UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA URUGUAY

FACULTAD DE CIENCIAS
UDELAR fcien.edu.uy

TESINA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE LICENCIADA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Estudio de la variación morfológica y genética en *Rhyncholestes raphanurus*; Osgood, 1924 (Paucituberculata: Caenolestidae)

Ma. Eugenia Olivera

Orientador: Alejandro D'Anatro

Laboratorio de Evolución, Facultad de Ciencias,
Universidad de la República

Montevideo, Uruguay

2022

ÍNDICE

Página

RESUMEN……..3

AGRADECIMIENTOS.....4

INTRODUCCIÓN……..……..5

Variación en poblaciones naturales……..5
Morfometría geométrica……....6
Filogeografía……..8
La comadrejita trompuda Rhyncholestes raphanurus……..……9
El problema a estudiar……..……...10

MATERIALES Y MÉTODOS.....11

Área de muestreo.....11
Análisis de morfometría geométrica……..……..……11
Análisis genético-poblacionales……..……....14

RESULTADOS……..……....16

Análisis morfométricos……....16
Análisis genéticos……....24
Descripción de las secuencias obtenidas……....24
Estructura poblacional y relaciones filogenéticas……..26

DISCUSIÓN……..……..31

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS……..……....35

BIBLIOGRAFÍA……..……..36

ANEXO……..……..42

RESUMEN

Cuantificar la variación entre individuos de una especie a través de su rango de distribución es útil por ejemplo para probar hipótesis de adaptación local de las poblaciones, relaciones de parentesco o existencia de subespecies, dilucidar la historia y/o cambios geológicos dentro de un área, y, sobre todo en el contexto actual, para brindar conocimiento que contribuya a la gestión de la conservación, por ejemplo al definir unidades prioritarias a conservar. La Morfometría Geométrica, que permite el estudio de la forma de diferentes estructuras biológicas; y la Filogeografía, que aborda la variación genética geográfica, son herramientas utilizadas para analizar dicha variabilidad. En el presente estudio se trabajó con ambas disciplinas con el objetivo de evaluar la variabilidad morfológica y genética de uno de los marsupiales menos conocidos de América del Sur, *Rhyncholestes raphanurus*. Para ello se utilizaron especímenes disponibles en la colección de la Universidad Austral de Chile, provenientes de cinco localidades específicas distintas del correspondiente país. Se hizo especial énfasis en evaluar si existían diferencias significativas entre los individuos de Chile continental y los de la isla Chiloé. Se eligieron puntos de referencia homólogos en las vistas dorsal, lateral y ventral del cráneo y vista lateral de la mandíbula para los análisis morfométricos y se trabajó con secuencias del gen del Citocromo b mitocondrial obtenidos mediante amplificación por la técnica PCR para los análisis genéticos. Los resultados obtenidos mostraron cierta diferenciación entre individuos provenientes de las dos localidades continentales consideradas para estos análisis, así como también en comparación con los de la isla. Esto se explicó principalmente por diferencias en las dimensiones del cráneo; los de Chiloé fueron ligeramente más alargados y más bajos en relación a los de Parque Nacional Puyehué y, en menor medida, a los de La Picada. Los estudios genéticos revelaron una diversidad moderadamente alta. Pese a estos resultados no hay evidencia sólida de que las distintas poblaciones hayan desarrollado adaptaciones locales o morfotipos discretos, especialmente debido al bajo número de muestras analizadas, por lo que estos resultados apoyan la idea establecida por otros autores de que *R. raphanurus* no representa más de una única especie. Se deben seguir haciendo estudios de este marsupial tan escasamente conocido, que representa uno de los pocos sobrevivientes de los Paucituberculados en Sudamérica.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi tutor Alejandro, no sólo por la orientación en esta tesis sino también por las oportunidades que me dio de ingresar al mundo de la investigación. A Guillermo D'Elía por brindar los datos en que se basó este trabajo y realizar una revisión preliminar del mismo que enriqueció el resultado final.
A los miembros del tribunal, Ivanna Tomasco y Enrique Lessa, por ser partes del mismo y realizar las sugerencias para mejorar esta tesis.

A mi familia, en primer lugar a mi madre, y mi abuela, por estar siempre y enseñarme a ser lo que soy, a esforzarme para mejorar y para ser independiente en la vida. A mi padre, y a mi abuelo Ruben, que lo recuerdo con su ímpetu y fortaleza; me quedan guardados esos recuerdos en donde miramos juntos aquellos programas de la naturaleza que, como a mí, tanto interés te despertaba.

Agradezco especialmente a mi novio Andrés, por su incondicionalidad, siempre apoyarme, ser el mejor compañero de vida y darme tanto amor. También estoy agradecida con su familia que en todo momento me recibió como un miembro más de una forma tan cálida.

A mis amigas de la facultad, que con su compañía hicieron más lindo este camino de aprendizaje.

INTRODUCCIÓN

Variación en poblaciones naturales

Durante siglos, los investigadores se han maravillado ante la diversidad y complejidad de la vida en la Tierra. De la simple observación de que los organismos difieren tanto en sus atributos anatómicos como en el uso de estos rasgos, los estudiosos han tratado de describir las diferencias morfológicas y anatómicas entre taxones y explicar cómo estas han evolucionado (e.g., Darwin, 1859). Las poblaciones naturales de casi todas las especies generalmente se presentan subdivididas, y, por lo tanto, pueden mostrar un mayor o menor grado de diferenciación genética y morfológica, como resultado de aislamiento por barreras o distancia geográfica, donde el intercambio de material genético entre poblaciones es limitado (Mayr & O'Hara, 1986). Es importante entender los procesos genéticos y ecológicos que originan e influyen en la diversidad genética. Las nuevas variantes genéticas surgen continuamente debido a las mutaciones, y es el requisito necesario para que la especie evolucione y se adapte a nuevas condiciones, pues la selección actúa si existen diversas alternativas (Jiménez & Collada, 2000), cambiando las frecuencias de los alelos que influyen en el desempeño de las especies (Loo, 2011). Sin embargo, no es fácil estimar el verdadero grado de variación entre poblaciones. Ésta se puede dar por caracteres neutrales, es decir, que no se ven afectados por la selección natural, o también debido a los caracteres que sí presentan valor adaptativo. En los primeros, las frecuencias de las diferentes variantes son consecuencia de procesos aleatorios o direccionales, como la deriva genética y la migración entre poblaciones, mientras que el mantenimiento de nuevos fenotipos surgidos por mutación depende de su valor selectivo (Jiménez & Collada, 2000). La selección es una de las fuerzas evolutivas que generalmente disminuye la diversidad genética, debido a que ésta actúa en contra de las mutaciones deletéreas incrementando la frecuencia de genes favorables en la población, como resultado de las presiones ambientales. Existen numerosos métodos para estimar la diversidad dentro de una especie, dado que la caracterización de la variación genética y morfológica que presentan las poblaciones puede ser utilizada como herramienta clave para entender los procesos que afectan los patrones de diferenciación en las poblaciones naturales.

Morfometría Geométrica

La comparación de caracteres anatómicos entre organismos ha sido un elemento central de la biología comparada durante siglos, e históricamente la clasificación taxonómica y la comprensión de la diversidad biológica han basado sus fundamentos principalmente en descripciones morfológicas (Adams *et al.*, 2004).

Cuantificar la variación morfológica es útil para poner a prueba hipótesis de adaptación local y parentesco dentro de una especie, siendo una herramienta valiosa para la gestión de la conservación (Colangelo *et al.*, 2012).

Un enfoque cuantitativo para el estudio de la variación morfológica es la morfometría, que combina herramientas para la descripción y el análisis estadístico de diversas preguntas biológicas relevantes (Rohlf, 1990). Además de analizar la variación de la forma, indaga su covarianza con otras variables (Bookstein, 1991). Hace algunas décadas, surge la Morfometría Geométrica como una potente herramienta de análisis dentro de la morfología, la cual permite el estudio de la forma, definida como las propiedades geométricas restantes tras remover los efectos de la escala, la rotación y la traslación de un objeto (Bookstein, 1996). Ha sido empleada en el campo de la taxonomía y filogenia de vertebrados, y utilizada en estructuras morfológicas muy diferentes (Rohlf & Slice, 1990). Los métodos de morfometría geométrica capturan la geometría de un objeto utilizando datos basados en coordenadas. Se desarrolló una teoría estadística de la forma que permite el uso combinado de métodos estadísticos multivariados y de métodos para la visualización directa en forma biológica (Adams *et al.*, 2004). Una diferencia importante entre la morfometría geométrica y la morfometría tradicional, además del tipo de variables que utiliza, es que los resultados de los análisis multivariados pueden ser interpretados y visualizados directamente como deformaciones de la forma (López Galán, 2015).

Los datos digitales usados en Morfometría Geométrica, especialmente las fotografías de animales en el campo o de especímenes de museos, son fáciles de recolectar rápidamente en grandes cantidades. Así, la Morfometría Geométrica permite un análisis multivariado muy sofisticado de dichos datos. A pesar de su sofisticación matemática, las técnicas morfométricas geométricas son fáciles de dominar gracias a la disponibilidad de software de calidad y simples de utilizar, y a la naturaleza intuitiva de los métodos visuales para representar los resultados (Lawing & Polly, 2010).

El enfoque más extendido en Morfometría Geométrica es representar cada espécimen por las posiciones relativas de los puntos de referencia morfológicos, los marcos anatómicos o “landmarks”, que se ubican con precisión y establecen una correspondencia uno a uno entre todos los especímenes incluidos en el análisis (Klingerberg, 2011).

De esta manera, de cada muestra se obtiene un conjunto de coordenadas de referencia, que registran las posiciones anatómicas relativas definibles. Estos puntos de referencia se pueden considerar "puntos fijos", ya que definen la ubicación de rasgos anatómicos particulares que representan atributos biológicos discretos (Adams *et al.*, 2013). Se han propuesto tres categorías para la clasificación de los puntos de referencia (Bookstein, 1991): de tipo I, que corresponden a yuxtaposiciones discretas de tejido (por ejemplo, un foramen); de tipo II, que son zonas de máxima o mínima curvatura; y de tipo III que corresponden a puntos extremos (Claude, 2008).

La información de la forma se extrae mediante un procedimiento llamado superposición de Procrustes, que elimina la variación de tamaño, posición y orientación de los datos en las coordenadas de los puntos de referencia, y que es el núcleo de la morfometría geométrica (Goodall, 1991).

Las coordenadas de los puntos de referencia resultantes de la superposición de Procrustes centrados, escalados y rotados se denominan coordenadas Procrustes de la forma; su promedio, la configuración consenso, es la forma cuya suma de distancias al cuadrado a las otras formas es mínima y, por lo tanto, es la estimación de máxima verosimilitud de la media para ciertos modelos estadísticos (Dryden & Mardia, 1998).

Las coordenadas de los puntos de referencia superpuestos se pueden utilizar en análisis estadísticos multivariados para abordar una amplia gama de cuestiones biológicas (Klingerberg, 2011).

El tercer paso de un estudio morfométrico es probar hipótesis biológicas utilizando métodos estadísticos multivariados. Finalmente, se utilizan métodos gráficos para visualizar patrones de variación de forma y facilitar las descripciones de cambios de forma (Adams *et al.*, 2013).

Uno de los potenciales problemas que tienen los marcadores morfológicos para inferir eventos demográficos de la historia de las poblaciones, es que, aunque algunas características están bajo estricto control genético, la influencia de las

condiciones ambientales significa que no suele haber en general una relación “uno a uno” entre el genotipo de un organismo y su fenotipo (Freeland, 2003).
Por ello, la variación genética geográfica dentro de las especies es un fenómeno muy estudiado. Muchos investigadores están interesados en la adaptación fenotípica a los entornos locales y la diferenciación filogeográfica, tanto genética como fenotípica, que conduce a la especiación (Lawing & Polly, 2010).

Filogeografía

La filogeografía aborda los patrones de distribución espacial y las relaciones genealógicas de la variabilidad genética a nivel intraespecífico o entre especies cercanamente emparentadas (Avise, 1989). El tipo de datos más usados en estudios filogeográficos son las secuencias de un gen o región del ADN mitocondrial (ADNmt) de los individuos muestreados en una población, llamados comúnmente haplotipos. El análisis en un contexto geográfico de las variantes de estos haplotipos (polimorfismo) brinda una caracterización del estado actual de la diversidad genética de las poblaciones estudiadas (Serna-Lagunes *et al.*, 2015). Se utilizan secuencias de nucleótidos del ADN, y son las mutaciones puntuales las que proveen los caracteres para inferir procesos evolutivos (Lessa *et al.*, 2010).
El ADNmt es una molécula clave para este tipo de análisis filogeográficos, ya que exhibe características evolutivas intrínsecas y de herencia matrilineal, y en comparación con los marcadores nucleares, presenta una menor tasa de recombinación (Vázquez-Domínguez, 2007).
Análisis a una escala más precisa permiten inferir los cambios demográficos históricos que han experimentaron las poblaciones (Young *et al.*, 2000). La distribución espacial de los linajes de genes permite identificar patrones que señalan la existencia de antiguas barreras geográficas o ambientales que oportunamente limitaron el flujo génico entre las poblaciones (Roderick, 1996).
La filogeografía se ha utilizado para comprender el lugar de origen y dispersión de las especies, su adaptación a condiciones ambientales particulares, la estructura de la población, su correlación con aspectos geográficos y/o ecológicos y la variación intra e interespecífica a nivel de población, subpoblaciones o entre poblaciones (Avise & Hamrick, 1996).

La comadrejita trompuda Rhyncholestes raphanurus

Los mamíferos de pequeño porte y poca movilidad son buenos modelos para estudiar las causas y patrones de diferenciación en poblaciones naturales (D'Anatro & Lessa, 2006). Dentro de esta categoría encontramos a *Rhyncholestes raphanurus*, el cual es uno de los mamíferos menos conocidos de los bosques templados de América del Sur (Martin, 2011). Este marsupial fue descrito por Osgood en el año 1924 en una revisión de los caenoléstidos vivientes, basada en especímenes colectados en la isla de Chiloé en Chile. La misma constituye la única especie representante del género (González *et al.*, 2020). Son de color marrón oscuro o negro, con orejas cortas y redondeadas y cola larga, en la cual almacena estacionalmente grasa, un rasgo que ha sido relacionado con el letargo extendido (Patterson & Gallardo, 1987). La distribución conocida se limita a unas pocas localidades (menos de 25), restringidas a los bosques lluviosos templados del sur de Chile y áreas adyacentes de Argentina (una única localidad). Existe muy poca información disponible sobre su ecología (Patterson & Gallardo, 1987); presenta hábitos nocturnos y se alimenta principalmente de invertebrados, así como también de vegetación y hongos (Meserve *et al.*, 1988). La especie ha sido registrada en bosques altos y maduros con abundantes árboles caídos y una alta proporción de suelo desnudo (Kelt & Martínez, 1989), pero también en un bosque adyacente a un área recientemente talada como lo demuestra Pine *et al.* (1979), por lo que hasta cierto punto es tolerante a la presencia humana. Aparentemente, *R. raphanurus* requiere ciertas condiciones locales que incluirían dosel moderadamente cerrado con abundante densidad de follaje, porciones de suelo desnudo, alta cobertura de arbustos y alto contenido de humedad (Martin, 2011). Estas condiciones podrían encontrarse incluso en pequeños parches rodeados de áreas agrícolas, como lo reporta Kelt (2000). La ausencia de *Rhyncholestes* en bosques densos y aparentemente adecuados al sur de Chaitén, en Argentina, y en los bosques costeros al norte de Maicolpué sugieren un papel importante de los procesos históricos (Kelt & Martínez, 1989). Se conoce poco de la variabilidad para esta especie de marsupial. Hace algunas décadas Bublitz halló diferencias en los caninos superiores premolariformes entre hembras del continente y Chiloé y así separó a *Rhyncholestes* en dos especies: la forma continental *R. r. continentalis* y *R. r. raphanurus*, restringida a la isla de Chiloé (Bublitz, 1987). De todas maneras,

contaba con solo una hembra de la isla, por lo que este rasgo fue considerado insuficiente para dividir dos especies según otros autores (Patterson, 2007; Martin, 2008). Recientemente, González *et al.* presentaron una amplia revisión de la variación morfológica de la mayoría de especímenes de *R. raphanurus* depositados en las colecciones de mamíferos. Sus estudios comparativos de los individuos continentales y la isla de Chiloé apoyaron la consideración de *Rhyncholestes raphanurus* como una única especie válida, porque las diferencias morfométricas encontradas entre los individuos de Chiloé y los continentales difirieron en un grado similar a los de diferentes poblaciones continentales (González *et al.*, 2020). Los autores plantean que estos resultados pueden ser consecuencia de la historia geológica del área, donde la porción noroeste de la isla de Chiloé permaneció en contacto con el resto del continente hasta tiempos recientes (Villagrán *et al.*, 1997), por lo que pudo no pasar tiempo suficiente para que se produzca la acumulación de cambios identificables entre estas poblaciones luego del aislamiento.

El problema a estudiar

En base a los antecedentes planteados, el objetivo general de este trabajo fue evaluar la variabilidad morfológica y genética de *Rhyncholestes raphanurus* a lo largo de su rango de distribución geográfica. A diferencia del reciente trabajo de González *et al.*, que estudia la variación morfológica de la especie mediante medidas lineales craneodentales, aquí se empleó la técnica de morfometría geométrica, y se adicionó la variabilidad del gen del citocromo b mitocondrial para complementar la información disponible.

Se trabajó según las siguientes hipótesis:

1. No existen diferencias significativas entre las poblaciones insulares y continentales como consecuencia de la historia geológica del área.

2. Como hipótesis alternativa, se plantea que existen diferencias entre los individuos estudiados tanto a nivel genético como fenotípico, principalmente comparando aquellos continentales con insulares, debido al aislamiento geográfico entre poblaciones.

Como objetivos específicos se planteó evaluar el grado de diferenciación entre las poblaciones de *Rhyncholestes raphanurus* continentales y de Chiloé mediante análisis morfométricos del cráneo y genéticos utilizando el gen del Citocromo b mitocondrial.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de muestreo

Se analizaron especímenes disponibles en la Colección de Mamíferos de la Universidad Austral de Chile (Valdivia, Chile), provenientes de las Provincias chilenas de Osorno y Chiloé, de cinco localidades específicas distintas (Fig. 1). Los datos para los análisis morfométricos se obtuvieron a partir de 24 ejemplares originarios de las localidades continentales La Picada (N=19) y Parque Nacional Puyehué (N=3) y las localidades insulares Palomar Fundo El Venado (N=1) y Puerto Carmen (N=1). Para los análisis genéticos se utilizaron datos de 19 individuos obtenidos de cinco localidades (Fig. 1), las continentales La Picada (N=9) y Parque Nacional Puyehué (N=1) y de la isla Chiloé Palomar Fundo El Venado (N=6), Puerto Carmen (N=1) y Tantauco (N=2).

Análisis de morfometría geométrica

Cada cráneo y mandíbula se colocó paralelo al plano focal y se tomaron imágenes digitales de las vistas dorsal, lateral, ventral y mandíbula utilizando una cámara Olympus SP-800UZ. Para cada fotografía se tomó como escala de referencia un centímetro. A partir de las imágenes digitales, se obtuvieron las coordenadas *x* e *y* de cada punto de referencia seleccionado utilizando el software TpsDig2 versión 2.31 (Rohlf, http://life.bio.sunysb.edu/morph).

Se eligieron un total de 20, 33, 27 y 18 puntos de referencia homólogos, o landmarks, en las vistas dorsal, lateral y ventral del cráneo y vista lateral de la mandíbula, respectivamente, los cuales se describen a continuación:

Vista dorsal: 1 - extremidad anterior de la sutura premaxilar; 2 - punto más posterior del *septum nasi*; 3 - unión de sutura entre nasal, premaxilar y maxilar; 4 - sutura entre premaxilar y maxilar; 5 - borde externo del premaxilar (en plano fotográfico); 6 - punto más anterior de la vacuidad anteorbital; 7 - unión proximal de sutura entre frontal y nasal; 8 - punto de contacto de nasal, premaxilar y maxilar; 9 - punto más posterior de la vacuidad anteorbital; 10 - sutura entre premaxilar y lagrimal (en plano fotográfico); 11 - unión entre lacrimal y arco zigomático; 12 - sutura entre frontal y lagrimal (en plano fotográfico); 13 - sutura entre yugal y proceso cigomático del escamoso (en plano fotográfico); 14 - punto más interior en la curvatura de la porción proximal del proceso cigomático del escamoso (en el plano fotográfico); 15 - sutura entre parietal y mastoideo (en plano fotográfico); 16 - sutura entre mastoideo y exoccipital; 17 - punto más externo de exoccipital; 18 - sutura entre parietal e interparietal en la línea media del cráneo; 19 - sutura entre parietal y frontal en la línea media del cráneo; 20 - punto del inicio del lagrimal en la línea media del cráneo.
Vista lateral: 1 - extremo anterior del nasal; 2 - unión de premaxilar y nasal; 3 - punta de premaxilar; 4 - sutura entre el premaxilar y maxilar sobre el canino; 5 - unión de nasal, premaxilar y maxilar; 6 - sutura entre frontal y parietal; 7 - punto más anterior de la vacuidad anteorbital; 8 - punto más posterior de la vacuidad anteorbital; 9 - intersección entre la cresta supraorbital y la sutura entre lagrimal y frontal; 10 - sutura entre parietal e interparietal; 11 - punto más externo del exoccipital; 12 - punto más interior en la curvatura del cóndilo occipital (en plano fotográfico); 13 - unión del cóndilo occipital y proceso timpánico del periótico (en plano fotográfico); 14 - unión de alisfenoides y proceso timpánico de alisfenoides (en plano fotográfico); 15 - punto más anterior del mastoides; 16 - punta anterior del proceso cigomático del escamoso; 17 - punto más anterior del foramen infraorbital; 18 - punto más posterior del foramen posterolateral palatino; 19 - punto más posterior del alvéolo del último molar; 20 - punto más posterior del alvéolo del tercer molar; 21 - punto más posterior del alvéolo del segundo molar; 22 - punto más posterior del alvéolo del primer molar; 23 - punto más posterior del alvéolo del tercer premolar; 24 - punto más anterior del alvéolo del tercer premolar; 25 - punto más anterior del alvéolo del segundo premolar; 26 - punto más posterior del alvéolo del primer premolar; 27 - punto más anterior del alvéolo del primer premolar; 28 - punto más posterior del alvéolo del canino; 29 - punto más anterior del alvéolo del canino; 30 - punto más posterior del alvéolo del cuarto incisivo; 31 - punto más anterior del alvéolo del cuarto incisivo; 32 - punto más

anterior del alvéolo del tercer incisivo; 33 - punto más anterior del alvéolo del segundo incisivo. Vista ventral: 1 - punta del premaxilar; 2 - punto más posterior del alvéolo del primer incisivo; 3 - punto más posterior del alvéolo del segundo incisivo; 4 - punto más posterior del alvéolo del tercer incisivo; 5 - punto más posterior del alvéolo del cuarto incisivo; 6 - punto más anterior del alvéolo del canino; 7 - punto más posterior del alvéolo del canino; 8 - punto más anterior del alvéolo del primer premolar; 9 - punto más posterior del alvéolo del primer premolar; 10 - punto más anterior del alvéolo del tercer premolar; 11 - punto más anterior y externo del alvéolo del primer molar; 12 - punto más anterior y externo del alvéolo del segundo molar; 13 - punto más anterior y externo del alvéolo del tercer molar; 14 - sutura entre yugal y proceso cigomático del escamoso (en plano fotográfico); 15 - punto más anterior de la bulla alisfenoides; 16 - punto más proximal del foramen lacerum posterior; 17 - unión entre cóndilo occipital y exoccipital (en plano fotográfico); 18 - borde posterior del basioccipital; 19 - foramen carotídeo; 20 - unión entre basiesfenoides y paraesfenoides; 21 - unión entre paraesfenoides y vómer; 22 - punto más posterior de la cresta palatina por encima de la abertura de coana; 23 - punto más anterior de la cresta palatina por encima de la abertura de coana; 24 - punto más proximal de la fenestra maxilopalatina; 25 - punto más distal de la fenestra maxilopalatina; 26 - sutura entre maxilar y yugal; 27 - punto más interior en la curvatura del maxilar en el arco cigomático.

Mandíbula: 1 - punta más anterior del incisivo inferior procumbente; 2 - punto más anterior del alvéolo del primer incisivo inferior; 3 - punto más anterior del alvéolo del segundo incisivo inferior; 4 - punto más anterior del alvéolo del tercer incisivo inferior; 5 - punto más anterior del alvéolo del cuarto incisivo incisivo inferior; 6 - punto más anterior del alvéolo del segundo premolar inferior; 7 - punto más anterior del alvéolo del tercer premolar inferior; 8 - punto más anterior del alvéolo del primer molar inferior; 9 - punto más anterior del alvéolo del segundo molar inferior; 10 - punto más anterior del alvéolo del tercer molar inferior; 11 - punto más anterior del alvéolo del último molar inferior; 12 - punto más posterior del alvéolo del último molar inferior; 13 - punto más externo del apófisis coronoides de la mandíbula; 14 - borde posterior de la superficie articular del cóndilo mandibular; 15 - punta del proceso angular; 16 - canal mandibular debajo del segundo molar inferior; 17 - canal mandibular debajo del tercer premolar inferior; 18 - punto más posterior e inferior del incisivo inferior procumbente.

Para minimizar los efectos de las desviaciones, se realizó un análisis de Procrustes (Rohlf & Slice, 1990) en el programa MorphoJ (Klingenberg, 2011). Se efectuó un Análisis de Variación Canónica (CVA) a partir de los datos estandarizados, que maximiza la varianza entre grupos. Los cambios de forma asociados a cada eje canónico se visualizaron en rejillas de deformación.

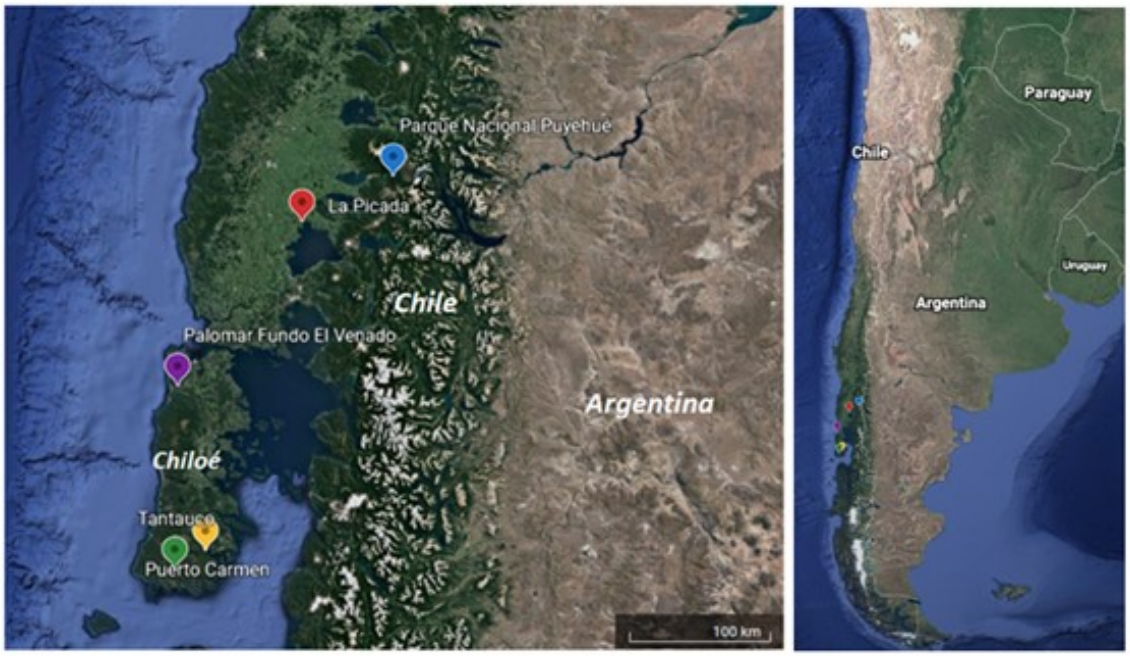

Fig 1. Procedencia de los individuos de *Rhyncholestes raphanurus* utilizados en este estudio

Análisis genético-poblacionales

Las extracciones de ADN total se realizaron con el Kit comercial (Promega) Wizard SV genomic siguiendo el protocolo de fabricación.

A partir de las extracciones de ADN se obtuvieron secuencias del gen del Citocromo b mitocondrial mediante amplificación por la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) empleando oligonucleótidos específicos. Las condiciones de PCR fueron las siguientes. Las reacciones se ejecutaron en volúmenes de 30 µl incluidos 0,8 µlM de cada cebador, 0,2 mM de dNTP, 3,0 mM MgCl2, 1x Invitrogen® buffer de reacción, 0,08 U Taq DNA polimerasa (Invitrogen®) y 15 ul de extracción de ADN.

Las condiciones de la PCR consistieron en un paso de desnaturalización inicial de 3 minutos a 94°C, seguido de 35 ciclos de desnaturalización de 30 s a 95°C, asociación de 30 s a 45°C y extensión de 40 s a 72°C, así como un paso de extensión final de 7 min a 72°C. Los productos de PCR se examinaron después de la electroforesis en minigeles de agarosa TBE de 0,8%. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados en Macrogen, Inc. Corea. Las secuencias fueron editadas con CodonCode. El alineamiento de las secuencias se realizó con el programa CLUSTALW (Chenna *et al.*, 2007). Con el software DnaSP6 (Rozas *et al.*, 2017), se calculó el número de haplotipos (H), los índices de diversidad haplotípica (Hd) y el número de sitios polimórficos (S). Con el fin de evaluar la diferenciación genética entre poblaciones, se calcularon valores de F_{ST} y los valores de probabilidad asociados se estimaron mediante 10^4 permutaciones (α= 0,05) en el programa ARLEQUIN 3.11 (Excoffier *et al.*, 2005). Así, los valores de p menores a 0,05 se consideraron significativos y los valores de p mayores a 0,05 se consideraron no significativos (Sokal & Rolph, 1979). El índice F_{ST} brinda una estimación del grado de diferenciación genética entre sub-poblaciones en relación a la población total (Freeland, 2005). Este parámetro varía entre 0 y 1; representando 0 la ausencia de estructura poblacional y 1 la existencia de una fuerte estructura poblacional. Mediante el programa PopART se efectuó una red de haplotipos utilizando como algoritmo de agrupamiento el TCS (Clement *et al.*, 2002). Además, se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA), y las pruebas de neutralidad de Tajima y Fu, también utilizando el programa ARLEQUIN 3.11. Se definieron dos agrupamientos alternativos para efectuar los análisis, con el fin de comparar posibles diferencias entre las poblaciones de la isla. El primer agrupamiento se efectuó formando tres grupos, conteniendo por un lado los individuos originarios del Continente (La Picada y Parque Nacional Puyehué) y por otro los de la isla Chiloé subdivididos en Chiloé Norte (Palomar Fundo El Venado) y Chiloé Sur (Tantauco y Puerto Carmen). El segundo agrupamiento consistió solamente en dos grupos; por un lado el Continente y por otro Chiloé.

Por otra parte, las relaciones filogenéticas se infirieron a través de un análisis de máxima verosimilitud en el programa IQ-TREE Web Server (Trifinopoulos *et al.*, 2016), utilizando los valores de los parámetros predeterminados, con bootstrap ultrarápido para probar el soporte de los nodos (Ultrafast Bootstrap) (Hoang *et al.*, 2018), en base a 1000 réplicas.

Además, se efectuó una filogenia en MEGA 7.0.18 (Kumar *et al.*, 2015) con el método Neighbor-Joining (NJ), modelo de distancia Kimura 2 parámetros, en base a 10000 replicaciones de bootstrap. El tipo de sustitución fue nucleótido y las sustituciones a incluir fueron tanto las transiciones como las transversiones y para el tratamiento de datos faltantes se seleccionó la eliminación completa. Asimismo, en MEGA 7.0.18 se efectuó otra filogenia mediante el método Máxima Parsimonia con las siguientes condiciones: el tipo de sustitución fue nucleótido, para el tratamiento de datos faltantes se seleccionó la eliminación completa y el método de búsqueda MP fue Tree-Bisection-Reconnection (TBR), con nro. de árboles iniciales=10, nivel de búsqueda MP=1 y nro. máximo de árboles para retener=100, en base a 10000 réplicas de bootstrap. Ambos árboles se colapsaron a un valor mínimo de 50% de bootstrap. Para todas las reconstrucciones se utilizó como grupo externo a *Caenolestes caniventer*, *Caenolestes sangay*, *Caenolestes convelatus*, *Caenolestes fuliginosus* y *Lestoros inca*. En estas reconstrucciones se incluyó un individuo de *Rhyncholestes* del que no se disponía la información de origen (AJ508399) y que no fue utilizado en los análisis previos.

RESULTADOS

Análisis morfométricos

Los datos de las tres vistas del cráneo y mandíbula consideradas revelaron resultados similares. Los análisis discriminantes mostraron diferencias entre las distintas localidades.

Para la vista dorsal, el primer eje de variación canónica explicó el 76% de la varianza y el segundo eje el 24% (Tabla 1). Para la vista lateral, el primer y el segundo eje representaron también el 76% y el 24% de la varianza, respectivamente. El análisis de la vista ventral indicó que el primer eje de variación canónica explica el 78% de la varianza y el segundo el 22%. Por último, para la mandíbula el primer eje explicó el 65% de la varianza mientras que el segundo el 35%.

Los análisis discriminantes realizados sobre la vista dorsal indicaron que todos los especímenes de Parque Nacional Puyehué presentaron valores negativos a lo largo del eje 1 mientras que los de La Picada y Chiloé presentaron generalmente valores

positivos (Fig 2.). Este desplazamiento morfológico de la configuración consenso implicó principalmente un desplazamiento posterior de los puntos de referencia 10, 12 y 20 y un desplazamiento anterior de los puntos 5 y 6. Estos cambios producen un alargamiento del lagrimal. Los ejemplares de La Picada y Chiloé presentaron esta característica. Los individuos con puntajes negativos a lo largo del eje 1 (es decir, los de Parque Nacional Puyehué) exhibieron el carácter morfológico opuesto. El eje 2 explicó una pequeña cantidad de variación en comparación con el eje 1, segregando a los individuos del continente con los de Chiloé, mostrando puntuaciones positivas en este último. Los cambios estuvieron principalmente caracterizados por un desplazamiento posterior de los puntos de referencia 1, 4, 18 y 19, y un desplazamiento anterior de los puntos 5, 6, 9, 12, 13 y 14. Esto implicó una tendencia al alargamiento del cráneo. Los individuos continentales con puntuaciones negativas para este eje presentaron la característica morfológica opuesta.

Desde la vista lateral el eje 1 ubicó a los individuos de Chiloé y Parque Nacional Puyehué sobre valores negativos y los de La Picada principalmente positivos (Fig 3.). Esto se debió principalmente a un desplazamiento anterior de los puntos de referencia 1, 10, 11 y 12 y un desplazamiento posterior de los puntos 6, 8 y 17. Estos cambios producen un cráneo más corto en los individuos pertenecientes a La Picada. Los individuos de Chiloé y Parque Nacional Puyehué presentaron la característica fenotípica opuesta, ya que mostraron valores negativos a lo largo del eje 1. El eje 2 representó el 23% de la variación. Los individuos de Chiloé se ubicaron en valores positivos, los de Parque Nacional Puyehué negativos, mientras que los de La Picada presentaron una ligera dispersión a valores positivos y negativos a lo largo de la raíz. Los cambios están caracterizados por un desplazamiento anterior de los puntos de referencia 6, 9, 14, 30, 31, 32 y 33, y por un desplazamiento posterior de los puntos 5, 11, 12, 15 y 16. Estos cambios resultaron en una caja craneana más baja, principalmente para los ejemplares de Chiloé. Los individuos con valores negativos a lo largo del eje 2 (es decir, los de Parque Nacional Puyehué) exhibieron la característica opuesta. Estos resultados desde la vista lateral están en concordancia con los de la vista dorsal; los individuos de Chiloé mostraron un cráneo más bajo y alargado mientras que en los continentales este fue más alto y corto.

Considerando la vista ventral, el eje 1 explicó el 78% de la varianza y separó a los individuos de Chiloé con valores negativos, los de Parque Nacional Puyehué con valores positivos y los de La Picada dispersos tanto en valores positivos como

negativos (Fig. 4). Estos cambios involucraron un desplazamiento posterior de los puntos de referencia 5, 6, 7, 8 y 9 y un desplazamiento anterior de los puntos 1, 2, 3, 10 y 11 principalmente. Los cambios producen un hocico más corto, asociado fundamentalmente a los individuos de Puyehué; los individuos con valores negativos a lo largo del eje 1 exhibieron la característica opuesta (hocico más largo). Una pequeña fracción de la variación (22%) asociada al eje 2 en el análisis de la vista ventral no representó una diferenciación significativa entre las poblaciones por lo que estos resultados no fueron tomados en cuenta.

Con respecto a la mandíbula, los cambios para el eje 1 se debieron principalmente a un desplazamiento anterior del landmark 13 y a un desplazamiento posterior de los landmarks 14 y 18 (Fig 5). Los individuos del Continente (La Picada y Parque Nacional Puyehué) mostraron principalmente valores positivos para el eje 1, que se asocia a una apófisis coronoides más alta y un cóndilo mandibular más pronunciado; mientras que los ejemplares de Chiloé, al presentar valores negativos, exhibieron las características morfológicas opuestas. El eje 2 implicó un desplazamiento anterior de los puntos de referencia 1, 13 y 17, y un desplazamiento posterior de los puntos 2, 3, 4, 5, 6, 7, 14. Esto representó un desplazamiento posterior de los dientes inferiores, excepto los molares, una apófisis coronoides más bajo y un cóndilo mandibular más pronunciado. Los individuos de La Picada se ubican dispersos en valores tanto positivos como negativos del eje 2, mientras que los de Puyehué y Chiloé en positivos.

Tabla 1. Varianza explicada para el eje 1 y el eje 2 de los análisis de funciones discriminantes.

	Valor de la varianza explicada	
	Eje 1	**Eje 2**
Vista dorsal	0,76	0,24
Vista lateral	0,76	0,24
Vista ventral	0,78	0,22
Mandíbula	0,65	0,35

Las distancias de Mahalanobis por pares entre los centroides de los grupos aparecen en la Tabla 2. Las distancias más altas fueron entre Parque Nacional Puyehué y Chiloé para las vistas dorsal y ventral del cráneo y mandíbula, excepto para la vista lateral, donde la distancia más alta se da entre La Picada y Chiloé.

Tabla 2. Distancias de Mahalanobis entre pares de poblaciones, para la vista dorsal (a), lateral (b) y ventral (c) del cráneo y mandíbula (d).

	La Picada	**Chiloé**
(a)		
La Picada	0	4,33
PN Puyehué	6,09	7,98
(b)		
La Picada	0	6,78
PN Puyehué	4,20	5,73
(c)		
La Picada	0	5,73
PN Puyehué	3,22	7,52
(d)		
La Picada	0	6,41
PN Puyehué	4,14	7,80

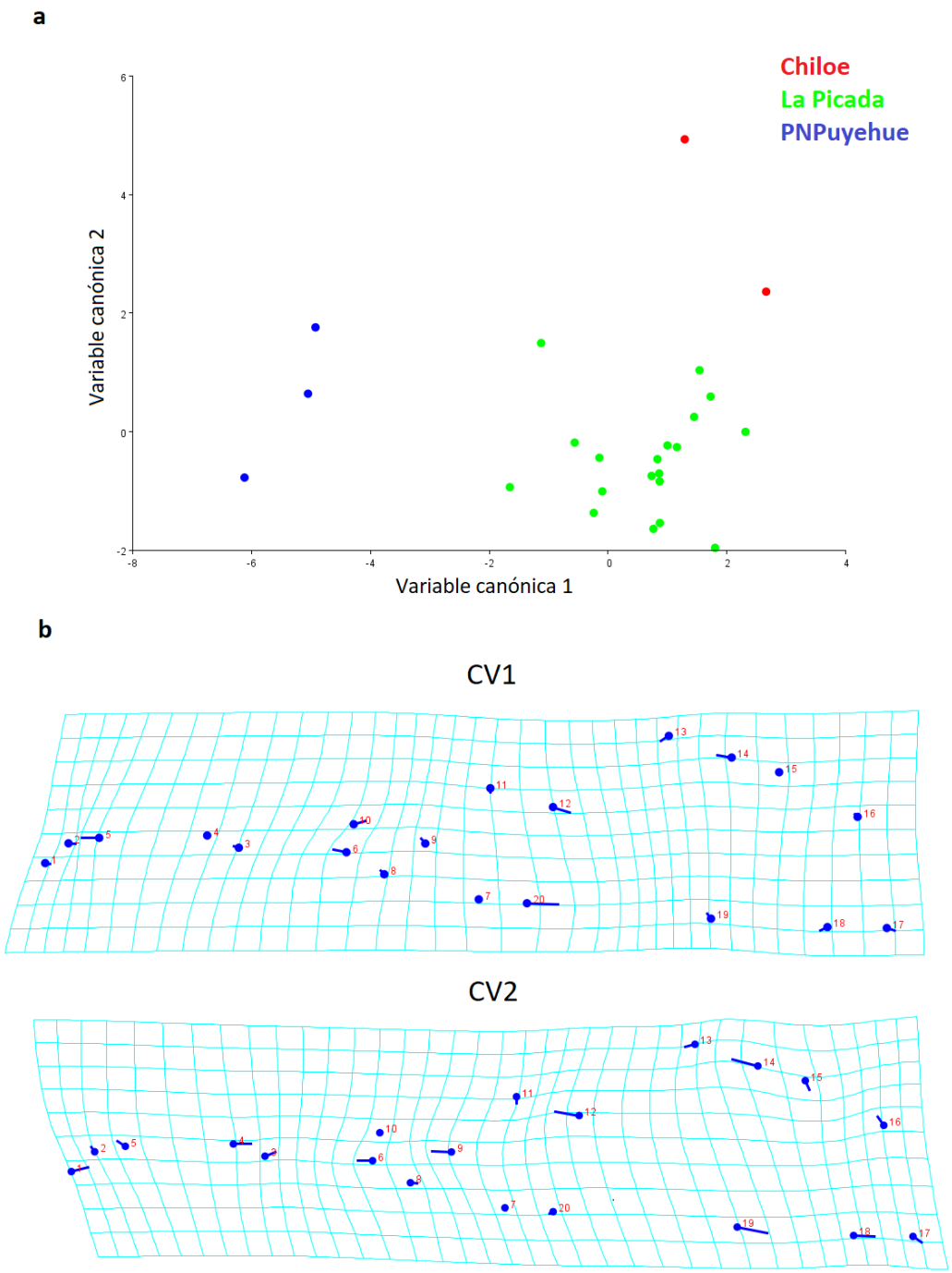

Fig 2. a. Diagrama de los dos primeros factores canónicos del CVA para los 24 individuos de *Rhyncholestes* en vista dorsal. **b**. Desplazamiento relativo de los landmarks en sentido positivo con respecto al centroide para los dos primeros factores canónicos en vista dorsal de los cráneos de *Rhyncholestes raphanurus*.

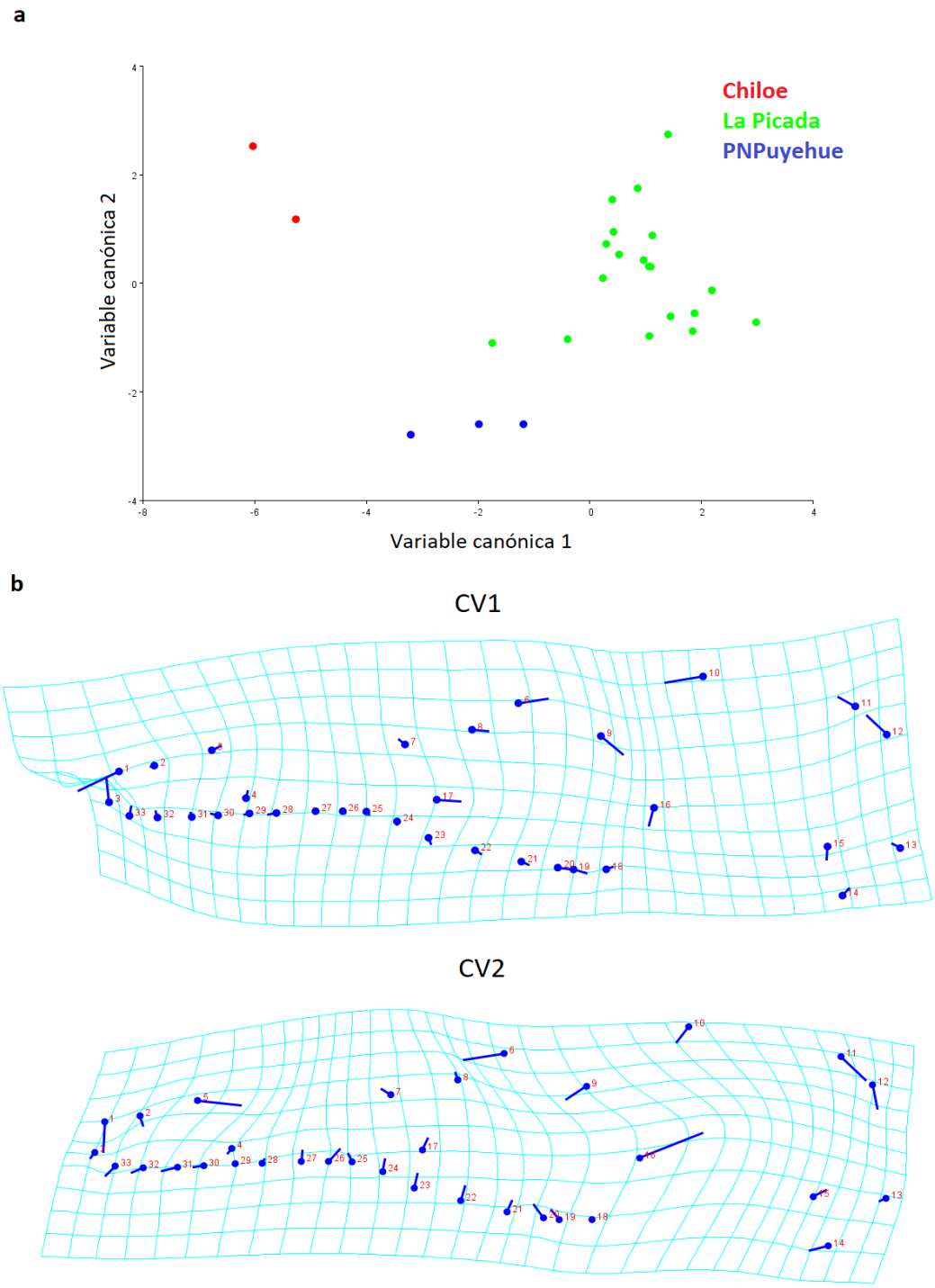

Fig 3. a. Diagrama de los dos primeros factores canónicos del CVA para los 24 individuos de *Rhyncholestes* en vista lateral. **b**. Desplazamiento relativo de los landmarks en sentido positivo con respecto al centroide para los dos primeros factores canónicos en vista lateral de cráneos de *Rhyncholestes raphanurus*.

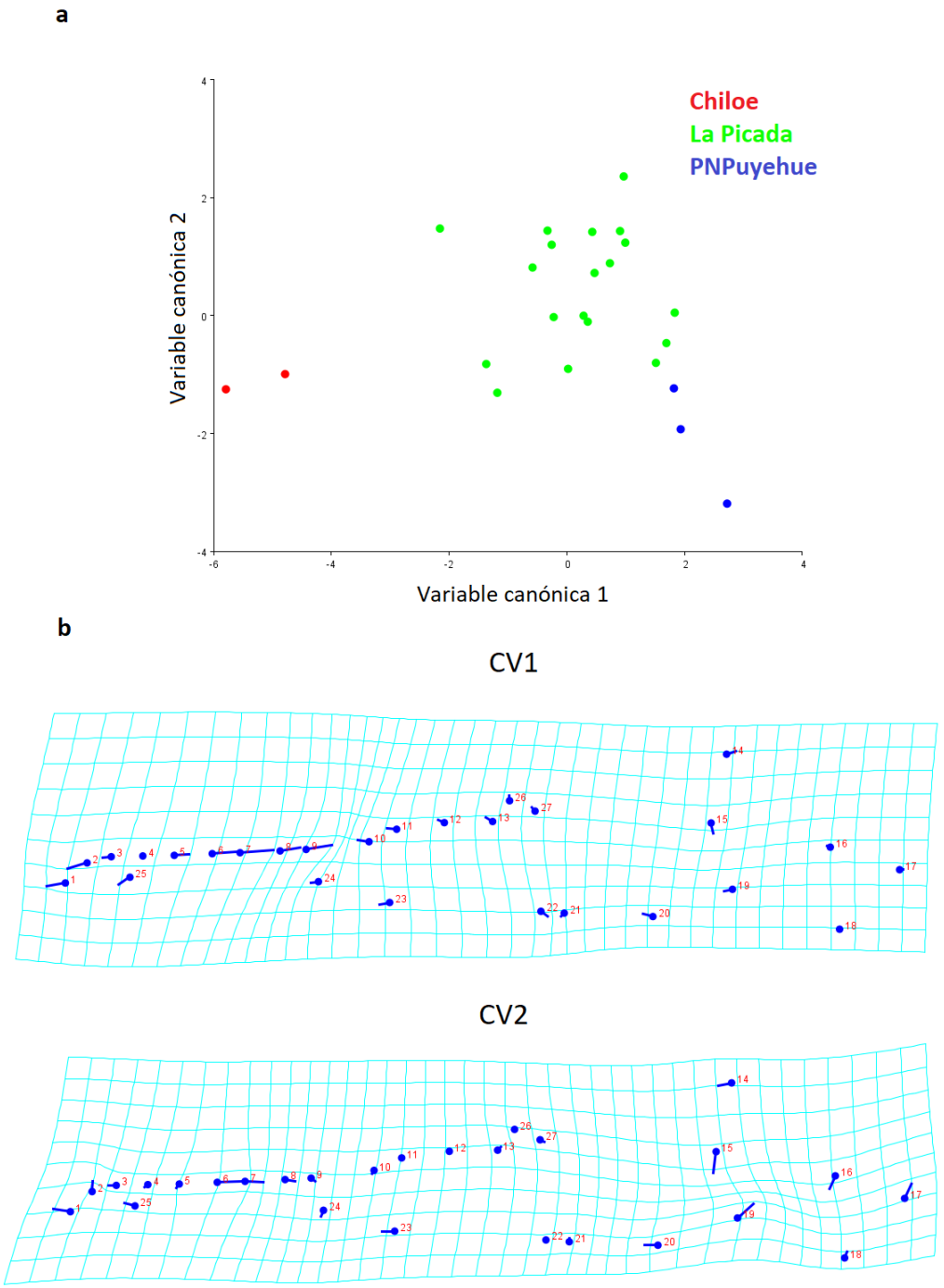

Fig 4. a. Diagrama de los dos primeros factores canónicos del CVA para los 24 individuos de *Rhyncholestes* en vista ventral. **b**. Desplazamiento relativo de los landmarks en sentido positivo respecto al centroide para los dos primeros factores canónicos en vista ventral de cráneos de *Rhyncholestes raphanurus*.

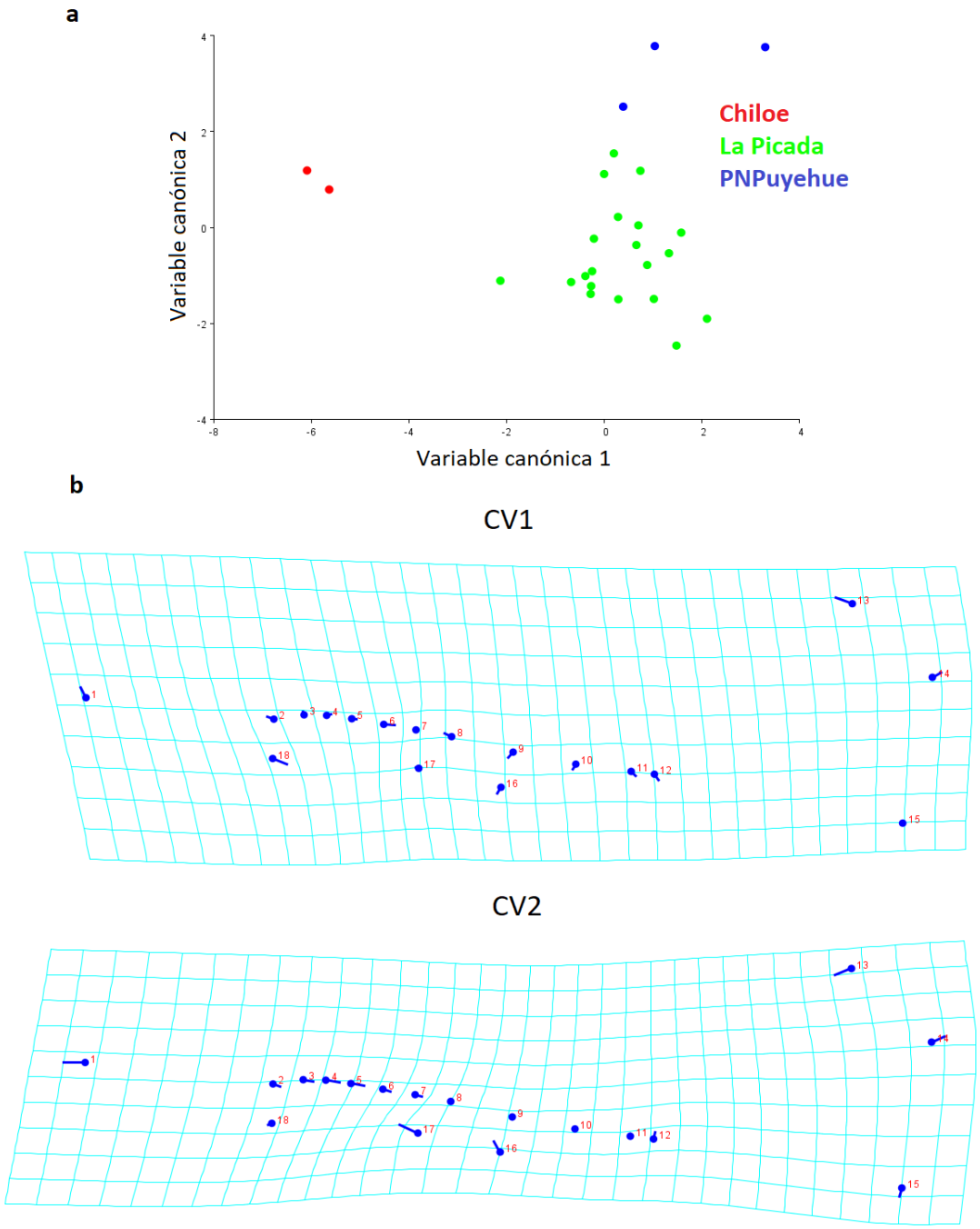

Fig 5. a. Diagrama de los dos primeros factores canónicos del CVA para los 24 individuos de *Rhyncholestes* en mandíbula. **b**. Desplazamiento relativo de los landmarks en sentido positivo respecto al centroide para los dos primeros factores canónicos en mandíbula de *Rhyncholestes raphanurus*.

Análisis genéticos

Descripción de las secuencias obtenidas

Se secuenciaron exitosamente 19 individuos: 9 de La Picada (Osorno), 1 de Parque Nacional Puyehué (Osorno), 6 de Palomar Fundo El Venado (Chiloé), 1 de Puerto Carmen (Chiloé) y 2 de Tantauco (Chiloé), obteniéndose un fragmento de 801 pb del gen del Citocromo b mitocondrial. El análisis del fragmento de 801 pb del gen de 19 especímenes de 5 localidades específicas reveló 8 haplotipos, definidos por 52 sitios polimórficos, de los cuales 17 fueron sitios informativos. La diferencia entre los haplotipos fue de 1 a 14 pasos mutacionales; casi todas las sustituciones (13 de 17) fueron transiciones (C-T o A-G) y tres fueron transversiones (C-G, G-T o T-A) (Tabla 3). Los cambios sinónimos fueron 44 y los no sinónimos 11.

La diversidad de haplotipos general fue de 0,673. El haplotipo más común (H3) estuvo presente en 11 individuos (55% de la muestra total) y se encontró tanto en localidades continentales (La Picada) como en la isla Chiloé en la zona norte (Palomar Fundo El Venado). El segundo haplotipo más frecuente (H1) se registró en 2 individuos (el 10% del total de la muestra) y se encontró en La Picada (Tabla 4).

Tabla 3. Haplotipos (H) identificados y sus sitios polimórficos informativos del gen del citocromo b mitocondrial de *Rhyncholestes raphanurus*.

	Sitios informativos polimórficos																
Haplotipo	4	5	6	8	10	11	12	18	20	30	36	38	40	42	44	45	52
H1	T	T	G	T	T	C	C	C	T	C	T	T	G	T	A	C	T
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A	-	-	-	A
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	A
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	-
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	C	C	A	C	C	T	G	-	-	T	C	C	A	A	-	T	A
H7	C	C	A	C	C	T	G	T	C	T	C	C	-	A	G	-	-
H8	C	-	A	C	C	T	G	T	C	T	C	C	-	A	G	-	-

Tabla 4. Frecuencias de los haplotipos en las poblaciones de *Rhyncholestes raphanurus*. Se muestra el número de individuos secuenciados para cada caso.

Haplotipo	**Localidad**				
	La Picada (n=9)	*P N Puyehué (n=1)*	*Fundo El Venado (n=6)*	*Puerto Carmen (n=1)*	*Tantauco (n=2)*
H1	0,22	0	0	0	0
H2	0,11	0	0	0	0
H3	0,55	0	1	0	0
H4	0	1	0	0	0
H5	0,11	0	0	0	0
H6	0	0	0	1	0
H7	0	0	0	0	0,5
H8	0	0	0	0	0,5

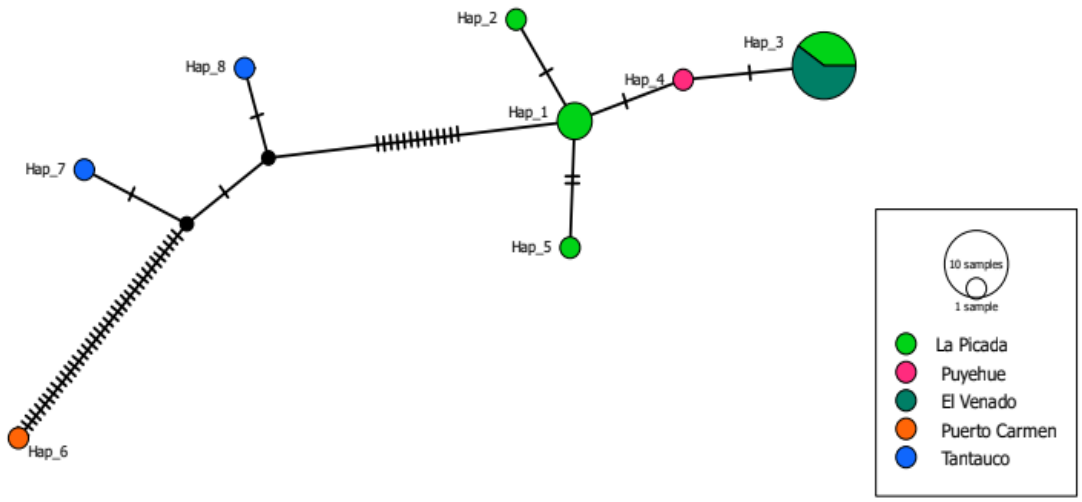

Fig 6. Red de haplotipos del gen Cyt b mitocondrial. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. Las líneas que los unen representan las conexiones entre ellos y cada línea transversal sobre las mismas un cambio mutacional.

La red de haplotipos (Fig. 6) indica que los haplotipos de las localidades continentales y de Palomar Fundo El Venado (norte de Chiloé) están estrechamente relacionados, mientras que los del sur de la isla habrían acumulado un número mucho mayor de diferencias, especialmente los de Puerto Carmen.

Estructura poblacional y reconstrucciones filogenéticas

El F_{ST} global para el primer agrupamiento con 3 grupos fue 0,53, con $p<0,005$, indicando estructura geográfica sustancial. El F_{ST} por pares más alto se encontró entre el Continente y Chiloé Sur, en donde los individuos se encuentran más alejados geográficamente (F_{ST}= 0,71, $p<0,01$; Tabla 5). Además, los valores del F_{ST} por pares también mostraron diferenciación genética entre Chiloé Norte y Chiloé Sur (F_{ST} = 0,65, $p<0,05$).

El segundo agrupamiento con dos grupos dio un F_{ST} global de 0,11, sin embargo este no fue significativo ($p>0,05$).

Los resultados del test de Tajima arrojaron valores negativos para todas las poblaciones pero estos no fueron significativos ($p>0,05$). El test de Fu dio valores negativos para el continente (p marginal a 0,05) para ambos agrupamientos, y positivo para Chiloé pero este último tampoco fue significativo ($p>0,05$) (Tablas 6 y 7).

Se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) exploratorio pero este no dio resultados coherentes debido a que no se disponía de más de una población para cada grupo definido, puesto que para Chiloé Norte todos los individuos provenían de una misma localidad (Fundo El Venado), por lo que estos resultados no se muestran en el trabajo.

Tabla 5. Por encima de la diagonal se muestran los valores de F_{ST} pareados entre individuos del Continente, Chiloé Norte y Chiloé Sur, por debajo de la diagonal se presentan los valores de *p* asociados a estas estimaciones.

	Continente	**Chiloé Norte**	**Chiloé Sur**
Continente	———	0,09	0,71
Chiloé Norte	0,23 ± 0,01	———	0,65
Chiloé Sur	0,004 ± 0,002	0,011 ± 0,003	———

Tabla 6. Pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F) con los valores de p asociados, para el primer agrupamiento, realizado con tres grupos.

	D	**p**	**F**	**p**
Continente	-0,99	0,20	-1,55	0,06
Chiloé Norte	0,00	1	-	-
Chiloé Sur	0,00	0,6	2,16	0,55

Tabla 7. Pruebas de neutralidad de Tajima (D) y Fu (F) con los valores de p asociados, para el segundo agrupamiento, realizado con dos grupos.

	D	**p**	**F**	**p**
Continente	-0,99	0,2	-1,55	0,06
Chiloé	-1,02	0,13	6,47	0,99

El árbol filogenético ML (Fig. 7) separó claramente a los individuos con un apoyo de bootstrap del 93% en dos grupos: los continentales y de Chiloé Norte y por otro lado a los del sur de Chiloé. Las reconstrucciones con el método Neighbor-Joining (Fig. 8) y Máxima Parsimonia (Fig. 9) también establecieron esta división. Se observan politomías en estos últimos para los individuos continentales debido a que se optó por colpasar el árbol a un mínimo de 50% de soporte de bootstrap, por lo que no fue posible resolver estas relaciones con la información disponible.

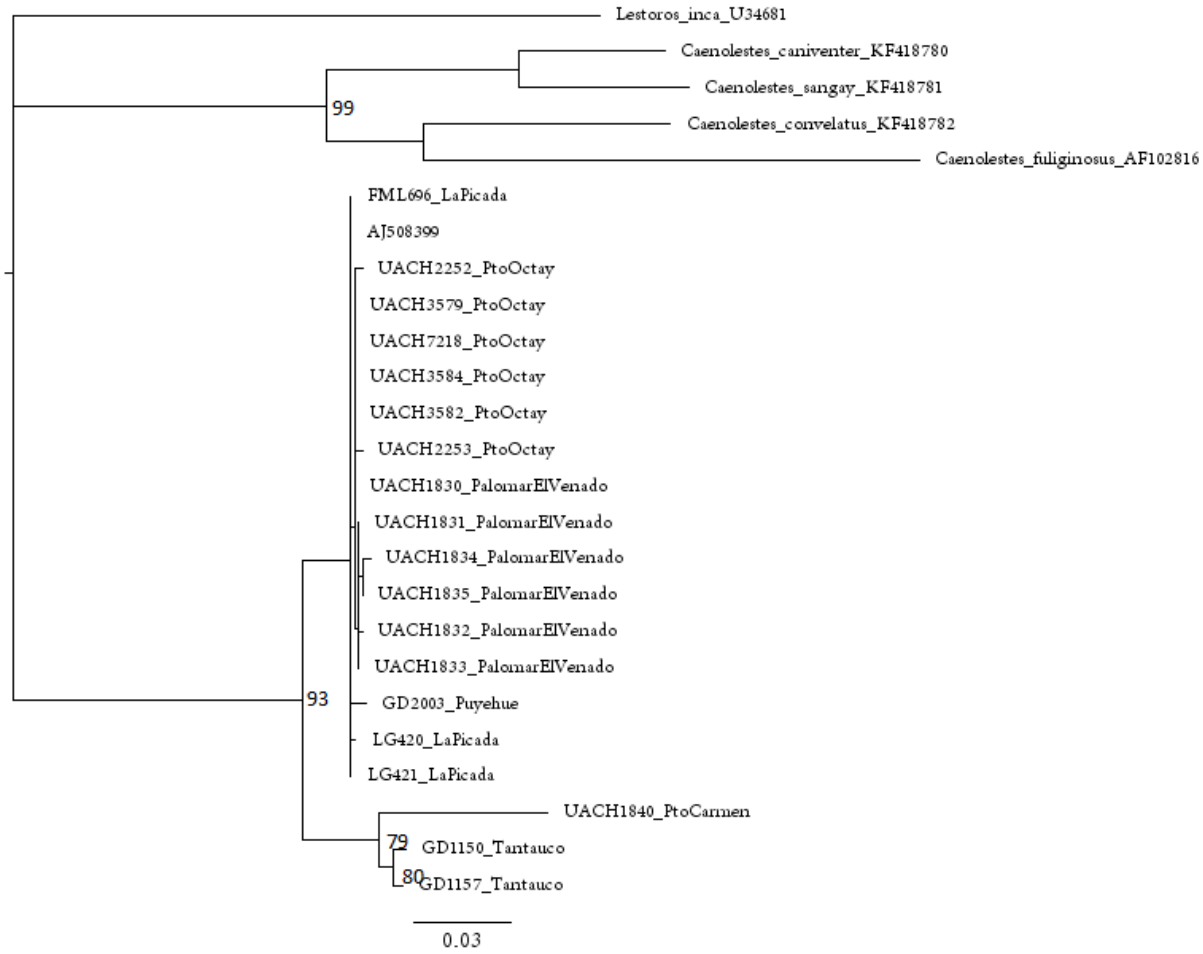

Fig 7. Árbol filogenético de máxima verosimilitud para los individuos de *Rhyncholestes raphanurus* estudiados. El grupo externo está formado por las cuatro especies de *Caenolestes* y *Lestoros inca*. Se muestran los valores de soporte del Ultrafast Bootstrap (1000 réplicas) más relevantes para este trabajo.

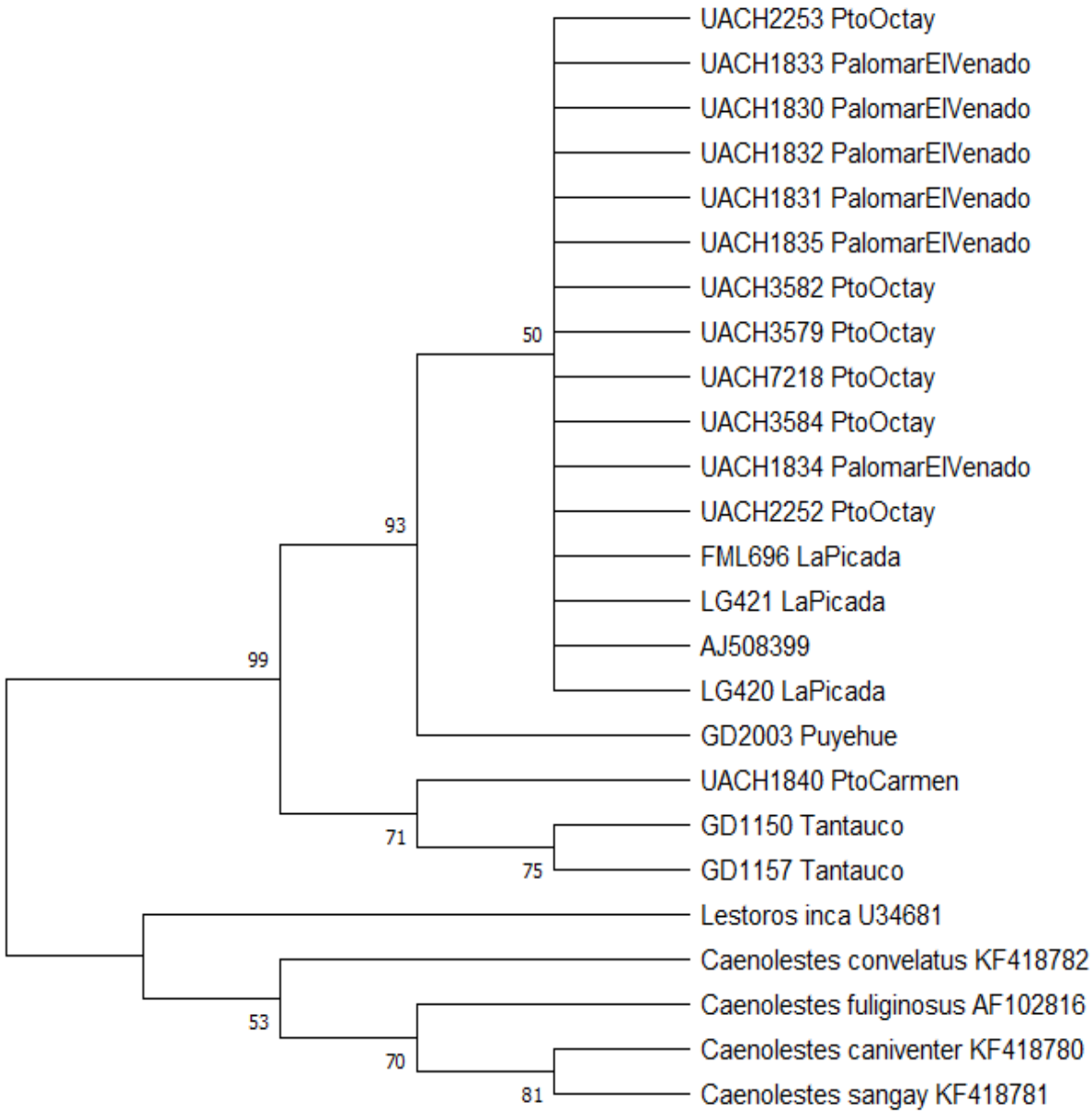

Fig 8. Árbol filogenético realizado bajo el método Neighbor-Joining, distancia de Kimura 2 parámetros.

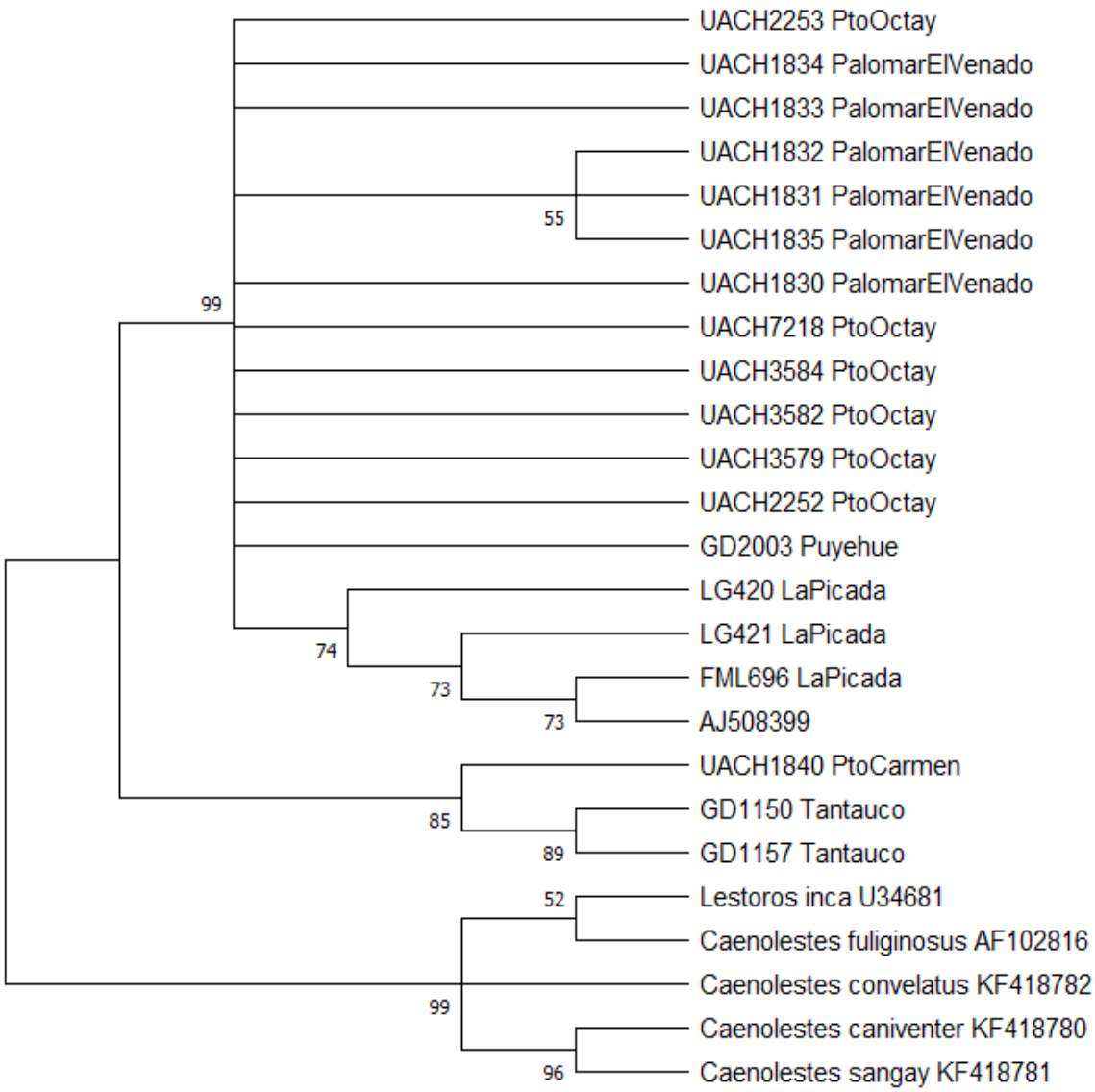

Fig. 9. Árbol filogenético realizado bajo el método Máxima Parsimonia. El grupo externo está formado por las cuatro especies de *Caenolestes* y *Lestoros inca*.

DISCUSIÓN

A pesar de la escasa representación actual y de ser uno de los pocos Paucituberculados vivientes, *Rhyncholestes raphanurus* conforma un relicto de este diverso grupo que constituyó uno de los componentes principales de la fauna de micromamíferos de comienzos del Neógeno (Bublitz, 1987), por lo que resulta necesario una adecuada estrategia de conservación. Para esto se deben realizar estudios de distintos aspectos de la especie. Este trabajo se focalizó en el nivel morfológico y genético, y dichos enfoques empleados proporcionaron información complementaria sobre la estructura poblacional de *R. raphanurus*. Por un lado, los análisis de morfometría geométrica cuantificaron la variación de forma en el cráneo de la especie a lo largo de su distribución geográfica en Chile. Los resultados obtenidos muestran cierta diferenciación entre individuos provenientes de las dos localidades continentales consideradas para estos análisis, La Picada y Parque Nacional Puyehué, así como también en comparación con los de la isla Chiloé. El CVA mostró separación de los tres grupos para los dos primeros componentes (Figs. 2 a 5), lo que se explica principalmente por diferencias en las dimensiones del cráneo; los pertenecientes a individuos de Chiloé son ligeramente más alargados y más bajos en relación a los de Parque Nacional Puyehué y, en menor medida, a los de La Picada.

Martin (2011) concluyó que la precipitación y las variables relacionadas con ésta parecen ser las que más contribuyen a los patrones de distribución de *Rhyncholestes raphanurus*. El Parque Nacional Puyehué presenta el menor nivel de precipitación promedio de las tres localidades. Por otra parte, La Picada exhibe un valor mayor que este pero menor que Chiloé. Esto podría provocar diferencias en los recursos a los que la especie accede. Se sabe que los cráneos más cortos implican mayores fuerzas de mordida y, por lo tanto, podrían indicar la masticación de alimentos más duros (Wroe & Milne, 2007). Lo anterior está en concordancia con las diferencias obtenidas en los presentes análisis, observándose un gradiente de un cráneo y hocico más corto para los individuos del Parque Nacional Puyehué y un alargamiento de estas estructuras en los pertenecientes a Chiloé.

De todas maneras, los análisis morfométricos realizados sobre los individuos de Chiloé corresponden únicamente a hembras, y los de Parque Nacional Puyehué solamente a machos (datos no mostrados). Con esto en consideración, las diferencias pueden también ser atribuidas a variación sexual. Por ejemplo, Wroe & Milne (2007), en un estudio de cráneos de carnívoros y marsupiales encontraron que existe una débil tendencia de los machos a tener hocicos más cortos que las hembras. Sin embargo, González *et al.* (2020) aseguraron que el dimorfismo sexual de *R. raphanurus* sólo estaría restringido a la forma del diente canino, y no al tamaño o la forma externa o craneodental. Por otro lado, tampoco se dispone de datos acerca de la madurez de los individuos; sumado a esto y frente al escaso número de ejemplares de Chiloé y Parque Nacional Puyehué disponibles para los análisis, resulta dificultoso afirmar si estas diferencias se deben a adaptaciones al ambiente, a la edad de los individuos o al sexo, aunque esto último sería descartado por resultados de medidas lineales de González *et al.* (2020) y morfométricas geométricas de Astúa (2010), que no encontraron un dimorfismo sexual de estas características.

En los estudios genéticos se encontraron 8 haplotipos para las 19 secuencias analizadas, la diversidad genética resultó moderadamente alta (0,67 - 67%). La diferenciación de *Rhyncholestes* entre localidades se reveló por los altos niveles de diversidad genética, medidos por la diversidad de haplotipos, un F_{ST} general alto y significativo (0,53) y por los valores altos de las estadísticas de F_{ST} por pares (de 0,65 y 0,71).

Se encontró que la variación del presente marsupial está principalmente estructurada geográficamente. La estructura genética sustancial en esta especie se puede deber en parte al aislamiento histórico en ambientes geográficamente desconectados; cuando el intercambio de individuos es reducido, la estructura poblacional, asociada a la poca dispersión, permite que los especímenes acumulen diferencias entre sus poblaciones (Kimura & Weiss, 1964). La región de Chiloé Sur mostraría una diversidad haplotípica más alta que el resto de las localidades, puesto que, a pesar del bajo número de individuos estudiados para esta región, cada uno representó un haplotipo distinto; mientras que para Chiloé Norte, por ejemplo, se encontró un único haplotipo, siendo que se contaba con el doble de individuos de esta zona para los análisis. De todas maneras, el grupo Chiloé Sur comprendió dos localidades separadas geográficamente (Puerto Carmen y Tantauco), pero los de Chiloé Norte

probablemente corresponden a individuos cercanamente colectados. Esto resulta contraintuitivo debido a que en el Último Máximo Glacial la región sur de Chiloé se encontró cubierta de hielo y la norte no, por lo que sería esperable una menor diversidad en el sur en comparación con el norte, si la especie efectivamente se hubiese dispersado desde esta última región hacia el sur de la isla. De todas maneras, dichos resultados también puede ser un artefacto del bajo número de individuos disponibles del sur de la isla para los análisis genéticos (uno proveniente de Puerto Carmen y dos de Tantauco). Por lo tanto, sería adecuado obtener más muestras de ejemplares disponibles en las colecciones para obtener una mayor representatividad de las distintas regiones de la isla. Además, resulta deseable plantear otras hipótesis alternativas, considerando que los resultados de este trabajo arrojan incongruencias sobre la fuente desde la que se colonizó el sur de la isla, existiendo la posibilidad de que no haya ocurrido directamente desde el norte, sino de otros posibles relictos de los cuales no se dispone de muestras u otros sitios donde la especie ya no está presente o se extinguió.

Otro aspecto a resaltar fue que el test de Fu estimó valores negativos para el continente, lo cual puede ser indicio de una reciente expansión poblacional.

Según los resultados de las filogenias fue posible inferir que probablemente el ejemplar AJ508399 del que no se contaba con la información de origen fue colectado en La Picada porque se ubicó dentro del grupo del Continente en todas las reconstrucciones, y agrupado junto con otros individuos de esta localidad específica.

De todas formas, la reconstrucción filogeográfica basada un único gen no necesariamente refleja la historia de la especie (Maddison, 1997), por lo que el uso de más genes podría arrojar resultados diferentes.

Por otro lado, la variación genética de una población está relacionada directamente con el tamaño efectivo de su población (Wright, 1951). A pesar de los esfuerzos de muestreo de *R. raphanurus* en muchas áreas que parecen adecuadas para la especie, no se han capturado especímenes desde hace aproximadamente dos décadas (Martin, 2011), lo que sugiere la naturaleza fragmentada del rango de la especie y sus bajas densidades locales. En el sector de La Picada se han determinado densidades de 0,3 a 0,8 individuos por hectárea; en ese mismo sitio y época, por ejemplo, la densidad de marsupiales y roedores varió de 5 a 28,6 individuos por hectárea. Muñoz-Pedreros & Palma (2009) plantean que su aparente rareza también podría deberse a deficiencias en el trampeo.

Finalmente, considerando los análisis morfométricos y genéticos no hay evidencia sólida de que las distintas poblaciones hayan desarrollado adaptaciones locales o morfotipos discretos, por lo que estos resultados apoyan la idea vigente de que *Rhyncholestes raphanurus* compone una única especie válida.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo están en concordancia con la hipótesis taxonómica actual de la especie, manteniéndose la falta de evidencia sólida para clasificarla en dos especies distintas. De todas formas, se presentaron ciertas incongruencias, sobre todo en la diversidad de haplotipos de los individuos de la región sur de Chiloé, que permiten plantear nuevas hipótesis acerca de la biogeografía histórica y expansión de estos marsupiales.

Rhyncholestes raphanurus ha sido clasificada como Casi Amenazada por la lista roja de la UICN en 2017, pero aún existe un gran desconocimiento de su verdadero tamaño, estructura y dinámica poblacional.

Se deberían realizar capturas no letales de la especie a lo largo de su rango de distribución, con el fin de obtener registros de su presencia en otras zonas además de los escasos parches ya conocidos. Martin (2011) afirma que pese a que en Chiloé las localidades registradas de distribución de este marsupial se concentran en el sur y en el oeste, la mayor parte de la isla tiene altos valores de predicción de potencial distribución, con un hábitat aparentemente adecuado. Con estos esfuerzos se contaría con un mayor número de muestras, y sumando a las ya disponibles en las colecciones científicas, sería posible realizar estudios más extensos, ampliando las localidades analizadas, para dilucidar de forma más robusta y detallada la estructura poblacional de la especie. El conocimiento de la estructura filogeográfica de las poblaciones fragmentadas es vital para la formulación de estrategias de conservación. Se considera que las principales amenazas para la especie son la pérdida y la degradación de hábitat, debido a la fragmentación del bosque nativo (Díaz & Teta, 2008). El manejo efectivo de especies amenazadas requiere de información del hábitat, estructura poblacional y las relaciones taxonómicas (Romero, 2010). La conservación de la diversidad genética es un requisito indispensable ya que de ella depende la supervivencia a largo plazo de la especie al permitir la adaptación a los cambios del ambiente. Con un conocimiento más profundo sobre numerosos aspectos de la especie, es más viable diseñar estrategias de conservación que la protejan del acelerado crecimiento de la actividad humana.

BIBLIOGRAFÍA

Adams, D. C., Rohlf, F. J., & Slice, D. E. (2004). Geometric morphometrics: Ten years of progress following the 'revolution'. *Italian Journal of Zoology*, 71(1): 5-16.

Adams, D.C., Rohlf, F. J. & Slice, D.E. (2013). A field comes of age: Geometric morphometrics in the 21st century. *Hystrix*, 24: 7-14.

Astúa, D. (2010). Cranial sexual dimorphism in New World marsupials and a test of Rensch's rule in Didelphidae. *J Mammal*, ;91:1011-24.

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*. viii + 447.

Avise, J.C. & Hamrick, J. L. (1996). Conservation Genetics: case histories from Nature. Chapman & Hall, New York, 512.

Bookstein, F. L. (1991). Morphometric tools for landmark data: geometry and biology. *Cambridge University Press*, 435.

Bookstein, F. L. (1996). Biometrics, biomathematics and the morphometric synthesis. *Bulletin of Mathematical Biology*, 58(2): 313-365.

Bublitz, J. (1987). Untersuchungen zur Systematik der rezenten Caenolestidae Treouessart, 1898: unter Verwendung craniometrischer Methoden. *Bonner Zoologische Monographien*, 23: 1-96.

Claude, J. (2008). Morphometrics with R. *Springer*.

Clement, M., Snell, Q., Walker, P., Posada, D. & Crandall, K. (2002). TCS: Estimating gene genealogies. Parallel and Distributed Processing Symposium, International Proceedings, 2, 184.

Colangelo, P., Loy, A., Huber, D., Gomerčić, T., Vigna Taglianti, A. & Ciucci, P. (2012). Cranial distinctiveness in the Apennine brown bear: Genetic drift effect

or ecophenotypic adaptation? *Biological Journal of the Linnean Society*, 107(1), 15-26.

D'Anatro, A. & Lessa, E. (2006). Geometric morphometric analysis of geographic variation in the Río Negro tuco-tuco, *Ctenomys rionegrensis* (Rodentia: Ctenomyidae). *Mammalian biology*, 288-298.

Díaz, M. & Teta, P. (2008). *Rhyncholestes raphanurus*. En: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.

Dryden, I. L., & Mardia, K. V. (1998). Statistical Shape Analysis. New York: John Wiley and Sons.

Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131: 479-491.

Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. (2005). Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 1: 47-50.

Freeland, J. (2003). *Molecular Ecology*.

González, B., Brook, F., & Martin, G. M. (2020). Variability and variation in *Rhyncholestes raphanurus* Osgood (Paucituberculata, Caenolestidae). *Revista Chilena de Historia Natural*, 93:1.

Goodall, C. R. (1991) Procrustes methods in the statistical analysis of shape. *Journal of the Royal Statistical Society B*, 53: 285-339.

Hewitt, G. M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, 359(1442):183-195.

Hoang, T., Chernomor, O., von Haeseler, A., Minh, B. Q. & Vinh, L. S. (2018) UFBoot2: Improving the ultrafast bootstrap approximation. *Mol. Biol. Evol.,* 35:518–522.

Jiménez, P. & Collada, C. (2000). Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación. I*nvestigación Agraria: Sistemas y Recursos Forestales, Fuera de Serie (Chile)*, 2: 237-248.

Kelt, D. A. (2000). Small mammal communities in rainforest fragments in central southern Chile. *Biological Conservation*, 92: 345-358.

Kelt, D. A. & Martínez, D. R. (1989). Notes on the distribution and ecology of two marsupials endemic to the Valdivian Forests of southern South America. J*ournal of Mammalogy*, 70: 220-224.

Kimura, M. & Weiss, G. H. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49(4): 561-576.

Klingenberg, C. (2011). MorphoJ: An Integrated Software Package For Geometric Morphometrics. *Molecular Ecology Resources*, 11(2): 353-357.

Kumar, S., Stecher, G. & Tamura, K. (2015). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0. *Molecular Biology and Evolution*.

Lawing, A. M. & Polly, P. D. (2010). Geometric morphometrics: recent applications to the study of evolution and development. *Journal of Zoology*, 280, 1-7.

Lessa, E. P., D'Elía, G. & Pardiñas U. F. J. (2010). Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Molecular Ecology*, 19: 3031-3037.

Loo, J. A. (2011). Manual de Genética de la conservación. Comisión Nacional Forestal. 1 ed. México.

López Galán, A. (2015). Morfometría geométrica: el estudio de la forma y su aplicación en biología. *Temas de Ciencia y Tecnología*, 19: 53-59.

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

Martin, G. M.. (2008). Sistemática, distribución y adaptaciones de los marsupiales Patagónicos. Ph.D. dissertation, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina. 2008.

Martin, G. M. (2011). Geographic distribution of *Rhyncholestes raphanurus* Osgood, 1924 (Paucituberculata: Caenolestidae), an endemic marsupial of the Valdivian Temperate Rainforest. *Australian Journal of Zoology,* 59: 118-126.

Mayr, E. (1963). Animal Species and Evolution. *Cambridge: Harvard University Press*.

Mayr, E. & O'Hara, R. J. (1986). The biogeographical evidence supporting the Pleistocene forest refuge hypothesis. *Evolution*, 40: 55-67.

Meserve, P. L., Lang, B. K., & Patterson, B. D. (1988). Trophic Relationships of Small Mammals in a Chilean Temperate Rainforest. *Journal of Mammalogy*, 4: 721-730.

Miller, S. A., Dikes, D. D., & Polesky, H. H. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16: 215.

Monteiro, L. R., dos Reis, S. F. (2000). Principios de Morfometria Geometrica. *Ribeira˜o Preto: Holos*, 188.

Muñoz-Pedreros, A. & Palma, R. E. (2009). Marsupiales, 53-65. En: Muñoz-Pedreros, A. & Yáñez, J. (eds). Mamíferos de Chile. Segunda Edición. Ediciones CEA, Valdivia Chile.

Patterson, B.D. (2007-2008). Genus *Rhyncholestes* Osgood, 1924. In: Gardner, A.L., ed. Mammals of South America, volume 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. *Chicago University Press*, 126–7.

Patterson, B. D., & Gallardo, M. H. (1987). Rhyncholestes raphanurus. *MAMMALIAN SPECIES*, 286: 1-5.

Pine, R. H., Miller, S. D. & Schamberger, M. L. (1979). Contributions to the mammalogy of Chile. *Mammalia*, 43: 339-376.

Roderick, G. K. (1996) Geographic structure of insect populations: Gene flow, phylogeography,and their uses. *Annual Review of Entomology*, 41: 325-352.

Rohlf, F. J., & Slice, D. (1990). Extensions of the Procrustes method for the optimal superimposition of landmarks. *Systematic Zoology*, 39: 40-59.

Romero, P. (2010). Filogeografía de *Systrophia helicycloides*: el reflejo de la dinámica del bosque lluvioso tropical en los genes 16S rRNA y COI de moluscos terrestres. Tesis para optar el grado académico de Magíster en Biología Molecular. Universidad Nacional Mayor de San Carlos.

Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S.E. & Sánchez-García, A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Mol. Biol. Evol.*

Serna-Lagunes, R., Clemente-Sánchez, F., Cortez-Romero, C., Becerril-Pérez, C. M., Ramírez-Herrera, C. & Salazar-Ortiz, J. (2015). La filogeografía aplicada en la conservación de fauna silvestre: revisión y resultados. *Agroproductividad,* 8(5): 34-41.

Spotorno, A. E., Marín, J. C., Yevenes, M., Walker, L., Fernández-Donoso, R., Pincheira, J, Berríos, S. & Palma, R. E. (1997). Chromosome divergences among American marsupials and the Australian affinities of the American Dromiciops. *Journal of Mammalian Evolution*, 4 (4): 259-269.

Trifinopoulos, J., Nguyen, L. T.,von Haeseler, A. & Minh, B. Q. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. *Nucleic Acids Res.*, 44:232-235.

Vázquez-Domínguez, E. (2007). Filogeografía y vertebrados. Ecología Molecular. Eguiarte, L.E., V. Souza y X. Aguirre (compiladores). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. Instituto Nacional de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. México: 441-466.

Villagrán, C., Moreno, P. & Villa, R. (1997). Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. En: Armesto, J.J., Villagrán, C.,

Arroyo, M.K., editores. Ecología de los bosques nativos de Chile. Santiago de Chile: Editorial Universitaria: 51-69.

Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annales Eugenics*, 15: 323-354.

Wroe, S. & Milne, N. (2007). Convergence and remarkably consistent constraint in the evolution of Carnivore skull shape. *Evolution*, 61(5), 1251-1260.

Young, A. G., Clarke, G. M., Cowlishaw, G. & Woodroffe, R. (2000). Genetics, demography and viability of fragmented populations (Conservation Biology). *Cambridge University Press*, 456.

Zelditch, M. L., Swiderski, D. L., Sheets, H. D. & Fink, W. L. (2004). Geometric morphometrics for biologists. *Elsevier* (Vol. 59).

ANEXO

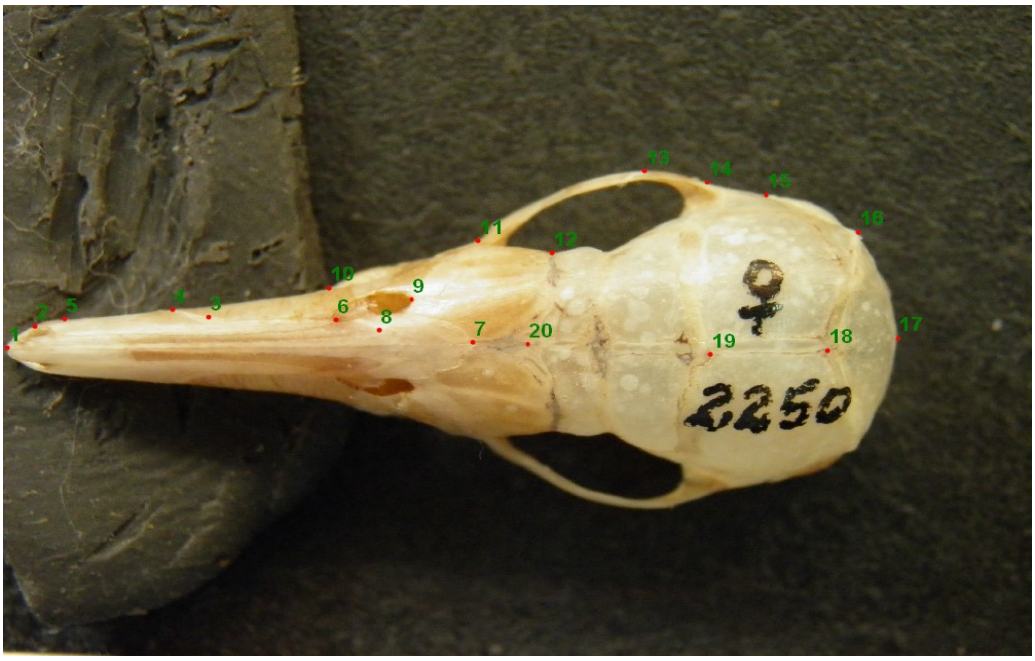

Fig 10. Puntos de referencia morfológicos definidos para la vista dorsal del cráneo de *Rhyncholestes raphanurus*.

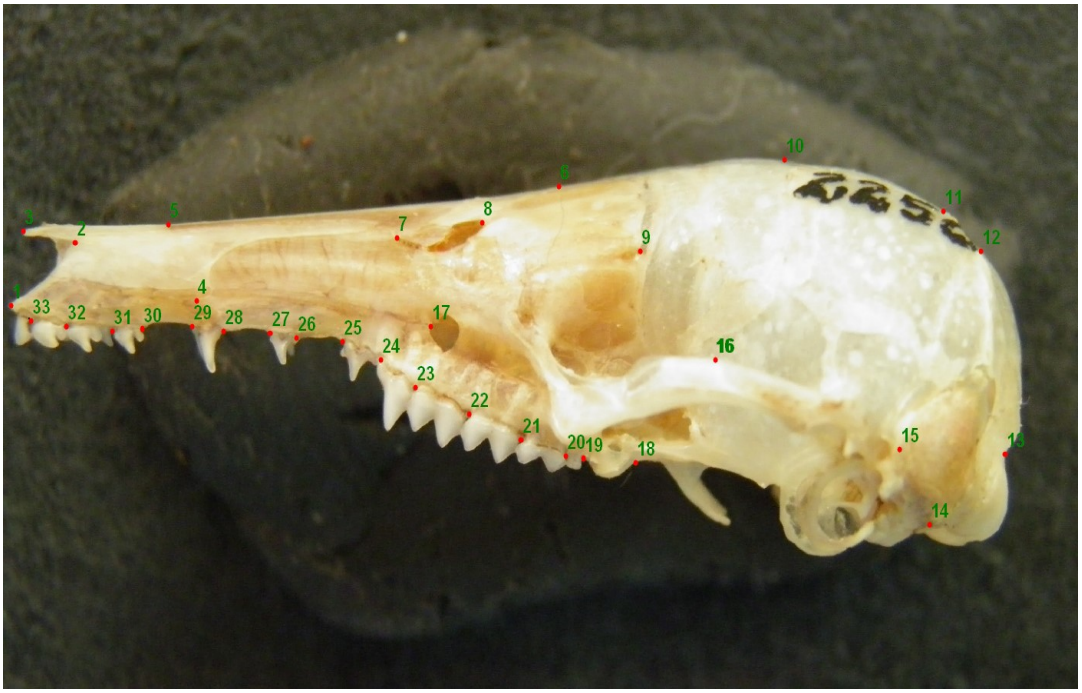

Fig 11. Puntos de referencia morfológicos definidos para la vista lateral del cráneo de *Rhyncholestes raphanurus*.

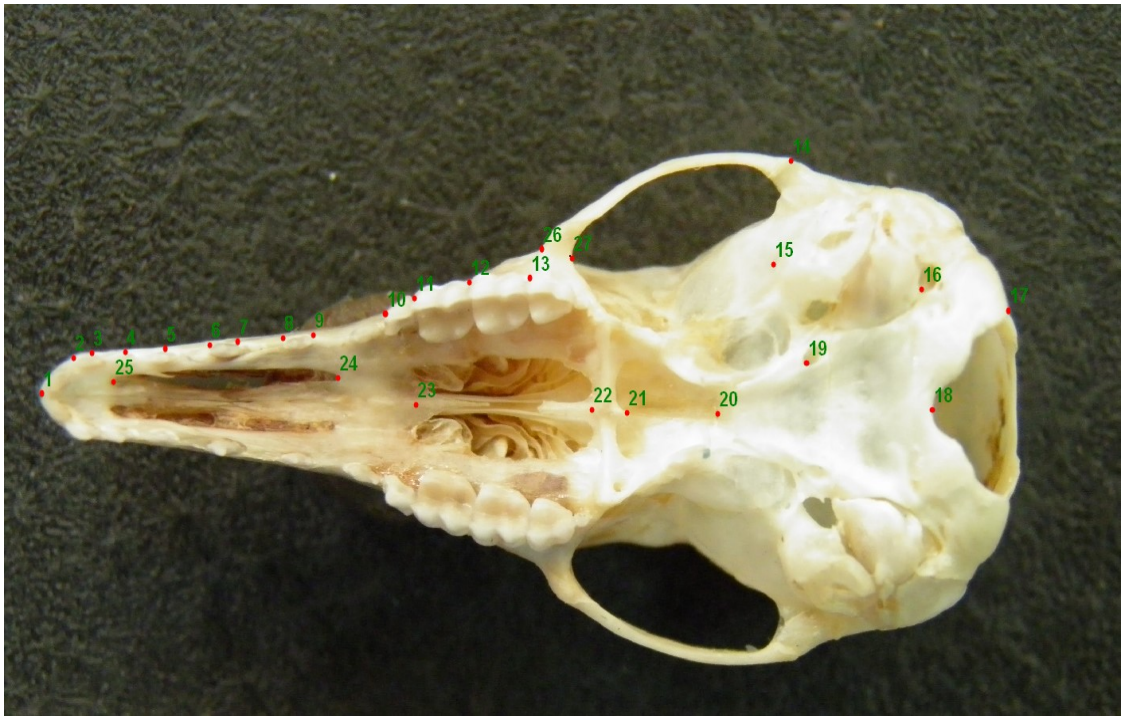

Fig 12. Puntos de referencia morfológicos definidos para la vista ventral del cráneo de *Rhyncholestes raphanurus*.

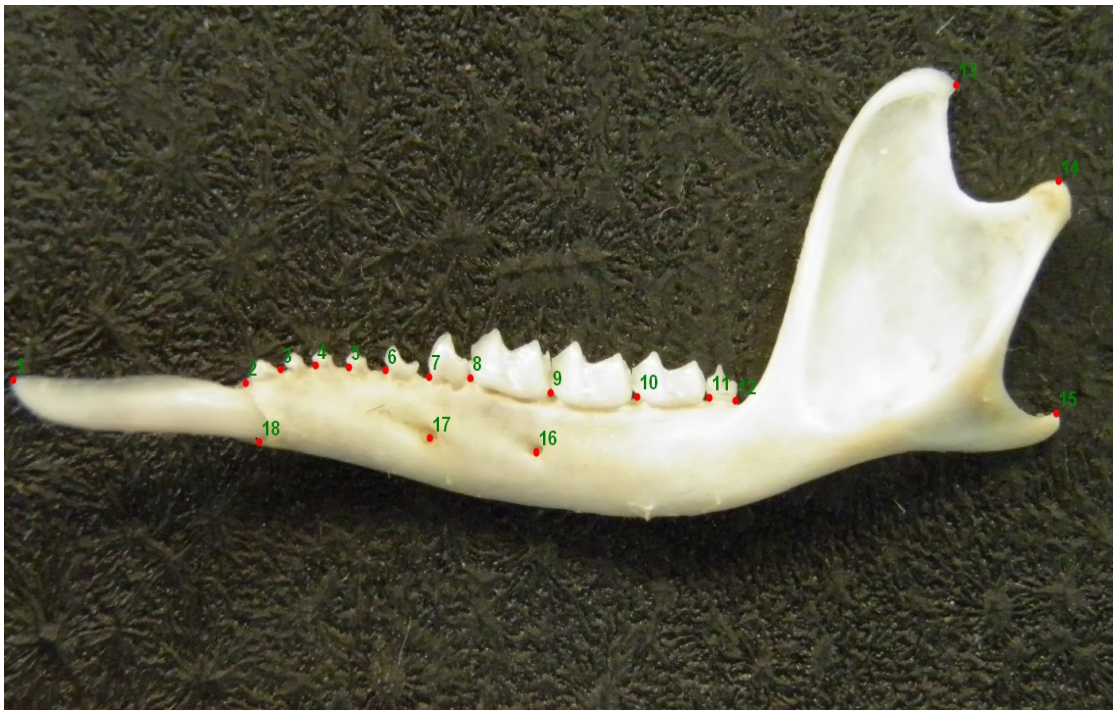

Fig 13. Puntos de referencia morfológicos definidos para la mandíbula de *Rhyncholestes raphanurus*.