41°42' S

---

					69°22' W
5546	Río Negro	El Cuy	RP 67. 20 Km S Mencue		41°42' S
5607	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		69°22' W
5608	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		40°51' S
5609	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		69°58' W
5610	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		40°51' S
5611	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		69°58' W
5613	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		40°51' S
5614	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 67, 3.5 km N Cañadon Chileno		69°58' W
8683	Río Negro	Pilcaniyeu	RN 40, cerro Alto		40°46' S
8684	Río Negro	Pilcaniyeu	RN 40, cerro Alto		70°34' W
12932	Río Negro	Bariloche	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 19.5 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche		41°14' S
12939	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 21,9 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche		71°01' W
12940	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 21,9 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche		41°15' S
12941	Río Negro	Pilcaniyeu	RP 80, camino hacia Cerro Bernal, 21,9 km S empalme acceso a Aeropuerto Bariloche		71°01' W
<i>L. sagei</i>	8730	Neuquén	Zapala	RP 46, 17.8 km SW empalme RN 40, entrada NE Parque Nacional Laguna Blanca	39°02' S
	8731	Neuquén	Zapala	RP 46, 17.8 km SW empalme RN 40, entrada NE Parque Nacional Laguna Blanca	70°16' W
<i>L. sitesi</i>	12243	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6, Base Guardaparque, Sierra Auca Mahuída	37°42' S
	12328	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6, Base	68°51' W
					37°42' S

				Guardaparque, Sierra Auca Mahuída	68°51' W
	12329	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6, Base Guardaparque, Sierra Auca Mahuída	37°42' S 68°51' W
	12330	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6, Base Guardaparque, Sierra Auca Mahuída	37°42' S 68°51' W
	12334	Neuquen	Pehuenches	Área Natural Protegida Auca Mahuída, 25.9 km S empalme RP 6, Base Guardaparque, Sierra Auca Mahuída	37°42' S 68°51' W
<i>L. tromen</i>	6153	Neuquén	Chos Malal	Volcán Domuyo, ladera este	23°79' S 59°41' W
	12154	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna Los Barros	37°07' S 70°08' W
	12155	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna Los Barros	37°07' S 70°08' W
	12156	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna Los Barros	37°07' S 70°08' W
	12339	Neuquen	Chos Malal	RP 37, 29.2 km N empalme RN 40, entrada Área Natural Protegida Tromen, Laguna Los Barros	37°07' S 70°08' W
<i>L. sp. M 34</i>	5270	Neuquén	Minas	Las Olletas. 7 Km N Aguas Calientes.	36°39' S 70°35' W
	5281	Neuquén	Minas	RP 45. 28.5 Km NW empalme RP 43.	36°55' S 70°55' W
	5282	Neuquén	Minas	RP 45. 28.5 Km NW empalme RP 43.	36°55' S 70°55' W
	5283	Neuquén	Minas	RP 45. 28.5 Km NW empalme RP 43.	36°55' S 70°55' W
	5286	Neuquén	Minas	RP 45. 28.5 Km NW empalme RP 43.	36°55' S 70°55' W
	5287	Neuquén	Minas	RP 45. 28.5 Km NW empalme RP 43.	36°55' S 70°55' W
	5288	Neuquén	Minas	RP 45. 28.5 Km NW empalme RP 43.	36°55' S 70°55' W
	5301	Neuquén	Minas	RP 45. 23 Km NW empalme RP 43.	36°53' S 70°56' W
	5302	Neuquén	Minas	RP 45. 23 Km NW empalme RP 43.	36°53' S 70°56' W
	6415	Neuquén	Minas	Orillas de caminos, Domuyo	36°53' S



	6416	Neuquén	Minas	Orillas de caminos, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6417	Neuquén	Minas	Orillas de caminos, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6424	Neuquén	Minas	Borde de caminos, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6434	Neuquén	Minas	Camino, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6435	Neuquén	Minas	Camino, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6453	Neuquén	Minas	Orillas de caminos, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6454	Neuquén	Minas	Orillas de caminos, Domuyo	70°56' W 36°53' S
	6473	Neuquén	Minas	RP 45, 23 km NW empalme RP 43	70°56' W 36°53' S
	6474	Neuquén	Minas	RP 45, 23 km NW empalme RP 43	70°56' W 36°53' S
	6476	Neuquén	Minas	RP 45, 23 km NW empalme RP 43	70°56' W 36°53' S
<i>L. sp. 4</i>	2548	Neuquén	Aluminé	RP 13. Pampa de Lonco Luan, 12 Km E Río Litrán	70°58' W 38°53' S
	2549	Neuquén	Aluminé	RP 13. Pampa de Lonco Luan, 12 Km E Río Litrán	70°58' W 38°53' S
	2550	Neuquén	Aluminé	RP 13. Pampa de Lonco Luan, 12 Km E Río Litrán	70°58' W 38°53' S
<i>L. senguer</i>	2187	Chubut	Río Senguer	RP 20, 23 Km W Los Manantiales, 576 msnm	45°27' S 69°45' W
	9027	Chubut	Tehuelches	RP 23, camino a Estancia Los Flamencos, a 3.6 km E empalme RP 20	44°32' S 70°21' W
	9040	Chubut	Paso de Indios	RP 23, 65.1 km E empalme RP 20, caminno a Estancia Los Flamencos	44°35' S 69°41' W
	9180	Chubut	Río Senguer	RN 26, 22.3 km NW empalme RP 18	45°57' S 69°52' W
	13067	Chubut	Río Senguer	RN 40, empalme RN 260, camino a Lago Blanco	45°56' S

	13077	Chubut	Río Senguer	RN 40, 26.5 km N empalme RN 26, 11.5 km N entrada a Facundo	70°24' W 45°14' S 69°56' W
	13097	Chubut	Languiño	Establecimiento 6 Hermanos, 10 km N NE empalme RN 25, camino a RP 62, Pocitos de Quichaura	43°26' S 70°00' W
	13099	Chubut	Languiño	Establecimiento 6 Hermanos, 10 km N NE empalme RN 25, camino a RP 62, Pocitos de Quichaura	43°26' S 70°00' W
<i>L. inacayali</i>	2175	Río Negro	Ñorquinco	RP 6, 7 Km NE de Mamuel Choique, 1013 msnm	41°42' S 70°07' W
	2818	Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 7 Km N Ingeniero Jacobacci	41°13' S 69°24' W
	6258	Río Negro	9 de Julio	RP 5, 7.2 km E de El Cain, cerca de Laguna de las Vacas	41°41' S 68°04' W
	11103	Río Negro	25 de Mayo	RN 23, 22.3 km E Ingeniero Jacobacci	41°18' S 69°17' W
	12277	Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 10 km N Ingeniero Jacobacci	41°43' S 69°25' W
	12284	Río Negro	25 de Mayo	Laguna Cari Lafquen Chica, 10 km N Ingeniero Jacobacci	41°43' S 69°25' W