



PEDECIBA-Biología

Subárea Zoología

Tesis de maestría

Estructura genética y filogeografía de *Homonota uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961) (Squamata, Phyllodactylidae) y su relación con el paisaje



Ernesto Elgue Amaral

Abril 2018

Tesis de maestría: Estructura genética y filogeografía de *Homonota uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961) (Squamata, Phyllodactylidae) y su relación con el paisaje

PEDECIBA/ Biología/ Zoología

Autor: Ernesto Elgue Amaral

e-mail: ernestoelgue@gmail.com

**Laboratorio de Sistemática e Historia Natural de Vertebrados,
Instituto de Ecología y Ciencias Ambientales, Facultad de
Ciencias, UdelaR.**

Orientadores: Dr. Raúl Maneyro y Dr. Arley Camargo

Tribunal: Dr. Enrique Lessa, Dra. Susana González y Dra. Graciela García

Índice

Agradecimientos	4
Resumen	5
Abstract	6
Capítulo 1: Introducción	7
Objetivos	12
Metodología general	13
Bibliografía	16
Capítulo 2: Variación genética espacial	
Introducción	21
Objetivos	24
Hipótesis	24
Predicciones	24
Materiales y métodos	25
Resultados	28
Discusión	41
Bibliografía	46
Capítulo 3: Variación genética temporal	
Introducción	52
Objetivos	55
Hipótesis	55
Predicciones	55
Materiales y métodos	56
Resultados	58
Discusión	64
Bibliografía	68
Capítulo 4: Conclusiones y perspectivas	73
Anexo	75

Agradecimientos

En primer lugar quisiera agradecer a mis orientadores, Raúl Maneyro y Arley Camargo, por aceptar dirigir esta maestría con total disposición, y abrirme totalmente las puertas de sus laboratorios sin restricción alguna y con total dedicación para enseñarme todo lo necesario.

Este trabajo no hubiera sido posible sin la ayuda financiera del Programa de Desarrollo para las Ciencias Básicas (PEDECIBA), la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y la Comisión Académica de Posgrado (CAP), al igual que la Comisión Sectorial de Investigación Científica (CSIC) a través de la financiación del proyecto I+D "Filogeografía comparada de anfibios y reptiles del Bioma Pampa: Patrones de diversidad genética, morfológica y filogenética en las Quebradas del Norte".

Muchas Gracias al Dr. Enrique Lessa, la Dra. Susana González y la Dra. Graciela García, por su disponibilidad para formar parte del tribunal y hacer correcciones y sugerencias que mejoraran el producto final de esta Maestría.

Es necesario agradecer a quiénes nos ayudaron sin interés alguno en las salidas de campo que hicieron posible este proyecto, Joaquín Villamil, Ignacio Lombardo y Valeria de Olivera.

Agradezco a todos los compañeros de laboratorio, con quienes tuve la suerte de compartir el lugar diariamente y aprender muchísimas cosas. Principalmente a Claudia Fernández, Ignacio Lombardo, Gisela Pereira, Sabrina Riverón, Vanessa Valdez y Joaquín Villamil.

Un agradecimiento especial a Sabrina Riverón y Joaquín Villamil, que conformaron un primer consejo para debates en temas referentes a esta tesis, y otros tantos.

A los amigos, pilares importantísimos que mantienen todo proyecto a flote con su acompañamiento paralelo.

A mi familia, lo mejor y más incondicional de mi vida, responsables de todo lo bueno que tengo.

Resumen

El geko de las piedras, *Homonota uruguayensis*, es un reptil de pequeño tamaño perteneciente a la familia Phyllodactylidae, que se distribuye únicamente en las serranías del norte de Uruguay y en el sur del estado de Rio Grande do Sul, en Brasil. Es considerada especialista de hábitat, ya que se encuentra exclusivamente en pedregales, donde se refugia principalmente debajo de piedras en sustratos rocosos. Con el objetivo de determinar patrones históricos y espaciales de estructuración genética de *H. uruguayensis*, fueron amplificados y secuenciados fragmentos del gen mitocondrial citocromo b y del gen nuclear PRLR, provenientes de diversas localidades en Uruguay y Brasil. Los resultados mostraron la presencia de seis poblaciones geográficamente bien definidas y con una estructuración clara, que pueden representar distintas unidades de manejo para su conservación. La mayor diversidad filogenética estimada estuvo en el norte de Artigas en Uruguay, y en las localidades más australes de Brasil. Sin embargo, se encuentra el norte de Salto como la región que mejor complementa al Paisaje Protegido Valle del Lunarejo, ya que en conjunto asegurarían la conservación de la mayor diversidad filogenética. La diferenciación genética estuvo asociada con la distancia geográfica principalmente, aunque se encontraron indicios de que las corrientes de agua pueden actuar como barreras a la dispersión de individuos. No se encontró ningún indicio de que otros factores del suelo analizados tuvieran efecto en la estructuración poblacional, tanto a nivel actual como en la dispersión histórica de poblaciones. Adicionalmente, en la historia demográfica no se encontró evidencia de efectos importantes de los ciclos glaciales sobre la dinámica poblacional de la especie.

Abstract

The Uruguay marked gecko, *Homonota uruguayensis*, is a small reptile belonging to the family Phyllodactylidae, which is distributed only in the hilly areas of northern Uruguay and in the southern of Rio Grande do Sul state, Brazil. It is considered a habitat specialist, since they are found exclusively on stony ground, where it shelters mainly under rocks on rocky substrates. With the aim to determine the historical and spatial patterns of the genetic structure of *H. uruguayensis*, I amplified and sequenced fragments of the mitochondrial gene cytochrome b and the nuclear gene PRLR, from different locations in Uruguay and Brazil. The results showed the presence of six geographically well defined populations with a strong structure, which could represent different management units for their conservation. The highest estimated phylogenetic diversity was found in northern Artigas (Uruguay), and in the southernmost locations in Brazil. However, northern Salto is the region that best complements the protected area "Paisaje Protegido Valle del Lunarejo", and both areas would jointly ensure the conservation of the greatest phylogenetic diversity. Genetic differentiation was associated with geographic distance mainly, although there were indications of some streams acting as barriers against the dispersion of individuals. No evidence was found that other soil factors analyzed had an effect on the population structure, both in contemporary and historical times. Additionally, no significant effects were found that the glacial cycles have influenced the demographic history of the species.

Capítulo 1: Introducción

La biodiversidad observada es producto de múltiples procesos evolutivos, que tienen siempre tres componentes: forma, tiempo y espacio (Crisci et al., 2000). Históricamente, no siempre se tuvieron presentes estas tres dimensiones, siendo clave por ejemplo "El origen de las especies" de Darwin (1859) para consolidar el tiempo como un componente importante de los procesos evolutivos (Morrone, 2000). La importancia del espacio en la biodiversidad estuvo siempre presente en estudios biogeográficos, incluso en la misma obra de Darwin, pero se cree que tomó su dimensión a la par del tiempo y la forma a mediados del siglo XX, cuando Croizat (1964) publica su obra "Espacio, tiempo y forma", colocando a estos tres componentes como las dimensiones esenciales de cualquier estudio evolutivo. Actualmente, existen disciplinas biológicas que se centran en algunos de estos ejes a la hora de plantearse preguntas, pero otras, como la genética de poblaciones, tratan de abordar las tres dimensiones para obtener respuestas (Crow, 1987).

Las herramientas genéticas son cada vez más importantes para responder preguntas en varias ramas de la biología, como las relacionadas a evolución, biogeografía y ecología, entre otras (Freeland, 2005). El desarrollo de nuevas técnicas para la obtención y análisis de datos genéticos, y la reducción de los costos de estas, han permitido tener a disposición diversas herramientas moleculares para seleccionar las más adecuadas a los objetivos planteados (Brito & Edwards, 2009). Por ejemplo, el estudio basado en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt) se ha utilizado especialmente para probar hipótesis históricas, como los efectos de cambios geológicos y climáticos en especies o poblaciones (Hewitt 2000, 2004). Si bien es claro que algunas características del ADNmt lo hacen especialmente útil para estudios evolutivos a grandes escalas temporales (alta tasa de sustitución, ausencia de recombinación, fácil aislamiento y amplificación, entre otras), se ha incorporado el uso conjunto de información proveniente del ADN nuclear (ADNn), que permite compensar algunas de las desventajas que podría tener el uso exclusivo de ADNmt (por ejemplo, la herencia matrilineal, que generalmente hace que sea inadecuado para medir el grado de conexión actual entre poblaciones)

(Brown et al., 1979; Vawter & Brown, 1986; Brito & Edwards, 2009; Edwards & Bensch, 2009). Es por estas razones que cada disciplina, según sus objetivos y la escala de sus análisis, suele utilizar determinados marcadores moleculares y una metodología asociada. Por ejemplo, la filogeografía aborda los patrones de distribución espacial y las relaciones genealógicas de la variabilidad genética a nivel intra-específico o entre especies cercanamente emparentadas (Avise, 1989; Avise, 2009). Suele valerse de marcadores de ADNmt y algunas regiones de ADNn para establecer relaciones filogenéticas, y analizados conjuntamente con los patrones geográficos, inferir los procesos evolutivos que han producido los patrones de estructuración genética actuales (Knowles, 2004; Carstens & Richards, 2007; Beaumont et al., 2010). Al igual que la filogeografía, otras disciplinas derivadas de la genética de poblaciones también abarcan las tres dimensiones de los procesos evolutivos (forma, tiempo y espacio), como la genética del paisaje, que emplea marcadores moleculares altamente variables para integrar la variación genética de las poblaciones con los patrones del paisaje, y de esta forma entender como los factores ambientales y las características del paisaje han influido recientemente en la estructura y la conectividad de las poblaciones (Manel et al., 2003).

Los avances en el uso de marcadores moleculares en diversas disciplinas fueron también favorecidos por el desarrollo teórico de marcos conceptuales que permitieron inferir modelos evolutivos más complejos haciendo un uso más potente y eficiente de los datos genéticos. Por ejemplo, la teoría del coalescente ha sido central en el desarrollo de la filogeografía y otras disciplinas relacionadas, donde se analiza la relación entre la genealogía de los genes y la demografía (Kingman, 1982; Avise, 2000). Esta establece formalmente que el patrón de descendencia de los linajes actuales hasta un ancestro común se puede modelar mediante un proceso aleatorio, mientras se cumplan determinados supuestos. Cada vez que dos linajes convergen en el pasado, nos encontramos con un evento de coalescencia, el cual ocurre en un tiempo determinado según un modelo probabilístico. A su vez, los desvíos de los supuestos generan un efecto predecible en los tiempos de coalescencia que permiten identificar cambios demográficos e inferir procesos históricos asociados a estos supuestos (Kingman, 1982; Harding, 1996).

Numerosos estudios filogeográficos y de genética de poblaciones han sido realizados en la región Neotropical, estando principalmente enfocados en especies de la Amazonia, los Andes y la Floresta Atlántica, pero con una minoría de otros

biomas (Beheregaray, 2008; Victoriano et al., 2008; Carnaval et al., 2009; Turchetto-Zolet et al., 2013). Particularmente, en las regiones templadas de Sudamérica los trabajos se han realizado principalmente en la Patagonia, siendo pocos los que se han enfocado en el bioma Pampa (Premoli et al., 2000; Pastorino & Gallo, 2002; Muellner et al., 2005; Avila et al., 2006; Morando et al., 2007; Himes et al., 2008; Lessa et al., 2010; Camargo et al., 2013; Felappi et al., 2015; Langone et al., 2016). Este bioma, biogeográficamente denominado Provincia de la Pampa, es uno de los mayores pastizales templados del mundo, cubriendo aproximadamente 760.000 km² en gran parte de las provincias de Córdoba, Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires, en Argentina, todo el territorio uruguayo y el sur de Rio Grande do Sul, en Brasil (Cabrera & Willink, 1973; Soriano et al., 1991; Morrone, 2001). Se caracteriza por su tener extensas praderas, generalmente llanas, pero presentando algunas elevaciones que no superan los 1200 msnm (Cabrera & Willink, 1973). Esta región enfrenta importantes amenazas derivadas del uso de tierra, sin embargo es considerado el bioma terrestre con la menor relación de superficie protegida (0,69%), lo cual hace imperativo la generación de estudios sobre biodiversidad en el área (Martino, 2004).

Los reptiles terrestres, debido a su condición ectoterma, tienen una fuerte dependencia de los factores ambientales (particularmente cuando poseen pequeño tamaño), favoreciendo la especialización de hábitat y una capacidad de dispersión limitada (McDiarmid et al., 2011). Debido a estos rasgos de su historia de vida, pueden ser especialmente aptos para estudios poblacionales, ya que suelen mostrar una estructura poblacional definida (Avice, 2000). El género de lagartijas *Homonota* pertenece a la familia Phyllodactylidae, y se distribuye en la región templada de Sudamérica, con varias especies que habitan en el bioma Pampa (Carreira et al., 2005). Estos gekos tienen como características particulares no presentar dedos dilatados, cuerpo moderadamente deprimido, cola larga y una coloración que suele ser críptica con el entorno (Carreira et al., 2005). En 1951 se colectó por primera vez un ejemplar de *Homonota uruguayensis* (= *Wallsaurus uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961), que consistía en el primer registro fehaciente de un geko en el Uruguay (Carreira et al., 2005). Conocido comúnmente como Geko de las piedras, *Homonota uruguayensis* es un reptil de pequeño tamaño (alcanza entre 40-50 mm de longitud cabeza-cloaca) con una distribución restringida a los afloramientos rocosos del norte de Uruguay y algunas localidades del estado de Rio

Grande do Sul, Brasil (Fig. 1) (Carreira et al., 2005; Carreira & Maneyro, 2013). Se ha descrito que su actividad puede ser nocturna o diurna, y suele refugiarse debajo de piedras, prefiriendo también el sustrato rocoso (Carreira & Maneyro, 2013). Esta característica lo convierte en un animal especialista de hábitat, que vive específicamente en afloramientos basálticos o de arenisca donde están disponibles los mencionados refugios. Particularmente en Uruguay, prácticamente todos los registros de la especie ocurren al norte del Río Negro, y suelen encontrarse asociados con las serranías (Fig. 2) (Carreira et al., 2005). Es considerada como una especie prioritaria a proteger por el Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP) (Carreira & Estrades, 2013) y está catalogada como Vulnerable a nivel nacional de acuerdo a los criterios de IUCN (Carreira & Maneyro, 2015). Si bien existen algunos estudios sobre la ecología y comportamiento de la especie (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1973; Gudynas & Gambarotta, 1980; Gudynas, 1986; Vieira, 2012), casi no existen abordajes moleculares o trabajos enfocados en su conservación. Una reconstrucción filogenética del género *Homonota* ubica a *H. uruguayensis* dentro del grupo de *H. borellii*, y establece que el origen de sus especies estuvo asociado al aislamiento durante las transgresiones marinas del Mioceno, en el norte del actual territorio uruguayo (Morando et al., 2014). A nivel



Figura 1. Ejemplar de *Homonota uruguayensis* en su ambiente natural.

poblacional, el único estudio basado en ADNmt incluye cinco localidades uruguayas. Estos autores encontraron cuatro clados bien diferenciados, dos de los cuales estarían presentes en Uruguay: uno abarca poblaciones de Brasil, que incluye las localidades del Departamento de Artigas, y el otro clado estaría compuesto por localidades de Salto, Paysandú y Rivera (Felappi et al., 2015).

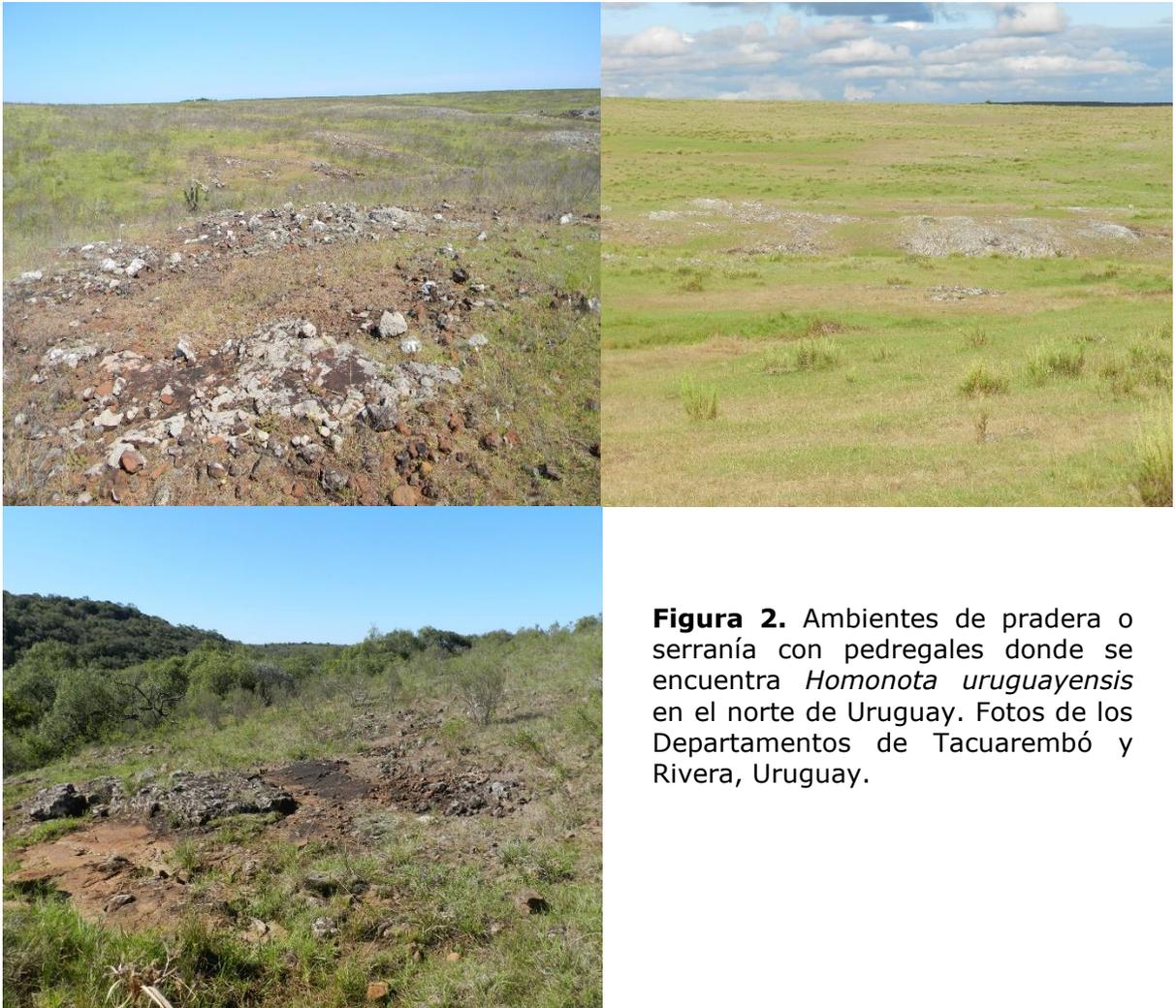


Figura 2. Ambientes de pradera o serranía con pedregales donde se encuentra *Homonota uruguayensis* en el norte de Uruguay. Fotos de los Departamentos de Tacuarembó y Rivera, Uruguay.

Objetivos

Objetivo general

Determinar patrones históricos y espaciales de estructuración genética en poblaciones de *Homonota uruguayensis*.

Objetivos específicos

- Determinar las poblaciones presentes de *Homonota uruguayensis* y evaluar su distribución geográfica, diversidad genética y flujo génico.
- Establecer el lugar y tiempo de origen de las poblaciones actuales y determinar su historia demográfica.
- Analizar la presencia de barreras del paisaje que hayan influido o aún operen en la estructuración y conectividad de las poblaciones.

Metodología general

Se realizaron salidas de campo en el norte de Uruguay, pretendiendo abarcar toda la distribución de *Homonota uruguayensis* en el País, colectando en 46 puntos de muestreo de los Departamentos de Artigas, Rivera, Salto, Tacuarembó y Paysandú (Fig. 3). En cada punto se colectó un máximo de cinco individuos para la obtención de tejido, que fue extraído del hígado o músculo de la cola. En el primer caso los animales fueron sacrificados según un protocolo de eutanasia aprobado por la Comisión Honoraria de Experimentación Animal de la Universidad de la República para este trabajo, luego fijados con formalina y almacenados en etanol 70° en las colecciones de Zoología de Vertebrados de la Facultad de Ciencias y del Centro Universitario de Rivera. El tejido proveniente de las colas fue obtenido manualmente en el campo, y los ejemplares fueron posteriormente liberados en el lugar de

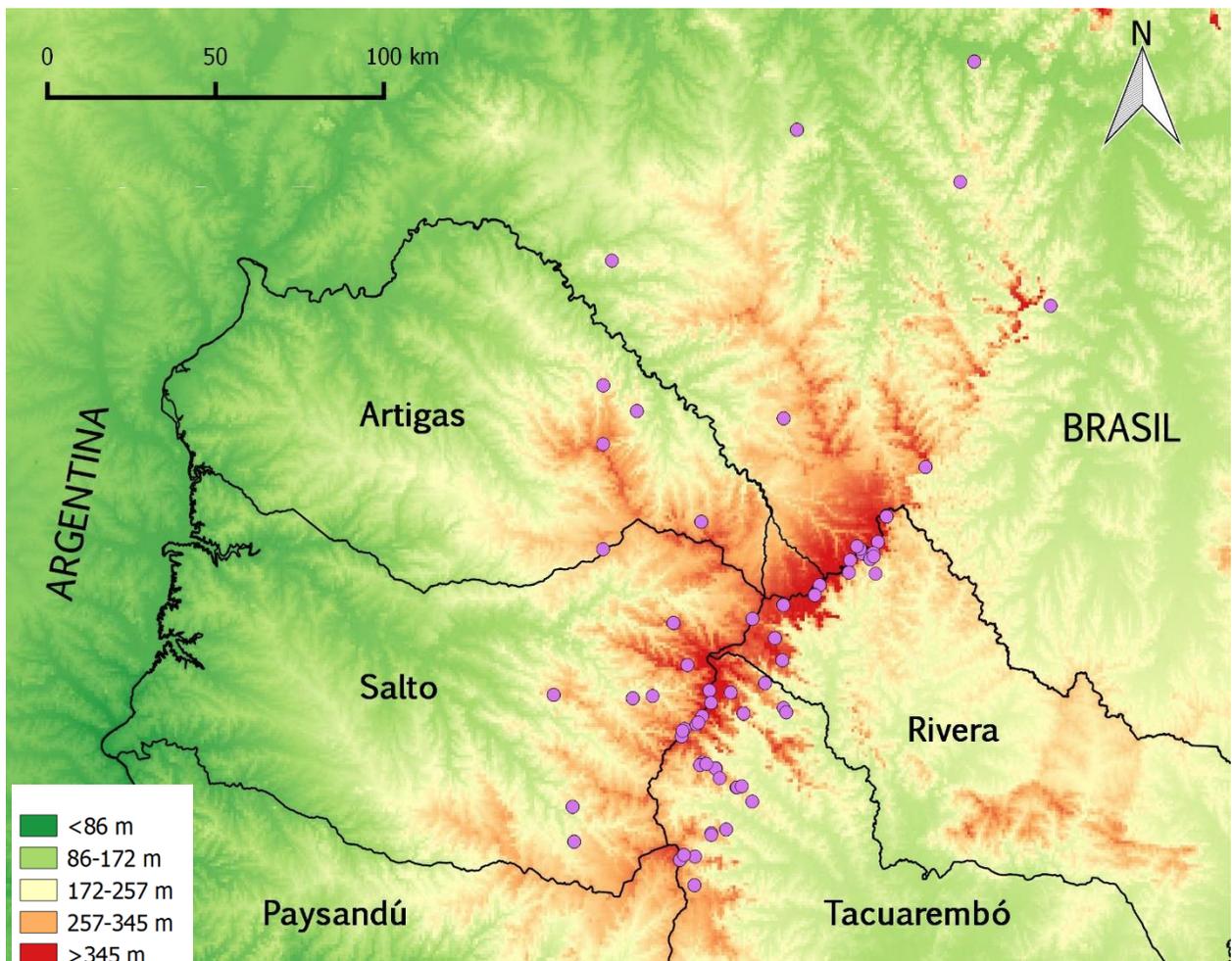


Figura 3. Mapa de altitud señalando el origen geográfico de los individuos cuyas secuencias fueron analizadas.

captura. Cabe destacar que este procedimiento es sencillo debido a la capacidad de autotomía caudal en la especie, mediante la cual desprende fragmentos de su cola como estrategia defensiva (Carreira & Maneyro, 2013). Todos los tejidos fueron preservados en etanol 95°. Se registraron las coordenadas geográficas de cada localidad de captura utilizando un equipo de posicionamiento global (Garmin eTrex® 20).

La extracción de ADN se realizó mediante un kit comercial de extracción, Quick-gDNA™ MiniPrep (Zymo Research Corp.), siguiendo las condiciones del fabricante para la extracción de tejidos sólidos con digestión mediante proteinasa K. Para los casos en los cuales se comprobó, mediante un espectrofotómetro de microvolúmenes (Thermo NanoDrop 2000), que la pureza o cantidad de ADN no era buena, se volvieron a realizar las extracciones de ADN siguiendo un protocolo de extracción salina (MacManes, 2013).

Mediante PCR (*polymerase chain reaction*) se amplificó un fragmento del gen mitocondrial citocromo b de un tamaño aproximado de 720 pares de bases (pb), en termociclador Techne 3PrimeG, utilizando los oligonucleótidos denominados 703Botp (5'-TCAAAYATCTCAACCTGATGAAAYTTYGG-3') y MVZ16p (5'-GGCAAATAGGAAGTATCAYTCTGGYTT-3') modificados por Pook et al. (2000). Las condiciones de termociclado fueron las mismas a las utilizadas por Felappi et al. (2015). También fue amplificado un fragmento del gen nuclear PRLR (*Prolactin receptor gene*) de 530 pb aproximadamente, mediante los oligonucleótidos PRLR_f1 (5'-GACARYGARGACCAGCAACTRATGCC-3') y PRLR_r3 (5'-GACYTTGTGRACTTCYACRTAATCCAT-3') (Townsend et al., 2008). Para esta reacción se utilizó el programa de termociclado de Noonan & Yoder (2009) con modificaciones basadas en una reacción de prueba con gradiente, que resultó en el siguiente programa: 94°-1:15 min; [94°-0:35 min; 62° (aumento 0,4°/ciclo)-0:35 min; 72°-1:00 min] x10; [94°-0:35 min; 56°-0:35 min; 72°-1:00 min] x10; [94°-0:35 min; 52°-0:35; 72°-1:00 min] x15; 72°-10:00 min.

Todos los productos de PCR fueron verificados mediante corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1,5% teñidos con GoodView (SBS Genetech) para su visualización en un transiluminador UV. Posteriormente, los amplicones fueron purificados utilizando el kit DNA Clean & Concentrator-5 (Zymo Research Corp.). Los productos de purificación fueron enviados al servicio de secuenciación del

Instituto Pasteur de Montevideo o MacroGen (www.macrogen.com) para la secuenciación Sanger automática.

Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de secuencias nucleotídicas BLASTn (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) para verificar su pertenencia al gen y especie objetivo. Luego fueron revisadas y editadas en base a su cromatograma en ProSeq 3.5 (Filatov, 2009), y alineadas manualmente en MEGA 6 (Tamura et al., 2013). Se añadieron a los respectivos alineamientos secuencias provenientes de localidades en Brasil, disponibles en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>): dos secuencias del gen PRLR utilizados por Morando et al. (2014) y 26 secuencias de Citocromo b utilizadas por Felappi et al. (2015) (ver Anexo). Debido a la condición diploide del gen nuclear PRLR, para trabajar con el alineamiento correspondiente se utilizó el algoritmo PHASE para la resolución de fases, implementado en el programa DnaSP 5.10, utilizando los parámetros por defecto (Librado & Rozas, 2009).

Como producto final del proceso mencionado anteriormente, se generaron dos alineamientos, el correspondiente al gen PRLR con 148 secuencias, y el correspondiente al gen citocromo b con 142 secuencias. Para las secuencias de citocromo b, se utilizó una tasa de sustitución de 1,15% por millón de años ($\pm 0,20\%$), calculada para el género *Hemidactylus* (Arnold et al., 2008), mientras que para las secuencias de PRLR fue utilizada una tasa de sustitución de 0,1322% por millón de años ($\pm 0,029\%$), calculada para el género *Liolaemus* (Olave et al., 2015). El modelo de sustitución utilizado para citocromo b fue el de HKY (Hasegawa-Kishino-Yano), mientras que para el gen PRLR fue utilizado el modelo GTR (*General Time Reversible*). Los modelos fueron elegidos según el BIC (*Bayesian information criterion*) en jModeltest 2 (Darriba et al., 2012) y paquete bModelTest (Bouckaert & Drummond, 2017) implementado en Beast 2 (Bouckaert et al., 2014).

Bibliografía

- Arnold, E.N., Vasconcelos, R., Harris, D.J., Mateo, J.A. & Carranza, S. (2008). Systematics, biogeography and evolution of the endemic *Hemidactylus* geckos (Reptilia, Squamata, Gekkonidae) of the Cape Verde Islands: based on morphology and mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Zoologica Scripta*, 37: 619-636.
- Avila, L.J., Morando, M. & Sites Jr., J.W. (2006). Congeneric phylogeography: hypothesizing species limits and evolutionary processes in Patagonian lizards of the *Liolaemus boulengeri* group (Squamata: Liolaemini). *Biological Journal of the Linnean Society*, 89: 241-275.
- Avise, J.C. (1989). Gene trees and organismal histories: a phylogenetic approach to population biology. *Evolution*, 43: 1192-1208.
- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press.
- Avise, J.C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36: 3-15.
- Beaumont, M.A., Nielsen, R., Robert, C., Hey, J., Gaggiotti, O., Knowles, L., Estoup, A., Panchal, M., Corander, J., Hickerson, M., Sisson, S.A., Fagundes, N., Chikhi, L., Beerli, P., Vitalis, J., Cornuet, J.M., Huelsenbeck, J., Foll, M., Yang, Z., Rousset, F., Balding, D. & Excoffier, L. (2010). In defence of model-based inference in phylogeography. *Molecular Ecology*, 19: 436-446.
- Beheregaray, L.B. (2008). Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: 3754-74.
- Bouckaert, R.R. & Drummond, A.J. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC evolutionary biology*, 17: 42.
- Bouckaert, R., Heled, J., Kühnert, D., Vaughan, T., Wu, C.H., Xie, D., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Drummond, A.J. (2014). BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 10: e1003537.
- Brito P.H. & Edwards S.V. (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135: 439-455.
- Brown, W.M., George, M., & Wilson, A.C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 76: 1967-1971.
- Cabrera, A.L. & Willink, A. (1973). *Biogeografía de America Latina*. Organización de Estados Americanos, Serie Biología, Monografía N°13, 117 pp.
- Camargo, A., Werneck, F.P., Morando, M., Sites Jr., J.W. & Avila, L.J. (2013). Quaternary range and demographic expansion of *Liolaemus darwini* (Squamata: Liolaemidae) in the Monte

Desert of Central Argentina using Bayesian phylogeography and ecological niche modelling. *Molecular Ecology*, 22: 4038- 4054.

- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F., Rodrigues, M.T. & Moritz, C. (2009). Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. *Science*, 323: 785-789.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2013). Guía de Reptiles del Uruguay. Ediciones de la Fuga, Montevideo.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2015). Lista Roja de los Anfibios y Reptiles del Uruguay. Una evaluación del estado de conservación de la herpetofauna de Uruguay sobre la base de los criterios de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza. Dirección Nacional de Medio Ambiente, Montevideo.
- Carreira, S., Meneghel, M. & Achaval, F. (2005). Reptiles de Uruguay. DI.R.A.C. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Carstens, B.C. & Richards, C.L. (2007). Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution*, 61: 1439-1454.
- Crisci, J.V., Katinas L. & Posadas P. (2000). Introducción a la teoría y práctica de la biogeografía histórica. Sociedad Argentina de Botánica, Buenos Aires, Argentina.
- Croizat, L. (1964). Space, time, form: the biological synthesis, Caracas, publicado por el autor.
- Crow, J.F. (1987). Population genetics history: a personal view. *Annual Review of Genetics*, 21: 1-22.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9: 772-772.
- Darwin, C.R. (1859). On origin of species, Londres, J. Murray.
- Edwards S.V. & Bensch, S. (2009). Looking forwards or backwards in avian phylogeography? A comment on Zink and Barrowclough 2008. *Molecular Ecology*, 18: 2930–2933.
- Felappi, J.F., Vieira, R.C., Fagundes, N.J. & Verrastro, L.V. (2015). So Far Away, Yet So Close: Strong Genetic Structure in *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), a Species with Restricted Geographic Distribution in the Brazilian and Uruguayan Pampas. *PloS one* 10: e0118162.
- Filatov, D.A. (2009). Processing and population genetic analysis of multigenic datasets with ProSeq3 software. *Bioinformatics*, 25: 3189-3190.
- Freeland, J. (2005). Molecular markers in ecology. Pp 31-62. En: Kirk, H. (ed.). *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester.

- Gudynas, E. & Gambarotta, J.C. (1980). Notes on the ecology of the gekkonid lizard *Homonota uruguayensis*. *ASRA Journal*, 1: 13–26.
- Gudynas, E. (1986). Notes on the behavior of *Homonota uruguayensis* with special reference to elevated postures (Lacertilia: Gekkonidae). *Contribuciones en Biología del Centro Educativo Don Orione*, 14: 1–10.
- Harding, R.M. (1996). New phylogenies: an introductory look at the coalescent. Pp 15-22. En: Harvey, P.H., Leigh Brown, A.J., Maynard Smith, J. & Nee, S. (eds.). *New uses for new phylogenies*. Oxford University Press, New York.
- Hewitt, G.M. (2000). The genetic legacy of Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–913.
- Hewitt, G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (Series B-Biological Sciences)*, 359: 183-195.
- Himes, C.M.T., Gallardo, M.H. & Kenagy, G.J. (2008). Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography*, 35: 1415–1424.
- Kingman, J.F.C. (1982). The Coalescent. *Stochastic Processes and Their Applications*, 13: 235-248.
- Knowles, L.L. (2004). The burgeoning field of statistical phylogeography. *Journal of Evolutionary Biology*, 17: 1-10.
- Langone, J.A., Camargo, A. & de Sá, R.O. (2016). High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95: 137-151.
- Lessa, E.P., D'Elía, G. & Pardiñas, U.F.J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fuegian rodents. *Molecular Ecology*, 19: 3031–3037.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- MacManes, M. (2013). MacManes salt extraction protocol. Figshare. Available from: <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.658946>.
- Manel, S., Schwartz, K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- Martino, D. (2004). Conservación de praderas en el cono sur: valoración de las áreas protegidas existentes. *Ecosistemas*, 13: 114-123.

- McDiarmid, R.W., Foster, M.S., Guyer, C., Gibbons, J.W. & Chernoff, N. (eds.) (2012). Reptile biodiversity: standard methods for inventory and monitoring. University of California Press.
- Morando, M., Avila, L.J., Turner, C. & Sites Jr., J.W. (2007). Molecular evidence for species complex in the Patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 43: 952-973.
- Morando, M., Medina, C.D., Avila, L.J., Perez, C.H., Buxton, A. & Sites, J.W. (2014). Molecular phylogeny of the New World gecko genus *Homonota* (Squamata: Phyllodactylidae). *Zoologica Scripta*, 43: 249-260.
- Morrone, J.J. (2000). El tiempo de Darwin y el espacio de Croizat: rupturas epistémicas en los estudios evolutivos. *Ciencia*, 5: 39-46.
- Morrone, J.J. (2001). Biogeografía de América Latina y el Caribe. M&T-Manuales & Tesis SEA, vol. 3. Zaragoza, 148 pp.
- Muellner, A.N., Tremetsberger, K., Stuessy, T. & Baeza, C.M. (2005). Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Astraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology*, 14: 203-212.
- Noonan, B.P. & Yoder, A.D. (2009). Anonymous nuclear markers for Malagasy plated lizards (*Zonosaurus*). *Molecular Ecology Resources*, 9: 402-404.
- Olave, M., Avila, L.J., Sites Jr, J.W. & Morando, M. (2015). Model-based approach to test hard polytomies in the *Eulaemus* clade of the most diverse South American lizard genus *Liolaemus* (Liolaemini, Squamata). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 174: 169-184.
- Pastorino, M.J. & Gallo, L.A. (2002). Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *Journal of Biogeography*, 29: 1167-1178.
- Pook, C.E., Wüster, W., & Thorpe, R.S. (2000). Historical biogeography of the western rattlesnake (Serpentes: Viperidae: *Crotalus viridis*), inferred from mitochondrial DNA sequence information. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 15: 269-282.
- Premoli, A.C., Kitzberger, T. & Veblen, T.T. (2000). Isozyme variation and recent biogeographical history of the longlived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, 27: 251-260.
- Soriano, A., León, R.J.C, Sala, O.E., Lavado, R.S., Deregibus, V.A., et al. (1991). Río de la Plata grasslands. Pp. 367-407. En: Coupland, R.T. (ed.). *Ecosystems of the world 8A. Natural grasslands. Introduction and Western Hemisphere*. Elsevier, New York.

- Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipiński, A. & Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30: 2725-2729.
- Townsend, T.M., Alegre, R.E., Kelley, S.T., Wiens, J.J. & Reeder, T.W. (2008). Rapid development of multiple nuclear loci for phylogenetic analysis using genomic resources: an example from squamate reptiles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 47: 129-142.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22: 1193-1213.
- Vawter, L., & Brown, W.M. (1986). Nuclear and mitochondrial DNA comparisons reveal extreme rate variation in the molecular clock. *Science*, 234: 194-197.
- Vaz-Ferreira, R. & Sierra de Soriano, B. (1973). Notas ecológicas sobre *Homonota uruguayensis*. *Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay*, 2: 53-63.
- Victoriano, P.F., Ortiz, J.C., Benavides, E., Adams, B.J. & Sites, J.W. (2008). Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropicuridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology*, 17: 2397-2416.
- Vieira, R.C. (2012). Aspectos Ecológicos de uma População de *Homonota uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Phyllodactylidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. M.Sc Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 177pp.

Capítulo 2:

Variación genética espacial

Introducción

Históricamente, las zonas prioritarias para la conservación se han basado casi exclusivamente en la riqueza de especies (Posadas et al., 2001; Brazeiro et al., 2008). Sin embargo, los enfoques recientes enfatizan en que el valor de un área depende también de la diversidad genética que contiene (Purvis et al., 2005; Faith & Baker, 2006), por lo que el conocimiento sobre la distribución y estructura genética de las especies son necesarios para la toma de decisiones sobre zonas y poblaciones prioritarias a conservar (Benayas et al., 2009; Lean & Maclaurin, 2016; Torres-Florez et al., 2017; Magalhães et al., 2017).

Una de las formas de determinar la diversidad genética en un área es la diversidad filogenética (PD), que estima que proporción de la historia evolutiva acumulada está representada por un subconjunto de individuos (Faith, 1992). Para esta estimación, la PD se basa en la distancia del largo de ramas que une a los individuos en un cladograma, de forma que cuanto más grande sea esta distancia, mayor será la cantidad de cambios evolutivos acumulados representados en un subgrupo (Faith et al., 2004). Otra de las herramientas proveniente de la genética utilizada en conservación es el concepto de Unidades Evolutivas Significativas (ESU) (Moritz, 1994). Estas se definen como una población o grupo de poblaciones que poseen una historia evolutiva común separada de otros grupos y representa una variación adaptativa significativa (Ryder, 1986). Desde un punto de vista genético, esto significaría que una ESU está definida como grupos de poblaciones que poseen monofilia recíproca en los haplotipos del ADNmt, y al menos una divergencia significativa en las frecuencias alélicas de los loci de ADNn (Moritz, 1994). El concepto de Unidades de Manejo (MU) (Moritz, 1994) también ha sido ampliamente utilizado con fines de conservación, y refiere a poblaciones que son significativamente diferentes en las frecuencias alélicas (ADNmt o ADNn), sin importar la diferenciación filogenética de estos alelos (Fraser & Bernatchez, 2001). Este concepto apunta a la estructura poblacional actual de los grupos

intraespecíficos que constituyen poblaciones independientes en términos demográficos, de forma que cualquier impacto que sufra una MU no podría ser remediado por aportes de otras poblaciones adyacentes (Moritz, 1994; Avise, 1995; Palsbøll et al., 2006). El uso en conservación de los conceptos de PD, ESU y MU tiene como objetivo el reconocimiento y protección del patrimonio evolutivo de las poblaciones, y así poder mantener el potencial evolutivo de la especie (Moritz, 1994). Crandall et al. (2000) resaltan también la importancia de preservar la red natural de conexiones genéticas entre poblaciones, en lugar de solo conservar las poblaciones diferenciadas dentro de esta red, para asegurar la diversidad adaptativa de una especie.

La dispersión, y por lo tanto el flujo génico, pueden ser influenciados por factores intrínsecos (ej.: filopatría, movilidad, tolerancia fisiológica) o extrínsecos (ej.: interacciones bióticas, características del paisaje) (Ricketts, 2001; Manel et al., 2003; Storfer et al., 2010). El mantenimiento de la conectividad genética es esencial para que ocurra el intercambio de alelos, neutrales o adaptativos, entre las poblaciones o subpoblaciones. La interrupción del flujo génico puede llevar a la depresión endogámica, la acumulación de alelos deletéreos, la reducción del potencial adaptivo, y en última instancia, la extinción local (Fahrig, 2003; Crispo et al., 2011). Por lo tanto, el reconocimiento de las vías de dispersión, para poder evaluar el efecto de la fragmentación o pérdida de hábitat, puede ser muy importante en el mantenimiento de la conectividad entre las poblaciones (Sanderson et al., 2002; Ewers & Didham, 2005).

La genética del paisaje es una disciplina que integra información ambiental georeferenciada con la genética de poblaciones, para comprender como las características del paisaje influyen en la estructura, flujo génico y deriva de las poblaciones (Manel et al., 2003). Suele partir de la hipótesis nula del aislamiento por distancia (Wright, 1943) (modelo donde la dispersión es homogénea en todas direcciones, que deriva en una diferenciación genética proporcional con la distancia geográfica), y es ideal para testear el efecto del paisaje en la dispersión y conectividad de las poblaciones (Broquet et al., 2006). Posteriormente, se evalúa también la presencia de barreras a la dispersión, o de resistencia del paisaje (ciertos ambientes pueden generar una resistencia mayor a la dispersión de los individuos) como hipótesis alternativas para comprender la influencia del paisaje en la estructura poblacional (Cushman & Landguth, 2010).

La sabana uruguaya es una de las dos ecorregiones comprendidas dentro del bioma Pampa, diferenciadas de acuerdo a su flora y fauna con fines de identificar unidades de acción para la conservación (Olson et al., 2001). Esta abarca el territorio uruguayo, el sur de Brasil y parte de las provincias de Corrientes y Misiones en Argentina (Dinerstein et al., 1995). La mayor parte de esta región está constituida por planicies, siendo la excepción partes de Uruguay y Brasil donde se encuentran las zonas más altas, y emergen diversos arreglos rocosos (Paruelo et al., 2007). Particularmente en el norte de Uruguay, desde un punto de vista geomorfológico, se encuentra la denominada cuesta basáltica, caracterizada por un suelo basáltico superficial levemente inclinado hacia el oeste, con un límite abrupto en las Cuchillas de Haedo y Negra (Panario et al., 2014). En estos suelos superficiales, y con más frecuencia en las cuchillas, es donde emergen de forma parcheada los pedregales de basalto donde habita *Homonota uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961) (Carreira et al., 2005). Esta especie es considerada especialista de hábitat, ocupando pedregales, donde se refugia debajo de piedras en sustrato rocoso (Carreira & Maneyro, 2013). Esta condición, junto con su estrategia "sit-and-wait" de forrajeo están relacionadas a un área de vida restringida y a una distancia de dispersión que no supera 190 metros (Vieira, 2012). Basado en ADNmt, un estudio previo encontró cuatro clados profundamente diferenciados en *H. uruguayensis*, que mostraron correspondencia geográfica y una marcada estructura poblacional (Felappi et al., 2015). En este estudio, se adjudica el bajo flujo génico entre poblaciones a la capacidad de dispersión limitada, y se establece una relación entre la distancia geográfica y genética que indicaría aislamiento por distancia, aunque se propone también que los ríos podrían funcionar como barreras (Felappi et al., 2015). Sin embargo, pocas localidades uruguayas fueron analizadas y poco se sabe sobre el efecto del ambiente en la estructura poblacional, elementos importantes a la hora de considerar la conservación la especie.

Objetivos

- Determinar el número y la distribución geográfica de las poblaciones de *Homonota uruguayensis* y evaluar su diversidad
- Analizar la presencia de barreras del paisaje con incidencia histórica y/o reciente en la conformación y nivel de conectividad de las poblaciones

Hipótesis

Debido a los requerimientos y características biológicas de *Homonota uruguayensis*, la estructura de sus poblaciones está fuertemente influida por barreras espaciales que limitan la dispersión de los individuos.

Predicciones

- Se espera una marcada estructura poblacional con múltiples poblaciones genéticamente diferenciadas
- La diferenciación genética y conectividad de las poblaciones estará determinada principalmente por factores ambientales

Materiales y métodos

Se calcularon los estadísticos genéticos básicos de diversidad de los alineamientos [número de sitios variables (S), número de haplotipos (k), diversidad haplotípica (Hd), promedio de diferencias entre secuencias (Π) y diversidad nucleotídica (π)] mediante DnaSP 5.1 (Librado & Rozas, 2009). Para evaluar la distancia genética en el gen citocromo b se utilizó el software Arlequin 3.5.1 (Excoffier & Lischer, 2010) en el cálculo de las diferencias pareadas promedio entre las poblaciones.

Las genealogías fueron estimadas mediante inferencia bayesiana en Beast 1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007), el cual basa sus estimaciones en la teoría del coalescente. Este análisis consta de una corrida con un largo de Cadena de Markov-Monte Carlo (MCMC) de 400 millones y un muestreo cada 20 mil pasos, un *tree prior* coalescente de tamaño poblacional constante y con un modelo de reloj molecular estricto. Fue utilizado este modelo por recomendación de los autores del programa, debido a que en corridas de prueba el valor del parámetro *uclid.stdev* (desvio estándar del *uncorrelated lognormal relaxed clock*) tenía valores muy cercanos a cero (Drummond et al., 2009). Las redes de haplotipos fueron elaboradas en PopART (Leigh & Bryant, 2015), a través del algoritmo TCS (Templeton et al., 1992).

El número y distribución de poblaciones fue estimado con Geneland 4.0 (Guillot et al., 2005), analizando los dos marcadores moleculares en conjunto. Se utilizó *Approximate Bayesian Computation* (ABC) para testear diversos escenarios de migración entre las poblaciones, a partir de genealogías simuladas con ms (Hudson 2002) y analizadas a través del paquete abc (Csilléry et al., 2012), implementado en R 3.4.0 (R Core Team, 2017). Se simularon 1×10^6 genealogías por cada modelo analizado (Tabla 2), y se estimaron los parámetros θ para cada población y las tasas de migración simétricas, en unidades de $4N_e m$. Las simulaciones fueron analizadas utilizando el algoritmo *neural-network* y una tolerancia de 0.0002. Posteriormente, los modelos fueron evaluados mediante *bayes factors* (Berger & Pericchi, 1996), el análisis de pods (*pseudo-observed data sets*) y la herramienta *random forest* implementada en el paquete abcrf (Pudlo et al., 2015).

Para los análisis donde fue necesario se definieron las localidades, agrupando los puntos de muestreo adyacentes cuando que se encontraban en el mismo sistema de

pedregales, de forma que quedaran al menos cinco muestras por localidad (ver Anexo). Se realizaron test de Mantel en el software *zt* (Bonnet & Van de Peer, 2002), para analizar la correlación entre distancias geográficas, distancias genéticas y distancias con resistencia del paisaje. Las distancias geográficas fueron estimadas como la distancia lineal entre las localidades, medidas en el software QGIS 2.14 (QGIS Development Team, 2016), mientras que se utilizó el F_{st} como medida de distancias genéticas, calculado en el software Arlequin 3.5.1 (Excoffier & Lischer, 2010). Por otra parte, las distancias con resistencia del paisaje fueron calculadas utilizando los paquetes *gdistance* (van Etten, 2012), *rgeos* (Bivand et al., 2014) y *raster* (Hijmans & van Etten, 2014), implementados en R 3.4.0 (R Core Team, 2017), en base a capas realizadas por el Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio (IECA, Facultad de Ciencias), con datos de profundidad de suelo, rocosidad, escabrosidad y cuerpos de agua, de una resolución de 1 km x 1km de pixel aproximadamente. Para este cálculo, se asigna un valor de resistencia a diferentes categorías de las variables en las capas paisajísticas trabajadas, de forma que represente la afinidad de *Homonota uruguayensis* por los ambientes. Se adjudicó menor resistencia a las regiones más rocosas, con mayor escabrosidad o menor profundidad del suelo, debido a la afinidad de la especie por los afloramientos rocosos. En el caso de las corrientes de agua, estas se establecieron como lugares de alta resistencia a los efectos de impedir el cruce de ríos y arroyos. Para el cálculo de las distancias entre las localidades, el software halla la ruta que implique la menor distancia, teniendo en cuenta los costos de resistencia asignada a cada transición entre celdas del territorio, a través del algoritmo denominado *Least Cost Path* (Adriaensen et al., 2003). Dado que las capas que se disponen con información del paisaje sólo abarcan el territorio uruguayo, las localidades brasileñas con las que se contaba información fueron excluidas de los análisis de resistencia.

Se calculó la diversidad filogenética (PD) y su correspondiente curva de rarefacción a partir de la información mitocondrial, mediante el paquete *iNextPD v0.1.0* (Chao et al. 2015), ejecutado en la plataforma R 3.4.0 (R Core Team, 2017). Para este propósito se tomaron como unidades las poblaciones estimadas y las regiones determinadas por proximidad geográfica y una extensión tal que permita la implementación de medidas de conservación (Fig. 7a). También se utilizó el programa PDA (Chernomor et al., 2015) en el cálculo de PD complementario, para

identificar el área que mejor complementa en la representación de la diversidad filogenética a las localidades abarcadas dentro de áreas protegidas.

Para estudiar los patrones de diferenciación geográfica del aislamiento por distancia se utilizó el software *LocalDiff* (Duforet-Frebourg & Blum, 2014), que representa gráficamente la tasa de diferenciación genética en el rango geográfico estudiado y la analiza mediante un test de homogeneidad (que rechaza o no un patrón estacionario de variación genética), pudiendo evidenciar barreras, corredores, o gradientes de flujo génico. También se utilizó el paquete *memgene* (Galpern et al., 2014), ejecutado en la plataforma R 3.4.0 (R Core Team, 2017), que usa *Moran's Eigenvectors Maps* para extraer el componente espacial de la variación genética y detectar patrones sutiles de variación. Para estimar la presencia de barreras geográficas entre las localidades uruguayas se utilizó el paquete *adegenet* (Jombart, 2008), ejecutado en la plataforma R 3.4.0 (R Core Team, 2017), que utiliza el algoritmo de Monmonier (Manni et al., 2004) para detectar límites en la red de localidades creada a partir de información genotípica georreferenciada.

Finalmente, se realizaron regresiones lineales múltiples entre matrices (MRM) (Lichstein, 2007) y regresiones con modelos lineales mixtos generalizados (GLMM) (Bolker et al., 2009) entre las matrices de distancia genética y de distancias geográficas, paisajísticas y filogenéticas, para analizar el aporte de cada uno de estos conjuntos de datos a la variación genética encontrada. La matriz de distancia filogenética, se basa en la comparación de la presencia o ausencia de haplotipos, y se elaboró a partir de las distancias de filodiversidad beta entre localidades, calculada mediante el paquete *betapart* (Baselga & Orme, 2012), ejecutado en la plataforma R 3.4.0 (R Core Team, 2017). Las MRM fueron realizadas con el paquete *ecodist* (Goslee & Urban, 2007), y las GLMM fueron realizados utilizando el método bayesiano mediante el paquete *MCMCglmm* (Hadfield, 2010), ejecutados en la plataforma R 3.4.0 (R Core Team, 2017). Los modelos analizados con GLMM fueron evaluados y ordenados según el *deviance information criterion* (DIC).

Resultados

El análisis en Geneland llegó a la estabilización en las Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC) (ver Anexo), siendo la estimación de un número de seis poblaciones como la más probable (Fig. 1). De estas poblaciones determinadas, los que abarcan las localidades más al norte (Brasil, pob6) y el Departamento de Artigas (Uruguay, pob5), son los dos grupos cuya probabilidad de pertenencia en el territorio baja gradualmente a medida que nos alejamos de los puntos de muestreos que comprenden, mientras que los restantes grupos muestran un gradiente muy marcado en la probabilidad de pertenencia que limita las poblaciones (Fig. 2).

Los estadísticos de diversidad muestran mayor diversidad en el grupo de secuencias de origen mitocondrial, donde se destaca una alta diversidad haplotípica. Entre las poblaciones delimitadas con Geneland, la que mostró mayor diversidad fue la pob5 (Artigas), mientras que la pob2 (Laureles y Lunarejo) mostró la menor diversidad. Se destaca el alto número de sitios polimórficos y diversidad nucleotídica de la pob6 en el marcador mitocondrial, aunque su diversidad es 0 en el marcador nuclear, donde solo se contó con cuatro secuencias, todas del mismo haplotipo (Tabla 1).

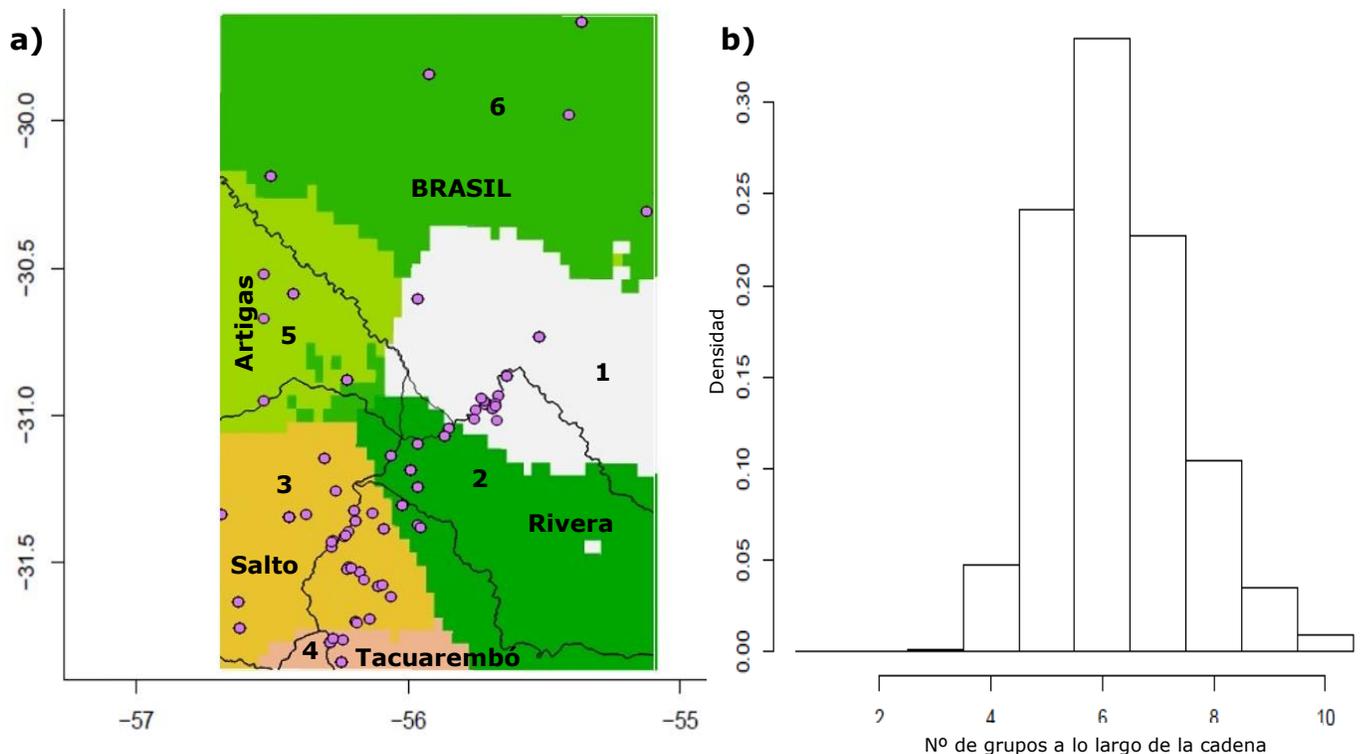


Figura 1. a) Distribución geográfica de las seis poblaciones estimadas mediante Geneland; b) Probabilidades en la estimación del número de clusters (poblaciones).

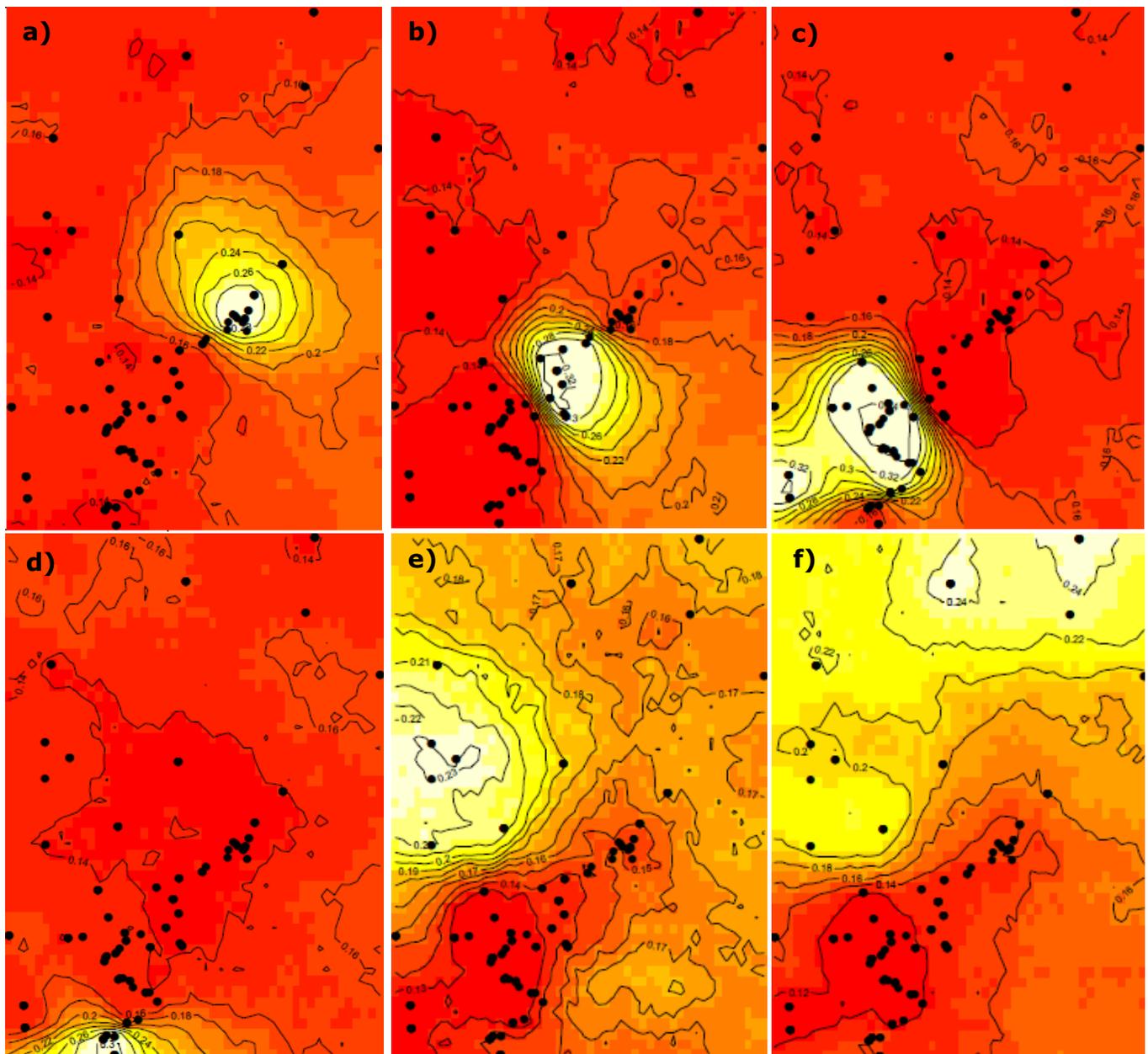


Figura 2. Mapas de líneas de probabilidad de pertenencia a las poblaciones determinadas en Geneland, a) Pob1: noreste del Depto. de Rivera y sur de Brasil; b) Pob2: localidades de Laureles (Tacuarembó) y Lunarejo (Rivera); c) Pob3: norte del Depto. de Tacuarembó y del Depto. de Salto; d) Pob4: región adyacente a la localidad de Tambores (Deptos. de Tacuarembó y Paysandú); e) Pob5: Depto. de Artigas; f) Pob6: localidades más al norte, en Brasil.

La mayor distancia genética fue de un 3,15%, encontrada entre las denominadas pob5 y la pob6, mientras que la menor distancia fue de un 0,48% y corresponde a la diferencia entre la pob6 y la pob1 (Tabla 2).

La red de haplotipos de citocromo b muestra cuatro haplogrupos principales, el primero contiene muestras que pertenecen a la pob3 y pob4 (haplogrupo I), el segundo contiene exclusivamente a la pob2 (haplogrupo II), mientras que los dos

Tabla 1. Estadísticos resumen de diversidad (S= sitios polimórficos; k= nº de haplotipos; Hd= diversidad haplotípica; Π = promedio de diferencias entre secuencias; π = diversidad nucleotídica), de los sets de secuencias de citocromo b (Cytb) y PRLR, para el set completo de secuencias y cada una de las poblaciones determinadas de *Homonota uruguayensis* (Fig.1).

	Todas		Pob1		Pob2		Pob3		Pob4		Pob5		Pob6	
	Cytb	PRLR	Cytb	PRLR										
S	49	24	17	9	8	8	31	11	9	8	16	10	30	0
k	46	32	13	5	7	7	20	12	3	5	9	12	6	1
Hd	0,928	0,678	0,884	0,614	0,713	0,484	0,864	0,569	0,53	0,848	0,939	0,926	0,831	0
Π	4,702	1,573	3,063	2,052	1,327	1,308	2,866	0,944	1,818	2,788	3,53	2,16	12,176	0
π	0,01231	0,00343	0,00711	0,00447	0,00317	0,00285	0,00708	0,00206	0,00425	0,00607	0,00812	0,00471	0,02008	0

haplogrupos restantes contienen a las muestras de las pob6 mezcladas, en uno de los casos con la pob1 (haplogrupo III), y en el otro caso formando un haplogrupo junto con la pob5 y dos haplotipos de la pob3 (haplogrupo IV), más específicamente del norte del Departamento de Salto. Cabe destacar que la localidad más al norte en Brasil, denominada Cerro do Tigre (incluida en la pob6), está representada por un único haplotipo, y se encuentra separado del resto por varios pasos mutacionales (Fig. 3).

En la genealogía realizada para citocromo b se observan los nodos más basales con un sustento de probabilidad posterior considerado significativo (>0.8). Se destacan dos clados principales, uno que contiene a localidades uruguayas exclusivamente, y el otro, a las localidades más al norte de Uruguay junto con las secuencias procedentes de Brasil. Por fuera de estos dos clados, se encuentran bien diferenciadas las secuencias pertenecientes a la localidad de Cerro do Tigre (Fig. 4). La genealogía elaborada a partir de las secuencias del gen nuclear PRLR no presentó buenos sustentos de probabilidad posterior en los nodos, por más que en la estimación de MCMC se llegara a estabilizar y todos los valores de tamaño de muestra efectivos fueran altos (>200) (Fig. 5).

Se probaron cinco modelos diferentes en ABC con distintos patrones de migración entre las poblaciones (Tabla 3), donde el modelo B (ver Anexo) resultó el más indicado según el criterio de *Bayes factor* (Tabla 4). En las estimaciones de los parámetros de este modelo (Fig. 6), se destaca que la estimación de migración entre pob5 y pob3 (m_{35}) resultó ser cero (valores negativos en la estimación de este parámetro). Analizando pods del modelo B se obtuvo una probabilidad posterior del modelo de 0.59 (error de 41%). Los resultados de *random forest* sin embargo elijen

Tabla 2. Porcentajes de distancia genética basadas en las diferencias pareadas corregidas entre las poblaciones, para el gen mitocondrial citocromo b. Elaborado para las agrupaciones determinadas mediante Geneland (ver Fig. 1)

	Pob1	Pob2	Pob3	Pob4	Pob5	Pob6
Pob1	-	0,53	1,84	1,93	2,88	0,48
Pob2	-	-	1,96	1,77	2,65	0,67
Pob3	-	-	-	0,87	1,30	2,29
Pob4	-	-	-	-	0,70	2,18
Pob5	-	-	-	-	-	3,15
Pob6	-	-	-	-	-	-

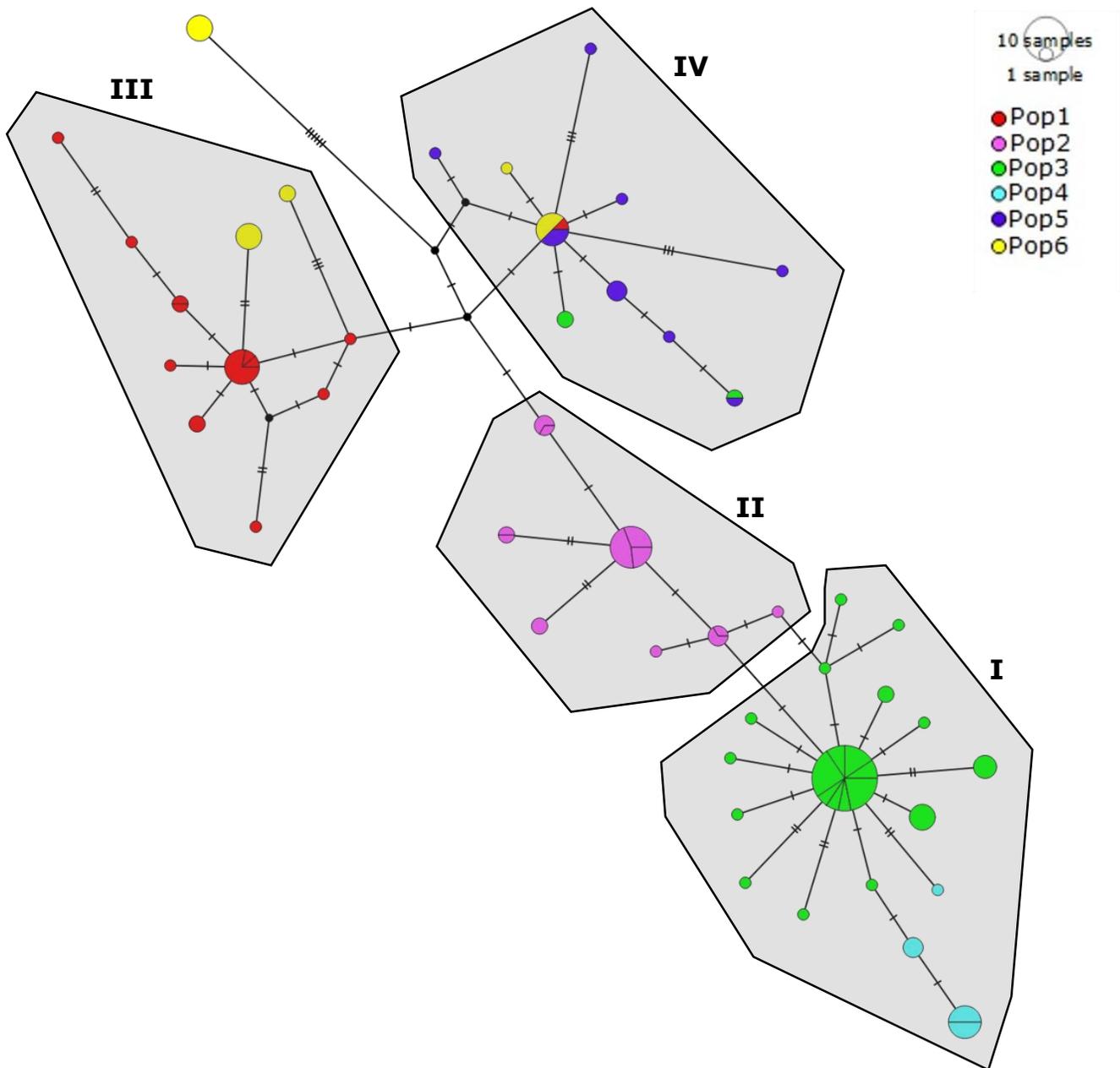


Figura 3. Red de haplotipos elaborada a partir de las secuencias de citocromo b, identificada por colores según la población de origen (ver Fig. 1), donde se indican los haplogrupos delimitados.

Figura 4. Genealogía bayesiana del gen citocromo b para todos las muestras utilizadas de *Homonota uruguayensis*, identificadas por colores según población de procedencia (ver Fig. 1). Se indica con * los nodos cuyo sustento de probabilidad posterior fue >0.8.

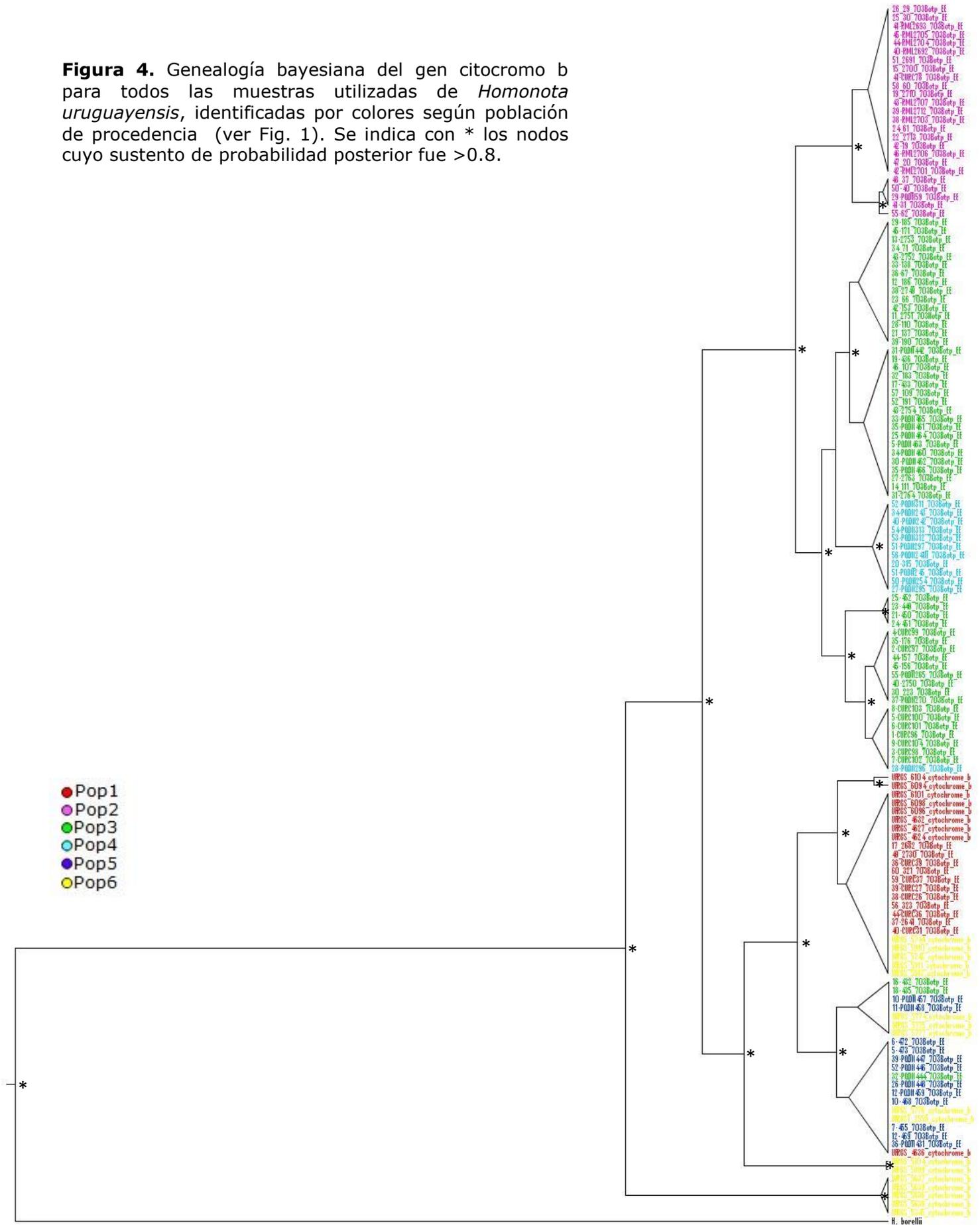


Figura 5. Genealogía bayesiana del gen PRLR para todas las muestras utilizadas de *Homonota uruguayensis*, identificadas por colores según población de procedencia (ver Fig. 1). Se indica con * los nodos cuyo sustento de probabilidad posterior fue >0.8.

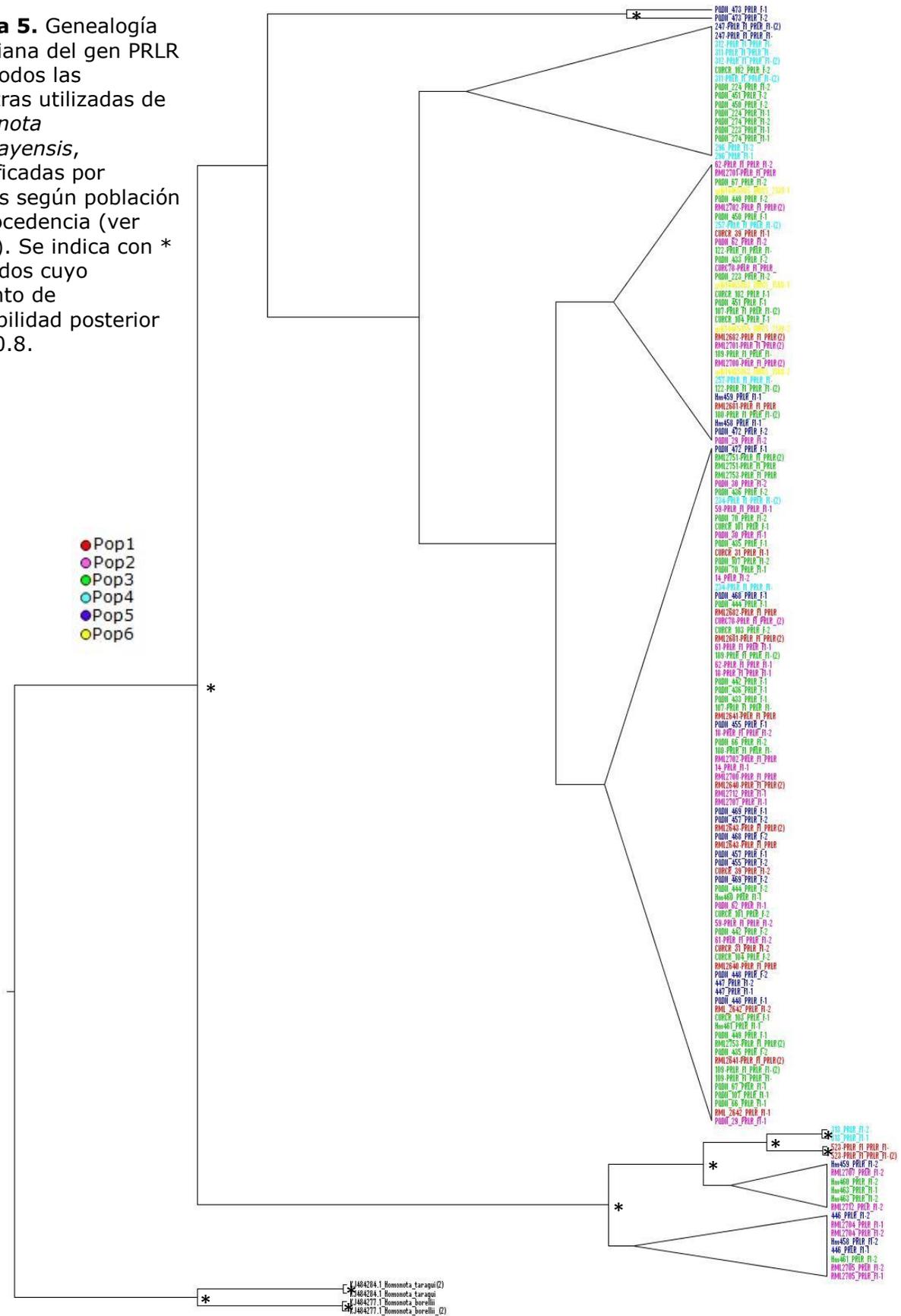


Tabla 3. Modelos de migración probados en ABC, con migraciones simétricas entre las poblaciones.

Modelo	Descripción del modelo (Tasas de migración contempladas)	Prob. posterior
A	$m_{12}; m_{23}; m_{34}; m_{25}; m_{35}; m_{16}; m_{56}$	0.1667
B	$m_{23}; m_{34}; m_{25}; m_{35}; m_{16}; m_{56}$	0.7819
C	$m_{12}; m_{23}; m_{34}; m_{25}; m_{35}; m_{16}$	0.0288
D	$m_{23}; m_{34}; m_{25}; m_{35}; m_{16}$	0.0180
E	$m_{12}; m_{23}; m_{34}; m_{16}; m_{56}$	0.0046

Tabla 4. Valores de *bayes factor* resultado de la comparación entre modelos probados en ABC. Se compara el apoyo del modelo en las filas, con respecto al modelo en las columnas.

	A	B	C	D	E
A	1.0	0.21	5.79	9.27	36.06
B	4.69	1.0	27.16	43.45	169.11
C	0.17	0.037	1.0	1.60	6.23
D	0.10	0.023	0.62	1.0	3.89
E	0.027	0.0059	0.16	0.26	1.0

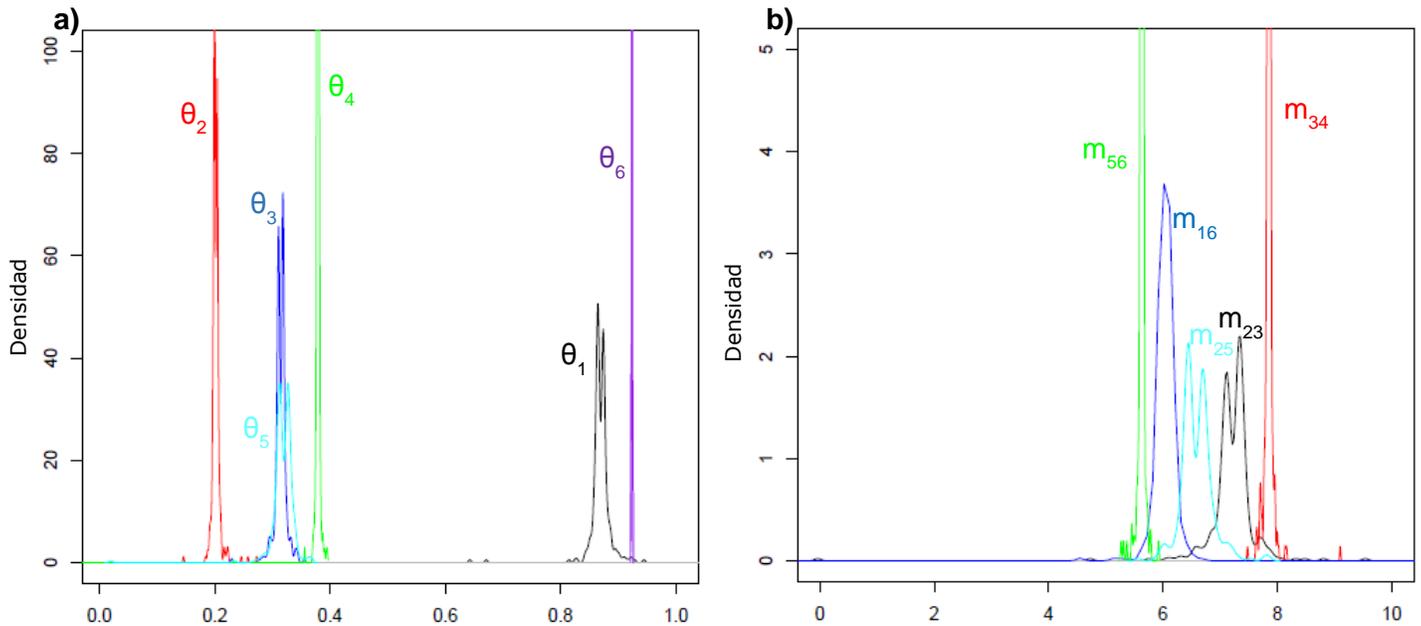


Figura 6. a) Theta (θ) estimado para cada población del modelo B evaluado en ABC; b) Tasas de migración simétricas entre pares de poblaciones estimadas para el modelo B en ABC.

al modelo A como más probable (probabilidad posterior = 0,55) con una estimación de 34% de error (ver Anexo).

El cálculo de PD mostró que la región con mayor diversidad fue el sur de Brasil, mientras que en la región del centro de Salto fue la menor. En 10 de las 12 regiones consideradas, las curvas de rarefacción proyectaron una PD mayor de la encontrada con el muestreo realizado (Fig. 7a y b). En cuanto a la PD en las poblaciones estimadas, la pob3 fue la que presentó mayor diversidad, aunque la extrapolación indicaría que es la pob5 la que posee mayor PD (Fig. 7c). En el cálculo del PD complementario, se destaca la única región comprendida en la zona de Lunarejo (Depto. de Rivera), que presentó una complementariedad mayor con las regiones de Brasil (PDcompBrasNorte= 0.077; PDcompBrasSur= 0.060), y en tercer lugar con el norte del Depto. de Salto (PDcompSalN=0.054) (ver Anexo).

Los resultados de Localdiff mostraron que existe una tasa de diferenciación genética en el espacio homogénea (Fig. 8), ya que el test de homogeneidad no pudo rechazar un patrón estacionario de diferenciación genética ($p > 0.05$).

El análisis de los patrones espaciales mediante MEMGENE encontró que un 22% de la variación en las distancias genéticas estaría explicada por los factores espaciales, compuesto de un 13.8% explicado por los patrones del modelo, un 1.5% explicado por las coordenadas independientemente del modelo y un 6.7% por patrones espaciales confundidos entre coordenadas y el modelo. Dentro de esta variación, el análisis especifica cuatro componentes significativos, entre los cuales el primero explicaría un 46% de esta variación (Fig. 9), el segundo un 24%, el tercero 18% y el cuarto un 11%.

Para adegenet se utilizaron dos tipos de redes entre localidades, red tipo *K nearests neighbours* (con las dos localidades más cercanas) y red tipo *Minimum spanning tree*, donde en ambos casos se trazaron barreras que separan la localidades en los mismos sitios (Fig. 10).

El test de Mantel mostró una correlación significativa entre las distancias genéticas y las distancias geográficas ($r=0.46$; $p < 0.001$). A partir de las superficies de resistencia y de los caminos de menor costo (Fig. 11), también se encontraron correlaciones significativas entre las distancias genéticas y las distancias de resistencia de escabrosidad ($r=0.38$; $p=0.0018$), rocosidad ($r=0.44$; $p < 0.001$), profundidad del suelo ($r=0.45$; $p=0.001$) y corrientes agua ($r=0.39$; $p < 0.001$). Sin embargo, en los casos de test de Mantel parciales, utilizando la distancia geográfica

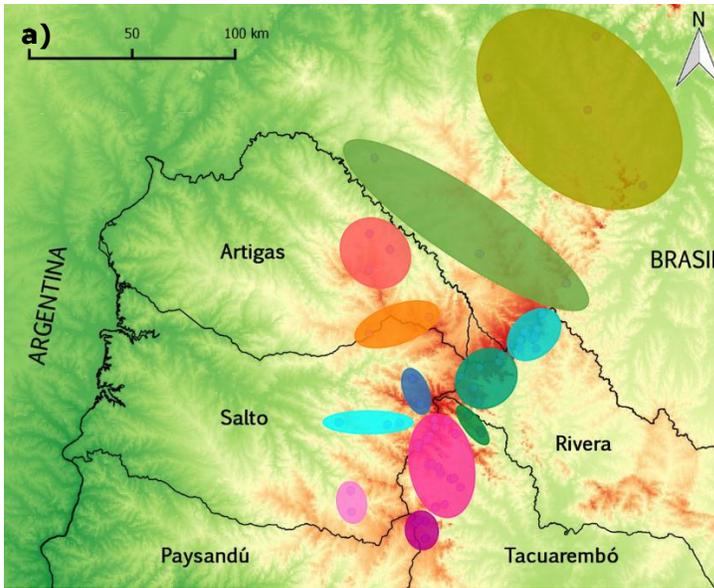


Figura 7. a) Regiones donde las muestras fueron agrupadas para el cálculo de Diversidad Filogenética (PD); b) Curvas de rarefacción de PD para diferentes regiones muestreadas; c) Curvas de rarefacción de PD para las poblaciones estimadas.

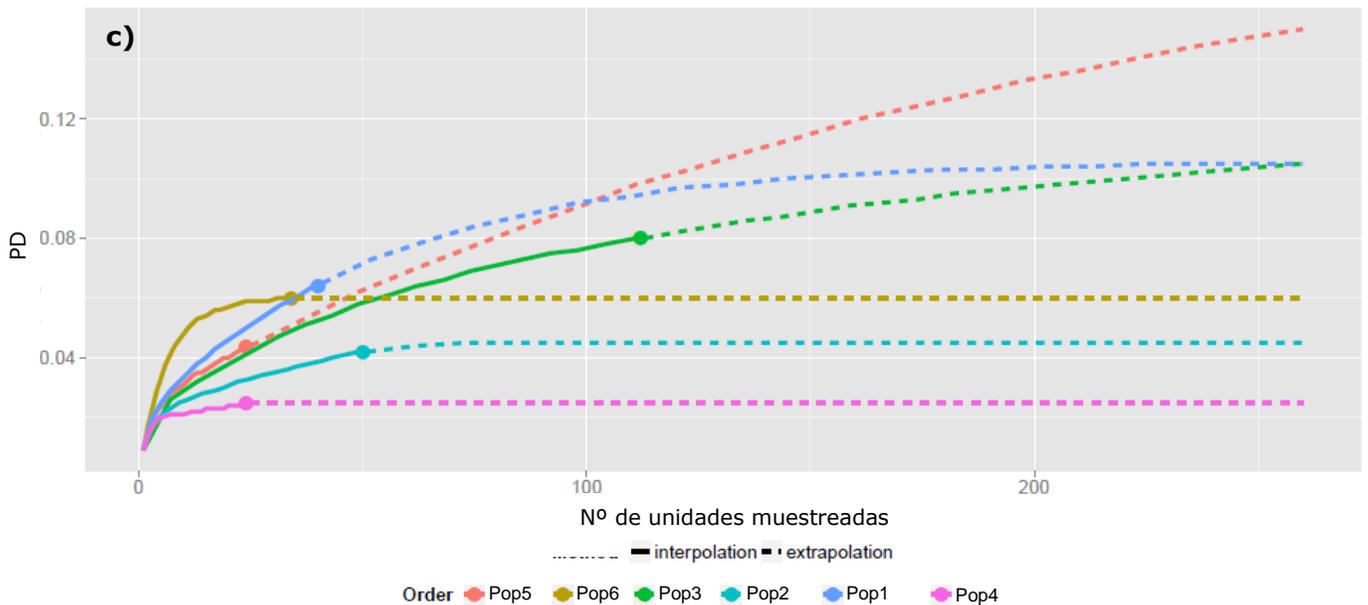
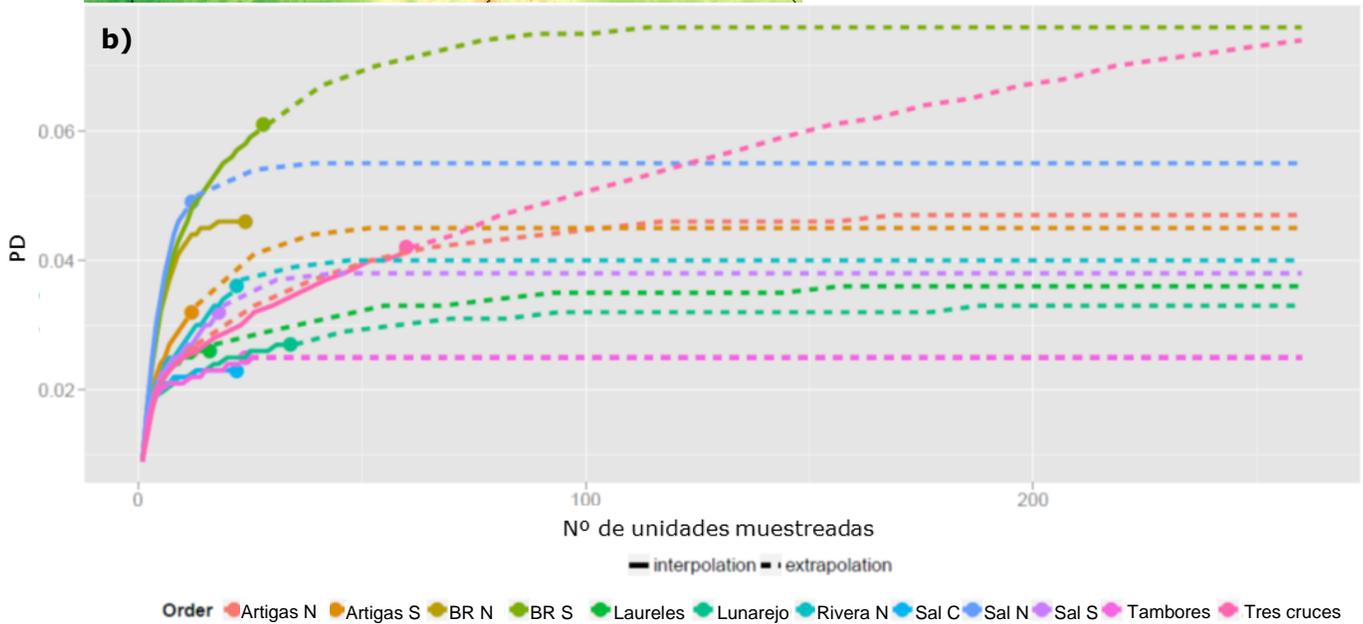
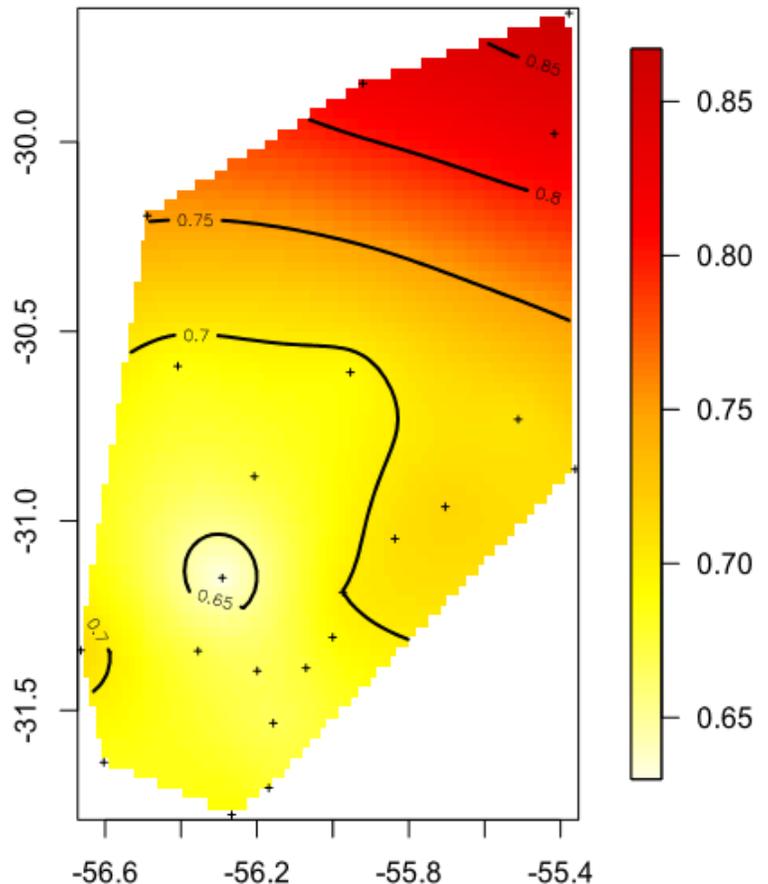


Figura 8. Mapa de localidades muestreadas generado por Localdiff, donde se representa la diferenciación genética acumulada en el territorio.



como tercer matriz de control, no fueron significativas las correlaciones con las matrices de resistencia ($p > 0.05$).

Las matrices de resistencia según escabrosidad, rocosidad y profundidad del suelo mostraron estar altamente correlacionadas entre sí ($R > 0.80$), por lo que para las MRM y GLMM fue utilizada únicamente la de escabrosidad. Las MRM mostraron el mejor ajuste entre las distancias genéticas y distancias filogenéticas + distancias geográficas ($R^2 = 0.26$; $p = 0.0002$), dentro de la cual, el ajuste de las distancias geográficas fue significativo ($p = 0.0044$) y el de las distancias filogenéticas fue marginalmente significativo ($p = 0.064$) (ver Anexo). En el caso de los GLMM, el modelo que fue mejor evaluado según DIC fue el que relacionaba las distancias genéticas con las distancias filogenéticas, distancias geográficas y distancias evitando las corrientes de agua (Tabla 5).

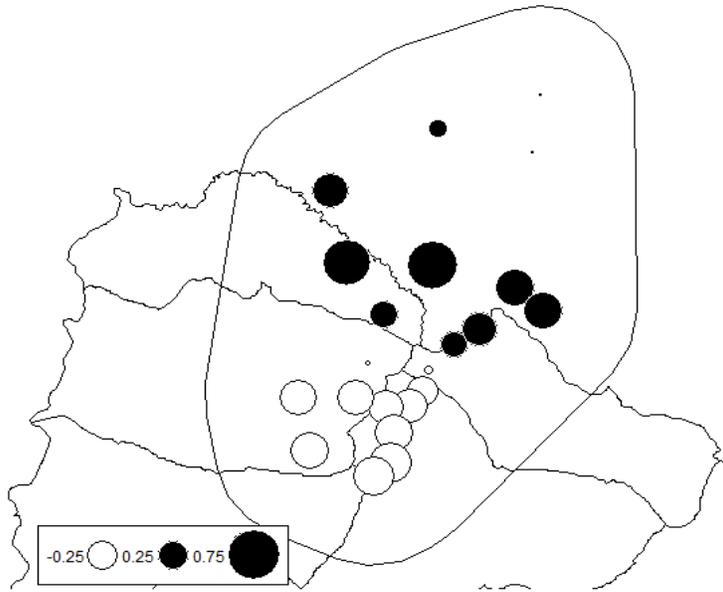


Figura 9. Mapa de norte de Uruguay y sur de Brasil, donde se detalla el primer componente de los ejes de memgene. Los círculos de igual color y tamaño indican igual valor en el eje, mientras que el color blanco o negro indica extremos opuestos en los ejes de variación analizados.

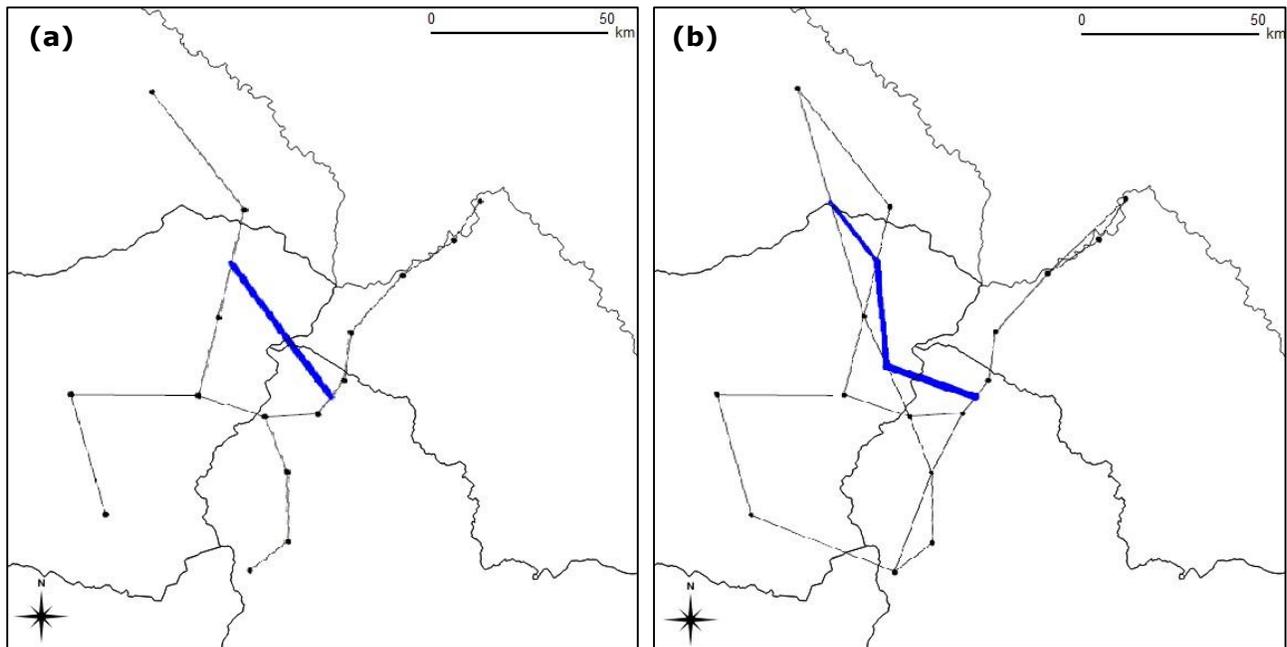


Figura 10. Red de localidades elaborada en adegenet, a partir de *Minimum spanning tree* (a) y de *2 nearest neighbours* (b), donde se detalla en azul el lugar donde se trazaron las barreras a partir del algoritmo de Monmonier.

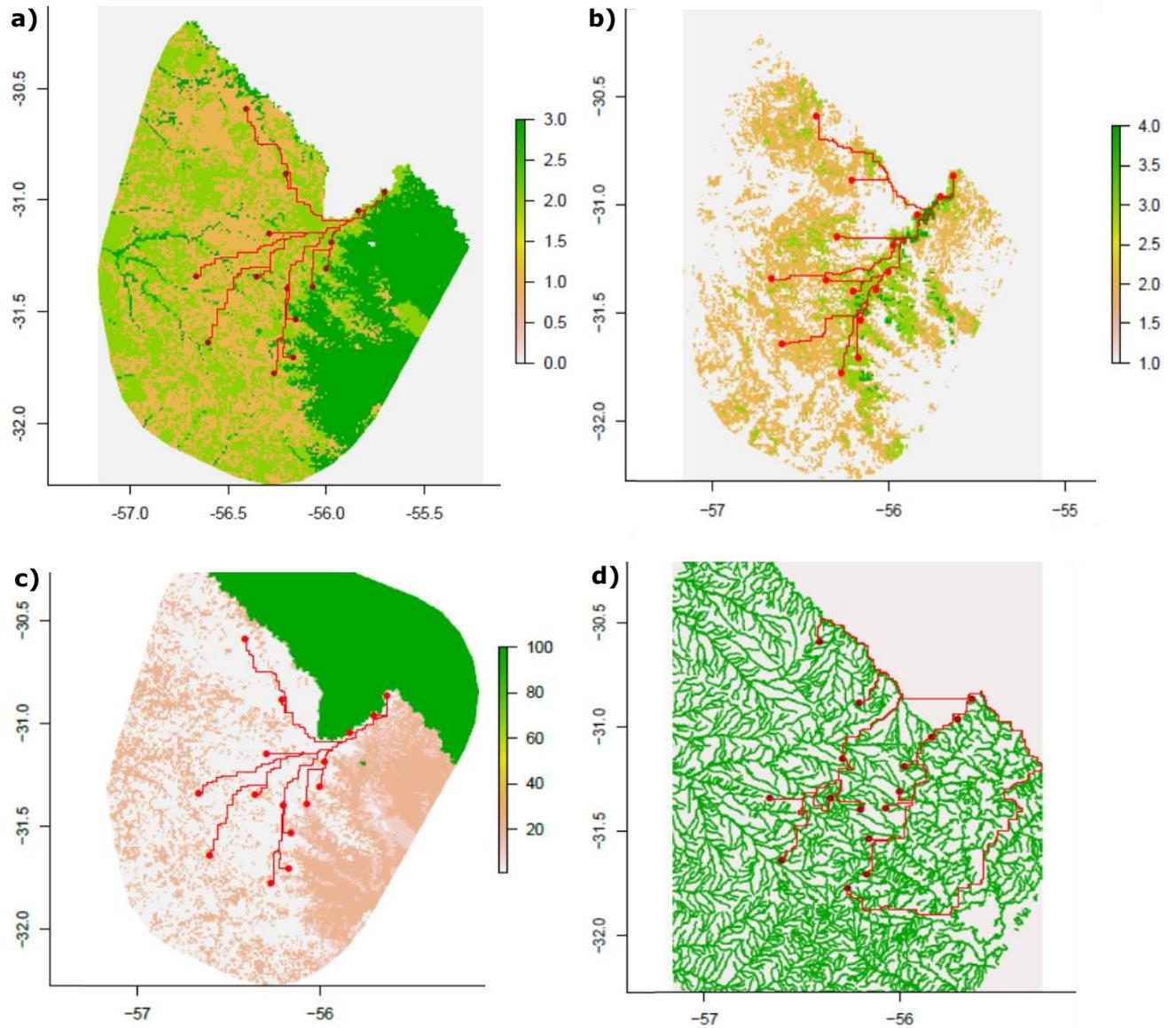


Figura 11. Mapas de resistencia para las distintas variables analizadas, con el ejemplo de rutas de menor costo para una de las localidades: a) Rocosidad; b) Escabrosidad; c) Profundidad del Suelo; d) Distancias evitando corrientes de agua.

Tabla 5. Evaluación de modelos lineares mixtos generalizados, para la correlación de las distancias genéticas entre las localidades muestreadas, donde se utilizaron matrices de distancias filogenéticas (Filo), distancias geográficas (Geo), distancias evitando corrientes de agua (Agua) y distancias de resistencia por escabrosidad (Esc).

Modelo	DIC	R²
Filo + Geo + Agua	-8.561	0.328
Filo + Geo + Esc + Agua	-7.041	0.363
Filo + Geo	-4.025	0.310
Filo + Geo + Esc	0.947	0.297
Filo	23.575	0.151

Discusión

Los resultados de Geneland fueron claros con respecto al número de poblaciones de *Homonota uruguayensis* encontradas y sus límites geográficos aunque, si se analizan los mapas de probabilidad de pertenencia a las distintas poblaciones, se encuentra que están más definidas las poblaciones 2, 3 y 4. Esto puede deberse a que poseen una densidad y número de muestras mayor que en los otros casos, como puede evidenciarse en la población 6, dónde los límites resultan más difusos. Seguramente, con una densidad de muestreo mayor se pueda identificar más precisamente los límites geográficos de todas las poblaciones.

Analizando la red de haplotipos y la genealogía de citocromo b, se diferencian claramente las secuencias pertenecientes a la localidad de Cerro do Tigre (la localidad más al norte analizada), quedando por fuera las restantes secuencias. Si bien sería interesante analizar mayor número de muestras y marcadores nucleares de esta localidad, este resultado es concordante con los encontrados por Felappi et al. (2015), donde se propone que los individuos de esta localidad puedan pertenecer a una especie o subespecie nueva. También se encuentra muy diferenciado el clado compuesto por todas las secuencias asignadas a la población 2, en las localidades de Laureles y Lunarejo. Basados en la información mitocondrial, este grupo puede considerarse una ESU, ya que es monofilético y no comparte haplotipos con otras poblaciones. Este resultado cobra mayor fortaleza considerando que existe un buen muestreo en esta área, dada la proximidad y continuidad que poseen estas localidades respecto al resto de los puntos muestreados en los Departamentos de Tacuarembó y Rivera. Desde el punto de vista de la conservación, en el clado que contiene a las poblaciones más australes (poblaciones 2, 3 y 4), consideramos que cada una de ellas debe ser una UM diferente, debido a la diferenciación genética vista en los resultados. Las poblaciones 1 y 5, ambas más emparentadas con las localidades del sur de Brasil que las anteriores, también deberían considerarse como UM diferentes, ya que su composición genética es diferente a las de otras localidades uruguayas. Respecto a la denominada población 6, la determinación de estas localidades como una población real de la especie es confusa, ya que incluyó a la localidad de Cerro do Tigre, que está muy diferenciada del resto de los individuos. Probablemente, el bajo número de secuencias de estas localidades junto con la baja

densidad geográfica de muestreo esté influenciando estos resultados, por lo que sería necesario aumentar los muestreos en esta área en particular.

Analizando la diversidad genética de las poblaciones, resaltan los altos niveles encontrados en la población 4 en el gen PRLR. Tratándose de un gen nuclear, no es esperada una diversidad haplotípica tan alta, incluso mayor que en citocromo b, que presenta una diversidad más baja que en las restantes poblaciones. Una posibilidad podría ser que sea una población que haya sufrido un decrecimiento poblacional reciente, observándose una diversidad inusualmente alta como consecuencia de un cuello de botella poblacional. Otra opción, no excluyente, podría ser que estemos en presencia de una población muy pequeña, donde el efecto de la deriva sea importante y los valores de diversidad estén sujetos al azar.

Desde el punto de vista de la diversidad, sería prioritaria para la conservación la población 5 (localidades del Depto. de Artigas), en base a la extrapolación de la mayor PD en su curva de rarefacción. A pesar de esto, proponer medidas de conservación en esa escala de extensión geográfica no sería factible, y por ello, se analizó la diversidad por regiones. Con estas agrupaciones, es en la región más al sur de Brasil donde se proyecta mayor PD, mientras que el norte de Artigas sería donde habría mayor PD en Uruguay, a lo que se suma también la más alta diversidad haplotípica y nucleotídica observada. Es por esto que podría ser importante conservar esta región para la especie. En toda la extensión geográfica analizada, únicamente existe un área protegida en Uruguay, el Paisaje protegido Valle del Lunarejo, que abarca la localidad muestreada de Lunarejo perteneciente a la población 2 (MVOTMA, 2017). A la hora de asegurar la conservación de la especie, esta única medida de protección existente resulta insuficiente, en particular para conservar la mayor parte del acervo genético o una sección representativa de su diversidad. Para este propósito, los resultados muestran que sería prioritario la región del norte de Salto en Uruguay, ya que presentó mayor complementariedad con la zona de Lunarejo desde el punto de vista de la PD. Visiones actuales de conservación proponen poner el foco sobre la diversidad filogenética a la hora de establecer prioridades, ya que sería la mejor herramienta para medir la biodiversidad conforme a los objetivos de la conservación (Lean & Maclaurin, 2016).

En el clado que incluye a las poblaciones 1, 5 y 6, se destacan tres secuencias mitocondriales que pertenecen a la población 3, más precisamente a la localidad del norte de Salto, cuando las restantes de esa localidad se encuentran en el clado que

componen junto con las poblaciones 2 y 4. Esta es la única incongruencia entre la distribución y la filogenia mitocondrial, pero geográficamente puede tener sentido, ya que el norte de Salto es un punto cercano a las localidades de Artigas (pob 5). Esto podría indicar una conexión actual o algún relacionamiento histórico entre estas poblaciones, sin embargo en el modelo de migraciones analizado con ABC que resultó más probable (que contemplaba una migración entre estas dos poblaciones) el valor estimado de la tasa de migración entre ellas fue cero. Cabe destacar que los resultados muestran cierta conectividad entre las poblaciones, más allá de la diferenciación observada, algo que sería bueno para la conservación de la especie. Si bien varias de las conexiones planteadas en los modelos fueron consistentes con la estructuración encontrada, las probabilidades de error en ellos fue alta, por lo que estos resultados son pocos confiables. Incluso, cuando se utilizó *random forest* para la evaluación, el modelo elegido fue diferente, por lo que se genera más incertidumbre aún respecto a los resultados de los modelos analizados.

El nivel de diferenciación genética entre las poblaciones estuvo dentro de los valores esperados para el ADNmt. Si bien una distancia genética de un 3,15% (valor máximo de distancia genética encontrado) estaría dentro de lo esperado a un nivel de especies dentro de algunos grupos de lagartijas, como los pertenecientes a la familia Lacertidae (Ljubisavljević et al., 2007), varios casos en gekos muestran que suele existir una distancia genética entre poblaciones hasta mayores de un 9% (Carranza et al., 2000; Jesus et al., 2005; 2006). En la misma familia Phyllodactylidae también se ha encontrado gran estructura en el ADNmt, sin embargo la comparación con *Homonota uruguayensis* no es tan clara debido a la significativamente menor distribución que ocupa esta especie, algo que no lo hace directamente comparable con los estudios mencionados, y resalta aún más la fuerte estructura encontrada en este marcador (Werneck et al., 2012).

Los resultados del test de Mantel permiten ver un patrón de aislamiento por distancia significativo entre las localidades, que analizado en detalle muestra algunas discontinuidades y poblaciones definidas, algo que se ajusta mejor a un patrón derivado del modelo *stepping stone* (Kimura, 1953). De hecho, el modelo nulo de aislamiento por distancia estacionario que se prueba en LocalDiff se adecua al modelo *stepping stone*, y no pudo ser rechazado (Duforet-Frebourg & Blum, 2014).

En los resultados de memgene se observan dos grupos diferenciados, que coinciden con los dos grandes clados encontrados en la genealogía. Esta separación podría estar hablando de una barrera entre estos dos grupos. A su vez, también las barreras halladas mediante adegenet coinciden parcialmente con esta separación, particularmente en la separación de la localidad del norte de Salto con las de Artigas. Considerando la parte Este de la barrera calculada en adegenet y del corte en memgene, vemos que no coinciden exactamente, pero ambos conforman los límites de la población 2 (Figs. 9 y 10). Estos resultados son también concordantes con lo visto en la genealogía, donde la población 2 muestra ser un clado diferenciado del resto. La barrera encontrada, parece encontrarse con orientación noroeste-sureste, al igual que las corrientes de agua, que en este caso serían el Arroyo Arapey Grande en el Departamento de Artigas, y el Arroyo de las Cañas en el Departamento de Tacuarembó. A su vez, las localidades de Artigas, se encuentran en la Cuchilla de Belén, una cuchilla secundaria derivada de la Cuchilla de Haedo, por lo que el valle del Arroyo Arapey Grande separa incluso dos sistemas de elevaciones diferentes.

El efecto del paisaje analizado (escabrosidad, rocosidad, profundidad del suelo y corrientes de agua) no parece haber sido significativo más allá de la distancia geográfica. Si bien se analiza una especie especialista de hábitats rocosos, por lo que debería observarse una correspondencia con las variables del paisaje analizadas, tal vez la resolución que brindan los marcadores moleculares utilizados no sea la apropiada para ver este efecto (Anderson et al., 2010). Por lo tanto, sería necesario el uso de marcadores con una variación mayor (ej.: microsatélites o SNPs) que permitan observar procesos más recientes. También puede llegar a ser un problema la resolución de las capas ambientales, que al ser mayor que la capacidad de dispersión de la especie (Vieira, 2012), se puede estar perdiendo información importante para los análisis (Anderson et al., 2010). La única característica del paisaje que tuvo alguna relación con la estructura genética fueron las corrientes de agua, que tuvo una pequeña contribución en el modelo mejor evaluado mediante GLMM. También se destaca en los análisis de memgene y adegenet como barreras geográficas, donde la ubicación y sentido de estas coinciden con arroyos. Si bien la evidencia no es firme, Felappi et al. (2015) también proponen a las corrientes de agua como determinantes en la distribución de esta especie. Es posible que no todos los arroyos sean barreras para las

poblaciones, puede que solo algunos cumplan esta función (por su caudal, por ejemplo), o lo hayan hecho en algún momento. Incluso, es común que tramos de las nacientes de algunas corrientes de agua se sequen durante los periodos secos y cálidos. Este patrón, donde ríos y arroyos grandes actúan como barreras, ha sido observado en Sudamérica para diversas especies de animales y plantas, planteándose como una de las barreras más comunes en los estudios filogeográficos realizados en el continente (Turchetto-Zolet et al., 2013).

Con los datos analizados se pudo explicar solamente un máximo del 32% de la distribución geográfica de la variación genética analizada, explicados principalmente por las distancias geográficas y las relaciones filogenéticas. Sin embargo, las variables paisajísticas no fueron explicativas de la distribución, lo cual puede deberse a la cobertura histórica de los marcadores moleculares utilizados, no acorde para que muestren señales de efectos más recientes del paisaje (Anderson et al., 2010). Adicionalmente, pueden existir otros factores ambientales que no están siendo evaluados y tal vez sean relevantes para la estructuración genética de la especie.

En conclusión, se encontraron un total de seis poblaciones de *H. uruguayensis*, con una estructura poblacional marcada. Se destaca la población 2, en la zona de Laureles y Lunarejo, que conforman un clado con límites geográficos claros que puede definirse como una ESU. Sería necesario un mayor muestreo en la parte brasileña de la distribución, donde se destaca la localidad de Cerro do Tigre, que conforma un clado altamente diferenciado del resto de las muestras analizadas. Sería interesante realizar análisis morfométricos en la especie, particularmente para ver si estas localidades diferenciadas genéticamente también los están desde su morfología. En la escala temporal y espacial analizada, no se encontró un efecto del paisaje significativo en la estructuración poblacional, y se detectó un efecto más importante de la distancia geográfica y de las relaciones filogenéticas. Se propone la obtención de marcadores moleculares hipervariables para poder analizar patrones a una escala temporal más reciente, que permita identificar los factores del paisaje que condicionan la conectividad genética de esta especie especialista de hábitat y con escasa capacidad de dispersión.

Bibliografía

- Adriaensen, F., Chardon, J. P., De Blust, G., Swinnen, E., Villalba, S., Gulinck, H. & Matthysen, E. (2003). The application of 'least-cost' modelling as a functional landscape model. *Landscape and urban planning*, 64: 233-247.
- Anderson, C.D., Epperson, B.K., Fortin, M.J., Holderegger, R., James, P., Rosenberg, M.S., Scribner, K.T. & Spear, S. (2010). Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Molecular Ecology*, 19: 3565-3575.
- Avise, J.C. (1995). Mitochondrial DNA polymorphism and a connection between genetics and demography of relevance to conservation. *Conservation Biology*, 9: 686-690.
- Baselga, A. & Orme, C.D.L. (2012). betapart: an R package for the study of beta diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 3: 808-812.
- Benayas, J.M.R., Newton, A.C., Diaz, A. & Bullock, J.M. (2009). Enhancement of Biodiversity and Ecosystem Services by Ecological Restoration: A Meta-Analysis. *Science*, 325: 1121-1124.
- Berger, J.O., & Pericchi, L. R. (1996). The intrinsic Bayes factor for model selection and prediction. *Journal of the American Statistical Association*, 91(433), 109-122
- Bonnet, E., & Van de Peer, Y. (2002). zt: a software tool for simple and partial Mantel tests. *Journal of Statistical software*, 7: 1-12.
- Bivand, R., Rundel, C., Pebesma, E., Stuetz, R. & Hufthammer, K.O. (2014). rgeos. Interface Geometry Engine–Open Source (GEOS). R package version 0.3–23.
- Bolker, B.M., Brooks, M.E., Clark, C.J., Geange, S.W., Poulsen, J.R., Stevens, M.H.H. & White, J.S.S. (2009). Generalized linear mixed models: a practical guide for ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 24: 127-135.
- Brazeiro, A., Achkar, M., Canavero, A., Fagúndez, C., González, E., Grela, I., Lezama, F., Maneyro, R., Barthesagy, L., Camargo, A., Carreira, S., Costa, B., Núñez, D., da Rosa, I. & Toranza, C. (2008). Prioridades geográficas para la conservación de la Biodiversidad terrestre de Uruguay. Resumen Ejecutivo. Proyecto PDT 32-26.
- Broquet, T., Ray, N., Petit, E., Fryxell, J.M. & Burel, F. (2006). Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landscape Ecology*, 21: 877-889.
- Carranza, S., Arnold, E.N., Mateo, J.A. & López-Jurado, L.F. (2000). Long-distance colonization and radiation in gekkonid lizards, *Tarentola* (Reptilia: Gekkonidae), revealed by mitochondrial DNA sequences. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 267: 637–649.

- Carreira, S., Meneghel, M. & Achaval, F. (2005). *Reptiles de Uruguay*. D.I.R.A.C. Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo.
- Carreira, S. & Maneyro, R. (2013). *Guía de Reptiles del Uruguay*. Ediciones de la Fuga, Montevideo.
- Chao A., Chiu C., Hsieh T., Davis T., Nipperess D. & Faith, D. (2015). Rarefaction and extrapolation of phylogenetic diversity. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 380-388.
- Chernomor, O., Minh, B.Q., Forest, F., Klaere, S., Ingram, T., Henzinger, M. & von Haeseler, A. (2015). Split diversity in constrained conservation prioritization using integer linear programming. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 83-91.
- Crandall, K.A., Bininda-Emonds, O.R.P., Mace, G.M. & Wayne, R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15: 290-295.
- Crispo, E., Moore, J.S., Lee-Yaw, J.A., Gray, S.M. & Haller, B.C. (2011). Broken barriers: human-induced changes to gene flow and introgression in animals. *BioEssays*, 33: 508-518.
- Csilléry, K., François, O. & Blum, M. G. (2012). abc: an R package for approximate Bayesian computation (ABC). *Methods in ecology and evolution*, 3: 475-479.
- Cushman, S.A. & Landguth, E.L. (2010). Spurious correlations and inference in landscape genetics. *Molecular Ecology*, 19: 3592-3602.
- Dinerstein, E., Olson D.M., Graham, D.J., Webster, A.L., Primm, S.A., Bookbinder, M.P. & Ledec, G. (1995). *A Conservation Assessment of the Terrestrial Ecoregions of Latin America and the Caribbean*. Washington (DC): World Bank.
- Drummond, A.J., Ho, S.Y.W., Rawlence, N. & Rambaut, A. (2009). A rough guide to BEAST 1.4. 2007. Edinburgh: University of Edinburgh.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology* 7: 214.
- Duforet-Frebourg, N. & Blum, M. G. (2014). Nonstationary patterns of isolation-by-distance: inferring measures of local genetic differentiation with bayesian kriging. *Evolution*, 68: 1110-1123.
- Ewers, R.M. & Didham, R.K. (2005). Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. *Biological Reviews*, 81: 117-142.

- Excoffier, L. & Lischer, H.E. L. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
- Fahrig, L. (2003). Effects of habitat fragmentation on biodiversity. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 34: 487–515.
- Faith, D.P. (1992). Conservation evaluation and phylogenetic diversity. *Biological Conservation*, 61: 1–10.
- Faith, D.P., Reid, C.A.M. & Hunter, J. (2004). Integrating Phylogenetic Diversity, Complementarity, and Endemism. *Conservation Biology*, 18: 255-261.
- Faith, D.P. & Baker, A.M. (2006). Phylogenetic diversity (PD) and biodiversity conservation: some bioinformatics challenges. *Evolutionary Bioinformatics*, 2: 70–77.
- Felappi, J.F., Vieira, R.C., Fagundes, N.J. & Verrastro, L.V. (2015). So Far Away, Yet So Close: Strong Genetic Structure in *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), a Species with Restricted Geographic Distribution in the Brazilian and Uruguayan Pampas. *PloS one*, 10: e0118162.
- Fraser, D.J. & Bernatchez, I. (2001). Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology*, 10: 2741-2752.
- Galpern, P., Peres-Neto, P.R., Polfus, J. & Manseau, M. (2014). MEMGENE: Spatial pattern detection in genetic distance data. *Methods in Ecology and Evolution*, 5: 1116-1120.
- Goslee, S. C. & Urban, D. L. (2007). The ecodist package for dissimilarity-based analysis of ecological data. *Journal of Statistical Software*, 22: 1-19.
- Guillot, G., Mortier, F. & Estoup, A. (2005). GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes*, 5: 712-715.
- Hadfield, J.D. (2010). MCMC methods for multi-response generalized linear mixed models: the MCMCglmm R package. *Journal of Statistical Software*, 33: 1-22.
- Hijmans, R.J. & van Etten, J. (2014). raster: Geographic data analysis and modeling. R package version, 2.
- Hudson, R.R. (2002). Generating samples under Wright-Fisher neutral model of genetic variation. *Bioinformatics*, 18: 337–338.
- Jesus, J., Brehm, A. & Harris, D.J. (2005). Phylogenetic relationships of *Hemidactylus* geckos from the Gulf of Guinea islands: patterns of natural colonizations and anthropogenic introductions estimated from mitochondrial and nuclear DNA sequences. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 34: 480–485.

- Jesus, J., Brehm, A. & Harris, D.J. (2006). Phylogenetic relationships of *Lygodactylus* geckos from the Gulf of Guinea Islands: rapid rates of mitochondrial DNA sequence evolution? *The Herpetological Journal*, 16: 291–295.
- Jombart, T. (2008). adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. *Bioinformatics*, 24: 1403-1405.
- Kimura, M. (1953). Stepping stone model of population. *Annual Report of the National Institute of Genetics Japan*, 3: 62–63.
- Lean, C. & Maclaurin, J. (2016). The value of phylogenetic diversity. En *Biodiversity Conservation and Phylogenetic Systematics* (pp. 19-37). Springer International Publishing.
- Leigh, J. W. & Bryant, D. (2015). popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6: 1110-1116.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451-1452.
- Lichstein, J.W. (2007). Multiple regression on distance matrices: a multivariate spatial analysis tool. *Plant Ecology*, 188: 117-131.
- Ljubisavljevic, K., Arribas, O., Dzukic, G. & Carranza, S. (2007). Genetic and morphological differentiation of Mosor rock lizards, *Dinarolacerta mosorensis* (Kolombatović, 1886), with the description of a new species from the Prokletije Mountain Massif (Montenegro) (Squamata: Lacertidae). *Zootaxa*, 1613: 1–22.
- Magalhães, R.F., Lemes, P., Camargo, A., Oliveira, U., Brandão, R.A., Thomassen, H., de Anchietta Garcia, P.C., Sá Fortes Leite, F. & Santos, F.R. (2017). Evolutionarily significant units of the critically endangered leaf frog *Pithecopus ayeaye* (Anura, Phyllomedusidae) are not effectively preserved by the Brazilian protected areas network. *Ecology and Evolution*, 7: 8812-8828.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G. & Taberlet, P. (2003). Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189–197.
- Manni, F., Guerard, E. & Heyer, E. (2004). Geographic patterns of (genetic, morphologic, linguistic) variation: how barriers can be detected by using Monmonier's algorithm. *Human biology*, 76: 173-190.
- Moritz, C. (1994). Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9: 373-375.
- MVOTMA (2017). Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP). Paisaje protegido Valle del Lunarejo. Disponible en: www.mvotma.gub.uy. Último acceso: Agosto 2017.

- Olson, D.M., Dinerstein, E., Wikramanayake, E.D., Burgess, N.D., Powell, G.V., Underwood, E.C., D'Amico, J.A., Itoua, I., Strand, H.E., Morrison, J.C., Loucks, C.J., Allnutt, T.F., Ricketts, T.H., Kura, Y., Lamoreux, J.F., Wettengel, W.W., Hedao, P. & Kassem, K.R. (2001). Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth: A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience*, 51: 933-938.
- Panario, D., Gutiérrez, O., Bettucci, L.S., Peel, E., Oyhantçabal, P. & Rabassa, J. (2014). Ancient landscapes of Uruguay. Pp. 161-199. En Rabassa, J. & Ollier, C. (eds.) *Gondwana Landscapes in southern South America*. Springer Netherlands.
- Paradis, E., Claude, J. & Strimmer, K. (2004). APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics*, 20: 289-290.
- Paruelo, J.M., Jobbágy, E.G, Oesterheld M., Golluscio R.A. & Aguiar M.R. (2007). The grasslands and steppes of Patagonia and the Rio de la Plata plains. Pp. 232-248. En Veblen, T., Young, K. & Orme, A. (eds.). *The Physical Geography of South America*. The Oxford Regional Environments Series, Oxford University Press.
- Palsbøll, P.J., Bérubé, M. & Allendorf, F.W. (2006). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology and Evolution*, 22: 11-16.
- Posadas, P., Miranda-Esquivel, D.R. & Crisci, J.V. (2001). Using phylogenetic diversity measures to set priorities in conservation: an example from southern South America. *Conservation Biology*, 15: 1325-1334.
- Pudlo, P., Marin, J.M., Estoup, A., Cornuet, J.M., Gautier, M. & Robert, C.P. (2015). Reliable ABC model choice via random forests. *Bioinformatics*, 32: 859-866.
- Purvis, A., Cardillo, M., Grenyer, R. & Collen, B. (2005). Correlates of extinction risk: phylogeny, biology, threat and scale. Pp 295–316, En: Purvis, A, Gittleman, J. L. & Brooks, T. (Eds.). *Phylogeny and conservation*. Cambridge University Press.
- QGIS Development Team (2016). QGIS 2.14.0 Chugiak Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ricketts T.H. (2001). The matrix matters: effective isolation in fragmented landscapes. *The American Naturalist*, 158: 87–99.
- Ryder, O.A. (1986). Species conservation and systematics: The dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1: 9-10.

- Sanderson, E.W., Jaiteh, M., Levy, M.A., Redford, K.H., Wannebo, A.V. & Woolmer, G. (2002). The human footprint and the last of the wild. *BioScience*, 52: 891-904.
- Storfer, A., Murphy, M.A., Spear, S.P., Holderegger, R. & Waits, L.P. (2010). Landscape genetics: where are we now? *Molecular Ecology*, 19: 3496–3514.
- 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: 619–633.
- Torres-Florez, J.P., Johnson, W.E., Nery, M.F., Eizirik, E., Oliveira-Miranda, M.A. & Galetti, P.M. (2017). The coming of age of conservation genetics in Latin America: what has been achieved and what needs to be done. *Conservation Genetics*, 1: 1-15.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F. & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22: 1193-1213.
- van Etten, J. (2012). *gdistance: Distances and routes on geographical grids*. URL: <http://CRAN.R-project.org/package=gdistance>. R package version, 1-1.
- Vieira, R.C. (2012). Aspectos Ecológicos de uma População de *Homonota uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Phyllodactylidae). no Rio Grande do Sul, Brasil. M.Sc Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 177pp.
- Werneck, F.P., Gamble, T., Colli, G.R., Rodrigues, M.T. & Sites, J.W. Jr (2012). Deep diversification and longterm persistence in the South American 'dry diagonal': integrating continent-wide phylogeography and distribution modeling of geckos. *Evolution*, 66: 3014–3034.
- Wright, S. (1943). Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114.

Capítulo 3:

Variación genética temporal

Introducción

La distribución geográfica actual de una especie es el resultado de procesos ecológicos e históricos, que han determinado la contracción y expansión demográfica en el tiempo, así como la fragmentación e incluso el contacto secundario de las poblaciones (Avice 2000, Hewitt 2004). Las características ecosistémicas, geológicas y climáticas influyen sobre las poblaciones, pudiendo generar desplazamientos de hábitats, y por consiguiente promover eventos de migración, variación en la intensidad de la deriva génica, contracciones y expansiones poblacionales, o pérdida de diversidad genética (Klicka & Zink 1997, Riddle 1998, Taberlet et al. 1998, Hewitt 2004).

Mediante los estudios filogeográficos se puede reconstruir el origen y las características de los cambios demográficos de las poblaciones en el tiempo, evaluando por ejemplo si distribuciones continuas son el producto de expansiones a partir de refugios ancestrales, si las poblaciones se han retraído geográfica o demográficamente, o incluso si sus distribuciones son el resultado del contacto secundario entre linajes que permanecieron aislados (Avice, 2000). Con el objetivo de identificar procesos históricos que determinaron la distribución de las poblaciones, tradicionalmente la filogeografía se ha basado en secuencias de ADN mitocondrial (ADNmt), para poner a prueba hipótesis relacionadas a cambios geológicos y climáticos (Hewitt, 2000; 2004). En los últimos años se ha incrementado el uso de secuencias de ADN nuclear (ADNn) conjuntamente con el ADNmt, para mejorar la estimación de parámetros, y evitar las limitaciones o incertidumbres que surgen de las inferencias a partir de un solo *locus* (Zhang & Hewitt 2003; Berheregaray, 2008; Brito & Edwards 2009). La divergencia genética precede a la divergencia poblacional, y debido a la estocasticidad del proceso coalescente, pueden generarse historias diferentes en distintos *loci*, produciéndose una visión sesgada si se analiza únicamente uno de ellos (Moore, 1995; Maddison,

1997; Edwards & Beerli 2000; Degnan & Rosenberg, 2009; McCormack et al., 2011). Debido a la evolución independiente de *loci* no ligados, pero condicionada por la historia de las poblaciones, una aproximación *multilocus* permite obtener estimaciones más exactas y precisas de los cambios demográficos, y cuando son analizados mediante métodos bayesianos es posible explorar un amplio rango de complejos modelos y parámetros demográficos de forma eficiente (Heled & Drummond, 2008; 2010).

Durante el Mioceno, unos de los eventos más influyentes en la biota continental sudamericana fueron las transgresiones marinas. Estas generaron un “Mar Amazónico”, cubriendo gran parte de la actual cuenca del Río Amazonas, y el “Mar Paranaense”, que invadió principalmente parte de Argentina, sur de Paraguay, Bolivia y el sur de Uruguay (Räsänen et al., 1995; Webb, 1995). Para este último, Hernández et al. (2005) estiman dos periodos importantes: un primer pulso entre 15-13 Ma (Mioceno Medio) y el segundo entre 10-5 Ma (Mioceno Superior). En concreto, estas transgresiones separaron el territorio de Uruguay y sudeste de Brasil de las Guayanas por el Norte, y de parte de Buenos Aires y otras zonas emergentes de la Patagonia en el Suroeste. Luego de la retracción de las transgresiones marinas, se desarrollaron extensas praderas en gran parte del continente sudamericano, que alcanzaron su plenitud durante el Plioceno (5,3-1,8 Ma atrás) (Pascual et al., 1996; Ortiz Jaureguizar, 1998). Durante el Cuaternario, los cambios climáticos fueron frecuentes y paulatinos, dando lugar a periodos glaciares e interglaciares que provocaron retracciones o expansiones de diversos taxa en el territorio (Pascual & Ortiz Jaureguizar, 1990; Pascual et al., 1996). Particularmente en el Pleistoceno sudamericano, los cambios climáticos causaron profundas alteraciones en los biomas, que provocaron el cambio en los paisajes entre sabanas, estepas áridas, bosques tropicales y bosques subtropicales húmedos (Marshall & Cifelli, 1990). La Teoría de Refugios plantea que, durante estas alteraciones en los biomas, determinadas áreas quedaron aisladas como relictos del ambiente que se retrajo, funcionando como refugios para la biota en los que se sucedieron procesos de diversificación o extinción (Haffer, 1969).

El género *Homonota* pertenece a la familia Phyllodactylidae y es endémico de Sudamérica, siendo los Gekkota que poseen la distribución más austral (Kluge, 1964). Está compuesto por 12 especies que ocurren en diversos biomas en

Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Kluge, 1964; Vanzolini, 1968; Cei, 1978; Cacciali et al., 2017). Estas especies están ordenadas en tres grupos: el grupo *fasciata*, el grupo *whitii*, y el grupo *borellii*, este último compuesto por *H. uruguayensis* (Vaz-Ferreira & Sierra De Soriano, 1961), *H. taragui* (Cajade, Etchepare, Falcione, Barraso & Alvarez, 2013), *H. borellii* (Peracca, 1897) y *H. rupicola* (Cacciali, Avila & Bauer, 2007). Morando et al. (2014) estiman el origen del género *Homonota* durante el Mioceno medio (15 Ma aproximadamente), y particularmente el origen del grupo *borellii* entre 6-8 Ma aproximadamente, asociado al aislamiento que habría generado el Mar Paranaense. El ancestro de este grupo habría permanecido en tierras emergentes en la zona que actualmente ocupa *H. uruguayensis* (norte de Uruguay y sur de Rio Grande do Sul, Brasil), para luego expandirse y diversificarse con la regresión del mar. Justamente es en este período donde se data el origen de *H. uruguayensis* (aproximadamente entre 6.8-15 Ma), siendo la especie más ancestral dentro del grupo *borellii* (Morando et al., 2014; Felappi et al., 2015). El único trabajo que aborda su historia demográfica encuentra estabilidad poblacional en gran parte de su distribución, a excepción de un clado (que incluye localidades del Departamento de Artigas, Uruguay) donde se encuentran señales de expansión reciente (Felappi et al., 2015). Existen otros casos de estudio en organismos co-distribuidos con *H. uruguayensis*, donde se han visto casos de estabilidad demográfica asociados a la estabilidad ambiental de las serranías del norte de Uruguay y sur de Rio Grande do Sul (Turchetto et al., 2014; Fernández, 2016), o casos donde se encuentran señales de expansión poblacional, que son asociados a posibles refugios y posteriores expansiones poblacionales luego del Último Máximo Glacial (Speranza et al., 2007; Langone et al., 2015).

Objetivos

- Establecer temporal y geográficamente el origen de las poblaciones actuales de *Homonota uruguayensis*.
- Reconstruir la tendencia demográfica de las poblaciones y relacionarla con la historia y los atributos ambientales.

Hipótesis

Los cambios ambientales han influenciado el origen y la dinámica poblacional de *Homonota uruguayensis* en el tiempo.

Predicciones

- El origen de las poblaciones actuales es posterior a la retracción del Mar Paranaense (hace 5 Ma aproximadamente).
- Las poblaciones fueron afectadas negativamente por los períodos glaciares del Cuaternario.

Materiales y métodos

Para el análisis de la historia demográfica de *Homonota uruguayensis*, se consideraron las poblaciones delimitadas en el capítulo anterior (Fig. 1). Se calcularon los test de D de Tajima y de Fu para analizar el apartamiento de la neutralidad de los set de datos completos, así como de las poblaciones individualizadas, mediante DnaSP 5.1 (Librado & Rozas, 2009), y también se graficó la *mismatch distribution* para analizar el crecimiento poblacional. Con este mismo propósito, se generaron los gráficos *Extended Bayesian Skyline Plot* (EBSP) (Heled & Drummond, 2008), utilizando los dos *loci* en conjunto para observar cómo ha variado el tamaño poblacional en el tiempo, mediante el software Beast 1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007) y Tracer 1.6 (Rambaut et al., 2014). Las corridas tuvieron una largo de Cadena de Markov-Monte Carlo (MCMC) de 400 millones de

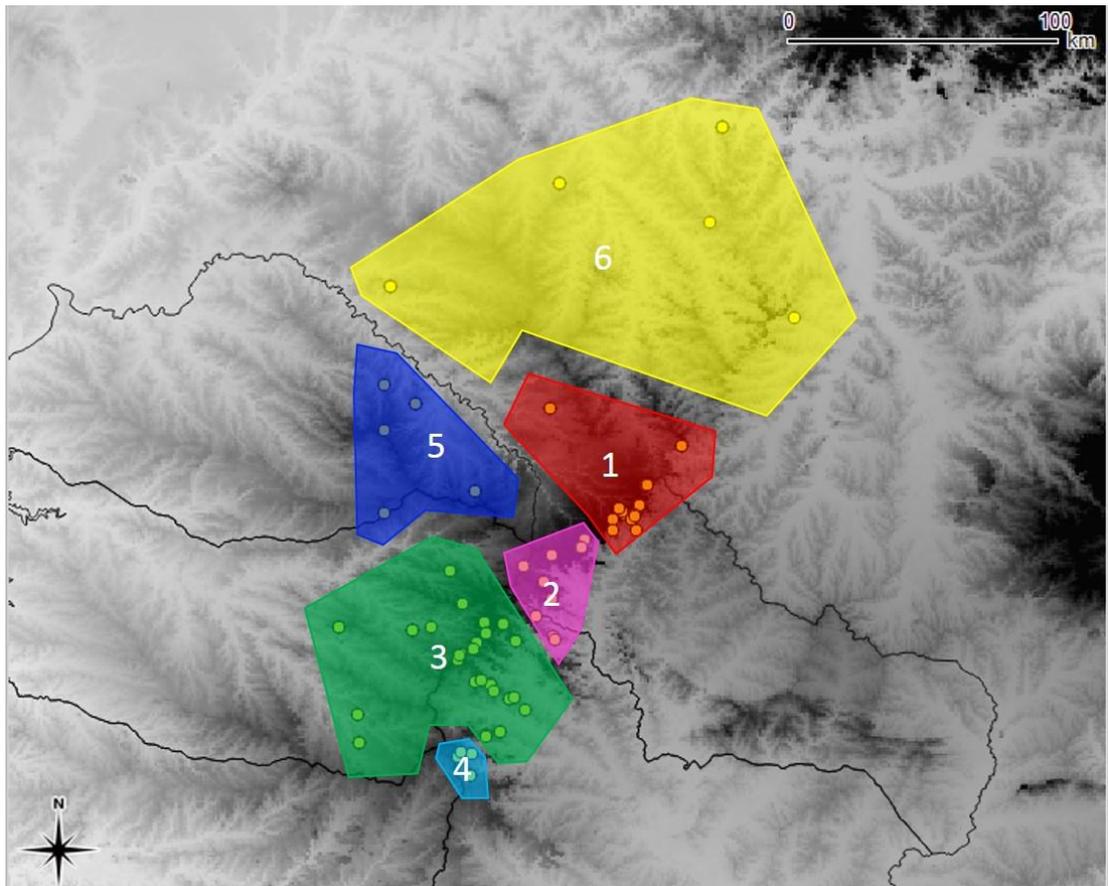


Figura 1. Poblaciones analizadas de *Homonota uruguayensis* delimitadas mediante Geneland (ver Capítulo 1).

pasos, muestreada cada 20 mil pasos, utilizando un modelo de reloj molecular estricto para ambos *loci*.

Se realizó un análisis de reconstrucción filogeográfica bayesiana incorporando difusión espacio-temporal (Lemey et al., 2010), donde a partir de una filogenia se reconstruye la difusión de los linajes en el espacio a través del tiempo. Este análisis se realizó con el paquete Beast 1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007), utilizando el modelo de difusión *relaxed random walk* para las coordenadas espaciales de la genealogía del citocromo b, con un modelo de reloj molecular estricto y un largo de MCMC de 50 millones con un muestreo cada 5 mil pasos. La localización espacial de los nodos ancestrales de genealogías muestreadas fue resumida con el software SPREAD (Bielejec et al., 2011), y visualizada en forma dinámica en Google Earth Pro 7.3.0 (www.google.com/earth/). También se analizó la variación en el tiempo de la tasa de difusión, utilizando la herramienta *Time Slicer* en el software Beast 1.8.0 (Drummond & Rambaut, 2007), en intervalos de 50 mil años.

Se utilizó el software SERAPHIM (Dellicour et al., 2016) para el estudio de las reconstrucciones del movimiento espacial en un contexto ambiental, donde a partir de la información espacio temporal contenida en genealogías se calcula el historial de dispersión y se relaciona con la información ambiental disponible, analizando en qué grado la variable ambiental facilita o impide la dispersión del linaje. Para este análisis se utilizó la información ambiental proveniente de capas realizadas por el Laboratorio de Desarrollo Sustentable y Gestión Ambiental del Territorio (IECA, Facultad de Ciencias), con datos de profundidad de suelo, rocosidad y escabrosidad, con una resolución de 1 km x 1km de pixel aproximadamente, al igual que capas de altura extraídas de Worldclim.org (Hijmans et al., 2005). La relación entre las capas ambientales y la tasa de dispersión se evalúa mediante la regresión lineal entre la tasa de dispersión y las distancias ambientales en cada rama de la genealogía (coeficiente de determinación ambiental), y mediante el parámetro D, resultado de la diferencia entre el coeficiente de determinación ambiental y el coeficiente de determinación espacial (determinado mediante la regresión lineal entre la tasa de dispersión y las distancias geográficas en cada rama) (Dellicour, 2016).

Resultados

En los test de neutralidad, únicamente hubo señal significativa de expansión poblacional en el set completo de secuencias del gen PRLR con el test de Tajima, y en la población 3 (localidades del Depto. de Salto y Tacuarembó) en las secuencias de citocromo b con ambos test utilizados (Tabla 1). Para la población 6 no se pudo calcular los test de neutralidad en el gen PRLR, ya que únicamente se contaba con cuatro secuencias sin polimorfismos. En las *mismatch distribution*, se observó un patrón acorde al esperado durante crecimiento poblacional en el set completo de

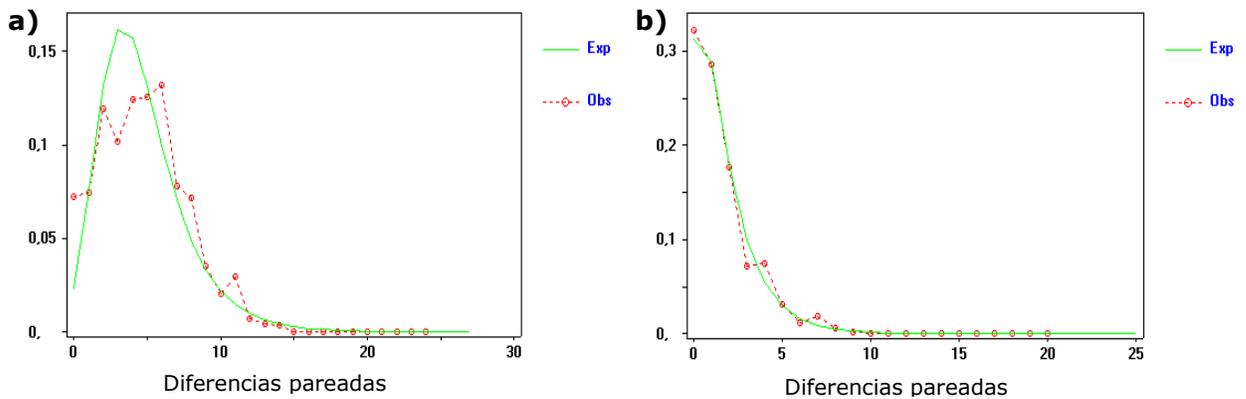


Figura 2. *Mismatch distribution* para todas las secuencias analizadas, para a) secuencias de citocromo b; b) secuencias de PRLR.

secuencias de PRLR (Fig. 2), al igual que para la población 2, 3 y 5 con citocromo b, y poblaciones 3 y 5 con PRLR (Fig. 3). Para las secuencias de PRLR de la población 6 no se pudo elaborar por solo presentar secuencias idénticas.

Para todos los análisis de EBSM elaborados las estimaciones MCMC llegaron a estabilizarse y los valores de tamaño de muestra efectivos fueron altos (>200).

Tabla 1. Estadísticos de los test de neutralidad D' Tajima y F' Fu para el set de secuencias completo y todas las poblaciones delimitadas. Se destaca con * los estadísticos cuyos valores fueron significativos ($p < 0,05$).

	Todos		Pob1		Pob2		Pob3		Pob4		Pob5		Pob6	
	PRLR	Cit-b	PRLR	Cit-b	PRLR	Cit-b	PRLR	Cit-b	PRLR	Cit-b	PRLR	Cit-b	PRLR	Cit-b
D'Tajima	-1,85*	-1,54	-1,059	-1,35	-1,022	-1,19	-1,69	-1,94*	0,21	0,21	-0,73	-1,44	-	1,013
F'Fu	-0,43	-2,026	0,45	-1,20	-0,34	-0,31	-1,43	-2,63*	1,23	1,23	0,11	-2,023	-	1,56

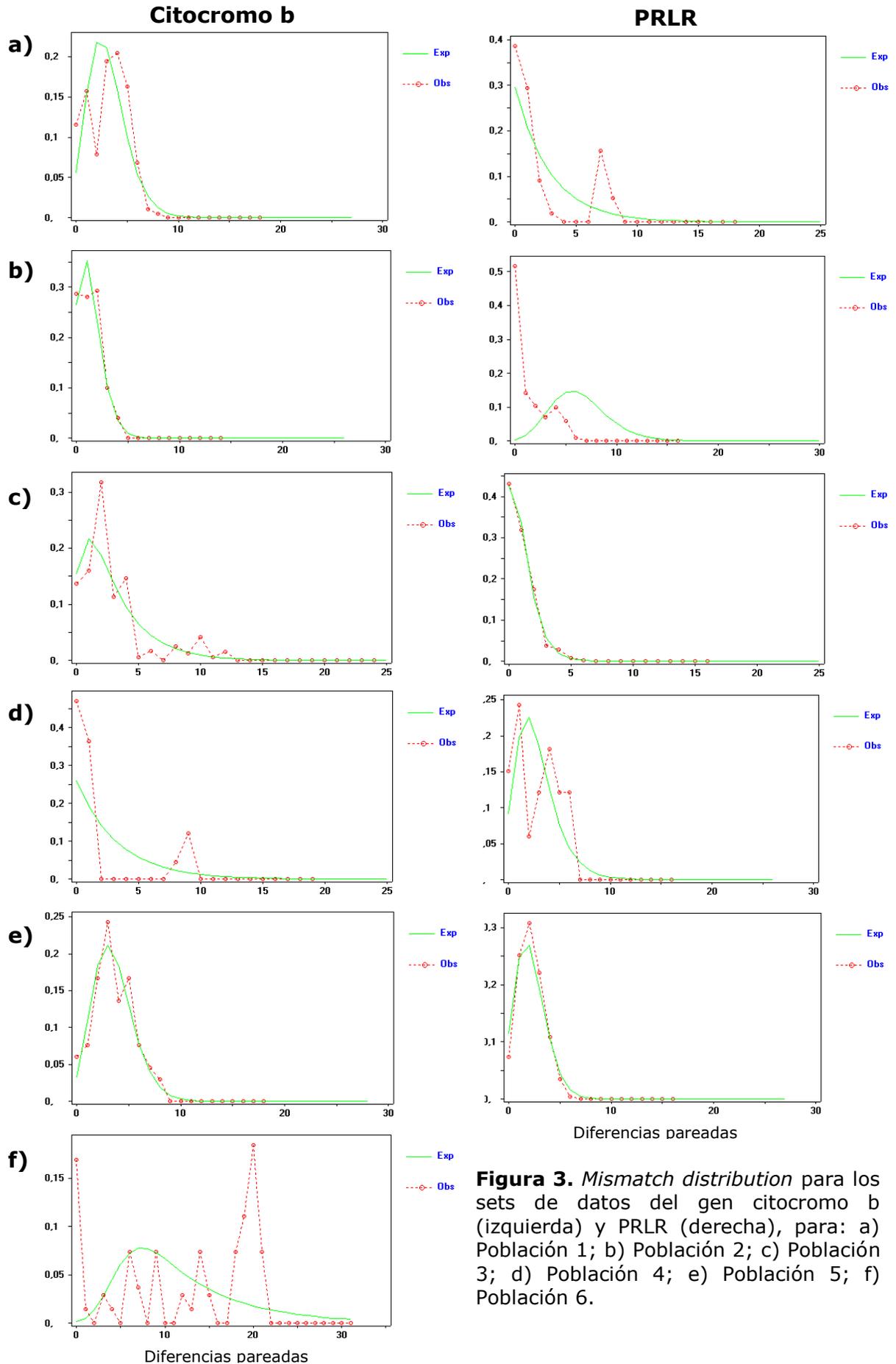
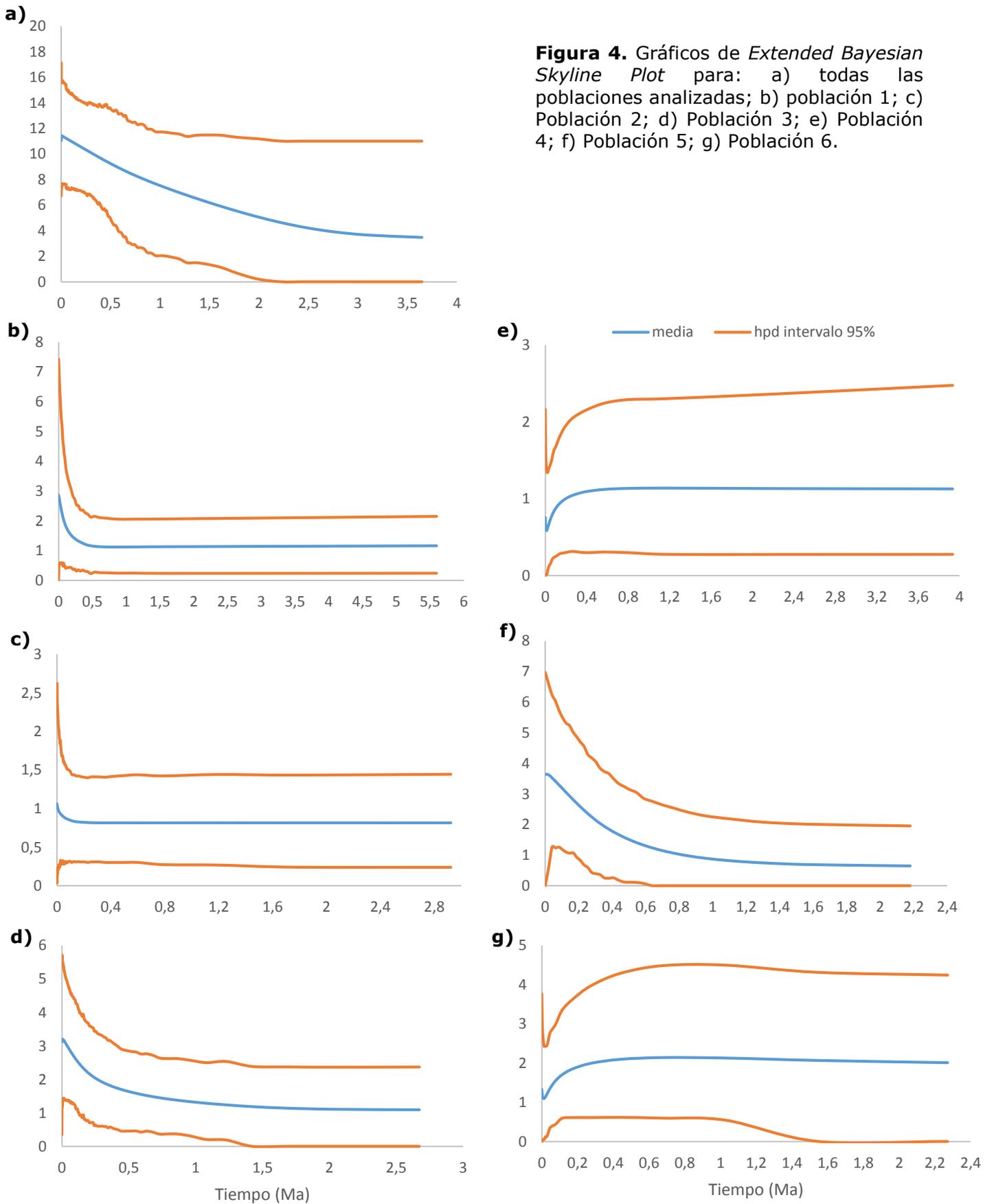


Figura 3. *Mismatch distribution* para los sets de datos del gen citocromo b (izquierda) y PRLR (derecha), para: a) Población 1; b) Población 2; c) Población 3; d) Población 4; e) Población 5; f) Población 6.

Analizando todas las poblaciones en conjunto, puede observarse un crecimiento poblacional estable, y un origen de las poblaciones datado hace 3.6 Ma aproximadamente (Fig. 4a). Las poblaciones individualizadas mostraron una estabilidad hasta aproximadamente 500-50 mil años atrás, donde hay señales de expansión poblacional (Fig. 4). Las excepciones fueron las poblaciones 4 (zona de Tambores, Deptos. de Tacuarembó y Paysandú) y 6 (localidades más al norte, en Brasil), que presentaron un decrecimiento poblacional en los últimos 200 mil años (Fig. 4).

El análisis de difusión reveló un origen de las poblaciones en el sur de Brasil, entre los Departamentos de Rivera y Artigas, próximo al límite contestado Rincón de Artigas (Fig. 5). La tasa de difusión estimada tuvo una media de 76.88 km/Ma y un intervalo HDP de 95% entre 45.96-108.05 km/Ma. Su valor presentó variación en el tiempo, con una tendencia a disminuir hacia el presente (Fig. 6).

Los análisis en SERAPHIM no encontraron relación entre las variables ambientales y la tasa de difusión, ya que el coeficiente de correlación en las regresiones siempre fue bajo ($R^2 < 0,1$), el parámetro D estuvo siempre cercano a cero, y la distribución de los estadísticos fue similar a las obtenidas con capas nulas para todas las variables (ver Anexo).



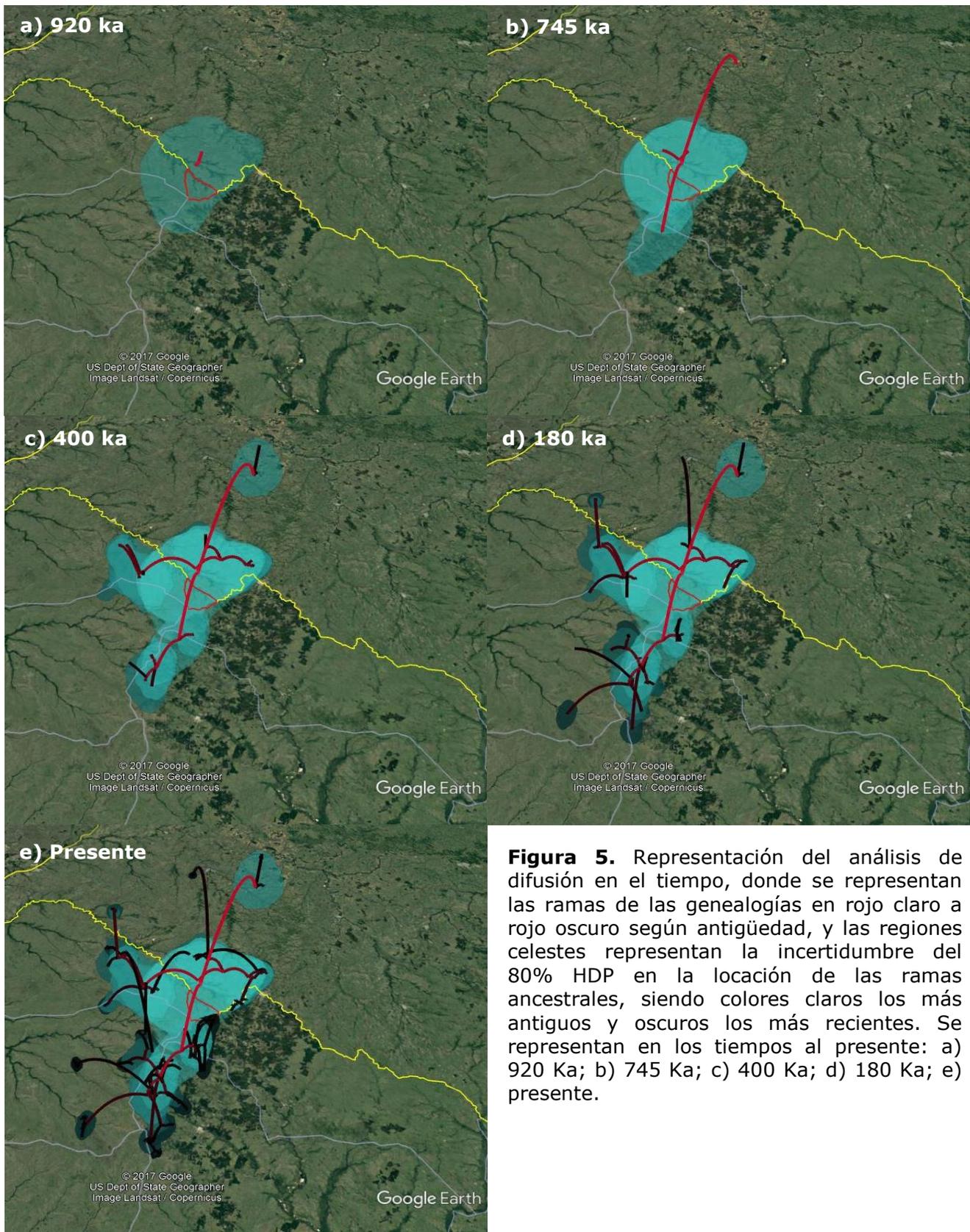


Figura 5. Representación del análisis de difusión en el tiempo, donde se representan las ramas de las genealogías en rojo claro a rojo oscuro según antigüedad, y las regiones celestes representan la incertidumbre del 80% HDP en la locación de las ramas ancestrales, siendo colores claros los más antiguos y oscuros los más recientes. Se representan en los tiempos al presente: a) 920 Ka; b) 745 Ka; c) 400 Ka; d) 180 Ka; e) presente.

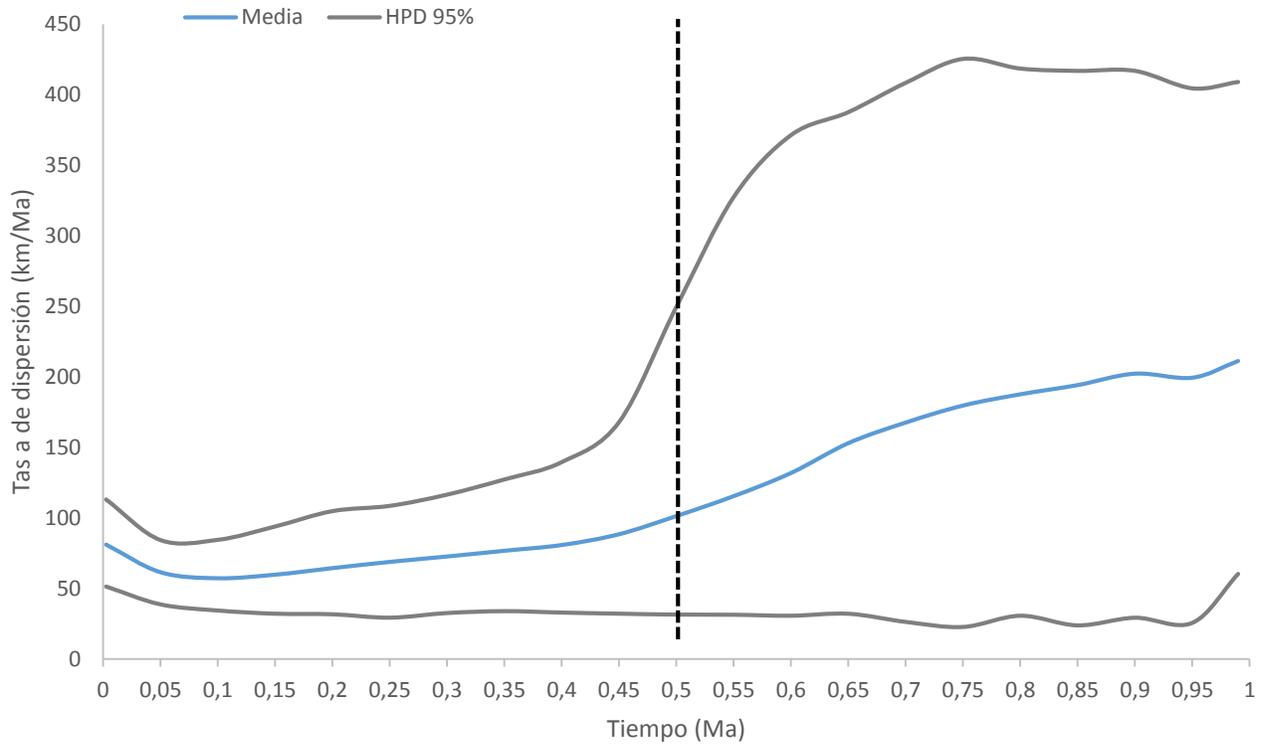


Figura 6. Variación de la tasa de dispersión en las poblaciones de *Homonota uruguayensis* en el tiempo, calculada con *Time Slicer* para períodos de 50 mil años.

Discusión

Considerando las poblaciones de *Homonota uruguayensis* en conjunto, se observa una leve tendencia creciente en el tamaño poblacional. Individualmente, todos los análisis sustentan el crecimiento de la población 3, y hay evidencias de crecimiento poblacional en las poblaciones 1, 2 y 5. En la población 4, el gráfico de EBSP muestra una reciente disminución poblacional, en los últimos 180 mil años aproximadamente. Este resultado es compatible con los niveles de diversidad haplotípica inusuales encontrados en el capítulo anterior para esta población. Un comportamiento demográfico similar puede observarse en la población 6, donde sin embargo los resultados pueden ponerse en duda debido a que en esta población se incluyen muestras altamente diferenciadas, que pueden llegar a ser incluso una especie diferente (Felappi et al., 2015). Sin embargo, hay que considerar que se ha visto mediante simulaciones que el análisis de *Bayesian Skyline Plot* puede mostrar un falso decrecimiento en el pasado reciente, en casos donde la estructuración poblacional es fuerte y mantenida desde la fase de dispersión en la conformación de la poblaciones (Heller et al., 2013), una situación que puede corresponderse con el caso de *H. uruguayensis* donde parece existir una fuerte estructuración en pequeñas escalas espaciales.

Analizando las poblaciones individualmente, el crecimiento poblacional parece haber comenzado en los últimos 500 mil años, luego de una relativa estabilidad poblacional. Los tiempos en la estimación demográfica del EBSP no parecen estar acorde a los encontrados en otros análisis de esta tesis (análisis de difusión y genealogías), o por en el único antecedente de estudio genético poblacional en la especie (Felappi et al., 2015). Sin embargo, la aproximación *multilocus* del EBSP parece ser mucho mejor para inferir el cambio y el tiempo de eventos demográficos (Edwards & Beerli 2000; Heled & Drummond, 2008; Degnan & Rosenberg, 2009). Aunque sean concordantes con el origen estimado de la especie (Morando et al., 2014), el origen estimado mediante EBSP analizando todas las poblaciones juntas y por separado no son concordantes (algunas poblaciones se muestran más antiguas por separado que cuando fueron analizadas en conjunto), por lo tanto hay que tener precaución a la hora de sacar conclusiones, ya que parece haber un margen de error muy grande. Las tasas de mutación utilizadas pueden ser una de las

fuentes de error, ya que no fueron realizadas para *H. uruguayensis* (Arnold et al., 2008; Olave et al., 2015). Conjuntamente, el hecho que las estimaciones se remonten a un pasado tan lejano (Mioceno), también las hace menos confiables a medida que se alejan en el tiempo.

En el análisis de EBS, la población que se establece como más antigua es la población 1, resultado concordante con lo encontrado en el análisis de difusión, ya que el origen geográfico coincide con el área de distribución inferido para dicha población. La tasa de dispersión promedio encontrada (aprox. 0,08 m/año, con un máximo de 0,40; ver Fig. 6) fue relativamente baja comparada con otros estudios similares en reptiles (por ejemplo, 1,1 m/año en *Liolaemus darwini*) (Camargo et al., 2013). No existen datos de campo para contrastar este valor en *H. uruguayensis*, debido a que, aunque existe un estudio que estimó el área de vida y el desplazamiento de individuos en una población (Vieira, 2012), la tasa de difusión solo sería comparable con el desplazamiento del área de vida en el tiempo (Camargo et al., 2013). Tal vez la causante de los valores bajos de la tasa de difusión sea que se está utilizando una tasa de sustitución nucleotídica muy lenta, ya que en realidad fue estimada para otra especie y podría no corresponder con la realidad de *H. uruguayensis*. Otra posibilidad es que la especificidad de hábitat de la especie sea la causante de estas tasas de difusión, aunque sería importante realizar estudios similares para poder comparar las tasas obtenidas, así como estudios ecológicos donde se cuantifique el desplazamiento del área de vida y la dispersión de los individuos en las distintas franjas etarias.

Analizando la variación de la tasa de difusión en el tiempo, se observó una disminución general de su valor hacia el presente. Este es un resultado esperable, ya que la dinámica de dispersión de una población en expansión y de una población estable no suele ser la misma. Se ha visto que en las primeras etapas suele haber una tasa de difusión mayor que provoca una expansión de rango en la especie, y luego que se establece un rango geográfico estable y las condiciones son favorables, la dispersión es menor y el crecimiento se basa en el aumento de la densidad poblacional principalmente (Camargo et al., 2013). Esto parece concordante con lo observado a partir de los últimos 500 mil años aproximadamente, donde la tasa de difusión se estabiliza en los valores más bajos. A su vez, es en ese tiempo en que el análisis de difusión muestra que se alcanza

prácticamente todo el rango de distribución actual, y también dónde se comienza a observar crecimiento poblacional en los EBSP. Sin embargo, en los últimos 50 mil años se observó un aumento de la tasa de difusión. Teniendo en cuenta que el paisaje en el área de distribución de la especie ha permanecido estable durante el Cuaternario (Panario et al., 2014), un cambio en la tendencia de la tasa de difusión puede estar relacionado con cambios en las condiciones ambientales que resultaron favorables para la especie. Particularmente, MIS3 (*Marine Isotope Stage 3*), fue un periodo relativamente largo (entre 60-27 ka al presente aprox.), notoriamente más cálido que los estadios anterior y posterior (Gasparini et al., 2016), donde existen indicadores de un ambiente árido o semiárido para el norte de Uruguay (Ubilla et al., 2016). Estas condiciones pueden haber resultado favorables, pudiendo haber facilitado la dispersión y haber causado un incremento de la tasa de difusión.

No se encontró evidencia del efecto de las características del suelo en los eventos de dispersión inferidos por la filogeografía. Si bien la especificidad de hábitat de la especie asociada a sustratos rocosos podría sugerir que se encontraría una relación con las variables del suelo analizadas, este resultado no es extraño si se tiene en cuenta que en el capítulo 2 de esta tesis tampoco se encontró una relación con las características del paisaje analizadas. A su vez, aunque las variables ambientales fueron elegidas por ser consideradas estables en el rango temporal del presente estudio, su elaboración corresponde a datos actuales, por lo que podría no representar los ambientes reales en los tiempos de dispersión de las poblaciones. Hay que tener en cuenta que no existen antecedentes del uso del paquete SERAPHIM en vertebrados, una herramienta relativamente nueva que únicamente ha sido utilizada previamente para el análisis en virus (Laenen et al., 2016; Dellicour et al., 2017a, b; Fountain-Jones et al., 2017; Jacquot et al., 2017), organismos que evolucionan y se dispersan en escalas de tiempo muy recientes.

En conclusión, se puede decir que el tiempo de origen de las poblaciones es concordante con el origen de la especie y la última retracción del Mar Paranaense, de acuerdo a la hipótesis de que la especiación del grupo puede haber sido favorecida por la expansión geográfica hacia el norte y oeste (Hernández et al., 2005; Morando et al., 2014). Sin embargo, posteriormente a estos eventos no se encontró evidencia de efectos importantes de las oscilaciones ambientales en la

dinámica poblacional, ya que la tendencia general fue a la estabilidad o a un crecimiento constante en las poblaciones.

Bibliografía

- Avise, J.C. (2000). *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard University Press.
- Beheregaray, L.B. (2008). Twenty years of Phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology*, 17: 3754–3774.
- Bielejec, F., Rambaut, A., Suchard, M.A. & Lemey, P. (2011). SPREAD: spatial phylogenetic reconstruction of evolutionary dynamics. *Bioinformatics*, 27: 2910–2912.
- Brito, P.H. & Edwards, S.V. (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135: 439–455.
- Cacciali, P., Avila, I. & Bauer, F. (2007). A new species of *Homonota* (Squamata, Gekkonidae) from Paraguay, with a key to the genus. *Phyllomedusa*, 6: 137–146.
- Cacciali, P., Morando, M., Medina, C.D., Köhler, G., Motte, M. & Avila, L.J. (2017). Taxonomic analysis of Paraguayan samples of *Homonota fasciata* Duméril & Bibron (1836) with the revalidation of *Homonota horrida* Burmeister (1861) (Reptilia: Squamata: Phyllodactylidae) and the description of a new species. *PeerJ*, 5: e3523.
- Cajade, R., Echepare, E.G., Falcione, C., Barrasso, D.A. & Alvarez, B.B. (2013). A new species of *Homonota* (Reptilia: Squamata: Gekkota: Phyllodactylidae) endemic from the hills of Paraje Tres Cerros, Corrientes Province, Argentina. *Zootaxa*, 3709: 162–176.
- Camargo, A., Werneck, F.P., Morando, M., Sites, J.W. & Avila, L.J. (2013). Quaternary range and demographic expansion of *Liolaemus darwini* (Squamata: Liolaemidae) in the Monte Desert of Central Argentina using Bayesian phylogeography and ecological niche modelling. *Molecular Ecology*, 22: 4038–4054.
- Cei, J. M. (1978). Estado taxonómico y distribución geográfica de las especies del género *Homonota*. *Publicaciones Ocasionales del Instituto de Biología Animal, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Serie Científica*, 9:1–3.
- Degnan, J.H. & Rosenberg, N.A. (2009). Gene tree discordance, phylogenetic inference, and the multispecies coalescent. *Trends in Ecology and Evolution*, 24: 332–340.
- Dellicour, S. (2016). Tutorial for the R package seraphim 1.0. Disponible en: <http://evolve.zoo.ox.ac.uk/Evolve/Seraphim.html>.
- Dellicour, S., Rose, R., Faria, N.R., Lemey, P. & Pybus, O.G. (2016). SERAPHIM: studying environmental rasters and phylogenetically informed movements. *Bioinformatics*, 32: 3204–3206.

- Dellicour, S., Baele, G., Dudas, G., Faria, N.R., Pybus, O.G., Suchard, M.A., Rambaut, A. & Lemey, P. (2017a). Phylodynamic assessment of intervention strategies for the West African Ebola virus outbreak. bioRxiv, 163691. doi: <https://doi.org/10.1101/163691>.
- Dellicour, S., Rose, R., Faria, N.R., Vieira, L.F.P., Bourhy, H., Gilbert, M., Lemey, P. & Pybus, O.G. (2017b). Using viral gene sequences to compare and explain the heterogeneous spatial dynamics of virus epidemics. *Molecular Biology and Evolution*, 34: 2563-2571.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7: 214.
- Edwards, S.V. & Beerli, P. (2000). Perspective: gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence times in phylogeographic studies. *Evolution*, 54: 1839-1854.
- Felappi, J.F., Vieira, R.C., Fagundes, N.J. & Verrastro, L.V. (2015). So far away, yet so close: strong genetic structure in *Homonota uruguayensis* (Squamata, Phyllodactylidae), a species with restricted geographic distribution in the Brazilian and Uruguayan Pampas. *PLoS One*, 10: e0118162.
- Fernández, C. (2016). Diversidad filogeográfica a múltiple escala en poblaciones de *Limnomedusa macroglossa* (Anura, Alsodidae) de Uruguay. M.Sc Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay. 122pp.
- Fountain-Jones, N.M., Craft, M.E., Funk, W.C., Kozakiewicz, C., Trumbo, D.R., Boydston, E.E., Lyren, L.M., Crooks, K., Lee, J.S., VandeWoude, S. & Carver, S. (2017). Urban landscapes can change virus gene flow and evolution in a fragmentation-sensitive carnivore. *Molecular Ecology*, 26: 6487-6498.
- Gasparini, G.M., Rabassa, J., Deschamps, C. & Tonni, E.P. (Eds.). (2016). Marine Isotope Stage 3 in Southern South America, 60 KA BP-30 KA BP. Springer International Publishing.
- Haffer, J. (1969). Speciation in Amazonian forest birds. *Science*, 165: 131-137.
- Heled, J. & Drummond, A.J. (2008). Bayesian inference of population size history from multiple loci. *BMC Evolutionary Biology*, 8: 289.
- Heled, J. & Drummond, A.J. (2010). Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 570-580.
- Heller, R., Chikhi, L. & Siegmund, H.R. (2013). The confounding effect of population structure on Bayesian skyline plot inferences of demographic history. *PLoS One*, 8: e62992.
- Hernández, R., Jordan T., Dalenzfarjat, A., Echavarria, L., Idleman, B. & Reynolds, J. (2005). Age, distribution, tectonics, and eustatic controls of the Paranense and Caribbean Marine

- transgressions in Southern Bolivia and Argentina. *Journal of South American Earth Sciences*, 19: 495–512.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of Quaternary ice ages. *Nature*, 405: 907–913.
- Hewitt, G. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 359: 183–195.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G. & Jarvis, A. (2005). Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology*, 25: 1965–1978.
- Jacquot, M., Nomikou, K., Palmarini, M., Mertens, P., & Biek, R. (2017). Bluetongue virus spread in Europe is a consequence of climatic, landscape and vertebrate host factors as revealed by phylogeographic inference. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 284: 20170919.
- Klicka, J. & Zink, R.M. (1997). The importance of recent ice ages in speciation: A failed paradigm. *Science*, 277: 1666–1669.
- Kluge, A.G. (1964). A revision of the South American gekkonid lizard genus *Homonota* Gray. *American Museum Novitates*, 2183: 1–41.
- Laenen, L., Dellicour, S., Vergote, V., Nauwelaers, I., De Coster, S., Verbeeck, I., Vanmechelen, B., Lemey, P. & Maes, P. (2016). Spatio-temporal analysis of Nova virus, a divergent hantavirus circulating in the European mole in Belgium. *Molecular Ecology*, 25: 5994–6008.
- Langone, J.A., Camargo, A. & de Sá, R.O. (2016). High genetic diversity but low population structure in the frog *Pseudopaludicola falcipes* (Hensel, 1867) (Amphibia, Anura) from the Pampas of South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 95: 137–151.
- Lemey, P., Rambaut, A., Welch, J.J. & Suchard, M.A. (2010). Phylogeography takes a relaxed random walk in continuous space and time. *Molecular Biology and Evolution*, 27: 1877–1885.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25: 1451–1452.
- Maddison, W.P. (1997). Gene trees in species trees. *Systematic Biology*, 46: 523–536.
- Marshall, L.G. & Cifelli, R.L. (1990). Analysis of changing diversity patterns in Cenozoic Land Mammal Age faunas South America. *Palaeovertebrata*, 19: 169–210.

- McCormack, J.E., Heled, J., Delaney, K.S., Peterson, A.T. & Knowles, L.L. (2011). Calibrating divergence times on species trees versus gene trees: implications for speciation history of *Aphelocoma* jays. *Evolution*, 65: 184–202.
- Moore, W.S. (1995). Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial gene trees versus nuclear gene trees. *Evolution*, 49: 718–726.
- Morando, M., Medina, C.D., Avila, L.J., Perez, C.H.F., Buxton, A. & Sites Jr., J.W. (2014). Molecular phylogeny of the New World gecko genus *Homonota* (Squamata: Phyllodactylidae). *Zoologica Scripta*, 43: 249–260.
- Ortiz Jaureguizar, E. (1998). Paleoecología y evolución de la fauna de mamíferos de América del sur durante la “Edad de las Planicies Australes” (Mioceno Superior-Plioceno Superior). *Estudios Geológicos*, 54: 161–169.
- Panario, D., Gutiérrez, O., Bettucci, L. S., Peel, E., Oyhantçabal, P. & Rabassa, J. (2014). Ancient landscapes of Uruguay. En: Rabassa, J., & Ollier, C. (Eds.), *Gondwana Landscapes in southern South America*. Springer Netherlands.
- Pascual, R. & Ortiz Jaureguizar, E. (1990). Evolving climates and mammal faunas in Cenozoic South America. *Journal of Human Evolution*, 19: 23–60.
- Pascual, R., Ortiz Jaureguizar, E. & Prado, J.L. (1996) Land mammals: paradigm of Cenozoic South American geobiotic evolution. En: Arratia, G. (Ed), *Contribution of Southern South America to Vertebrate Paleontology*, *Müncher Goewissenschaftliche Abhandlungen*, 30: 217–226.
- Räsänen, M.E., Linna A.M., Santos J.C.R. & Negri, F.R. (1995) Late Miocene Tidal deposits in the Amazonian foreland Basin. *Science*, 269: 3–7.
- Rambaut, A., Suchard, M.A., Xie, D. & Drummond, A.J. (2014). Tracer v1.6, Available from <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>
- Peracca, M. G. (1897). Viaggio del Dott. Alfredo Borelli nel Chaco boliviano e nella Repubblica Argentina. Rettili ed Anfibi. *Bollettino dei Musei di Zoología ed Anatomia comparata Della R. Università di Torino*, 12: 1–19.
- Riddle, B.R. (1998). The historical assembly of continental biotas: Late Quaternary range shifting, areas of endemism, and biogeographic structure in the North American mammal fauna. *Ecography*, 21: 437–446.

- Speranza, P.R., Seijo, J.G., Grela, I.A., Neffa, V.G.S. (2007). Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography*, 34: 427–436.
- Taberlet, P., Fumagalli, L., Wust-Saucy, A.G. & Cosson, J.F. (1998). Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7: 453-464.
- Turchetto, C., Fagundes, N.J.R., Segatto, A.L.A., Kuhlemeier, C., Solís Neffa, V.G., Speranza, P.R., Bonatto, S.L. & Freitas, L.B. (2014). Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology*, 23: 374–389.
- Ubilla, M., Corona, A., Rinderknecht, A., Perea, D. & Verde, M. (2016). Marine Isotope Stage 3 (MIS 3) and Continental Beds from Northern Uruguay (Sopas Formation): Paleontology, Chronology, and Climate. En: Gasparini, G.M., Rabassa, J., Deschamps, C. & Tonni, E.P. (Eds.), *Marine Isotope Stage 3 in Southern South America, 60 KA BP-30 KA BP*. Springer International Publishing.
- Vanzolini, P.E. (1968). Geography of the South American Gekkonidae (Sauria). *Arquivos de Zoologia Sao Paulo*, 17: 85–112.
- Vaz-Ferreira, R. & Sierra De Soriano, B. (1961). Un nuevo Gekkonidae del Uruguay, *Wallsaurus uruguayensis* n. sp. *Comunicaciones Zoológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 5: 1–15.
- Vieira, R.C. (2012). Aspectos Ecológicos de uma População de *Homonota uruguayensis* Vaz-Ferreira & Sierra de Soriano, 1961 (Squamata, Phyllodactylidae) no Rio Grande do Sul, Brasil. M.Sc Thesis, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. 177pp.
- Webb, S.D. (1995). Biological implications of the Middle Miocene Amazon Seaway. *Science*, 269: 361–362.
- Zhang, D.X., Hewitt, G. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12: 563–584.

Capítulo 4:

Conclusiones y perspectivas

Se encontraron seis poblaciones geográficamente bien definidas para *Homonota uruguayensis*. Dentro de éstas, la denominada población 6 requiere mejor estudio, ya que contiene a la localidad de Cerro do Tigre donde se encuentran muestras altamente diferenciadas del resto. En general, sería ideal un muestreo más completo en el territorio de Brasil, para poder confirmar y establecer los límites claros de las poblaciones presentes, y estudiar con mayor profundidad la localidad de Cerro do Tigre.

Cada una de las poblaciones podría considerarse una unidad de manejo distinta debido a su grado de diferenciación genética. Sería interesante poder asegurar la conservación de cada una de ellas, pero ante la necesidad de priorizar, hay que considerar que el sur de Brasil y el norte de Artigas son las regiones con mayor diversidad filogenética. Sin embargo, teniendo en cuenta el Paisaje Protegido Valle del Lunarejo (la única área protegida dentro de este estudio en territorio uruguayo), surge complementariamente el norte de Salto como región prioritaria para asegurar la conservación de la mayor diversidad filogenética posible. Cabe destacar que los resultados muestran una alta estructuración y una capacidad de dispersión limitada, características que hacen más vulnerable a las poblaciones ante extinciones locales, sobre todo aquellas que mostraron menor conectividad con las poblaciones circundantes. Estos rasgos hacen más importante aún la prevención de impactos como medida de conservación para esta especie.

Tanto a nivel actual como a nivel histórico no se pudo visualizar ningún efecto claro de las características del paisaje sobre las poblaciones. Si bien las únicas barreras encontradas corresponden a corrientes de agua, estas no representaron barreras en todos los casos. Sería interesante contar con marcadores moleculares hipervariables (por ejemplo microsatélites o SNPs) para poder analizar con mayor resolución los efectos de las variables ambientales sobre las poblaciones. Adicionalmente, mayor cantidad de marcadores moleculares podría dar mejor

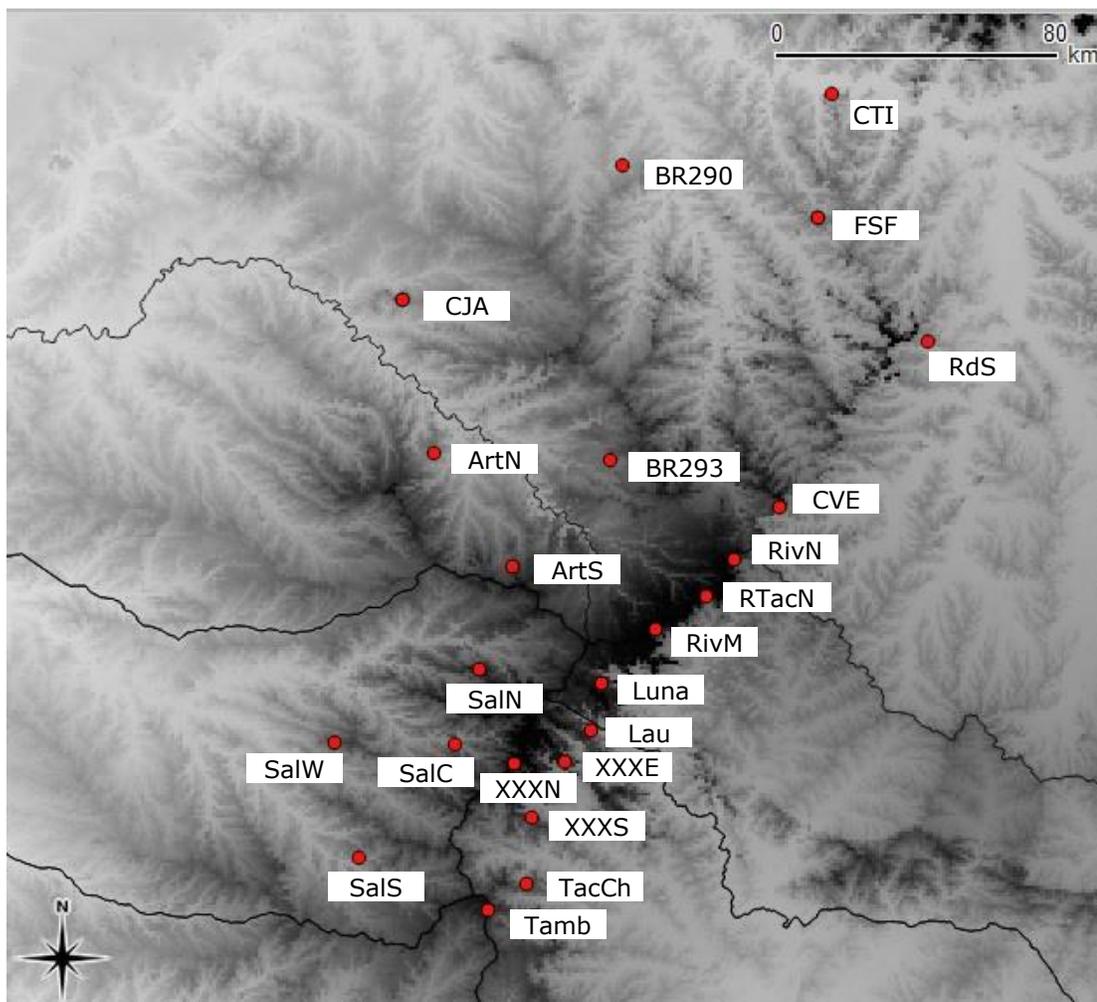
precisión en las estimaciones de los parámetros, tanto a nivel de conectividad como de inferencia histórica sobre las poblaciones analizadas.

Históricamente, los resultados indican que luego del surgimiento de la especie hubo una dispersión estable hasta ocupar el área de distribución actual, y posteriormente un crecimiento poblacional constante en la mayor parte de las poblaciones. Esto habría ocurrido sin mostrar evidencia clara de un efecto generalizado de las oscilaciones climáticas de los ciclos glaciares. Sería interesante la realización de modelos potenciales de paleo-distribución, para poder contrastar con los resultados obtenidos. La realización de estos modelos permitiría contrastar con un método sustancialmente diferente la posibilidad de que la especie haya permanecido en determinadas áreas y ver en qué grado puede haber sido afectada por las variaciones climáticas.

Secuencias obtenidas de GeneBank utilizadas

N° Colección	N° GeneBank	Gen
UFRGS 4624	KM677706.1	Citocromo b
UFRGS 4627	KM677708.1	Citocromo b
UFRGS 4632	KM677709.1	Citocromo b
UFRGS 4636	KM677707.1	Citocromo b
UFRGS 5104	KM677741.1	Citocromo b
UFRGS 5345	KM677739.1	Citocromo b
UFRGS 5636	KM677735.1	Citocromo b
UFRGS 5637	KM677736.1	Citocromo b
UFRGS 5638	KM677737.1	Citocromo b
UFRGS 5639	KM677738.1	Citocromo b
UFRGS 5744	KM677725.1	Citocromo b
UFRGS 5745	KM677726.1	Citocromo b
UFRGS 5774	KM677694.1	Citocromo b
UFRGS 5775	KM677695.1	Citocromo b
UFRGS 5776	KM677696.1	Citocromo b
UFRGS 5777	KM677697.1	Citocromo b
UFRGS 5899	KM677740.1	Citocromo b
UFRGS 5910	KM677727.1	Citocromo b
UFRGS 5911	KM677728.1	Citocromo b
UFRGS 5913	KM677729.1	Citocromo b
UFRGS 6094	KM677747.1	Citocromo b
UFRGS 6096	KM677748.1	Citocromo b
UFRGS 6098	KM677749.1	Citocromo b
UFRGS 6101	KM677750.1	Citocromo b
UFRGS 6104	KM677751.1	Citocromo b
UFRGST 2559	KM677698.1	Citocromo b
UFRGS 2139	KJ484296.1	PRLR
UFRGS 1568	KJ484285.1	PRLR

Localidades analizadas



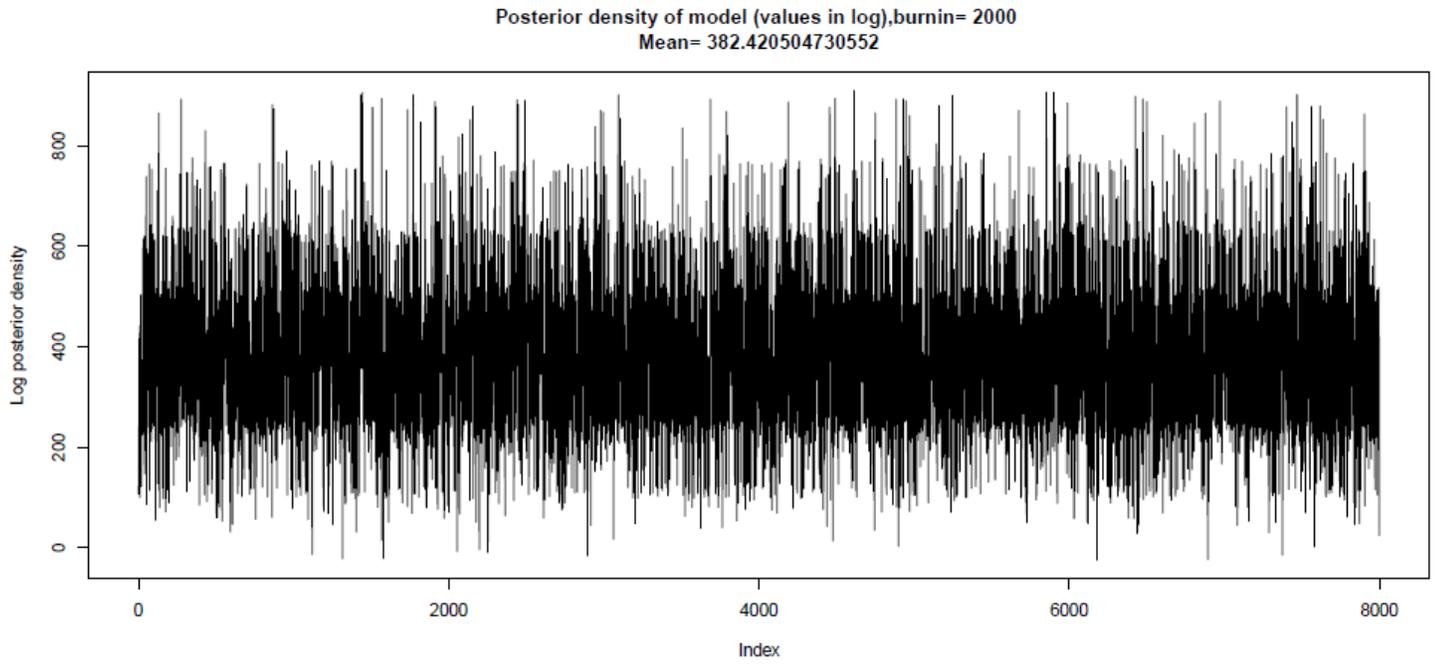
Localidades:

CTI= Cerro do Tigre; BR290=Alegrete; FSF= Fazenda São Francisco; CJA=Cerro do Jarau; RdS= Rosario do Sul; BR293= Livramento; CVE= Cerros Verdes; ArtN= Norte Artigas; ArtS= Sur Artigas; RivN= Norte Rivera; RTacN= Norte Arroyo Tacuarembó; RivM= Rivera Centro; Luna= Lunarejo; Lau= Laureles; XXXE= Tres Cruces Este; XXXN= Tres Cruces Norte; XXXS= Tres Cruces Sur; TacCh= Arroyo Tacuarembó Chico; Tamb= Tambores; SalS= Sur Salto; SalW= Oeste Salto; SalC= Centro Salto; SalN= Norte Salto.

Número de secuencias analizadas por localidad

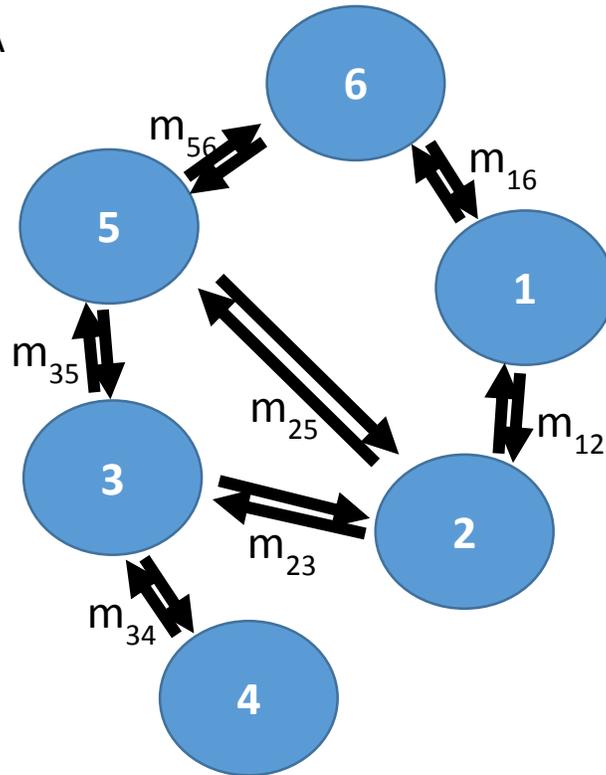
Localidad	Sec. Cit-b	Sec. PRLR
CTI	5	0
BR290	5	0
FSF	2	0
CJA	5	0
RdS	0	4
BR293	4	0
CVE	5	0
ArtN	6	6
ArtS	6	6
RivN	1	8
RTacN	10	10
RivM	3	8
Luna	14	12
Lau	8	12
XXXE	3	6
XXXN	11	6
XXXS	13	12
TacCh	3	8
Tamb	12	14
SalS	9	10
SalW	4	10
SalC	7	6
SalN	6	10

Muestreo de MCMC de Geneland

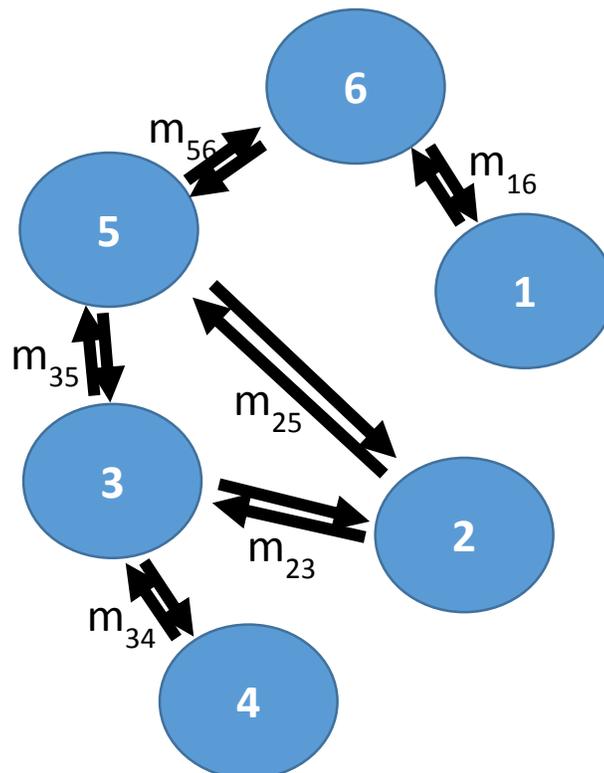


Modelos puestos a prueba en ABC que resultaron más probables

Modelo A



Modelo B



Regresiones lineales múltiples entre matices (MRM)

Fst ~ Distancias filogenéticas + Distancias Geográficas:

R ²	pval
0.2581511	0.0002000

	Fst	pval
Dist. filogenéticas	7.528334146	0.0637
Dist. geográficas	0.003579194	0.0044

Fst ~ Distancias filogenéticas + Distancias geográficas + Distancia por escabrosidad + Distancias evitando arroyos:

R ²	pval
0.2865126	0.0010000

	Fst	pval
Dist. filogenéticas	8.002669	0.0499
Dist. geográficas	8.106394e-03	0.0677
Dist. escabrosidad	-9.005862e-06	0.2106
Dist. arroyos	-2.919529e-08	0.9241

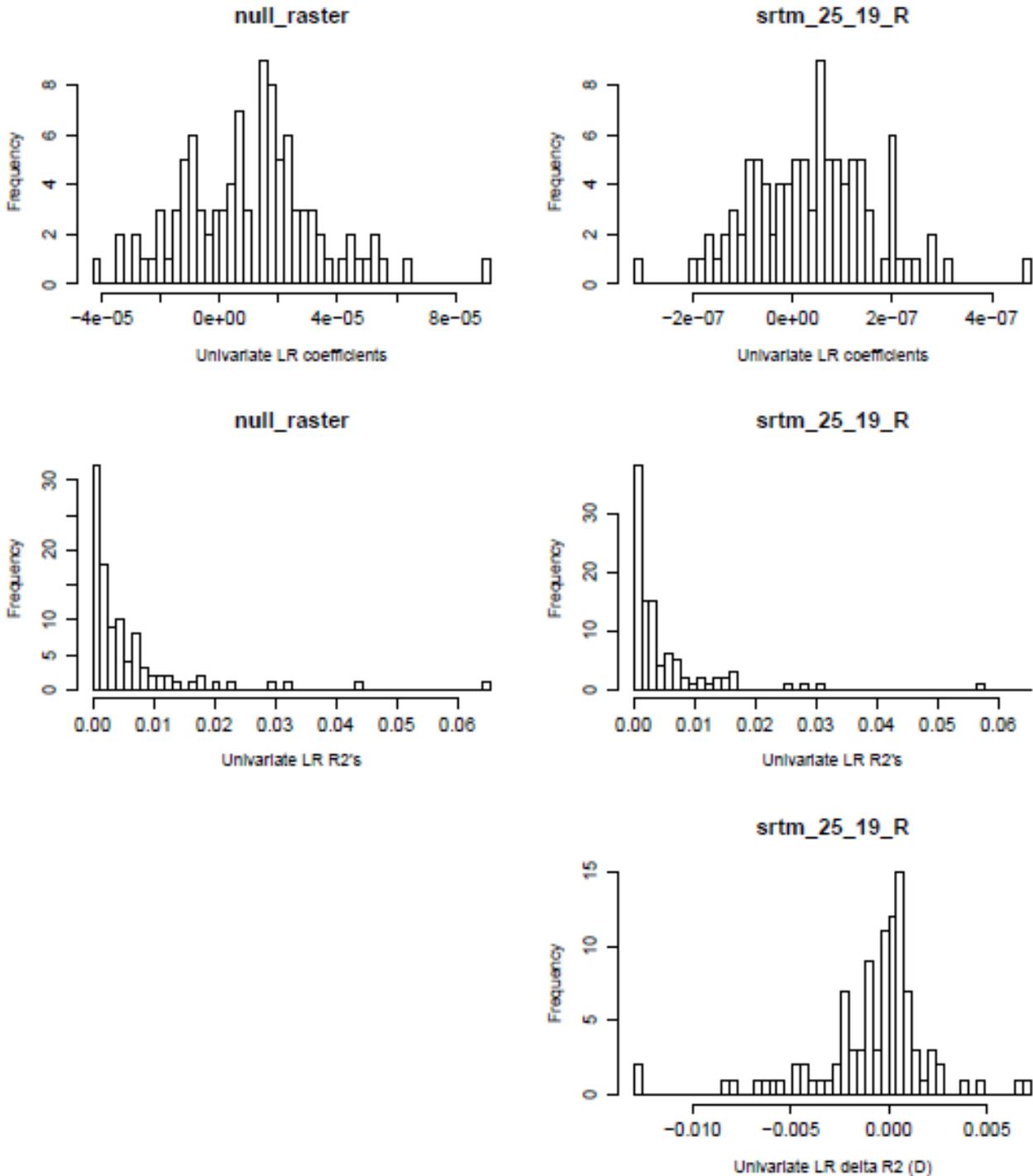
Valores de diversidad filogenética (PD) y PD complementaria

<i>Región</i>	<i>PD</i>	<i>PD-Compl. ArtN</i>	<i>PD-Compl. ArtS</i>	<i>PD-Compl. SaIS</i>	<i>PD-Compl. SaIN</i>	<i>PD-Compl. SaIC</i>	<i>PD-Compl. Tamb</i>	<i>PD-Compl. XXX</i>	<i>PD-Compl. Lau</i>	<i>PD-Compl. Luna</i>	<i>PD-Compl. RivN</i>
<i>BrasN</i>	0.0634	0.0670	0.0640	0.0820	0.0556	0.0798	0.0783	0.0771	0.0755	0.0768	0.0617
<i>BrasS</i>	0.0427	0.0400	0.0397	0.0652	0.0351	0.0631	0.0616	0.0603	0.0587	0.0600	0.0410
<i>RivN</i>	0.0115	0.0184	0.0177	0.0373	0.0129	0.0352	0.0337	0.0324	0.0311	0.0324	0.0000
<i>Luna</i>	0.0155	0.0405	0.0375	0.0269	0.0155	0.0204	0.0203	0.0199	0.0071	0.0000	0.0364
<i>Lau</i>	0.0128	0.0364	0.0335	0.0247	0.0115	0.0182	0.0181	0.0176	0.0000	0.0043	0.0324
<i>XXX</i>	0.0491	0.0741	0.0711	0.0472	0.0422	0.0424	0.0371	0.0000	0.0539	0.0535	0.0700
<i>Tamb</i>	0.0219	0.0482	0.0452	0.0203	0.0170	0.0172	0.0000	0.0099	0.0272	0.0267	0.0442
<i>SaIC</i>	0.0185	0.0463	0.0433	0.0218	0.0144	0.0000	0.0138	0.0118	0.0239	0.0233	0.0422
<i>SaIN</i>	0.0542	0.0449	0.0512	0.0573	0.0000	0.0501	0.0493	0.0473	0.0529	0.0542	0.0557
<i>SaIS</i>	0.0132	0.0431	0.0402	0.0000	0.0164	0.0165	0.0116	0.0114	0.0251	0.0246	0.0391
<i>ArtS</i>	0.0223	0.0202	0.0000	0.0493	0.0194	0.0472	0.0457	0.0444	0.0430	0.0443	0.0286
<i>ArtN</i>	0.0232	0.0000	0.0211	0.0531	0.0139	0.0509	0.0494	0.0482	0.0468	0.0481	0.0301

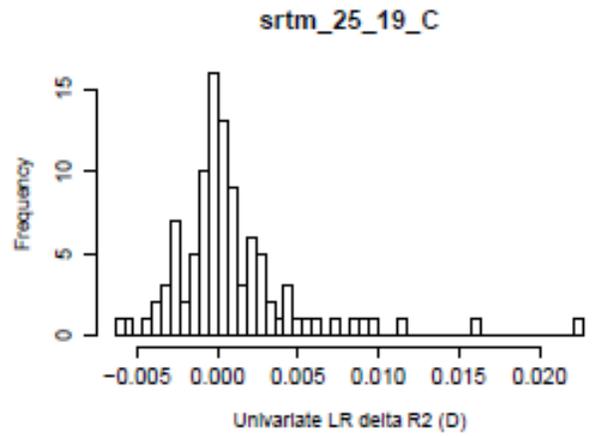
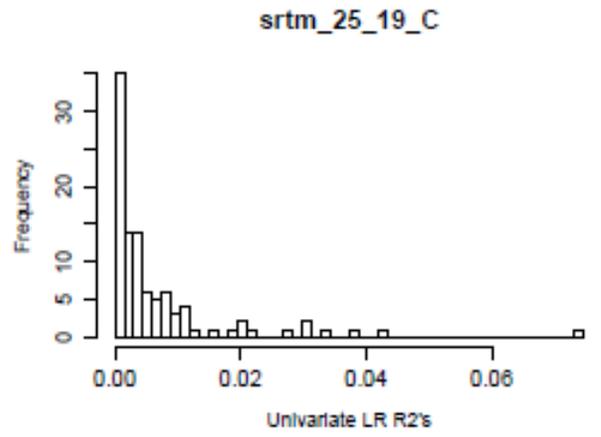
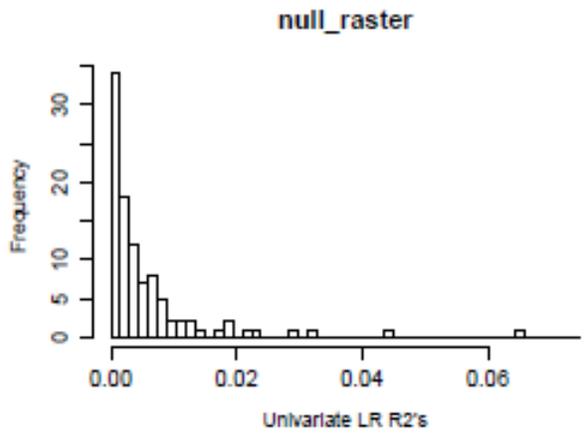
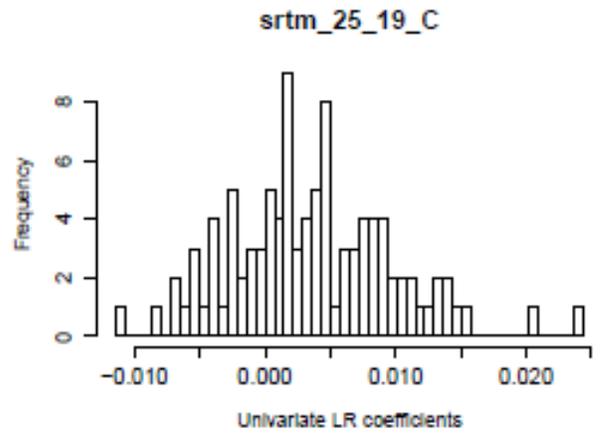
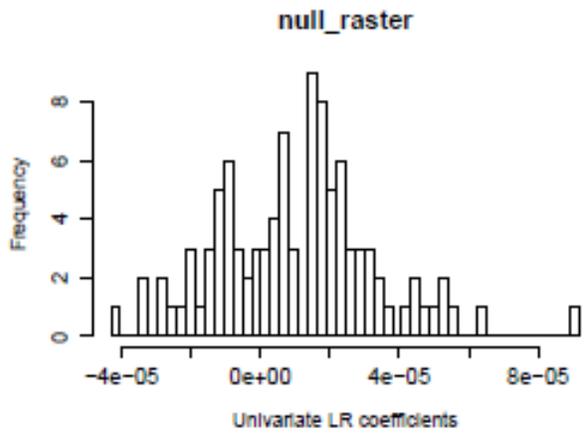
Resultados de SERAPIHM

A continuación se detallan los valores obtenidos en SERAPHIM para altura, escabrosidad, rocosidad y profundidad del suelo, analizando las variables como resistencia y como conductancia, y comparándolas con capas nulas.

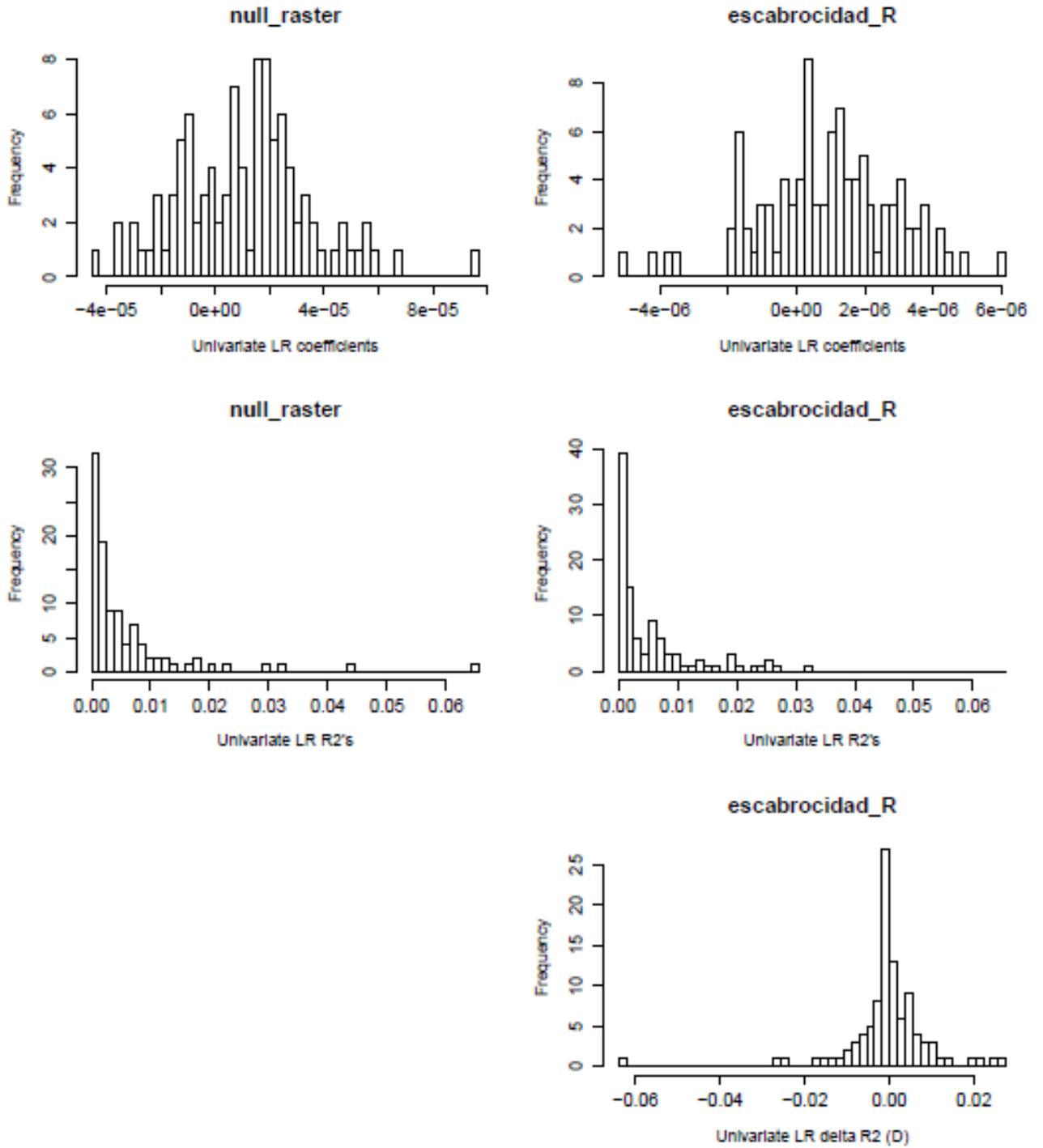
Altura (resistencia)



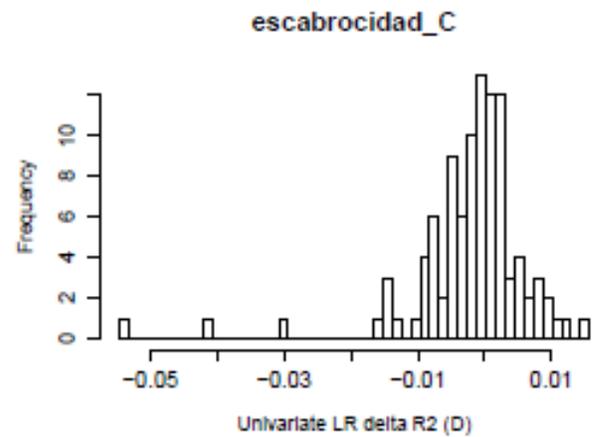
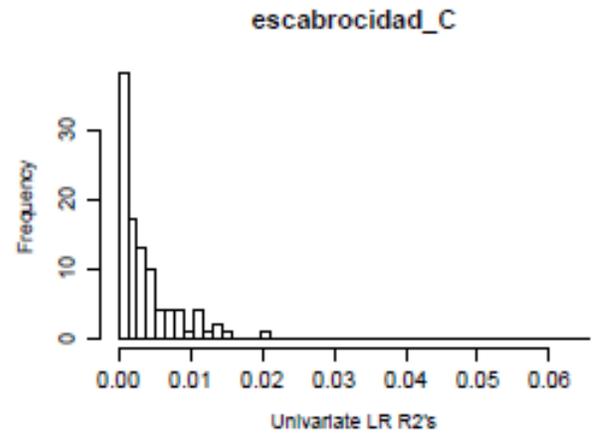
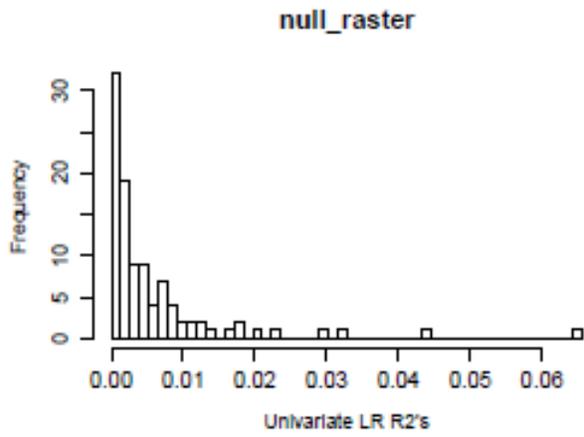
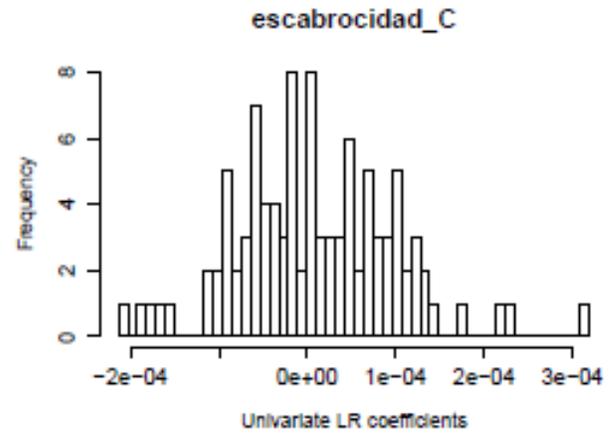
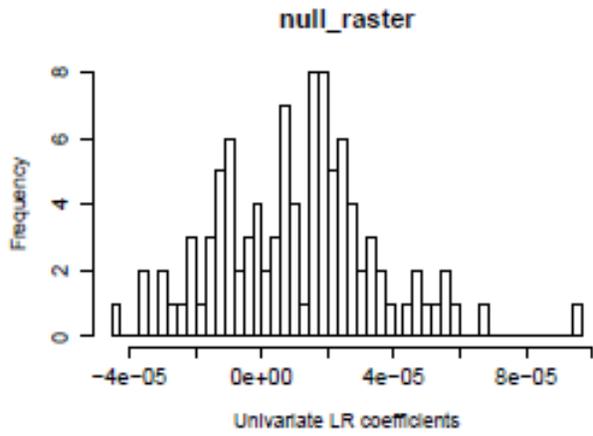
Altura (conductancia)



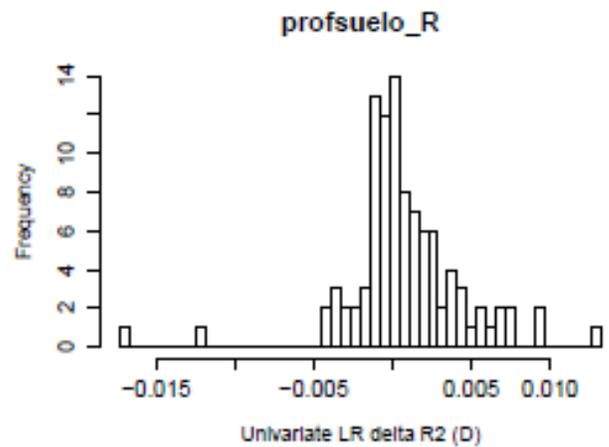
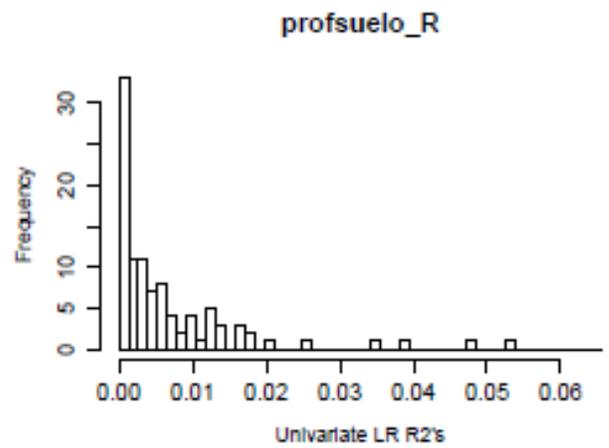
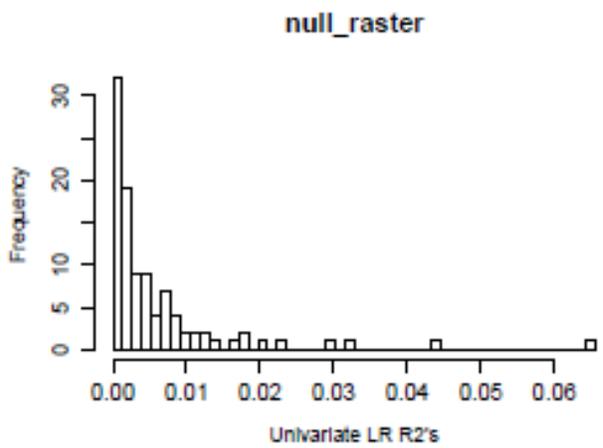
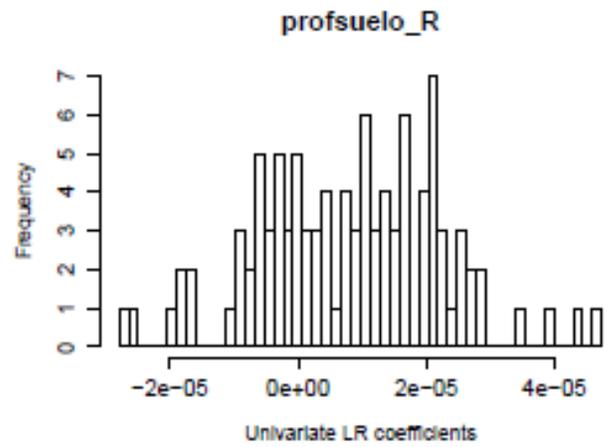
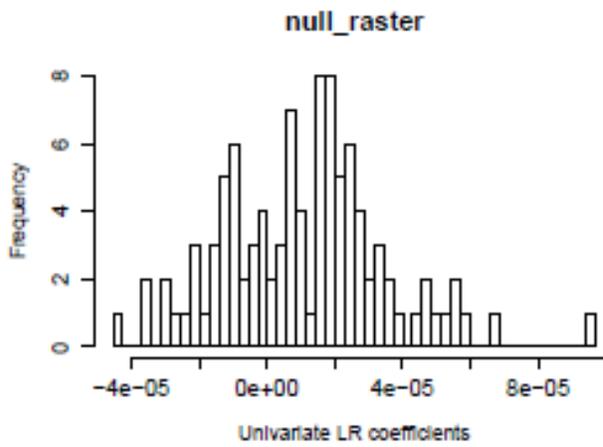
Escabrosidad (resistencia)



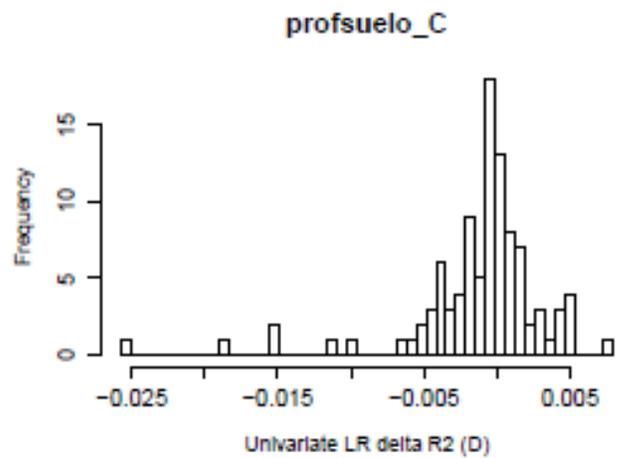
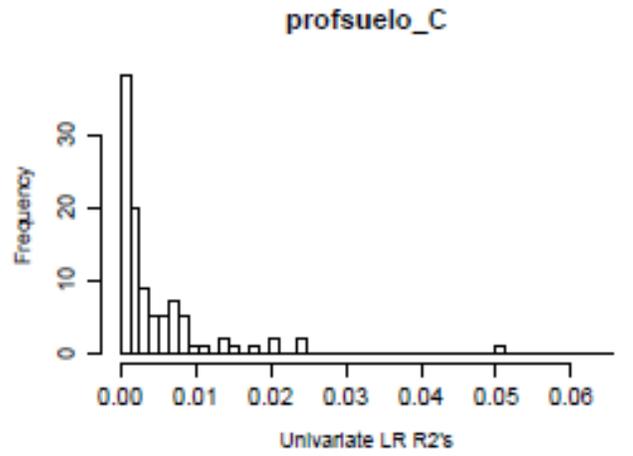
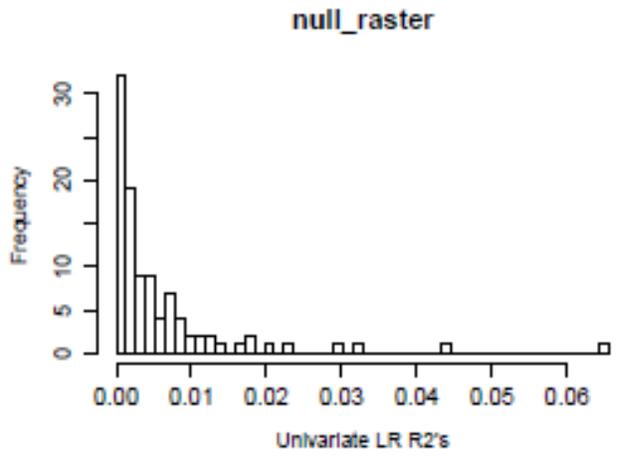
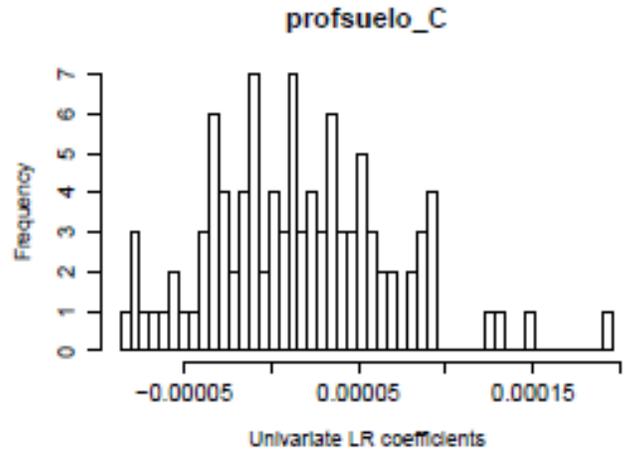
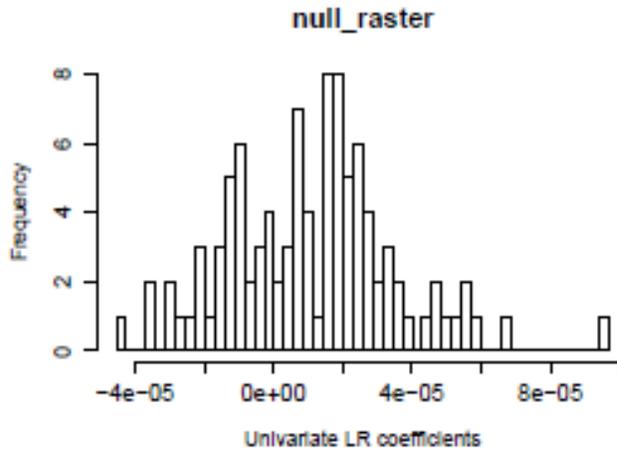
Escabrosidad (conductancia)



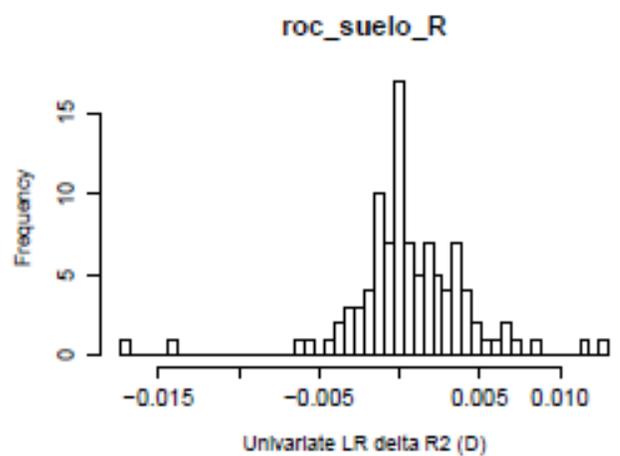
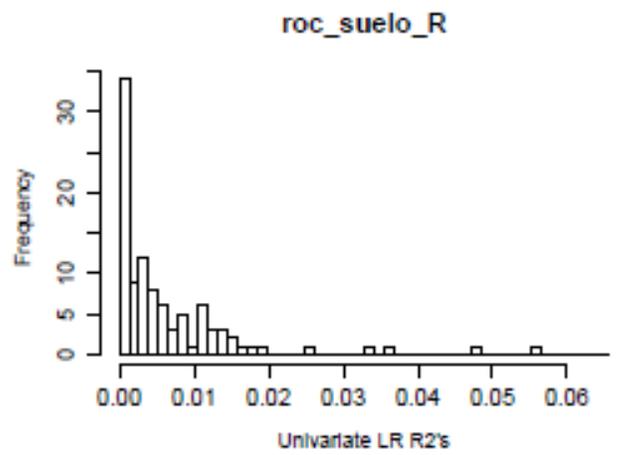
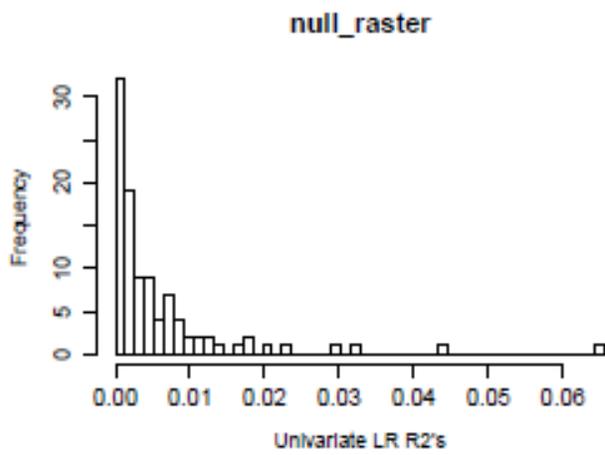
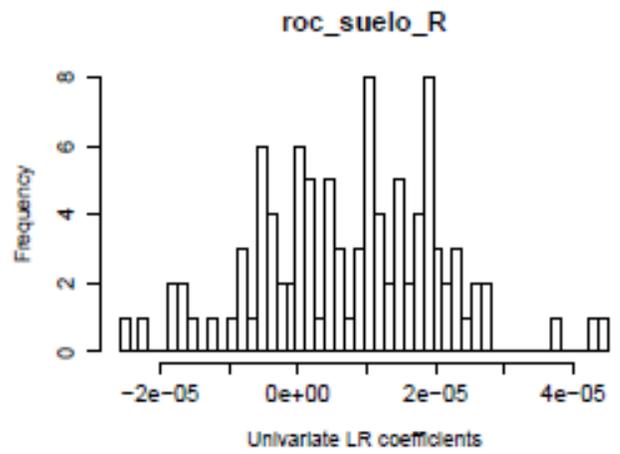
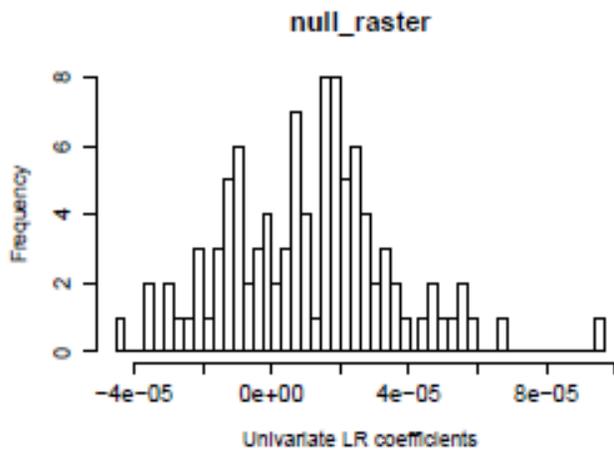
Profundidad del suelo (resistencia)



Profundidad del suelo (conductancia)



Rocosidad (resistencia)



Rocosidad (conductancia)

