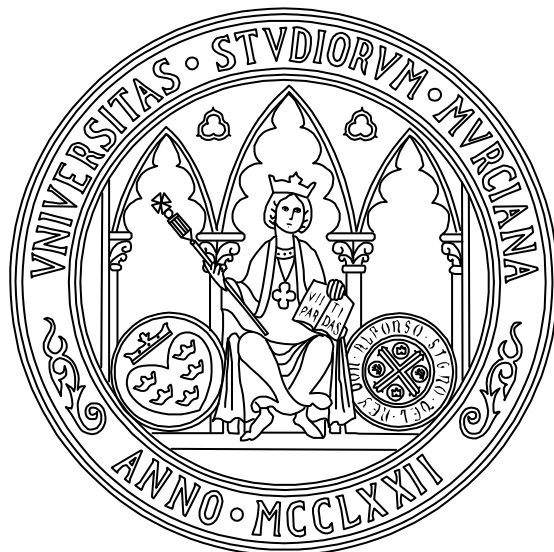


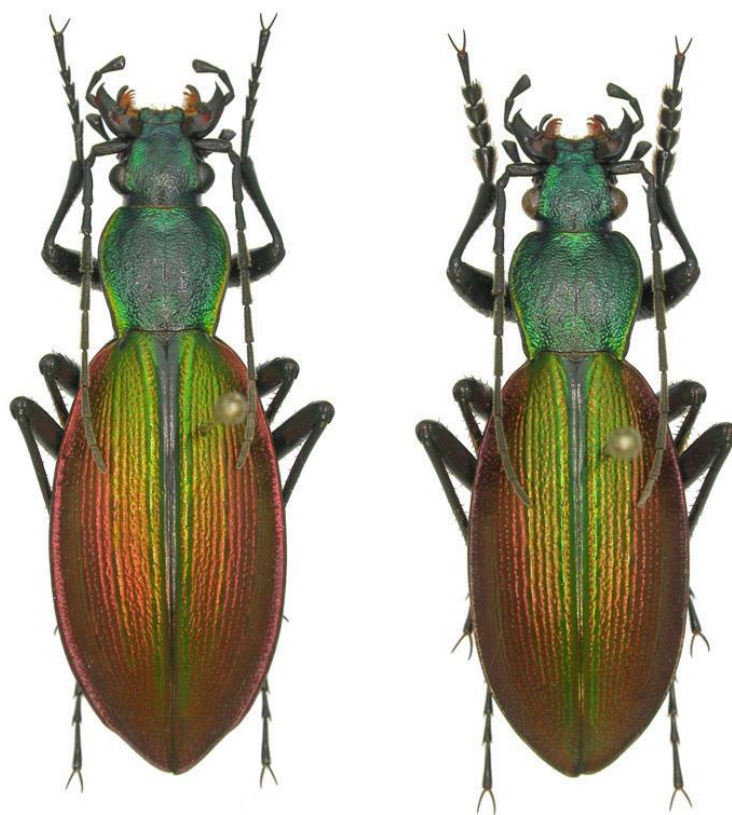


UNIVERSIDAD DE MURCIA

FACULTAD DE BIOLOGÍA

Filogenia molecular, filogeografía, morfometría
geométrica y análisis citogenético del género
Ceroglossus Solier, 1848 (Coleoptera)

D. Víctor Acosta Candel
2017



Filogenia molecular, filogeografía,
morfometría geométrica y análisis
citogenético del género *Ceroglossus*
Solier, 1848 (Coleoptera)

Tesis Doctoral

Víctor Acosta Candel

2017



ÍNDICE

Índice.....	3
Resumen	7
Introducción.....	9
1 - El grupo de estudio	11
1.1 - El Orden Coleoptera.....	11
1.2 - Suborden Adephaga: Familia Carabidae.....	12
1.3 - <i>Ceroglossus</i> : principales características.....	14
1.4 - Distribución del género <i>Ceroglossus</i>	15
1.5 - <i>Ceroglossus</i> : Ciclo de desarrollo	15
1.6 - Morfología de <i>Ceroglossus</i>	17
1.7 - Caracteres morfológicos y taxonomía de <i>Ceroglossus</i>	19
1.8 - Posición sistemática de <i>Ceroglossus</i> en la familia Carabidae.....	22
1.9 - Taxonomía del género <i>Ceroglossus</i>	22
1.10 - Deforestación en Chile.....	30
2 - Disciplinas para una visión completa de la biodiversidad.....	33
2.1 - Sistemática	33
2.2 - Taxonomía	33
2.3 - Filogenia	34
2.4 - Métodos de reconstrucción filogenética	36
2.5 - Métodos de delimitación de especies basados en datos moleculares	37
2.6 - Redes haplotípicas.....	39
2.7 - Filogenia y filogeografía de <i>Ceroglossus</i> y grupos relacionados.....	40
2.8 - Marcadores mitocondriales en filogenia y filogeografía	42
2.9 - ADN mitocondrial (ADNmt).....	43
2.10 - El gen ND5.....	45



2.11 - Citogenética y evolución cromosómica	45
2.12 - Morfometría geométrica	47
3 - Objetivos de esta tesis.....	49
Material y Métodos.....	51
1 - Recolección y fijación de las muestras.....	53
2 - Procesamiento de las muestras para el estudio molecular	76
3 - Edición de las secuencias	78
4 - Análisis filogenético.....	82
5 - Análisis de morfométrica geometría	84
Resultados.....	89
1 - Análisis filogenético	91
1.1 - Grupo de <i>C. darwini</i>	97
1.2 - Grupo de <i>C. magellanicus</i>	101
1.3 - Grupo de <i>C. suturalis</i>	101
1.4 - Grupo de <i>C. buqueti</i>	105
1.5 – Grupo de <i>C. chilensis</i>	107
2 - Análisis morfométrico.....	118
Análisis 17LM	118
Análisis 4LM	118
Análisis 6LM.....	118
Análisis 10LM.....	118
Análisis 11LM	119
Análisis 11M+A	119
Análisis P+E.....	119
Discusión.....	135
1 – Filogenia del género <i>Ceroglossus</i>	137
2 - Influencia de los ciclos climáticos en la evolución de <i>Ceroglossus</i>	139
3 - Evolución y taxonomía de los grupos de <i>Ceroglossus</i>	140
3.1 - <i>C. buqueti</i>	140
3.2 - <i>C. chilensis</i>	141

3.3 - <i>C. suturalis</i>	141
3.4 - <i>C. darwini</i>	142
3.5 - <i>C. magellanicus</i>	142
4 - Morfometría en <i>Ceroglossus</i>	144
5 - Evolución cromosómica en <i>Ceroglossus</i>	145
6 - Consecuencias de la deforestación en el género <i>Ceroglossus</i>	147
Conclusiones generales	151
Bibliografía.....	155
Apéndice.....	169





RESUMEN

El género *Ceroglossus* está compuesto por diez especies de coleópteros endémicas de los bosques de *Nothofagus* en el sur de Chile y algunas localidades de Argentina, actualmente amenazados por la deforestación. Su taxonomía resulta problemática debido a una serie de caracteres de diagnóstico confusos, y a una serie de fenómenos de mimetismo entre especies de diferentes linajes que comparten la misma localidad.

En esta tesis se realiza un análisis filogenético del género empleando fragmentos mitocondriales y nucleares. Los resultados recuperan cinco grupos principales, correspondientes a las especies tradicionales *C. darwini*, *C. magellanicus*, *C. buqueti*, *C. suturalis* y *C. chilensis*. Sin embargo, los algoritmos de delimitación de especies basados en datos moleculares revelan que la diversidad de este género es mayor de la sospechada, aumentando a un total de 16 especies.

Los análisis filogeográficos permiten así mismo inferir los procesos que han moldeado la evolución de cada uno de estos grupos de especies, asociando cambios climatológicos con eventos de divergencia. Además, la interpretación de datos cromosómicos previamente obtenidos sobre la filogenia obtenida en esta tesis permite establecer hipótesis sobre el efecto de las reorganizaciones cromosómicas y el aumento del número cromosómico en la especiación y evolución de *Ceroglossus*.

Debido a la falta de información precisa aportada por los caracteres morfológicos utilizados para el diagnóstico taxonómico de *Ceroglossus*, se proponen métodos cuantitativos basados en la morfometría geométrica para facilitar la identificación de las diferentes especies. En particular, el análisis de la parte dorsal del pronoto es que ofrece mejores resultados para discriminar taxones en este género, proporcionando una herramienta útil para la taxonomía de *Ceroglossus* y la correcta identificación, que facilitarán el trazado futuro de posibles estrategias de conservación.



INTRODUCCIÓN





1 - El grupo de estudio

1.1 - El Orden Coleoptera

Los coleópteros, conocidos comúnmente como “escarabajos”, constituyen el orden más diverso y numeroso de insectos y el grupo animal que ha experimentado la mayor radiación conocida (Grove & Stork, 2000; Hunt et al., 2007). Esta alta diversidad (Figura 1) se traduce en 17 superfamilias divididas en 179 familias (Bouchard et al., 2011) y unas 400000 especies descritas, aunque éstas corresponden a tan sólo una pequeña parte de la biodiversidad estimada (Erwin, 1982).



Figura 1: Representantes de la diversidad del Orden Coleoptera. En el sentido del reloj, desde la esquina superior izquierda: *Lamprina aurata*, *Megasoma sp.*, *Rhinitia hemistictus*, *Chondropyga dorsalis* y *Amblytelus*. Imagen creada por Bugboy52.40, tomada de Wikimedia Commons (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Coleoptera_collage.png).



El orden tiene un origen antiguo, estimado en hace 300 millones de años (Hunt et al., 2007; Misof et al. 2014), a comienzos del periodo Pérmico. Poco después surgieron los cuatro subórdenes en los que se divide: Archostemata, Adephaga, Polyphaga y Myxophaga. Los coleópteros se distinguen de otros órdenes de insectos por poseer un exoesqueleto particularmente rígido, el cual se extiende al primer par de alas (élitros), que se encuentra quitinizado y protegiendo al segundo par de alas.

Debido a su gran diversidad y a la variedad de adaptaciones que poseen, los coleópteros son un grupo ideal para el estudio de la biodiversidad y sus orígenes, mediante el estudio de sus relaciones y evolución (Hunt et al., 2007).

1.2 - Suborden Adephaga: Familia Carabidae

Adephaga constituye el segundo suborden en cuanto a número de especies de escarabajos. Incluye unas 45000 especies descritas (Ślipíński et al., 2011). Los miembros de este suborden ocupan una amplia gama de hábitats, que a menudo exhiben altos grados de especialización. Los adéfagos terrestres, también llamados "Geadephaga" (familias Carabidae, Cicindelidae y Trachypachidae), incluyen la mayor parte de la diversidad de Adephaga con unas 40.000 especies (Ślipíński et al., 2011).

Una de las familias más numerosas y diversas de coleópteros son los carábidos (Carabidae), que comparten con otras familias del suborden Adephaga su particular configuración estructural del abdomen (Jeannel, 1944). Los carábidos cuentan con un número de especies que oscila en torno a las 33.000-37.000 (Lorentz, 2005; Chapman, 2009). Poseen una distribución mundial, ocupando una gran variedad de hábitats terrestres y su origen se remonta a inicios del periodo Mesozoico (Lawrence y Newton, 1995; Hunt et al., 2007).

Los carábidos constituyen un grupo de coleópteros principalmente carnívoros, cuya dieta incluye colémbolos, lombrices de tierra, nematodos, babosas, caracoles, pulgones, huevos y larvas de dípteros y coleópteros, pupas de Lepidoptera, pero también encontramos especies que se alimentan de semillas de plantas herbáceas (Holland, 2002). Aunque existen estudios sobre los hábitos alimenticios de los carábidos, todavía quedan muchas lagunas en el conocimiento y la comprensión de los hábitos alimentarios de estos escarabajos (Toft y Bilde, 2002). El análisis del contenido del tracto digestivo de los carábidos con ADN (PCR) permitirá en el futuro la evaluación de los tipos de alimentos consumidos en el campo por estos coleópteros.



Los carábidos presentan diferencias considerables en el potencial de dispersión que tienen las diferentes especies e incluso las diferentes poblaciones e individuos dentro de la misma especie. En este sentido es fundamental la morfología del ala. Los Carabidae incluyen especies que poseen alas completamente desarrolladas (macrópteros), alas reducidas (braquíteros) o alas vestigiales (micrópteros), constituyendo por tanto uno de taxones de insectos que exhiben mayor diversidad en cuanto a los patrones de morfología del ala (Venn, 2016).

Dentro de su diversidad encontramos desde los carábidos más “típicos”, como los miembros de la subfamilia Carabinae (*Carabus*, *Calosoma* o *Ceroglossus* entre otros) hasta grupos de morfología muy modificada, como por ejemplo los Paussini, como consecuencia de diferentes adaptaciones ecológicas.

Los carábidos son un grupo de insectos que juegan un papel importante en relación al ser humano y sus actividades. En particular, son importantes bioindicadores de la estabilidad del ecosistema. Se han utilizado en praderas o bosques boreales en donde se ha observado que el número de especies y su abundancia cambia a lo largo de un gradiente de perturbación del hábitat (Raino y Niemela, 2003), y pueden indicar la perturbación de la calidad del hábitat causada por la influencia antropogénica. Para preservar la biodiversidad de los carábidos, especialmente en los agroecosistemas de gestión intensiva, es importante vigilar su composición, abundancia, dominancia y diversidad en los paisajes agrícolas (Lemic et al., 2017).

Si bien sus características los convierten en un grupo ideal para estudios evolutivos, el establecimiento de las relaciones filogenéticas entre ellos y con otros grupos ha resultado problemática. Por un lado, se han propuesto hipótesis contradictorias sobre su relación con el resto de adéfagos, en particular acerca de su monofilia recíproca o bien su parafilia con respecto a las familias acuáticas (Hydradephaga) (Crowson, 1960). Así mismo, se han publicado evidencias a favor y en contra de la identidad de determinados grupos de carábidos como linajes (y, por lo tanto, familias) independientes. El advenimiento de las filogenias moleculares (Maddison et al., 1999, 2009; Shull et al., 2001; Bocak et al., 2004; Timmermans et al., 2016) no han logrado alcanzar un consenso sobre estas cuestiones; sin embargo, estudios recientes apuntan a que Geadephaga y Hydradephaga constituyen realmente grupos recíprocamente monofiléticos, y que la mayoría de los taxones considerados como carábidos forman un linaje monofilético (Maddison et al., 1999, 2009; López-López y Vogler, 2017).



1.3 - *Ceroglossus*: principales características

Los *Ceroglossus* habitan en zonas de bosque nativo. Suelen presentar mayor actividad durante la noche. Se alimentan principalmente de frutos maduros, ya estén caídos en el suelo o directamente de la propia planta, aunque también pueden nutrirse de pequeñas presas vivas o incluso carroña.



Figura 2: Ejemplar típico de *Ceroglossus*, mostrando su peculiar coloración.

En su hábitat natural, las diferentes especies de *Ceroglossus* ocupan distintos nichos ecológicos y temporales, lo cual limita los efectos de la competencia interespecífica y les permite cohabitar. Esto se ha confirmado en cautividad, se observa una nula agresividad cuando se reagrupan varias especies en un terrario (Jiroux, 2006).

Los *Ceroglossus* son conocidos comúnmente como “peorros” debido a su estrategia defensiva, consistente en la expulsión de un líquido maloliente. Este líquido proviene de las glándulas anales y está probablemente compuesto por ácido butírico (al igual que sucede en otros carábidos como los Brachinini o los Paussinae) junto con otros compuestos fétidos (Laurent Rataj http://ceroglossus.voila.net/Ceroglossus/simpleviewer/index_principal.html).



1.4 - Distribución del género *Ceroglossus*

Las especies del género *Ceroglossus* se encuentran en el sur de Chile, desde el nivel del mar hasta alturas elevadas. También sobrepasan los límites territoriales chilenos y ocupan algunos biotopos argentinos, donde se pueden encontrar varios taxones diferentes de los endémicos de Chile, como por ejemplo *C. buqueti argentinensis* Jiroux, *C. chilensis pseudovillaricensis* Jiroux y *C. buqueti ceciliae* Jiroux.

La distribución del género parece coincidir con las hayas del género *Nothofagus* (Blume), las cuales crecen en las regiones templadas más o menos húmedas, extendiéndose del sur del municipio de Santiago (Alto Cantillana) a la Tierra de Fuego (Figura 3).

1.5 - *Ceroglossus*: Ciclo de desarrollo

El ciclo de desarrollo de *Ceroglossus* dura aproximadamente tres meses. Los huevos eclosionan a las dos semanas de la puesta. El primer estadio larvario dura dos semanas, el segundo tres semanas y el tercer estadio (Figura 4) dos semanas. Al final de esta etapa la larva alcanza unos 20 mm de longitud. Las larvas mudan siempre en superficie, ocultas bajo un pedazo de corteza.



Figura 3: Distribución de las hayas del género *Nothofagus* en Sudamérica. Modificado de https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Nothofagus_Distribution.svg



Figura 4: Tercer estadio larvario de *C. buqueti calvus*, en vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha). Tomado de Jiroux (2006).

A los estadios larvarios les sigue un periodo durante el cual se produce la pupación, a unos 10 cm de profundidad. Esta fase se prolonga unas dos semanas, durante las cuales ciertas partes del cuerpo (patas, ojos, mandíbula) se pigmentan (Figura 5).



Figura 5: Pupa de *C. buqueti calvus*, en vista dorsal (izquierda) y ventral (derecha). Tomado de Jiroux (2006).



Al término de la metamorfosis la pupa se transforma en un imago en parte despigmentado. La cromatogénesis tiene lugar durante las 24 horas siguientes (Figura 6).

Para que el desarrollo produzca un individuo viable es necesario que la temperatura esté comprendida dentro del rango entre 15-20 °C, tal como ha constatado Jaffrézic mediante la cría en cautividad en 2005 (Jiroux 2006).



Figura 6: Pigmentación del imago, desde 5 minutos tras la emergencia hasta 24 horas después, donde ya se observa al imago completamente pigmentado. (Tomado de Jaffrezic, 2006).

1.6 - Morfología de *Ceroglossus*

Las características que definen al género *Ceroglossus* son:

- Forma corporal esbelta
- Segundo artejo antenal reducido.
- Tercer artejo antenal el doble de largo que el segundo.
- Mandíbulas con dos dientes.
- Labio de color metálico.
- Cromatismo muy variado y presente en numerosas partes del cuerpo.
- Carenas en los artejos antenales (únicamente en el macho, Figura 7). Este carácter posee un gran valor taxonómico (Jiroux, 2006).

La cabeza presenta ojos prominentes, en ocasiones rugosos. Las mandíbulas son falciformes, y el labio saliente. Las antenas llegan aproximadamente hasta la mitad del



élitro. Los cuatro primeros artejos de las antenas son glabros, mientras que los siete restantes están totalmente recubiertos de una débil pilosidad.

El pronoto es algunas veces estrecho, cordiforme, de talla bastante variable según la especie y a menudo ribeteado. El escutelo tiene forma de triángulo, frecuentemente oscuro. Los élitros son alargados y ovalados, algunas veces muy convexos (*C. suturalis*) y a veces aplanados (*C. guerini*). La escultura elitral es extremadamente variable, haciendo imposible utilizarla como un carácter de identificación. Las costillas, habitualmente regulares, pueden ser largas y salientes (*C. chilensis seladonicus*, Kraatz-Koschlau), o finas (*C. darwini*), algunas veces compuestas de una serie de tubérculos fraccionados irregulares (*C. suturalis*). Cuando desaparecen, dejan como vestigio de su presencia unas manchas negras (*C. ochsenii*). Las costillas están separadas unas de otras por una hilera de puntos.

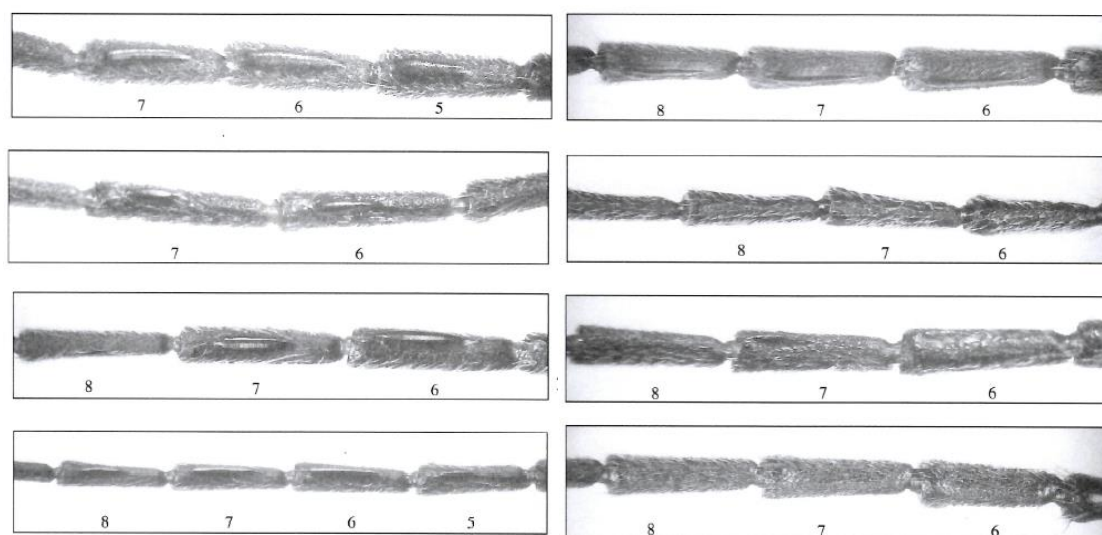


Figura 7: Carenas en las antenas de varias especies del género *Ceroglossus*. Columna izquierda, de arriba a abajo: *C. buqueti chiloensis*, *C. suturalis olivaceus*, *C. ochsenii*, *C. guerini*. Columna derecha, de arriba a abajo: *C. chilensis gloriosus*, *C. darwini darwini*, *C. speciosus*, *C. magellanicus ortrudheinzae*. Tomado de Jiroux (2006).

Las patas son lisas o presentan una fina estría entre dos líneas de puntos. El fémur anterior del macho es ligeramente más grueso que en la hembra, y el tarso de las patas anteriores se encuentra más o menos dilatado en el macho, siguiendo el patrón de dimorfismo sexual habitual de los carábidos.



1.7 - Caracteres morfológicos y taxonomía de *Ceroglossus*

Las semejanzas fenotípicas entre las diferentes especies del género *Ceroglossus* (Figura 8) y su pertenencia a la misma descendencia son innegables, sin embargo, su identificación al nivel específico y subespecífico planteó durante mucho tiempo problemas, y es sólo recientemente, con la revisión del género realizada por Jiroux (2006), cuando las cosas han comenzado a clarificarse.

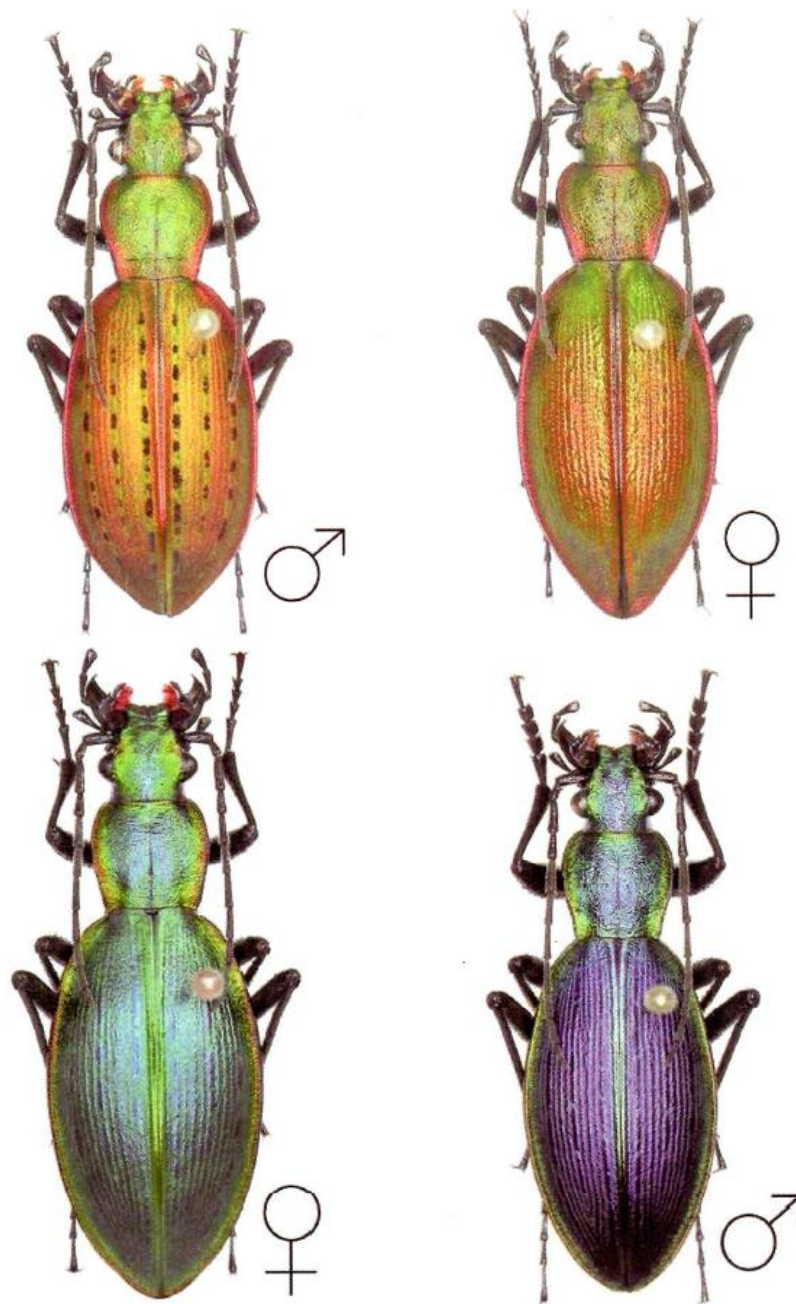




Figura 8: Imagos de *C. buqueti* de Punta Estaquilla (arriba) y de *C. darwini solieri* de Huar Huar (abajo). Tomado de Rataj (2012).

La identificación de los *Ceroglossus* a nivel específico y subespecífico no es una tarea fácil. Las características de la morfología que se usan para su identificación suele ser principalmente el edeago que es el aparato copulador masculino, la presencia y posición de las carenas de los artejos antenales, tamaño, entre otros. Sin embargo, utilizar el edeago como único criterio de diferenciación (curvatura y alargamiento) no es muy fiable según lo da a entender la clasificación actual. Ya que este criterio de determinación se basa en que la forma del edeago es estable, única y limpia en cada una de los 4 grupos de especies, y que el edeago por ejemplo en el grupo *darwini* es muy encorvado en *C. magellanicus* y más alargado en *C. darwini* y *C. speciosus*. Si se compara el edeago de un *magellanicus* del norte (ssp. *C. m. gerstaeckeri*), con uno de *C. darwini* del sur de la isla de Chiloé (viviendo a 500 km uno del otro), efectivamente existe una diferencia nítida en la intensidad de la curvatura del edeago como se observa en la Figura 9.



Figura 9: Edeagos de *C. magellanicus gerstaeckeri* de Contulmo (izquierda) y de *C. darwini darwini* de Pilpilhue, Chiloé (derecha). Imágenes de Laurent Rataj (<http://ceroglossus.voila.net/Ceroglossus/simpleviewer/articles2.html>).

Pero cuando se estudia el grupo en conjunto, otras observaciones tienden a desacreditar este criterio de determinación, ya que el alargamiento y la curvatura del



edeago son en realidad progresivos de norte a sur, y cuando se observa este desvanecido de formas, la distinción *C. magellanicus* / *C. darwini* no es tan evidente. En cambio, las formas del edeago de los grupos *C. chilensis* y *C. buqueti* son más estables, pero si verdaderamente se concede la primacía a este carácter, entonces el grupo *C. darwini* debe ser subdividido en 5 o 6 especies por lo menos, ya que existen numerosos gradientes en la forma del edeago. La forma del edeago es una ayuda a la determinación (Figura 10), pero en ningún caso el criterio único de determinación por encima de los demás (Laurent Rataj; <http://ceroglossus.voila.net/Ceroglossus/simpleviewer/articles2.html>).



Figura 10: Edeagos de varias especies de *Ceroglossus*. De izquierda a derecha, y de arriba hacia abajo: *C. buqueti buqueti*, *C. chilensis gloriosus*, *C. darwini darwini*, *C. guerini*, *C. magellanicus ortrudheinzae*, *C. ochsenii*, *C. suturalis olivaceus*, *C. speciosus*.



1.8 - Posición sistemática de *Ceroglossus* en la familia Carabidae

El género *Ceroglossus* pertenece a la familia de los Carábidos, subfamilia Carabinae y se considera que forma una pequeña pero distintiva tribu llamada Ceroglossini, que equivaldría a las tribus más grandes de los Cychrini y los Carabini. Los Carabina, que son una de las 2 subtribus de la tribu Carabini, han logrado una gran diferenciación morfológica y poseen una amplia distribución en el hemisferio norte. Por el contrario, el número de especies de la tribu Ceroglossini es muy pequeño debido a que se han dado escasas variaciones en su morfología, aunque sí poseen una variada gama de colores en la superficie de su cuerpo de modo que la clasificación a simple vista de los diferentes grupos se hace bastante ambigua (Okamoto et al., 2001).

La radiación de los Carabina fue hace unos 40 millones de años y se conocen unas 800 especies, contrastando con la situación de los *Ceroglossus* que cuenta con una historia evolutiva mucho más larga, y aun así este género sólo cuenta con “10 especies” debido a que ha sufrido una baja diferenciación morfológica, excepto en la coloración de la superficie del cuerpo. Por lo tanto, la historia evolutiva de los *Ceroglossus* ha procedido en gran medida en “silencio”, es decir las mutaciones no han tenido ventajas evolutivas o han sido silenciosas. Para ello se ha propuesto el término “evolución silenciosa o siliente” también aplicable a algunos grupos de Carabina (Su et al., 2000, 2001) y de Calosomina (Su et al., 2005).

1.9 - Taxonomía del género *Ceroglossus*

Los trabajos en la familia Carabidae sobre caracteres morfológicos del exoesqueleto (Deuve 2004) o sobre el gen 18S del ADN ribosomal (Maddison et al. 1999) indican que los Ceroglosini están más relacionados con el género *Calosoma* que con el género *Carabus* (Figura 11). La semejanza fenotípica aparente del género *Ceroglossus* y el género *Carabus* puede ser debida a la existencia de una convergencia morfológica al ocupar nichos ecológicos equivalentes (Jiroux, 2006).

Eric Jiroux (1996), basándose en caracteres morfológicos (forma del edeago, forma del pronoto, presencia y posición de las carenas en los artejos antenales, etc.) divide el género en cuatro grandes grupos de especies (*C. chilensis* Eschscholtz, 1829; *C. darwini* Hope, 1837, *C. buqueti* Laporte, 1834 y *C. suturalis* Fabricius, 1775). Este autor describe 86 subespecies, aunque la determinación a nivel subespecífico es complicada ya que poseen una gran variabilidad, tanto en el plano cromático como en



el estructural. De este modo, ciertas subespecies pueden ser muy variables dentro de ciertas localidades y particularmente estables en otras. Añadido el hecho de que dentro de los biotopos donde los taxones son estables, todas las especies muestran un cromatismo frecuente y una escultura elitral idéntica, hecho que ha provocado gran confusión en la identificación de las diferentes subespecies. Jiroux (1996) no plantea ninguna hipótesis en cuanto a estas llamativas variaciones.

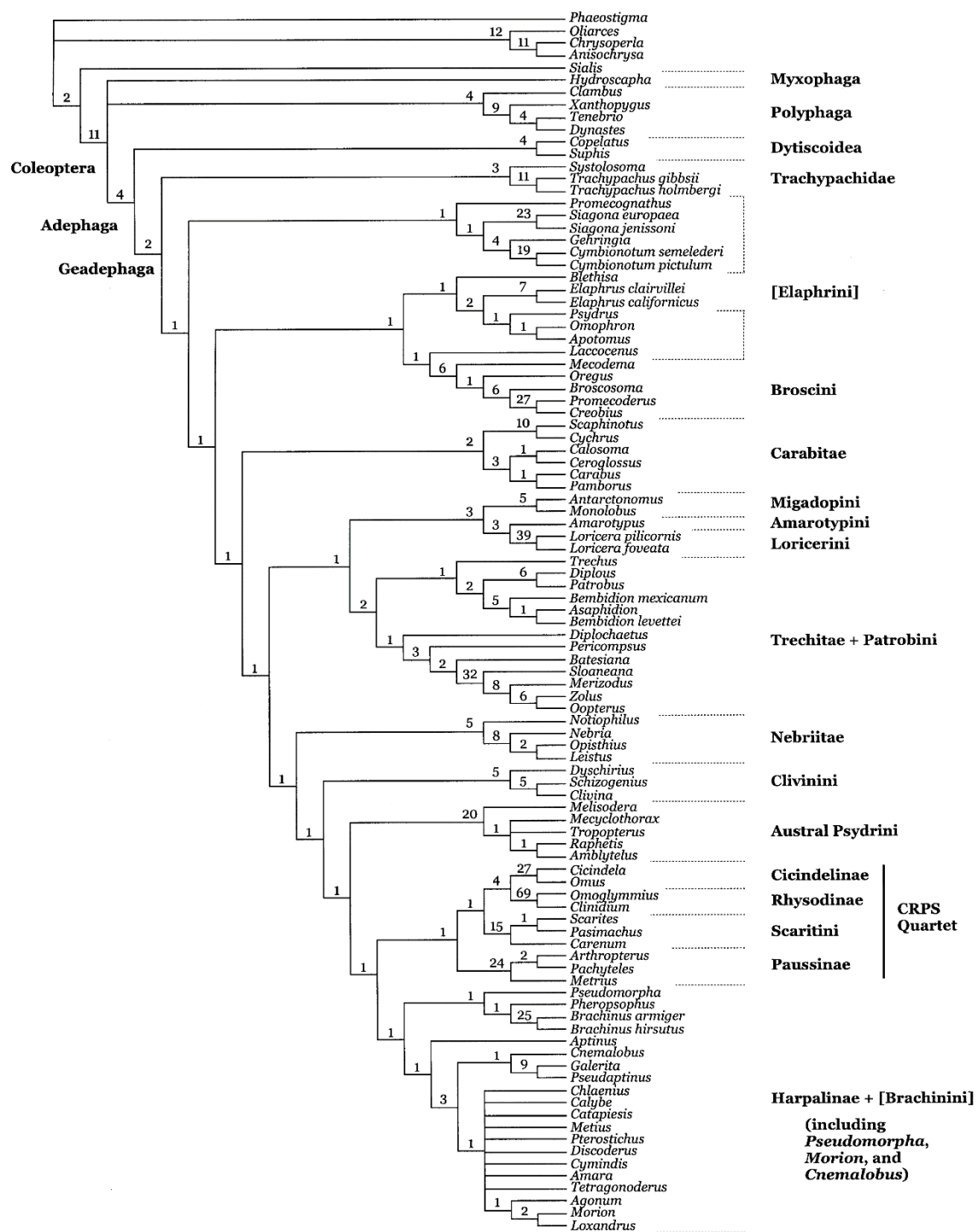


Figura 11: Árbol consenso del trabajo de Maddison et al. (1999), mostrando a *Ceroglossus* como grupo hermano de *Calosoma*, en la supertribu Carabidae.

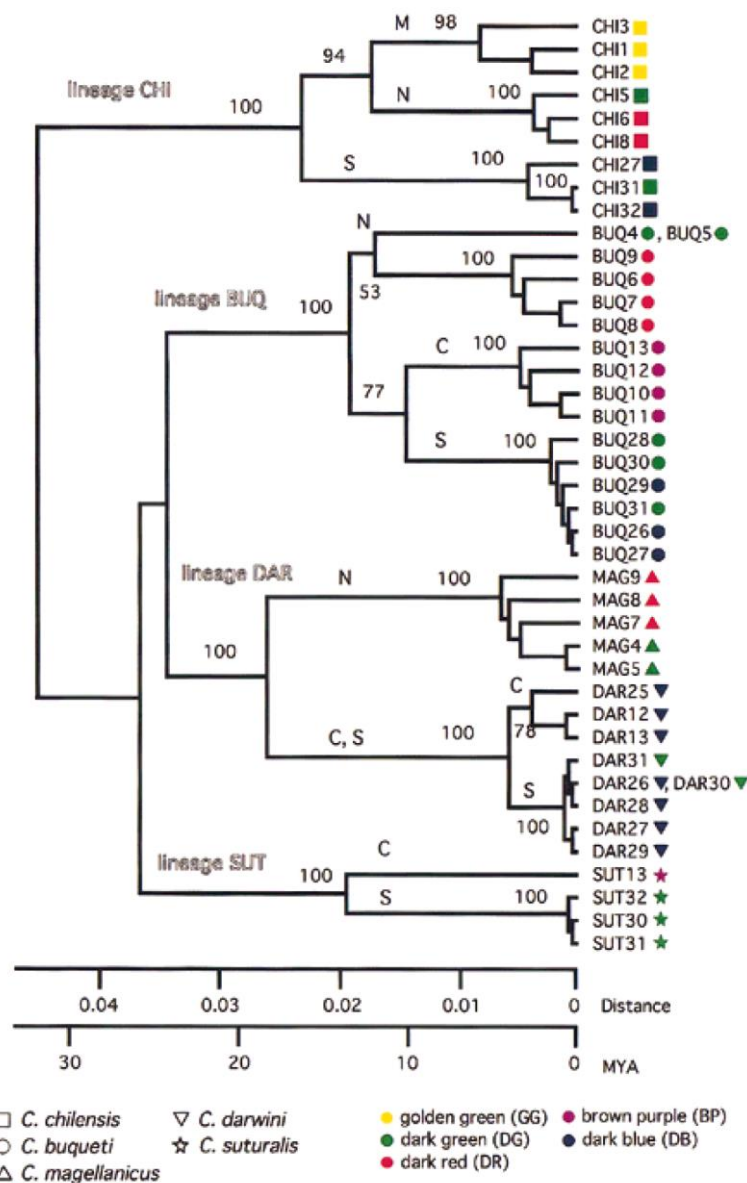


Figura 12: Árbol filogenético del género *Ceroglossus* del trabajo de Okamoto et al. (2001).

Después de este trabajo se plantea la necesidad entre los expertos que trabajan en este grupo de realizar estudios filogenéticos para mejorar la clasificación ya que se hacen numerosas apelaciones sobre la nomenclatura que se necesitan poner en sinonimia, en esta línea Okamoto et al. (2001) realizan un estudio filogenético basado en métodos fenéticos (NJ y UPGMA) mediante el análisis de las secuencias del gen mitocondrial ND5 de 66 ejemplares *Ceroglossus* recogidos en diferentes localidades de Chile. Los árboles filogenéticos (Figura 12) muestra 4 líneas bien diferenciadas, las cuales tienen divergencias de 25-30 M.A., manejando para ello la escala temporal que utilizó Su et al. (2001).



Estos resultados, publicados por Okamoto et al. (2001) se corresponden con la clasificación de la primera revisión del género *Ceroglossus* realizada por Jiroux (1996), aunque según Laurent Rataj algunos *C. magellanicus* Géhin, 1885 aparecieron en el árbol como *C. darwini*, con lo cual la correlación forma del edeago / especie (característica de bastante peso en la identificación morfológica de este género) pierde su credibilidad. Los resultados de Okamoto et al. (2001) muestran (Figura 12) que el ancestro de los *Ceroglossus* se diferenció en 4 líneas de descendientes hace entre 25 y 32 millones de años (4 grandes grupos) ocupando la actual zona de distribución del género, a su vez el grupo *C. chilensis* (podría haber sido el primero en divergir) se subdivide en 4 líneas de descendientes hace entre unos 10-12 millones de años, los 3 grupos restantes divergieron simultáneamente: el grupo *C. chilensis* se separó en 4 sublinajes hace entre 10 y 12 millones de años, el grupo *C. darwini* se subdividió hace unos 18 millones de años dejando a un lado a *C. magellanicus* y a otro a *C. darwini* y *C. speciosus* Gerstaecker, 1858 (que divergen hace 5 millones de años) y el grupo *C. suturalis* se separó en 3 líneas hace unos 12 millones de años.

Este estudio también demostró que, a pesar de un gran polimorfismo cromático, el color es una característica íntimamente relacionada con la geografía y no es representativo de la especie. Esto supone que factores ecológicos y/o medioambientales son el origen que modela esta diversidad cromática. Evocan la posibilidad de que mutaciones en los genes que afectan al color del cuerpo junto con la selección natural son el resultado de estas variaciones cromáticas.

El último trabajo importante sobre los *Ceroglossus* se plasma en el libro “Le Genre *Ceroglossus*” escrito por Jiroux (2006). En este libro se revisa el trabajo anterior de este autor (Jiroux, 1996) y además introduce un capítulo realizado por Oliver Jaffrézic sobre la posible historia de evolución del género *Ceroglossus* en un contexto paleogeográfico y paleoclimático. Se analizan también los resultados de Maddison et al. (1999) sobre la posición sistemática de *Ceroglossus*, confirmando su parentesco con *Calosoma* y siendo ambos el grupo hermano de *Carabus* y *Pamborus*, proponiendo la hipótesis de que *Ceroglossus* procede de Gondwana, habiéndose separado de un ancestro de los *Calosoma* en el Pangea en el inicio del Triásico, las fluctuaciones geográficas y climáticas en el transcurso del Jurásico y el Cretácico les obligaron a refugiarse probablemente en el emplazamiento de la Patagonia actual. En el libro también se hace una interpretación del trabajo previo de Okamoto et al. (2001) y se atreve a dar una datación de la divergencia de los linajes. Los resultados del estudio molecular de Okamoto et al. (2001) indican que la divergencia comenzó hace unos 30 M.A., pero es importante resaltar que el ADN mitocondrial pudo sufrir fácilmente introgresiones entre especies simpátricas (Deuve, 2004). La notable semejanza que



existe frecuentemente entre especies simpátricas de *Ceroglossus* es un elemento fuerte a favor de la hipótesis de transferencia de la región de los lagos, protegida de la transgresión procedente de los relieves Andinos incipientes. Esta región es donde en la actualidad nos encontramos la mayor diversidad específica y subespecífica entre los *Ceroglossus*.

Los estudios morfológicos (Jiroux, 1996) y moleculares (Okamoto et al., 2001) parecen indicar que los 4 grupos de especies no han divergido al mismo tiempo, se piensa que el grupo *C. suturalis* ha sido el que ha divergido primero adaptándose a los biotopos más fríos y más húmedos, seguido del grupo *C. buqueti*. Estos 2 taxones tienen ciertamente un ancestro común (como expresa la forma del edeago y la posición de las carenas en los segmentos antenales). El grupo *C. darwini* pudo derivar de la descendencia de *C. buqueti*, *C. suturalis* o más directamente del grupo *C. chilensis* con el que comparte los caracteres más primitivos.

En cuanto la diferenciación de las especies, tal como ocurre con la formación de los grandes grupos de especies, la especiación dentro de cada uno de estos grupos parece también muy extendida en el tiempo (Okamoto et al., 2001). Así hace unos 32 millones de años la especie *C. chilensis* se individualizó del resto de los *Ceroglossus* y se adaptaron a los biotopos más calurosos y secos, permitiendo la ocupación de zonas situadas al norte de área de repartición del género, permitiéndole resistir mejor los periodos áridos que afecta a la mitad norte de Chile desde el Mioceno (Chong-Díaz et al., 1999). Hace unos 25 M.A. las especies del grupo *C. suturalis* se separan en *C. ochsenii* Germain, 1895 y *C. guerini* Germain, 1895 que soportan menos las temperaturas frías, mientras que *C. suturalis* puede adaptarse a nuevos biotopos más fríos de esta época que aparecen en el sur. Hace unos 24 M.A. es cuando se separan *C. buqueti* y el linaje *C. darwini*. Jiroux (2006) cree que el grupo *C. darwini* está más relacionado con *C. chilensis* que con *C. buqueti*, aunque considera que su parentesco morfológico podría ser una convergencia evolutiva.

En el seno del grupo *C. darwini*, *C. magellanicus* se individualizó hace unos 18 M.A. en el transcurso del Mioceno y se adaptó a biotopos más elevados de la cordillera de los Andes. La aparición de la última especie *C. speciosus* no ocurrirá hasta hace 5 M.A. (Jiroux, 2006).

Jiroux (2006) también da una posible explicación sobre el origen de las múltiples subespecies, originadas parece ser por las importantes fluctuaciones climáticas durante el Mioceno. Así las poblaciones de diferentes *Ceroglossus* se adaptaron a los diferentes biotopos comenzando de esta manera los procesos de subespeciación. Por ejemplo, dentro de *C. chilensis*, los ancestros del complejo formado por *C. c. fallaciosus*, *C. c. colchaguensis* y *C. c. cyanicollis*, se adaptaron a los biotopos más secos aumentando de



tamaño. Otro ejemplo dentro de *C. chilensis* es el complejo *solieri* que se adaptaron al frío, desarrollando colores oscuros, sección cilíndrica, etc. En el Plioceno es donde la evolución conduce a la formación de la mayor parte de subespecies más o menos marcadas. Se estima que en *C. buqueti* la formación de la mayoría de las subespecies se produce hace entre 5-2 millones de años a partir de dos grandes grupos de descendientes: *C. buqueti* que se distribuyeron por el norte (*buqueti sensu stricto* que se separó de *lepidus* hace 4 millones de años) y *C. buqueti chiloensis* y *sybarita* que se separaron hace unos 5 millones de años. Igualmente hace unos 5-3 millones de años que se formaron la mayor parte de subespecies del grupo *C. magellanicus*: *candens* a baja altitud dentro de la región de Valdivia y *C. magellanicus* dentro de la cordillera de los Andes al oeste. Dos mecanismos que son posibles y no excluyentes que se podrían haber producido en el género *Ceroglossus* son las hibridaciones interespecíficas, aunque no aparece citado en ningún trabajo, se sabe que existen híbridos como sabemos por los híbridos que tiene Laurent Rataj: un macho procedente de un *C. chilensis gloriosus* x *C. magellanicus candens* de Valdivia, así como una hembra *C. darwini heinzi* x *C. chilensis paffrezici* de Puaucho. Se sabe de otros híbridos dentro de otras colecciones, pero la introgresión de genes entre especies sólo explica la convergencia morfológica. El otro mecanismo es la convergencia simpátrica, expresión utilizada por Okamoto et al. (2001) para designar la expresión condicional de los genes persistentes en todos los *Ceroglossus* responsables de la coloración, en función de factores ambientales (Figura 13). Evoca la posibilidad de que mutaciones en los genes que afectan al color del cuerpo junto con la selección natural son el resultado de estas variaciones cromáticas. Pero Jiroux (2006) se pregunta cómo es posible que las mismas mutaciones afecten en un mismo lugar geográfico a varias especies diferentes. Conviene evocar la expresión de genes pleiotrópicos, genes de expresión múltiple, (Mayr, 1970). Si el color del cuerpo es la expresión más visible de dichos genes comunes a las diferentes especies, otros caracteres como los relacionados con adaptaciones fisiológicas también se verán muy probablemente afectados. Así los caracteres fisiológicos adaptados a los biotopos húmedos podrían estar asociados a un color oscuro como la forma *penai* Dorsslaer de *C. buqueti chiloensis* en diversas localidades, según observaciones de Gilles Boeuf dentro de los alrededores de los lagos de Chapo y Yelcho (Jiroux, 2006). De la misma manera un color azul oscuro podría estar íntimamente ligado a la adaptación de algunos factores de los biotopos fríos de altas latitudes, como por ejemplo entre *C. magellanicus*: *boeufi* y *caburgansis*.

Jiroux (2006) cree que las ventajas que sacan los *Ceroglossus* de esta convergencia interespecífica están relacionadas con el “mimetismo mulleriano”. Los *Ceroglossus* constituyen un eslabón importante en la cadena alimentaria de los ecosistemas del bosque primario chileno, siendo depredados por diversas aves como el “Chucazo” (*Scelorchilus rubecula* Kittlitz, 1830) y el “Hued-Hued” (Género *Pterotochos* Kittlitz,



1830). Ya que en los pájaros el sentido de la vista es el más desarrollado y es esencial para sus presas las potenciales adaptaciones cromáticas, a manera de camuflaje o, al contrario, presentando colores vivos como advertencia imitando a presas tóxicas no comestibles. Además, la posibilidad de arrojar un líquido de un olor desagradable puede hacer que sean considerados como presas no comestibles. El interés es, por tanto, que los colores estridentes rojo y negro, o amarillo y negro son las asociaciones más frecuentes que alertan al depredador. Podemos hablar entonces de mimetismo mülleriano. Jiroux (2006) piensa que la ventaja es evidente, considera que la tendencia a la convergencia cromática entre las especies de *Ceroglossus* es una tendencia importante y casi inevitable y este punto es primordial para reconstruir las trayectorias de las migraciones de las poblaciones a lo largo de la evolución del género. Así cuando 3 especies que cohabitan sólo se parecen 2 se puede deducir que las que se parecen se encuentran más próximas. Finalmente, Jiroux (2006) considera los mismos grupos de especies (Figura 14) que en su trabajo anterior (Jiroux, 1996) y las mismas que Okamoto et al. (2001) pero ahora propone la existencia de 75 subespecies, las cuales describe detalladamente (características, distribución, etc.). De estas 75 subespecies 26 corresponden al grupo *C. chilensis*, 25 al grupo *C. darwini* (que incluye tres especies: *C. darwini*, *C. magellanicus*, *C. speciosus*), 17 corresponden al grupo *C. buqueti* y *C. suturalis* (que incluye 3 especies: *C. suturalis*, *C. guerini* y *C. ochseni*) considera que está formado por 7 subespecies.

Recientemente otros autores han descrito dos nuevas especies y varias subespecies: *C. magellanicus lucifer*, *C. buqueti leopardalinus*, *C. archoides* (Rataj y Godeau, 2010) *C. morpheus* (Rataj, 2011), *C. suturalis nigripes*, *C. magellanicus varians*, *C. chilensis tenebris*, *C. darwini solaris*, *C. chilensis imperialis* y *C. buqueti lafquen* (Rataj, 2012) aunque su estatus taxonómico no está del todo claro.

Debido a la rápida degradación por medio de la deforestación indiscriminada que está sufriendo Chile, que aún quedan taxones por descubrir junto la necesidad de clarificación de la taxonomía actual por medio de una taxonomía integrativa, se evidencia la necesidad de invertir recursos de manera que se contribuya a aumentar el listado de la biodiversidad de Chile y así poder constatar antes de que desaparezcan las poblaciones o especies de este género amenazadas.

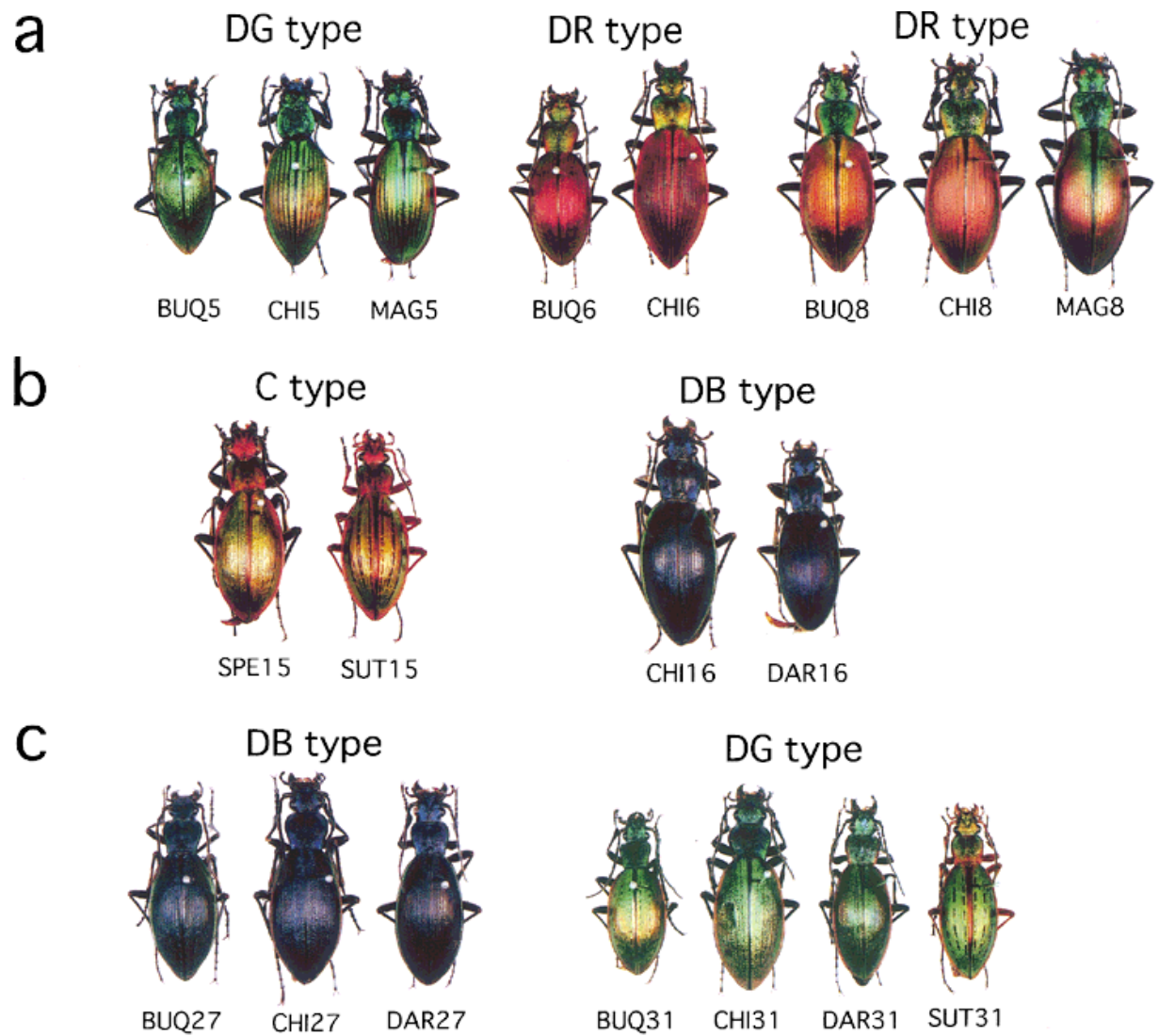


Figura 13: Ejemplo de convergencia simpátrica en *Ceroglossus*. Se indican el tipo de color y la especie en 3 áreas geográficas diferentes de Chile: a) región norte, b) región central y c) región sur. Tomado de Okamoto et al. (2001).

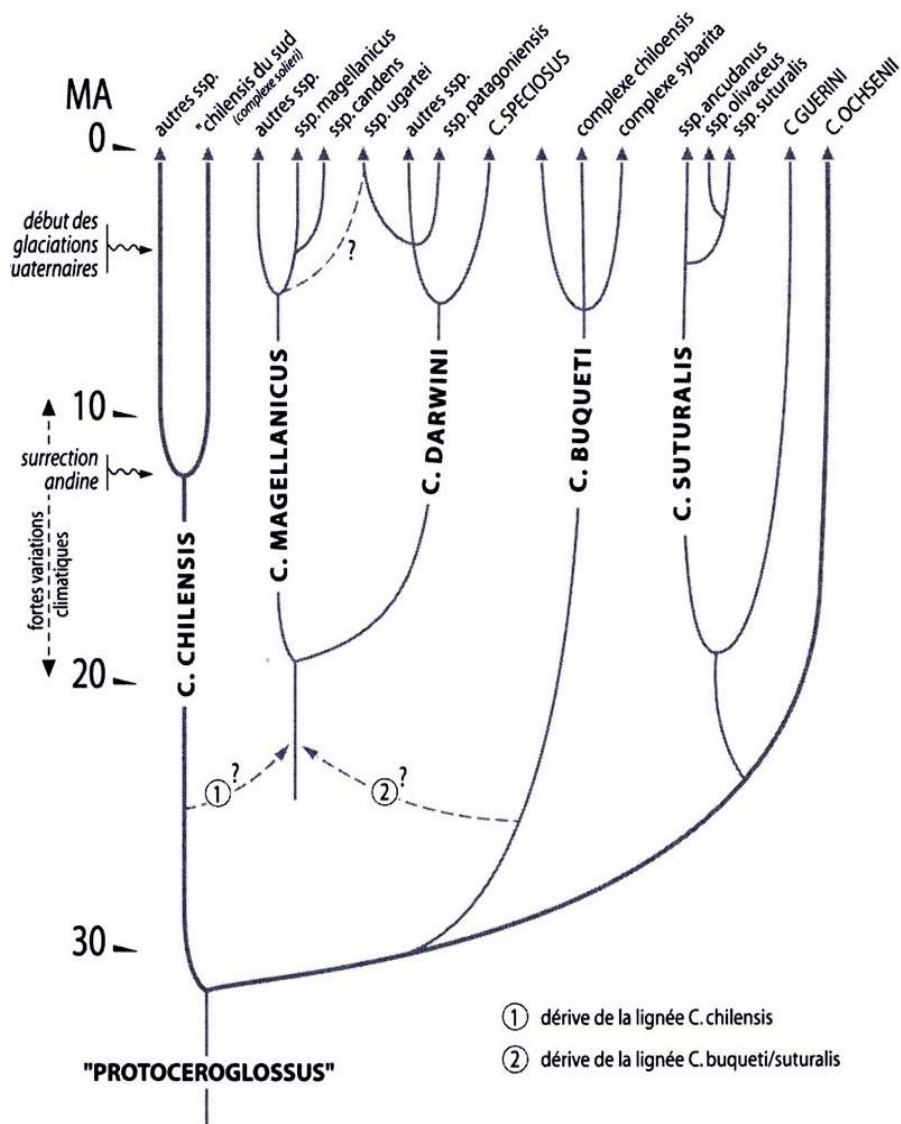


Figura 14: Relaciones evolutivas entre las especies de *Ceroglossus* según Jiroux (2006).

1.10 - Deforestación en Chile

Los actuales estudios indican que los bosques templados de Chile (Figura 15) están siendo talados para la creación de áreas para cultivos agrícolas y praderas, así como para suplir la creciente demanda internacional de productos derivados de la madera (Lara et al., 2002, Echeverría et al., 2006, 2008).

Las altas tasas de deforestación tienen un impacto negativo sobre la biodiversidad debido a la fragmentación del paisaje mediante la pérdida de bosque, reducción del tamaño, y aumento del aislamiento de los fragmentos remanentes (Echeverría et al., 2006), lo cual a su vez afecta los procesos ecológicos (Armenteras et al., 2006).



Figura 15: Bosque de *Nothofagus*, hábitat natural de *Ceroglossus*. Fotografía de José Galián.

Existe una gran amenaza para estos ecosistemas que se consideran islas biogeográficas ya que han estado sometidos a periodos glaciales y a las barreras naturales actuales como desiertos, cordilleras y océanos (Donoso, 1994; Armesto et al., 1998). Estos ecosistemas están presentes en una zona considerada como una de las más importantes a nivel mundial en términos de biodiversidad (Arroyo et al., 1996, Myers et al., 2000, Smith-Ramírez, 2004), debido principalmente a los altos niveles de endemismo y géneros monotípicos (Armesto et al., 1998). A su vez, de acuerdo a la Iniciativa Global 200 de la WWF y el Banco Mundial, estas áreas se encuentran entre las más amenazadas del mundo (Dinerstein et al., 1995).

A pesar de este escenario los esfuerzos tendientes a completar el conocimiento de esta biodiversidad han permitido tener sólo una visión parcializada, pues aún restan muchos grupos de organismos por estudiar. De igual forma, los recursos humanos para realizar esta tarea son escasos y sesgados hacia especies carismáticas o de importancia económica, en desmedro de la gran mayoría de los invertebrados. Muchas especies de estos bosques, principalmente de invertebrados todavía no están descritas o si lo están muchas con dudoso estatus, es el caso del grupo de carábidos del género *Ceroglossus*, género que actualmente no tiene una taxonomía demasiado clara. Es en estos casos



donde los análisis filogenéticos junto con otros datos como los ambientales, etológicos, biogeográficos o morfométricos, pueden cumplir la tarea de identificar realmente los taxones.



2 - Disciplinas para una visión completa de la biodiversidad

Entre las disciplinas tendentes a la obtención de una visión completa y global de la biodiversidad que incluya la descripción, la clasificación y el establecimiento de relaciones de parentesco de los seres vivos se encuentran las siguientes:

- **Sistemática:** que se encarga de proponer una clasificación que sintetice la historia evolutiva del mundo vivo.
- **Taxonomía:** que se encarga de describir y proponer nuevos taxones especies y categorías taxonómicas superiores.
- **Filogenia:** que investiga las relaciones genealógicas (ancestro/descendiente) con las herramientas metodológicas y conceptuales a nuestro alcance y discernir así, los linajes monofiléticos de los que no lo son.

2.1 - Sistemática

La sistemática se encarga de la organización del conjunto total del conocimiento sobre los organismos. Incluye la información filogenética, taxonómica, ecológica o paleontológica. Es una disciplina de síntesis, de abstracción de conceptos y de enunciado de teorías explicativas de los fenómenos observados. Por lo tanto, tiene en sí, un trasfondo teórico que supera al de la taxonomía y una vocación predictiva (De Haro y Melic, 1998). Por lo tanto, la sistemática se ocupa de la diversidad biológica tanto en un plano descriptivo, como en otro explicativo o interpretativo.

2.2 - Taxonomía

La taxonomía es una subdisciplina de la sistemática con el objetivo de ordenar a los seres vivos en un sistema de clasificación compuesto por una jerarquía de taxones. Existen diferentes métodos como el feneticismo, el cladismo, la taxonomía evolutiva, criterios de tipo ecológico, paleontológico, etc. Es una disciplina eminentemente empírica y descriptiva, acumula fenómenos, hechos, objetos, y a partir de dicha acumulación genera las primeras hipótesis explicativas. Actualmente, la taxonomía actúa después de haberse resuelto el árbol filogenético de los organismos estudiados, esto es,



una vez que están resueltos los clados o ramas evolutivas, en función de las relaciones de parentesco entre ellos.

La taxonomía se considera una parte importante en la ciencia de la conservación ya que el reconocimiento de los taxones, sus descripciones, claves de determinación, etc. resultan esenciales para distinguir un determinado grupo de organismos para poder conservarlos (Bisby et al., 1995). Existe una relación directa con la ciencia de la conservación dado que una clasificación inadecuada podría llevarnos a una pérdida de la diversidad genética o a la pérdida de alguna categoría taxonómica.

El enfoque de la taxonomía integradora surgió para proporcionar un marco sólido para el trabajo taxonómico moderno. Sin embargo, la falta de un consenso general acerca de cómo se debe aplicar este enfoque sigue impidiendo la renovación completa en la taxonomía relacionada con la "revolución molecular" que se predijo (Padial et al., 2010). Actualmente existen dos escuelas principales de pensamiento (Padial et al., 2010): i) integración por congruencia, lo que requiere patrones concordantes de divergencia para decidir que dos linajes corresponden a especies separadas (DeSalle et al., 2005), y ii) la integración por acumulación, que supone que la divergencia en cualquiera de los caracteres taxonómicos puede proporcionar evidencia suficiente para la existencia de diferentes especies (De Queiroz, 2007). Se están haciendo esfuerzos para desarrollar un protocolo de consenso que combine las ventajas de ambos enfoques (Padial et al., 2010).

2.3 - Filogenia

El conocimiento de las relaciones filogenéticas entre los diferentes organismos constituye una herramienta esencial a la hora de establecer una clasificación taxonómica coherente con su historia evolutiva (Figura 16). También es indispensable para trazar estrategias de conservación, identificando unidades taxonómicas operativas susceptibles de ser objeto de medidas especiales de protección. La necesidad de la filogenia para la clasificación es clara, ya que las categorías clasificatorias dejan de ser abstracciones ideales más o menos arbitrarias para convertirse en entidades reales que expresan la perspectiva histórica única e irrepetible del mundo orgánico.

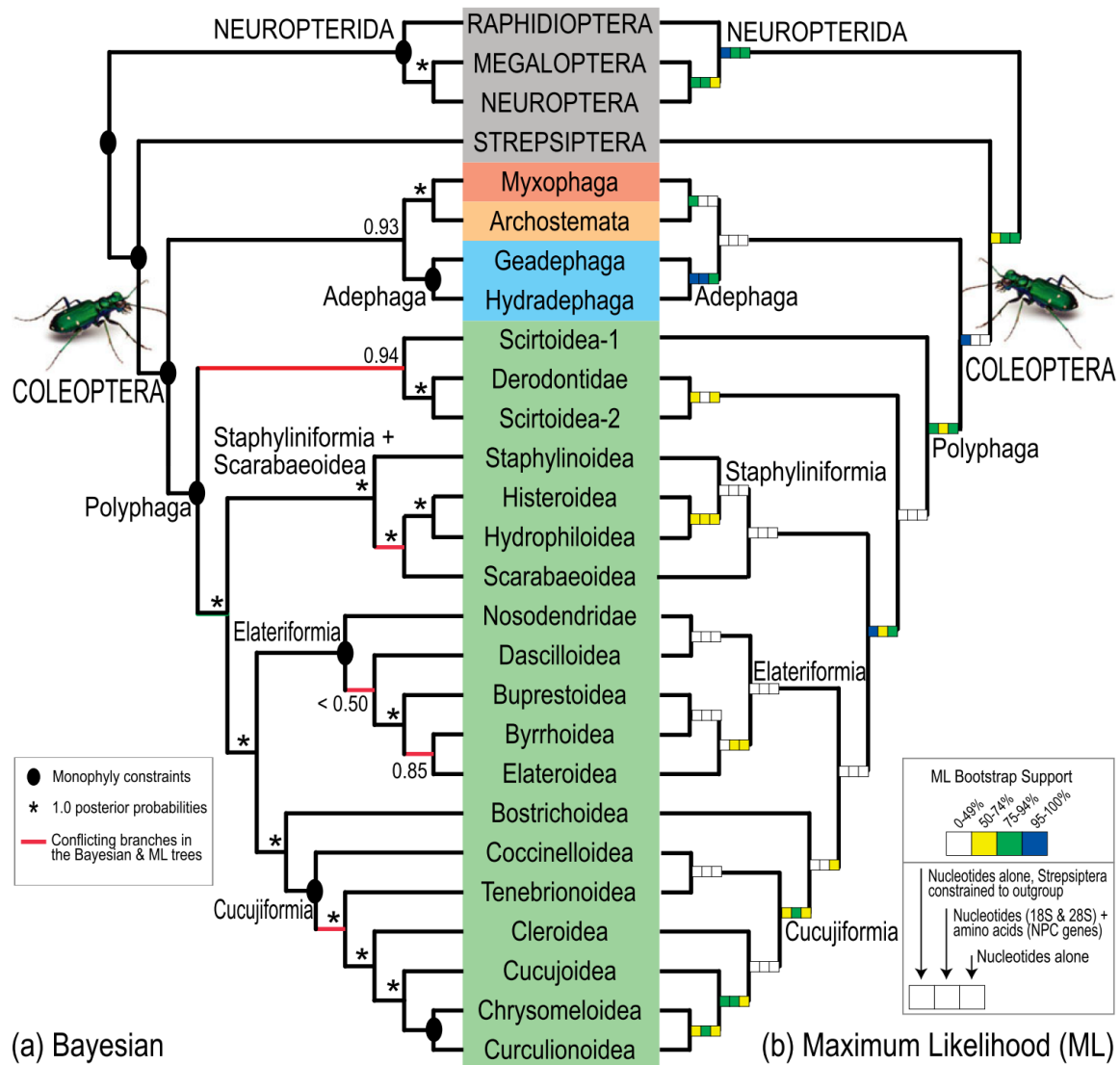


Figura 16: Reconstrucción de la filogenia de los coleópteros según McKenna et al. (2015).

La reconstrucción filogenética se sustenta en el concepto darwiniano de “descendencia con modificación”, de forma que los caracteres que se observan en las distintas especies, heredados a partir de un ancestro común, son indicativos de una relación genealógica. El análisis filogenético tiene como objetivo reconstruir las relaciones evolutivas entre los organismos, entre poblaciones de una especie, entre especies de un género, entre géneros, etc. Así como estimar el tiempo de su divergencia, es decir, descubrir todas las relaciones de las ramas del árbol filogenético y la longitud de estas ramas para descubrir las cercanías evolutivas de las secuencias sometidas al análisis.

Si bien durante un largo periodo de tiempo la reconstrucción filogenética, originalmente propuesta por Willi Hennig (1950), ha dependido exclusivamente de caracteres morfológicos, ecológicos, etológicos o similares, el reciente desarrollo de las



técnicas de secuenciación de ADN y filogenia molecular, cada día más baratas y accesibles, han proporcionado un amplio número de marcadores para ayudar a esclarecer las relaciones filogenéticas entre los organismos (Rodrigo et al., 2008). Estos marcadores, si bien pueden ser usados por sí solos, proporcionan resultados más apropiados y próximos a la realidad si se combinan con otro tipo de caracteres.

Esto ha cambiado el curso del declive que la ciencia de la taxonomía venía sufriendo (Wilson, 1985; Walter y Winterton, 2007; Yeates et al., 2011) y además ha propiciado la aparición de disciplinas nuevas, como la taxonomía de ADN (Tautz et al., 2003; Vogler y Monaghan, 2007).

En la actualidad, la reconstrucción filogenética tiene un papel fundamental en cualquier estudio que trate sobre la evolución de algún grupo de organismos. Incluso, en palabras de Yang y Rannala (2012): “cada biólogo necesita saber algo sobre la inferencia filogenética”.

2.4 - Métodos de reconstrucción filogenética

Los métodos más simples están basados en las distancias genéticas entre las secuencias analizadas, convenientemente modificadas mediante el uso de modelos de sustitución nucleotídica para corregir la desviación entre el número de diferencias observadas y el número real de mutaciones. Dentro de estos métodos destaca el Neighbor-Joining (Saitou y Nei, 1987).

Por el contrario, el método de Máxima Parsimonia (Fitch, 1971; Hartigan, 1973) trata de encontrar el árbol que requiere el mínimo número de cambios de estado. Entre sus ventajas se encuentra que no parte de asunciones establecidas de antemano, pero es un método muy sensible al efecto de atracción de ramas largas (Felsenstein, 1978; Huelsenbeck, 1998), en el que los taxones que han experimentado un mayor número de mutaciones se atraen y agrupan incorrectamente.

Los métodos de Máxima Verosimilitud (Felsenstein, 1981) buscan el árbol más probable de acuerdo a los datos. En realidad, es similar a la Máxima Parsimonia, ya que los árboles que requieran un menor número de sustituciones tienden a producir unos valores de probabilidad mayores; sin embargo, la Máxima Verosimilitud permite una mayor flexibilidad estadística al permitir que las tasas evolutivas varíen según la rama.

La Máxima Verosimilitud puede usarse para poner a prueba hipótesis alternativas, como por ejemplo la búsqueda del modelo de sustitución nucleotídica (Goldman, 1993) o de reloj molecular (Wilke et al., 2009) más adecuado.



Una forma de asegurar que los resultados obtenidos con estos métodos están cercanos a la realidad (Felsenstein y Kishino, 1993) es el test de bootstrap (Felsenstein, 1985). Este método repite el análisis en múltiples réplicas de la matriz original en las cuales los caracteres han sido desordenados al azar. La fidelidad de un nodo en particular viene dada por el porcentaje de estos árboles en los que se repite.

Una forma más avanzada de aplicar la Máxima Verosimilitud para reconstruir filogenias es la Inferencia Bayesiana (Rannala y Yang, 1996; Mau y Newton, 1997; Yang y Rannala, 1997), que aplica el Teorema de Bayes, a través de un algoritmo que usa las cadenas de Markov Monte Carlo, para calcular la probabilidad del árbol según la matriz de datos de partida. Finalmente se calcula la probabilidad posterior de cada nodo sobre el árbol más probable. Es un método bastante costoso en procesamiento informático, pero los ordenadores actuales pueden llevarlo a cabo sin problemas.

2.5 - Métodos de delimitación de especies basados en datos moleculares

Aunque las especies son la unidad taxonómica fundamental (Mayr, 1982), la comunidad científica ha luchado siempre para obtener una definición adecuada de lo que es una especie (Agapow et al., 2004). Año tras año, nuevas definiciones subjetivas surgen, tratando de superar los defectos de las anteriores (Mayr, 1976; Cracraft, 1983; Taylor et al., 2000; De Queiroz, 2007). Uno de los conceptos de especie más adecuados para ser aplicado en los trabajos de filogenia molecular es el concepto filogenético de especie (Cracraft, 1989). Este concepto reconoce como especie a cualquier grupo de organismos o poblaciones que descienden de un antepasado común y comparten un único carácter derivado o apomórfico (no presente en sus ancestros o afines).

Con el advenimiento del análisis estadístico de datos moleculares, surgió un nuevo marco para resolver este problema (Sites y Marshall, 2003; Wiens, 2007): en lugar de centrarse en la compatibilidad reproductiva dentro de los individuos, su similitud o disparidad morfológica o cualquier otra característica física, ecológica o bioquímica, se propuso delimitar especies utilizando la información proporcionada por secuencias de ADN. Los datos moleculares no sólo permiten agrupar muestras basadas en su similitud de secuencia, sino que también proporciona información sobre las divergencias de los diferentes clados que se pueden utilizar para inferir los procesos que explican la diversidad de los organismos estudiados. No obstante, los datos moleculares representan una hipótesis mas para ser contrastada en conjunto con datos morfológicos, ecológicos, etológicos, biogeográficos, etc.



Algunos de los primeros métodos estadísticos fueron los test de monofilia (P_{AB}) (Rosenberg, 2007), la relación entre las distancias genéticas intra/intergrupales, o la probabilidad de hacer una identificación correcta bajo criterios cladísticos estrictos o relajados (pID_{Strict} o $pID_{Liberal}$) (Ross et al., 2008). Estos métodos fueron implementados en un plugin (Masters et al., 2011) para GENEIOUS (Drummond et al., 2010), incluyendo algunos otros ensayos: AV_{MRCA} (distancia media al antepasado común más reciente), $P_{(aleatoriamente\ distinto)}$ (probabilidad de que un clado tenga el grado de distinción observado debido a procesos de coalescencia al azar), o el soporte del clado.

Posteriormente, se ha puesto a disposición un gran número de métodos de delimitación de especies basados en árboles filogenéticos, distancias genéticas y / u otros tipos de datos (Carstens et al., 2013): GMYC (Pons et al., 2006; Fujisawa y Barraclough, 2013), PTP (Zhang et al., 2013) BPP (Yang y Rannala, 2010, 2014; Rannala y Yang, 2013), Structurama (Pritchard et al., 2000, Huelsenbeck et al., 2011), el agrupamiento gaussiano (Hausdorf y Hennig, 2010), JDA y JDAP (Hey y Nielsen, 2007, Choi y Hey, 2011), modelo unificado de Guillot et al. (2012), el método heurístico de O'Meara (O'Meara, 2009), spedeSTEM (Kubatko et al., 2009, Carstens y Dewey, 2010, Ence y Carstens, 2011) y ABGD (Puillandre et al., 2012) entre otros.

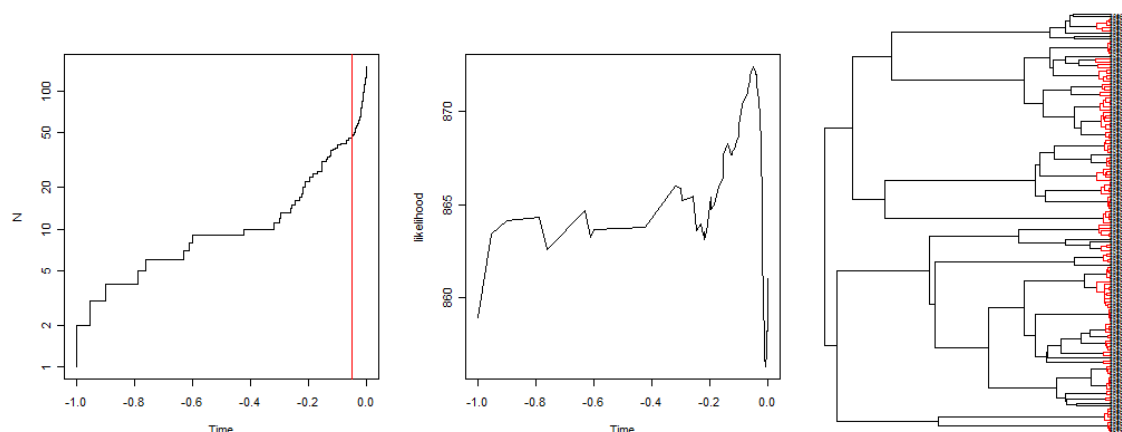


Figura 17: Método empleado por el algoritmo GMYC. Izquierda: Gráfica en la que se representa el número de ramas existentes a cada altura del árbol, marcando en rojo la transición entre eventos de especiación y divergencias por coalescencia. Centro: Gráfica que represente la probabilidad de que dicha transición se encuentre en cada punto de la altura del árbol. Derecha: Traslado del punto de corte al árbol, delimitando los linajes que corresponderían a las diferentes especies. Imagen tomada del blog de Tomochika Fujisawa (<https://tmfujis.wordpress.com/>).

El modelo mixto Yule coalescente GMYC usa los cambios en las tasas de ramificación del árbol para detectar el punto en el que los eventos de especiación transicionan a ramificaciones coalescentes dentro de las especies (Figura 17). Tiene dos enfoques: el primero asume que todas las ramas del árbol tienen la misma tasa de ramificación (único umbral) (Pons et al, 2004) y otro que permite a esta tasa variar entre



diferentes linajes (umbral múltiple) (Monaghan et al, 2009). Uno de sus principales fallos es la tendencia a sobredividir los taxones que poseen una elevada estructuración genética (Hendrich et al, 2010; Talavera et al., 2013). Un método alternativo, el PTP (Zhang et al., 2013) corrige algunos de sus fallos, reduciendo la necesidad de que el árbol empleado sea ultramétrico y usando el número de sustituciones nucleotídicas para determinar los puntos de corte entre especies.

2.6 - Redes haplotípicas

Los árboles filogenéticos representan adecuadamente las relaciones entre especies o entidades de nivel taxonómico superior, cuyas divergencias son sencillas y corresponden a eventos de especiación. Sin embargo, a la hora de establecer las relaciones entre poblaciones u otras entidades intraespecíficas, los árboles pueden no representar fielmente todos los posibles eventos que han producido la diversidad y distribución actuales.

Para estos casos se emplean redes filogeográficas (Posada y Crandall, 2001), consistentes en un gráfico en el que los diferentes haplotipos, tanto hallados en la población estudiada como inferidos, se encuentran unidos por múltiples ramas y separados por el número de pasos mutacionales en los que difieren (Templeton et al., 1992) (Figura 18).

Las redes de haplotipos proporcionan un medio de examinar la historia de intercambio genético entre poblaciones, con el potencial de distinguir patrones biogeográficos de variación genética, causados por el flujo, de aquellos causados por ancestros comunes (Schaal et al., 1998). La combinación e interpretación de ambos métodos (filogenia y filogeografía) es el enfoque más aconsejable para inferir la historia poblacional de una especie o de un grupo de especies estrechamente emparentadas (Posada y Crandall, 2001; Mardulyn, 2012).

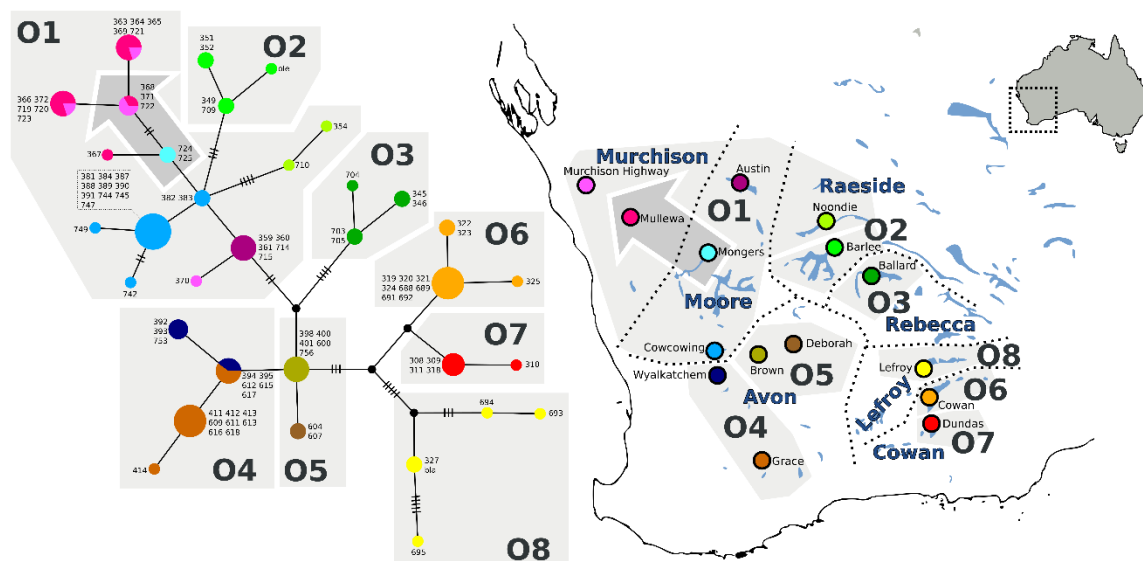


Figura 18: Ejemplo de red filogeográfica, tomada de López-López et al. (2016), mostrando la relación entre los haplotipos y la distribución geográfica en un grupo de especies del género *Pseudotetracha*.

2.7 - Filogenia y filogeografía de *Ceroglossus* y grupos relacionados

Uno de los primeros estudios de filogenia molecular en carábidos fue el de Su et al. (1996a), en el cual se analizó un fragmento del gen de la proteína ND5 mitocondrial en escarabajos de la subfamilia Carabinae de diferentes partes de Japón. El árbol filogenético construido reveló que los Carabina sin alas traseras (no voladores) y *Calosoma/Campalita* (Calosomina) con alas (voladores) son grupos hermanos que divergieron de un antepasado común, mientras que *Cychrus* es externo a ellos. Se reconocen 5 grupos distintos en la subfamilia Carabinae, (*Carabus*, *Hemicarabus*, *Leptocarabus*, *Aptomopterus* y *Procrustes/Damaster*) cuyos antepasados divergieron casi al mismo tiempo hace más de 10 millones de años.

El primer estudio filogenético que incluye a representantes de todos los grupos de Carabidae fue el de Maddison et al. (1999). En este trabajo utiliza el gen rRNA 18S y los resultados confirman en gran parte los datos procedentes de la morfología, pero las relaciones basales son confusas. *Ceroglossus* se muestra relacionado con *Calosoma*, dentro de Carabidae, los cuales están en una posición relativamente basal.

Su et al. (2001) abordan el estudio de la discontinuidad evolutiva de la subtribu Carabina, que en su mayoría son especies que no pueden volar, de modo que hay más posibilidades de diversificación por su aislamiento geográfico comparado con insectos



alados. Sobre la base de datación por un "reloj molecular" de ADN mitocondrial, se deduce que la radiación de los principales grupos de Carabina tuvo lugar hace unos 50-40 millones de años. Esta explosión fue seguida por radiaciones ocasionales a diferentes escalas, a veces acompañadas de cambios morfológicos paralelos. Existen un buen número de ejemplos en los que la morfología fundamental ha permanecido sin cambios por periodos largos de tiempo en poblaciones aisladas dentro de la misma especie. Se propone que la evolución de los carábidos podría haber procedido de forma discontinua, alternando fases de cambios morfológicos rápidos con fases silentes.

En su trabajo, Hunt et al. (2007) recuperan a *Ceroglossus* como género hermano de *Calosoma*, ambos relacionados con *Carabus*, y datan el origen de Carabinae hace ~180MA (Figura 19). Más recientemente, Andújar et al. (2012) recuperan a *Ceroglossus* como género hermano de *Carabus*+*Calosoma*, pero este resultado no es una evidencia concluyente, dado que utilizan a *Ceroglossus* como grupo externo.

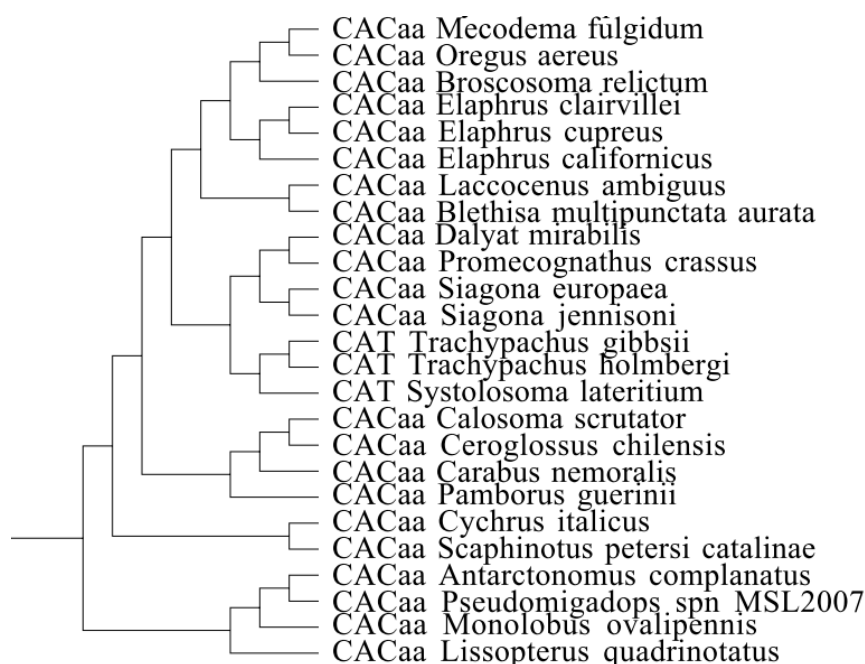


Figura 19: Porción del árbol de Hunt et al. (2007) (material suplementario) en la que encuentra *Ceroglossus* como grupo hermano de *Calosoma*.

Las relaciones filogenéticas dentro de la familia Carabidae han sido abordadas de nuevo por Maddison et al. (2009) utilizando secuencias de los genes 18S, 28S y wingless. En este trabajo se pone de manifiesto el carácter monofilético de los Geadephaga (incluyendo Trachypachidae), no obteniendo soporte la hipótesis de la monofilia de los Hydradephaga. No obstante, estos autores no incluyen ejemplares del género *Ceroglossus*.



Trabajos más recientes que abordan la filogenia de Carabidae como Bocak et al. (2014), McKenna et al. (2015) y Timmermans et al. (2016) tampoco incluyen al género *Ceroglossus*. En un trabajo reciente López-López y Vogler (2017) analizando genomas mitocondriales completos encuentran que los Cicindelidae + Trachypachidae son el grupo hermano del resto de Carabidae, y que la supertribu Carabinae constituye la primera separación del tronco común dentro de Carabidae. Sin embargo, estos autores tampoco incluyen en su análisis al género *Ceroglossus*.

Se han realizado numerosos trabajos sobre las relaciones filogenéticas de la supertribu Carabinae utilizando principalmente secuencias de la subunidad 5 del gen mitocondrial NADH deshidrogenasa (ND5), pero en pocos se incluye el género *Ceroglossus*. Okamoto et al. (2001) realizan un árbol filogenético mediante el análisis de secuencias de 66 ejemplares de *Ceroglossus* recogidos en diversas localidades de Chile. El árbol filogenético muestra 4 líneas bien diferenciadas, las cuales divergieron hace unos 20-30 millones de años. Se demuestra que el color es una característica íntimamente relacionada con la geografía y no es representativo de la especie, sugiriendo que intervienen factores ecológicos y/o medioambientales.

2.8 - Marcadores mitocondriales en filogenia y filogeografía

Para llevar a cabo estudios filogenéticos y filogeográficos se usan secuencias de ADN que proporcionan información sobre las relaciones de parentesco entre los organismos. Se asume que los organismos más emparentados son los que tienen las secuencias más similares, mientras que los más alejados presentan mayores diferencias. También se puede calcular el tiempo de divergencia relacionando los cambios en las secuencias con la tasa de mutación (reloj molecular), aunque en este punto hay que tener en cuenta el gen que se analiza, el organismo objeto de estudio, etc. ya que no existe un reloj molecular único.

Se pueden utilizar distintas moléculas para inferir relaciones filogenéticas, dependiendo del rango taxonómico en el que se desee trabajar y la información que se quiera obtener (Taylor et al., 2000):

- **ADN mitocondrial:** Frecuentemente utilizado para inferir relaciones evolutivas en las categorías taxonómicas de especie y género, debido a su elevada variabilidad.



- **ITS:** Los espaciadores internos transcritos (ITS) son más variables que otras regiones nucleares, por lo que se utilizan para inferir relaciones filogenéticas en especies y subespecies.
- **ARN ribosomal (ej: 18S, 28S):** Estos marcadores nucleares son útiles para reconstruir relaciones evolutivas entre familias y categorías superiores, debido a su estabilidad.

2.9 - ADN mitocondrial (ADNmt)

El ADN mitocondrial es el material genético de las mitocondrias, los orgánulos que generan energía para la célula mediante un proceso llamado fosforilación oxidativa, que utiliza oxígeno y azúcares simples para crear adenosina trifosfato (ATP), la principal fuente de energía de las células (Nass y Nass, 1963).

El ADNmt animal es una molécula pequeña (15-20 kb), bicatenaria, circular y sin extremos (Figura 20). Contiene un pequeño número de genes, distribuidos entre la cadena H, más pesada (conteniendo una mayor proporción de G+C), y que en gran parte constituye el molde para la transcripción, y la cadena ligera L. Los genes contenidos en el ADNmt son 37: 22 genes que codifican para ARN transferentes, 2 genes que codifican para ARN ribosomal y 13 genes que codifican para diversas proteínas que participan en la fosforilación oxidativa.

Se ha constatado que el ADN mitocondrial es una herramienta de gran potencial para inferir filogenias a nivel de especies próximas (nivel de género), como expone Avise (2000), y presenta varias características que lo diferencian del nuclear a la hora de ser utilizado en análisis filogenéticos.

En primer lugar, el estudio del ADNmt es más fácil que el de otros fragmentos, ya que el tamaño de la molécula es más pequeño que el del ADN nuclear; además, debido al gran número de copias presentes en cada célula, se suelen obtener mejores resultados en la extracción en comparación con el ADN nuclear.

El ADN mitocondrial posee además un porcentaje muy elevado de ADN codificante (ausencia de intrones) y escasez de ADN repetitivo y otras secuencias que pueden conducir a errores al estimar las filogenias.

En el ADN mitocondrial no se produce recombinación, puesto que solo se hereda por vía materna. Esto implica que los únicos cambios que haya podido haber en el ADN mitocondrial se deben exclusivamente a mutaciones (Avise et al., 1987). Aunque se han descrito algunos casos de heteroplasmia (diferentes poblaciones mitocondriales en un individuo) (Galtier et al., 2009), éstos representan hechos excepcionales.

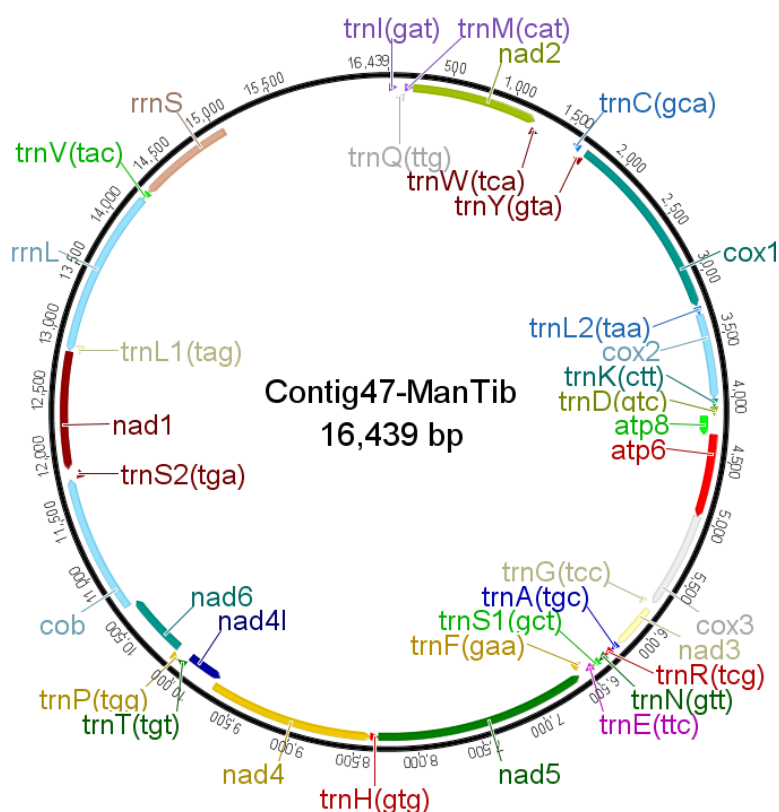


Figura 20: Genoma mitocondrial completo del coleóptero cicindélido *Manticora tibialis* (López-López, com. pers.).

El ADN mitocondrial evoluciona más rápido que el nuclear (Brown et al., 1979; Pons et al., 2010), por lo que es más fácil aún saber las relaciones entre organismos muy próximos. Esta elevada tasa de mutación permite discernir eventos de divergencias recientes, es decir, se requiere menor tiempo evolutivo para que las diferencias genéticas queden expresadas en esta molécula (Hewitt, 2004). Sin embargo, esto puede ser inconveniente para los taxones que divergieron en épocas más remotas o que han evolucionado a una tasa superior, ya que puede conducir a homoplasia: podrían haberse producido múltiples sustituciones para cada posición nucleotídica.

Varios de los fragmentos de ADN mitocondrial más utilizados para la reconstrucción filogenética son el gen de la subunidad I de la citocromo c oxidasa (COI), la subunidad 3 de la misma molécula (coxIII), la subunidad 5 de la NDH deshidrogenasa (ND5), etc. Las nuevas tecnologías de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing) han permitido que recientemente se hayan reconstruido filogenias utilizando la molécula de ADN mitocondrial completa, como el publicado por López-López y Vogler (2017).



2.10 - El gen ND5

El gen ND5 proporciona instrucciones para fabricar una proteína llamada cadena 5 de la NADH-ubiquinona oxidorreductasa. Esta proteína es parte de un gran complejo enzimático conocido como complejo I, que está activo en las mitocondrias, y es uno de los varios complejos necesarios para fosforilación oxidativa. En las mitocondrias, estos complejos están incorporados en la membrana mitocondrial. Durante la fosforilación oxidativa, los complejos enzimáticos llevan a cabo las reacciones químicas que impulsan la producción de ATP. El Complejo I cataliza la transferencia de electrones en el proceso de transporte electrónico, específicamente la transferencia se realiza desde el complejo NADH a otra molécula llamada ubiquinona o coenzima Q (Nakamura-Ogiso et al., 2010).

Este gen se ha usado en números estudios filogenéticos de coleópteros de manera aislada o junto con otros genes como los nucleares 28S, ITS, etc., dando buenos resultados. Algunos ejemplos son los estudios de inferencia filogenética y evolutivos comentados anteriormente en el grupo de los carábidos de Japón (Su et al., 1996a), análisis filogeográficos en el grupo de *Damaster* (Su et al., 1996b), diferenciación del género *Leptocarabus* en Japón (Kim et al., 2000). Es también la molécula que se ha usado en el trabajo de Okamoto et al. (2001) sobre la convergencia simpátrica en los patrones de color del género *Ceroglossus*.

2.11 - Citogenética y evolución cromosómica

Las reorganizaciones cromosómicas se han descrito en muchos grupos de animales, permitiendo distinguir poblaciones dentro de especies o incluso especies muy estrechamente relacionadas (Ayala y Coluzzi, 2005; Bush et al., 1977, Carson y Kaneshiro, 1976; Coluzzi et al., 2002). Dado que las reorganizaciones cromosómicas cambian la posición de los genes, generando nuevos grupos de ligamiento que pueden conducir a un aumento de la diferenciación genética entre las poblaciones, se espera que restrinjan la compatibilidad reproductiva y eventualmente promuevan la especiación. Las reorganizaciones cromosómicas producen gametos desequilibrados que se cree que son el efecto primario de las reorganizaciones en la especiación debido a la disminución de la fecundidad o la viabilidad de los heterocigotos (White, 1978). Más recientemente, se está observando que el efecto primario de las reorganizaciones cromosómicas es la reducción de la recombinación entre genomas en los individuos híbridos, favoreciendo los escenarios de "recombinación suprimida", lo que favorece el aislamiento reproductivo tras dichas reorganizaciones cromosómicas (Figura 21).

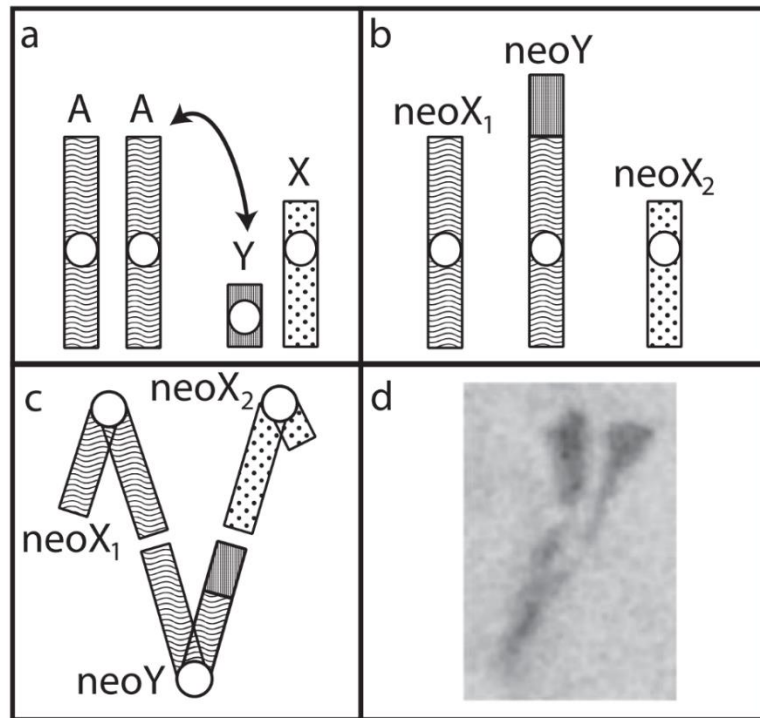


Figura 21: Reorganización cromosómica encontrada en el género de coleópteros *Pseudotetracha* (López-López et al., 2013).

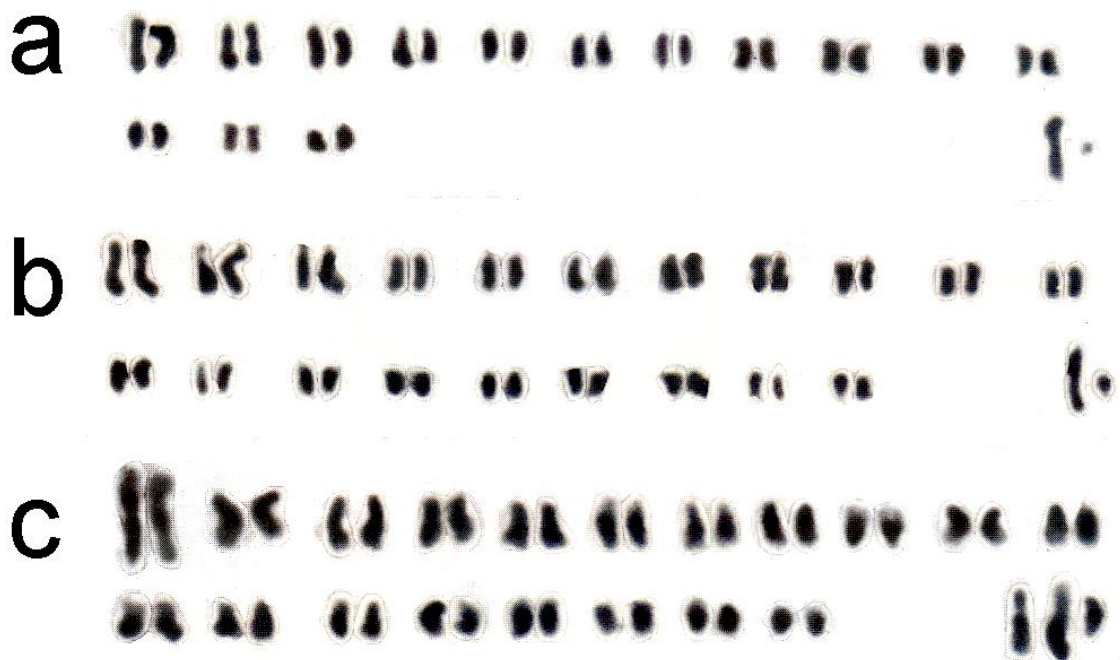


Figura 22: Cariotipos de machos de diferentes especies del género *Ceroglossus* (modificado de Galián et al., 1996). a: *C. magellanicus*, b: *C. buqueti*, c: *C. chilensis*.

En el único estudio cromosómico realizado hasta el momento sobre el género *Ceroglossus* (Galián et al., 1996) se describen tres formas cromosómicas en la especie *C. chilensis*; forma A: $2n=30$, forma B: $2n=42$ y forma C: $2n=38 + III$ (Figura 22).



Investigaciones posteriores no publicadas (Galian, com. pers.) indican que la determinación basada en la morfología de algunos individuos no fue correcta, correspondiendo la forma A a *C. magellanicus* y la forma B a *C. buqueti*, siendo la forma C la única identificada correctamente como *C. chilensis*.

2.12 - Morfometría geométrica

La morfometría geométrica es un método de análisis cuantitativo, que podría definirse como el estudio de la forma en espacios de dos o tres dimensiones (Bookstein, 1996), permitiendo una investigación en profundidad del cambio morfológico. Por lo tanto, la morfometría geométrica se basa en la visualización de los cambios de forma, que es posible gracias a los *landmarks*, o puntos de referencia. Estos son puntos en un espacio de dos o tres dimensiones que corresponden a la posición de un rasgo particular en un objeto (Zelditch et al., 2012). Por lo tanto, los *landmarks* son puntos anatómicos discretos que están presentes y siguen el mismo orden en todos los especímenes. La visualización de los cambios de forma sigue siendo una herramienta importante para entender la variación morfológica, ya que la morfometría geométrica se utiliza para abordar una gama cada vez más variada de preguntas sobre la evolución y el desarrollo de los organismos (Klingenberg, 2010). La forma se define técnicamente como todas las características geométricas de un objeto, excepto por su tamaño, posición y orientación (Dryden y Mardia, 1998).

La gran ventaja que ofrece la morfometría geométrica es que los cambios morfológicos son más fáciles de identificar que las tablas de resultados con todos los coeficientes obtenidos del análisis morfométrico tradicional, ya que se pueden visualizar directamente con programas estadísticos (Rohlf y Marcus, 1993; Klingenberg, 2013). Las visualizaciones de las formas y los cambios de forma se basan principalmente en dos principios: la visualización del cambio de forma mostrando el desplazamiento relativo de los *landmarks* correspondientes en diferentes formas, o mostrando la deformación de una rejilla regular, un contorno o una superficie interpolada desde el cambio de forma (Klingenberg, 2013).

Cuando no sabemos qué factores podrían estar presentes en los datos (un problema común en los estudios que analizan la variación dentro y entre las poblaciones naturales) podemos explorar los datos algebraicamente, para determinar si aparecen patrones evidentes (Zelditch, 2012). El análisis de componentes principales (PCA) es un ejemplo de este tipo de técnica exploratoria, cuyo objetivo principal es determinar la variable o variables y buscar la explicación biológica de su variación (Zelditch, 2012). El



análisis canónico de la varianza (CVA) es también un método exploratorio, pero asume que se están realizando preguntas sobre las diferencias entre los grupos.

Esta técnica se ha utilizado a menudo para el estudio de las diferencias de forma, principalmente de las alas en diversos órdenes de insectos como Coleoptera, Lepidoptera e Hymenoptera (Su et al., 2015; Roggero y Passerin d'Entrèves, 2005). Un estudio de morfometría geométrica en el género *Ceroglossus*, realizado por Benitez et al. (2010), evalúa las diferencias relacionadas con la forma corporal de machos y hembras de dos poblaciones de *Ceroglossus chilensis*. Estas poblaciones sólo mostraron diferencias en la parte ventral, lo cual es interpretado por los autores como baja presión selectiva sobre la morfología en estas dos localidades.



3 - Objetivos de esta tesis

El objetivo principal de este trabajo es reconstruir la filogenia molecular del género *Ceroglossus*, utilizando herramientas moleculares (genes mitocondriales y nucleares) con el fin de determinar las controvertidas propuestas realizadas previamente acerca de las relaciones interespecíficas, y aclarar el estatus taxonómico de diversos taxones de identidad dudosa. Esta filogenia servirá como marco de trabajo para interpretar otros datos (fórmula cromosómica, morfología, coloración, distribución geográfica, etc.) y así poder desvelar los mecanismos que han modelado la evolución de este género de coleópteros.

Los objetivos concretos son:

1. Reconstruir la filogenia de las especies del género *Ceroglossus* utilizando los genes ND5 (mitocondrial) e ITS1 (nuclear) para discernir el origen y el parentesco entre las especies de este género.
2. Aplicar los métodos de delimitación de especies disponibles sobre la filogenia obtenida para reinterpretar la taxonomía del género.
3. Trazar redes filogeográficas de cada una de las especies con las secuencias del gen ND5 mitocondrial para entender los mecanismos que han perfilado la evolución de cada uno de los taxones.
4. Realizar un análisis morfométrico preliminar para establecer un método cuantitativo que facilite la identificación de los taxones.
5. Interpretar los datos cromosómicos disponibles en el contexto de la filogenia obtenida para entender la evolución cromosómica del género.

Todos estos análisis permitirán poner a prueba las hipótesis previamente formuladas por Jiroux (2006) sobre la división del género en especies y subespecies y las descripciones posteriores de nuevas especies y subespecies realizadas por Rataj y Godeau (2010) y Rataj (2011, 2012); así como las hipótesis acerca de la evolución de este grupo esbozadas en Jiroux (2006) y los trabajos de Okamoto et al. (2001).



MATERIAL Y MÉTODOS





1 - Recolección y fijación de las muestras

Los ejemplares analizados fueron colectados en diferentes regiones de Chile (Tabla 1) (Figura 23) en 2009 por Laurent Rataj, en 2010 y 2011 por Laurent Rataj y José Galián, y en 2013 por Víctor Acosta y Laurent Rataj, utilizando trampas de caída con vinagre de vino como atrayente (Figura 24). Para evitar que los ejemplares perecieran ahogados una vez que caían en la trampa se introdujeron en los vasos servilletas de papel arrugadas. Los ejemplares capturados fueron identificados mediante sus características morfológicas a nivel de subespecie por Laurent Rataj. Los ejemplares vivos se mantuvieron en un terrario con una fracción del suelo en el que fueron capturados hasta su sacrificio con acetato de etilo. El abdomen fue abierto para extraer las gónadas, las cuales fueron preservadas en una dilución de etanol y ácido acético en proporciones 3:1, con el objetivo de mantener la estructura de los cromosomas para posteriores estudios. El resto del animal fue conservado en etanol absoluto para preservar la integridad del ADN. Los ejemplares encontrados muertos en las trampas se conservaron en tubos con etanol 100%, manteniéndose a -20 °C a su llegada al laboratorio para una mejor conservación hasta su análisis.

Tabla 1: Lista de ejemplares capturados durante los viajes de muestreo.

Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
17 a	A10	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 1	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	1999
17 b	A11	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 1	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	1999
5	mag dol	<i>magellanicus dolheni</i>	Loc 3	Nahuelbuta	Bío-Bío (VIII)	2009
6	mag ger	<i>magellanicus gerstaeckeri</i>	Loc 5	Contulomo	Bío-Bío (VIII)	2009
7	buq che 1	<i>buqueti cherquencoensis</i>	Loc 6	Manzanar	Araucanía (IX)	2009
9	buq obl 1	<i>buqueti oblitus</i>	Loc 7	15 km al sur de Tirúa	Bío-Bío (VIII)	2009
31	B2	<i>darwini patagoniensis</i>	Loc 28	Al norte de Puerto Murta	Aysén (XI)	2010
81	D8	<i>darwini coloanei</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
3.1	chi kra	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 8	Las Trancas, La Unión	Los Ríos (XIV)	2010
10	mag bim	<i>magellanicus bimarginalis</i>	Loc 2	15 km al sureste de Tirúaa	Bío-Bío (VIII)	2010



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
43	mag luc	<i>magellanicus lucifer</i>	Loc 7	Punta Galera	Los Ríos (XIV)	2010
42	mag mag 1	<i>magellanicus magellanicus</i>	Loc 4	Loncoche	Araucanía (IX)	2010
44	mag uga 1	<i>magellanicus ugartei</i>	Loc 8	Las Trancas, La Unión	Los Ríos (XIV)	2010
18	mag uga 2	<i>magellanicus ugartei</i>	Loc 8	Las Trancas, La Unión	Los Ríos (XIV)	2010
30	dar pat	<i>darwini patagonicus</i>	Loc 28	Al norte de Puerto Murta	Aysén (XI)	2010
45	dar col	<i>darwini coloaneii</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
19	dar ree	<i>darwini reedi</i>	Loc 11	Parque Nacional Puyehue	Los Lagos (X)	2010
17	dar meq	<i>darwini mequinoni</i>	Loc 13	Llico	Maule (VII)	2010
51	dar dar	<i>darwini darwini</i>	Loc 24	10 km al norte de Puyuhuapi	Aysén (XI)	2010
13	och 1	<i>ochsenii</i>	Loc 9	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2010
16	gue 2	<i>guerini</i>	Loc 5	Máfil	Los Lagos (X)	2010
83	chi glo	<i>chilensis gloriosus</i>	Loc 2	15 km al sureste de Tirúaa	Bío-Bío (VIII)	2010
9	chi rat	<i>chilensis rataji</i>	Loc 2	15 km al sureste de Tirúaa	Bío-Bío (VIII)	2010
67	sut oli 16	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 27	Laguna Cofre	Aysén (XI)	2010
57	sut oli 19	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 22	Norte del Lago Las Torres	Aysén (XI)	2010
70	sut oli 6	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
37	buq obl 2	<i>buqueti oblitus</i>	Loc 2	15 km al sureste de Tirúaa	Bío-Bío (VIII)	2010
89	buq leo	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 10	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2010
15	buq sin 1	<i>buqueti snizeki</i>	Loc 14	Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2010
34	buq sin 2	<i>buqueti snizeki</i>	Loc 14	Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2010
48, 49 o 50	buq mag	<i>buqueti magdalenae</i>	Loc 24	10 km al norte de Puyuhuapi	Aysén (XI)	2010
35	buq rel	<i>buqueti relictus</i>	Loc 12	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2010
36	buq buq 1	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 8	Las Trancas, La Unión	Los Ríos (XIV)	2010
38	buq lor	<i>buqueti lorenzi</i>	Loc 7	Punta Galera	Los Ríos (XIV)	2010



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
39	buq bre	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 16	Puancho	Los Lagos (X)	2010
33	buq chi 16	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 22	Norte del Lago Las Torres	Aysén (XI)	2010
60	buq chi 17	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 29	Puente Rico, Murta	Aysén (XI)	2010
56	buq chi 18	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 29	Puente Rico, Murta	Aysén (XI)	2010
52	buq chi 19	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 16	Puerto Aisén	Aysén (XI)	2010
47	buq chi 20	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
3	chi kra 1	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 8	Las Trancas, La Unión	Los Ríos (XIV)	2010
11	mag bim 1	<i>magellanicus bimarginalis</i>	Loc 2	15 km al sureste de Tirúaa	Bío-Bío (VIII)	2010
12	arc	<i>archoides</i>	Loc 10	Al oeste de Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2010
14	buq leo 1	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 10	Al oeste de Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2010
21	sut oli 8	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
22	sut oli 9	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
23	sut oli 17	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
24	sut oli 10	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
31	dar pat	<i>darwini patagonicus</i>	Loc 24	10 km al norte de Puyuhuapi	Aysén (XI)	2010
41	buq bre 1	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 16	Puancho	Los Lagos (X)	2010
50	buq mag	<i>buqueti magdalenae</i>	Loc 25	5 km al norte de Puyuhuapi	Aysén (XI)	2010
61	buq mag 4	<i>buqueti magdalenae</i>	Loc 25	5 km al norte de Puyuhuapi	Aysén (XI)	2010
62	buq chi	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 22	Norte del Lago Las Torres	Aysén (XI)	2010
63	buq chi 15	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 22	Norte del Lago Las Torres	Aysén (XI)	2010
64	buq chi 22	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 27	Laguna Cofre	Aysén (XI)	2010
53	buq chi 21	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 27	Laguna Cofre	Aysén (XI)	2010
66	sut oli 15	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 27	Laguna Cofre	Aysén (XI)	2010
67	sut oli 18	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 27	Laguna Cofre	Aysén (XI)	2010



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
68	sut oli 14	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 27	Laguna Cofre	Aysén (XI)	2010
69	sut oli 5	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 22	Norte del Lago Las Torres	Aysén (XI)	2010
70	sut oli 11	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 22	Norte del Lago Las Torres	Aysén (XI)	2010
71	sut oli 12	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 22	Al norte del Lago las Torres	Aysén (XI)	2010
73	sut oli 13	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
74	sut oli 3	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
75	sut oli 4	<i>suturalis olivaceus</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
76	buq 2	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
77	buq 1	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
78	buq 3	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
80	buq 4	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
81	dar col 4	<i>darwini coloanei</i>	Loc 21	20 km al norte de Mañihuales	Aysén (XI)	2010
83	chi	<i>chilensis solieri</i>	Loc 24	10 km al norte de Puyuhuapi	Aysén (XI)	2010
2	A1	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 8	Las Trancas, La Unión	Los Ríos (XIV)	2010
84	mag dav	<i>magellanicus davidsoni</i>	Loc 6	Punta Charhuin	Los Lagos (X)	2010
14	A5	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 10	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2010
41	B4	<i>buqueti breunigi</i>	Loc 16	Puauchó	Los Lagos (X)	2010
89	arc 1	<i>archoides</i>	Loc 10	Al oeste de Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2010
148	H7	<i>chilensis jaffrezici</i>	Loc 16	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2011
74	dar var	<i>darwini varians</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
75	dar var 1	<i>darwini varians</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
76	dar var 2	<i>darwini varians</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
77	dar var 3	<i>darwini varians</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
2	mor	<i>morpheus</i>	Loc 10	Al norte de Aleucopí	Los Lagos (X)	2011



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
69	OPO	<i>darwini varians</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
8	B11015	<i>speciosus</i>	Loc 24	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2011
82	A11015	<i>buqueti calvus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
83	A21015	<i>buqueti calvus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
84	A31015	<i>buqueti calvus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
85	A41015	<i>buqueti calvus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
86	A51015	<i>buqueti calvus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
3	sut nig 1	<i>suturalis nigripes</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
8	B61015	<i>buqueti lafquen</i>				2013
65	B111015	<i>buqueti lafquen</i>				2013
80	B81015	<i>speciosus</i>	Loc 28	15 km Al sur de Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
41	B51015	<i>speciosus</i>	Loc 27	6 km Al sur de Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
79	B71015	<i>speciosus</i>	Loc 28	15 km Al sur de Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
26	B31015	<i>speciosus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
25	B21015	<i>speciosus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
40	B41015	<i>speciosus</i>	Loc 27	6 km Al sur de Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
4	mag (4)	<i>magellanicus magellanicus</i>	Loc 4	Al norte del Lago Ranco, Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
13	dar new 2	<i>darwini newtoni</i>	Loc 11	Bahía Mansa	Los Lagos (X)	2011
17	sut nig	<i>suturalis nigripes</i>	Loc 7	10 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2011
20	mag car 1	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 32	Puerto Fuy	Los Lagos (X)	2011
21	gue	<i>guerini</i>	Loc 1	Máfil	Los Lagos (X)	2011
22	buq rel 1	<i>buqueti relictus</i>	Loc 16	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2011
25	spe 3	<i>speciosus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
26	spe 1	<i>speciosus</i>	Loc 26	Lajas Blancas, Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
28	dar hen	<i>darwin heinzi</i>	Loc 15	Huellahue	Los Lagos (X)	2011



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
29	dar hen 1	<i>darwin heinzi</i>	Loc 15	Huellahue	Los Lagos (X)	2011
30	dar hen	<i>darwin heinzi</i>	Loc 15	Huellahue	Los Lagos (X)	2011
31	mag car 2	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 32	Puerto Fuy	Los Lagos (X)	2011
33	dar new 1	<i>darwini newtoni</i>	Loc 11	Bahía Mansa	Los Lagos (X)	2011
34	dar new	<i>darwini newtoni</i>	Loc 11	Bahía Mansa	Los Lagos (X)	2011
35	chi sol 6	<i>chilensis solieri</i>	Loc 31	Puente Murror, Puerto Mont	Los Lagos (X)	2011
36	mag car	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 32	Puerto Fuy	Los Lagos (X)	2011
38	gue 3	<i>guerini</i>	Loc 1	Máfil	Los Lagos (X)	2011
39	gue 1	<i>guerini</i>	Loc 1	Máfil	Los Lagos (X)	2011
40	spe 2	<i>speciosus</i>	Loc 27	6 km Al sur de Ancud, Chiloé	Los Lagos (X)	2011
43	dar	<i>darwini darwini</i>	Loc 21	10 km al este de Fresia	Los Lagos (X)	2011
44	mag spe	<i>magellanicus speciformis</i>	Loc 16	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2011
45	mag spe 1	<i>magellanicus speciformis</i>	Loc 16	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2011
46	mag ort	<i>magellanicus ortrudheinzae</i>	Loc 3	Riñihue	Los Lagos (X)	2011
47	mag ort	<i>magellanicus ortrudheinzae</i>	Loc 3	Riñihue	Los Lagos (X)	2011
1	mag sn 4	<i>magellanicus ssp nueva</i>	Loc 25	A 14 km al noreste del Lago Villarica	Araucanía (IX)	2013
2	mag sim 1	<i>magellanicus similis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
3	mag sim 2	<i>magellanicus similis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
4	mag sim 3	<i>magellanicus similis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
5	mag sim 4	<i>magellanicus similis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
6	mag c v 1	<i>magellanicus carbugensis x varians</i>	Loc 18	A 7 km al noreste de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
7	mag c v 2	<i>magellanicus carbugensis x varians</i>	Loc 18	A 7 km al noreste de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
8	mag c v 3	<i>magellanicus carbugensis x varians</i>	Loc 18	A 7 km al noreste de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
9	mag c v 4	<i>magellanicus carbugensis x varians</i>	Loc 18	A 7 km al noreste de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
10	mag sim 5	<i>magellanicus similis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
11	mag o c 1	<i>magellanicus ortrudheinzae x caburgansis</i>	Loc 22	Al sur del Lago Riñihue, Huidif	Los Ríos (XIV)	2013
13	gue sn 1	<i>guerini ssp nueva</i>	Loc 22	Al sur del Lago Riñihue, Huidif	Los Ríos (XIV)	2013
14	B121015	<i>suturalis nigripes</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
15	mag ssp n 3	<i>magellanicus ssp nueva (fenotipo cercano a reedi)</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
16	mag sn 8	<i>magellanicus ssp nueva (fenotipo cercano a reedi)</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
17	buq chi 23	<i>buqueti chiloenisis</i>	Loc 15	Bosque Quillin, al suroeste del Lago Ranco	Los Ríos (XIV)	2013
20	dar ree 6	<i>darwini reedi</i>	Loc 15	Bosque Quillin, al suroeste del Lago Ranco	Los Ríos (XIV)	2013
21	mag 21	<i>magellanicus ssp nueva</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
22	buq sn 11	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaicho	Los Lagos (X)	2013
23	mor sn 3	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
24	mor pro 3	<i>morpheus prodigious</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
25	mor pro 4	<i>morpheus prodigious</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
26	arc 11	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
27	chi i j 1	<i>chilensis imperialis x jaffrezici</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
29	dar spe 1	<i>darwini speciosiformis</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
30	spe 4	<i>speciosus</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
31	spe 5	<i>speciosus</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
32	dar sn 4	<i>darwini ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
33	dar sn 3	<i>darwini ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
34	34	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
37	arc 12	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
38	arc 13	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
39	buq leo 12	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
40	buq leo 13	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
41	buq c s 1	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
42	buq c s 2	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
43	43	<i>morpheus prodigious</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
44	44	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
46	46	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
47	47	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
50	50	<i>ochsenii</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
54	buq leo 21	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
55	buq leo 16	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
60	60	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
66	66	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
74	dar sol 2	<i>darwini solieri</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
77	dar h n 1	<i>darwini heinzi x newtoni</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
78	dar h n 2	<i>darwini heinzi x newtoni</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
81	dar sol 1	<i>darwini solieri</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
88	buq vio 1	<i>buqueti violaceocrupeus</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
90	buq vio 3	<i>buqueti violaceocrupeus</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
105	dar hei 13	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
106	dar hei 12	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
107	dar hei 11	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
109	mor sn 4	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
110	mor sn 5	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
111	mor sn 6	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
112	112	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
113	mor s n 7	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
114	buq mix 1	<i>buqueti calvus x snizeki x lafquen</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
115	buq mix 5	<i>buqueti calvus x snizeki x lafquen</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
116	buq mix 4	<i>buqueti calvus x snizeki x lafquen</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
117	buq mix 2	<i>buqueti calvus x snizeki x lafquen</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
118	buq mix 3	<i>buqueti calvus x snizeki x lafquen</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
120	arc 15	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
121	arc 16	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
122	arc 14	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
123	mag uga 3	<i>magellanicus ugartei</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
125	125	<i>morpheus prodigious</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	
124	dar sn 5	<i>darwini ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
133	buq bre 2	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
136	buq rel 2	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
137	buq rel 4	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
138	buq rel 3	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
139	buq rel 5	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
140	buq rel 6	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
141	buq rel 7	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
143	buq bre 4	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
144	buq bre 9	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
146	buq bre 8	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
147	buq bre 7	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
148	buq bre 3	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
149	buq bre 5	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
150	buq bre 10	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
151	buq bre 6	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
152	buq laf 3	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
153	buq laf 8	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
154	buq laf 4	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
155	buq laf 9	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
156	buq laf 6	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
157	buq laf 2	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
158	buq laf 11	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
159	buq laf 7	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
160	buq laf 10	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
161	buq laf 5	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
163	163	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
164	164	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
165	165	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
168	168	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
169	169	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
170	170	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
171	171	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
172	172	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
174	174	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
175	175	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
176	176	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
177	177	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
178	178	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
181	181	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
182	182	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
183	183	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
184	184	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
185	185	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
187	187	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
188	188	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
189	189	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
192	buq vio 6	<i>buqueti violaceocrupeus</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
193	buq vio 4	<i>buqueti violaceocrupeus</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
194	buq vio 2	<i>buqueti violaceocrupeus</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
196	chi kra 14	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
197	chi kra 15	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
198	chi kra 9	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
199	chi kra 17	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
200	buq buq	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
201	201	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
202	buq buq 6	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
203	buq buq 9	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
204	buq buq 7	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
206	chi kra 16	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
207	chi kra 8	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
209	209	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
210	210	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
212	212	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
213	213	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
214	214	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
215	buq leo 18	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
218	buq buq 10	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
219	buq buq 8	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
220	arc 17	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
221	buq leo 15	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
222	buq leo 17	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
223	buq leo 11	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
224	buq leo 20	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
225	buq leo 14	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
226	buq leo 19	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
229	chi jaf	<i>chilensis jaffrezici</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
240	mag sn 9	<i>magellanicus ssp nueva (fonotipo cercano a darwini reedi)</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
241	mag sn 5	<i>magellanicus ssp nueva (fonotipo cercano a darwini reedi)</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
242	mag sn 6	<i>magellanicus ssp nueva (fonotipo cercano a darwini reedi)</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
243	mag sn 7	<i>magellanicus ssp nueva (fonotipo cercano a darwini reedi)</i>	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifén	Los Ríos (XIV)	2013
244	244	<i>Buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
245	245	<i>Buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
246	246	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
247	247	<i>buqueti andestud</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
249	249	<i>buqueti andestud</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
250	250	<i>magellanicus carbugensis (trazas de similis)</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
251	251	<i>magellanicus carbugensis</i> (trazas de similis)	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
252	252	<i>magellanicus carbugensis</i> (trazas de similis)	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
254	254	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
001	001	<i>buqueti</i>				
002	002	<i>buqueti</i>				
258	mag sn 1	<i>magellanicus ssp nueva</i> (fenotipo cercano a <i>darwini reedi</i>)	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifen	Los Ríos (XIV)	2013
259	mag sn 2	<i>magellanicus ssp nueva</i> (fenotipo cercano a <i>darwini reedi</i>)	Loc 17	Al este del Lago Ranco, a 5 km de Llifen	Los Ríos (XIV)	2013
260	260	<i>buqueti buqueti</i> (trazas de <i>arieli</i> y <i>breuning</i>)	Loc 22	Al sur del Lago Riñihue, Huidif	Los Ríos (XIV)	2013
261	buq 14	<i>buqueti buqueti</i> (trazas de <i>arieli</i> y <i>breuning</i>)	Loc 22	Al sur del Lago Riñihue, Huidif	Los Ríos (XIV)	2013
262	chi kra 14	<i>chilensis kratzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
263	buq 10	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
264	buq 11/264	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
265	265	<i>chilensis kratzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
268	chi 2	<i>chilensis villarensis x gloriosus</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
270	buq 22	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
271	buq 23	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
272	buq 18	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
273	buq 24	<i>buqueti cherquencoensis x subnites</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
274	mag uga 5	<i>magellanicus ugartei</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013

Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
275	mag uga 6	<i>magellanicus ugartei</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
276	dar sn 1	<i>darwini ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
278	buq 28	<i>buqueti andestud</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
278	buq 29	<i>buqueti andestud</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
280	buq 27	<i>buqueti andestud</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
281	buq 30	<i>buqueti andestud</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
282	sut 1	<i>suturalis ancudanus x puxel</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
283	283	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
284	284	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
285	buq 43	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
286	buq 36	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
287	dar 2	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
288	dar 1	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
289	buq 40	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
290	buq 45	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
291	buq 44	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
292	buq 37	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
293	dar hei 1	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
294	buq 42	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
295	dar hei 7	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puauchó	Los Lagos (X)	2013
296	buq 46	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
297	buq 38	<i>buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
298	298	<i>Chilensis jaffrezici</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
299	dar hei 6	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
300	buq 39	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
301	buq 41	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
302	dar hei 3	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
303	303	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
304	304	<i>chilensis jaffrezici</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
305	dar hei 8	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
306	dar hei 4	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
307	dar hei 10	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
308	dar hei 2	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
309	dar hei 5	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
310	310	<i>chilensis kratzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
311	buq bre 2	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puaucho	Los Lagos (X)	2013
312	buq leo 7	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
313	buq leo 5	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
314	buq leo 10	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
315	buq leo 1	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
316	buq sn 9	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaucho	Los Lagos (X)	2013
317	buq sn 8	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaucho	Los Lagos (X)	2013
318	buq sn 6	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaucho	Los Lagos (X)	2013
319	mor sn 1	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
320	mor sn 2	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
322	buq 25	<i>buqueti andestus</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucania (IX)	2013
323	buq 26	<i>buqueti andestus</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucania (IX)	2013
324	buq 31	<i>buqueti andestus</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucania (IX)	2013
325	buq laf 1	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
326	326	<i>buqueti lafquen</i>	Loc 3	Playa al norte de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
327	chi 3	<i>Chilensis jafrezici</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
328	buq rel 2	<i>buqueti relictus</i>	Loc 5	20 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
329	329	<i>chilensis kraatzianus</i>	Región X			2013
330	buq 5	<i>Buqueti chiloensis</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
331	331	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puaicho	Los Lagos (X)	2013
332	332	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaicho	Los Lagos (X)	2013
333	buq bre 1	<i>buqueti breuningi</i>	Loc 6	Puaicho	Los Lagos (X)	2013
335	dar hei 9	<i>darwini heinzi</i>	Loc 6	Puaicho	Los Lagos (X)	2013
337	buq reg 2	<i>buqueti regalis</i>	Loc 7	Al norte de Pucatrihue	Los Lagos (X)	2013
338	buq reg 1	<i>buqueti regalis</i>	Loc 7	Al norte de Pucatrihue	Los Lagos (X)	2013
339	dar mix 4	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaicho	Los Lagos (X)	2013
340	dar mix 2	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaicho	Los Lagos (X)	2013
341	buq sn 10	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaicho	Los Lagos (X)	2013
342	buq sn 5	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 8	12 km al suroeste de Puaicho	Los Lagos (X)	2013
343	dar sn 2	<i>darwini ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
344	mor 2	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
345	mor 1	<i>morpheus ssp nueva</i>	Loc 10	500 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
346	mag car 6	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 23			2013
347	mag uga 4	<i>magellanicus ugartei</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
348	chi kra 4	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
349	chi kra 5	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
350	buq buq 4	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
351	buq vio 5	<i>buqueti violaceocupreus</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
353	353	<i>darwini heinzi x newtoni</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
354	chi kra 7	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
355	chi kra 5	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
356	buq buq 5	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
357	buq and 3	<i>buqueti andestu</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
358	buq and 4	<i>buqueti andestu</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
360	mag car 7	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
361	mag car 8	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
363	mag car 5	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
364	mag car 4	<i>magellanicus carbugensis</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
365	chi kra 2	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
366	chi kra 13	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
367	chi kra 12	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
370	chi kra 10	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
371	chi kra 11	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
378	dar hei 1	<i>darwini heinzi</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
393	dar mix 1	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
394	dar mix 3	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
395	dar mix 6	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
396	dar ree 2	<i>darwini reedi</i>	Loc 14	20 km al oeste del Lago Ranco, al sur del Río Bueno	Los Ríos (XIV)	2013
398	dar ree 3	<i>darwini reedi (transición con magellanicus)</i>	Loc 15	Bosque Quillin, al suroeste del Lago Ranco	Los Ríos (XIV)	2013
399	buq sol 1	<i>buqueti solieri</i>	Loc 14	20 km al oeste del Lago Ranco, al sur del Río Bueno	Los Ríos (XIV)	2013
405	chi kra 3	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
406	buq and 2	<i>buqueti andestus</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
407	buq and 1	<i>buqueti andestus</i>	Loc 23	Reserva Nacional Villarica, Sato de Huilo-Huilo	Araucanía (IX)	2013
410	buq sn 7	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
411	mor pro 1	<i>morpheus prodigious</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
412	mor pro 2	<i>morpheus prodigious</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
413	dar mix 5	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
414	dar mix 6	<i>darwini heinzi x ssp nueva</i>	Loc 9	300 m al oeste de la loc 8	Los Lagos (X)	2013
416	dar ree 4	<i>darwini reedi</i>	Loc 14	20 km al oeste del Lago Ranco, al sur del Río Bueno	Los Ríos (XIV)	2013
417	dar ree 1	<i>darwini reedi (transición con mag)</i>	Loc 14	20 km al oeste del Lago Ranco, al sur del Río Bueno	Los Ríos (XIV)	2013
418	dar ree 5	<i>darwini reedi</i>	Loc 15	Bosque Quillin, al suroeste del Lago Ranco	Los Ríos (XIV)	2013
419	buq sol 2	<i>buqueti solieri</i>	Loc 15	Bosque Quillin, al suroeste del Lago Ranco	Los Ríos (XIV)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
420	420	<i>buqueti subnites x cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
425	425	<i>buqueti subnites x cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
426	chi glo 1	<i>chilensis gloriosus</i>	Loc 25	A 14 km al noreste del Lago Villarica	Araucanía (IX)	2013
427	och 1	<i>ochsenii</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
428	och 2	<i>ochsenii</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
430	chi kra 6	<i>chilensis kraatzianus</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
432	buq buq 2	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
433	buq buq 3	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
434	buq leo 9	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
435	arc 10	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
436	arc 4	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
437	buq leo 4	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
438	arc 11	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
439	arc 5	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
440	arc 6	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
441	arc 7	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
442	arc 12	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
443	buq leo 2	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
445	buq leo 3	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
458	arc 8	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
459	arc 9	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
460	arc 3	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
461	arc 2	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
462	arc	<i>archoides</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
463	buq leo 8	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
464	buq leo 22	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
466	buq leo 6	<i>buqueti leopardalinus</i>	Loc 12	Oeste del Alerce Costero, 10 km al este de Hueicolla	Los Ríos (XIV)	2013
474	mag 1	<i>magellanicus varians</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
475	buq 35	<i>buqueti ssp desconocida</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	
476	buq 15	<i>buqueti ssp desconocida</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
478	buq sn 2	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 21	Al sureste del Lago Riñihue	Los Ríos (XIV)	2013
479	buq sn 3	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 21	Al sureste del Lago Riñihue	Los Ríos (XIV)	2013
480	buq 17	<i>buqueti subnites cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
481	buq 32	<i>buqueti subnites cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
482	buq 20	<i>buqueti subnites cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
483	buq 19	<i>buqueti subnites cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
484	buq 21	<i>buqueti subnites cherquencoensis</i>	Loc 24	Al sur del Volcán Villarica	Araucanía (IX)	2013
485	buq 34	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
486	buq 6	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013



Código de muestreo	Código árbol	Especie / Subespecie	Código localidad	Localidad	Región	Fecha
487	buq 7	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
488	buq 16	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
489	buq 33	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
491	buq 8	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
492	buq 9	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
493	buq 12	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
494	buq 13	<i>buqueti buqueti</i>	Loc 13	Las Trancas, al este de la Unión	Los Ríos (XIV)	2013
496	mag 4	<i>magellanicus varians</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
497	mag 2	<i>magellanicus varians</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
498	mag 3	<i>magellanicus varians</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
499	A71015	<i>suturalis nigripes</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
500	sut 2	<i>suturalis nigripes</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
504	504	<i>magellanicus ssp desconocida</i>	Loc 20	A 20 km al oeste de Furono	Los Ríos (XIV)	2013
507	buq sn 1	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 21	Al sureste del Lago Riñihue	Los Ríos (XIV)	2013
508	buq sn 4	<i>buqueti ssp nueva</i>	Loc 21	Al sureste del Lago Riñihue	Los Ríos (XIV)	2013
509	A121015	<i>ochsenii</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
510	A81015	<i>suturalis nigripes</i>	Loc 19	A 7 km al oeste de Futrono	Los Ríos (XIV)	2013
511	A111015	<i>ochsenii</i>	Loc 11	Alerce Costero	Los Ríos (XIV)	2013
512	A61015	<i>suturalis ancudanus x puxel</i>	Loc 1	Puente Murror, Puerto Montt	Los Lagos (X)	2013
513	H12N	<i>darwini heinzi x newtoni</i>	Loc 4	15 km al oeste de Hueyusca	Los Lagos (X)	2013
514	B91015	<i>speciosus</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013
515	B101015	<i>speciosus</i>	Loc 2	Al sur de Punta Estaquilla	Los Lagos (X)	2013



Figura 23: Mapa del sur de Chile, indicando la localización de las regiones en las que se recolectaron ejemplares de *Ceroglossus* a lo largo de los diferentes muestreos.



Figura 24: Procedimiento de captura, mostrando la excavación de las trampas de caída (arriba) y las trampas en el momento de la recolección (abajo), con ejemplares de *Ceroglossus*.



2 - Procesamiento de las muestras para el estudio molecular

La extracción del ADN se ha realizado con el kit de extracción de ADN Invisorb-Spin Tissue Mini Kit. Se seccionó una pata del segundo par de cada ejemplar, a partir de la cual se extrajo el ADN siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante del kit de extracción. Para comprobar que la extracción fue adecuada se realizó la espectrofotometría de 1µl de cada muestra en el espectrofotómetro NanoDrop 1000.

A partir de cada extracción, se amplificaron dos fragmentos de ADN mediante PCR: un fragmento del gen de la cadena 5 de la NADH-ubiquinona oxidoreductasa mitocondrial (ND5) y un fragmento del espaciador transcrito interno (ITS1) (Tabla 2).

La amplificación se realizó siguiendo los programas detallados en la Tabla 3.

Tabla 2: Lista de primers utilizados en este trabajo.

Fragmento	Primer	Secuencia	Referencia
ND5	V1.06-1	CCTGTTTCTGCTTTAGTTCA	Su et al. (1996a)
	A0.3	ATATTCATTTCAACCTTGATC	
ITS1	5p8sB1	ATGTGCGTTCRAAATGTTCGATGTTCA	Ji et al. (2003)
	18sfl	TACACACCGCCCGTCGCTACTA	

Tabla 3: Programas de PCR empleados para la amplificación de los fragmentos.

	ND5	ITS1
Desnaturalización inicial	94°C, 5 min	94°C, 5 min
Número de ciclos	50	50
▪ Desnaturalización	94°C, 1 min	94°C, 1 min
▪ Anillamiento	50°C, 1 min	57°C, 1 min 40 seg
▪ Extensión	72°C, 2 min	72°C, 2 min
Extensión final	72°C, 10 min	72°C, 1 min

Se comprobó el éxito de las reacciones de PCR corriendo parte del producto en un gel de agarosa al 1,5%. Posteriormente, los productos de PCR fueron purificados mediante el protocolo estándar con isopropanol y acetato de amonio, y posteriormente

resuspendidos en agua destilada. Esta suspensión fue enviada a secuenciar a MacroGen (Amsterdam/Seúl) o Secugen.



3 - Edición de las secuencias

Las secuencias de cada fragmento fueron manualmente editadas en Geneious (Kearse et al., 2012) para corregir posibles errores y recortar los extremos de baja calidad. Posteriormente, fueron alineadas en el mismo programa usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004), junto con las secuencias descargadas de la base de datos GenBank, procedentes del trabajo de Okamoto et al. (2001) (Tabla 4).

Las matrices fueron exportadas en formato NEXUS para realizar el análisis filogenético y se colapsaron en haplotipos. Previamente al análisis, se cargaron en el programa jModelTest (Darriba et al., 2012) para establecer el modelo de sustitución nucleotídica más apropiado.

Tabla 4: Lista de secuencias extraídas de GenBank, procedentes del trabajo de Okamoto et al. (2001).

Código	Especie / Subespecie	Código Okamoto	Referencia GenBank	Localidad	Región
buq chi 14	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 31	AB057640	Tortel, Vagabundos	Aysén (XI)
buq chi 13	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 30	AB057639	Río Cajón, Puente Ovejas	Aysén (XI)
buq mag 3	<i>buqueti magdalenaensis</i>	BUQ 29	AB057638	Puerto Aysén, Viviana	Aysén (XI)
buq chi 12	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 28	AB057637	Villa Amengual	Aysén (XI)
buq mag 2	<i>buqueti magdalenaensis</i>	BUQ 27	AB057636	Puerto Cisnes, Mirador	Aysén (XI)
buq mag 1	<i>buqueti magdalenaensis</i>	BUQ 26	AB057635	Magdalena Is., Seno Magdalena	Magallanes (XII)
buq chi 11	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 24	AB057634	Quellon, Cailinis	Los Lagos (X)
buq chi 10	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 23	AB057633	Isla Chiloe, Coinco	Los Lagos (X)
buq chi 9	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 21	AB057632	Isla Chiloe, Lago Tepuhuico	Los Lagos (X)
buq chi 8	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 20	AB057631	Isla Chiloe, Lago Huillinco	Los Lagos (X)
buq chi 7	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 19	AB057630	Quinchao Is., Achao	Los Lagos (X)
buq chi 6	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 18	AB057629	Isla Chiloe, Butalcura	Los Lagos (X)



Código	Especie / Subespecie	Código Okamoto	Referencia GenBank	Localidad	Región
buq syb	<i>buqueti sybarita</i>	BUQ 17	AB057628	Isla Chiloe, Degan	Los Lagos (X)
buq cal	<i>buqueti calvus</i>	BUQ 15	AB057627	Isla Chiloe, Ancud	Los Lagos (X)
buq chi 5	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 14	AB057626	Isla Chiloe, El Quilar	Los Lagos (X)
buq chi 4	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 13	AB057625	Hornopiren, Río Negro	Los Lagos (X)
buq chi 3	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 12	AB057624	Puerto Montt, Chamiza	Los Lagos (X)
buq chi 2	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 11	AB057623	Lago Chapo, Correntoso	Los Lagos (X)
buq chi 1	<i>buqueti chiloensis</i>	BUQ 10	AB057622	Puerto Varas, Río Negro	Los Lagos (X)
buq buq	<i>buqueti buqueti</i>	BUQ 9	AB057621	La Unión, Las Trancas	Los Ríos (XIV)
buq arr 2	<i>buqueti arriagadi</i>	BUQ 8	AB057620	Máfil, Sur Máfil	Los Ríos (XIV)
buq arr 1	<i>buqueti arriagadi</i>	BUQ 7	AB057619	Mehuín	Los Ríos (XIV)
buq che	<i>buqueti cherquencoensis</i>	BUQ 6	AB057618	Pucón, Mt., Villarica	Araucanía (IX)
buq and	<i>buqueti andestus</i>	BUQ 4	AB057617	Lago Carburgua	Araucanía (IX)
chi mer 2	<i>chilensis meridionalis</i>	CHI 32	AB057587	Villa O´Higgins, Lago Ciervo	Araucanía (IX)
chi mer 1	<i>chilensis meridionalis</i>	CHI 31	AB057586	Tortel, Vagabundos	Aysén (XI)
chi kei	<i>chilensis keithi</i>	CHI 27	AB057585	Puerto Cisnes, Mirador	Aysén (XI)
chi sol 5	<i>chilensis solieri</i>	CHI 22	AB057584	Isla Chiloe, Compu	
chi sol 4	<i>chilensis solieri</i>	CHI 21	AB057583	Isla Chiloe, Lago Tepuhuico	Los Lagos (X)
chi sol 3	<i>chilensis solieri</i>	CH 16	AB057582	Isla Chiloe, Pontra	Los Lagos (X)
chi sol 2	<i>chilensis solieri</i>	CHI 15	AB057581	Isla Chiloe, Ancud	Los Lagos (X)
chi sol 1	<i>chilensis solieri</i>	CHI 8	AB057580	Máfil, Sur Máfil	Los Ríos (XIV)



Código	Especie / Subespecie	Código Okamoto	Referencia GenBank	Localidad	Región
chi vil	<i>chilensis villaricensis</i>	CHI 6	AB057579	Pucón, Mt., Villarica	Araucanía (IX)
chi glo	<i>chilensis gloriosus</i>	CHI 5	AB057578	Pucón, Meirenehue	Araucanía (IX)
chi cya	<i>chilensis cyanicollis</i>	CHI 3	AB057577	Antaco, El Chacay	Bío-Bío (VIII)
chi fal 2	<i>chilensis fallaciosus</i>	CHI 2	AB057576	Concepción, Roa	Bío-Bío (VIII)
chi fal 1	<i>chilensis fallaciosus</i>	CHI 1	AB057575	Tome, Nachur	Bío-Bío (VIII)
dar pat 2	<i>darwini patagoniensis</i>	DAR 31	AB057574	Tortel, Vagabundos	Aysén (XI)
dar pat 1	<i>darwini patagoniensis</i>	DAR 29	AB057573	Puerto Aisén, Viviana	Aysén (XI)
dar col 3	<i>darwini coloanei</i>	DAR 28	AB057572	Villa Amengual	Aysén (XI)
dar col 2	<i>darwini coloanei</i>	DAR 27	AB057571	Puerto Cisnes, Mirador	Aysén (XI)
dar col 1	<i>darwini coloanei</i>	DAR 26	AB057570	Río Cajón, Puente Ovejas	Aysén (XI)
dar dar 8	<i>darwini darwini</i>	DAR 25	AB057569	Chaitén	Los Lagos (X)
dar dar 7	<i>darwini darwini</i>	DAR 24	AB057568	Quellon, Cailín Is.	Los Lagos (X)
dar dar 6	<i>darwini darwini</i>	DAR 23	AB057567	Isla Chiloe, Coinco	Los Lagos (X)
dar dar 5	<i>darwini darwini</i>	DAR 20	AB057566	Isla Chiloe, Lago Huilincó	Los Lagos (X)
dar dar 4	<i>darwini darwini</i>	DAR 19	AB057565	Isla Quinchao, Acaho	Los Lagos (X)
dar dar 3	<i>darwini darwini</i>	DAR 16	AB057564	Isla Chiloe, Puntra	Los Lagos (X)
dar dar 2	<i>darwini darwini</i>	DAR 13	AB057563	Hornopirén, Río Negro	Los Lagos (X)
dar dar 1	<i>darwini darwini</i>	DAR 12	AB057562	Puerto Montt, Chamiza	Los Lagos (X)
sut o-s 2	<i>suturalis olivaceus trans ad suturalis</i>	SUT 32	AB057561	Villa O' Higgins, Lago Ciervo	Araucanía (IX)
sut o-s 1	<i>suturalis olivaceus trans ad suturalis</i>	SUT 31	AB057560	Tortel, Vagabundos	Aysén (XI)
sut oli 7	<i>suturalis olivaceus</i>	SUT 30	AB057559	Río Cajón, Puente Ovejas	Aysén (XI)
sut oli 2	<i>suturalis olivaceus</i>	SUT 23	AB057558	Isla Chiloe, Coinco	Los Lagos (X)

Código	Especie / Subespecie	Código Okamoto	Referencia GenBank	Localidad	Región
sut oli 1	<i>suturalis olivaceus</i>	SUT 21	AB057557	Isla Chiloe, Lago Tepuhuico	Los Lagos (X)
sut anc	<i>suturalis ancudanus</i>	SUT 15	AB057556	Isla Chiloe, Ancud	Los Lagos (X)
sut pux	<i>suturalis puxel</i>	SUT 13	AB057555	Hornopirén, Río Negro	Los Lagos (X)
spe	<i>speciosus</i>	SPE 15	AB057554	Isla Chiloe, Ancud	Los Lagos (X)
mag uga	<i>darwini ugartei</i>	MAG 9	AB057553	La Unión, Las Trancas	Los Ríos (XIV)
mag car	<i>magellanicus candens</i>	MAG 8	AB057552	Máfil, Sur Máfil	Los Ríos (XIV)
mag mag	<i>magellanicus magellanicus</i>	MAG 7	AB057551	Mehuín	Los Ríos (XIV)
mag c-s	<i>magellanicus caburguansis trans as similis</i>	MAG 5	AB057550	Pucón, Meirenehue	Araucanía (IX)
mag car 3	<i>magellanicus carbuganis</i>	MAG 4	AB057549	Lago Caburgua	Araucanía (IX)



4 - Análisis filogenético

Los análisis filogenéticos fueron llevados a cabo en BEAST (Drummond et al., 2012), uno para cada fragmento. Para ello, las matrices fueron introducidas en BEAUTi. Para el análisis del ND5 se realizaron análisis independientes con dos priors para el árbol (el modelo de especiación de Yule y un modelo coalescente con tamaño poblacional constante), y diversos modelos de reloj molecular. Para el ND5, el reloj estuvo basado en las tasas medias calculadas por Pons et al. (2010) para coleópteros, probando tres modelos distintos: reloj con tasa fija, con distribución uniforme y con distribución normal. En todos los casos, se probó un reloj estricto y uno relajado. Para el ITS1 se realizaron análisis con reloj estricto y relajado, sin establecer una tasa de sustitución ya que ésta es desconocida para este grupo; y con los modelos de Yule y coalescente para el árbol.

Los análisis corrieron durante 50 millones de generaciones, muestreando un árbol cada 5000 pasos. Una vez concluidos los análisis, se cargaron en TRACER (Rambaut y Drummond, disponible en <http://beast.bio.ed.ac.uk>), donde se comprobó que los análisis hubieran alcanzado la estacionariedad, y se evaluó mediante factores de Bayes qué combinación de modelos de reloj y árbol había sido la más adecuada para cada uno de los fragmentos.

Finalmente, los dos árboles correspondientes a los dos fragmentos fueron obtenidos en TREEANNOTATOR (distribuido con BEAST), donde se aplicó un burn-in eliminando los primeros 1000 árboles. Adicionalmente, se construyeron filorredes usando el programa SplitsTree (Huson y Bryant, 2005) con los parámetros por defecto.

Los árboles resultantes fueron usados para realizar delimitación de especies mediante los algoritmos GMYC (Pons et al., 2006; Fujisawa et al., 2013) y PTP (Zhang et al., 2013). En el primer caso, se utilizó un script personalizado (Apéndice) basándose en las modificaciones de Powell et al (2012), creado a partir de un script cedido por Paula Arribas. Para el PTP se utilizó el programa distribuido por los autores, en su variante con cadenas de Markov Monte Carlo (bPTP).

Las redes filogeográficas fueron construidas para cada uno de los 5 grupos principales mediante el programa POPART (disponible en <http://popart.otago.ac.nz>) usando el algoritmo Median Joining y el valor por defecto del parámetro epsilon. Los haplotipos se colorearon en base a la identificación morfológica realizada en el momento de la captura y en base a la región geográfica.

Los árboles y las redes haplotípicas fueron editadas posteriormente con el software InkScape (disponible en <http://inkscape.org>), plasmando sobre ellos la información obtenida de los métodos de delimitación de especies.



5 - Análisis de morfométrica geometría

El análisis de morfometría geométrica, que considera la variación atribuible exclusivamente a la forma, se realizó utilizando registros fotográficos de individuos de los cinco grandes grupos de especies obtenidos en la filogenia. Se incluyeron tres ejemplares hembras, para evitar variación por dimorfismo sexual, de cada grupo.

1. Del grupo de *C. darwini* se incluyeron ejemplares identificados como *C. archoides* y *C. darwini heinzi* (esta última únicamente para la vista ventral).
2. Del grupo de *C. magellanicus* se incluyeron ejemplares identificados como *C. magellanicus caburgensis*.
3. Del grupo de *C. chilensis* se incluyeron ejemplares identificados como *C. chilensis kraatzianus*.
4. Del grupo de *C. buqueti* se incluyeron ejemplares identificados como *C. buqueti chiloensis*.
5. Del grupo de *C. suturalis* se incluyeron ejemplares identificados como *C. morpheus*.

Se tomaron fotografías de las vistas dorsales y ventrales con una cámara digital Spot Insight Firewire modelo 18.2 color mosaic de Diagnostic Instruments, usando el programa SPOT Advance (Diagnostic instrument 1997-2006) para guardar cada imagen con información de la escala utilizada, añadiendo una barra milimétrica de 7 mm. Se construyó una matriz de fotografías para cada vista utilizando el programa TpsUtil 1.74 (Rohlf, 2017a). Para la digitalización de los *landmarks* se utilizó el programa TpsDig 2.30 (Rohlf, 2017b).

- **17LM:** Sobre la vista ventral se utilizaron los *landmarks* establecidos por Benitez et al. (2010), excepto los ubicados en la cabeza (por problemas de alineación con el resto del insecto) e incluyendo una cierta variación de *landmarks* (Figura 25). En este caso se utilizaron más de tres individuos por especie.
- **4LM:** Cuatro *landmarks* en el élitro: se utilizaron los puntos de corte de la línea que sigue la sutura, y los puntos de corte de la línea perpendicular a ésta que pasa por su punto medio (Figura 26).



- **6LM:** Seis *landmarks* en el élitro: al anterior se le añaden los puntos de corte de la línea perpendicular a la sutura que pasa por el punto de máxima anchura de los élitros (Figura 27).
- **10LM:** Diez *landmarks* en el pronoto: se utilizaron los puntos de corte de la línea que divide al pronoto en dos por el punto medio, los puntos de corte de la línea que divide al pronoto por el punto más amplio, y los puntos situados en las cuatro esquinas del mismo (Figura 28).
- **11LM:** Once *landmarks* correspondientes a los anteriores exceptuando a la línea de anchura máxima e incluyendo los puntos de cambio de curvatura del borde posterior (Figura 29).
- **11LM+A:** Idéntica a la anterior, incluyendo los puntos de corte de las líneas que pasan por el centro del pronoto en ángulos 135° y 225° (considerando que el ángulo 0° está dirigido hacia el lateral izquierdo del individuo, y girando en sentido antihorario) (Figura 30).
- **P+E:** Usando una combinación de *landmarks* de la parte dorsal del pronoto y de los élitros (Figura 31).

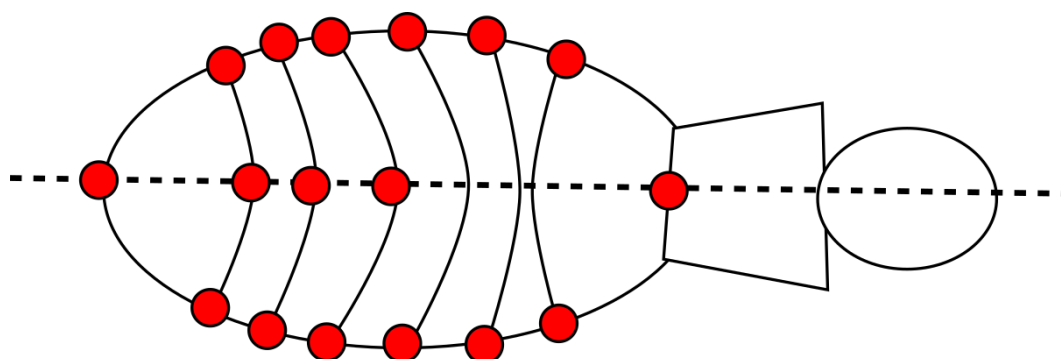


Figura 25: *Landmarks* diseñados para la vista ventral del abdomen del individuo (17LM).

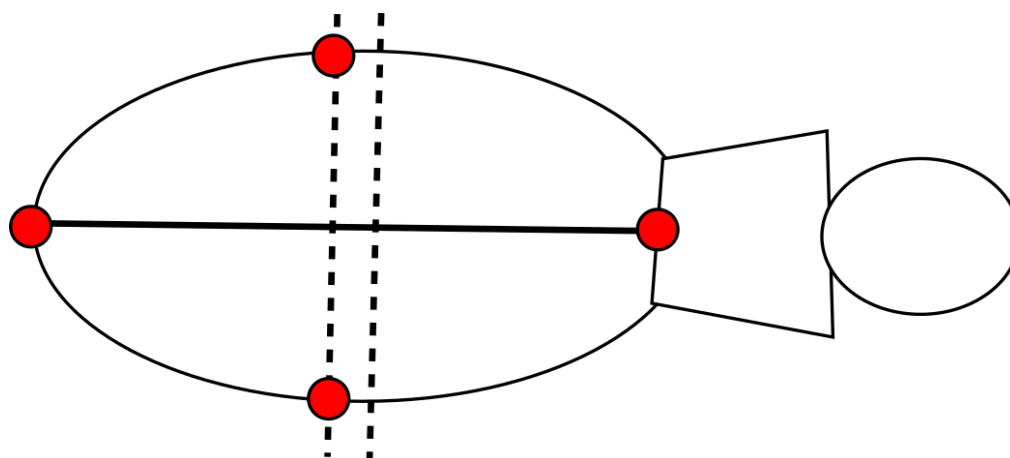


Figura 26: *Landmarks* diseñados para la vista dorsal de los élitros 4LM.

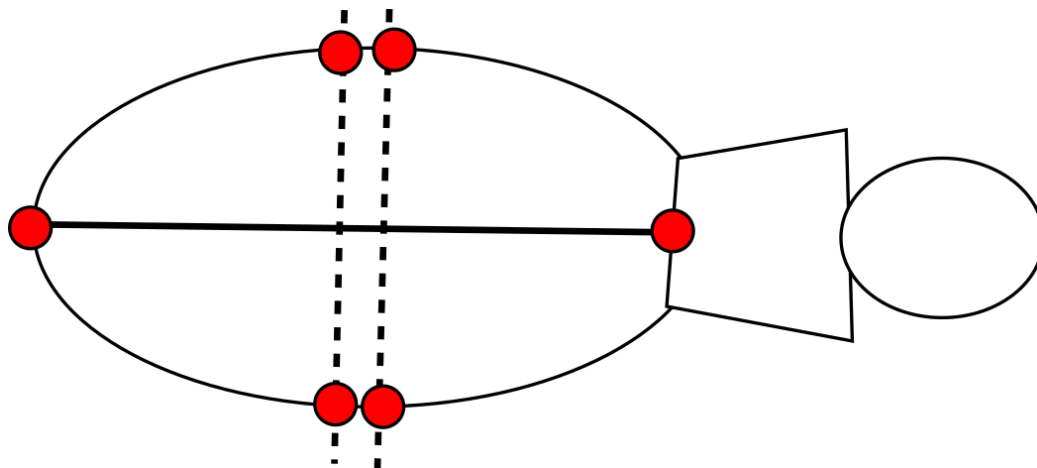


Figura 27: *Landmarks* diseñados para la vista dorsal de los élitros 6LM.

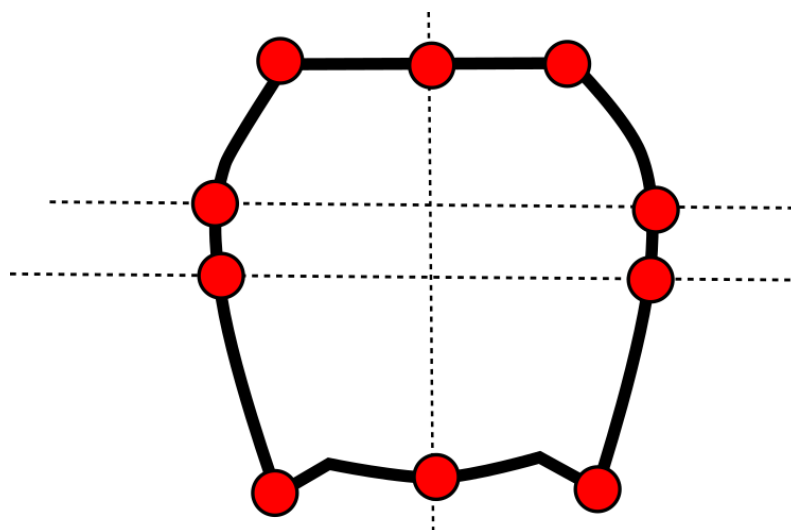


Figura 28: *Landmarks* diseñados para la vista dorsal del pronoto 10LM.

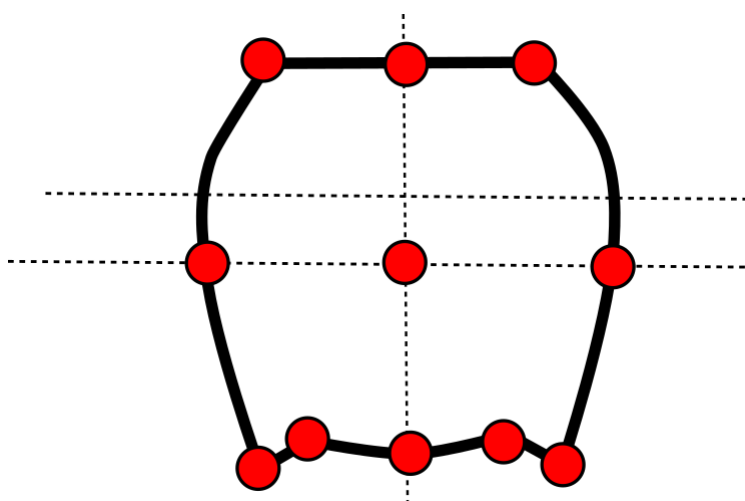


Figura 29: *Landmarks* diseñados para la vista dorsal del pronoto 11LM.

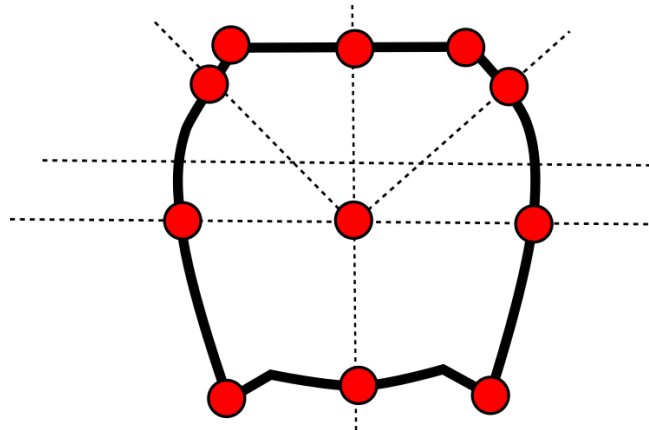


Figura 30: *Landmarks* diseñados para la vista dorsal del pronoto IILM+A.

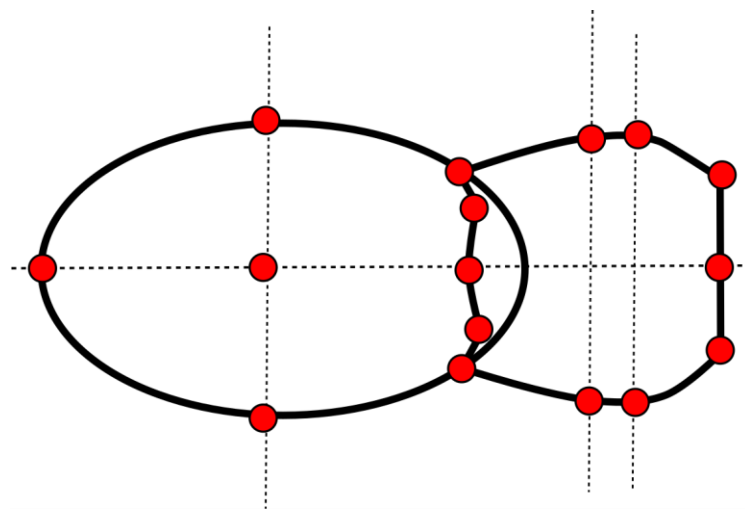


Figura 31: *Landmarks* diseñados para la combinación de las vistas dorsales del pronoto y los élitros (P+E).

Se importó el archivo generado por TpsDig en el programa MORPHOJ (Klingenberg et al., 2011). En primer lugar, se editaron los clasificadores para identificar las especies. Entonces, las coordenadas X e Y de los *landmarks* homólogos fueron alineadas y superpuestas con el método de mínimos cuadrados medios basado en el análisis de procrustes generalizado (GPA) (Rohlf y Slice, 1990), con el fin de eliminar variación no relacionada con la forma (por ejemplo, rotación, traducción y escala).

Seguidamente, se creó una matriz de covarianza y se realizó el análisis de componentes principales (PCA), coloreando los puntos según la identificación taxonómica. Se dibujaron elípticas sobre el gráfico para determinar el agrupamiento. También se creó el plano de variación de los *landmarks*, superponiendo los diferentes puntos para determinar su variación.

Además, se realizó un análisis de la varianza canónica (CVA), categorizando según las especies, sobre la cual se realizaron los mismos análisis que para el PCA.



RESULTADOS





1 - Análisis filogenético

Se obtuvieron secuencias del ND5 de 510 individuos, cada una de ellas de 703 pares de bases de longitud, correspondientes a un total de 320 haplotipos. En el caso del ITS1 la longitud varió de un ejemplar a otro, dando una longitud total del alineamiento de 1450 pares de bases; no obstante, esto incluyó una inserción de 400 nucleótidos únicamente presente en unas pocas muestras. En ambos casos, el modelo de sustitución nucleotídica más apropiado fue el GTR+I+G.

Sorprendentemente, al realizar el alineamiento, se comprobó que las secuencias de ITS1 no correspondían con las de los outgroups obtenidas de las bases de datos. Una búsqueda de BLAST reveló que, aunque estas secuencias poseen algunas porciones con cierta similaridad al ITS1 de otros organismos, realmente no corresponden a este fragmento. Sin embargo, se comprobó así mismo que este “pseudo-ITS” posee señal filogenética y, por lo tanto, se procedió a realizar los correspondientes análisis. Con el fin de evitar confusiones, a lo largo de este texto se le seguirá denominando ITS1.

La comparación mediante factores de Bayes mostró que el mejor análisis para el ND5 fue el realizado con un reloj relajado con tasa fija y un prior de árbol siguiendo el modelo coalescente con tamaño poblacional constante (Tabla 5). Por otro lado, el mejor análisis con el ITS1 fue el realizado con el prior de árbol siguiendo el modelo de Yule y el reloj relajado (Tabla 6). Sin embargo, la topología producida no tenía sentido, por lo que fue descartado y, en su lugar, tomamos el árbol producido con el modelo coalescente con tamaño poblacional constante. La diferencia de verosimilitud con respecto al modelo más apropiado no es significativa, y la topología es coherente con la clasificación morfológica y los resultados obtenidos para el otro fragmento.

Tanto en el árbol obtenido para el fragmento ND5 (Figura 32) como para el ITS1 (Figura 33), las muestras se agrupan en cinco clados monofiléticos, correspondientes a grandes rasgos a cinco especies basadas en la morfología: *C. darwini*, *C. magellanicus*, *C. suturalis*, *C. buqueti* y *C. chilensis*.

C. darwini y *C. magellanicus* se muestran como especies hermanas, formando un clado hermano de las otras tres especies. Dentro de este otro clado, las relaciones varían según el fragmento analizado: en el árbol obtenido con el ITS1, *C. chilensis* es hermana el clado compuesto por *C. buqueti* y *C. suturalis*; mientras que en el árbol del ND5 *C. suturalis* es hermana de *C. chilensis* + *C. buqueti*.



Tabla 5: Comparación de modelos mediante verosimilitud marginal (desviación estándar calculada de las réplicas de bootstrap) para los análisis con el fragmento del ND5. Se muestran las diferencias entre verosimilitudes marginales (específicamente, logaritmo de los Factores de Bayes). Los valores positivos indican un mayor ajuste relativo del modelo mostrado en esa fila comparado con el modelo de esa columna. RELf: reloj relajado con tasa fija. RELn: reloj relajado con distribución normal. RELu: reloj relajado con distribución uniforme. STRf: reloj estricto con tasa fija. STRn: reloj estricto con distribución normal. STRu: reloj estricto con tasa uniforme. YULE: modelo de Yule. COAL: modelo coalescente con tamaño poblacional constante.

Trace	RELf COAL	RELf YULE	RELn COAL	RELn YULE	RELu COAL	RELu YULE	STRf COAL	STRf YULE	STRn COAL	STRn YULE	STRu COAL	STRu YULE
RELf COAL	-	76.792	-14.146	69.435	-9.408	68.705	-88.52	79.077	-50.823	67.066	-85.491	90.44
RELf YULE	-76.792	-	-90.938	-7.357	-86.2	-8.088	-165.312	2.284	-127.616	-9.726	-162.283	13.648
RELn COAL	14.146	90.938	-	83.581	4.738	82.851	-74.374	93.222	-36.678	81.212	-71.345	104.586
RELn YULE	-69.435	7.357	-83.581	-	-78.843	-0.73	-157.955	9.642	-120.259	-2.369	-154.926	21.005
RELu COAL	9.408	86.2	-4.738	78.843	-	78.113	-79.112	88.484	-41.416	76.474	-76.083	99.848
RELu YULE	-68.705	8.088	-82.851	0.73	-78.113	-	-157.224	10.372	-119.528	-1.639	-154.195	21.736
STRf COAL	88.52	165.312	74.374	157.955	79.112	157.224	-	167.596	37.696	155.586	3.029	178.96
STRf YULE	-79.077	-2.284	-93.222	-9.642	-88.484	-10.372	-167.596	-	-129.9	-12.011	-164.567	11.364
STRn COAL	50.823	127.616	36.678	120.259	41.416	119.528	-37.696	129.9	-	117.89	-34.667	141.264
STRn YULE	-67.066	9.726	-81.212	2.369	-76.474	1.639	-155.586	12.011	-117.89	-	-152.557	23.374
STRu COAL	85.491	162.283	71.345	154.926	76.083	154.195	-3.029	164.567	34.667	152.557	-	175.931
STRu YULE	-90.44	-13.648	-104.586	-21.005	-99.848	-21.736	-178.96	-11.364	-141.264	-23.374	-175.931	-

Tabla 6: Comparación de modelos mediante verosimilitud marginal (desviación estándar calculada de las réplicas de bootstrap) para los análisis con el fragmento del ITS1. Se muestran las diferencias entre verosimilitudes marginales (específicamente, logaritmo de los Factores de Bayes). Los valores positivos indican un mayor ajuste relativo del modelo mostrado en esa fila comparado con el modelo de esa columna. REL: reloj relajado. STR: reloj estricto. YULE: modelo de Yule. COAL: modelo coalescente con tamaño poblacional constante.

Trace	ln P(data model)	S.E.	REL COAL	REL YULE	STR COAL	STR YULE
REL COAL	-6925.764	+/-0.177	-	-7.818	68.225	100.69
REL YULE	-6917.947	+/-0.082	7.818	-	76.043	108.508
STR COAL	-6993.989	+/-0.105	-68.225	-76.043	-	32.466
STR YULE	-7026.455	+/-0.507	-100.69	-108.508	-32.466	-

Estos cinco clados principales se distinguen también en las filorredes, tanto en la obtenida a partir del ND5 (Figura 34) como en la del ITS1 (Figura 35). Sin embargo, en este caso, las relaciones entre los diferentes grupos no se resuelven claramente, con la excepción de *C. darwini* y *C. magellanicus* que surgen, en ambos casos, de un tronco común. Los otros tres grupos (*C. chilensis*, *C. suturalis* y *C. buqueti*) surgen independientemente del centro de la filorred.

En el árbol del ND5, datado con las tasas obtenidas del trabajo de Pons et al. (2010) para coleópteros en general, se muestra que el origen del género *Ceroglossus* se remonta a un mínimo de 9 millones de años, cuando los dos principales clados divergieron. La separación de *C. darwini* y *C. magellanicus* habría tenido lugar hace 5,5 millones de años. Por otro lado, *C. chilensis* y *C. buqueti* habrían divergido hace 6,5 millones de años, mientras que *C. suturalis* se habría separado de este linaje hace casi 8 millones de años. Si bien el número de linajes observados es escaso durante gran parte de la línea temporal, se observa una gran explosión de ramificaciones intraespecíficas que se habría iniciado hace 1 millón de años.

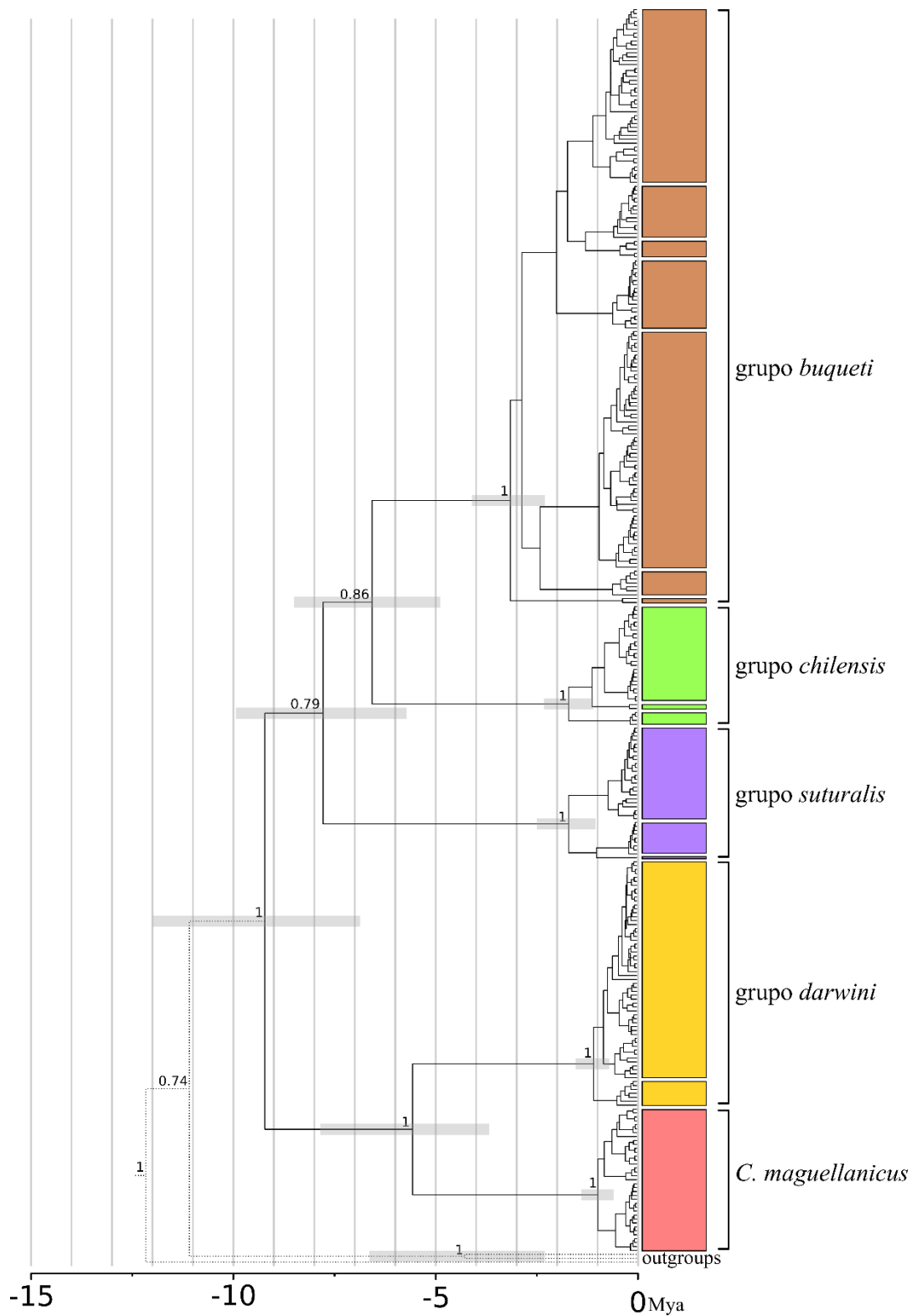


Figura 32: Árbol consenso simplificado de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5. Se señalan los cinco grupos correspondientes a las principales especies (derecha), así como los clústeres consenso delimitados según el método establecido en López-López et al. (2016) (rectángulos coloreados). Los números en los nodos corresponden a los valores de probabilidad posterior. La barra de escala situada en la parte inferior indica la edad de los nodos en millones de años. Las barras en los nodos indican el intervalo de la altura de cada nodo con un 95% de confianza.

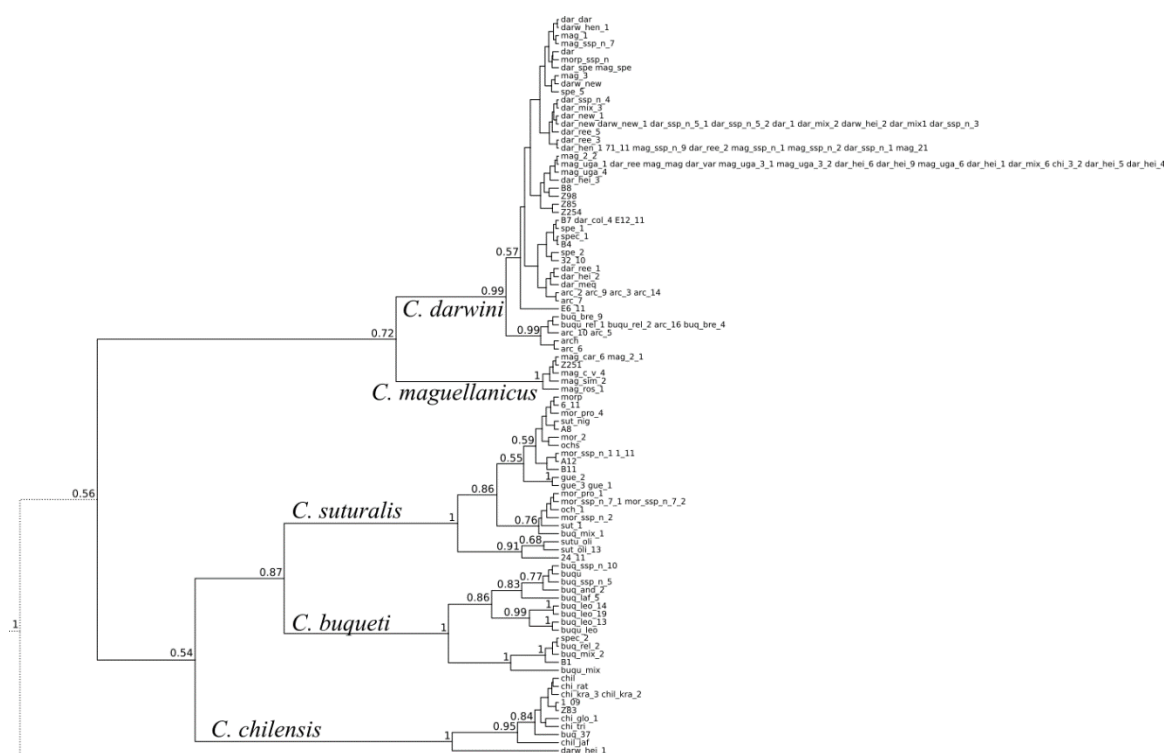


Figura 33: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ITS1. Los cinco grupos correspondientes a las especies principales están señalados. Los números en los nodos corresponden a los valores de probabilidad posterior.

Los algoritmos de delimitación de especies reconocieron un número variable de entidades (Tabla 7). El algoritmo GMYC con umbral único y el bPTP produjeron resultados bastante similares, mientras que el GMYC con umbral múltiple sobredivió a las diferentes especies en una multitud de entidades. El número de Clústeres Consenso definidos siguiendo el método de López-López et al. (2016) fue similar al número de grupos delimitados por el GMYC con umbral único y por el bPTP, aunque ligeramente menor.

Estos clústeres consenso se recuperan también como grupos separados en las redes filogeográficas y en las filorredes.

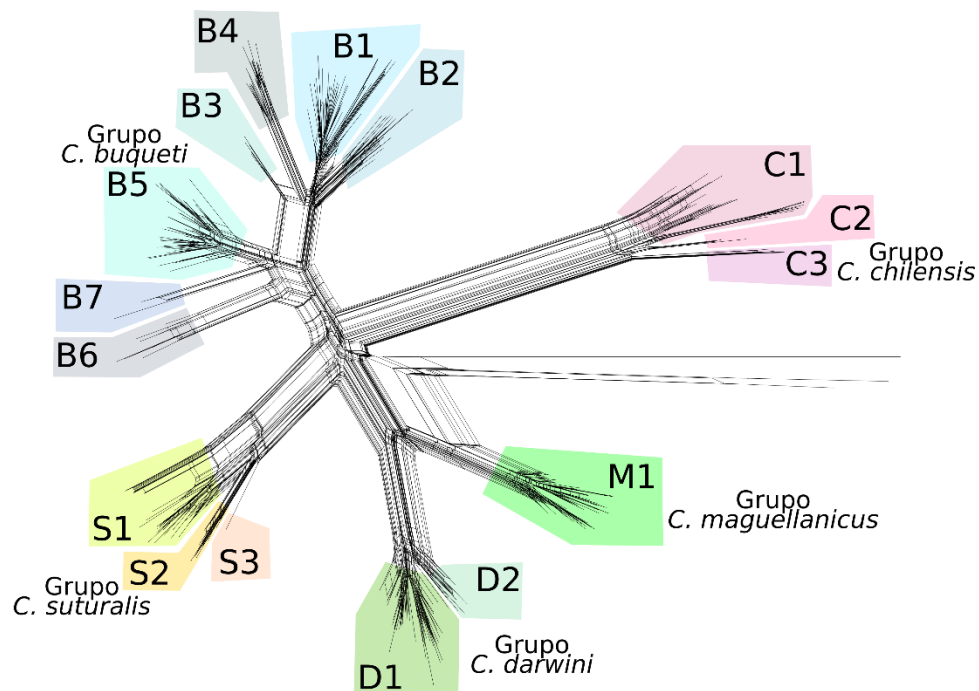


Figura 34: Filored obtenida del análisis del fragmento ND5. Se señalan los cinco grupos principales, así como los clústeres consenso.

Tabla 7: Resumen de los resultados de los algoritmos de delimitación de especies aplicados al árbol obtenido de la matriz del ND5.

Clado	Entidades (GMYC umbral único)	Entidades (GMYC umbral múltiple)	Entidades (bPTP)	Clústeres Consenso
<i>C. darwini</i>	2	5	2	2
<i>C. maguellanicus</i>	2	9	1	1
<i>C. buqueti</i>	9	28	8	7
<i>C. suturalis</i>	3	8	3	3
<i>C. chilensis</i>	3	8	4	3
<i>Total</i>	19	58	18	16

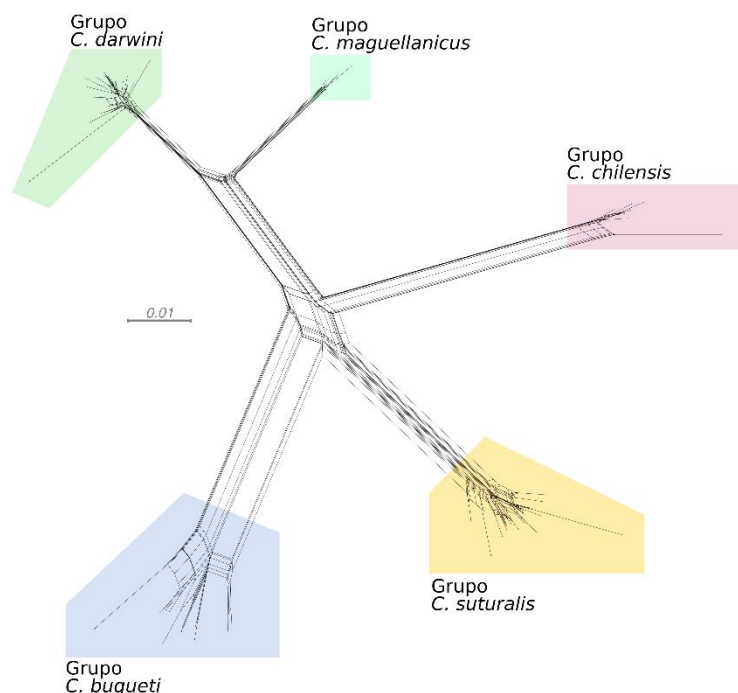


Figura 35: Filored obtenida del análisis del fragmento ITS1. Se señalan los cinco grupos principales.

1.1 - Grupo de *C. darwini*

Los dos clústeres consenso observados dentro del grupo de *C. darwini* (Figura 36) corresponden a los ejemplares identificados como *C. darwini* (clúster D1) por un lado y *C. speciosus* (clúster D2) por el otro. Sin embargo, el Clúster Consenso de *C. speciosus* no incluye a todos los ejemplares identificados como pertenecientes a esta especie. Cuatro de las muestras clasificadas como *C. speciosus* se muestran incluidas, tanto en el árbol como en la red filogenética, dentro de *C. darwini*.

Llama la atención el hecho de que ciertos ejemplares identificados como *C. magellanicus specisiformis* y una subespecie nueva de *C. magellanicus* se encuentren formando parte de *C. darwini*, en el clúster D1.

En la red filogeográfica (Figura 37), las subespecies de *C. darwini* no suelen formar grupos exclusivos, del mismo modo que tampoco forman clados monofiléticos en el árbol, sino que se encuentran divididas en un mínimo de dos grupos o clados.

La distribución geográfica (Figura 38) de los ejemplares del clúster D1 (*C. darwini*) se halla repartida desde el distrito de Los Ríos hasta Aysén. Por el contrario, los ejemplares de *C. speciosus* (clúster D2) se encuentran exclusivamente en la región de Los Lagos, correspondiente al punto medio en un gradiente latitudinal de la distribución de *C. darwini*.

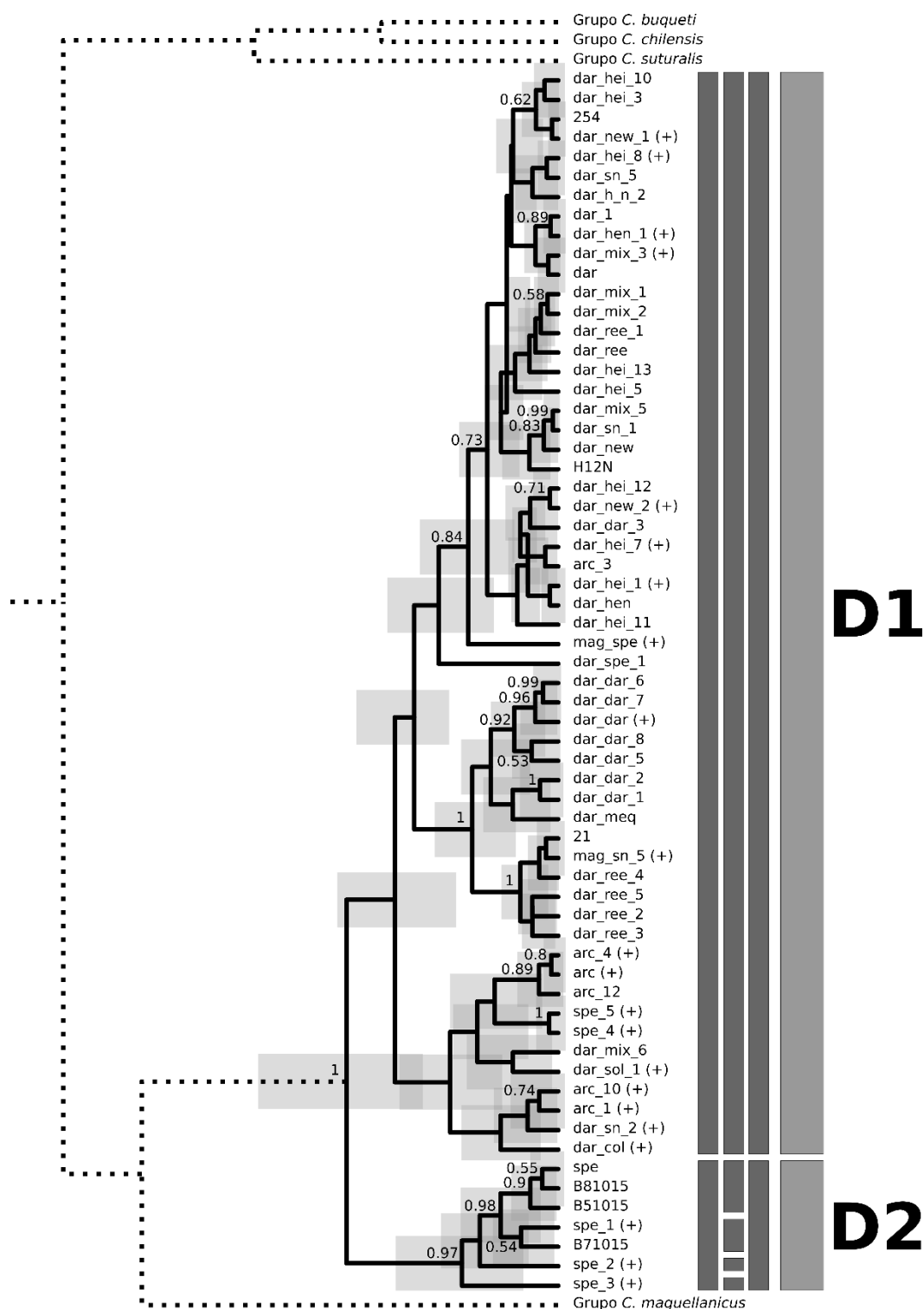


Figura 36: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5, centrada en el clado correspondiente al grupo de *C. darwini*. Los nombres de los nodos terminales corresponden a los códigos de los ejemplares; los casos que se muestran con un símbolo (+) significan que hay más de una muestra compartiendo ese haplotipo (la lista detallada se puede ver en las figuras correspondientes a las redes haplotípicas). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior, y las barras la altura en un intervalo con el 95% de confianza. A la derecha se muestran mediante rectángulos los grupos delimitados por (de izquierda a derecha) el GMYC con un único umbral, el GMYC con umbral múltiple, el bPTP y los clústeres consenso.

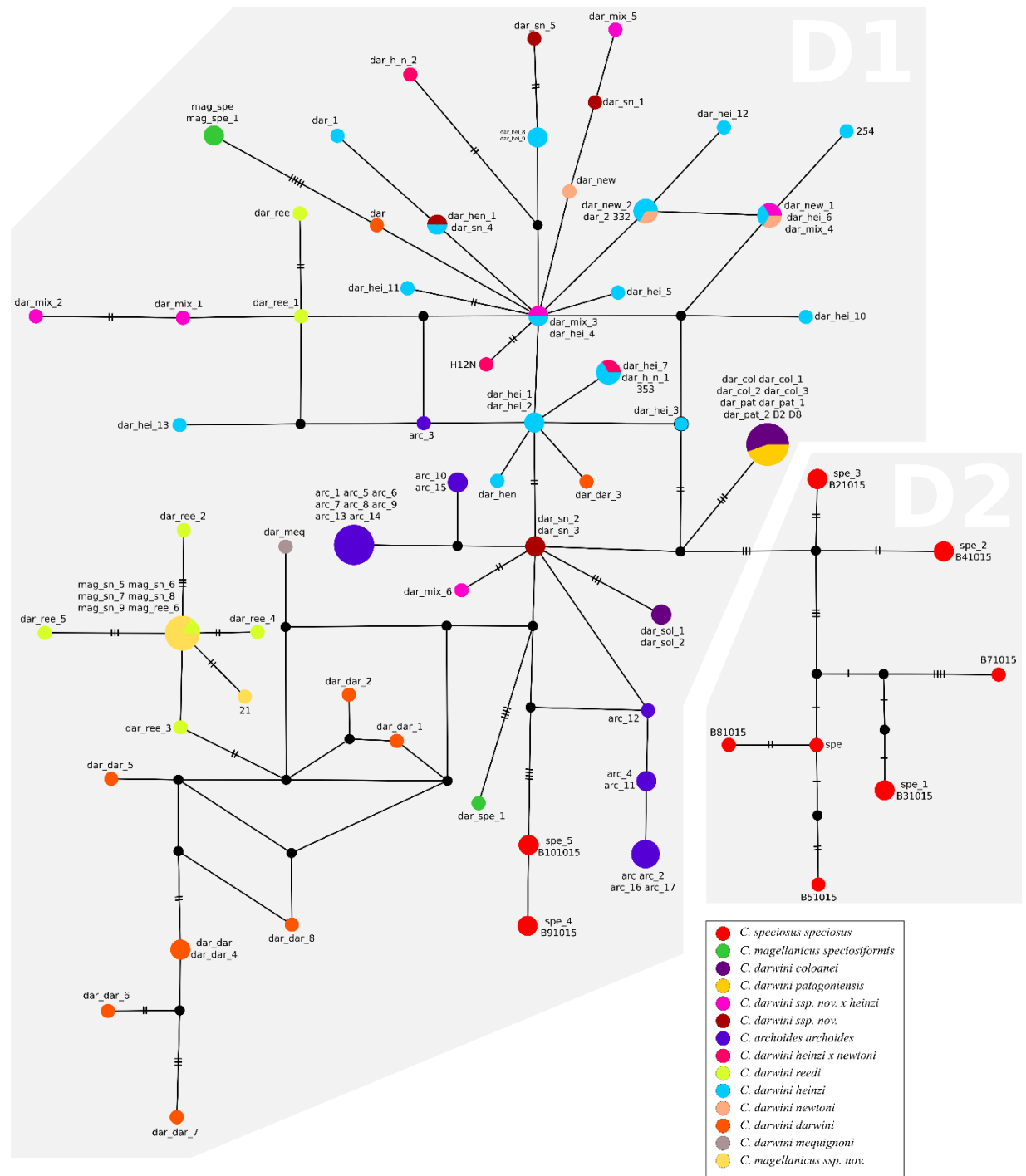
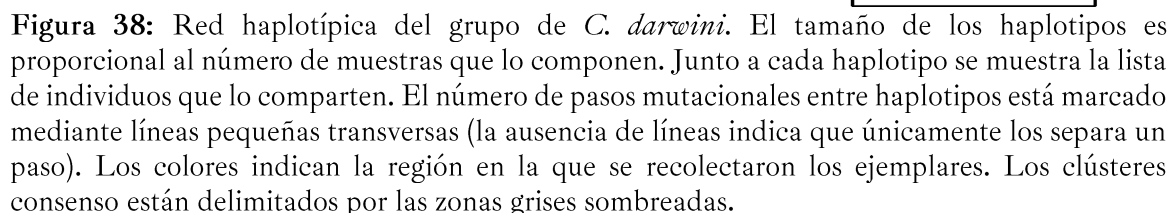


Figura 37: Red haplotípica del grupo de *C. darwini*. El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la identificación basada en la morfología en el momento de captura. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.





1.2 - Grupo de *C. magellanicus*

Dentro de *C. magellanicus* únicamente se reconoce un clúster consenso (M1), correspondiente a esta especie (Figura 39). Aunque en este caso se observa una mayor correspondencia de grupos de haplotipos con subespecies morfológicas, muchas de éstas son polifiléticas y/o se hallan repartidas por diferentes áreas de la red, como es el caso de *C. m. ugartei* o *C. m. carbugansis*.

En la red filogeográfica (Figuras 40 y 41), se observa cómo la mayoría de haplotipos corresponden a las regiones de Los Ríos y La Araucanía, encontrándose relativamente aislados unos de otros, con contadas excepciones (por ejemplo, las muestras “mag_mag_1” o “mag_mag”). De entre el grupo de haplotipos de la región de Los Ríos surge una rama formada por haplotipos de la región del Bío Bío, mientras que la parte de la red correspondiente a la región de la Araucanía muestra varios haplotipos hallados también en la región de Los Lagos.

1.3 - Grupo de *C. suturalis*

Dentro del grupo de *C. suturalis* se distinguen tres Clústeres Consenso bien diferenciados (Figura 42).

El clúster S1 incluye a varios ejemplares identificados como *C. suturalis*, más las muestras asignadas a las especies *C. morpheus*, *C. ochsenii* y *C. guerini*. La especie *C. guerini* forma un grupo separado en la red filogeográfica (Figuras 43 y 44), pero no constituye un clado monofilético en el árbol. *C. ochsenii* y *C. morpheus* no tienen entidad como clados ni en la red ni en el árbol filogenético. Los ejemplares de este clúster fueron capturados en las regiones de Los Ríos y de Los Lagos.

El clúster S2 reúne a los ejemplares identificados como *C. suturalis olivaceus*, más dos muestras identificadas como cruces entre *C. s. olivaceus* y *C. s. suturalis*. En este grupo se observa un haplotipo central compartido entre varios individuos, rodeado por una serie de haplotipos más raros, formando un patrón en estrella. Este clúster tiene una distribución más meridional, extendiéndose desde Los Lagos hasta Aysén.

El último clúster dentro de este grupo, el clúster S3, está formado por un único individuo asignado a la subespecie *C. s. ancudanus*, procedente de la región de Los Lagos.

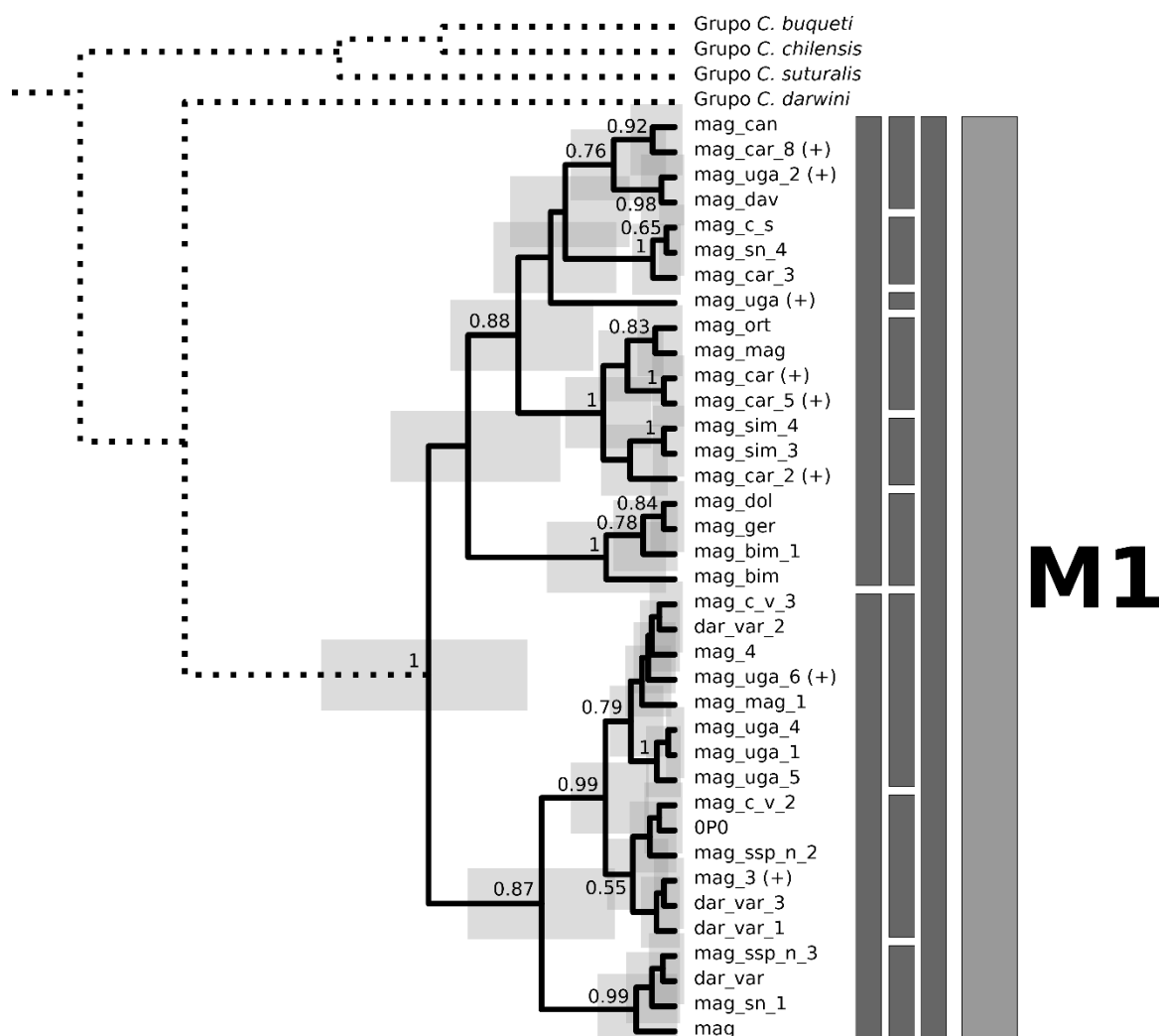


Figura 39: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5, centrada en el clado correspondiente al grupo de *C. magellanicus*. Los nombres de los nodos terminales corresponden a los códigos de los ejemplares; los casos que se muestran con un símbolo (+) significan que hay más de una muestra compartiendo ese haplotipo (la lista detallada se puede ver en las figuras correspondientes a las redes haplotípicas). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior, y las barras la altura en un intervalo con el 95% de confianza. A la derecha se muestran mediante rectángulos los grupos delimitados por (de izquierda a derecha) el GMYC con un único umbral, el GMYC con umbral múltiple, el bPTP y los clústeres consenso.

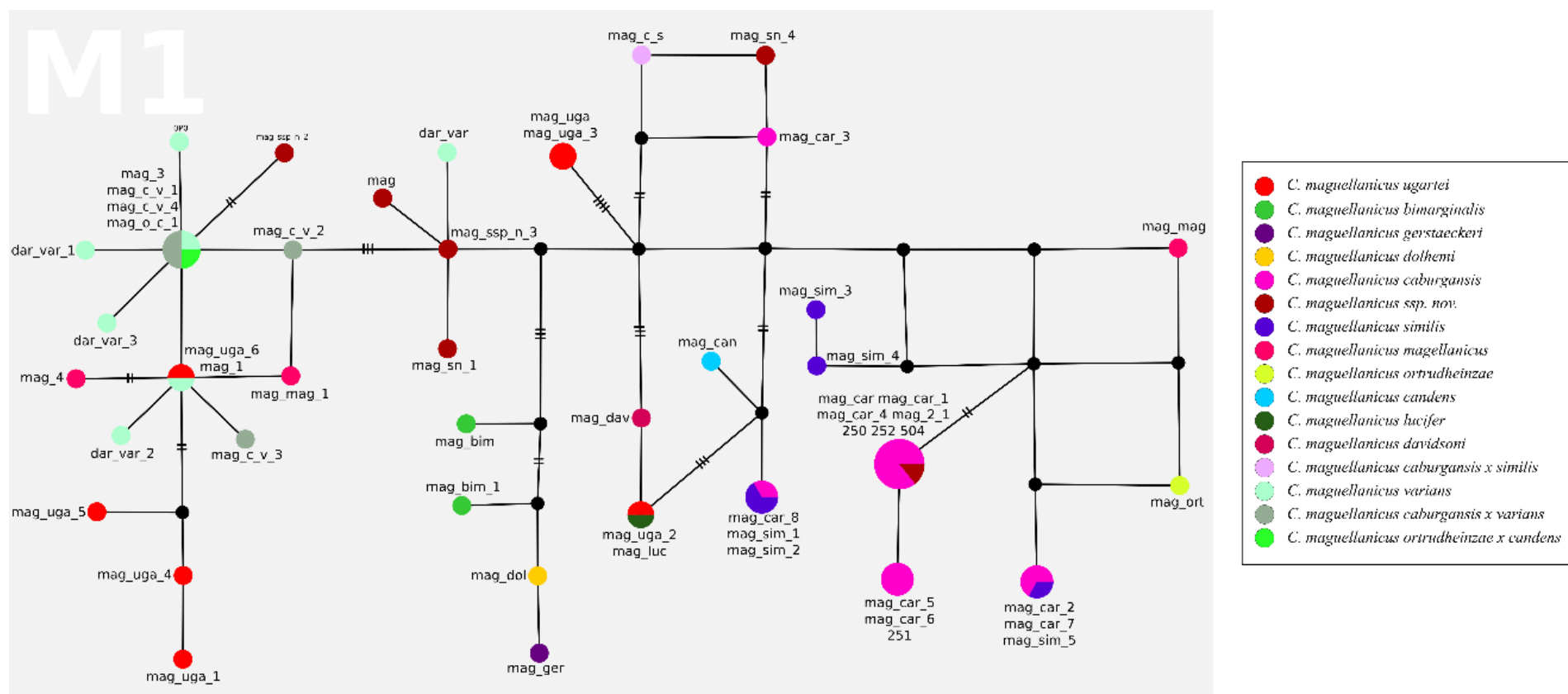
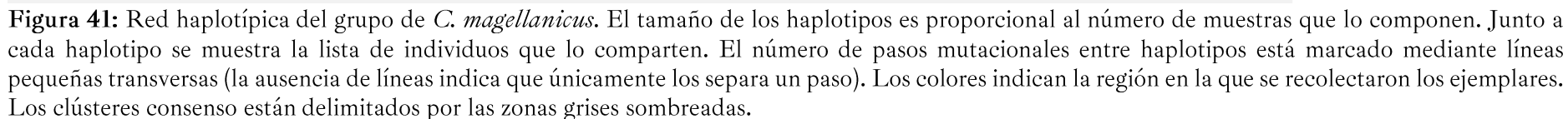


Figura 40: Red haplotípica del grupo de *C. magellanicus*. El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la identificación basada en la morfología en el momento de captura. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.



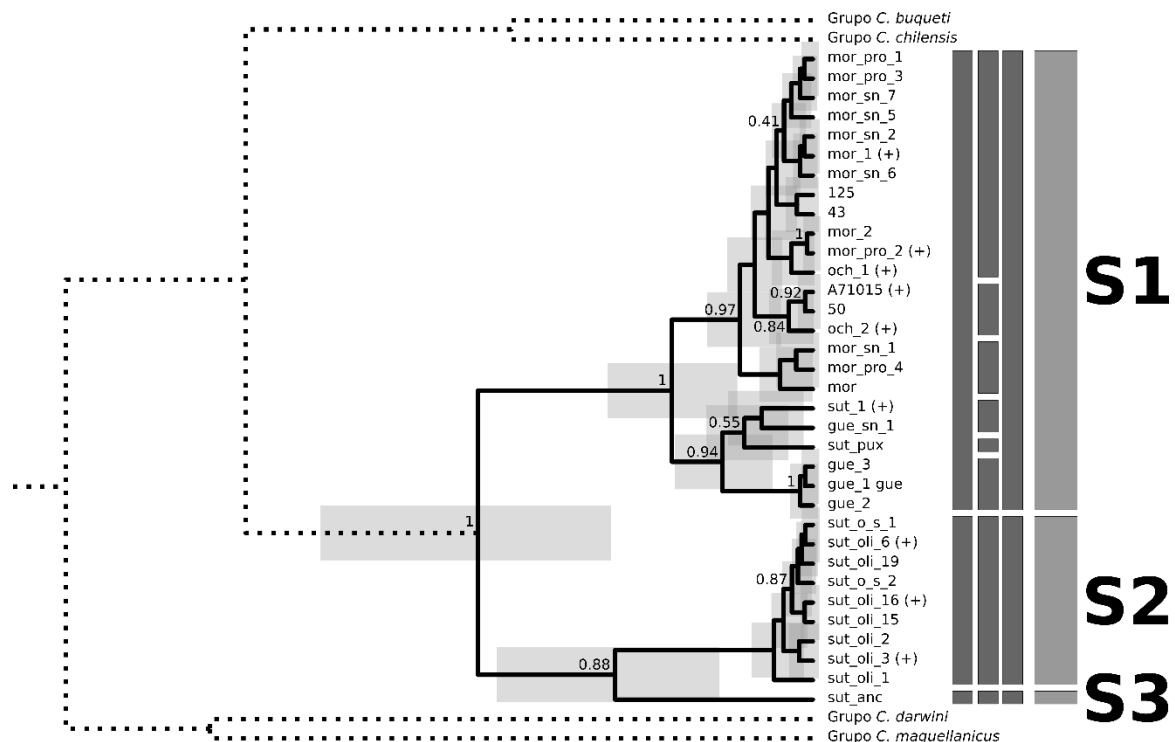


Figura 42: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5, centrada en el clado correspondiente al grupo de *C. suturalis*. Los nombres de los nodos terminales corresponden a los códigos de los ejemplares; los casos que se muestran con un símbolo (+) significan que hay más de una muestra compartiendo ese haplotipo (la lista detallada se puede ver en las figuras correspondientes a las redes haplotípicas). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior, y las barras la altura en un intervalo con el 95% de confianza. A la derecha se muestran mediante rectángulos los grupos delimitados por (de izquierda a derecha) el GMYC con un único umbral, el GMYC con umbral múltiple, el bPTP y los clústeres consenso.

1.4 - Grupo de *C. buqueti*

Dentro de *C. buqueti* se encuentra la mayor diversidad observada, con siete Clústeres Consenso (Figuras 45 y 46). En este grupo, la identidad taxonómica y la localización geográfica tienen una marcada estructuración, tanto en la red (Figuras 47, 48, 49 y 50) como en el árbol. Únicamente unas pocas subespecies se encuentran divididas entre varios clústeres, siendo *C. b. chiloensis* el caso más evidente.

El clúster B1 está formado por ejemplares identificados como *C. breuningi*, *C. chiloensis* y *C. violaceocupreus*. Además, se incluyen varios ejemplares asignados a una posible subespecie nueva y un ejemplar de *C. b. regalis*.

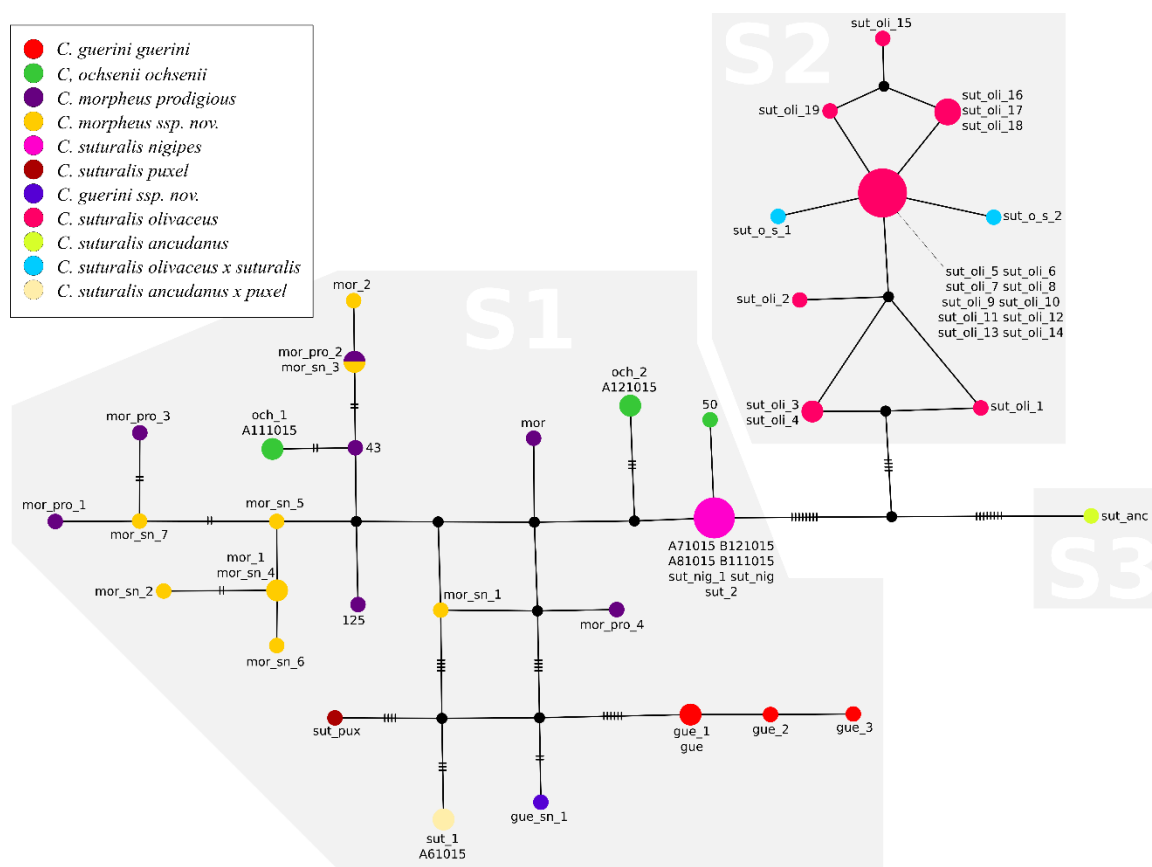


Figura 43: Red haplotípica del grupo de *C. suturalis*. El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la identificación basada en la morfología en el momento de captura. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.

Los clústeres B2 y B3 forman un clado monofilético hermano del clúster B1. El clúster B2 corresponde mayoritariamente a las subespecies *C. b. lafquen* y *C. b. snizeki*, incluyendo así mismo varios ejemplares identificados como posibles híbridos *lafquen x snizeki x calvus*, más un ejemplar de *C. b. relictus*. El clúster B3 incluye a la mayor parte de los ejemplares de *C. b. relictus*, más los *C. b. violaceocupreus* no incluidos en el clúster B1.

El clúster B4, hermano de todos los anteriores, está compuesto por otro grupo de *C. b. chiloensis* más las subespecies *C. b. calvus*, *C. b. magdalenaensis* y *C. b. sybarita*.

Los clústeres B1 a B4 muestran una distribución meridional, desde Los Lagos hasta Magallanes. Por el contrario, los clústeres B5 a B7, situados en una posición relativamente más basal en el árbol, se distribuyen al norte, desde Bío Bío hasta Los Ríos.

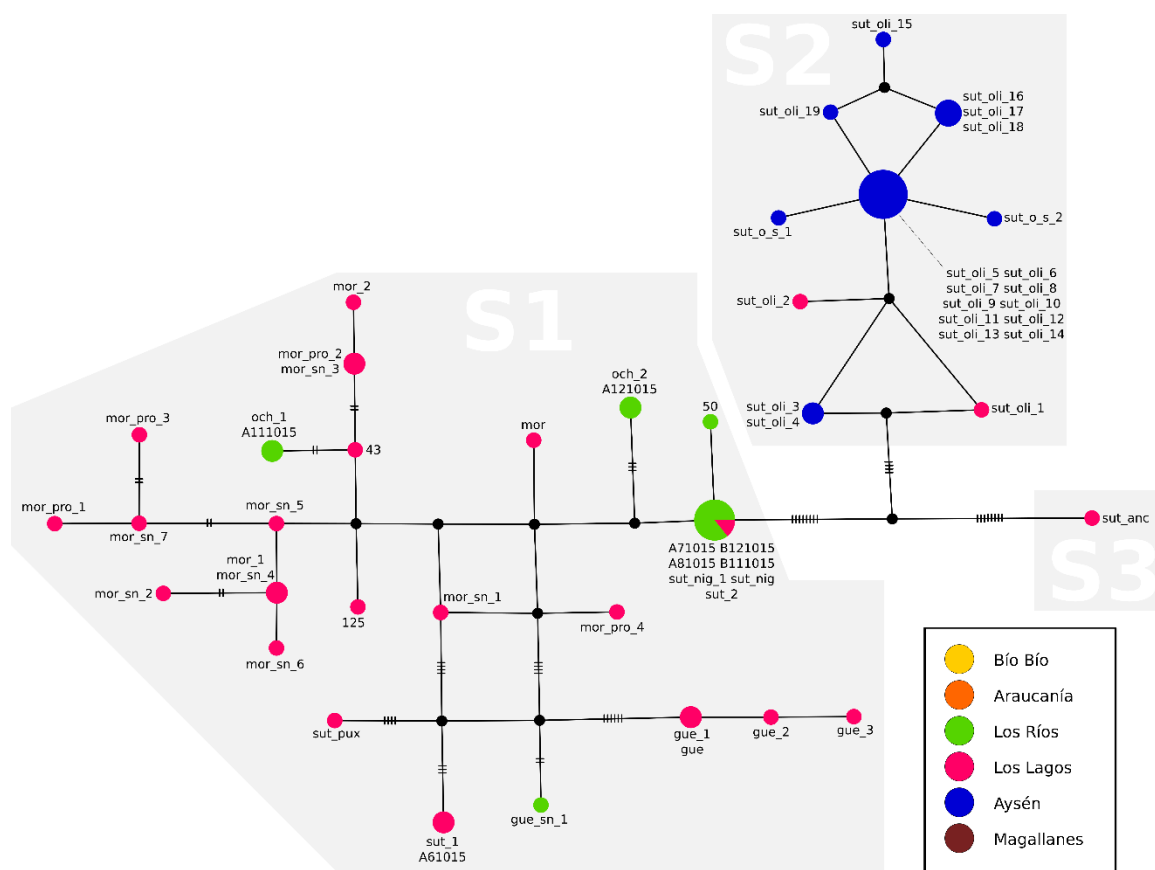


Figura 44: Red haplotípica del grupo de *C. suturalis*. El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la región en la que se recolectaron los ejemplares. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.

El clúster B5 está formado por las subespecies *C. b. buqueti*, *C. b. leopardalinus*, *C. b. solieri*, *C. b. lorenzi*, *C. b. andestus* y *C. b. arriegadai*. Además, incluye ejemplares identificados como híbridos *cherquencoensis x subnites*, varias muestras asignadas a una posible subespecie nueva, y dos ejemplares correspondientes a las subespecies *C. b. relictus* y *C. b. regalis*, respectivamente.

El clúster B6 también incluye ejemplares identificados como *C. b. andestus* e híbridos *cherquencoensis x subnites*, así como una muestra de *C. b. oblitus*. Por otro lado, el clúster B7 está formado únicamente por un individuo de *C. b. oblitus* y otro de *C. b. cherquencoensis*.

1.5 – Grupo de *C. chilensis*

En el grupo de *C. chilensis* se pueden distinguir tres Clústeres Consenso (Figura 51), aunque en este caso hay una correspondencia menos clara entre clústeres y



subespecies morfológicas (Figura 52). El clúster C2 incluye a los dos únicos ejemplares de *C. c. fallaciosus* y *C. c. cyanicollis*. El clúster C1 contiene a todos los ejemplares de *C. c. villarensis*, *C. c. jaffrezici*, *C. c. rataji*, *C. c. gloriosus* y varios posibles híbridos, entre ellos *villariensis x gloriosus* y *imperialis x jaffrezici*. Por su lado, el clúster C3 incluye a las muestras de *C. c. meridionalis* y *C. c. keithi*. Las subespecies *C. c. solieri* y *C. c. kraatzianus*, bastante numerosas en cuanto a cantidad de muestras recolectadas, se encuentran repartidas entre los clústeres C1 y C3.

El clúster C1 tiene una amplia distribución, desde Bío Bío hasta Los Lagos, mientras que el clúster C2 se encuentra aislado en la parte más septentrional de este rango de distribución (Figura 53). Por otro lado, el clúster C3 se restringe a la zona más meridional, llegando a la región de Aysén.

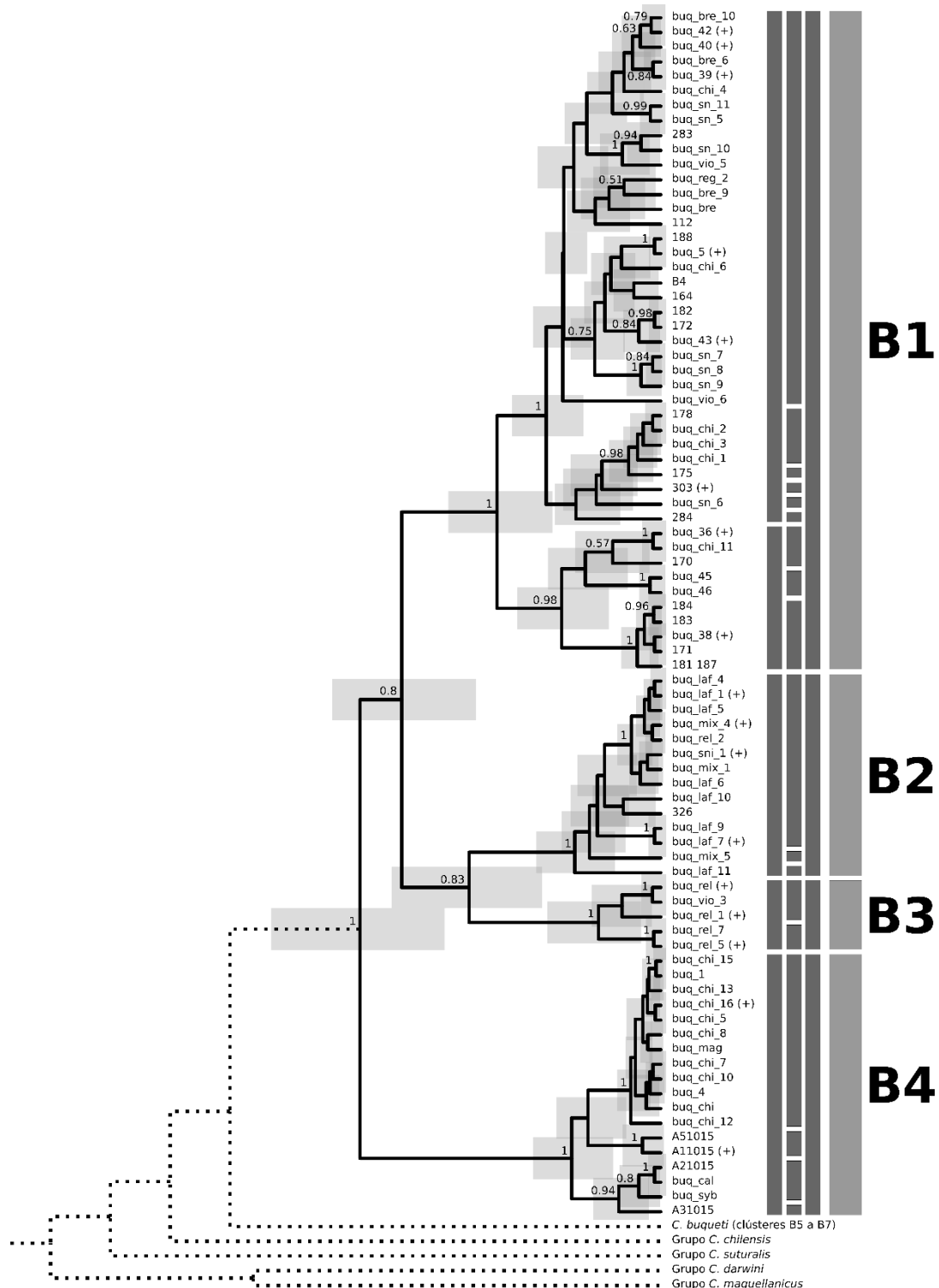


Figura 45: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5, centrada en el clado correspondiente a los clústeres B1 a B4 del grupo de *C. buqueti*. Los nombres de los nodos terminales corresponden a los códigos de los ejemplares; los casos que se muestran con un símbolo (+) significan que hay más de una muestra compartiendo ese haplotipo (la lista detallada se puede ver en las figuras correspondientes a las redes haplotípicas). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior, y las barras la altura en un intervalo con el 95% de confianza. A la derecha se muestran mediante rectángulos los grupos delimitados por (de izquierda a derecha) el GMYC con un único umbral, el GMYC con umbral múltiple, el bPTP y los clústeres consenso.

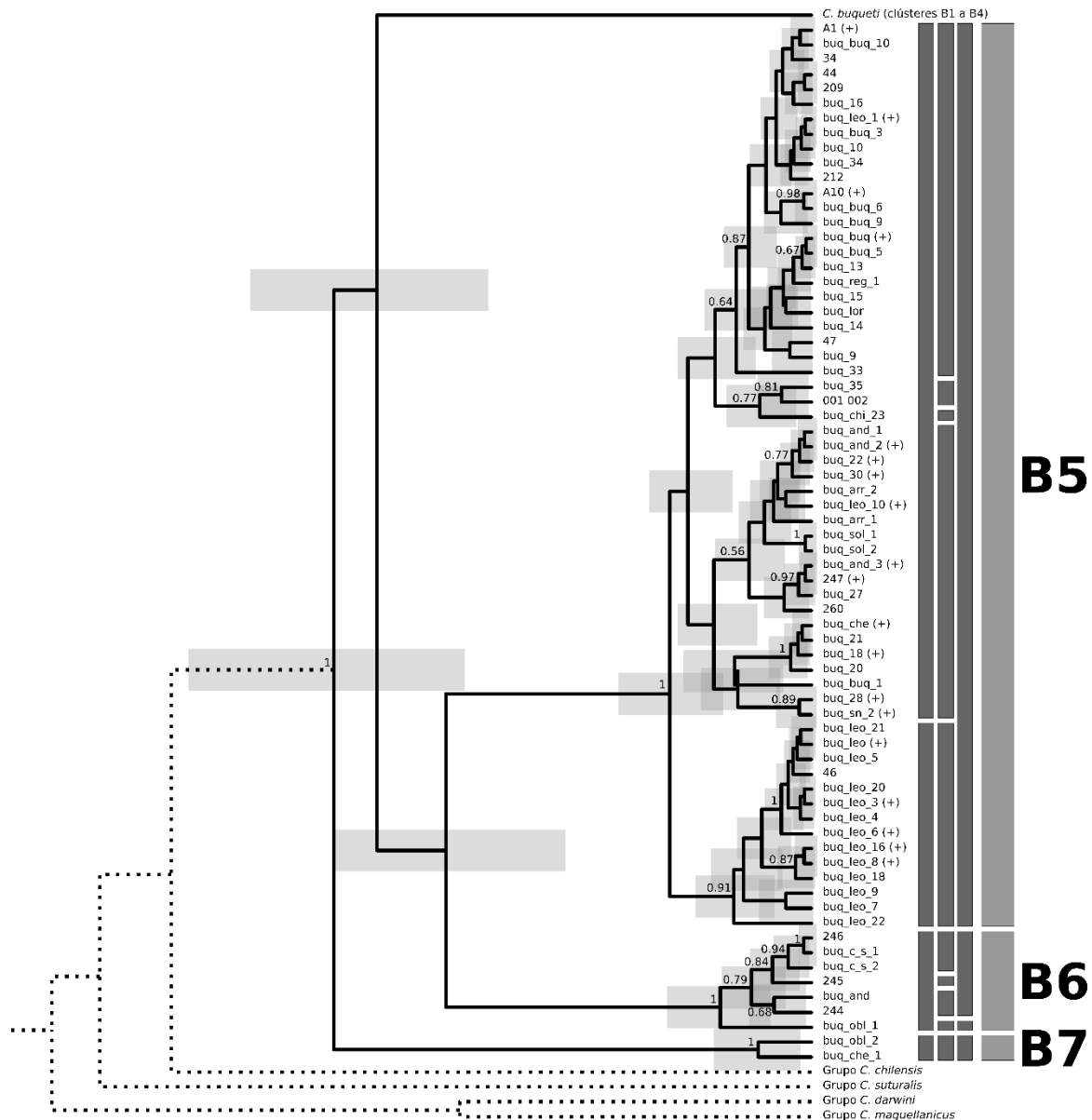


Figura 46: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5, centrada en el clado correspondiente a los clústeres B5 a B7 del grupo de *C. buqueti*. Los nombres de los nodos terminales corresponden a los códigos de los ejemplares; los casos que se muestran con un símbolo (+) significan que hay más de una muestra compartiendo ese haplotipo (la lista detallada se puede ver en las figuras correspondientes a las redes haplotípicas). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior, y las barras la altura en un intervalo con el 95% de confianza. A la derecha se muestran mediante rectángulos los grupos delimitados por (de izquierda a derecha) el GMYC con un único umbral, el GMYC con umbral múltiple, el bPTP y los clústeres consenso.

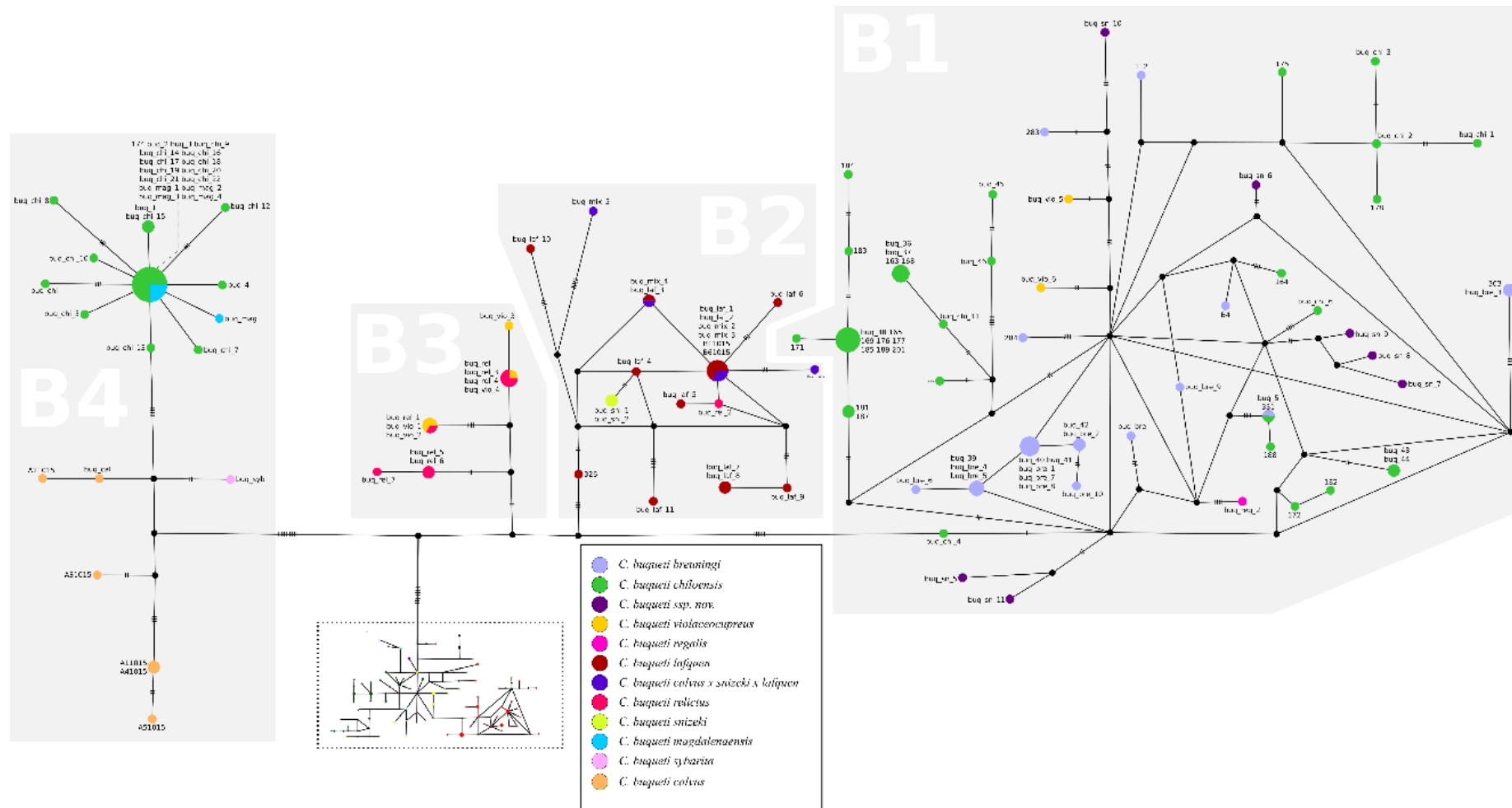
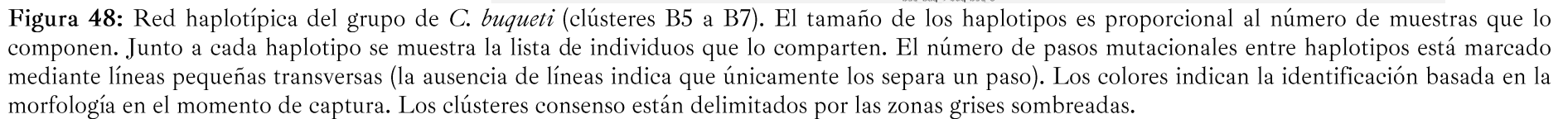
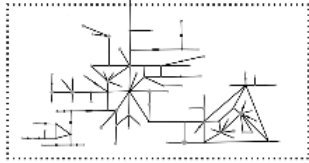


Figura 47: Red haplotípica del grupo de *C. buqueti* (clústeres B1 a B4). El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la identificación basada en la morfología en el momento de captura. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.





113

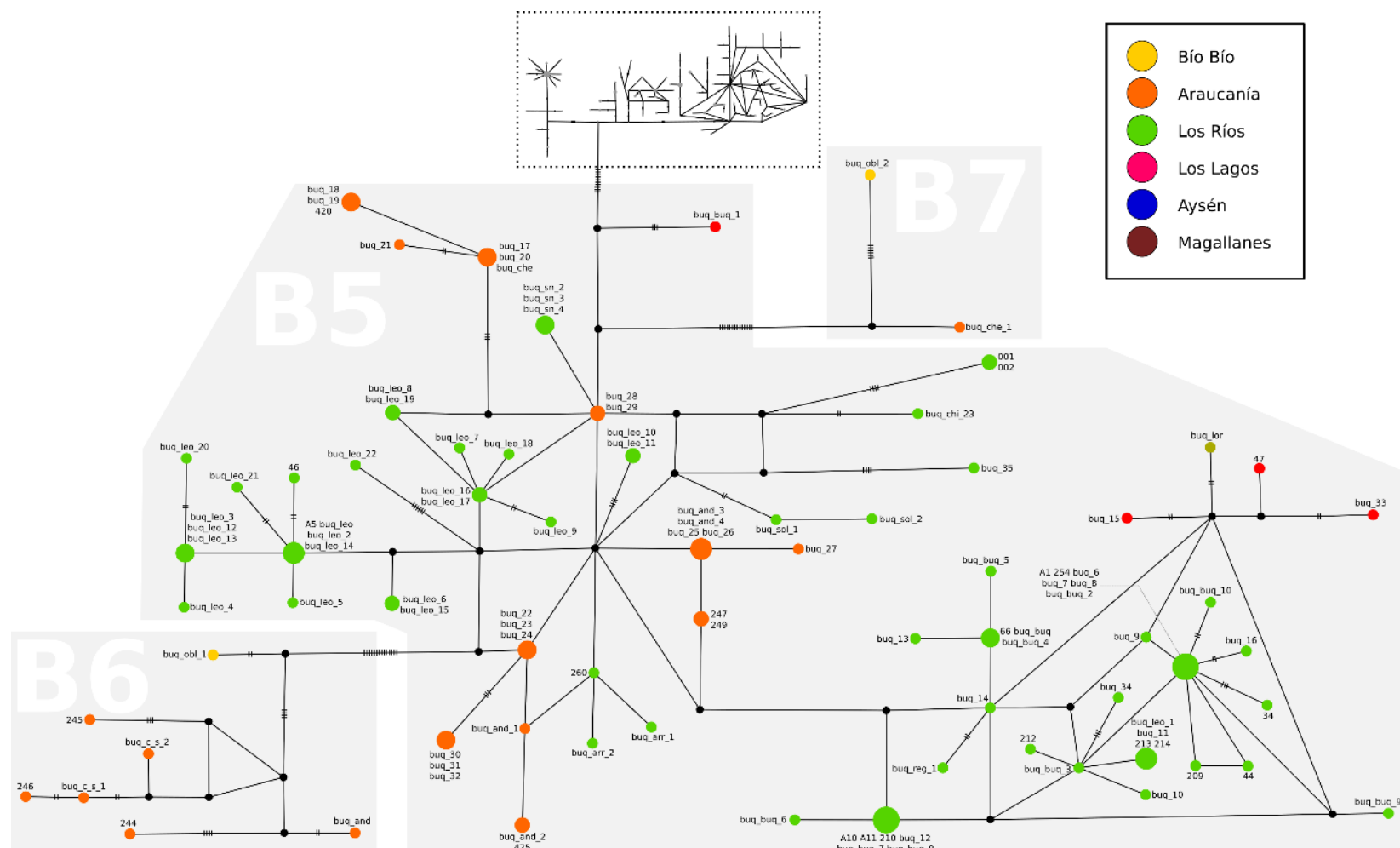


Figura 50: Red haplotípica del grupo de *C. buqueti* (clústeres B5 a B7). El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la región en la que se recolectaron los ejemplares. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.

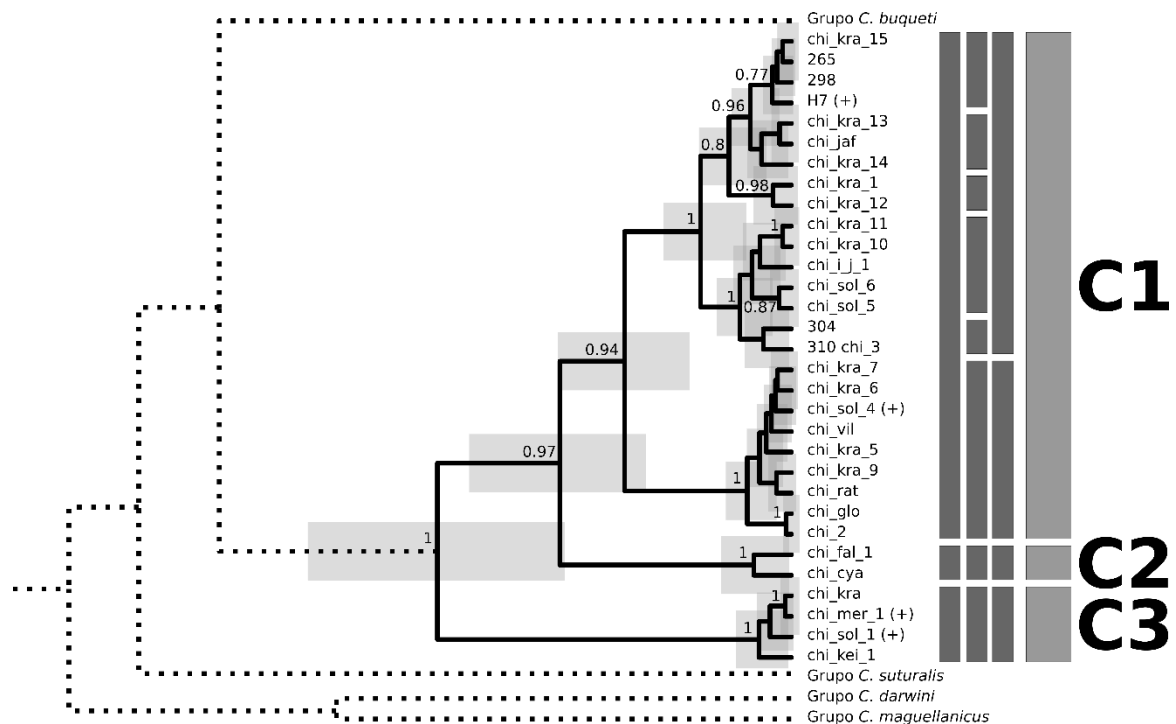


Figura 51: Árbol de Inferencia Bayesiana obtenido del análisis del fragmento ND5, centrada en el clado correspondiente al grupo de *C. chilensis*. Los nombres de los nodos terminales corresponden a los códigos de los ejemplares; los casos que se muestran con un símbolo (+) significan que hay más de una muestra compartiendo ese haplotipo (la lista detallada se puede ver en las figuras correspondientes a las redes haplotípicas). Los números en los nodos indican la probabilidad posterior, y las barras la altura en un intervalo con el 95% de confianza. A la derecha se muestran mediante rectángulos los grupos delimitados por (de izquierda a derecha) el GMYC con un único umbral, el GMYC con umbral múltiple, el bPTP y los clústeres consenso.

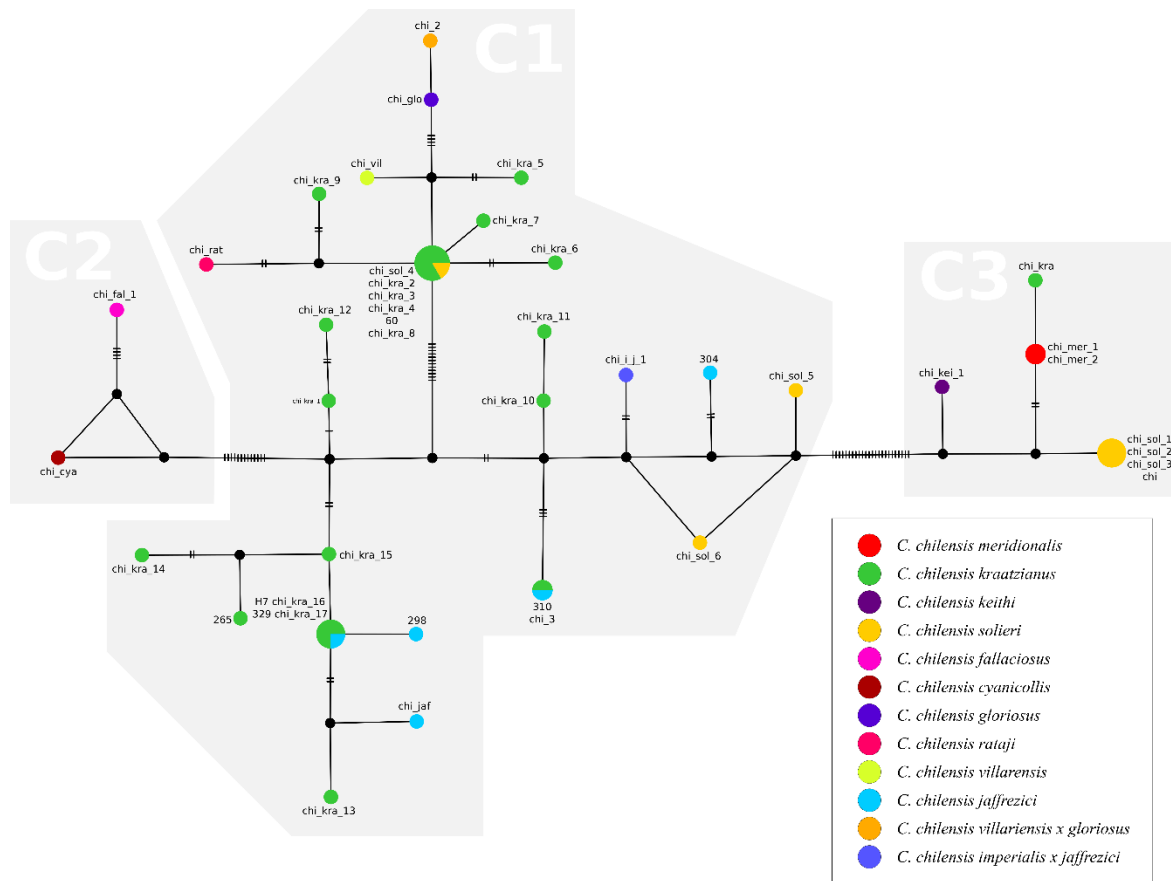


Figura 52: Red haplotípica del grupo de *C. chilensis*. El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la identificación basada en la morfología en el momento de captura. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.

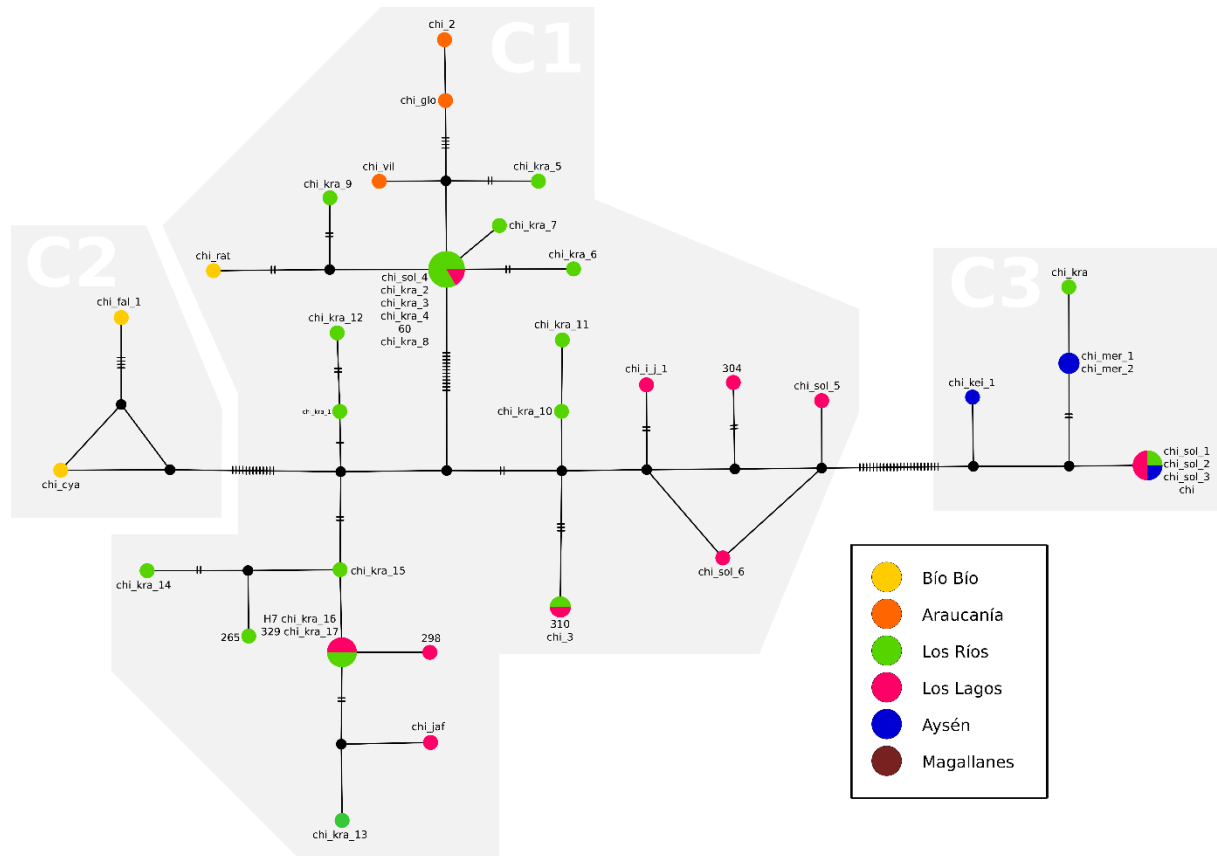


Figura 53: Red haplotípica del grupo de *C. chilensis*. El tamaño de los haplotipos es proporcional al número de muestras que lo componen. Junto a cada haplotipo se muestra la lista de individuos que lo comparten. El número de pasos mutacionales entre haplotipos está marcado mediante líneas pequeñas transversas (la ausencia de líneas indica que únicamente los separa un paso). Los colores indican la región en la que se recolectaron los ejemplares. Los clústeres consenso están delimitados por las zonas grises sombreadas.



2 - Análisis morfométrico

Análisis 17LM

El análisis de la parte ventral del abdomen con 17 *landmarks* no separó a los diferentes grupos taxonómicos según el análisis de componentes principales (Figura 54), en el cual los *landmarks* más variables son aquellos que recorren la línea media del cuerpo (Figura 55). Sin embargo, el análisis de la varianza canónica sí separó a *C. chilensis* y *C. buqueti* del resto (Figuras 56), aunque en este caso la variación de los *landmarks* es menor (Figura 57).

Análisis 4LM

Los cuatro *landmarks* de la parte dorsal del élitro no produjeron resultados concluyentes con ningún análisis (Figuras 58 y 60). En este caso, los *landmarks* situados en los laterales de los élitros tuvieron una mayor variación que los situados en la parte anterior o posterior (Figuras 59 y 61).

Análisis 6LM

Añadiendo los *landmarks* correspondientes a la parte más ancha de los élitros, el análisis de componentes principales continuó sin mostrar resultados concluyentes (Figura 62). No obstante, el análisis de la varianza canónica sí produjo una separación de las especies en cuatro grupos: *C. morpheus*, *C. buqueti*, *C. magellanicus* y un grupo formado por *C. archoides* y *C. chilensis* (Figura 64). Al igual que en el caso anterior, los *landmarks* más variables correspondieron a los situados en el borde de los élitros (Figuras 63 y 65).

Análisis 10LM

El análisis de los *landmarks* del pronoto logró separar a *C. buqueti* del resto de especies en el análisis de componentes principales (Figura 66), en el que los *landmarks* más variables correspondieron a los situados en los bordes laterales del pronoto y el situado en la base del escutelo (Figura 67).



Por otro lado, el análisis de la varianza canónica separó a todas las especies (Figura 68), siendo los *landmarks* más variables en este caso los situados en los bordes laterales y posteriores del pronoto (Figura 69).

Análisis 11LM

Eliminando los puntos de corte de la línea correspondiente a la anchura máxima del pronoto, y añadiendo el punto central más los puntos de cambio de curvatura del borde posterior, no se logra obtener un resultado concluyente del análisis de componentes principales (Figura 70). En este caso, los *landmarks* situados en los bordes laterales son los que poseen mayor variabilidad (Figura 71).

Por el contrario, el análisis de la varianza canónica separa las especies *C. archoides*, *C. buqueti* y *C. morpheus*, aunque no logra separar las especies *C. chilensis* y *C. magellanicus* (Figura 72). Los *landmarks* tuvieron menor variabilidad que en el caso anterior (Figura 73).

Análisis 11M+A

Añadiendo los puntos de corte de las líneas correspondientes a los ángulos 225° y 315°, se obtienen los mismos resultados que en el análisis anterior (Figuras 74 y 75), aunque en este caso no separa a *C. chilensis* y *C. buqueti* en el análisis de la varianza canónica. La variación de los *landmarks* fue igual que en el caso anterior (Figuras 76 y 77).

Análisis P+E

Uniando los puntos del pronoto y de los élitros, los resultados del análisis de componentes principales no son concluyentes (Figura 78), pero el análisis de la varianza canónica separa las cinco especies, mostrando únicamente un pequeño solapamiento entre *C. archoides* y *C. chilensis* (Figura 80).

Generalmente, los *landmarks* del pronoto fueron más variables que los de los élitros (Figuras 79 y 81).

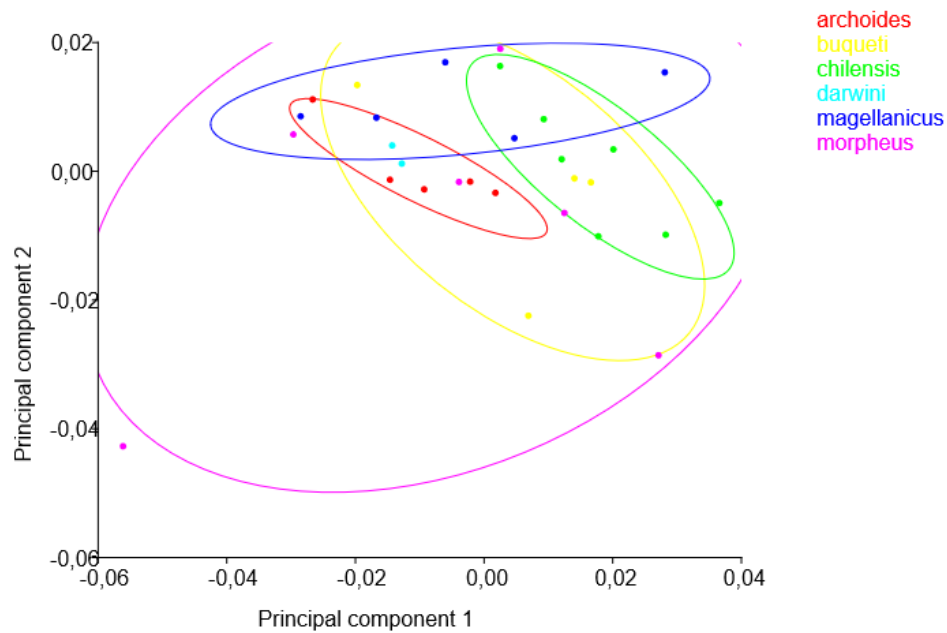
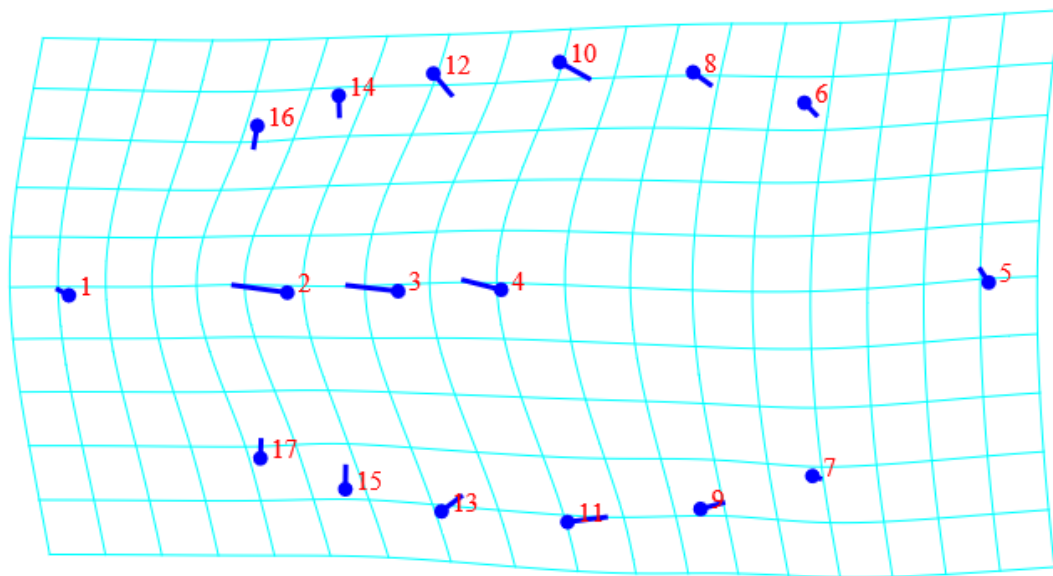


Figura 54: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos 17LM. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.



PC1

Figura 55: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos 17LM.

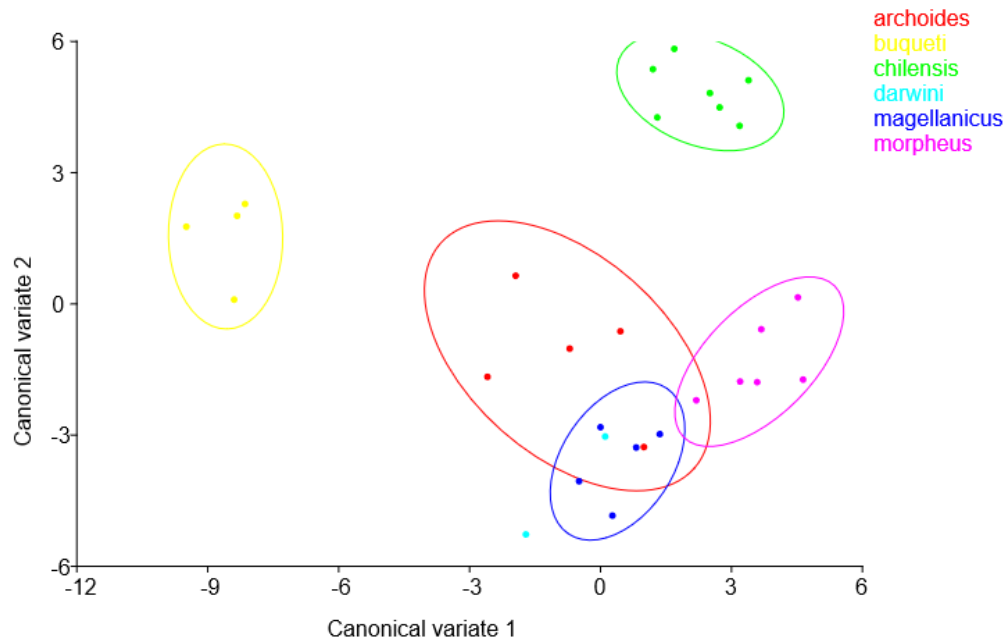


Figura 56: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos 17LM usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

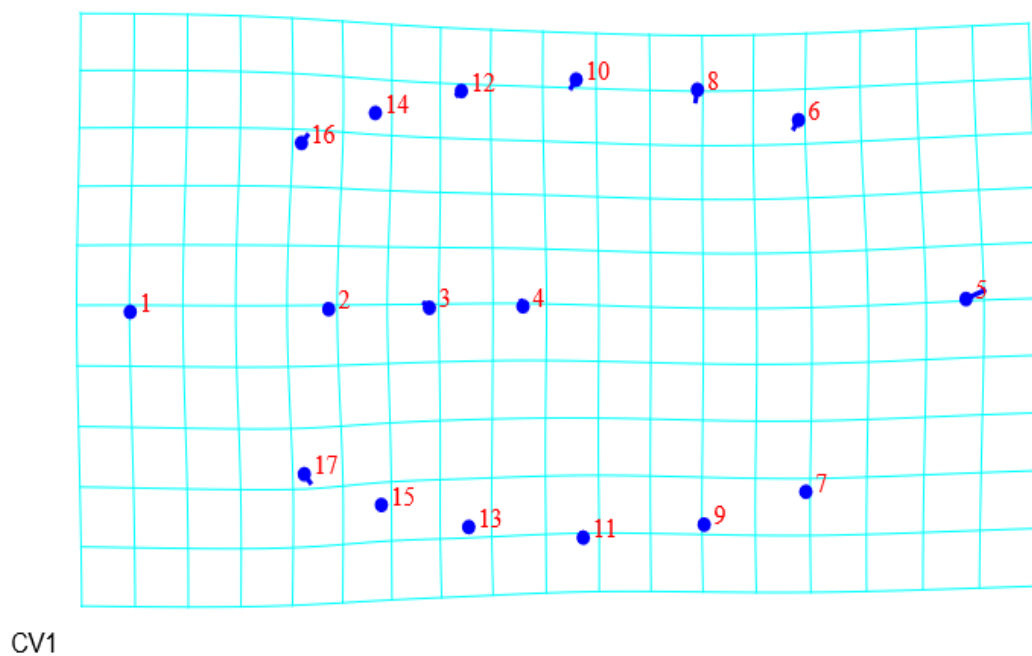


Figura 57: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis 17LM.

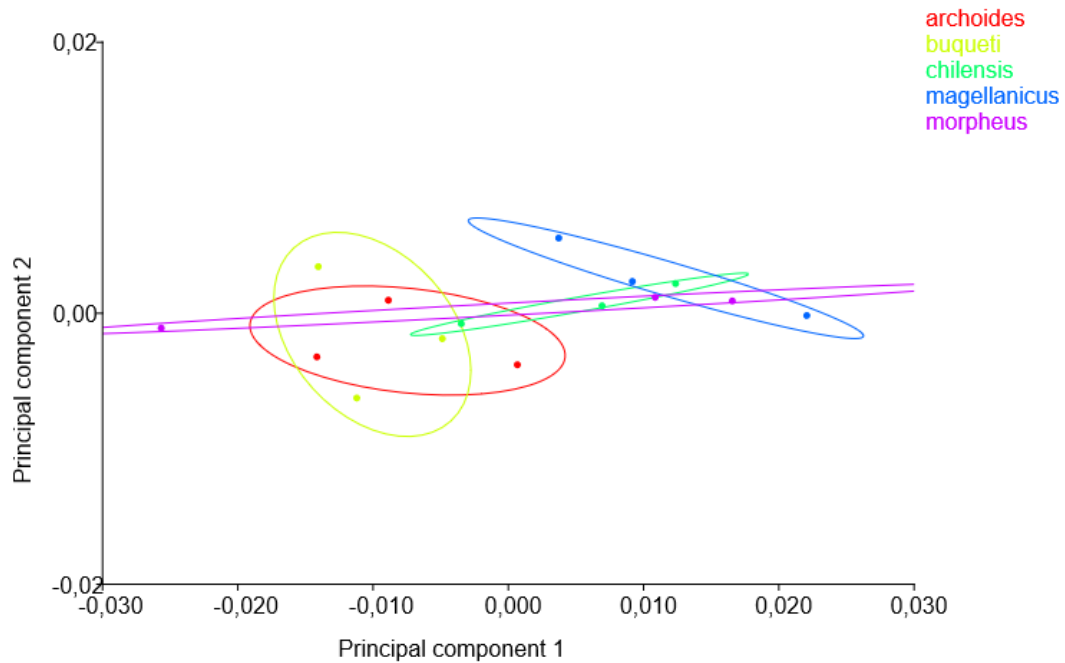
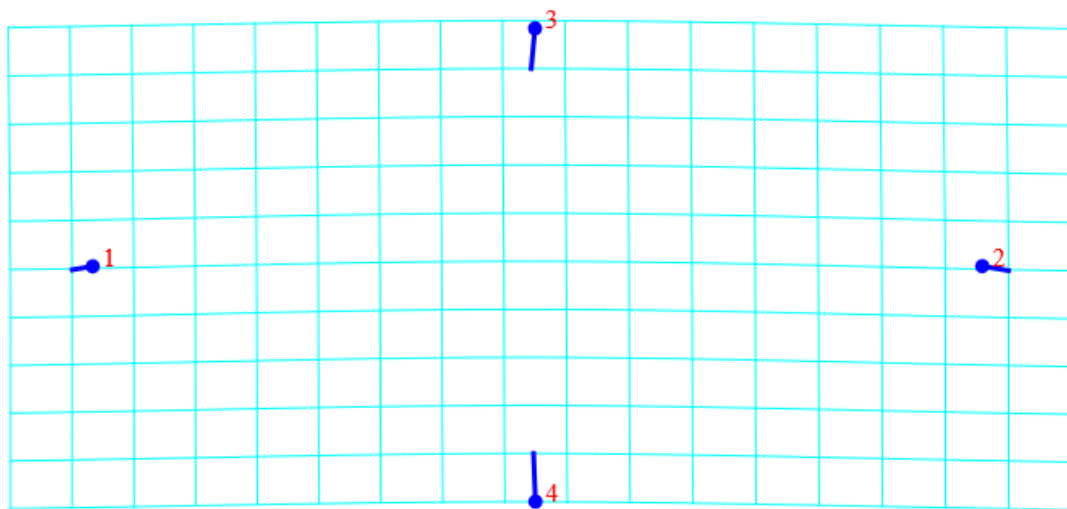


Figura 58: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos 4LM. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.



PC1

Figura 59: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos 4LM.

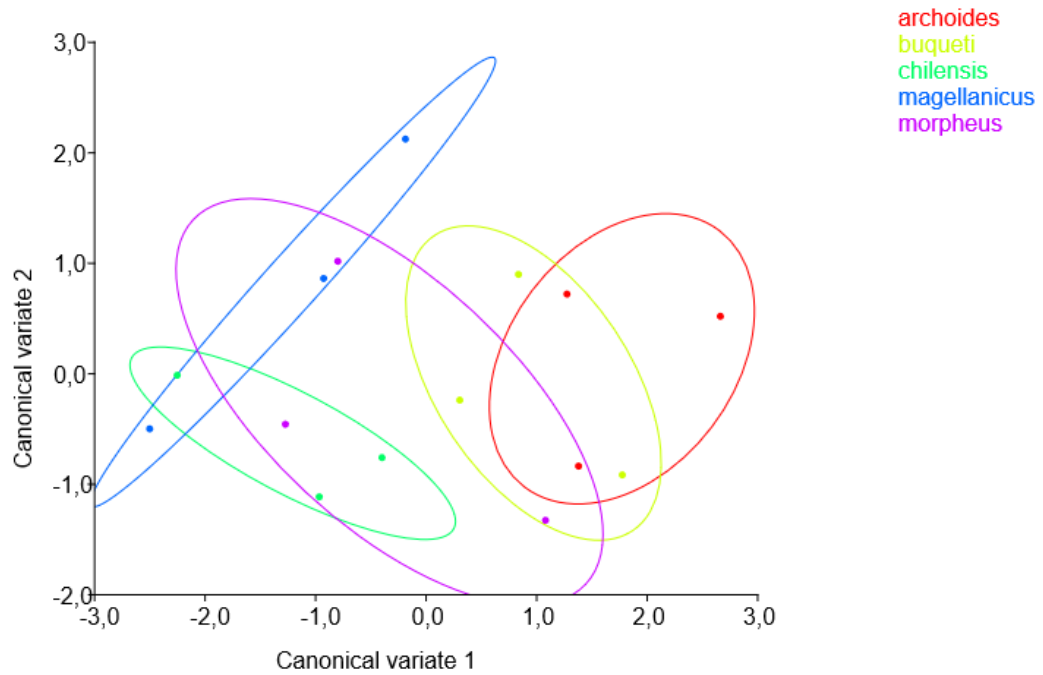


Figura 60: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos 4LM usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

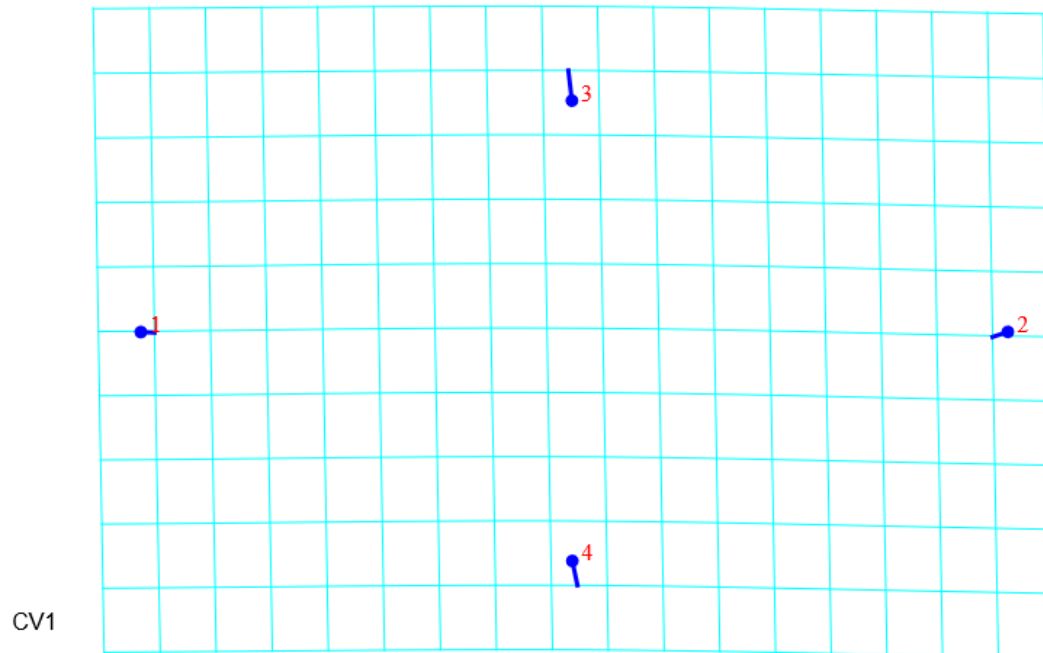


Figura 61: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis 4LM.

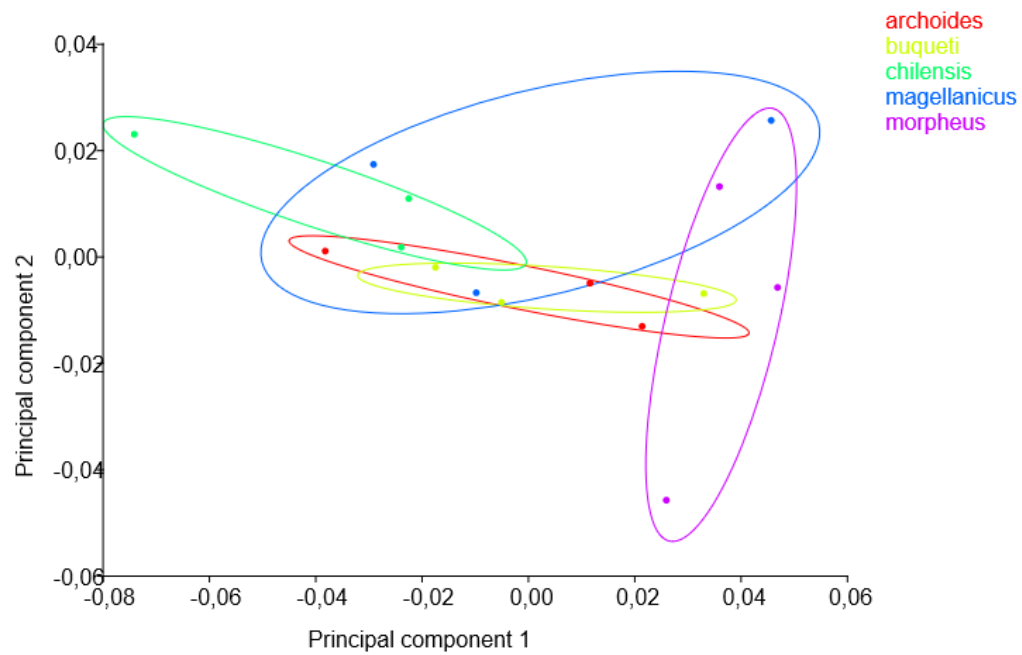


Figura 62: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos 6LM. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

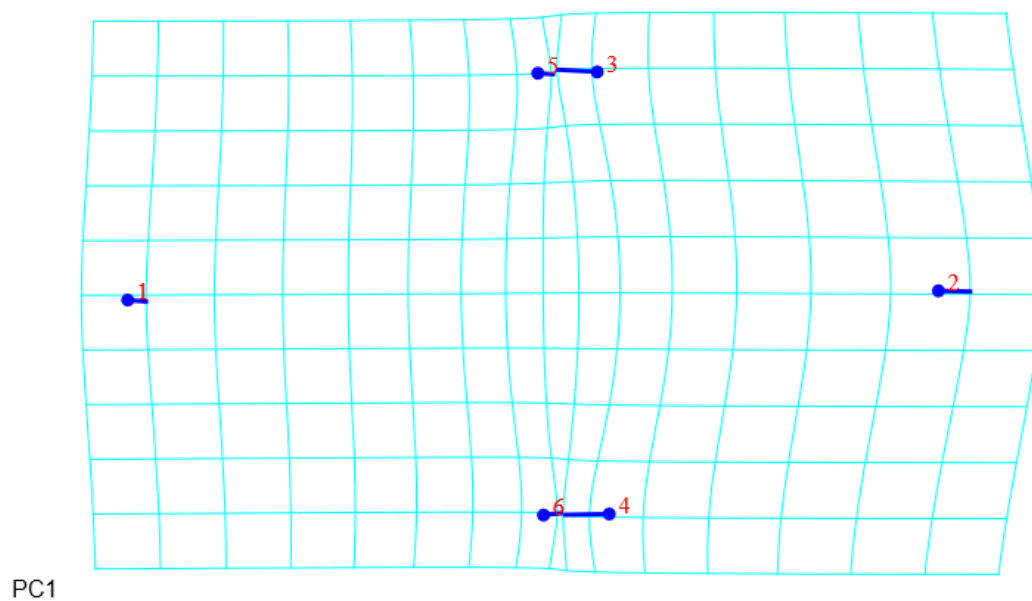


Figura 63: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos 6LM.

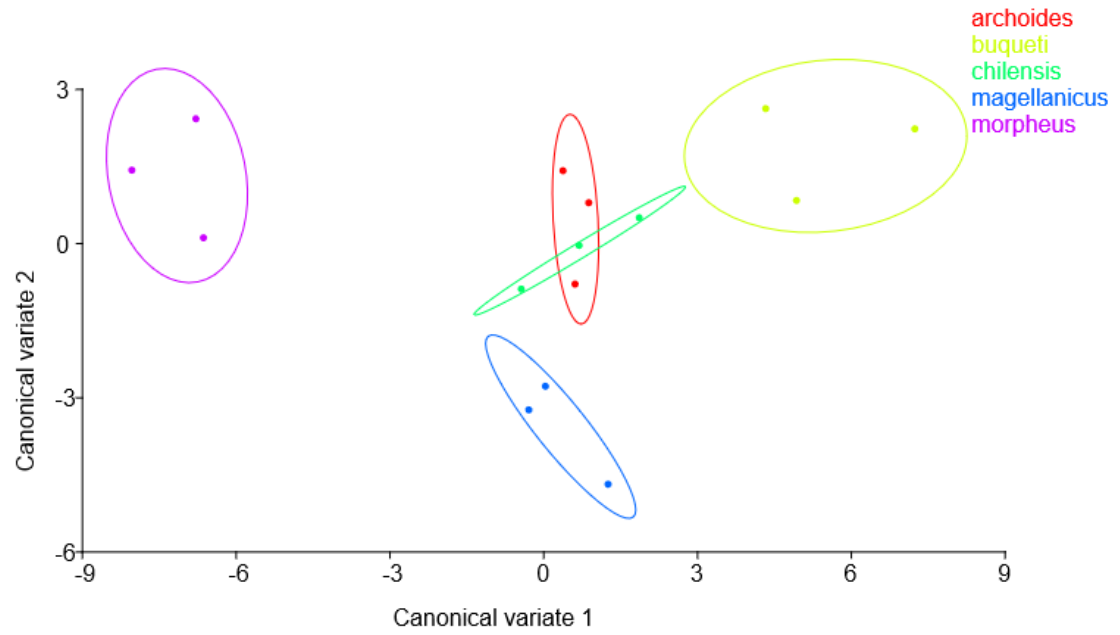


Figura 64: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos 6LM usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

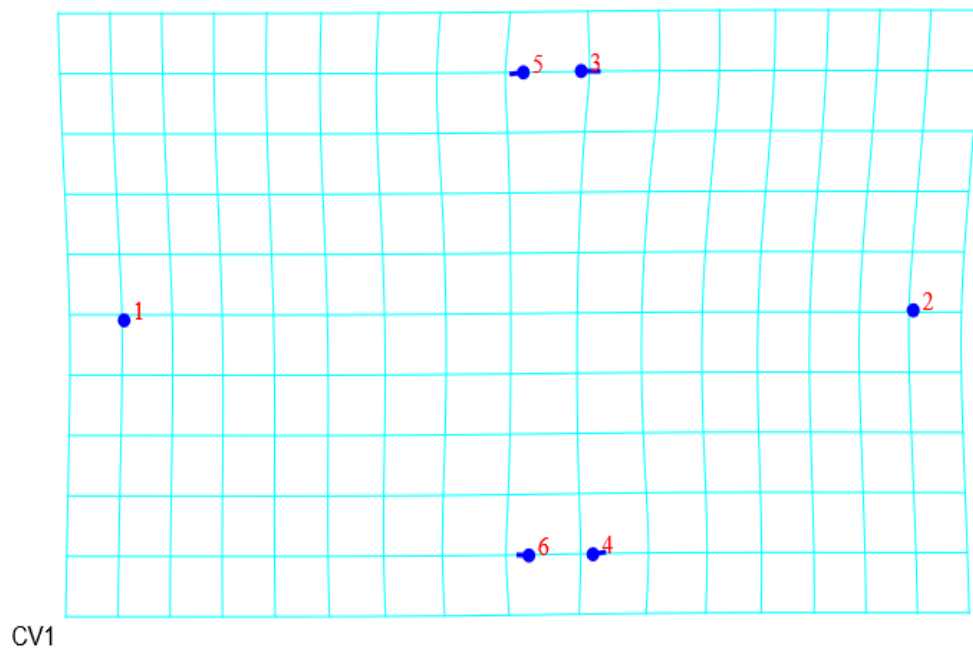


Figura 65: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis 6LM.

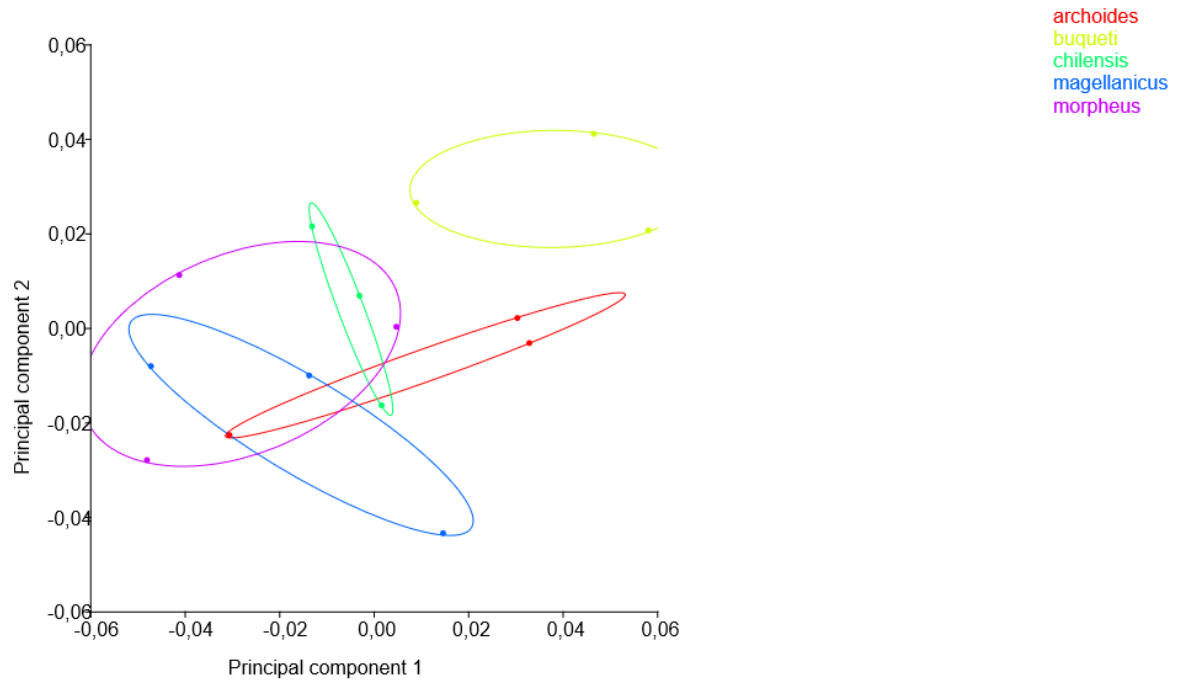


Figura 66: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos 10LM. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

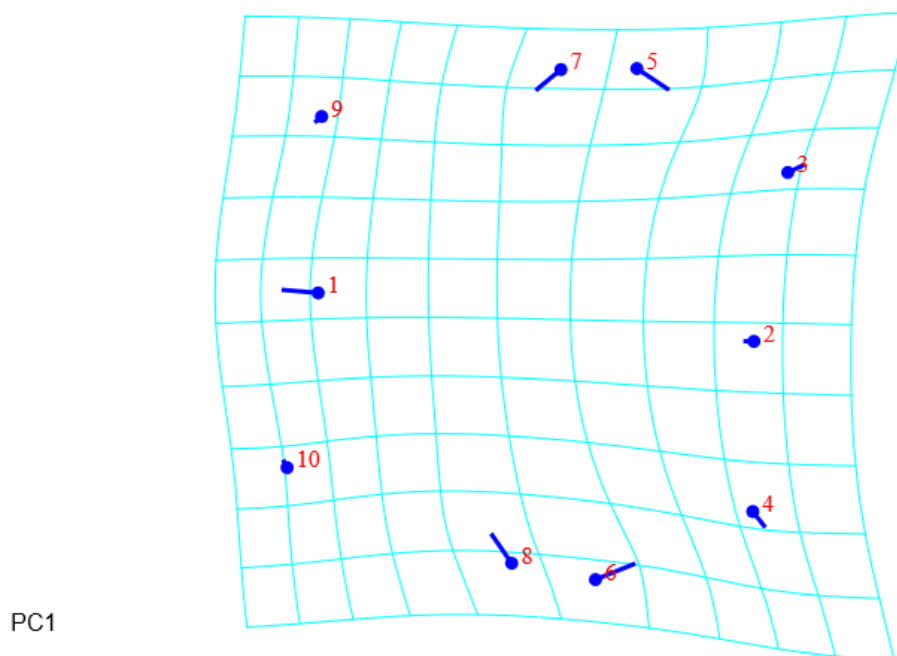


Figura 67: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos 10LM.

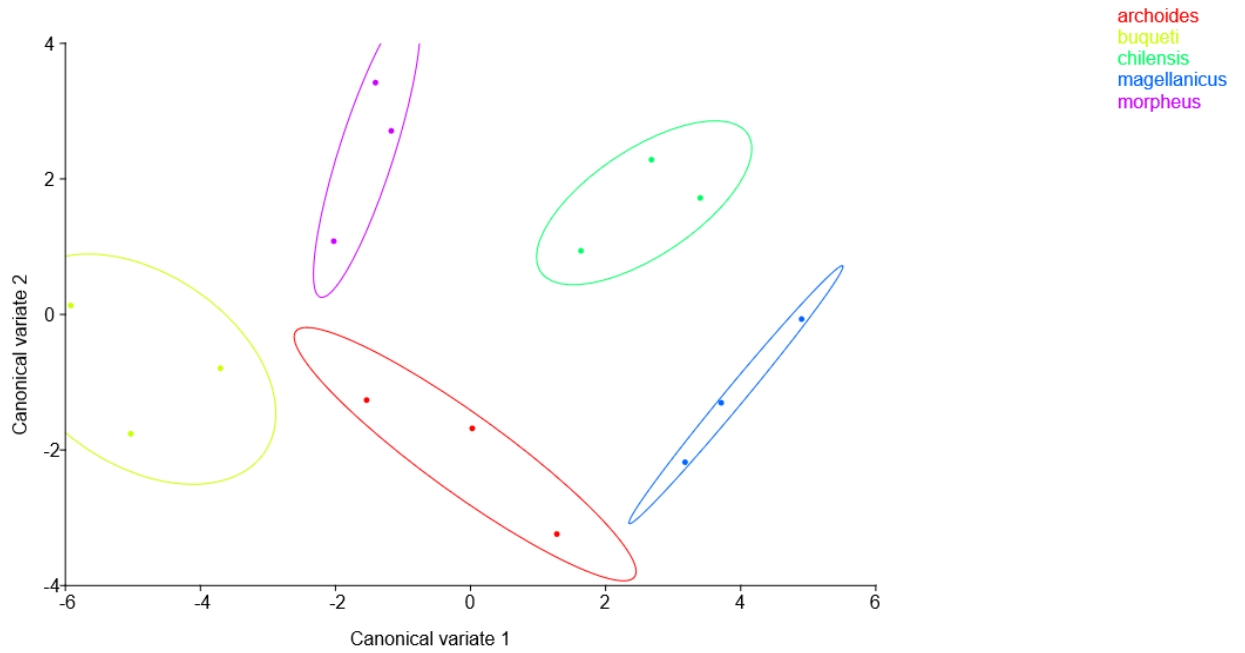


Figura 68: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos 10LM usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

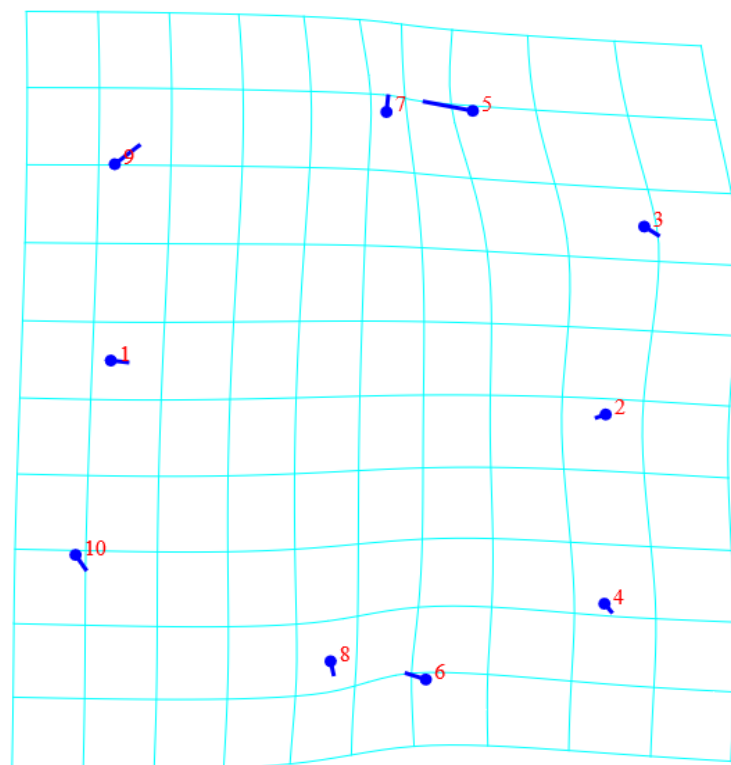


Figura 69: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis 10LM.

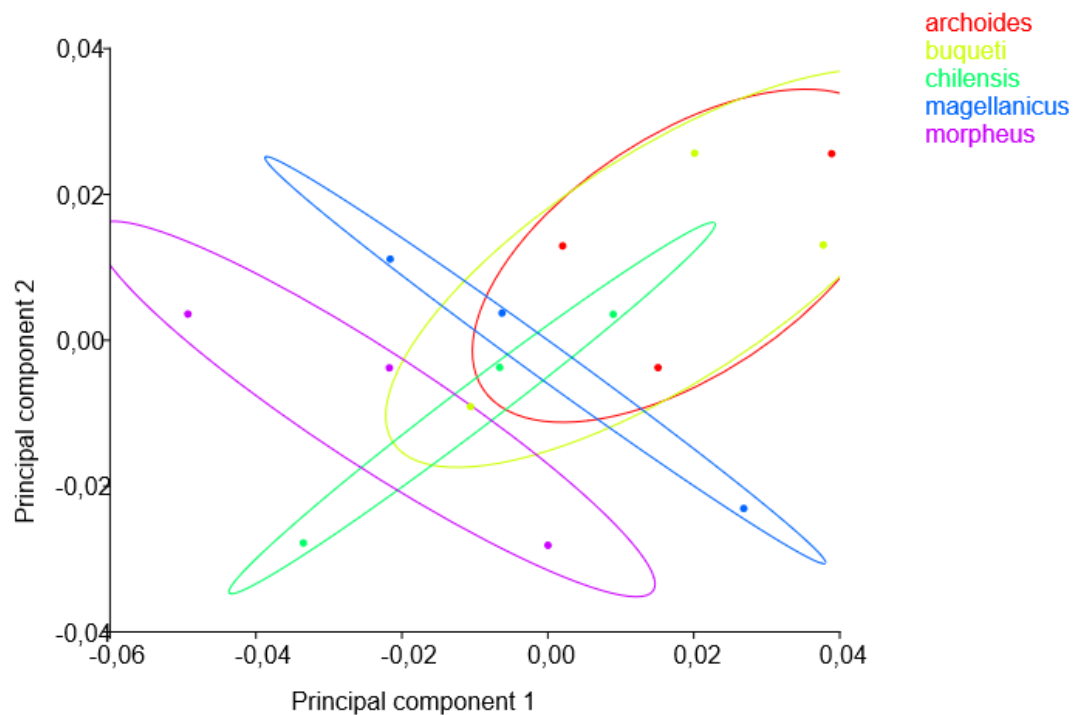


Figura 70: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos ILM. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

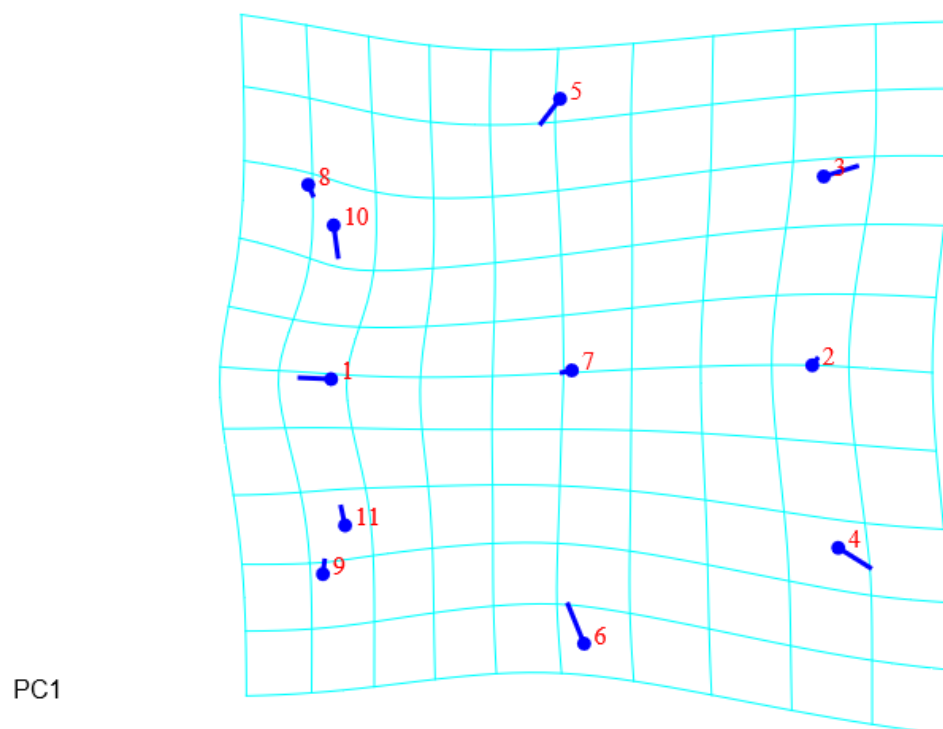


Figura 71: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos ILM.

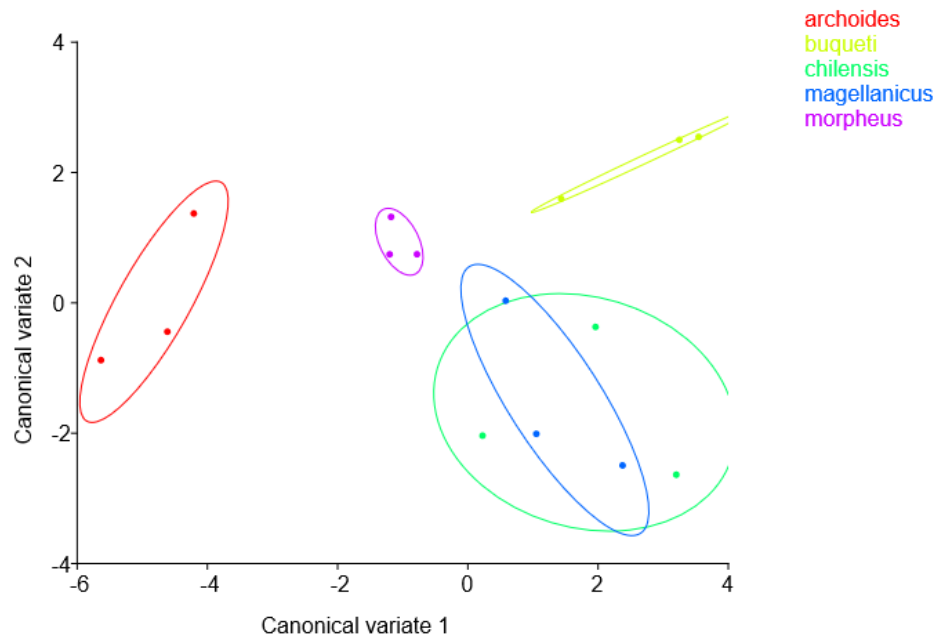


Figura 72: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos ILM usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

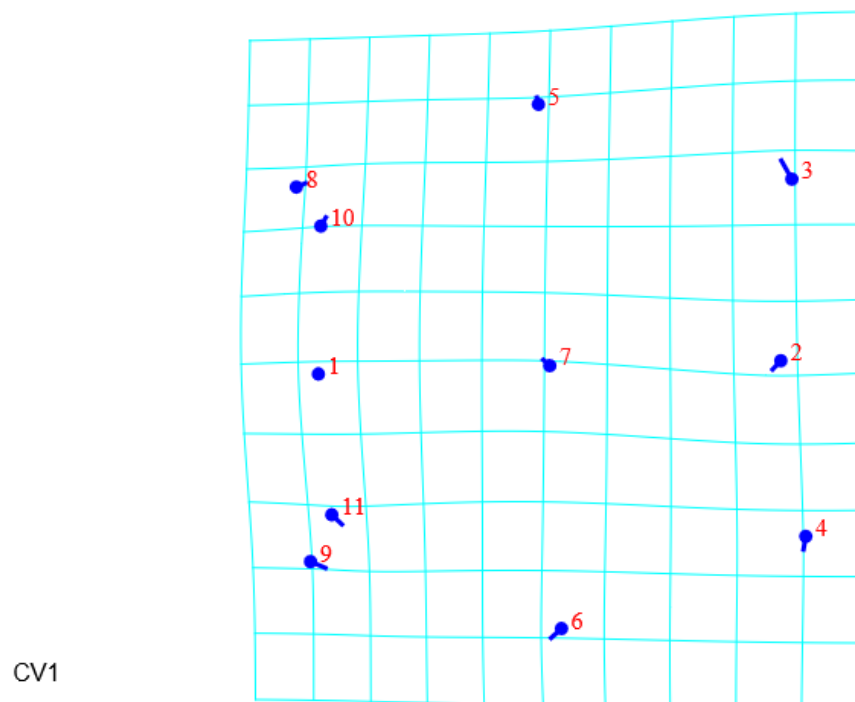


Figura 73: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis ILM.

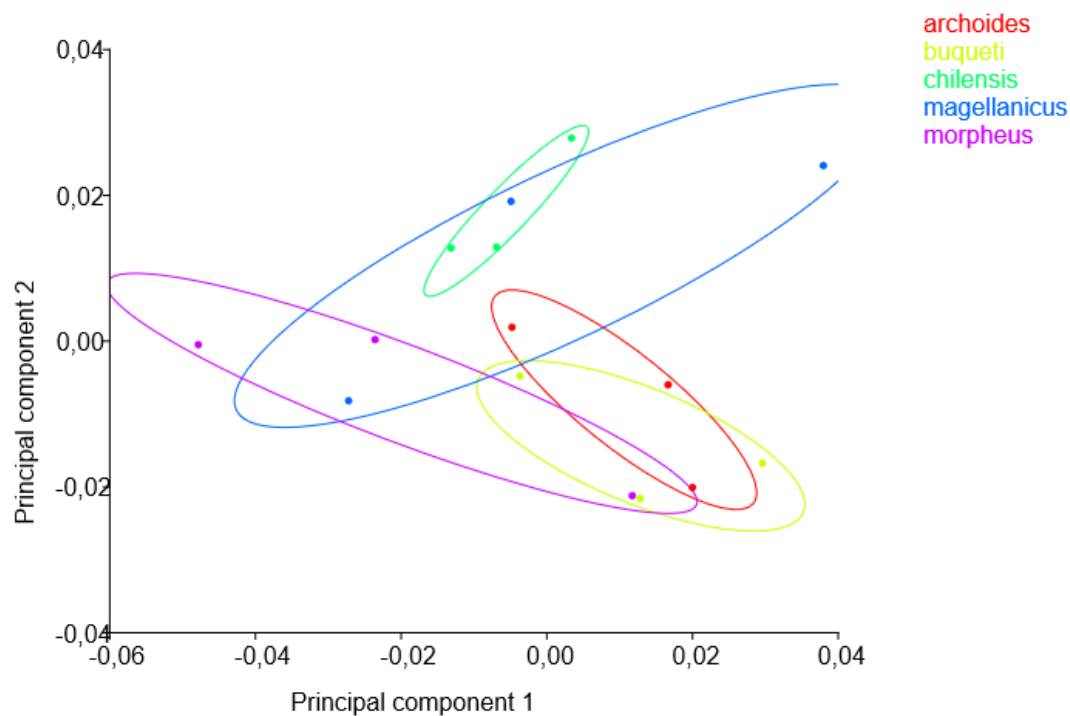


Figura 74: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos 11LM+A. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

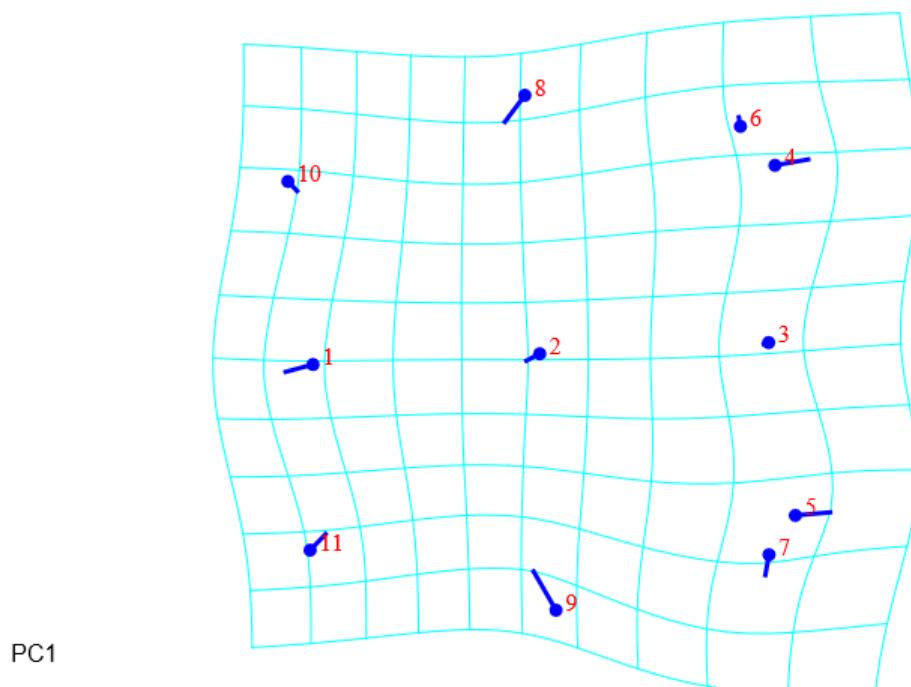


Figura 75: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos 11LM+A.

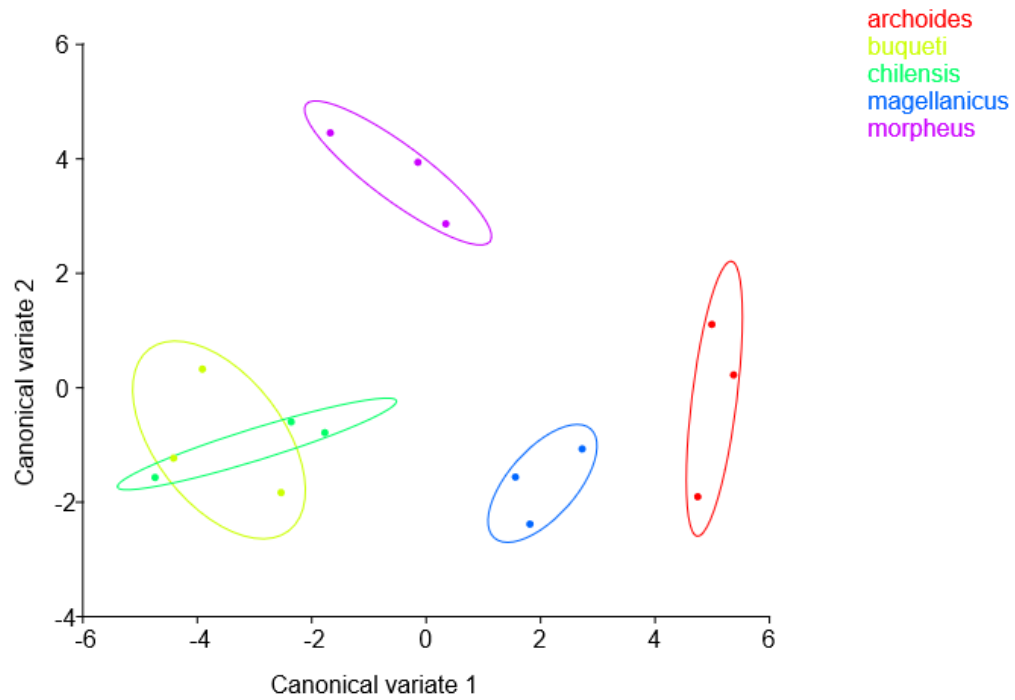


Figura 76: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos IILM+A usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.

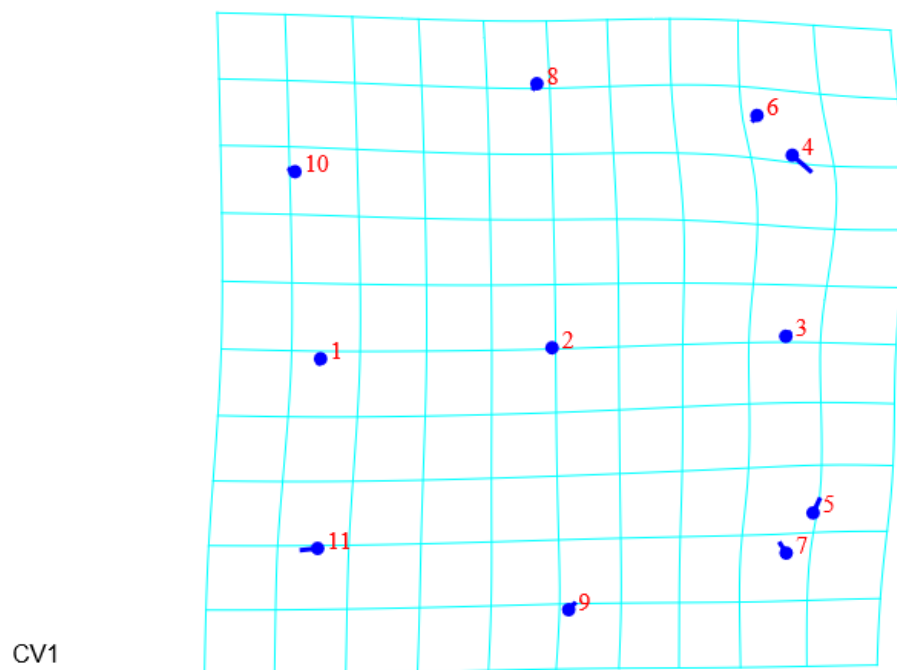


Figura 77: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis IILM+A.

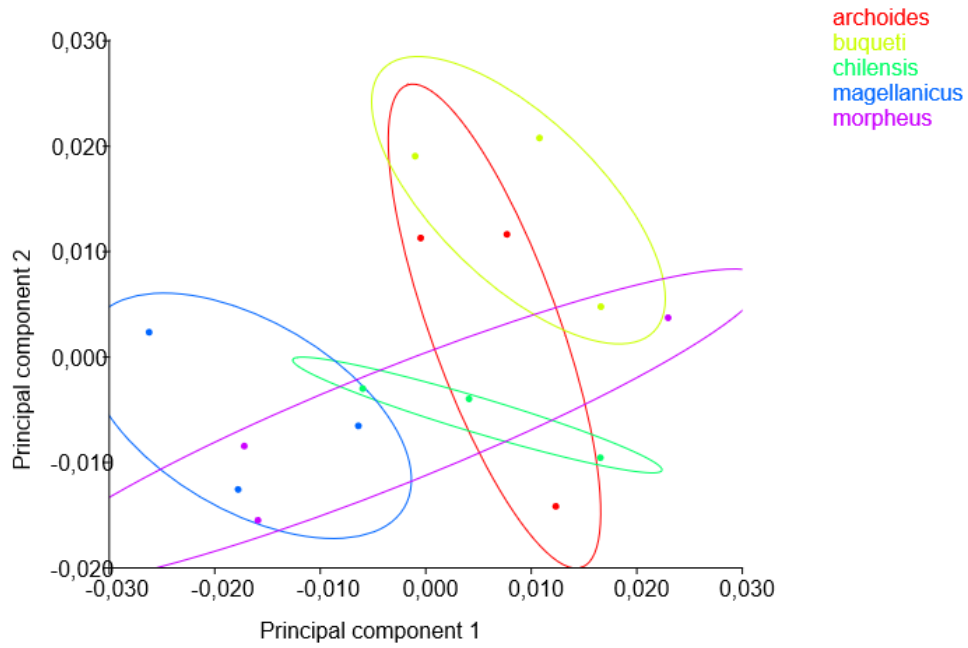
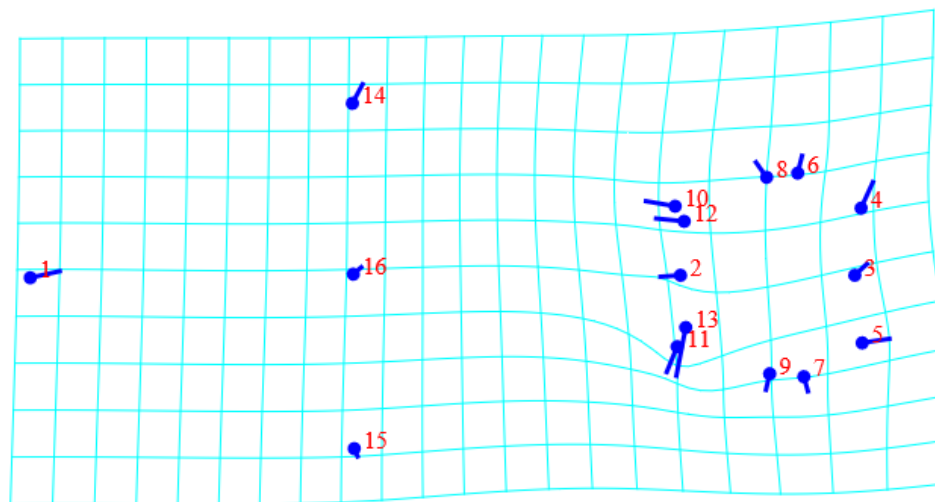


Figura 78: Representación de los datos en los dos primeros componentes principales del conjunto de puntos P+E. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.



PC1

Figura 79: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por los componentes principales del conjunto de puntos P+E.

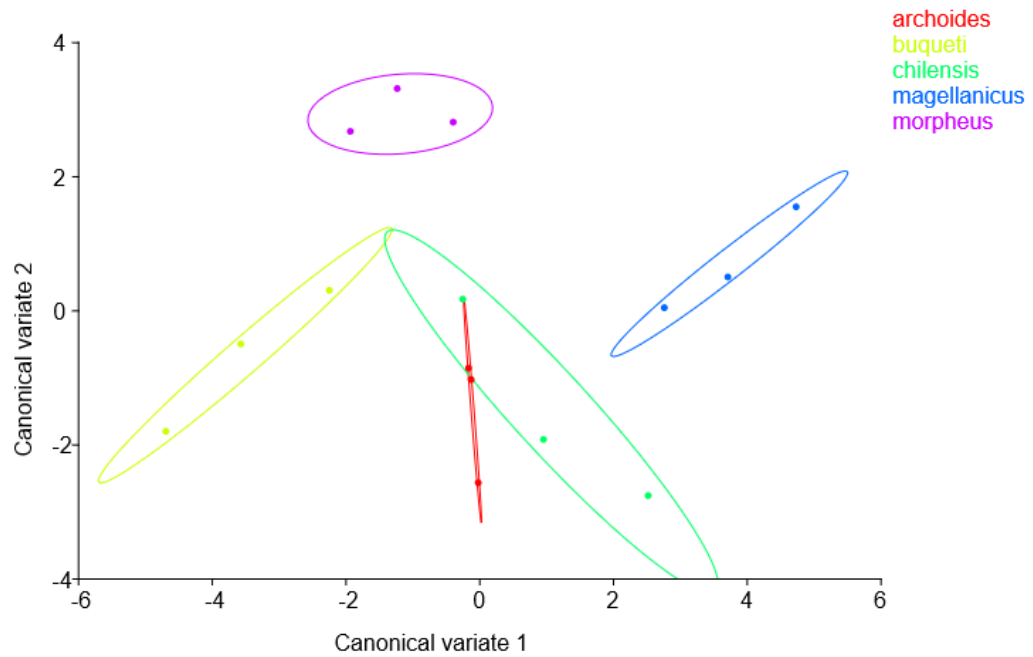
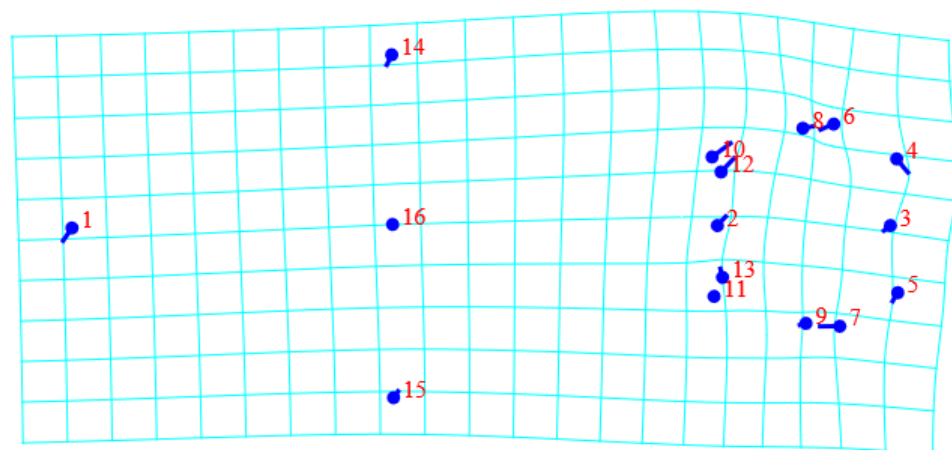


Figura 80: Análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos P+E usando como variable de agrupación las categorías taxonómicas. Los grupos taxonómicos se muestran diferenciados por el color. Los elipsoides agrupan a las muestras de un mismo grupo.



CV1

Figura 81: Plano de la variación de los *landmarks* explicada por el análisis de la varianza canónica del conjunto de puntos análisis P+E.



DISCUSIÓN





1 – Filogenia del género *Ceroglossus*

El objetivo principal de este trabajo consiste en realizar una filogenia molecular del género *Ceroglossus*, con el fin de determinar las controvertidas propuestas realizadas previamente acerca de las relaciones interespecíficas, y aclarar el estatus taxonómico de diversos taxones de identidad dudosa. Esta filogenia servirá como marco de trabajo para interpretar otros datos (fórmula cromosómica, coloración, distribución geográfica...) y así poder desvelar los mecanismos que han modelado la evolución de este género de coleópteros.

Los resultados apoyan la existencia de los cuatro principales grupos de especies definidos clásicamente en *Ceroglossus*, es decir, *C. darwini* + *C. magellanicus*, *C. suturalis*, *C. chilensis* y *C. buqueti*; sin embargo, *C. darwini* y *C. magellanicus* tendrían una separación suficiente como para ser considerados grupos diferentes. Así mismo, los resultados de las filogenias moleculares realizadas tanto con el fragmento mitocondrial ND5 como con el fragmento nuclear ITS1 apoyan la división de *Ceroglossus* en dos linajes, que se habrían separado hace algo menos de 10 millones de años: *C. magellanicus* + *C. darwini*, por un lado, y *C. suturalis* + *C. chilensis* + *C. buqueti* por el otro.

Por otro lado, todos los resultados apoyan la relegación de ciertas especies descritas recientemente a un estatus subespecífico, revelándose como linajes incluidos dentro de varias de las cinco especies principales. Así, la especie *C. archoides*, descrita por Rataj y Godeau (2010), se muestra como un linaje de *C. darwini*. Por otro lado, las especies *C. morpheus*, *C. ochsenii* y *C. guerini* quedarían incluidas dentro de *C. suturalis*.

Esto es debido principalmente a la confusión generada por el uso de caracteres poco apropiados para distinguir especies en este género, dada la alta variabilidad fenotípica dependiente en ocasiones más de la localidad que del linaje filogenético.

No obstante, los resultados obtenidos con los diferentes algoritmos de delimitación de especies apuntan a que la diversidad podría ser mayor a cinco grupos de especies, correspondiendo cada una de ellas a un grupo de especies íntimamente relacionadas. Si bien estos métodos tienden a sobredividir a los grupos de organismos, especialmente en aquellos casos en los que la estructura genética está muy marcada, en este caso encontramos que, incluso tomando la opción más conservadora proporcionada por los clústeres consenso, hay cierta división de entidades en cada uno de los cinco grupos de especies principales.



Estas divisiones tienen cierto grado de relación con la identificación morfológica y con la distribución geográfica. Sumando a esta evidencia la identidad genética, puesta de relieve tanto por los árboles filogenéticos como por las redes haplotípicas, podemos proponer la identidad de cada clúster consenso como una especie, sobre todo si usamos el concepto filogenético de especie (Cracraft, 1989). Este concepto reconoce como especie a cualquier grupo de organismos que comparten al menos un carácter derivado o apomórfico (no presente en sus ancestros o afines) y que descienden de un antepasado común.

Esta filogenia puede servir como punto de partida para la reinterpretación de los caracteres morfológicos tradicionalmente utilizados para la taxonomía de *Ceroglossus*, para crear finalmente un marco de referencia que clarifique la identificación de las especies de este género. Por ejemplo, Calosomini y Ceroglossini poseen carenas en las antenas de los machos. En *Ceroglossus*, las carenas se encuentran siempre presentes en el clado formado por los grupos de *C. chilensis*, *C. buqueti* y *C. suturalis*. Sin embargo, en el otro clado, formado por los grupos de *C. darwini* y *C. magellanicus* se encuentran reducidas o ausentes. Específicamente, han desaparecido en *C. magellanicus* y ciertas poblaciones de *C. darwini*, están reducidas en *C. speciosus*, pero se mantienen en *C. archoides*. Es remarcable el hecho de que *C. archoides*, definida como especie por Rataj y Godeau (2010) en parte debido a la presencia de este carácter, se muestre en el árbol dentro de *C. darwini*, donde las carenas se han perdido.



2 - Influencia de los ciclos climáticos en la evolución de *Ceroglossus*

A partir de las edades estimadas en los nodos del árbol filogenético (Figura 32) se deduce que las divergencias que originaron los cinco grupos de especies principales tuvieron lugar hace entre 9 y 5 millones de años. No es descartable que la creación de nuevos nichos propiciados por la estabilidad de la altitud de la Cordillera de los Andes haya contribuido a la generación de estos 5 grupos de especies. Posteriormente, hace unos 3,5 millones de años habría comenzado la radiación de los linajes de *C. buqueti* dando lugar a los 7 clusters detectados en el periodo que va entre 3,5 y 1 millón de años antes del presente. Los tres clusters de *C. chilensis* y los tres de *C. suturalis* se habrían originado entre 2 y 1 millón de años antes del presente, ya comenzado el Pleistoceno. Los dos clados de *C. darwini* se habrían originado hace 1 millón de años. Dentro de *C. magellanicus* únicamente se detecta un clúster consenso; sin embargo, en la figura se distinguen dos linajes que si son separados por los enfoques del algoritmo GMYC and igual que en *C. darwini* estos dos linajes se habrían separado hace 1 millón de años.

En todos los casos, las divergencias observadas dentro de cada uno de los clústeres consenso habrían tenido lugar en el periodo desde hace 1 millón de años hasta el presente. Este periodo se caracteriza por las fluctuaciones climáticas conocidas como glaciaciones del cuaternario. Las repetidas expansiones y retracciones de los hielos durante este periodo con los consiguientes movimientos de fauna tanto en altitud como en latitud podrían haber sido uno de los principales motores de generación de linajes recientes dentro de cada uno de los grandes clados. Uno de los efectos de las glaciaciones observables hoy en día en *Ceroglossus* es la ausencia de estos escarabajos en las zonas que estuvieron cubiertas por hielo durante el último periodo glaciario. Durante este periodo, extensas zonas de la superficie terrestre fueron ocupadas por casquetes de hielo, que al retirarse dejan erosionado el terreno por abrasión y la ausencia de suelo impide una recolonización rápida por los *Ceroglossus* debido a los requisitos de las larvas. Resulta llamativo observar el contraste entre la ausencia de colectas en estas zonas y la abundancia de individuos a escasos cientos de metros de estos límites. La escasa profundidad y desarrollo del suelo y la presencia de fragmentos de roca en el suelo observada al cavar para colocar las trampas ya era indicativo del resultado posterior.



3 - Evolución y taxonomía de los grupos de *Ceroglossus*

3.1 - *C. buqueti*

Dentro de este taxón se distinguen siete clústeres consenso. Dado que estos clústeres muestran una marcada estructuración genética de las subespecies morfológicas, así como de su distribución geográfica, se podría considerar que cada uno de ellos corresponde a una especie diferente.

Siguiendo el principio de prioridad del Código Internacional de Nomenclatura Zoológica, el clúster B5 sería el correspondiente a la auténtica *C. buqueti*, incluyendo las subespecies *C. b. buqueti*, *C. b. leopardalinus*, *C. b. solieri*, *C. b. andestus*, *C. b. arriegadai*, *C. b. cherquencoensis* y una subespecie aún no descrita (Rataj, com. pers.).

Por otro lado, el clúster B2 correspondería a la especie *C. snizeki*, incluyendo las subespecies *C. s. snizeki* y *C. s. lafquen*. El clúster B3, a su vez, sería la especie *C. relictus*, e incluiría a la subespecie aún no descrita (Rataj, com. pers.) *C. r. violaceocupreus*.

La subespecie morfológica *C. b. chiloensis* se halla dividida entre los clústeres B1 y B4. Entendiendo que los ejemplares presentes en el clúster B1 corresponden a los colectados en el continente, mientras que los individuos del clúster B4 fueron capturados en Chiloé, el clúster B4 sería *C. chiloensis* y el clúster B1 recibiría el nombre de *C. breuningi*. *C. chiloensis*, presente en localidades insulares, incluiría las subespecies *C. c. chiloensis*, *C. c. calvus*, *C. c. sybarita* y *C. c. magdalenaensis*. Por otro lado, la especie *C. breuningi* sería más continental y incluiría la subespecie *C. b. breuningi*, otra subespecie formada por los antiguos *C. b. chiloensis* continentales (que deberían recibir un nuevo nombre), otra subespecie aún no descrita, más unos pocos individuos de *C. b. violaceocupreus* y *C. b. regalis* que requerirían un nuevo examen para comprobar su identidad taxonómica.

La nomenclatura de los clústeres B6 y B7, escasos en ejemplares y cuya identificación es dudosa, quedaría pendiente de futuros estudios incluyendo más muestras.

Un hecho que llama la atención es que las especies más basales de este grupo (*C. buqueti* y los clústeres B6 y B7) muestran una distribución más septentrional, propia de climas más cálidos, mientras que las especies más derivadas (*C. breuningi*, *C. snizeki*, *C.*



relictus y *C. chiloensis*) ocuparían áreas más meridionales y frías. Esto podría indicar un proceso de expansión paulatina hacia el sur, o bien una extinción de los taxones más termófilos de las zonas meridionales durante las glaciaciones.

3.2 - *C. chilensis*

Los tres clústeres delimitados dentro de *C. chilensis* también corresponderían a tres especies distintas, distribuidas en un gradiente norte-sur. La especie más septentrional correspondería al clúster C2, formado por individuos indentificados como *C. cyanicollis* y *C. fallaciosus*. Aunque no poseemos ejemplares de *C. chilensis chilensis*, la distribución de esta subespecie correspondería con el área ocupada por este clado. Por lo tanto, C2 sería la auténtica *C. chilensis*, incluyendo al menos las subespecies *C. c. cyanicollis* y *C. c. fallaciosus*.

El clúster C1, más abundante en muestras y ocupando un área intermedia, correspondería a la especie *C. kraatzianus*, e incluiría las subespecies *C. k. kraatzianus*, *C. k. jaffrezici*, *C. k. gloriosus*, *C. k. villaerensis* y *C. k. rataji*.

La especie que comprendería el clúster C3, situado más hacia el sur, llevaría por nombre *C. solieri*, y estaría formada por *C. s. solieri*, *C. s. meridionalis* y *C. s. keithi*.

Dentro del clúster C1 quedarían varios ejemplares identificados como *C. c. solieri* que deberían ser reexaminados. También debería ser reexaminado el ejemplar de *C. c. kraatzianus* observado dentro del clúster C3.

La topología del árbol filogenético revela que inicialmente se separó *C. solieri*, más meridional y por lo tanto con preferencia hacia un clima más frío y húmedo. La divergencia entre *C. chilensis* y *C. kraatzianus* tuvo lugar posteriormente, ocupando *C. chilensis* los ambientes más cálidos y secos al norte de la zona habitada por *C. kraatzianus*. *C. chilensis* podría haber surgido como una colonización hacia el norte por parte de individuos más termófilos, o bien por especiación alopátrica tras la aparición de alguna barrera de tipo ecológico.

3.3 - *C. suturalis*

En este taxón se encuentran tres clústeres, que no corresponden a la división tradicional en especies establecida para este grupo. Las especies *C. morpheus*, *C. ochsenii* y *C. guerini* quedarían incluidas junto a *C. suturalis* en el clúster S1, siendo relegadas al estatus de subespecie con los nombres *C. s. morpheus*, *C. s. ochsenii* y *C. s. guerini*. Sería necesaria una revisión taxonómica de este grupo para aclarar el estatus de



las numerosas subespecies descritas, incluso recientemente (como *C. morpheus galiani* Rataj, 2013), dentro de cada uno de estos taxones.

Por otro lado, el clúster S2, distribuido en las zonas más meridionales, estaría formado por los ejemplares identificados como la subespecie *C. s. olivaceus* (que quedaría elevada a la especie *C. olivaceus*), más un par de posibles híbridos de esta subespecie con *C. s. suturalis*. Lo mismo sucede con el único ejemplar de *C. s. ancudanus* que forma el clúster S3, correspondiente ahora a la especie *C. ancudanus*. La secuencia analizada de *C. ancudanus*, que proviene del trabajo de Okamoto et al. (2001), ha sido obtenida de la base de datos GenBank, y no ha sido posible en los sucesivos viajes volver a colectar ejemplares en la misma localidad, lo que podría presagiar una extinción de este taxón representante de un linaje bien diferenciado.

Los haplotipos de *C. olivaceus* se ordenan en una forma de estrella, con un haplotipo central compartido por un número relativamente elevado de individuos rodeado de una serie de haplotipos más escasos. Esto es indicativo de una expansión reciente a partir de un cuello de botella, en el que únicamente habrían sobrevivido unos pocos individuos que, posteriormente, habrían dado lugar a la población actual.

3.4 - *C. darwini*

Dentro de este grupo, los ejemplares identificados como *C. darwini* y *C. speciosus* corresponden con los dos clústeres delimitados, salvo algunos ejemplares posiblemente mal identificados como *C. speciosus* localizados dentro de *C. darwini*.

En *C. darwini* no se aprecia la identidad de las subespecies descritas como clados monofiléticos en el árbol ni como grupos separados en la red haplotípica. Por lo tanto, es necesario reevaluar taxonómicamente las subespecies que forman *C. darwini*, de forma que se definan los linajes naturales monofiléticos procedentes de ancestros comunes.

Así mismo, también se han encontrado dentro de este grupo dos subespecies de *C. magellanicus*: *C. m. specisiformis* y una subespecie no descrita. Ambas deberían ser descritas de nuevo como subespecies de *C. darwini*.

3.5 - *C. magellanicus*

Todas las muestras de *C. magellanicus* formarían un único clúster consenso, correspondiente a esa especie. Al igual que en *C. darwini*, no existe una correspondencia clara entre subespecies morfológicas y clados en el árbol o grupos en la red haplotípica.



Llama la atención la inclusión de varios ejemplares identificados inicialmente como *C. darwini varians*, que podrían formar parte de la subespecie posteriormente descrita como *C. magellanicus varians* (Rataj, 2012).



4 - Morfometría en *Ceroglossus*

Debido a la falta de información precisa aportada por los caracteres tradicionalmente usados para el diagnóstico taxonómico de *Ceroglossus*, como el edeago o las carenas de los artejos antenares, se hacía necesaria la búsqueda de métodos cuantitativos para establecer los límites de variación de puntos claves en la morfología de este género, que posteriormente puedan facilitar la identificación de las diferentes especies de *Ceroglossus*.

De todas las combinaciones de puntos que se han analizado, la mejor separación de los taxones de acuerdo a la delimitación tradicional de especies corresponde al análisis que incluyó los *landmarks* combinados de las visiones dorsales del pronoto y los élitros, y también únicamente con los 10 *landmarks* del pronoto. Sin embargo, esta separación únicamente se recuperó en el análisis de la varianza canónica. El resto de combinaciones que se han analizado no han producido resultados concluyentes, ya que, en el mejor de los casos, sólo han separado alguno de los taxones del resto.

La inclusión de más ejemplares, procedentes de más poblaciones, en cada uno de los grupos, e incluyendo todas las especies delimitadas por los métodos moleculares, permitirá comprobar la bondad de estos métodos. No obstante, estos resultados ya indican que los futuros estudios deberían centrarse en los caracteres que delimitan la forma del pronoto, ya que proporcionan una herramienta objetiva y relativamente sólida para discernir los diferentes grupos taxonómicos del género *Ceroglossus*.



El aumento en el número cromosómico en estas dos especies sería debido a la presencia de ADN repetitivo tal como describen Galián et al. (1996).

Este incremento en el número de cromosomas por procesos de fisión y acumulación de ADN repetitivo podría haber tenido un efecto sobre estas especies de *Ceroglossus*, permitiendo un mayor número de combinaciones alélicas que se traducirían en una mayor plasticidad y capacidad de adaptación a cambios ambientales.

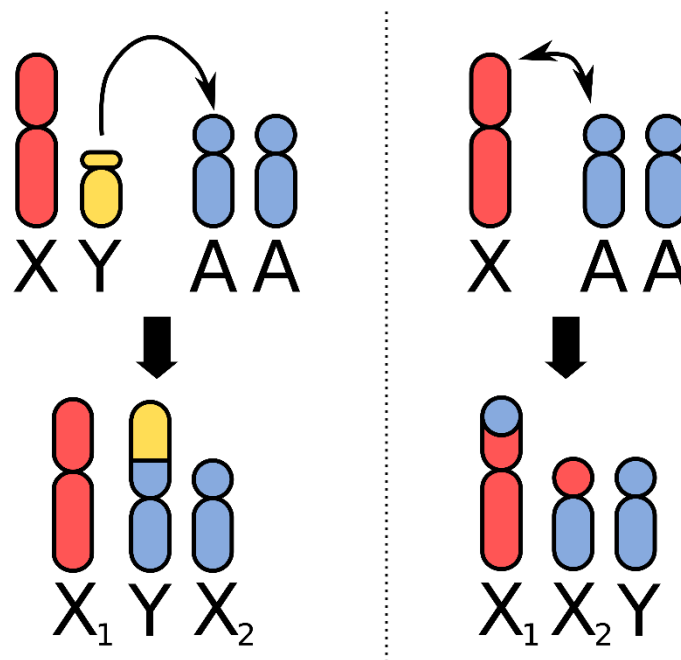


Figura 83: Hipótesis alternativas sobre el origen del trivalente de *C. chilensis*. Izquierda: a partir de un cariotipo 40+XY por fusión del cromosoma Y a un autosoma. Derecha: a partir de un cariotipo 40+X por translocación recíproca entre el cromosoma X y un autosoma.



6 - Consecuencias de la deforestación en el género *Ceroglossus*

Según Laurent Rataj (com. pers.), existen dos especies pertenecientes al grupo *C. suturalis* en peligro de extinción, ya que sus biotopos están disminuyendo por la deforestación y están exclusivamente confinadas a unas zonas determinadas por poseer una alta especificidad de nichos: *C. suturalis guerini*, perteneciente a Máfil (una comuna de la Provincia de Valdivia, en la Región de los Ríos, cuya economía se sustenta principalmente en la silvicultura) y *C. suturalis morpheus*, que existe alrededor de las montañas de Aleucopi y Cumilelfu al norte de Puacho (en la Comuna de San Juan de la Provincia de Osorno, donde la actividad productiva es casi en su totalidad agrícola, pesquera y forestal). Especialmente amenazados están los biotopos de las zonas húmedas entre Llico y Parga, en la Comuna de Fresia (Provincia de Llanquihue, Región de Los Lagos), donde la disminución de la superficie de bosque nativo del norte asciende a 8.368 hectáreas, correspondiendo un 57% a habilitación de terrenos agropecuarios y el resto a sustitución por plantaciones (www.profesorenlinea.cl/Chilegeografia/). Este es el sitio típico de la subespecie *C. suturalis brevis*, que está en consecuencia amenazada.

Se han propuesto algunos sitios que merecen la declaración como Reservas de la Biodiversidad, para hacer frente a la creciente degradación por diversos factores, principalmente por la tala descontrolada del bosque nativo. Por ejemplo, un área situada 10 km al noreste de Tirúa, y 15 km al sureste desde Tirúa, que forma parte de la Provincia de Arauco y de la Región del Bio Bío, donde las principales actividades locales son industria forestal, agricultura y la pesca artesanal. En este sector la entomofauna es extremadamente rica y endémica, aunque el 95% del bosque nativo se ha sustituido por plantaciones de *Eucalyptus* y *Pinus*. En los pequeños arbustos que aún quedaban se descubrieron nuevas subespecies en 2006, 2008 y 2009: *C. chilensis rataji*, *C. buqueti oblitus*, *C. magellanicus bimarginalis* y *C. magellanicus ignescens*. Esta última subespecie se halla posiblemente en grave peligro de extinción.

Hay un gran interés en crear una reserva en esta región debido a que las zonas naturales están desapareciendo demasiado rápido, y no existe ninguna figura de protección adecuada. Únicamente está declarado el Monumento Natural Contulmo, que protege una superficie de 82 hectáreas de bosque con añosos árboles nativos, cubiertos por plantas epifitas (helechos). Este paisaje era el que existía en toda esta zona, hoy sólo quedan estas hectáreas protegidas por CONAF y el Parque Nacional



Nahuelbuta, con una extensión de 6.832 hectáreas, y que se caracteriza por presentar grandes bosques de araucarias, con ejemplares de edades estimadas cercanas a los 2.000 años (www.chilebosque.cl/tree/aarau.html).

Otra zona donde se debería de priorizar la conservación es el Sector al norte de Pucatrihue, cerca de la Bahía Mansa en Caleta El Manzano, donde los propietarios están talando el bosque muy rápidamente. La fauna de este sector es desconocida en un 90%, y los bosques pueden ser completamente destruidos en los próximos 5 años. Las autoridades chilenas deberían involucrar a los propietarios para mantener una parte de sus propiedades en estado natural, mediante los instrumentos económicos y/o administrativos que consideren oportunos.

Toda la vertiente oeste de la cordillera de la costa contiene una gran cantidad de especies endémicas de animales. Su valor faunístico es muy superior al del valle central. Dado su vejez, la eliminación de una pequeña superficie de la zona costera supondría una gran pérdida de la biodiversidad. El lugar más importante es el bosque 20 km al oeste de Hueyusca, donde conviven *C. relictus relictus* y *C. magellanicus speciosiformis*. Este sector, relativamente bien conservado, nos muestra cómo era la biodiversidad hace 17.000 años. Esta es una región donde el bosque no ha cambiado desde hace mucho tiempo, y podría ser un buen argumento para crear una reserva natural.

Al oeste de Futrono (al norte del Lago Ranco), la mayor parte de los bosques están siendo sustituidos por prados. Los últimos bosques naturales deberían ser protegidos para asegurar la supervivencia de una parte de la fauna endémica de esta región turística. Este bosque húmedo contiene nuevas subespecies en proceso de descripción (*C. darwini varians* y *C. suturalis nigripes*). La presencia de estos nuevos taxones es un buen argumento para demostrar la gran singularidad de este lugar.

El bosque donde conviven *C. archoides* y *C. buqueti leopardalinus* se ha incluido recientemente en la nueva Reserva Costera Valdiviana. Este lugar es uno de los bosques viejos más notables de la Cordillera Pelada (al oeste del Parque Nacional Alerce Costero). La protección de esta zona es de gran interés en cuanto a la caracterización de su biodiversidad.

Finalmente, cabe mencionar las implicaciones de una buena taxonomía del género *Ceroglossus* en relación con la conservación. La clarificación del panorama taxonómico es una tarea urgente, ya que, debido al avance de la deforestación de los principales bosques nativos chilenos, donde habita este género, es posible que se pierdan taxones todavía sin identificar o se pierdan taxones únicos que, por una mala clasificación, se creían comunes en otras zonas. Por tanto, la búsqueda de caracteres que faciliten la identificación de los taxones de *Ceroglossus* y lleven al establecimiento de



una taxonomía fundamentada del género son importantes a la hora de proponer áreas prioritarias de conservación. Por extensión, se puede indicar que la existencia de taxones específicos y subespecíficos ligados a nichos ecológicos particulares y la consecuente protección de éstos incidirían positivamente en la protección de otros grupos de organismos ligados a dichos nichos.

Por otro lado, convendría llevar a cabo estrategias de restauración y recuperación de áreas degradadas, lo cual a su vez requiere de un estudio de las estrategias que utilizan las diferentes especies para colonizar las diferentes condiciones de sitio que se han visto alteradas. Debido a los múltiples impactos que produce la deforestación se propone focalizar los incentivos estatales en áreas con altos niveles de deforestación y pobreza, presencia de especies amenazadas y menor disponibilidad de agua desde las cuencas. Igualmente, sería conveniente priorizar la conectividad de las actuales áreas protegidas y el desarrollo de un sistema de fiscalización eficaz para el manejo de los bosques, el cual considere un monitoreo permanente con uso de tecnologías avanzadas.



CONCLUSIONES GENERALES





Las conclusiones generales de esta tesis son:

1. Los análisis filogenéticos con ND5 e ITS1 apoyan la existencia de los cinco principales grupos de especies definidos clásicamente en *Ceroglossus*: *C. darwini*, *C. magellanicus*, *C. buqueti*, *C. chilensis* y *C. suturalis*.
2. Los métodos de delimitación de especies apuntan a que la diversidad podría ser mayor de las diez especies descritas, correspondiendo cada una de ellas a un grupo de especies íntimamente relacionadas.
3. La especie *C. archoides* se muestra como una subespecie de *C. darwini*.
4. Las especies *C. morpheus*, *C. ochsenii* y *C. guerini* quedan incluidas dentro de *C. suturalis*.
5. Se confirma la validez de *C. speciosus* como especie válida.
6. Los cinco grupos principales de especies se originaron entre hace 9 y 5 millones de años, mientras que la diversificación dentro de cada uno de ellos comenzó hace menos de 2 millones de años.
7. El grupo de *C. buqueti* estaría compuesto por siete especies: *C. buqueti*, *C. snizeki*, *C. relictus*, *C. chiloensis*, *C. breuningi*, y dos especies por definir.
8. El grupo de *C. chilensis* está formado por *C. chilensis*, *C. kraatzianus* y *C. solieri*.
9. El grupo de *C. suturalis* contaría, aparte de su especie nominal, con *C. olivaceus* y *C. ancudanus*.
10. El grupo de *C. darwini* contendría además a la especie *C. speciosus*.
11. La especie *C. magellanicus* forma su propio grupo.
12. Se propone que el uso de una serie de puntos basados en la visión dorsal del pronoto es suficientemente útil para discernir los principales grupos de especies.
13. La interpretación de los datos cromosómicos sobre la filogenia revela una tendencia al incremento numérico en los linajes de *C. chilensis* y *C. buqueti*.





BIBLIOGRAFÍA

- Agapow, P. M., Bininda-Emonds, O. R., Crandall, K. A., Gittleman, J. L., Mace, G. M., Marshall, J. C., & Purvis, A. (2004). The impact of species concept on biodiversity studies. *The Quarterly Review of Biology*, 79(2), 161-179.
- Andújar, C., Serrano, J., & Gómez-Zurita, J. (2012). Winding up the molecular clock in the genus *Carabus* (Coleoptera: Carabidae): assessment of methodological decisions on rate and node age estimation. *BMC Evolutionary Biology*, 12(1), 40.
- Armenteras, D., Rudas, G., Rodriguez, N., Sua, S., & Romero, M. (2006). Patterns and causes of deforestation in the Colombian Amazon. *Ecological Indicators*, 6(2), 353-368.
- Armesto, J. J., Rozzi, R., Smith-Ramirez, C., & Arroyo, M. T. K. (1998). Conservation targets in South American temperate forests. *Science*, 282(5392), 1271-1272.
- Arroyo, M. K., Cavieres, L., Peñaloza, A., Riveros, M., & Faggi, A. M. (1996). Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de riqueza de especies en la flora del bosque lluvioso templado de Sudamérica. En: Armesto, J., Villagrán, C., Arroyo, M. T. K. (eds). *Ecología de los Bosques Nativos de Chile*. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. p. 71-99.
- Avice, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Boston.
- Avice, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A., & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18(1), 489-522.
- Ayala, F. J., & Coluzzi, M. (2005). Chromosome speciation: humans, *Drosophila*, and mosquitoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102(1), 6535-6542.
- Benitez, D. L. F., Vidal, M., Briones, R., & Jerez, V. (2010). Sexual dimorphism and morphological variation in populations of *Ceroglossus chilensis* (Eschscholtz, 1829) (Coleoptera, Carabidae). *Journal of the Entomological Research Society*, 12(2), 87-95.



- Bisby, F. A., Coddington, J., Thorpe, J. P., Smartt, J., Hengeveld, R., Edwards, P. J., & Duffield, S. J. (1995). Characterization of biodiversity. In: V.H. Heywood (Ed.) *Global Biodiversity Assessment*, pp. 21-106. Cambridge University Press, Cambridge.
- Bocak, L., Barton, C., Crampton-Platt, A., Chesters, D., Ahrens, D., & Vogler, A. P. (2014). Building the Coleoptera tree-of-life for >8000 species: composition of public DNA data and fit with Linnaean classification. *Systematic Entomology*, 39(1), 97-110.
- Bookstein, F. L. (1996). Landmark methods for forms without landmarks: localizing group differences in outline shape. In: *Proceedings of the Workshop on Mathematical Methods in Biomedical Image Analysis* (pp. 279-289). IEEE.
- Bouchard, P., Bousquet, Y., Davies, A. E., Alonso-Zarazaga, M. A., Lawrence, J. F., Lyal, C. H., Newton, A. F., Reid, C. A. M., Schmitt, M., Ślipiński, S. A. & Smith, A. B. (2011). Family-group names in Coleoptera (Insecta). *ZooKeys*, (88), 1.
- Brown, W. M., George, M., & Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76(4), 1967-1971.
- Bush, G. L., Case, S. M., Wilson, A. C., & Patton, J. L. (1977). Rapid speciation and chromosomal evolution in mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(9), 3942-3946.
- Carson, H. L., & Kaneshiro, K. Y. (1976). *Drosophila* of Hawaii: systematics and ecological genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 7(1), 311-345.
- Carstens, B. C., & Dewey, T. A. (2010). Species delimitation using a combined coalescent and information-theoretic approach: an example from North American *Myotis* bats. *Systematic Biology*, 59(4), 400-414.
- Carstens, B. C., Pelletier, T. A., Reid, N. M., & Satler, J. D. (2013). How to fail at species delimitation. *Molecular Ecology*, 22(17), 4369-4383.
- Chapman, A. D. (2009). *Numbers of living species in Australia and the world*. Report for the Australian Biological Resources Study, Canberra.
- Choi, S. C., & Hey, J. (2011). Joint inference of population assignment and demographic history. *Genetics*, 189(2), 561-577.
- Chong-Díaz, G., Mendoza, M., García-Veigas, J., Pueyo, J. J., & Turner, P. (1999). Evolution and geochemical signatures in a Neogene forearc evaporitic basin: the



-
- Salar Grande (Central Andes of Chile). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 151(1), 39-54.
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Della Torre, A., Di Deco, M. A., & Petrarca, V. (2002). A polytene chromosome analysis of the *Anopheles gambiae* species complex. *Science*, 298(5597), 1415-1418.
- Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. *Current ornithology*, 1(4), 159-187.
- Cracraft, J. (1989) Speciation and its ontology: the empirical consequences of alternative species concepts for understanding patterns and processes of differentiation. In: Otte, D., & Endler, J. A. (eds.) *Speciation and its Consequences*, pp. 28 – 59. Sinauer, Sunderland, MA.
- Crowson, R. A. (1960). The phylogeny of Coleoptera. *Annual Review of Entomology*, 5(1), 111-134.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), 772-772.
- De Haro, J. J., & Melic, A. (1998). Taxonomía, sistemática, filogenia y clasificaciones. *Boletín de la Sociedad Entomológica Aragonesa*, 23, 57-58.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56(6), 879-886.
- DeSalle, R., Egan, M. G., & Siddall, M. (2005). The unholy trinity: taxonomy, species delimitation and DNA barcoding. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 360(1462), 1905-1916.
- Deuve, T. (2004). Phylogénie et classification du genre *Carabus* Linné, 1758. Le point des connaissances actuelles (Coleoptera, Carabidae). *Bulletin de la Société Entomologique de France*, 109(1), 5-39.
- Dinerstein, E., Olson, D. M., Graham, D. J., Webster, A. L., Primm, S. A., Bookbinder, M. P., & Ledec, G. (1995). Una evaluación del estado de conservación de las ecoregiones terrestres de América Latina y el Caribe. *World Bank, Washington, DC*.
- Donoso, C. (1994). Bosques templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Segunda Edición. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
-



- Drummond, A. J., Ashton, B., Buxton, S., Cheung, M., Cooper, A., Heled, J., Kearse, M., Moir, R., Stones-Havas, S., Sturrock, S., Thierer, T., and Wilson, A. (2010). Geneious v5.1. Available at: <http://www.geneious.com>.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Dryden, I. L., & Mardia, K. V. (2016). *Statistical Shape Analysis: With Applications in R*. John Wiley & Sons.
- Echeverria, C., Coomes, D. A., Hall, M., & Newton, A. C. (2008). Spatially explicit models to analyze forest loss and fragmentation between 1976 and 2020 in southern Chile. *Ecological Modelling*, 212(3), 439-449.
- Echeverria, C., Coomes, D., Salas, J., Rey-Benayas, J. M., Lara, A., & Newton, A. (2006). Rapid deforestation and fragmentation of Chilean temperate forests. *Biological Conservation*, 130(4), 481-494.
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 32(5), 1792-1797.
- Ence, D. D., & Carstens, B. C. (2011). SpedeSTEM: a rapid and accurate method for species delimitation. *Molecular Ecology Resources*, 11(3), 473-480.
- Erwin, T. L. (1982). Tropical forests: their richness in Coleoptera and other arthropod species. *The Coleopterists' Bulletin*, 36(1), 74-75.
- Felsenstein, J. (1978). Cases in which parsimony or compatibility methods will be positively misleading. *Systematic Zoology*, 27(4), 401-410.
- Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution*, 17(6), 368-376.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39(4), 783-791.
- Felsenstein, J., & Kishino, H. (1993). Is there something wrong with the bootstrap on phylogenies? A reply to Hillis and Bull. *Systematic Biology*, 42(2), 193-200.
- Fitch, W. M. (1971). Toward defining the course of evolution: minimum change for a specific tree topology. *Systematic Biology*, 20(4), 406-416.
- Fujisawa, T., & Barraclough, T. G. (2013). Delimiting species using single-locus data and the Generalized Mixed Yule Coalescent approach: a revised method and evaluation on simulated data sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707-724.



- Galián, J., Prüser, F., De la Rúa, P., Serrano, J., & Mossakowski, D. Cytological and molecular differences in the *Ceroglossus chilensis* species complex (Coleoptera: Carabidae). *Annales Zoologici Fennici*, 33, 23-30.
- Galtier, N., Nabholz, B., Glémin, S., & Hurst, G. D. D. (2009). Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, 18(22), 4541-4550.
- Goldman, N. (1993). Statistical tests of models of DNA substitution. *Journal of Molecular Evolution*, 36(2), 182-198.
- Grove, S. J., & Stork, N. E. (2000). An inordinate fondness for beetles. *Invertebrate Systematics*, 14(6), 733-739.
- Guillot, G., Renaud, S., Ledevin, R., Michaux, J., & Claude, J. (2012). A unifying model for the analysis of phenotypic, genetic, and geographic data. *Systematic Biology*, 61(6), 897-911.
- Hartigan, J. A. (1973). Minimum mutation fits to a given tree. *Biometrics*, 53-65.
- Hausdorf, B., & Hennig, C. (2010). Species delimitation using dominant and codominant multilocus markers. *Systematic Biology*, 59(5), 491-503.
- Hennig, W. (1950). Grundzuge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Berlin (Germany): Deutscher Zentralverlag.
- Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 359(1442), 183-195.
- Hey, J., & Nielsen, R. (2007). Integration within the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(8), 2785-2790.
- Holland, J. M. (2002). *The agroecology of carabid beetles*. Intercept Limited.
- Huelsenbeck, J. P. (1998). Systematic bias in phylogenetic analysis: is the Strepsiptera problem solved? *Systematic Biology*, 47(3), 519-537.
- Huelsenbeck, J. P., Andolfatto, P., & Huelsenbeck, E. T. (2011). Structurama: Bayesian inference of population structure. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 7, 55.
- Hunt, T., Bergsten, J., Levkanicova, Z., Papadopoulou, A., John, O. S., Wild, R., Hammond, P. M., Ahrens, D., Balke, M., Caterino, M. S., Gómez-Zurita, J., Ribera, I., Barraclough, T., Bocakova, M., Bocak, L., and Vogler, A. P. (2007).



- A comprehensive phylogeny of beetles reveals the evolutionary origins of a superradiation. *Science*, *318*, 1913-1916.
- Huson, D. H., & Bryant, D. (2005). Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Molecular Biology and Evolution*, *23*(2), 254-267.
- Jaffrézic, O. (2006). Le cycle de développement des *Ceroglossus* (Coleoptera, Carabidae). *Les Cahiers Magellanes*, *15*, 1-7.
- Jeannel, R. P. (1944). Morphologie abdominale des Coléoptères et systématique de l'ordre. *Revue Française d'Entomologie*, *II*, 65-110.
- Ji, Y. J., Zhang, D. X., & He, L. J. (2003). Evolutionary conservation and versatility of a new set of primers for amplifying the ribosomal internal transcribed spacer regions in insects and other invertebrates. *Molecular Ecology Resources*, *3*(4), 581-585.
- Jiroux, E. (1996). Révision du genre *Ceroglossus*. Collection Systematique 1, Ed. Magellanes, Paris.
- Jiroux, E. (2006). Le genre *Ceroglossus*. Collection Systematique 14, Ed. Magellanes, Paris.
- Kim, C. G., Zhou, H. Z., Imura, Y., Tominaga, O., Su, Z. H., & Osawa, S. (2000). Pattern of morphological diversification in the *Leptocarabus* ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as deduced from mitochondrial ND5 gene and nuclear 28S rDNA sequences. *Molecular Biology and Evolution*, *17*(1), 137-145.
- Klingenberg, C. P. (2010). Evolution and development of shape: integrating quantitative approaches. *Nature Reviews Genetics*, *11*, 623-635.
- Klingenberg, C. P. (2011). MorphoJ: an integrated software package for geometric morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, *11*(2), 353-357.
- Klingenberg, C. P. (2013). Visualizations in geometric morphometrics: how to read and how to make graphs showing shape changes. *Hystrix, the Italian Journal of Mammalogy*, *24*(1), 15-24.
- Kubatko, L. S., Carstens, B. C., & Knowles, L. L. (2009). STEM: species tree estimation using maximum likelihood for gene trees under coalescence. *Bioinformatics*, *25*(7), 971-973.
- Lara, A., Echeverría, C., & Reyes, R. (2002). Bosques Nativos. Instituto de Asuntos Públicos, Universidad de Chile. Santiago de Chile.



- Lawrence, J. F., & Newton, A. F. (1995). Families and subfamilies of Coleoptera. In: Pakaluk, J., Ślipiński, S. A. & Crowson, R. A. (eds.). *Biology, phylogeny, and classification of Coleoptera. Papers celebrating the 80th birthday of Roy A. Crowson*, 2. pp. 779-1006. Muzeum i Instytut Zoologii.
- Lemic, D., Živković, I. P., Čaćija, M., Kos, T., Gašparić, H. V., & Bažok, R. (2017). Carabid composition in different agricultural landscapes. In: *Landscape management for functional biodiversity*.
- López-López, A., & Vogler, A. P. (2017). The mitogenome phylogeny of Adephaga (Coleoptera). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2017.06.009>
- López-López, A., Hudson, P., & Galián, J. (2013). Recent origin of a chiasmatic sex trivalent in Australian *Pseudotetracha* tiger beetles. *Journal of Zoology*, 289(4), 262-269.
- López-López, A., Hudson, P., & Galián, J. (2016). Islands in the desert: species delimitation and evolutionary history of *Pseudotetracha* tiger beetles (Coleoptera: Cicindelidae: Megacephalini) from Australian salt lakes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 101, 279-285.
- Lorenz, W. (2005). *Nomina Carabidarum: a directory of the scientific names of ground beetles: Insecta, Coleoptera "Geadephaga": Trachypachidae and Carabidae incl. Paussinae, Cicindelinae, Rhysodinae*. W. Lorenz, Tutzing (Germany).
- Maddison, D. R., Moore, W., Baker, M. D., Ellis, T. M., Ober, K. A., Cannone, J. J., & Gutell, R. R. (2009). Monophyly of terrestrial adephagan beetles as indicated by three nuclear genes (Coleoptera: Carabidae and Trachypachidae). *Zoologica Scripta*, 38(1), 43-62.
- Maddison, D., Baker, M. D., & Ober, K. (1999). Phylogeny of carabid beetles as inferred from 18S ribosomal DNA (Coleoptera: Carabidae). *Systematic Entomology*, 24(2), 103-138.
- Mardulyn, P. (2012). Trees and/or networks to display intraspecific DNA sequence variation? *Molecular Ecology*, 21(14), 3385-3390.
- Masters, B. C., Fan, V., & Ross, H. A. (2011). Species delimitation – a Geneious plugin for the exploration of species boundaries. *Molecular Ecology Resources*, 11(1), 154-157.



- Mau, B., & Newton, M. A. (1997). Phylogenetic inference for binary data on dendrograms using Markov chain Monte Carlo. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 6(1), 122-131.
- Mayr, E. (1970). *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution*. Harvard University Press, Boston.
- Mayr, E. (1976). Species concepts and definitions. In: Mayr, E. (ed.). *Topics in the Philosophy of Biology*, pp. 353–371. AAAS, Washington DC.
- McKenna, D. D., Wild, A. L., Kanda, K., Bellamy, C. L., Beutel, R. G., Caterino, M. S., ... & Leschen, R. A. (2015). The beetle tree of life reveals that Coleoptera survived end-Permian mass extinction to diversify during the Cretaceous terrestrial revolution. *Systematic Entomology*, 40(4), 835-880.
- Misof, B., Liu, S., Meusemann, K., Peters, R. S., Donath, A., Mayer, C., ... & Niehuis, O. (2014). Phylogenomics resolves the timing and pattern of insect evolution. *Science*, 346(6210), 763-767.
- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., ... & Vogler, A. P. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic Biology*, 58(3), 298-311.
- Myers, N., Mittermeier, R. A., Mittermeier, C. G., Da Fonseca, G. A., & Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403(6772), 853-858.
- Nass, S., & Nass, M. M. (1963). Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. *The Journal of Cell Biology*, 19(3), 613-629.
- Okamoto, M., Kashiwai, N., Su, Z. H., & Osawa, S. (2001). Sympatric convergence of the color pattern in the Chilean *Ceroglossus* ground beetles inferred from sequence comparisons of the mitochondrial ND5 gene. *Journal of Molecular Evolution*, 53(4), 530-538.
- O'meara, B. C. (2009). New heuristic methods for joint species delimitation and species tree inference. *Systematic Biology*, 59(1), 59-73.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I., & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7(1), 16.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D. P., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. D., & Vogler, A. P. (2006). Sequence-based species



- delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55(4), 595-609.
- Pons, J., Ribera, I., Bertranpetit, J., & Balke, M. (2010). Nucleotide substitution rates for the full set of mitochondrial protein-coding genes in Coleoptera. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 56(2), 796-807.
- Posada, D., & Crandall, K. A. (2001). Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *Trends in Ecology and Evolution*, 16(1), 37-45.
- Powell, J. R. (2012). Accounting for uncertainty in species delineation during the analysis of environmental DNA sequence data. *Methods in Ecology and Evolution*, 3(1), 1-11.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), 945-959.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877.
- Rainio, J., & Niemelä, J. (2003). Ground beetles (Coleoptera: Carabidae) as bioindicators. *Biodiversity and Conservation*, 12(3), 487-506.
- Rannala, B., & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*, 43(3), 304-311.
- Rannala, B., & Yang, Z. (2013). Improved reversible jump algorithms for Bayesian species delimitation. *Genetics*, 194(1), 245-253.
- Rataj, L. (2011). Description de *Ceroglossus morpheus* n. sp., une nouvelle espèce pour le groupe *suturalis* Fabricius, 1775 (Coleoptera, Carabidae). *Lambillionea*, 111(2), 165-170.
- Rataj, L. (2012). *Contribution à la connaissance des coléoptères du Chili, Tome 1*. L'Association de Coléoptéristes ACOREP-France, Paris.
- Rataj, L., & Godeau, B. (2010). Découverte d'une nouvelle espèce et de deux nouvelles sous-espèces de *Ceroglossus* (Coleoptera, Carabidae). *Lambillionea*, 110(2), 245-257.
- Rodrigo, A., Bertels, F., Heled, J., Noder, R., Shearman, H., & Tsai, P. (2008). The perils of plenty: what are we going to do with all these genes? *Philosophical*



Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences, 363(1512), 3893-3902.

- Roggero, A., & Passerin d'Entrèves, P., (2005). Geometric morphometric analysis of wings variation between two populations of the *Scythris obscurella* species-group: geographic or interspecific differences? (Lepidoptera: Scythrididae). *SHILAP Revista de Lepidopterologia*, 33(130).
- Rohlf, F. J. (2017b). TpsDig, version 1.31. Available at: <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>.
- Rohlf, F. J. (2017a). TpsUtil, version 1.34. Available at: <http://life.bio.sunysb.edu/ee/rohlf/software.html>.
- Rohlf, F. J., & Marcus, L. F. (1993). A revolution in morphometrics. *Trends in Ecology and Evolution*, 8(4), 129-132.
- Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Biology*, 39(1), 40-59.
- Rosenberg, N. A. (2007). Statistical tests for taxonomic distinctiveness from observations of monophyly. *Evolution*, 61(2), 317-323.
- Ross, H. A., Murugan, S., & Sibon Li, W. L. (2008). Testing the reliability of genetic methods of species identification via simulation. *Systematic Biology*, 57(2), 216-230.
- Saitou, N., & Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 4(4), 406-425.
- Schaal, B. A., Hayworth, D. A., Olsen, K. M., Rauscher, J. T., & Smith, W. A. (1998). Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology*, 7(4), 465-474.
- Shull, V. L., Vogler, A. P., Baker, M. D., Maddison, D. R., & Hammond, P. M. (2001). Sequence alignment of 18S ribosomal RNA and the basal relationships of adephagan beetles: evidence for monophyly of aquatic families and the placement of Trachypachidae. *Systematic Biology*, 50(6), 945-969.
- Sites, J. W., & Marshall, J. C. (2003). Delimiting species: a Renaissance issue in systematic biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 18(9), 462-470.



- Ślipiński, S. A., Leschen, R. A. B., Lawrence, J. F. (2011). Order Coleoptera Linnaeus, 1758. In: Zhang, Z. Q. (ed.). *Animal biodiversity: An outline of higher-level classification and survey of taxonomic richness*. Magnolia press.
- Smith-Ramírez, C. (2004). The Chilean coastal range: a vanishing center of biodiversity and endemism in South American temperate rainforests. *Biodiversity and Conservation*, 13(2), 373-393.
- Su, J., Guan, K., Wang, J., & Yang, Y. (2015). Significance of hind wing morphology in distinguishing genera and species of cantharid beetles with a geometric morphometric analysis. *ZooKeys*, (502), 11.
- Su, Z. H., Imura, Y., & Osawa, S. (2001). Evolutionary discontinuity of the carabine ground beetles. *Journal of Molecular Evolution*, 53(4-5), 517-529.
- Su, Z. H., Imura, Y., & Osawa, S. (2005). Evolutionary history of Calosomina ground beetles (Coleoptera, Carabidae, Carabinae) of the world as deduced from sequence comparisons of the mitochondrial ND5 gene. *Gene*, 360(2), 140-150.
- Su, Z. H., Ohama, T., Okada, T. S., Nakamura, K., Ishikawa, R., & Osawa, S. (1996a). Phylogenetic relationships and evolution of the Japanese Carabinae ground beetles based on mitochondrial ND5 gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 42(2), 124-129.
- Su, Z. H., Ohama, T., Okada, T. S., Nakamura, K., Ishikawa, R., & Osawa, S. (1996b). Geography-linked phylogeny of the *Damaster* ground beetles inferred from mitochondrial ND5 gene sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 42(2), 130-134.
- Tautz, D., Arctander, P., Minelli, A., Thomas, R. H., & Vogler, A. P. (2003). A plea for DNA taxonomy. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(2), 70-74.
- Taylor, J. W., Jacobson, D. J., Kroken, S., Kasuga, T., Geiser, D. M., Hibbett, D. S., & Fisher, M. C. (2000). Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*, 31(1), 21-32.
- Templeton, A. R., Crandall, K. A., & Sing, C. F. (1992). A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, 132(2), 619-633.
- Timmermans, M. J., Barton, C., Haran, J., Ahrens, D., Culverwell, C. L., Ollikainen, A., Dodsworth, S., Foster, P. G., Bocak, L., & Vogler, A. P. (2015). Family-



- level sampling of mitochondrial genomes in Coleoptera: compositional heterogeneity and phylogenetics. *Genome Biology and Evolution*, 8(1), 161-175.
- Toft, S., & Bilde, T. (2002). Carabid diets and food value. In: Holland, J. M. (ed.) *Agroecology of Carabid Beetles* (pp. 81-110). Intercept, Andover.
- Venn, S. (2016). To fly or not to fly: Factors influencing the flight capacity of carabid beetles (Coleoptera: Carabidae). *European Journal of Entomology*, 113, 587.
- Vogler, A. P., & Monaghan, M. T. (2007). Recent advances in DNA taxonomy. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45(1), 1-10.
- Walter, D. E., & Winterton, S. (2007). Keys and the crisis in taxonomy: extinction or reinvention? *Annual Review of Entomology*, 52, 193-208.
- White, M. J. D. (1978). *Modes of speciation*. W.H. Freeman, San Francisco (USA).
- Wiens, J. J. (2007). Species delimitation: new approaches for discovering diversity. *Systematic Biology*, 56(6), 875-878.
- Wilke, T., Schultheiß, R., & Albrecht, C. (2009). As time goes by: a simple fool's guide to molecular clock approaches in invertebrates. *American Malacological Bulletin*, 27(1/2), 25-45.
- Wilson, E. O. (1985). The biological diversity crisis: a challenge to science. *Issues in Science and Technology*, 2(1), 20-29.
- Yang, Z., & Rannala, B. (1997). Bayesian phylogenetic inference using DNA sequences: a Markov Chain Monte Carlo method. *Molecular Biology and Evolution*, 14(7), 717-724.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2010). Bayesian species delimitation using multilocus sequence data. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(20), 9264-9269.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2012). Molecular phylogenetics: principles and practice. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 303-314.
- Yang, Z., & Rannala, B. (2014). Unguided species delimitation using DNA sequence data from multiple loci. *Molecular Biology and Evolution*, 31(12), 3125-3135.
- Yeates, D. K., Seago, A., Nelson, L., Cameron, S. L., Joseph, L. E. O., & Trueman, J. W. (2011). Integrative taxonomy, or iterative taxonomy? *Systematic Entomology*, 36(2), 209-217.
- Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., & Sheets, H. D. (2012). *Geometric morphometrics for biologists: a primer*. Academic Press.

- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876.



APÉNDICE

Script de R utilizado para automatizar los análisis de delimitación de especies mediante el algoritmo GMYC. Modificado a partir del original cedido por Paula Arribas (com. pers.).

```
# Script para hacer el gmyc en R, según las instrucciones de
Paula Arribas.
# Paquetes requeridos: geiger, igraph, vegan, gtools, ape, paran,
splits, fields.
# Si no están instalados, hacerlo con el comando
"install.packages":
# > install.packages("paran")
# El paquete "splits" debe instalarse mediante el siguiente
comando:
# > install.packages("splits", repos="http://R-Forge.R-
project.org")
# Requiere además gmyc.pkg.0.9.6.R y Powell_supplemental_script.R

# Nombre del archivo de entrada (tiene que estar NEXUS)
infile = "XXXXXXXXXX.tre"
# Prefijo de los archivos de salida
outfile = "XXXXXXXXXX"

# Empezamos cargando los paquetes necesarios.
library(geiger)
library(igraph)
library(vegan)
library(gtools)
library(ape)
library(paran)
library(splits)
library(fields)
# Y los ficheros auxiliares que definen las funciones que vamos a
usar.
# Deben estar en la carpeta de trabajo.
source("gmyc.pkg.0.9.6.R")
source("Powell_supplemental_script.R")

# Leemos el árbol.
# Escribir el nombre del archivo del árbol, con extensión.
# El árbol debe ser ultramétrico (los nodos terminales deben
quedar
# a la misma altura) y completamente bifurcativo (cada nodo debe
dar
# lugar únicamente a dos ramas). En principio, los árboles
obtenidos
# por el BEAST cumplen estos requisitos.
```




```
# Este comando asume que el árbol está en formato NEXUS. Si
estuviera
# en formato NEWICK habrá que usar el comando "read.tree".
read.nexus(infile) -> tree

# Primero realizamos el GMYC asumiendo que el cambio de
ramificaciones
# intra e interespecíficas tuvo lugar a la misma altura en todas
las
# ramas ("single"):
tree.single <- gmyc(tree, method="single")

# Luego realizamos el GMYC asumiendo que dicho cambio de
ramificación
# ha podido tener lugar a diferentes alturas según la rama
("multiple"):
tree.multi <- gmyc.edit(tree, method="m")

# Iniciamos el archivo log en el cual vamos a guardar los datos:
sink(paste(outfile, ".gmyc.log", sep=""),
type=c("output", "message"), split="True")

# Imprimimos en el archivo log el resumen del análisis "single":
summary(tree.single)
tree.single
# Y guardamos un archivo de texto que contenga la información
acerca
# de qué ejemplares corresponden a cada "cluster"/"especie".
spec.list(tree.single) -> single.species
write.table(single.species, file=paste(outfile,
"species.single.txt", sep=""))
# Ídem con el análisis "multiple":
summary(tree.multi)
tree.multi
spec.list(tree.multi) -> multi.species
write.table(multi.species, file=paste(outfile,
"species.multi.txt", sep=""))

# Ahora vamos a comparar cuál es mejor.
# Nos saldrá una tabla en la que los diferentes modelos
aparecerán
# ordenados en base a sus criterios de información de Akaike. El
mejor
# es el primero de la lista.
compare(tree.single, tree.multi)
test.scores <- model.scores(tree.single, tree.multi)
summary.scores(test.scores, deltaAICc=7)
sample.est(test.scores, deltaAICc=7)
test.probs <- cluster.probs(test.scores, deltaAICc=7)

# Valores de soporte para los clusters [PRUEBA]
sup.single <- gmyc.support(tree.single)
sup.multi <- gmyc.support(tree.multi)
sup.single
sup.multi
```



```
write.table(sup.single, file=paste(outfile,
"species.single.support.txt", sep=""))
write.table(sup.multi, file=paste(outfile,
"species.multi.support.txt", sep=""))

# Cerramos el "log".
sink()

# Por último guardamos archivos svg que contengan todas las
figuras
# para poder luego extraerlas con un programa de imagen
vectorial.
svg(paste(outfile, ".gmyc.single.svg", sep=""), height=100,
width=100)
plot.gmyc(tree.single)
sup.single[sup.single==0] <- NA
nodelabels(round(sup.single, 2), cex=0.6, frame="n", adj=1)
dev.off()
svg(paste(outfile, ".gmyc.multi.svg", sep=""), height=100,
width=100)
plot.gmyc(tree.multi)
sup.multi[sup.multi==0] <- NA
nodelabels(round(sup.multi, 2), cex=0.6, frame="n", adj=1)
dev.off()
pdf(paste(outfile, ".gmyc.probs.pdf", sep=""), height=11,
width=10)
plot.gmyc(tree.single)
sup.single[sup.single==0] <- NA
nodelabels(round(sup.single, 2), cex=0.6, frame="n", adj=1)
plot.gmyc(tree.multi)
sup.multi[sup.multi==0] <- NA
nodelabels(round(sup.multi, 2), cex=0.6, frame="n", adj=1)
plot.probs(test.probs, main="tree GMYC scores deltaAICc=7")
dev.off()
svg(paste(outfile, ".gmyc.matrix.svg", sep=""), height=100,
width=100)
image.plot(test.probs$clusterMatrix.avg, col=grey((20:1)/20),
main="tree GMYC scores deltaAICc=7")
dev.off()
svg(paste(outfile, ".gmyc.matrix2.svg", sep=""), height=100,
width=100)
image(test.probs$clusterMatrix.avg, main="tree GMYC scores
deltaAICc=7")
dev.off()
```