



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas -Programa de Doctorado en Sistemática y Biodiversidad

Sistemática y biogeografía del género *Thylamys*: Implicancias para la filogeografía de *Thylamys elegans* (Didelphidae, Didelphimorphia), un Marsupial endémico de Chile Mediterráneo.

Tesis para optar al grado de Doctor en Sistemática y Biodiversidad

DUSAN VLADIMIR BORIC BARGETTO

CONCEPCIÓN-CHILE

2015

Profesor Guía: Cristián E. Hernández

Dpto. de Zoología, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

Universidad de Concepción

Esta tesis ha sido desarrollada en el Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la Universidad de Concepción.

Profesor Guía y Director de Programa: Dr. Cristián Hernández Ulloa

Profesor Coguía: Dr. Eduardo Palma Vásquez

Ha sido aprobada por la siguiente Comisión Evaluadora:



Dr. Juan Carlos Marín
(Evaluador externo)

Dr. Pedro Victoriano

Dedicatoria

Esta tesis está dedicada a mis dos mujeres: mi compañera de vida Angie Carolina Araos Tobar y mi hija Alenka Katarina Boric Araos

Agradecimientos

A mis tutores, Dr. Cristián Hernández Ulloa y Dr. Eduardo Palma Vásquez, por todo su apoyo, enseñanzas y consejos. Si no fuera por ellos no habría llegado a esta instancia. A Cristián por recibirme en su laboratorio, por sus agudos y siempre constructivos comentarios que me hicieron crecer como investigador. Al “profe” Palma por ser mi mentor y darme a conocer el mundo de la biología evolutiva y tenerme en su laboratorio en pregrado y volver a recibirme durante mi tesis doctoral. A ambos, les estaré eternamente agradecido por la paciencia que me han tenido. A mis compañeros del laboratorio de Filoinformática y Diversidad Molecular del Departamento de Zoología, a Jorge Avaria que me recibió en su casa cuando viajaba a Concepción. A Oscar Inostroza por sus comentarios y ayuda cuando la necesité en algún análisis y terreno y en especial en los análisis y figura 4 del capítulo 1. A Juan Pablo Jayat por su ayuda en el mapa (Fig 1) del capítulo 1. A Cristian Canales, Sandra Sarpentegui, Jessica Borquez, Sandra Ferrada, Alfonso Jara, Gloria Gallegos y Olivia Vergara. A Raúl Briones por su ayuda mediante Bioforest, a Caro Silva por el contacto con Daniel González Acuña. A Guillermo D’Elía, Pedro Victoriano, Nicolás Gouin y Luis Parra por sus enseñanzas en el Doctorado. A mis compañeros del Laboratorio de Biología Evolutiva del Departamento de Ecología de la Pontificia Universidad Católica. A Ricardo Cancino por toda su paciencia, ayuda y valiosos comentarios. A Patricio Zavala, curador de la Colección de Flora y Fauna ‘Profesor Patricio Sánchez Reyes’ (SSUC), Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de

Chile. A los equipos de terreno del proyecto Hantavirus y terrenos de proyectos del Dr. Palma que colectaron yacas. A los que me facilitaron muestras (Carlos Garín, Pablo Valladares, Fernando Torres-Pérez, Guillermo D'Elía y Daniel González-Acuña). A mi equipo de terreno (Claudio Correa, Dayana Vásquez, Oscar Inostroza) y en especial a Jaime Zúñiga y Álvaro Zúñiga. A Viviane Jerez por los años que fue la directora de mi programa. A la escuela de graduados de la Universidad de Concepción y Doctorado en Sistemática y Biodiversidad por su beca 100% eximición de arancel (2008-2012), beca de instructor (2008-2009) y beca de Doctorado Nacional CONICYT (2011). Al Servicio Agrícola Ganadero (SAG) por los permisos otorgados. A mis compañeros de vivienda en Concepción (Carlos Muñoz Ramírez, Eduardo Tejos y Diego Segovia) y a los compañeros del Doctorado en Sistemática y Biodiversidad y Magister en Zoología con los que compartí. A Fernando Torres-Pérez y Juan Carlos Ortiz por darme trabajo en la etapa de escritura de mi tesis. A mis compañeros del Laboratorio de Zoología, Epidemiología y Evolución del Instituto de Biología, Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, sede Curauma (Ricardo Campos, Gastón Carvallo, Benjamín Moreira, Tomás Ramírez y Franco Cianferoni). A la Universidad del Desarrollo por el trabajo como jefe de equipo de terrenos para Hantavirus (2013-2014). Al Ministerio de Bienes Nacionales por el terrero a la desembocadura del río Loa y personas que colaboraron en ese proyecto (Enrique Rodríguez, Magdalena Bennett y Andrés Meynard), en especial a Enrique y Andrés por tantos años de amistad. A mi familia, pareja e hija que me apoyaron durante estos años y me instaron a terminar esta tesis.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

RESUMEN GENERAL.....	7
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	8
CAPÍTULO 1.....	10
RESUMEN.....	10
INTRODUCCIÓN.....	10
MATERIALES Y MÉTODOS.....	14
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN.....	23
AGRADECIMIENTOS.....	31
LEYENDA DE FIGURAS.....	32
Figura 1.....	34
Figura 2.....	35
Figura 3.....	36
Figura 4.....	37
Figura 5.....	38
Tabla 1.....	39
Tabla 2.....	46
CAPÍTULO 2.....	47
RESUMEN.....	47
INTRODUCCIÓN.....	48
MATERIALES Y MÉTODOS.....	50
RESULTADOS.....	55

DISCUSIÓN.....	55
LEYENDA DE FIGURA.....	57
Figura 1.....	58
Tabla 1.....	59
CAPÍTULO 3.....	61
RESUMEN.....	61
INTRODUCCIÓN.....	62
MATERIALES Y MÉTODOS.....	64
RESULTADOS.....	74
DISCUSIÓN.....	79
LEYENDA DE FIGURAS.....	94
Figura 1.....	96
Figura 2.....	97
Figura 3.....	98
Figura 4.....	99
Figura 5.....	100
Figura 6.....	101
Tabla 1.....	102
Tabla 2.....	105
CONCLUSIÓN GENERAL.....	106
BIBLIOGRAFÍA.....	107



Resumen general

Dado que la familia Didelphidae constituye el único grupo diverso de mamíferos actuales que descende de la fauna Terciaria original de Sudamérica, resolver los conflictos sistemáticos de ésta es fundamental para comprender la historia evolutiva de los mamíferos neotropicales. En el presente estudio se evalúan las hipótesis filogenéticas y biogeográficas del género *Thylamys* con el fin de aportar al entendimiento del origen y diversificación del marsupial endémico de Chile Mediterráneo *Thylamys elegans*. Los resultados confirman la monofilia del género y a *T. karimii* y *T. velutinus* como especies basales. Se encuentra una especie nueva de los Andes de Perú, hermana a *T. tatei*. Se valida a *T. sponsorius*, *T. cinderella* y *T. tatei* y haplogrupos de *T. pusillus*. El género diverge en el Oligoceno tardío, diversificando desde el Mioceno temprano al Plioceno, con expansión hacia áreas contiguas y un evento vicariante. Se valida a *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis*, ampliando la distribución de esta última a la costa de la región de Coquimbo y Atacama. *T. elegans* se estructuraría en seis subespecies: *T. e. elegans*, *T. e. coquimbensis*, tres variantes no descritas (Loa, Aconcagua y Sur 1) y Sur 2 que podría ser *T. e. soricinus*. Se determina las áreas biogeográficas ancestrales de las seis subespecies y se propone un escenario biogeográfico para su diversificación, donde los ríos habrían jugado un papel fundamental: el río Mataquito y Teno como evento vicariante estructurando las subespecies Sur 1 y Sur 2; el río Quilimarí como barrera a la dispersión sur en *T. e. coquimbensis*; y río Aconcagua en el origen de la subespecie Aconcagua. Sin embargo, las montañas de la región de Coquimbo y cordón de Chacabuco también habrían sido importantes barreras a la dispersión sur de *T. e. coquimbensis* y la subespecie Aconcagua. Finalmente, la historia evolutiva de *T. elegans* fue gobernada por dispersión a gran distancia, expansión hacia

áreas contiguas y un evento vicariante, favorecido por el avance y retroceso de la vegetación y cambio del cauce de ríos durante las glaciaciones del Plioceno y Pleistoceno.

Introducción general

La familia Didelphidae, es una de las más numerosas de los mamíferos neotropicales (Gardner 2008), siendo el único grupo diverso de mamíferos actuales que descende de la fauna Terciaria original de Sudamérica (Jansa *et al.* 2014). Por lo tanto, resolver los conflictos sistemáticos de esta familia y de algunos de sus géneros y especies es de suma importancia para entender la historia evolutiva de los mamíferos neotropicales. La taxonomía en didélfidos ha sido dinámica en las últimas décadas. El número de especies reconocidas ha aumentado de 69 a 94 en 12 años (Gardner 1993, 2005). Este aumento se debe a la descripción de nuevas especies, o a revisiones de especies de amplia distribución, que se concluye que son especies politípicas (Agrizzi *et al.* 2012). Revisiones sistemáticas de Didelphidae han resultado en la descripción de nuevos géneros como *Chacodelphys* y *Cryptonanus* (Voss *et al.* 2004a, 2005). Dado la gran diversidad de este grupo, es importante realizar nuevos estudios sistemáticos para aclarar los orígenes, relaciones evolutivas y diagnosis de sus especies (Patton & Costa 2003). Recientemente, varios estudios filogenéticos basados en genes mitocondriales, nucleares y caracteres morfológicos se han realizado en didélfidos (Jansa & Voss 2000; Voss & Jansa 2003; Voss *et al.* 2004b; Jansa & Voss 2005; Voss & Jansa 2009), siendo la base para hacer inferencias del tiempo y modo de evolución de la diferenciación de este grupo.

En *Thylamys*, su sistemática y biogeografía se evaluó recientemente (Giarla *et al.* 2010; Giarla & Jansa 2014; Giarla *et al.* 2014, Palma *et al.* 2014; Giarla & Jansa 2015). Sin embargo, quedan conflictos taxonómicos por resolver en algunas especies del género como

T. elegans (Palma *et al.* 2014). Este trabajo, encuentra dos clados separados por el río Maipo y sugiere un rol de dicho río en la estructura filogeográfica de *T. elegans*.

Existen algunos conflictos taxonómicos sobre la validez de algunas especies del género *Thylamys* y subespecies de *T. elegans*, como la sinonimia de *T. e. coquimbensis* a *T. pallidior*. Esto sugiere que la diversidad interespecífica del género *Thylamys* e intraespecífica de *T. elegans* no está resuelta. Esto se debe a una falta de análisis filogenéticos con todas las especies del género y un muestreo denso en toda la distribución de *T. elegans*, incluyendo localidades tipo. Hipotetizo que algunos ríos de Sudamérica actuaron como evento vicariante o barrera a la dispersión, cumpliendo un rol estructurador en la diversidad genética de *Thylamys*, generando taxa distinguibles por su diferenciación genética y asignables a especies del género y subespecies de *T. elegans*.

Esta tesis doctoral consta de tres capítulos: 1) evalúa las relaciones filogenéticas y biogeográficas del género *Thylamys* y compara los resultados obtenidos con la hipótesis filogenética propuesta por Giarla *et al.* (2010). Además, evalúa el escenario biogeográfico para la diferenciación del género y estima el tiempo de divergencia de sus especies (publicado en *Zoologica Scripta*, Palma *et al.* 2014); 2) evalúa la validez de *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis* y determina si las yacas de los valles de Coquimbo corresponden a *T. pallidior* o *T. e. coquimbensis* (pronto a someter en *Zootaxa*) y 3) evalúa el rol del río Maipo y otros ríos de Chile mediterráneo en la estructura genética de *T. elegans* y discute el rol de algunos ríos y montañas como factores determinantes en la historia evolutiva de *T. elegans*. Se discuten las implicancias taxonómicas de las seis subespecies encontradas para *T. elegans* y se propone un escenario biogeográfico para su diferenciación (enviado a *Zootaxa*).

Capítulo 1

Molecular phylogenetics of mouse opossums: new findings on the phylogeny of *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae). Palma *et al.* (2014). *Zoologica Scripta*, 43, 217-234.

ABSTRACT

The mouse opossums of the genus *Thylamys* constitute a group of species mainly adapted to open xeric-like habitats and restricted to the southern portion of South America. We used molecular data (mitochondrial and nuclear sequences) to evaluate the phylogenetic and biogeographical relationships of all currently known living species of the genus, recognizing a new taxon from the middle and high elevations of the Peruvian Andes and evaluating the phylogenetic structuring within *T. pallidior* and *T. elegans*, as well as the validity of *T. sponsorius*, *T. cinderella* and *T. tatei*, and the haplogroups recognized within *T. pusillus*. Our results confirm the monophyly of the genus and that the Caatinga and the Cerrado inhabitants *Thylamys karimii* and *T. velutinus* are the most basal species in the radiation of *Thylamys*. We also calibrated a molecular clock which hypothesized a time of origin of the genus of about 24 My, with most species differentiating in middle and late Miocene and Plio-Pleistocene times of South America.

Introduction

Mouse opossums are all mouse-sized marsupials inhabitants of the Neotropical region distributed between Mexico and southern Argentina. One of the pioneering works on mouse opossums was Tate's (1933) revision of the genus *Marmosa* (Didelphidae) *sensu lato*, recognizing five species groups based on morphology, later classified as the genera *Marmosa* (*sensu stricto*), *Micoureus*, *Marmosops*, *Gracilinanus* and *Thylamys* (Creighton

1984; Reig *et al.* 1985, 1987; Gardner & Creighton 1989). However, new revisions of the former taxa (Voss *et al.* 2004, 2005; Voss & Jansa 2009) incorporated novelty genera such as *Chacodelphys* and *Cryptonanus* that together with *Gracilinanus*, *Marmosops*, *Lestodelphys* and *Thylamys* comprise the tribe Thylamyini (Voss & Jansa 2009).

Thylamys Gray, 1843 characterizes by its southern or subequatorial distribution in South America, being predominantly a semi-xeric habitat form (Flores *et al.* 2000). *Thylamys* species are of small size (head and body 75-147 mm, tail 65-161 mm; Gardner 2008), lack a marsupium, have nocturnal habits and an arboreal life, and they can be found in the most diverse open-like South American biomes such as Coastal Desert, Puna, Monte Desert, Pampas, Patagonia, Chaco, Caatinga and Cerrado (Palma *et al.* 2002; Gardner 2008; Giarla *et al.* 2010; Formoso *et al.* 2011). However, some species are inhabitants of dense forests such as the temperate forests of the Yungas and the subtropical Atlantic Forests of Paraguay (Flores *et al.* 2007). The tail of most species seasonally becomes thickened (incrassation) with fat deposits particularly in winter seasons (Mann 1978; Gardner 2008). Regarding number of species, recent propositions based on morphology and molecular phylogenetics have recognized between nine and 13 species (see below; Braun *et al.* 2005; Gardner 2005, 2008; Martin 2009; Teta *et al.* 2009; Voss & Jansa 2009; Giarla *et al.* 2010), but new taxa are in need of formal description.

The fossil record of *Thylamys* dates from the Pliocene (Montehermosan; Mones 1980; Reig *et al.* 1985), but recent revisions date back this taxon from the Huayqueran (late Miocene) of Cerro Azul Formation, Argentina (Goin 1997; Goin *et al.* 2000). The origin of *Thylamys* has been ascribed to have occurred via peripheral isolates from ancestral forms in the eastern Andes (Palma *et al.* 2002). Regarding phylogenetic relationships of *Thylamys*, the genus seems to constitute a monophyletic group (Palma *et al.* 2002; Braun *et al.* 2005;

Voss & Jansa 2009; Giarla *et al.* 2010), and its sister taxon is the Patagonian mouse opossum *Lestodelphys halli* (e.g. Kirsch & Palma 1995). At the beginning of 2000s, few studies considered molecular phylogenetic data to evaluate the origin and relationships of *Thylamys*, and most of them included approximately half of currently recognized species. Palma *et al.* (2002) phylogeny included five species of *Thylamys* based on cytochrome *b* sequences concluding that *T. macrura* from the subtropical forests of Paraguay would be the predecessor from which other species radiated and that the sister taxa *T. elegans* (Coastal Desert) and *T. pallidior* (Puna, Monte and Patagonia) would be the most derived forms within the genus. Similar conclusions to the latter study were obtained by Braun *et al.* (2005) using the same molecular marker. In addition, the latter study recovered two subclades within *T. pallidior*, one from the Puna or Altiplano in the Andes which they called '*T. pallidior* north', and the other from the Argentinean Patagonia that Braun *et al.* called '*T. pallidior* south'. According to these authors, these two clades would represent two subspecies of *T. pallidior*. Braun *et al.* (2005) also validated *T. cinderella* from the Yungas of Argentina as different from *T. venustus* of Bolivia and recognized *T. tatei* as a valid species (previously validated by Solari 2002) from Peru, although not to *T. sponsorius* that would be sinonim with *T. cinderella*. Flores *et al.* (2000) stated that *T. sponsorius* could not be distinguished from *cinderella* based on colour pattern, but they can be differentiated based on cranial features. A recent revision of marsupials from the Neotropics considered *T. sponsorius* as a valid species based on information available on morphology (Gardner 2008). More recently, another molecular study that included *T. karimii* from the Brazilian Caatinga and Cerrado recovered the latter as basal to a clade that joined *T. pusillus* (*T. elegans*-*T. pallidior*) (Carvalho *et al.* 2009).

Other more specific revisions have used morphologic and/or molecular data to evaluate the variation observed in some particular taxa. Teta *et al.* (2009) based on morphology and *cyt b* sequences recognized a complex of three taxa within *T. pusillus*: *T. pusillus sensu stricto* restricted to the Bolivian and Paraguayan Chaco, *T. citellus* restricted to the Argentinean provinces of Corrientes and Entre Ríos, and *T. pulchellus* inhabitant of the dry Argentinean Chaco. In addition, Martin (2009) based on cranial and body characters recognized as *T. fenestrae* several specimens from the Pampas and Espinal ecoregions in Argentina, formerly classified as *T. elegans* and *T. pallidior*. Finally, a recent publication by Giarla *et al.* (2010) included most of the currently known species, to the exception of *T. cinderella* (recognized as a full species by Gardner 2008). Giarla *et al.* (2010) study based on mitochondrial DNA sequences and morphology, recognized nine species of *Thylamys* in two subgenera: *Xerodelphys* (new subgenus) for *T. karimi* and *T. velutinus*, and the subgenus *Thylamys (sensu stricto)* for *T. macrurus* and *T. pusillus*, as well as five other species in two monophyletic groups ('groups' based on morphology): the *elegans* group (*T. elegans*, *T. pallidior* and *T. tatei*) and the *venustus* group (*T. sponsorius* and *T. venustus*).

This study was focused to evaluate the phylogenetic and biogeographical relationships of the genus *Thylamys*, with particular attention to the new classification schema proposed by Giarla *et al.* (2010). In addition, we report the existence of a new species of *Thylamys* from the Andes of Peru, evaluated the phylogenetic structuring within *T. pallidior* and *T. elegans*, as well as the validity of *T. sponsorius*, *T. cinderella* and *T. tatei* and the haplogroups recognized within *T. pusillus*. Finally, we hypothesize a biogeographical scenario for *Thylamys* differentiation and calibrated a molecular clock to propose times of origins for the species of the genus.

Material and methods

Tissues and specimens analysed

Voucher specimens for sequenced individuals were deposited in the Colección de Mamíferos del Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Chubut, Argentina (CNP); Colección de Flora y Fauna ‘Profesor Patricio Sánchez Reyes’ (SSUC), Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile; the Museum of Southwestern Biology (MSB), Department of Biology, University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico; Programa de Investigaciones de Biodiversidad Argentina (PIDBA), Instituto Miguel Lillo, Universidad Nacional de Tucumán, Tucumán, Argentina; Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional de San Agustín de Arequipa (MUSA), Arequipa, Perú; Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú (MUSM); Texas Tech University, Natural Science Research Laboratory/Mammals, Lubbock, Texas (TK); Oklahoma Collection of Genomic Resources, Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History (OCGR); field catalogs of Fernando Alfaro (FDA), L. Ignacio Ferro (LIF), Randy Gladwell (RRG), Jorge Pablo Jayat (JPJ), Marcela Nabte (MN), R. Eduardo Palma (EP), Ulyses Pardiñas (UP, AC), Enrique Rodríguez-Serrano (ER), Horacio Zeballos Patrón (HZP). Tissues and other data associated with each specimen were cross-referenced directly to each voucher specimen and stored in the collection using a special field catalog number, the NK number used by the SSUC and MSB. A detailed list of the specimens sequenced per locality is given in Table 1. We followed the American Society of Mammalogists guidelines during the collection and handling of all animals used in this work (Sikes *et al.* 2011).

Nucleotide sequence analyses

DNA was extracted from frozen liver samples treated with the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin). The complete cytochrome *b* mitochondrial gene (*cyt b*; 1144 bp) was amplified for 70 individuals representing 52 localities (Fig. 1). In addition, we included 33 *cyt b* sequences from additional 31 localities that were available from the GenBank (see Table 1). We also amplified the nuclear transthyretin intron 1 (TTR; 1058 bp) for 27 of the above 84 individuals from 19 localities. Primers used to amplify the *cyt b* gene were 14724 (L—Irwin *et al.* 1991) and LBE13 (5' TTG TTG GCT TAC AAG GCC AGT 3'), using the following thermal cycle protocol: initial denaturation for 8 min at 95 °C, followed by 30 cycles of 94 °C (1 min 30 s), 46 °C (45 s) and 72 °C (1 min 30 s). A final extension at 72 °C for 8 min terminated the reaction. Primers to amplify the TTR were the MP1 (forward) y MM2 (reverse) (Duan *et al.* 1995; Aldred *et al.* 1997), and the thermal cycle was performed using the following protocol (modified from Aldred *et al.* 1997): initial denaturation for 3 min at 94 °C, followed by 30 cycles of 94 °C (30 s), 65 °C (30 s) and 72 °C (1 min). The final extension was at 72 °C for 3 min. Doublestranded PCR products were purified with Qiaquick (Qiagen, Valencia, California). Cycle sequencing (Murray 1989) was performed using primers 14724, LBE13 and 15162 (Irwin *et al.* 1991) for the *cyt b* gene and MP1, MM2, MP5 y MM6 (Steiner *et al.* 2005) for the TTR intron, labelled with the Big Dye Terminator kit (Perkin Elmer, Norwalk, Connecticut). Sequencing reactions were analysed on an Applied Biosystems Prism 3100 (Foster City, CA, USA) automated sequencer. Sequences were aligned using the CLUSTAL X program (Thompson *et al.* 1997) and by eye. All sequences have been deposited in GenBank, and accession numbers for both *cyt b* and TTR sequences are given in Table 1.

Phylogenetic analyses

Phylogenetic analyses were conducted using maximum parsimony, maximum likelihood and Bayesian methodology on the *cyt b*, TTR and concatenated *cyt b*-TTR sequences. For parsimony analysis congruence between *cyt b* and TTR, data sets were tested using the partition homogeneity test (Farris *et al.* 1994) implemented in PAUP* 4.0 b10 (Swofford 2002) with 1000 replicates excluding invariant characters (Cunningham 1997). Phylogenetic trees were rooted with the outgroup criterion using the outgroups of *Thylamys*, *Lestodelphys halli* (Kirsch & Palma 1995) and *Marmosops impavidus*. Outgroups for the concatenated *cyt b*-TTR analysis also included *L. halli* and a chimerical sequence assembled from two different specimens (see Table 2 for GenBank accession numbers). For maximum parsimony (MP), we used PAUP* 4.0 b10 (Swofford 2002), treating all characters as unordered with four possible states (A, C, G, T) and using only those characters that were phylogenetically informative. For parsimony, a heuristic search was performed with 100 random additions and branch swapping via treebisection-reconnection (TBR—Nei & Kumar 2000). A strict consensus tree was estimated when more than one equally parsimonious tree was obtained, and we obtained the consistency index (CI) and the retention index (RI) for the most parsimonious tree. The reliability of nodes was estimated by nonparametric bootstrap (Felsenstein 1985) with 1000 pseudoreplications. Maximum likelihood (ML) searches were performed with the Treefinder version of October 2008 (Jobb 2008). We selected the best fitting model of nucleotide substitution using the corrected Akaike Information Criterion (AICc—Akaike 1974) in Treefinder. We evaluated support for the nodes with 1000 bootstrap replicates (Felsenstein 1985). For *cyt b* sequences, the AICc identified the GTR + I + Γ model (Tavaré 1986) as the best model of base substitution. The proportion of invariable sites

value was 0.5520, and the gamma shape parameter was = 1.7661. The proportions of nucleotides were A = 0.2806, C = 0.2867, G = 0.1287 and T = 0.3038. For the concatenated sequences, the AICc identified the GTR + Γ (Tavaré 1986) as the substitution model. The gamma shape parameter was 0.1116, and the proportions of nucleotides were A = 0.3003, C = 0.2306, G = 0.1504 and T = 0.3185. Sequences also were analysed in a Bayesian framework to estimate the posterior probabilities of phylogenetic trees. Ten million phylogenetic trees were generated, sampling every 1000 trees to assure that successive samples were independent. The first 1000 trees of the sample were removed to avoid including trees before convergence of the Markov Chain. Given that we used two independent molecular markers, we applied a general likelihood-based mixture model (MM) as described by Pagel & Meade (2004, 2005), based on the general time-reversible (GTR) model (Rodríguez *et al.* 1990) of sequence evolution. This model accommodates cases in which different sites in the alignment evolved in qualitatively distinct ways but does not require prior knowledge of these patterns or partitioning data. These analyses were conducted using the BayesPhylogenies software (<http://www.evolution.reading.ac.uk/BayesPhy.html>). To find the best mixture model of evolution, we estimated the number of GTR matrices using a reversible-jump Markov Chain Monte Carlo method (RJMCMC—Pagel & Meade 2006). The RJMCMC visits the different mixtures of GTR matrices in proportion to their posterior probabilities, ‘jumping’ from simple to complex models or vice versa, making a direct estimate of the support of 1GTR, 2GTR, 3GTR, and so on. Only the combination of matrices with the fewest number of parameters that significantly increased the likelihood was used (1GTR + Γ for cytochrome *b* data; 2GTR + Γ for concatenated data) to compute a 50% majority rule consensus tree. The percentage of samples that recover any particular clade on this tree represents the posterior probability of

that clade; these are the P values, and $P \geq 95\%$ was considered evidence of significant support for a clade (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Finally, and to compare our results with previous studies of didelphid *cyt b* variation (e.g. Patton *et al.* 1996; Giarla *et al.* 2010), we computed the Kimura-2-Parameter (K2P) among pairwise sequences of *Thylamys* spp.

The divergence times of *Thylamys* spp. were estimated using BEAST 1.6.2 software (Drummond & Rambaut 2007). As prior information, we used a GTR + Γ + I model of sequence evolution, the Yule process of speciation, and two points of fossil calibration: (i) *Thylamys pinei* from the Huayquerian (Cerro Azul Formation) of La Pampa, Argentina (9-6,8 My, upper Miocene; Goin *et al.* 2000), with affinities to *T. venustus*; and (ii) *Thylamys contrerasi* from the Montehermosan (Monte Hermoso Fm.) of Buenos Aires, Argentina (4-5 My, early Pliocene; Deschamps *et al.* 2012), with affinities to *T. pusillus*. These fossil points were treated as soft bonds and represented as a normal distributions. The 95% of the prior probabilities represent the whole SALMA age where the fossil was dated (i.e. *T. pinei* 7.5-2.3 My; *T. contrerasi* 5-4 My). Analyses were based on two models of mutation rate: an uncorrelated lognormal relaxed clock and an uncorrelated exponential relaxed clock. To find the best molecular clock model, we used Bayes factor to compare the two clock models. The MCMC chain was run for 20000000 generations (10000 generations were discarded as burn in, before the posterior probability distribution of the model converged), with parameters sampled every 10000 steps. Examination of MCMC samples using TRACER v1.5 software (Rambaut & Drummond 2007) suggested that the independent chains were each adequately sampling the same probability distribution and that effective sample sizes for all parameters of interest were > 500 .

*Ancestral distribution of *Thylamys**

We used the package BioGeoBEARS ('BioGeography with Bayesian Evolutionary Analysis in R Scripts'; Matzke 2013a; <http://cran.r-project.org/web/packages/BioGeoBEARS/index.html>) to reconstruct the ancestral distribution of each node of our *cyt b* calibrated phylogenetic hypothesis of *Thylamys*, with the intraspecific diversity collapsed. Specifically, we used the DEC (dispersal-extinction-cladogenesis; Ree & Smith 2008) and DEC + J (Matzke 2013a, b) model to obtain a probability distribution of the most probable ancestral areas. The DEC model has two free parameters, *d* (dispersal rate, *i.e.* the rate of range addition along a phylogenetic branch) and *e* (extinction rate, *i.e.* the rate of local range loss along a phylogenetic branch); and the DEC + J model has three free parameters, *d*, *e* and *j* (*i.e.* weighting factor for jump dispersal or founder-event speciation). For this analysis, we recorded the exact geographical distribution of *Thylamys* species included in the phylogenetic analysis. For this, we made an exhaustive literature search, and then we coded species distribution according to the ecoregions recognized by Morrone (2002, 2006). We used the "Likelihood Ratio Test" (LRT) to select the best fit model to generate the output of the biogeographical events and most probable areas of ancestral distribution.

Results

Phylogenetic relationships

All trees based on *cyt b* sequences recovered the same relationships among *Thylamys* taxa; thus, we show a single tree with bootstrap and posterior probability values for parsimony, likelihood and Bayesian phylogenies (Fig. 2). The maximum parsimony analysis recovered 384 trees, 1784 steps long, CI = 0.3700 (excluding uninformative characters), RI = 0.3223.

Of a final *cyt b* matrix with 1149 characters, 430 were parsimony informative. The *cyt b* phylogeny shows a very well resolved and supported phylogenetic tree in which the species *T. karimii* occupies the most basal position in the phylogeny, followed by a clade that joined the two representatives of *T. velutinus* from Brazil (Fig. 2). Then, we obtained two major reciprocally monophyletic splits in the phylogeny: one representing *T. venustus* and *T. sponsorius* as sister species. The other major grouping of clades recovered a subdivided *T. pusillus* between Argentina and Bolivia-Paraguay, conforming a Chacoan clade, and a major clade including species from the Andes and the Coastal Desert of Peru and Chile that may well represent what Giarla *et al.* (2010) recognized as an Andean clade. However, the latter should be an Andean-coastal clade because this arrangement joined samples from the Andes and from the coast of the Pacific Ocean. *T. macrurus* joined this ‘Chacoan/Andean-coastal clade’ at a basal position. However, the phylogenetic position (*cyt b* and concatenated sequences; Figs. 2 and 3) of *T. macrurus* is uncertain, because this form was either recovered at the base of the *sponsorius-venustus* clade (parsimony analysis) or at the base of the Chacoan/Andean-coastal clade (with likelihood and Bayes; Figs. 2 and 3). In none of the analyses, the *macrurus* node recorded a significant support value. The Chacoan clade, on the other hand, recovered two subclades, one representing forms from the Bolivian Chaco that correspond to *T. pusillus*, *sensu stricto*, and a second subclade representing forms from the humid Argentinean Chaco that correspond to *T. pulchellus* (Teta *et al.* 2009). In the latter, two specimens from the localities of Entre Ríos and Corrientes in Argentina represent what Teta *et al.* (2009) recognized as *T. citellus*. Next in the tree the Coastal Andean forms: a sister relationship representing *T. tatei* from the Coastal Desert of Peru (Lima) and a new species represented by several specimens from Arequipa and Lima Peru. This new form of *Thylamys* was trapped in several localities of

Arequipa and Lima between 250 and 3800 m. Finally, we recovered a clade representing the sister relationship of *T. pallidior* and *T. elegans*. As hypothesized by Braun *et al.* (2005), the *T. pallidior* clade recovered two subgroups: one constituted by specimens from the Andean Altiplano and transversal valleys in the Atacama Desert representing *T. pallidior* ‘A’ and the other group that included forms from the Patagonia of Argentina, *T. pallidior* ‘B’. A similar topology was obtained for *T. elegans* of the Mediterranean ecoregion of Chile because we obtained a north and a south clade in the topology. In Fig. 3, we show the phylogeny between the concatenated *cyt b* and TTR sequences recovering a similar topology to that obtained with the *cyt b* data, with good support both in the bootstrap and posterior probability values.

Molecular clock

We performed the molecular clock calibration using the cytochrome *b* gene sequences for which we have sequences of all species considered in this study. The divergence time for *Thylamys* and the rest of mouse opossums (represented here for outgroups *Lestodelphys halli* and *Marmosops impavidus*) is hypothesized to have occurred about 24.19 (HPD: 12.68-39.05) My, late Oligocene, with *Thylamys* differentiation about 18.58 (HPD: 11.01-27.22) My (Fig. 4). The same topology shows the mean values for divergence times of other taxa: *T. sponsorius* and *T. venutus* would have diverged about 6.5 (HPD: 5.44-7.5) My, whereas *T. macrurus* from the rest of *Thylamys* from the Andean-coastal clade is hypothesized to have speciated about 10.73 (HPD: 7.47-14.62) My. Among the ‘most recent’ speciation events in the radiation of *Thylamys*, it is the 4.65 (HPD: 2.4-7.01) My for the new species of *Thylamys* and *T. tatei*, the 4.6 (HPD: 2.1-4.5) My split between *T.*

pusillus and *T. pulchellus*, and the 6.11 (HPD: 5.3-7.23) My for the differentiation between sister taxa *T. elegans* and *T. pallidior*, late Miocene times.

Ancestral distribution of Thylamys

The model that best fits the *Thylamys* phylogeny and distribution is the DEC model (lnL = 24.7), with $d = 0.01$ and $e = 0$ (Fig. 5). The most recent common ancestor's (MRCA) area of distribution of the genus *Thylamys* would be the Chaqueña ecoregion that according to Morrone (2002, 2006) includes the Caatinga, Cerrado, Chaco, Pampa and Monte ecoregions with species *T. velutinus* and *T. karimii* (Fig. 5). From these areas, four major routes may have followed (see below): (i) dispersal (range expansion) of the MRCA of *T. sponsorius*-*T. venustus* to what today constitute the Chaqueña-Amazonica ecoregion that comprise among others the Yungas and Chaco biomes (*sensu* Morrone 2002, 2006); (ii) dispersal of *T. macrurus* to the Chaqueña-Paranaenense ecoregions that includes the Brazilian Atlantic Forest; (iii) a vicariant and posterior dispersal event of the MRCA to the boreal, dry and wet Chaco ecoregion where *T. pusillus*, *T. pulchellus* and *T. citellus* diversified by sympatric processes, respectively; (iv) to the Paramo-Puneña (western slope of the Andes) ecoregion that comprises the Puna, Prepuna and the Coastal Desert of Peru and Chile with the MRCA of *T. pallidior*-*T. elegans* and *T. tatei*-*T. sp.* A final range expansion occurred during the evolution of *T. pallidior* to the Patagonia (Fig. 5). Thus, the biogeographical history of the genus *Thylamys* was mostly dominated by range expansion to nearest areas of the diverse MRCAs and by a single vicariant event. No founder events and range contractions were detected.

Discussion

Phylogenetic relationships

The cytochrome *b*-based tree recovered the Cerrado form *Thylamys karimii* as the most basal taxon followed by the other Brazilian species *T. velutinus*. These results slightly contrast with Giarla *et al.* (2010) study that recovered the latter species as most basal based on cyt *b* sequences, although when they concatenated the latter sequence data with two other mitochondrial markers, *T. velutinus* and *T. karimii*, appeared at the base of the phylogenetic tree, as sister taxa, as showing our results. Then, two major clades are recovered with good support: one that includes the *T. venustus*-*T. sponsorius* relationship and the other major clade that includes *T. macrurus* as basal to a relationship consisting of *T. pusillus*, *T. citellus*, *T. pulchellus*, *T. tatei*, *T. sp.*, *T. elegans* and *T. pallidior*. The uncertain phylogenetic position of *macrurus* as either at the base of the *venustus*-*sponsorius* clade or at the base of the Andean clade was also recovered by Giarla *et al.* (2010) study. Needless to say, additional specimens of *T. macrurus* would be useful to correctly allocate its phylogenetic position in the *Thylamys* reconstruction.

The association *venustus*-*sponsorius* is well supported, and our results confirm *sponsorius* as a valid species, different from *venustus*. Tate (1933) recognized *cinderella* and *sponsorius* as subspecies of *T. venustus*, but Flores *et al.* (2000) raised the taxonomic status of *cinderella* to species, proposition later supported by Braun *et al.* (2005). In fact, Flores *et al.* (2000) based on morphological features, recognized *T. venustus*, *T. cinderella* and *T. sponsorius* as valid species, but Braun *et al.* (2005) based on partial cyt *b* sequences synonym *cinderella* and *sponsorius*, recognizing *T. venustus* and *T. cinderella*. Later, Gardner (2005) and Creighton & Gardner (2008) recognized *T. cinderella*, *T. sponsorius* and *T. venustus* as valid species following Flores *et al.* (2000); however, Voss & Jansa

(2009) recognized *T. cinderella* (including *sponsorius*) as earlier proposed by Braun *et al.* (2005). Our *cyt b* phylogeny did not recover the two subclades or haplogroups obtained by Giarla *et al.* (2010, 2014) for *T. sponsorius*. We believe that this is probably due to a more wide sampling that finally recovered both haplogroups and that might represent two different subspecies (*sponsorius* and *janetta*) as Giarla *et al.* (2014) proposed. Giarla *et al.* (2010) recovered three *cyt b* haplogroups ('A', 'B' and 'C') within the *T. venustus* clade that seems to represent a single species. These authors proposed that haplogroup 'C' that includes representatives from the type locality of *cinderella* (Tucumán, Argentina) could be *cinderella*; haplogroup A could be *venustus* as that grouping included specimens from Cochabamba, the type locality, whereas, for the haplogroup B, there would be no available name. Furthermore, Giarla *et al.* (2010) proposed that *T. venustus* and *T. sponsorius* constitute sister and valid species based on molecular (*cyt b*) and morphometric data. The latter authors stated that *cinderella* and *venustus* would be unambiguously assignable to a morphometric small-sized clade that reunited *venustus*, in contrast to the large-sized morphometric clade that grouped *sponsorius*. Taxonomically, the older available name between *cinderella* and *venustus* is *venustus*; thus, this would be the species recognized in the clade. Based on morphological and geographical data, our study included several specimens recognized as either *sponsorius* or *venustus*, and the phylogeny consistently recovered both taxa as well-differentiated sister species. However, we still believe that a careful revision of voucher specimens, holotypes and localities would be still necessary to clarify the taxonomy of *Thylamys* from northwestern Argentina and southern Bolivia.

The *T. pusillus* clade exhibited two major subclades, one representing forms from the boreal Chaco (Santa Cruz, Chuquisaca, Tarija, Alto Paraguay and Boquerón) that would correspond to *T. pusillus sensu stricto*. The latter subclade is in sister relationship to

another subclade that recovered specimens from the dry Chaco of Argentina that would represent *T. pulchellus* (Santiago del Estero, Catamarca, Tucumán and Formosa; Teta *et al.* 2009). Even the *pulchellus* subclade recovered two other specimens from Entre Ríos and Corrientes provinces in Argentina, part of the humid Chaco, that must correspond to *T. citellus*. In a recent paper, Teta *et al.* (2009) proposed that *T. pusillus* is a complex of three species: *T. pusillus*, *T. pulchellus* and *T. citellus* all of them distinguished morphologic and biogeographically. Although in our phylogeny, we did not have a good sampling of what Teta *et al.* (2009) recognized as *T. citellus* (from the humid subtropical areas of Entre Ríos and Corrientes, coast of Paraná river and neighbour areas, Argentina), the latter form exhibited a sequence divergence of K2P 5.7% with respect to *T. pulchellus* from the dry Chaco (west of Paraná river). Distance values between well-recognized species within *Thylamys* fluctuate between K2P 7-20% (this work, Table 2; Patton *et al.* 1996; Giarla *et al.* 2010). Besides the low nucleotide divergence between *pulchellus* and *pusillus*, there are marked differences between the morphology of both taxa, particularly cranial, dental and body morphology of *citellus* with respect to *T. pulchellus* and even with *T. pusillus*, the other related taxon (Teta *et al.* 2009). The still low nucleotide divergence between *citellus-pulchellus*, coupled to the morphological divergence between both sister taxa, make *citellus* to be recognized at the specific level as Teta proposed earlier (Teta *et al.* 2009). Giarla *et al.* (2010) also recovered three well-supported clades within *pusillus* that they called Haplogroups A, B and C. They, however, did not consider these haplogroups as different species due to no sequence data are available for large intervening areas in the range of *pusillus*. Giarla *et al.* (2010), instead, consider that a biogeographical sampling bias could explain the difference among the three haplogroups. In any case, Giarla *et al.* (2010) proposed the application of available names for the three haplogroups as follows:

Haplogroup A would correspond to *T. pusillus sensu stricto*, Haplogroup B to *T. pulchellus* and Haplogroup C to *T. citellus*.

The phylogeny of *Thylamys* recovered a new taxon that deserves specific status represented by specimens from Arequipa and Lima, Perú. This new species was recovered in sister relationship with specimens of *T. tatei* from the departments of Ancash and Lima, Perú. The new *Thylamys* species occurs in an altitudinal gradient between 250 up to 4800 m, being an endemic form from the Puna and the western slopes of the Peruvian Andes. Although we do not have a proper sample size representing *T. tatei*, as earlier proposed by Solari (2002, 2003) and more recently by Braun *et al.* (2005), we here recognize *T. tatei* as a valid species, phylogenetically the sister taxon to the new species of *Thylamys* from Arequipa and Lima, Perú. Thus, our results clarify the taxonomic problem mentioned by Giarla *et al.* (2010), because they could not properly resolve the phylogenetic relationships between *tatei* and the new taxon.

The last part of the tree depicted the sister relationship between *T. pallidior* and *T. elegans*. The clade representing the latter form is mostly restricted to Mediterranean Chile, showing two well-supported subclades that may well represent two subspecies. One of these subclades is represented by samples from O'Higgins and Maule regions, south of the Santiago Metropolitan region in Chile. The other subspecies of *T. elegans* grouped samples north of Santiago up to the Río Loa mouth (about 22°S). This northern subspecies of *T. elegans* would correspond to *T. e. elegans* whose type locality is Valparaíso, Chile (Tate 1933). Although we do not have samples from the type locality, biogeographically the clade representing this form includes the Valparaíso region. We do not believe that this northern subspecies of *T. elegans* be *T. e. coquimbensis* because the type locality of the latter is Paiguano (30°S) an area located 120 kms E of Coquimbo at about 1600 m. The

southern subspecies of *T. elegans* it might correspond to *T. e. soricinus*, although the type locality for this taxon is located in Valdivia province, Los Ríos region (40°S). The holotype of *soricinus* was recorded by R. A. Philippi (1894), and no further records of *Thylamys* exist in the Valdivia area, even no records of *Thylamys* have been reported south of the Biobío river (38°S) except for those of Tate (1933) and Greer (1965) in the Araucanía region (Angol, Malleco province 37°S). More recent records of *T. elegans* in southcentral Chile have been reported in the Maule region (e.g. Río Maule and Siete Tazas) being those phenetically ascribed to *T. e. soricinus* (Pine *et al.* 1979).

For *T. pallidior*, we also recognize two subclades representing two subspecies as proposed by Braun *et al.* (2005). The upper subclade ‘A’ recovered samples from the Puna of Peru and Chile, and the transversal valleys that cross the Atacama Desert in northern Chile, whereas subclade ‘B’ within *T. pallidior* corresponds to specimens from the southern portion of northwestern Argentina, the Monte, the Pampas and the Patagonia of that country. *T. pallidior* may be found in the lowlands of northern Chile such as Quebrada de Camarones (Arica-Parinacota region, 19°S; this paper) or La Huayca, Pampa del Tamarugal (20°S; Tarapacá region; this paper). This northernmost taxon of *pallidior* (the ‘A’ form) would clearly correspond to the subspecies *T. p. pallidior* because the type locality of this is Lago Poopo, Oruro, Bolivia (Tate 1933). On the other hand, the *pallidior* form that ranges east of the Andes, from NW Argentina, as far south as the Monte Desert, the Pampas and the Patagonia far south to southern Chubut (Formoso *et al.* 2011) would also constitute a subspecific taxon of *T. pallidior*. A recent work by Martin (2009) distinguished *T. fenestrae* from *T. pallidior* as a valid species based on morphological characters. However, some of the geographical localities of the specimens recognized as *fenestrae* by Martin (2009) correspond to the localities analysed by us (Abra de la Ventana,

Buenos Aires and La Tapera, Córdoba, Argentina). We thus believe that the morphological differences between both nominal taxa are not strong enough and we believe that what Martin (2009) recognized as a different species would be the southern subspecies of *T. pallidior*. In this context, the name *fenestrae*, with type locality in Abra de la Ventana (Buenos Aires province, Argentina; Marelli 1931), remains available for subspecific treatments. At the time of finishing this work, a new paper by Giarla *et al.* (2014) that used different nuclear loci tested the ‘species limits’ (genetic isolation) using coalescent-based approaches to validate or refute morphologically cryptic lineage diversity within *T. pallidior*, *T. sponsorius* and *T. venustus*, previously detected with mtDNA (Giarla *et al.* 2010). They concluded that all mtDNA haplogroups should be recognized as genetically isolated lineages (Giarla *et al.* 2014).

Biogeographical scenario

Our results hypothesized that the majority of species of *Thylamys* differentiated during Miocene times and some others speciating during Plio-Pleistocene times. These epochs of time in South America (middle-late Cenozoic) characterized by dramatic changes in the landscape and temperature shifts (Potts & Behrensmeyer 1992). Indeed, by the end of Oligocene, humid forests were common in the southern part of the continent, whereas by middle Miocene, gradual cooling and drying started changing the landscape to a mixed forest and savanna habitats. In addition, it is a time for the rise of the Andes mountains with the consequent formation of a rain shadow in south-east South America (Potts & Behrensmeyer 1992). The biogeographical changes continued through the Plio-Pleistocene with an increased uplift and vulcanism in the Andes mountains, with the formation of the Panamanian Land Bridge, the arid-wet glacial cycles and the expansion and contraction of

forests and savannas due to climate changes (Potts & Behrensmeyer 1992; Brown & Lomolino 1998; Scotese 2004). Is in the former biogeographical scenario that we have to understand the radiation of mouse opossums, particularly for the species of the genus *Thylamys*

The phylogenetic and the ancestral distribution analyses are consistent in showing *T. karimii* and *T. velutinus* as the most basal species in the *Thylamys* radiation, hypothesizing the Chaqueña ecoregion that comprises the Cerrado and the Caatinga biomes as the most ancestral areas for the origin of the genus, leaving *T. karimii* in both ecoregions and restricting *T. velutinus* to the Cerrado (Carmignotto & Monfort 2006). From these areas, four major radiations may have occurred within *Thylamys* that may have caused the divergence of different lineages in different biomes: (i) the MRCA of *T. sponsorius*-*T. venustus* clade that gradually invaded from the Cerrado and Caatinga to southern Bolivia and the Yungas triggering the speciation of sister taxa *T. venustus* in the eastern slope of the Andes at intermediate elevations (from Cochabamba, Bolivia to Salta Argentina) and *T. sponsorius* in the Argentinean portion of the Yungas; (ii) to the most humid and open areas of southern Amazonia: the Atlantic Forests of Mato Grosso do Sul, Brazil and eastern Paraguay with the species *T. macrurus*; (iii) a more complex scenario of dispersal and posterior vicariance of the MRCA triggering the diversification of *T. pusillus* in the boreal Chaco ecoregion of Bolivia and Paraguay), *T. pulchellus* in the dry Chaco of Argentina (e.g. Catamarca, Formosa provinces) and *T. citellus* in the most humid portion of the Argentinean Chaco (Entre Ríos, Corrientes provinces); and (iv) across the Andes where *T. pallidior*, *T. elegans*, *T. tatei* and *T. sp.* diversified in the Altiplano and Coastal Desert of Chile and Perú. Our results do not agree with Solari (2003) and Carmignotto & Monfort (2006) in the sense that the Brazilian forms of *Thylamys* (*karimii* and *velutinus*) derived

from the Paraguayan forms *T. macrurus* and *T. pusillus*, from where they might have dispersed into the open formations of Brazil. Instead, our data consistently showed that the Brazilian taxa are the most basal in the radiation of the genus, whereas the origin of Paraguayan forms would be much more recent.

With respect to the speciation of sister taxa *T. elegans* and *T. pallidior*, our results suggest a time of differentiation of about 6 My which is late Miocene, a period marked by the rise of the Andes and marine transgressions (Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006). It is important to note that several fossil species of *Thylamys*, such as *T. pinei*, *T. contrerasi* and *T. zettii*, have been recorded from late Miocene-early Pliocene deposits in Central Argentina. According to Goin *et al.* (2000); see also Goin (1997), these species are morphologically close to the '*elegans* group' sensu Tate (1933). Our results propose a scenario of dispersal for the speciation of *elegans* and *pallidior* lineages. In fact, *T. pallidior* occurs at high altitudes in the Altiplano which might have occurred when the ancestral form occupied a wide distribution in what is now southern/northern Peru and Chile. That split might have occurred by vicariance leaving *T. pallidior* in the Andes and *T. elegans* in the lowlands. The occurrence of *T. pallidior* in the canyons of the lowlands of southern Peru and northern Chile could be a posterior dispersal from the Puna Andes, from where they might also have colonized eastward and southward through the Monte Desert, Pampas and Patagonia of Argentina. On the other hand, *Thylamys elegans* may have characterized by a wider distribution in the past (today restricted to Mediterranean Chile in the central portion of the country), including an important area of northern Chile, because we have found relictual populations at the mouth of Río Loa (21°S, Tarapacá region, this study), which is 1000 km north of the northernmost distribution of this species in the Coquimbo region of Chile (33°S).

The rivers seem to be an important barrier for the differentiation of *Thylamys* spp. Teta *et al.* (2009) stated that major rivers might have played an important role delimiting local species of *Thylamys*. Teta's *et al.* (2009) work proposed that what they recognized as *T. citellus* (the subclade within *T. pulchellus* in our study) is geographically separated from *T. pulchellus* by the Paraná river in central South America, and the latter would be separated from *T. pusillus* by the Bermejo river. On the other hand, *T. pusillus* seems not to cross the Paraguay river to the east where *T. macrurus* occurs (Voss *et al.* 2009), although *pusillus* and *macrurus* are not sister taxa. Finally, a similar scenario of rivers as barriers could explain the differentiation between *T. tatei* and the new species of *Thylamys* from Arequipa, Perú. Indeed, both taxa have an important altitudinal distribution, between 300 up to 3000 m for *T. tatei* (Solari 2002, 2003), and between 250 and 4800 m for *T. sp.* (H. Zeballos, personal observation). Indeed, between both major ranges, there are a series of major and narrow rivers that run across the Andes (*e.g.* the Cañete river) that separates the distribution of both taxa, with no data of sympatric populations, thus being the canyons and rivers an effective barriers for dispersal. The river differentiation could also apply for some of the subspecies that we are recognizing in this study, for example the split within *T. elegans*. The 'north' subclade in this species is geographically separated from the 'south' clade by the Maipo River in Chile, in the Metropolitan region of Santiago. The 'north' form ranges north to the river that may correspond to *T. elegans elegans*, whereas the south form would be an unnamed taxon of subspecific rank.

Acknowledgements

We would like to thank to Sebastián Ramos and to the Laboratorio de Biología Evolutiva, Departamento de Ecología, P. Universidad Católica de Chile and to the Chilean Hanta

Crew for collecting several of the specimens analysed in this study. The funding support of grants Fondecyt 1100558, 1130467 and CASEB 1501-0001 to REP, and CONICET PIP 6179 and Agencia PICT 2008-0547 to UFJP is greatly appreciated. DBB was supported by the Graduate School of the Universidad de Concepción (2008-2010) and a CONICYT Doctoral Fellowship (2011). This study is part of the DBB requirements for his doctoral dissertation on Systematics and Biodiversity. Finally, we acknowledge the loan of tissues from RM Barquez and LI Ferro (Universidad Nacional de Tucumán, Argentina) and from all other researchers mentioned in the Material and Methods section; the collecting permits from Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) and Corporación Nacional Forestal (CONAF) are greatly appreciated.

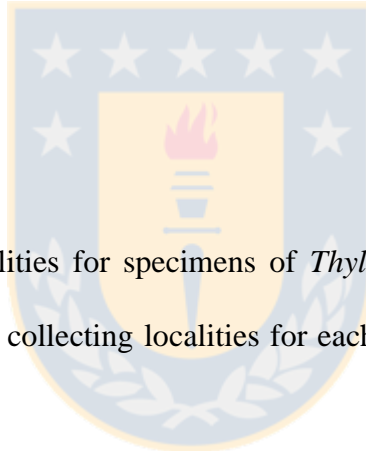


Figure legends

Fig. 1 Map of collecting localities for specimens of *Thylamys* sequenced for this study. Symbols on the map represent collecting localities for each of the species analysed in this study.

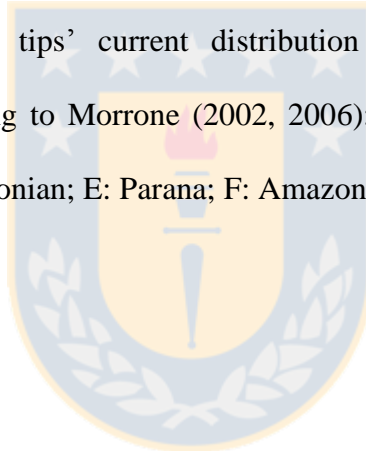
Fig. 2 Phylogenetic relationships of *Thylamys* based on the complete mitochondrial cytochrome *b* gene. Numbers on the nodes represent bootstrap support values for maximum parsimony and maximum likelihood analyses, as well as posterior probability support scores for Bayesian analysis (asterisks represent 100 support value either for parsimony and/or likelihood).

Fig. 3 Phylogenetic relationships of *Thylamys* based on the concatenated cytochrome *b* and TTR intron genes. Numbers on the nodes represent bootstrap support values for maximum parsimony and maximum likelihood analyses, as well as posterior probability support scores for Bayesian analysis (asterisks represent 100% support value either for parsimony

and/or likelihood). *Marmosops impavidus* sequence is chimerical between two different individuals obtained from GenBank (see Table 2 for accession numbers).

Fig. 4 Molecular clock calibration for the different nodes on the *cyt b* sequences of *Thylamys*. Numbers on the nodes reflect the mean value for the time of differentiation, and the grey bars reflect the 95% of the highest posterior density.

Fig. 5 Ancestral Distribution of *Thylamys*. Node's ancestral distribution has been estimated under the DEC model (Ree & Smith 2008) available at the BioGeoBEARS package for the software R. —A: the most probable event-based scenario of historical biogeography of *Thylamys*. —B: the pie charts represent the probability of the ancestral areas. The colour code is consistent with the tips' current distribution data (except for AC code). Ecogeographic zones according to Morrone (2002, 2006): A: Paramo Punan; B: Central Chilean; C: Chacoan; D: Patagonian; E: Parana; F: Amazonian.



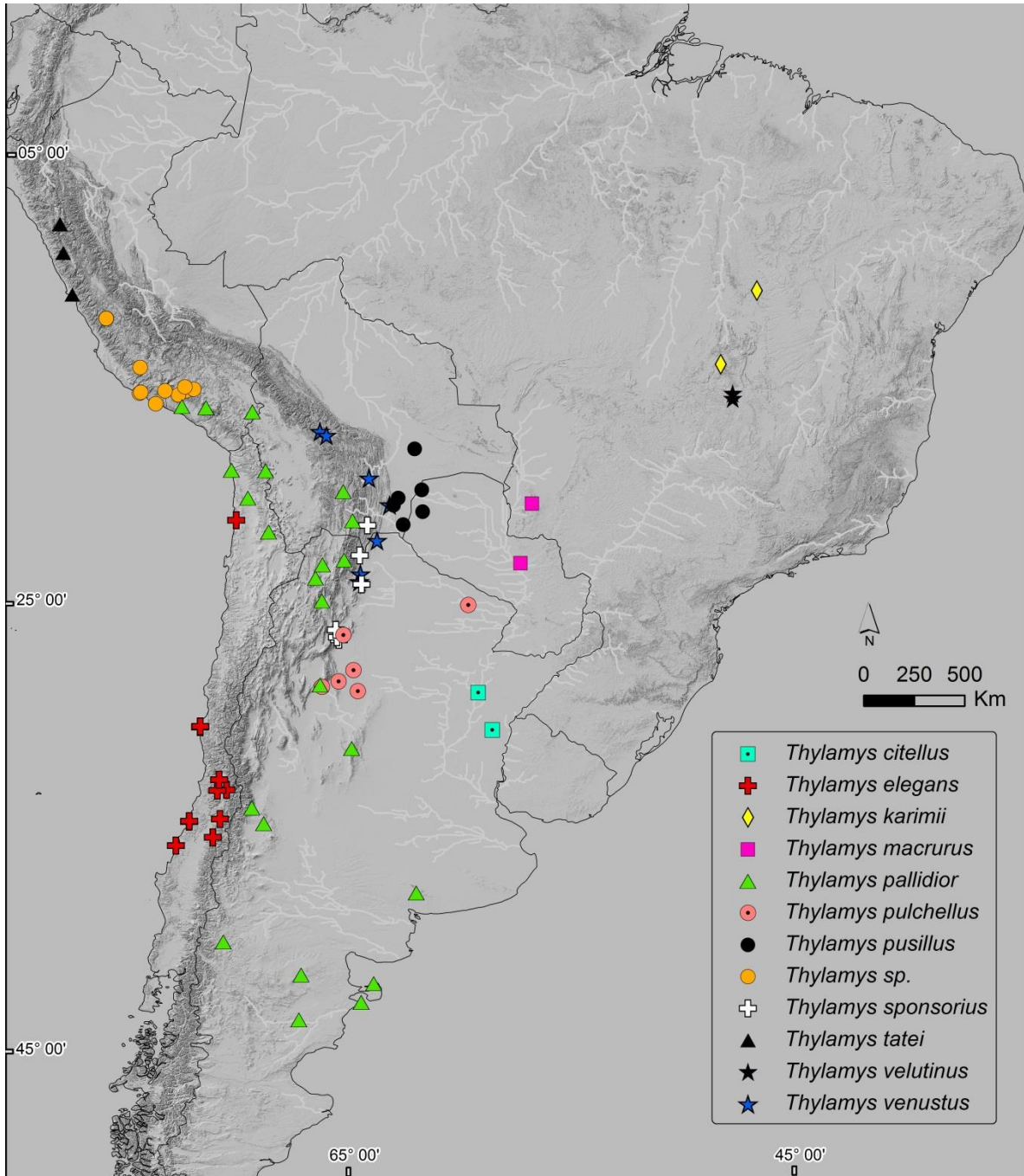


Fig. 1

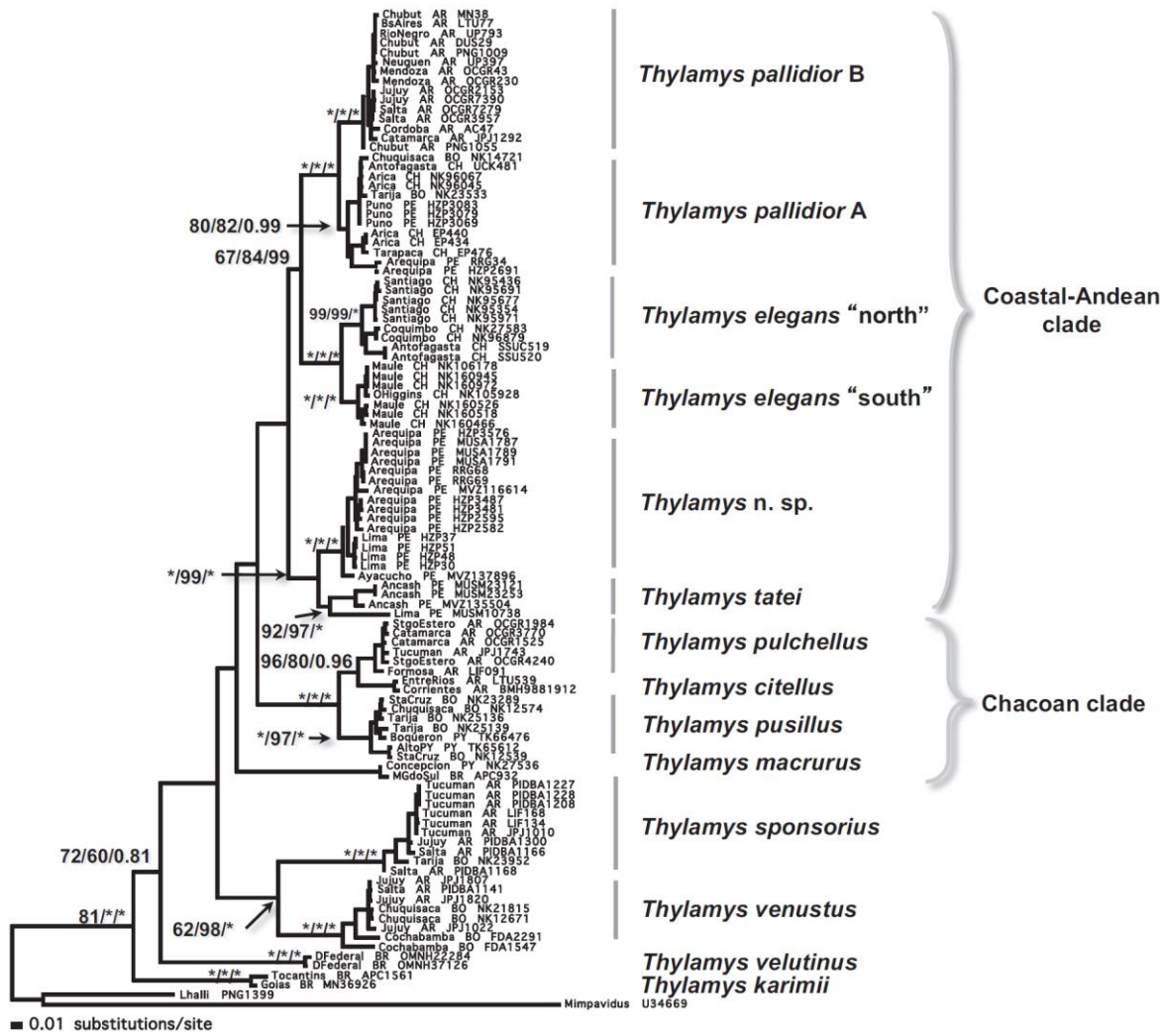


Fig. 2

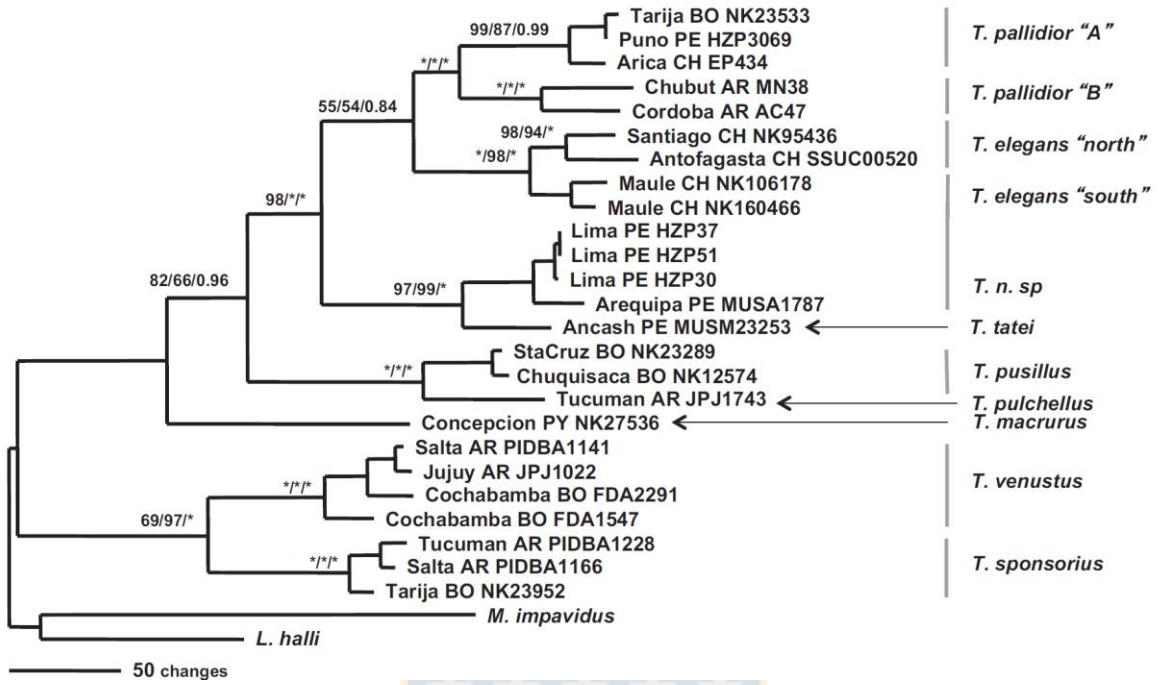


Fig. 3



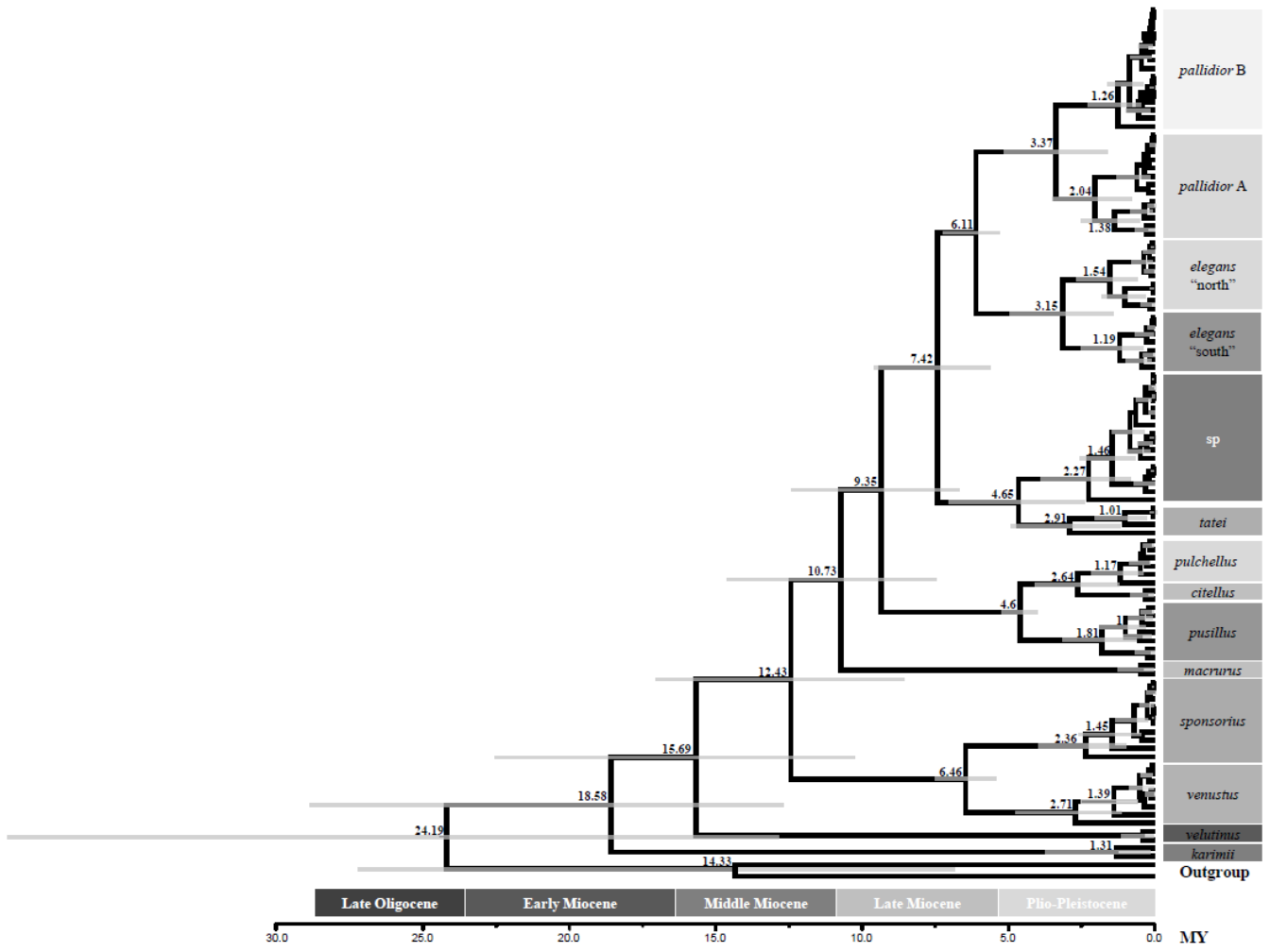


Fig. 4

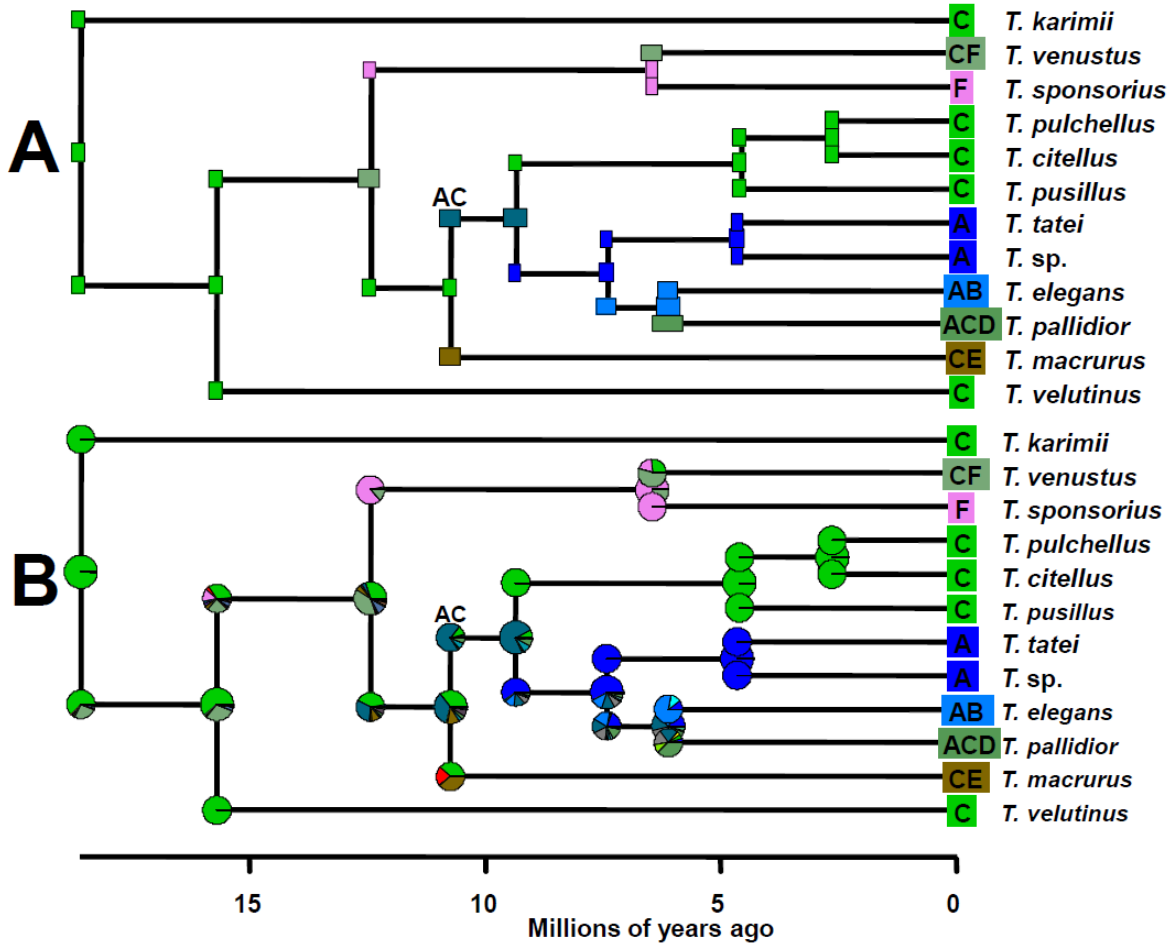


Fig. 5

Table 1 Collecting localities of *Thylamys* spp. Refer to Methods for acronyms of voucher specimens. Geographical coordinates were not available for all collecting sites

Voucher	GenBank access	GenBank Access	Species	Locality	Region/Province	Latitude	Longitude	Country	Elevation
	cyt <i>b</i>	TTR							
HZP3083	KF164509		<i>T. pallidior</i>	Hacienda Ventilla, Huacullani	Puno	16°35'45.18''S	69°20'05.18''W	Perú	3800
HZP3079	KF164510		<i>T. pallidior</i>	Hacienda Ventilla, Huacullani	Puno	16°35'45.18''S	69°20'05.18''W	Perú	3800
HZP3069	KF164511	KF164581	<i>T. pallidior</i>	Hacienda Ventilla, Huacullani	Puno	16°35'45.18''S	69°20'05.18''W	Perú	3800
NK96067	KF164512		<i>T. pallidior</i>	Enquelga	Arica-Parinacota	19°13'13.8''S	68°44'42.6006''W	Chile	3900
NK96045	KF164513		<i>T. pallidior</i>	Enquelga	Arica-Parinacota	19°13'13.8''S	68°44'42.6006''W	Chile	3900
NK23533	HM583386*	KF164580	<i>T. pallidior</i>	Serranía Sama	Tarija	21°26'59.99''S	64° 52'1.2''W	Bolivia	3200
NK14721	HM583385*		<i>T. pallidior</i>	68 km (by road) N Comargo	Chuquisaca	20°8'59.99''S	65°16'58.8''W	Bolivia	3400
UCK481	KF164514		<i>T. pallidior</i>	Río Loa Alto	Antofagasta	21°56'49.6''S	68°36'37.3''W	Chile	3053
EP476	KF164515		<i>T. pallidior</i>	La Huaica	Tarapacá	20°26'22''S	69°32'15''W	Chile	992
EP440	KF164516		<i>T. pallidior</i>	Quebrada Camarones	Arica-Parinacota	19°11'25.3''S	70°16'07''W	Chile	13
EP434	KF164517	KF164582	<i>T. pallidior</i>	Quebrada Camarones	Arica-Parinacota	19°11'25.3''S	70°16'07''W	Chile	13
RRG34	KF164518		<i>T. pallidior</i>	Aplao, Beringa, Castilla	Arequipa	16°20'44.09''S	72°28'37.64''W	Perú	680
HZP2691	KF164519		<i>T. pallidior</i>	Quebrada Canchimayo, Chiguata	Arequipa	16°24'11.8512''S	71°24'14.115''W	Perú	2892
MN38	KF164520	KF164583	<i>T. pallidior</i>	Estancia San Lorenzo	Chubut	42°06'53''S	63°55'23''W	Argentina	52
UP397 (CNP1921)	HM583413*		<i>T. pallidior</i>	Cerrito Piñón, Estancia Collón Curá	Neuquén	40°14'57''S	70°37'54''W	Argentina	608
LTU77 (CNP1919)	HM583411*		<i>T. pallidior</i>	Campamento Base, Sierra de	Buenos Aires	38°4'8.4''S	62°1'22.8''W	Argentina	50

				la Ventana					
UP793 (CNP541)	KF164521		<i>T. pallidior</i>	Establecimiento San Nicolás, Meseta de Somuncurá	Río Negro	41°43'50''S	67°09'49''W	Argentina	884
DUS29 (CNP1409)	KF164522		<i>T. pallidior</i>	Bahía Cracker	Chubut	42°57'02''S	64°28'45''W	Argentina	7
PNG1009 (CNP1678)	KF164523		<i>T. pallidior</i>	Piedra Grande	Chubut	42°57'02''S	64°28'45''W	Argentina	7
AC47	HM583392*	KF164584	<i>T. pallidior</i>	La Tapera, Pampa de Achala	Córdoba	31°37'19.2''S	64°54'39.7''W	Argentina	1959
JPJ1292	KF164524		<i>T. pallidior</i>	Agua del Gauchi, Capayán	Catamarca	28°46'52''S	66°18'43''W	Argentina	2024
PNG1055 (CNP1693)	KF164525		<i>T. pallidior</i>	Las Plumas	Chubut	43°43'48''S	67°15'48''W	Argentina	165
OCGR2153	HM583393*		<i>T. pallidior</i>	11 km E Humahuaca, 2 km E Pucará on road to Cianzo	Jujuy	23°11'59.99''S	65°14'34.799''W	Argentina	3505
OCGR 7390	HM583408*		<i>T. pallidior</i>	8.2 km S Sey	Jujuy	24°0'46.8''S	66°30'54''W	Argentina	4167
OCGR 7279	HM583406*		<i>T. pallidior</i>	16 km S and 1.8 km W Barrancas, along Río de las Burras	Salta	23°24'57.6''S	66° 12'21.6''W	Argentina	3521
OCGR 3957	HM583403*		<i>T. pallidior</i>	17 km NW Cachi	Salta	25°1'19.1994''S	66°14'16.7994''W	Argentina	3155
OCGR 43	HM583397*		<i>T. pallidior</i>	3 km W Refugio Militar General Alvarado	Mendoza	34°16'12''S	69°21'46.799''W	Argentina	2195
OCGR 230	HM583394*		<i>T. pallidior</i>	Salinas del Diamante RR Station	Mendoza	34°58'1.1994''S	68°49'58.7994''W	Argentina	1313
NK95436	KF164526	KF164585	<i>T. elegans</i>	Rinconada de Maipú	Santiago	33°29'40.92''S	70°53'34.5006''W	Chile	553
NK95354	KF164527		<i>T. elegans</i>	Rinconada de Maipú	Santiago	33°29'40.92''S	70°53'34.5006''W	Chile	553
NK95691	KF164528		<i>T. elegans</i>	San Carlos de Apoquindo	Santiago	33°28'8.2806''S	70°29'18.5388''W	Chile	1673
NK95677	KF164529		<i>T. elegans</i>	San Carlos de Apoquindo	Santiago	33°28'8.2806''S	70°29'18.5388''W	Chile	1673
NK95971	KF164530		<i>T. elegans</i>	Rinconada de Huechún, Colina	Santiago	33°1'3.8994''S	70°49'1.3116''W	Chile	782

NK27583	HM583376*		<i>T. elegans</i>	Parque Nacional Fray Jorge	Coquimbo	30°40'1.2''S	71°40'1.2''W	Chile	304
NK96879	KF164531		<i>T. elegans</i>	Parque Nacional Fray Jorge	Coquimbo	30°38'18.276''S	71°39'16.596''W	Chile	233
SSUC519	KF164532		<i>T. elegans</i>	desembocadura Río Loa	Tarapacá	21°25'33.1449''S	70°03'22.32691''W	Chile	12
SSUC520	KF164533	KF164586	<i>T. elegans</i>	desembocadura Río Loa	Tarapacá	21°25'33.1449''S	70°03'22.32691''W	Chile	12
NK160526	KF164534		<i>T. elegans</i>	Vilches Alto	Maule	35°35'4.7004''S	71°5'27.999''W	Chile	1013
NK160518	KF164535		<i>T. elegans</i>	Vilches Alto	Maule	35°35'4.7004''S	71°5'27.999''W	Chile	1013
NK160466	KF164536	KF164588	<i>T. elegans</i>	Tregualemu	Maule	35°56'59.5998''S	72°44'38.3994''W	Chile	24
NK106178	KF164537	KF164587	<i>T. elegans</i>	Duao, Licantén	Maule	34°52'55.56''S	72°9'15.0834''W	Chile	13
NK160945	KF164538		<i>T. elegans</i>	Lipimávida, Vichuquén	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''W	Chile	38
NK160972	KF164539		<i>T. elegans</i>	Lipimávida, Vichuquén	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''W	Chile	38
NK105928	KF164540		<i>T. elegans</i>	Las Peñas, San Fernando	O'Higgins	34°45'59.2992''S	70°46'34.3992''W	Chile	731
HZP3576	KF164541		<i>T. sp</i>	Acho, Ayo, Valle de los Volcanes, Castilla	Arequipa	15°39'47.67''S	72°18'16.02''W	Perú	1900
MUSA1787	KF164542	KF164592	<i>T. sp</i>	Andagua, Valle de los Volcanes, Castilla	Arequipa	15°29'04.01''S	72°20'47.75''W	Perú	3500
MUSA1789	KF164543		<i>T. sp</i>	Tapay, Valle del Colca, Caylloma	Arequipa	15°35'34.33''S	71°57'01.07''W	Perú	2700
MUSA1791	KF164544		<i>T. sp</i>	Tapay, Valle del Colca, Caylloma	Arequipa	15°35'34.33''S	71°57'01.07''W	Perú	2700
RRG68	KF164545		<i>T. sp</i>	Chuquibamba, Castilla	Arequipa	15°50'04.71''S	72°38'21.69''W	Perú	2800
RRG69	KF164546		<i>T. sp</i>	Chuquibamba, Castilla	Arequipa	15°50'04.71''S	72°38'21.69''W	Perú	2800
HZP3487	KF164547		<i>T. sp</i>	Hacienda el Carrizal, Caravelí	Arequipa	15°29'04.01''S	72°20'47.75''W	Perú	1750
HZP3481	KF164548		<i>T. sp</i>	La Cueva, Altos de	Arequipa	15°39'17.09''S	73°13'51.49''W	Perú	3500

				Caravelí					
HZP2582	KF164549		<i>T. sp</i>	Lomas de Atiquipa	Arequipa	15°45'34.55''S	74°22'33.49''W	Perú	900
HZP2595	KF164550		<i>T. sp</i>	Quebrada de la Waca, Lomas de Taymara	Arequipa	15°43'26.043''S	74°18'52.6638''W	Perú	350
MVZ116614	HM583420*		<i>T. sp</i>	3 mi W Atico	Arequipa	16°13'58.8''S	73°39'0''W	Perú	30
MVZ137896	HM583423*		<i>T. sp</i>	15 mi WNW Puquio	Ayacucho	14°37'1.2''S	74°20'20.3994''W	Perú	3657
HZP37	KF164551	KF164589	<i>T. sp</i>	Tinco, Huantán, Provincia de Yauyos	Lima	12°25'36''S	75°50'43''W	Perú	2680
HZP51	KF164552	KF164590	<i>T. sp</i>	Tinco, Huantán, Provincia de Yauyos	Lima	12°25'36''S	75°50'43''W	Perú	2680
HZP48	KF164553		<i>T. sp</i>	Tinco, Huantán, Provincia de Yauyos	Lima	12°25'39''S	75°51'14''W	Perú	2628
HZP30	KF164554	KF164591	<i>T. sp</i>	Tinco, Huantán, Provincia de Yauyos	Lima	12°25'39''S	75°51'14''W	Perú	2628
MUSM23121	KF164555		<i>T. tatei</i>	Pallasca, Pampas, 10 km to Pallasca	Ancash	8°13'45.984''S	77°54'18.684''W	Perú	2650
MUSM23253	KF164556	KF164593	<i>T. tatei</i>	Pallasca, Pampas, Río Conchucos	Ancash	8°12'50.364''S	77°55'29.6754''W	Perú	2650
MVZ135504	HM583449*		<i>T. tatei</i>	Ancash, 1 km N and 12 km E Pariacoto	Ancash	9°30'3.5994''S	77°46'26.4''W	Perú	2591
MUSM10738	KF164557		<i>T. tatei</i>	Chancay, Reserva Nacional Lachay	Lima	11°21'30''S	77°22'10''W	Perú	150
OCGR1525	HM583369*		<i>T. pulchellus</i>	Chumbicha, 0.5 km E Highway 38 on Highway 60	Catamarca	28°52'1.2''S	66°13'58.8''W	Argentina	457
JPJ1743	KF164558	KF164596	<i>T. pulchellus</i>	Trancas, intersection between H. 9 & India Muerta stream	Tucumán	26°33'16.5''S	65°16'44.0''W	Argentina	658

OCGR4240	HM583371*		<i>T. pulchellus</i>	Salinas de Ambargasta, ca. 8 km SE Cerro Rico	Santiago del Estero	29°4'1.2''S	64°37'58.7994''W	Argentina	141
OCGR1984	HM583370*		<i>T. pulchellus</i>	Virgen del Valle picnic area on Highway 64	Santiago del Estero	28°7'58.7994''S	64°49'58.7994''W	Argentina	701
OCGR3770	HM583372*		<i>T. pulchellus</i>	Bella Vista	Catamarca	28°37'37.1994''S	65°29'49.1994''W	Argentina	974
LIF091	KF164559		<i>T. pulchellus</i>	junction H. 95 & Riacho Pirane, 7 km N junction H. 95 & 81	Formosa	25°13'14.8''S	59°42'49.1''W	Argentina	104
LTU539	HM583374*		<i>T. citellus</i>	Estancia Santa Ana de Carpinchorí	Entre Ríos	30°47'45.5994''S	58°38'38.3994''W	Argentina	134
BMH9881912	HM583373*		<i>T. citellus</i>	Goya	Corrientes	29°7'58.7994''S	59°16'1.2''W	Argentina	32
NK25136	KF164560		<i>T. pusillus</i>	Estancia Bolivar	Tarija	21°38'S	62°37'W	Bolivia	400
NK23289	KF164561	KF164594	<i>T. pusillus</i>	53 km E of Boyuibe	Santa Cruz	20°27'S	62°50'W	Bolivia	535
NK12574	HM583415*	KF164595	<i>T. pusillus</i>	3,8 km E (by road) Carandayti	Chuquisaca	20°46'S	63°03'W	Bolivia	480
NK25139	HM583416*		<i>T. pusillus</i>	Estancia Bolivar	Tarija	21°38'S	62°37'W	Bolivia	400
TK66476	HM583419*		<i>T. pusillus</i>	Parque Nacional Teniente Enciso	Boquerón	21°3'0''S	61°45'0''W	Paraguay	275
TK65612	HM583418*		<i>T. pusillus</i>	Fortín Pikyrenda	Alto Paraguay	20°4'58.7994''S	61°46'58.8''W	Paraguay	337
NK12539	HM583414*		<i>T. pusillus</i>	Tita	Santa Cruz	18°15'0''S	62°6'0''W	Bolivia	300
NK27536	HM583383*	KF164597	<i>T. macrurus</i>	7 km NE Escuela Agropecuaria	Concepción	23°21'0''S	57°22'58.8''W	Paraguay	113
APC932	HM583382*		<i>T. macrurus</i>	Fazenda Califórnia	Mato Grosso do Sul	20°40'58.7994''S	56°52'1.1994''W	Brazil	650
PIDBA1227	KF164562		<i>T. sponsorius</i>	El Siambon on the edge of Río Grande	Tucumán	26°46'3''S	65°28'22''W	Argentina	944
PIDBA1228	KF164563	KF164602	<i>T. sponsorius</i>	El Siambon on the edge of Río Grande	Tucumán	26°46'3''S	65°28'22''W	Argentina	944

PIDBA1208	KF164564		<i>T. sponsorius</i>	El Siambon on the edge of Río Grande	Tucumán	26°46'3''S	65°28'22''W	Argentina	944
LIF168	KF164565		<i>T. sponsorius</i>	on the foothills of Chasquivil, 5 km upstreams La Hoyada on Río Hoyada	Tucumán	26°39'28''S	65°33'32.7''W	Argentina	1674
LIF134	KF164566		<i>T. sponsorius</i>	on the foothills of Chasquivil, 5 km upstreams La Hoyada on Río Hoyada	Tucumán	26°39'28''S	65°33'32.7''W	Argentina	1674
JPJ1010	KF164567		<i>T. sponsorius</i>	10 km S Hualinchay, on the road to Lara, Trancas	Tucumán	26°19'20.2''S	65°36'45.5''W	Argentina	2300
PIDBA1300	KF164568		<i>T. sponsorius</i>	21,7 km E Santa Clara, road to El Fuerte	Jujuy	24°17'42''S	64°27'58''W	Argentina	1288
PIDBA1166	KF164569	KF164603	<i>T. sponsorius</i>	road to Isla de Cañas, 43.7 km NW of the junction between 50 & 18 highways	Salta	23°00'S	64°33'W	Argentina	626
NK23952	KF164570	KF164604	<i>T. sponsorius</i>	5 km N NW Entre Ríos	Tarija	21°39'36''S	64°12'0''W	Bolivia	1161
PIDBA1168	KF164571		<i>T. sponsorius</i>	road to Isla de Cañas, 43.7 km NW of the junction between 50 & 18 highways	Salta	23°00'S	64°33'W	Argentina	626
JPJ1807	KF164572		<i>T. venustus</i>	Finca Las Moras, Santa Bárbara	Jujuy	23°49'38.8''S	64°31'33.5''W	Argentina	460
PIDBA1141	KF164573	KF164598	<i>T. venustus</i>	Piquirenda Viejo	Salta	22°20'S	63°47'W	Argentina	907
JPJ1820	KF164574		<i>T. venustus</i>	Finca Las Moras, Santa Bárbara	Jujuy	23°49'38.8''S	64°31'33.5''W	Argentina	460
NK21815	HM583492*		<i>T. venustus</i>	Río Limón	Chuquisaca	19°33'S	64°08'W	Bolivia	1300
NK12671	KF164575		<i>T. venustus</i>	Porvenir	Chuquisaca	20°45'S	63°13'W	Bolivia	675
JPJ1022	KF164576	KF164599	<i>T. venustus</i>	El Piquete farm, on the edge of Arroyo Volcán, Santa	Jujuy	24°18'S	64°56'W	Argentina	684

				Bárbara						
FDA2291	KF164577	KF164600	<i>T. venustus</i>	Vila Vila - Parotani	Cochabamba	17°27'5''S	66°19'17''W	Bolivia	2480-2558	
FDA1547	KF164578	KF164601	<i>T. venustus</i>	Chawarani - Tarata	Cochabamba	17°38'2''S	66°01'5''W	Bolivia	2790-2842	
OMNH22284	HM583450*		<i>T. velutinus</i>	25 km S Brasilia	D Federal, Brasilia	16°0'32''S	47°55'1''W	Brazil	1209	
OMNH37216	HM583451*		<i>T. velutinus</i>	Jardín Botánico	D Federal, Brasilia	15°46'58.799''S	47°55'1''W	Brazil	1100	
APC1561	HM583381*		<i>T. karimii</i>	Rio da Conceição	Tocantins	11°11'2.399''S	46°50'38''W	Brazil	591	
MN36926	EF051700*		<i>T. karimii</i>	55 km N Niquelandia	Goiás	14°28'S	48°27'W	Brazil	568	
PNG1399	KF164579	KF164605	<i>Lestodelphys halli</i>	Fofo Cahuel	Chubut	42°22'31.281''S	70°29'39.0012''W	Argentina	566	
MVZ171408	U34669*		<i>Marmosops impavidus</i>	72 km NE Paucartambo (by road), km 152	Cusco	13°10'42.1''S	71°35'05.4''W	Perú	1460	
AMNH272760		AJ628398*	<i>Marmosops impavidus</i>	Río Galvez, Nuevo San Juan	Loreto			Perú		

* = GenBank sequences

Table 2 Distance values among *Thylamys* spp. based on the Kimura-2-parameters model of sequence evolution

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1 <i>T. pallidior_A</i>													
2 <i>T. pallidior_B</i>	0.053												
3 <i>T. elegans_north</i>	0.106	0.104											
4 <i>T. elegans_south</i>	0.096	0.097	0.057										
5 <i>T. sp.</i>	0.108	0.11	0.11	0.106									
6 <i>T. tatei</i>	0.116	0.121	0.125	0.119	0.082								
7 <i>T. pulchellus</i>	0.136	0.14	0.157	0.149	0.143	0.147							
8 <i>T. citellus</i>	0.146	0.152	0.16	0.16	0.155	0.161	0.057						
9 <i>T. pusillus</i>	0.137	0.138	0.157	0.15	0.152	0.151	0.077	0.084					
10 <i>T. macrurus</i>	0.164	0.165	0.17	0.17	0.16	0.17	0.181	0.168	0.153				
11 <i>T. sponsorius</i>	0.196	0.199	0.184	0.2	0.188	0.201	0.202	0.194	0.188	0.168			
12 <i>T. venustus</i>	0.165	0.164	0.166	0.159	0.168	0.179	0.173	0.168	0.164	0.165	0.15		
13 <i>T. velutinus</i>	0.171	0.171	0.194	0.185	0.179	0.184	0.194	0.19	0.184	0.196	0.2	0.164	
14 <i>T. karimii</i>	0.172	0.177	0.19	0.177	0.157	0.166	0.173	0.172	0.177	0.165	0.206	0.194	0.164



Capítulo 2

Evaluación filogenética de dos subespecies de *Thylamys elegans* (Didelphidae) y revisión del conflicto taxonómico de las yacas de la región de Coquimbo, Chile. (Enviado a revisión en Zootaxa).

Resumen

Las especies chilenas del género *Thylamys* son: *T. elegans*, endémica de Chile Mediterráneo y *T. pallidior*, habitante de la Puna y quebradas. Giarla *et al.* (2010) mediante análisis morfológicos sinonimizan a *T. elegans coquimbensis* de los valles de Coquimbo (30-31°S) con *T. pallidior* y proponen que *T. pallidior* y *T. elegans* podrían estar en simpatria entre Fray Jorge donde habita *T. elegans* y la localidad tipo Paiguano (30°S) de *T. e. coquimbensis*. En el presente estudio se evaluó la validez de *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis* y el conflicto taxonómico de las yacas de los valles de Coquimbo mediante análisis filogenéticos basados en la secuenciación del gen mitocondrial *cyt b* usando por primera vez yacas de la localidad tipo de ambas subespecies descritas. Los resultados sustentan a *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis* como subespecies válidas y grupos monofiléticos recíprocos y polifiléticos con *T. pallidior* tanto con el criterio de Máxima Verosimilitud como Inferencia Bayesiana. Las yacas de los valles de Coquimbo corresponderían a *T. e. coquimbensis*, ampliando su distribución a la costa de la región de Coquimbo y Atacama. No se encuentra evidencia que *T. elegans* esté en simpatria con *T. pallidior* en la región de Coquimbo.

Palabras clave: Chile mediterráneo, conflicto taxonómico, *cyt b*, Didelphidae, localidad tipo, simpatria, sinonimia, *T. e. coquimbensis*, *T. e. elegans*, *T. pallidior*

Introducción

En Chile, *T. elegans* Waterhouse 1839:95 posee una amplia distribución, desde la ribera norte del río Loa (21°25'S), hasta la norte del río Biobío (36°52'S), siendo endémica de Chile (Reise & Venegas 1987; Palma *et al.* 2002; Iriarte 2008, Palma *et al.* 2014). Se ha propuesto al Desierto de Atacama como límite norte (Marquet 1994; Meynard *et al.* 2002; Palma *et al.* 2002; Braun *et al.* 2005) y se han descrito tres subespecies (Tate 1933; Osgood 1943; Palma 1997), cuyas localidad tipo y distribución son: 1) *T. e. elegans* Waterhouse 1939:95, subespecie tipo de la especie, localidad tipo Valparaíso (BMNH5382918, Natural History Museum, London, UK), distribuida por la precordillera de los Andes y Costa y áreas adyacentes, desde la región de Tarapacá al río Biobío (Tate 1933; Osgood 1943; Palma 1997); 2) *T. e. coquimbensis* Tate 1931:14, localidad tipo Paiguano, valle del Elqui, región de Coquimbo (FMNH23302, Field Museum of Natural History, Chicago, Estados Unidos), distribuida en los valles de la región de Atacama y Coquimbo (Tate 1933; Osgood 1943; Mann 1978; Palma 1995, 1997); y 3) *T. e. soricinus* Philippi 1894:36, descrita en base a un cráneo de egagrópila (Philippi 1894, Osgood 1943), localidad tipo Valdivia (Tate 1933; Osgood 1943, Palma 1995, 1997). Con respecto a *T. e. soricinus*, existen dos registros de Angol (37°50'S) de egagrópilas determinados por Greer (1965), y Osgood (1943) consideró a *T. e. soricinus* como subespecie válida y describió el tipo (ver Tate, 1933, p. 217) y posteriormente Solari (2003) resaltó sus diferencias con *T. e. elegans*. Sin embargo, la validez de la subespecie *T. e. soricinus* está en duda, dado la escasez de registros y características morfológicas externas utilizadas, de hecho, Mann (1978) y Tamayo & Frassinetti (1980) sugieren que *T. e. soricinus* es una variación adaptativa de la

forma típica en lugares fríos muy húmedos. Por lo tanto, estos autores no la reconocen como subespecie válida y sólo consideran a *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis* como subespecies válidas. Los caracteres diagnósticos según Tate (1993) que diferencian a las tres subespecies descritas son los siguientes: pelaje muy pálido, pelaje ventral grisáceo en la base y levemente desearrollado para *T. e. coquimbensis*. Color moderadamente oscuro, banda ventral media de un color y 15 mm de ancho para *T. e. elegans*. Color del pelaje muy oscuro, pelaje de un color sólo en la parte delantera del cuello para *T. e. soricinus*.

T. pallidior es la especie hermana de *T. elegans* (Giarla *et al.* 2010; Palma *et al.* 2014) que en Chile habita el Altiplano andino (19°S) y valles transversales (entre los Andes y la costa) del Desierto de Atacama, incluyendo zonas costeras en las quebradas de la región de Arica y Parinacota como Quebrada de Camarones (19°S), (Palma 1995; Meynard *et al.* 2002; Palma *et al.* 2002). Según Solari (2003), *T. pallidior* podría ser simpátrica con *T. e. coquimbensis* en el Desierto norte de Chile. Recientemente, Giarla *et al.* (2010) sugieren que *T. e. coquimbensis* y *T. e. elegans* tendrían una distribución simpátrica entre el P. N. Fray Jorge (30°40'S) y la localidad tipo Paiguano (30°02'S) de *T. e. coquimbensis*. Estos autores, en base a características morfológicas externas y a comparaciones de medidas corporales de un individuo de una localidad representativa de *T. e. elegans* (Fray Jorge, FMNH119487), diferencian esta subespecie de *T. e. coquimbensis* de Paiguano (FMNH22302). No obstante, los caracteres distintivos de *T. e. coquimbensis* mencionados por Tate (1931, 1933) concuerdan con los caracteres diagnósticos que Giarla *et al.* (2010) atribuyen a *T. pallidior*. Por lo tanto, sinonimizan a las yacas de los valles de Coquimbo con *T. pallidior*. Por otra parte, Palma *et al.* (2014), en estudio con el gen mitocondrial *cyt b* y gen nuclear TTR, entregan evidencia de un clado norte y sur en *T. elegans* y sugieren que el clado norte correspondería *T. e. elegans*, sin embargo, no usaron secuencias de la

localidad tipo Valparaíso. Al mismo tiempo, descartan que el clado *T. elegans* “norte” sea *T. e. coquimbensis* dado que no incluye secuencias de los valles de Coquimbo ni de la localidad tipo Paiguano. Los resultados sustentan que las yacas de los valles de Coquimbo son *T. e. coquimbensis*, estructuradas genéticamente de otras poblaciones de yacas de la región de Atacama y Coquimbo. La variación morfológica de los individuos de Paiguano asignados a *T. pallidior* por Giarla *et al.* (2010) serían el resultado de plasticidad fenotípica en *T. elegans* y no a diferencias de caracteres especie-específicos asignados a *T. pallidior*. Con estos antecedentes, se postula que la distribución de *T. e. coquimbensis* en los valles transversales de la región de Coquimbo habrían generado aislamiento geográfico, causando un taxon distinguible con diferenciación genética, como parte de la diversidad de *T. elegans*. Los objetivos de este trabajo fueron evaluar la validez de *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis*, y resolver el estatus taxonómico de las yacas de los valles de la región de Coquimbo. Para esto, se realizaron análisis filogenéticos basados en el marcador molecular mitocondrial *cyt b* que incluyeron dos especímenes de la localidad tipo de “*coquimbensis*” y uno de *T. e. elegans*. Además, evaluar la sinonimia a *T. pallidior* propuesta para las yacas de los valles de Coquimbo con una reconstrucción filogenética con secuencias de *T. pallidior*. Finalmente, evaluar si *T. elegans* y *T. pallidior* tienen una distribución simpátrica en los valles de la región de Coquimbo entre Fray Jorge y la localidad tipo Paiguano.

Materiales y métodos

Colectas y especímenes

Se realizó un muestreo de ejemplares mediante trampas Shermann (8×9×23cm; H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL), siguiendo las instrucciones de colecta y manipulación de mamíferos de la American Society of Mammalogists (Sikes *et al.* 2007).

Los individuos fueron sacrificados mediante una sobredosis de ketamina intraperitoneal y dislocación cervical. Se procesó cada individuo extrayendo sangre, hígado, corazón, pulmón, riñón y bazo, que fueron almacenados en nitrógeno líquido o frascos con etanol al 70% para posteriormente extraer ADN. Los especímenes y tejidos se depositaron en la Colección de Flora y Fauna “Profesor Patricio Sánchez Reyes” del Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile (SSUC). Los números de catálogo de cada tejido “voucher” se observan en la Tabla 1. Los acrónimos para las muestras de tejidos de otras colecciones son: the Museum of Southwestern Biology (MSB), Colección Zoológica de Zonas Áridas y Andinas, Universidad de Tarapacá (CZZA-UTA), Universidad Católica Kryovoucher (UCK), Oklahoma Collection of Genomic Resources, Sam Noble Oklahoma Museum of Natural History (OCGR), proyecto Localidades Tipo, PIP 6179 (CONICET), responsable Ulyses Pardiñas (LTU), colección de Ulyses Pardiñas (AC), y los catálogos de campo de Ulyses Pardiñas (UP), Jorge Pablo Jayat (JPJ), Daniel Udrizar Sauthier (DUS), Guillermo D’Elía (GD), Eduardo Palma (EP), Horacio Zeballos Patrón (HZP) y Randy Gladwell (RRG). Los voucher con los códigos 14, VII485, VI306 y VII70 corresponden a muestras del catálogo de campo de Daniel González Acuña.

Para evaluar la validez de *T. e. coquimbensis* y *T. e. elegans* se realizaron colectas de especímenes en la localidad tipo y áreas aledañas de ambas subespecies, Paiguano (30°02’14.6’’S, 70°27’26.0’’O; 1589 msnm) para *T. e. coquimbensis* y Las Docas, Valparaíso (33°8’20.38’’S, 71°42’12.46’’O; 85 msnm) para *T. e. elegans*. Para evaluar la sinonimia propuesta por Giarla *et al.* (2010) para las yacas de los valles de la región de Coquimbo se usó secuencias de *T. pallidior* de Chile, Perú, Bolivia y Argentina de GenBank y otras secuenciadas de este estudio (ver Tabla 1). Para evaluar la simpatría propuesta por Giarla *et al.* (2010) entre *T. elegans* y *T. pallidior* entre Fray Jorge (localidad

representativa de *T. elegans*) y Paiguano (localidad tipo de *T. e. coquimbensis*), se colectaron yacas en localidades de los valles de la región de Coquimbo (Reserva Nacional Las Chinchillas, Valle El Mauro, Los Pelambres, Chillepín y la localidad tipo Paiguano) y en la localidad costera de Fray Jorge.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico se extrajo de hígado, oreja o sangre utilizando Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, Madison, Wisconsin) o el procedimiento fenol-cloroformo (Longmire *et al.* 1998). Se usó el gen mitocondrial *cyt b* (1149 pares de bases) para un total de 45 individuos de 42 localidades. Se descargaron 28 secuencias de GenBank: (“*T. pallidior A*”, 12), (“*T. pallidior B*”, 10), (*T. elegans*, 5), (*T. tatei*, 2) y (*T. sp.*, 2). En este estudio se amplificaron 14 secuencias de *cyt b*: 11 de *T. elegans* y 3 de *T. pallidior*. Se usaron 16 localidades para *T. elegans* entre la región de Tarapacá y Metropolitana, y 22 localidades de *T. pallidior* de Chile, Perú, Bolivia y Argentina (Tabla 1). Para la amplificación de las secuencias se usaron los partidores L14724 (Irwin *et al.* 1991) y LBE13 (Palma *et al.* 2014). Las condiciones de PCR fueron: 8 minutos de denaturación inicial a 95°C, 30 ciclos con denaturación de 1,5 minutos a 94°C, 45 segundos de “annealing” a 46°C, 1,5 minutos a 72°C de extensión y extensión final de 8 minutos a 72°C. Los productos de PCR fueron purificados con QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGENTM Inc., Valencia, CA, USA) y enviados a secuenciar a MACROGEN Inc. (Seoul, Korea) o al servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile. Las secuencias fueron editadas y alineadas en Clustal W (Thompson *et al.* 1997) implementado en Bioedit (Hall 1999) usando los parámetros establecidos por defecto.

Análisis Filogenéticos

Para la reconstrucción filogenética se usó 41 haplotipos (ver Tabla 1). Los análisis se realizaron usando la aproximación de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Las reconstrucciones filogenéticas se enraizaron con el criterio de los “grupos externos”, usando dos secuencias de *Thylamys tatei* y dos de *Thylamys* sp (Tabla 1), especies hermanas de *T. elegans* y *T. pallidior* (Giarla *et al.* 2010, 2014; Palma *et al.* 2014). Para evaluar la validez de *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis*, se determinó la monofilia de ambas subespecies y la filiación de las secuencias de las localidades tipo de ambas formas. Para evaluar la sinonimia propuesta para las yacas de los valles de la región de Coquimbo a *T. pallidior*, se determinó mediante una aproximación filogenética si las yacas de estos valles conforman un grupo monofilético que contenga a la localidad tipo Paiguano, lo que entregaría evidencia que pertenecen a *T. e. coquimbensis* o por el contrario, la yacas de los valles de Coquimbo se asocian con un clado conformado por secuencias pertenecientes a *T. pallidior*, corroborando la sinonimia. Para evaluar si *T. elegans* y *T. pallidior* están en simpatria entre Fray Jorge y Paiguano, se determinó si algunas yacas de los valles de la región de Coquimbo se posicionaban en un clado correspondiente a *T. e. coquimbensis* con la localidad tipo Paiguano y otras con *T. pallidior*. La reconstrucción mediante MV y la selección del mejor modelo de sustitución nucleotídica se realizó usando el criterio de información de Akaike corregido (AICc-Akaike 1974) en el programa Treefinder (Jobb 2008). Se estimó el soporte de los nodos con 1000 pseudorélicas de bootstrap no paramétrico (Felsenstein 1985). Se consideró los valores de bootstrap > 70% como un alto sustento al clado (Wilcox *et al.* 2002). Los árboles basados en IB se construyeron mediante el método Bayesian Markov Chain Monte Carlo (BMCMC), para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos (Pagel & Meade 2004). En IB se hicieron 10000000

iteraciones, muestreando cada 1000 árboles para asegurar la independencia de cada muestra. Los primeros 1000 árboles fueron descartados para evitar incluir aquellos fuera de la zona de convergencia de la cadena de Markov. Como modelo de evolución de secuencias, se usó un "Modelo Mixto" (MM) de probabilidad basado en el modelo general de tiempo-reversible (GTR) (Rodríguez *et al.* 1990) para estimar la probabilidad de cada árbol (Pagel & Meade 2005). Este modelo toma en cuenta casos en que diferentes sitios del alineamiento evolucionan cualitativamente de distintas maneras, y no requiere previo conocimiento de estos patrones ni particionar los datos. Este análisis se realizó en el programa BayesPhylogenies (Pagel & Meade 2004). Para encontrar el mejor MM que describe la evolución de secuencias génicas, se estimó el número de matrices GTR mediante el método reversible-jump Markov Chain Monte Carlo (RJMCMC) (Pagel & Meade 2006). Este método visita desde una matriz simple a distintas mezclas de matrices GTR en proporción a su probabilidad *a posteriori*, saltando desde modelos simples a más complejos o viceversa, estimando el soporte del número de matrices GTR. La combinación de matrices con el menor número de parámetros que aumenta significativamente el valor de verosimilitud fue utilizado (1GTR + Γ en este caso) para computar el árbol consenso por la regla de la mayoría. El porcentaje de la muestra dentro de la zona de convergencia que muestra algún clado en particular constituye su valor de probabilidad *a posteriori*, donde valores de $p \geq 0.95$ se consideraron como evidencia de un buen soporte para un determinado clado (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

Resultados

Las filogenias reconstruidas bajo el criterio de MV e IB obtuvieron topologías similares, por lo tanto, se muestra el árbol de MV con los valores de sustento de bootstrap y probabilidad *a posteriori* de la IB (Fig. 1). Para las secuencias del gen *cyt b*, el AICc identificó al modelo TPM1uf+I+G como el mejor modelo de sustitución nucleotídica. Este modelo corresponde al Kimura 3 parámetros (Kimura 1981) con una frecuencia de las bases nucleotídicas desigual (uf), sitios invariantes (I) y tasa de distribución gamma (G). El valor de la proporción de sitios invariantes fue 0.5250 y del parámetro de la distribución gamma fue 1.0820. La proporción de los nucleótidos fue A = 0.2996, C = 0.2504, G = 0.1217 y T = 0.3284. Se obtuvieron 5 clados monofiléticos con alto sustento y probabilidad *a posteriori* (Fig. 1: Clados A, B, C, D y E). El clado A es el linaje *Loa*, el cual es hermano del clado B que corresponde a *T. e. coquimbensis* con las dos secuencias de Paiguano (Hap8 y Hap9). El clado C es hermano del clado (A, B) y corresponde a *T. e. elegans* con la secuencia de Las Docas, Valparaíso (Hap15). El nodo A (*Loa*)-B (*T. e. coquimbensis*) tiene un sustento de (68/0.86), el nodo *T. pallidior*-*T. elegans* (100/1) y el nodo “*T. pallidior* A” y “*Thylamys pallidior* B” (100/1). Los clados D y E están bien diferenciados del clado ((A,B)C) y concuerdan con “*T. pallidior* A” y “*T. pallidior* B” propuestos por Giarla *et al.* (2010), Giarla *et al.* (2014) y Palma *et al.* (2014). Los clados F (Hap38 y Hap39) y G (Hap 40 y Hap41) concuerdan con *T. sp* y *T. tatei* propuestos por Giarla *et al.* (2014) y Palma *et al.* (2014).

Discusión

T. elegans es un grupo monofilético hermano a *T. pallidior*, al igual que estudios anteriores (Giarla *et al.* 2010, 2014; Palma *et al.* 2014). *T. e. elegans* es validado, porque forma parte

de un clado con la localidad tipo Las Docas y localidades de la región de Valparaíso y Metropolitana (Fig 1, clado C). *T. e. coquimbensis* es una subespecie válida de *T. elegans*, formando un clado con la localidad tipo Paiguano y otros especímenes de la región de Atacama y Coquimbo. No se apoya la sinonimia a *T. pallidior* propuesta por Giarla *et al.* (2010) para yacas de los valles de Coquimbo, siendo efectivamente *T. e. coquimbensis*, aumentando su distribución a zonas costeras de la región de Atacama (Quebrada El León, Hap2 y Llanos de Challe, Hap3) y Coquimbo (Fray Jorge, Hap4 y Hap5) (Fig. 1, clado B). No existe simpatría para *T. e. coquimbensis* y *T. elegans* entre Fray Jorge y Paiguano. El clado B es *T. e. coquimbensis* incluyendo la localidad tipo Paiguano (Hap 8 y Hap9) y localidades de los valles de la región de Coquimbo (R. N. Las Chinchillas, Hap6, valle El Mauro, Hap7, Los Pelambres, Hap10 y Chillepín, Hap11) y la localidad costera Fray Jorge (Hap4 y Hap5). Ninguna localidad de los valles de Coquimbo entre Fray Jorge y Paiguano se agrupó con los clados “*T. pallidior* A” o “*Thylamys pallidior* B” (Fig. 1). Por lo tanto, *T. e. coquimbensis* no está en simpatría con *T. pallidior* como sugirió Giarla *et al.* (2010).

Se ha postulado el Desierto de Atacama como límite norte para *T. elegans* (Marquet 1994; Meynard *et al.* 2002; Palma *et al.* 2002; Braun *et al.* 2005). Sin embargo, existen registros de yacas en localidades del Desierto de Atacama (17°S-27°S): Pampa del Tamarugal (Carevic 2011), Cobija (Osgood 1943), desembocadura del río Loa (Spotorno *et al.* 1997; Palma *et al.* 2014), Paposo y Caldera (Meserve & Glanz 1978). En el actual trabajo se incorporó una secuencia de Quebrada El León (26°57'S) en el límite sur del Desierto de Atacama. Este espécimen se posicionó en el clado correspondiente a *T. e. coquimbensis* (Fig 1, clado B), resultado que descarta al Desierto de Atacama como límite norte de *T. elegans* como sugirió Palma *et al.* (2014). Las yacas del Loa serían la población más septentrional de *T. elegans* y lo suficientemente diferenciadas genéticamente de *T. e.*

coquimbensis y *T. e. elegans*, por lo tanto, podrían ser consideradas como una nueva subespecie del Loa (Fig 1, clado A), como lo sugirió Palma *et al.* (2014). Sin embargo, se requiere nuevas muestras de localidades aledañas para apoyar esta propuesta. Respecto a las yacas chilenas del clado D pertenecientes a “*T. pallidior* A” (Fig. 1), hay una secuencia de Alto Loa (Altiplano andino, 3322 msnm; Hap21, Fig.1 y Tabla 1), sugiriendo que las yacas del alto Loa son *T. pallidior*.

Finalmente, estos resultados resaltan la importancia de revalidar o evaluar las entidades taxonómicas sugeridas mediante el uso de marcadores moleculares y muestras de la localidad tipo de los taxa para resolver los conflictos taxonómicos, como la sinonimia a *T. pallidior* propuesta para las yacas de los valles de Coquimbo. Con esta aproximación, fenotipos altamente variables, como aquellos de las yacas de Paiguano, permite dar cuenta del efecto de complejas geografías, como lo son el Desierto de Atacama, los valles transversales de la región de Coquimbo y Chile Mediterráneo, sobre las distribución de las subespecies de *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis*. Futuros esfuerzos se deben enfocar en estimar el status taxonómico de *T. e. sorcinus* para generar un escenario taxonómico completo de este marsupial endémico de Chile Mediterráneo.

Leyenda de la figura

Fig. 1 Relaciones filogenéticas mediante MV basado en el gen mitocondrial *cyt b*. Se observan tres subespecies en *T. elegans*. El clado (A) en azul es la subespecie del Loa, clado (B) en celeste es *T. e. coquimbensis*, clado (C) en gris es *T. e. elegans*. El clado (D) en morado es “*T. pallidior* A” y el clado (E) en café es “*T. pallidior* B”. Los clados (F) y (G) en negro son los grupos externos *T. sp* y *T. tatei*. Los números de los nodos representan el valor de bootstrap de MV y probabilidad *a posteriori* de la IB.

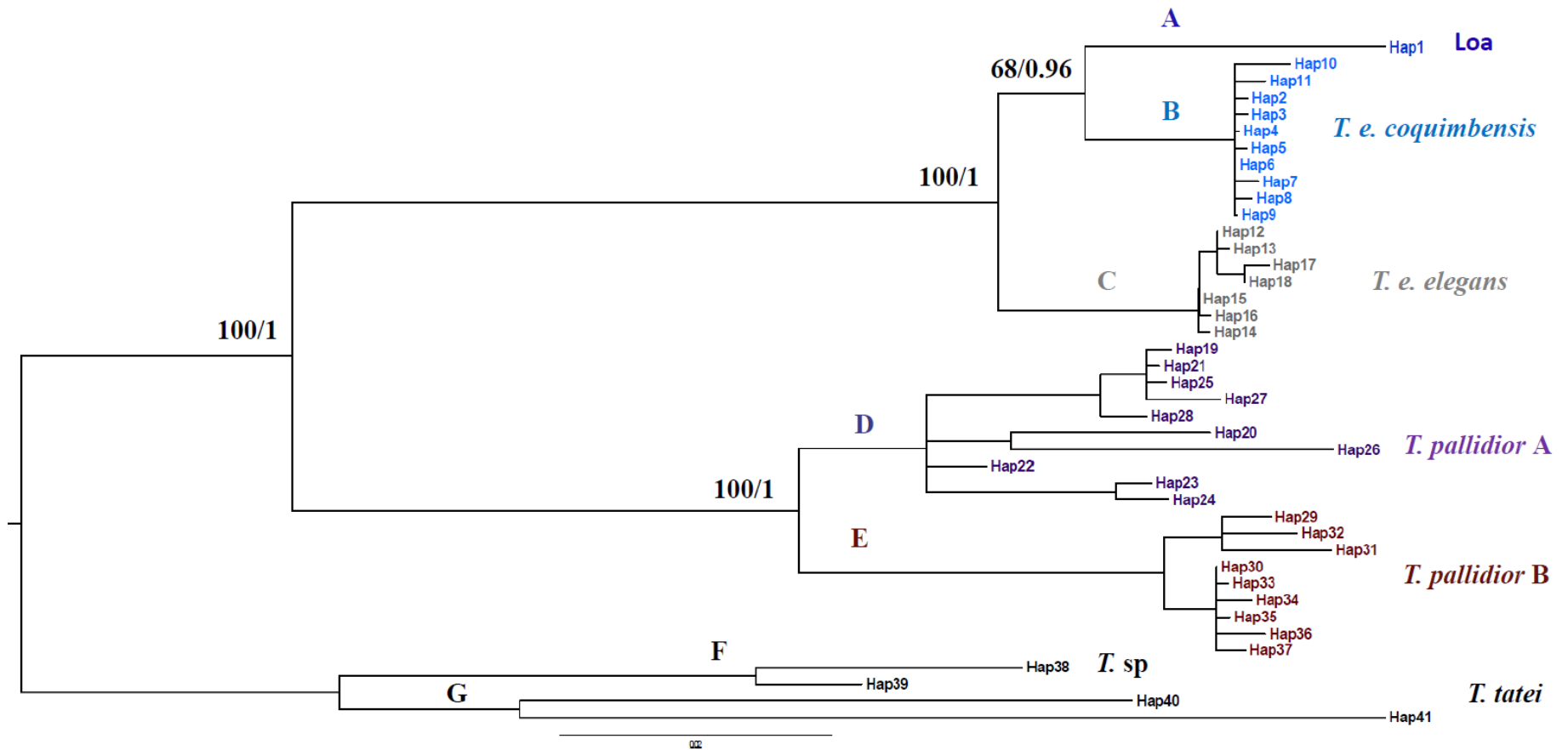


Fig. 1

Tabla 1 Lista de haplotipos, número de catálogo de cada “voucher”, número de acceso de GenBank, localidades de colecta, coordenadas y fuente bibliográfica (Fuentes: 1, Palma *et al.* (2014); 2, este estudio; y 3, Giarla *et al.* (2010). * = secuencias de GenBank.

Hap	Voucher	N° Acceso GenBank	Especies / Subespecies	Localidad	Región	Latitud	Longitud	País	Altitud	Fuente
1	SSUCMa519	KF164532*	<i>T. elegans</i> (Loa)	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43,75''S	70°03'30,35''O	Chile	12	1
1	SSUCMa520	KF164533*	<i>T. elegans</i> (Loa)	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43,75''S	70°03'30,35''O	Chile	12	1
2	CZZA-UTA252	KP994520	<i>T. e. coquimbensis</i>	Quebrada El León	Atacama	26°57'30,63''S	70°44'13,8''O	Chile		2
3	UCK21	KP994521	<i>T. e. coquimbensis</i>	Parque Nacional Llanos de Challe	Atacama	28°06'57,9''S	71°05'09,9''O	Chile	148	2
4	NK96879	KF164531*	<i>T. e. coquimbensis</i>	Parque Nacional Fray Jorge	Coquimbo	30°38'18,276''S	71°39'16,596''O	Chile	236	1
5	NK27583	HM583376*	<i>T. e. coquimbensis</i>	Parque Nacional Fray Jorge	Coquimbo	30°40'1,2''S	71°40'1,2''O	Chile	304	3
6	III14	KP994522	<i>T. e. coquimbensis</i>	Reserva Nacional Las Chinchillas	Coquimbo	31°30'S	71°06'O	Chile	589	2
7	UCK809	KP994523	<i>T. e. coquimbensis</i>	Valle El Mauro	Coquimbo	31°59'S	71°0'O	Chile	1014	2
8	UCK20	KP994524	<i>T. e. coquimbensis</i>	Paiguano	Coquimbo	30°02'14,6''S	70°27'26,0''O	Chile	1589	2
9	UCK23	KP994525	<i>T. e. coquimbensis</i>	Paiguano	Coquimbo	30°02'14,6''S	70°27'26,0''O	Chile	1589	2
10	NK96571	KP994526	<i>T. e. coquimbensis</i>	Los Pelambres	Coquimbo	31°49'13,7''S	70°34'56,1''O	Chile	1548	2
11	NK95622	KP994527	<i>T. e. coquimbensis</i>	Chillepín	Coquimbo	31°53'12,12''S	70°47'47,04''O	Chile	841	2
12	NK105407	KP994528	<i>T. e. elegans</i>	Quebrada de Córdova	Valparaíso	33°26'18,06''S	71°39'14,76''O	Chile	122	2
13	UCK807	KP994529	<i>T. e. elegans</i>	Viña Leyda	Valparaíso	33°34'08,1''S	71°22'22,3''O	Chile	214	2
14	NK27606	KP994530	<i>T. e. elegans</i>	Parque Nacional La Campana	Valparaíso	32°57'0''S	71°04'58,8''O	Chile	1264	2
15	UCK22	KP994531	<i>T. e. elegans</i>	Las Docas	Valparaíso	33°8'20,38''S	71°42'12,46''O	Chile	85	2
16	NK95971	KF164530*	<i>T. e. elegans</i>	Rinconada de Huechún	Metropolitana	33°1'3,9''S	70°49'1,31''O	Chile	781	1
17	NK95691	KP994532	<i>T. e. elegans</i>	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8,28''S	70°29'18,54''O	Chile	1673	2
18	NK95436	KP994533	<i>T. e. elegans</i>	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40,92''S	70°53'34,5''O	Chile	553	1
19	VII485	KP994534	<i>T. pallidior</i> A	Enquelga	Arica-Parinacota			Chile		2
20	VI306	KP994535	<i>T. pallidior</i> A	Putre	Arica-Parinacota			Chile		2
21	UCK481	KF164514*	<i>T. pallidior</i> A	Alto Loa	Antofagasta	21°56'49,6''S	68°36'37,3''O	Chile	3053	1
22	VII78	KP994536	<i>T. pallidior</i> A	Pampa del Tamarugal	Antofagasta			Chile		2
23	EP476	KF164515*	<i>T. pallidior</i> A	La Huaica	Taparacá	20°26'22''S	69°32'15''O	Chile	992	1
24	EP434	KF164582*	<i>T. pallidior</i> A	Quebrada de Camarones	Arica-Parinacota	19°11'25,3''S	70°16'07''O	Chile	97	1
25	HZP3083	KF164509*	<i>T. pallidior</i> A	Hacienda Ventilla, Huacullani	Puno	16°35'45,18''S	69°20'05,18''O	Perú	3800	1
26	RRG34	KF164518*	<i>T. pallidior</i> A	Aplao, Beringa, Castilla	Arequipa	16°20'44,09''S	72°28'37,64''O	Perú	680	1
27	NK23533	HM583386*	<i>T. pallidior</i> A	Serranía Sama	Tarija	21°26'59,99''S	64°52'1,2''O	Bolivia	3200	3
28	NK14721	HM583385*	<i>T. pallidior</i> A	68 km (por la carretera) N Comargo	Chuquisaca	20°8'59,99''S	65°16'58,8''O	Bolivia	3400	3
29	OCGR7279	HM583406*	<i>T. pallidior</i> B	16 km S y 1,8 km O Barrancas a lo largo del río de las Burras	Salta	23°24'57,6''S	66°12'21,6''O	Argentina	3521	3

29	OCGR2153	HM583393*	<i>T. pallidior</i> B	11 km E Humahuaca, 2 km E Pucará camino a Cianzo	Jujuy	23°11'59,99''S	65°14'34,799''O	Argentina	3505	3
30	UP793	KF164521*	<i>T. pallidior</i> B	Establecimiento San Nicolás, Meseta de Somuncurá	Río Negro	41°43'50''S	67°09'49''O	Argentina	884	1
30	UP397	HM583413*	<i>T. pallidior</i> B	Cerrito Piñón, Estancia Collón Curá	Neuquén	40°14'57''S	70°37'54''O	Argentina	608	3
30	DUS29	KF164522*	<i>T. pallidior</i> B	Bahía Cracker	Chubut	42°57'02''S	64°28'45''O	Argentina	73	1
31	AC47	HM583392*	<i>T. pallidior</i> B	La Tapera, Pampa de Achala	Córdoba	31°37'19,2''S	64°54'39,7''O	Argentina	1959	3
32	JPJ1292	KF164524*	<i>T. pallidior</i> B	Agua del Gauchi, Capayán	Catamarca	28°46'52''S	66°18'43''O	Argentina	2024	1
33	LTU77	HM583411*	<i>T. pallidior</i> B	Campamento base, Sierra de la Ventana	Buenos Aires	38°4'8,4''S	62°1'22,8''O	Argentina	50	3
34	OCGR4180	HM583401*	<i>T. pallidior</i> B	15 km N villa San José de Vinchina	La Rioja	28°43'1,20''S	68°17'34,8''O	Argentina	1681	3
35	OCGR43	HM583397*	<i>T. pallidior</i> B	3 km O Refugio militar General Alvarado	Mendoza	34°16'12''S	69°21'46,799''O	Argentina	2195	3
36	OCGR322	HM583395*	<i>T. pallidior</i> B	8 km O Complejo Astronómico El Leoncito	San Juan	31°46'58,8''S	69°25'4,8''O	Argentina	1966	3
37	OCGR460	HM583400*	<i>T. pallidior</i> B	15 km E Salinas del Bebedero	San Luis	33°31'58,8''S	66°29'16,8''O	Argentina	468	3
38	HZP357	KF164541*	<i>T. sp</i>	Acho, Ayo, Valle de los Vocanes, Castilla	Arequipa	15°39'47,67''S	72°18'16,02''O	Perú	1900	1
39	HZP37	KF164551*	<i>T. sp</i>		Lima	12°25'36''S	75°50'43''O	Perú	2680	1
40	MUSM23121	KF164555*	<i>T. tatei</i>	Pallasca, Pampas, 10 Km hacia Pallasca	Ancash	8°13'45,984''S	77°54'18,684''O	Perú	2650	1
41	MUSM10738	KF164557*	<i>T. tatei</i>	Chancay, Reserva Nacional Lachay	Lima	11°21'30''S	77°22'10''O	Perú	150	1



Capítulo 3

Determinantes biogeográficos de los linajes genéticos en *Thylamys elegans* (Didelphimorphia: Didelphidae).

Resumen

En *Thylamys* se han reportado los ríos como barreras a la dispersión, limitando la distribución actual e histórica de sus linajes. En *T. elegans* el río Maipo podría cumplir un rol en la estructuración genética del linaje norte y sur al ser recuperados como grupos recíprocamente monofiléticos en riberas opuestas de dicho río. En el presente estudio se evaluó esta hipótesis y el rol de otros ríos como barreras a la dispersión actual e histórica en la distribución de *T. elegans*. Se realizó una aproximación filogeográfica con el gen mitocondrial *cyt b* para 93 individuos de 37 localidades de *T. elegans*, complementando con análisis de delimitación de especies y estimación de áreas biogeográficas ancestrales. Los resultados sustentan que la diversidad genética de *T. elegans* está conformada por seis subespecies: *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis* anteriormente descritas y cuatro subespecies no descritas (Loa, Aconcagua, Sur 1 y Sur 2). El origen de estos linajes estaría asociado a ríos que influyeron en su estructuración a través del tiempo, apoyando la hipótesis ribereña, particularmente: el río Mataquito y Teno, habrían actuado como evento vicariante, estructurando las subespecies Sur 1 y Sur 2; y los ríos Quilimarí y Aconcagua, en conjunto con montañas de la región de Coquimbo y Metropolitana, actuaron como barreras a la dispersión sur en *T. e. coquimbensis* y la subespecie Aconcagua. Finalmente, la historia biogeográfica de *T. elegans* fue dominada por dispersión a gran distancia, ampliación de su distribución hacia áreas contiguas y eventos vicariantes. Esto habría sido favorecido por el

avance y retroceso de la vegetación y cambio del cauce de los ríos durante las glaciaciones del Plioceno y Pleistoceno. promoviendo el origen de los linajes genéticos de *T. elegans*.

Palabras claves: BioGeoBEARS, delimitación de especies, Dispersal Extinction Cladogenesis model, Hipótesis ribereña, “jump dispersal”, Poisson Tree Processes, vicarianza.

Introducción

La hipótesis ribereña asume que las poblaciones animales de diferentes riberas comienzan a quedar progresivamente aisladas de otras, y predice que las poblaciones de una ribera deberían ser recíprocamente monofiléticas a la ribera opuesta (Patton & da Silva 1998; Bonvicino & Weksler 2012). En mamíferos terrestres, existen tres patrones de estructura filogeográfica relacionados a la hipótesis ribereña: 1) poblaciones de riberas opuestas de un río que comparten haplotipos y forman un árbol genealógico que carece de diversificación. En estos casos los ríos no actuarían como barreras al flujo génico; 2) poblaciones hermanas recíprocamente monofiléticas en cada ribera opuesta de un río, actuando como barreras al flujo génico y siendo un factor de especiación; y 3) poblaciones disyuntas que tienen contacto secundario, con cada ribera opuesta de un río presentando un clado que comparte su ancestro común más reciente con otras poblaciones de la misma ribera (Patton & da Silva 1998; Patton *et al.* 2000; Bonvicino & Weksler 2012).

Los ríos se han propuesto como límites geográficos de distribución y barreras al flujo génico en algunas especies de didélfidos: Río Amazonas en *Philander andersoni*, *P. milchennyi* y *Marmosa murina* (Patton & da Silva 1997; Faria *et al.* 2014); Ríos Paraná y Paraguay en *Marmosa constantinae* y *M. paraguayana* (de la Sancha *et al.* 2012) y *Philander frenatus* y *P. opossum* (Chemisquy & Flores 2012). *Didelphis aurita* (Cerqueira & Tribe

2008), *Caluromys lanatus*, *Chironectes minimus*, *Metachirus nidicaudatus*, *Gracilinanus agilis*, *Marmosa paraguayana* y *Monodelphis brevicaudis* al este del río Paraguay (D' Elia & de la Sancha 2014) y *Cryptonanus unduaviensis* al oeste de dicho río (Teta *et al.* 2009; Voss *et al.* 2009); Río São Francisco en *G. agilis* (Faria *et al.* 2013).

En *Thylamys*, se ha propuesto un rol de los ríos en: Argentina, *T. citellus* y *T. pulchellus* (río Paraná); *T. pulchellus* y *T. pusillus* (río Bermejo), *T. pusillus* (río Paraguay) como límite occidental, *T. citellus* entre el río Paraná y Uruguay (Teta *et al.* 2009). “*T. pusillus A*” al norte del río Pilcomayo, “*T. pusillus B*” al sur y “*T. pusillus C*” entre los ríos Paraná y Uruguay (Giarla *et al.* 2014). Río Paraguay en los ancestros de *T. macrurus* y *T. venustus-T. sponsorius*, (*T. macrurus* al este y *T. venustus-T. sponsorius* al oeste); Río Paraná para separar a “*T. pusillus C*” de “*T. pusillus A*” y “*T. pusillus B*”, “*T. pusillus C*” en la Mesopotamia, y “*T. pusillus A*” y “*T. pusillus B*” al oeste del río Paraguay (Giarla & Jansa 2014). En Perú, el río Cañete para *T. tatei* y *T. sp.*, y en Chile, el río Maipo para *T. elegans* “norte” y *T. elegans* “sur” (Palma *et al.* 2014).

Dado los antecedentes reportados para varias especies de la familia Didelphidae, los ríos tendrían un rol en la diferenciación de varios linajes de didélfidos, y particularmente se ha sugerido que el río Maipo sería importante en la diversificación de los clados norte y sur de *T. elegans* (Palma *et al.* 2014). Aunque, se desconoce el efecto de este y otros ríos en la diversificación de las subespecies de *T. elegans* propuestas en literatura. El objetivo de este estudio fue evaluar mediante una aproximación filogeográfica el rol del río Maipo y otros ríos de Chile en la estructuración de poblaciones de *T. elegans* e identificar sus linajes y barreras históricas que determinaron la estructura genética actual. Se postula como hipótesis que la naturaleza terrestre y arborícola de *T. elegans* habría provocado que las barreras ribereñas constituyan efectivos estructuradores de la diversidad genética como

evento vicariante o barrera a la dispersión, generando históricamente su divergencia y diferenciación intraespecífica de linajes. Esta estructura se habría mantenido hasta la actualidad con los ríos como límites de distribución de linajes de *T. elegans*.

Materiales y Métodos

Colectas

Se muestreó la distribución completa de *T. elegans*, obteniendo yacas desde el norte de la Desembocadura del río Loa (21°S) hasta Tregualemu (35°S) (Fig. 1, Tabla 1). Los ejemplares fueron colectados con trampas Sherman (8×9×23cm; H. B. Sherman Traps, Inc., Tallahassee, FL). Los individuos capturados se sacrificaron con sobredosis de ketamina intraperitoneal y dislocación cervical. Se siguieron las recomendaciones de colecta y manipulación según la American Society of Mammalogists (Sikes *et al.* 2007). De cada individuo se extrajo muestras de sangre, hígado, corazón, pulmón, riñón y bazo, las que fueron almacenadas en criotubos preservados en nitrógeno líquido o frascos con etanol al 70%. Los especímenes se depositaron en la colección de Flora y Fauna Prof. Patricio Sánchez Reyes del Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile (SSUC) usando un número de catálogo específico para cada individuo (Tabla 1). Los acrónimos para las muestras de tejidos de otras colecciones son: the Museum of Southwestern Biology (MSB), catálogo especial que usa voucher de la colección MSB y SSUC, Departamento de Ecología, Pontificia Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile (NK), Universidad Católica Kryovoucher (UCK), Colección Zoológica de Zonas Áridas y Andinas, Universidad de Tarapacá (CZZA-UTA), Colección de Mamíferos del Centro Nacional Patagónico, Puerto Madryn, Chubut, Argentina (CNP) y los catálogos de

campo de Guillermo D'Elía (GD), Eduardo Palma (EP) y Ulyses Pardiñas (UP). Los códigos 14, III70 y IV62 corresponden al catálogo de campo de Daniel González Acuña.

Extracción de ADN, amplificación y secuenciación

El ADN genómico se extrajo con el procedimiento fenol-cloroformo (Longmire *et al.* 1998). Se secuenció el gen mitocondrial *cyt b* completo (1149 pares de bases) para 93 individuos de *T. elegans* de 37 localidades (Tabla 1). Las reacciones de amplificación por PCR siguieron los protocolos descritos en Palma *et al.* (2014). Los productos de PCR fueron purificados usando QIAquick PCR Purification Kit (QUIAGENTM Inc., Valencia, CA, USA), y secuenciados en MACROGEN Inc. (Seoul, Korea). Las secuencias fueron editadas en el programa Bioedit (Hall 1999) y alineadas en el programa Clustal W (Thompson *et al.* 1997) usando los parámetros por defecto. Las secuencias fueron codificadas a su respectivo aminoácido en el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011) para verificar errores en el marco de lectura y la presencia de codones de término.

Reconstrucción filogenética

Para los análisis de reconstrucción filogenética se utilizaron los 49 haplotipos obtenidos a partir de las 93 secuencias utilizadas (ver Tabla 1). Las secuencias alineadas fueron analizadas filogenéticamente utilizando los criterios de Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). El árbol se enraizó usando como “outgroup” a “*T. pallidior A*” y “*T. pallidior B*” (Tabla 1), especie hermana de *T. elegans* y a *T. tatei* y *T. sp* que pertenecen al clado que incluye a *T. elegans* (Giarla *et al.* 2010, 2014; Palma *et al.* 2014). Los análisis de MV se realizaron en el programa Treefinder (Jobb 2008) y con el criterio de información Akaike corregido (AICc-Akaike 1974) se seleccionó el mejor modelo de sustitución

nucleotídica que se ajustó a los datos. El soporte de los nodos en MV se evaluó con 1000 pseudoréplicas de “bootstrap” no paramétrico (Felsenstein 1985), considerando como un alto sustento los nodos con un valor de bootstrap $> 70\%$ (Wilcox *et al.* 2002). La reconstrucción filogenética mediante IB se hizo con el método “Bayesian Markov Chain Monte Carlo” (BMCMC) para estimar la probabilidad *a posteriori* de los árboles filogenéticos (Pagel & Meade 2004). En la IB se realizaron 10000000 iteraciones, muestreando cada 1000 árboles para asegurar la independencia de las muestras. Se descartaron los primeros 1000 árboles, evitando incluir árboles sub-óptimos en la zona de convergencia de la cadena de Markov. Como modelo de evolución de secuencias se usó un “Modelo Mixto” (MM) basado en el modelo general de tiempo-reversible (GTR; Rodríguez *et al.* 1990) para estimar la probabilidad de cada árbol (Pagel & Meade 2005) usando el programa BayesPhylogenies (Pagel & Meade 2004). Para encontrar el mejor MM de evolución de secuencias, se estimó el número de matrices GTR con el método “reversible-jump Markov Chain Monte Carlo” (RJMCMC-Pagel & Meade 2006). Se usó la combinación de matrices con el menor número de parámetros que aumentó significativamente el valor de probabilidad (2GTR + Γ en este caso) para computar el árbol consenso por la regla de la mayoría. El porcentaje de la muestra dentro de la zona de convergencia que muestra algún clado en particular constituye su valor de probabilidad *a posteriori*, donde valores de $p \geq 0.95$ se consideraron como evidencia de un buen soporte para un determinado clado (Huelsenbeck & Ronquist 2001).

Distancia corregida (K2P) y delimitación de especies

Para evaluar si los linajes encontrados corresponden a variabilidad intraespecífica dentro de *T. elegans* o un complejo de especies, se calculó la distancia corregida Kimura 2-parámetros (K2P) en el programa MEGA 5.0 (Tamura *et al.* 2011) y se comparó con valores de otros trabajos en didélfidos y el género *Thylamys* (Patton *et al.* 1996; Giarla *et al.* 2010; Caramischi *et al.* 2011).

Para determinar mediante secuencias nucleotídicas especies putativas se usó el modelo Poisson Tree Processes (PTP) para delimitar especies sobre un árbol filogenético enraizado (Zhang *et al.* 2013). Este método es un criterio operacional de delimitación de especies que utiliza la teoría de coalescencia y el concepto filogenético de especie (Baum & Shaun 1995). En este método, especiación o eventos de ramificación son modelados en base al número de sustituciones representadas por el largo de ramas y sólo requiere de un árbol filogenético. Estima “clusters” (unidades panmícticas) de especies usando un árbol filogenético reconstruido bajo el criterio de MV en base a las secuencias y asume que cada sustitución nucleotídica tiene una probabilidad fija de ser la base de un evento de especiación (Pons *et al.* 2006). Entrega una determinación exacta de las especies a pesar de la similitud de las secuencias entre las especies comparadas. No requiere definir un umbral de similitud de secuencias e identifica la tasa de ramificación en la transición intra e interespecífica usando directamente el número de sustituciones nucleotídicas. Incorpora el número de sustituciones en el modelo de especiación y asume que la probabilidad que una sustitución produzca especiación sigue una distribución de Poisson. La longitud de las ramas del árbol de MV se asume que puede ser generada por dos clases independientes de eventos de Poisson: especiación y coalescencia. Por lo tanto, modela eventos de

coalescencia y especiación relacionados al número de sustituciones. Además, para delimitar Unidades Evolutivas Significativas (Evolutionary Significant Units, ESU; Ryder 1986) usa algoritmos heurísticos para identificar la clasificación de ramas más probable en procesos poblacionales y de nivel de especies. La principal ventaja de esta metodología es que se aplica en árboles ultramétricos y no necesita la estimación de tiempos de divergencia (Tang *et al.* 2014).

Los análisis se hicieron en el “web server” de PTP disponible en <http://species.hits.org/ptp/> (Zhang 2013) usando como archivo de entrada el árbol filogenético de los 49 haplotipos con mejor valor de verosimilitud y con largo de ramas obtenido en el servidor RaxML (Stamatakis 2006) con el modelo GTR + G. El análisis con el método PTP se corrió por 200000 MCMC generaciones, con un “thinning” de 100 y un “burn-in” de 25%. Se confirmó visualmente la convergencia de las cadenas MCMC como recomiendan Zhan *et al.* (2013). Valores de soporte de un grupo monofilético mayores a 0,95 son necesarios para que sea considerado como una especie válida (Zhang 2013; Zhang *et al.* 2013).

Estructuración genética

Para explorar la estructura subpoblacional y patrones de distribución geográfica, inicialmente se utilizó el programa NETWORK versión 4.5.1.6 (<http://www.fluxusengineering.com>) para generar una red de haplotipos mediante el algoritmo de Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999). Se usó un valor de epsilon de 10 y una tasa de transición y transversión (Tv/Ts) de 10. Luego, para evaluar la presencia de estructuración poblacional en un marco bayesiano, se utilizó el paquete GENELAND v 4.0 (Guillot *et al.* 2005) implementado en el ambiente computacional R v 3.0.2 (Ihaka & Gentleman 1996). Este paquete permite distinguir el número de poblaciones o “clusters”

(K), sus límites geográficos y la probabilidad de asignación de individuos a estas agrupaciones geográficas (Guillot *et al.* 2005, 2008). Este análisis implementa un modelo de estadística poblacional con inferencia bayesiana en un conjunto de individuos georreferenciados pertenecientes a una de varias poblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se determina el mejor agrupamiento de las muestras usando su información genética y geográfica, determinando discontinuidades genéticas entre las poblaciones de los genotipos diferenciados. Se toma en cuenta la incerteza en la localización de los individuos dentro de la muestra. Para determinar esto usa la técnica de muestreo computacional MCMC. Se utiliza como prior para la IB la información geográfica.

Se determinó el número de “clusters” (K) con un rango de 1 a 10. Se realizaron 10 corridas independientes de 5000000 iteraciones muestreando cada 1000 pasos, con un período de “bur-in” de 4900 y usando los modelos de frecuencia no correlacionados y correlacionado y un número máximo de “clusters” K de 37 (dado que es el número de localidades usadas en este estudio). Esto se hizo para estimar los parámetros del modelo y probabilidades *a posteriori* de pertenencia a un grupo o “cluster”. Se usó el modelo de frecuencias correlacionadas dado que fue el elegido luego de realizar un Factor de Bayes comparando un modelo de frecuencias no correlacionadas y correlacionadas. Además, el modelo de frecuencias correlacionado incorpora un escenario más realista dado que más a menudo las frecuencias alélicas tienden a ser similares en diferentes poblaciones (Nicholson *et al.* 2002; Balding 2003). El modelo de frecuencias correlacionadas es la manera biológicamente más correcta de realizar inferencias y puede ser más poderoso en detectar sutiles diferencias (Guillot *et al.* 2005). Luego, se fijó el valor de K en 6 considerando la distribución de probabilidades del parámetro. Las 5 corridas fueron post-procesadas quemando el 5% de las primeras iteraciones y se obtuvo la probabilidad *a*

posteriori de asignación de cada individuo a una población y a cada pixel en el dominio espacial. Con ello, se obtuvo un histograma con la probabilidad *a posteriori* con la estimación de K. El número máximo de núcleos de teselación de Poisson-Voronoi se fijó en 279 por ser el triple de los 93 genotipos usados en el análisis (Guillot *et al.* 2005, 2008).

Tiempos de divergencia

Para entender los procesos de divergencia y estructuración en un contexto histórico se estimaron los tiempos de divergencia de los linajes de *T. elegans* en el programa BEAST 1.6.2 (Drummond & Rambaut 2007). Para buscar el mejor modelo de reloj molecular, se utilizó el Factor de Bayes para comparar cuatro modelos de reloj (estricto, relajado lognormal no correlacionado, relajado exponencial no correlacionado y local aleatorio), dado que es el marco teórico más sólido para comparaciones de modelos en un marco bayesiano (Drummond & Rambaut 2007). Se usó el Factor de Bayes (Gelman *et al.* 1995) que compara la verosimilitud marginal de los modelos observados, dado que es la integral de la verosimilitud de los modelos sobre todos los valores de los parámetros y sobre todos los árboles filogenéticos posibles. Como la verosimilitud marginal es difícil de calcular, se usó el método propuesto por Newton & Raftery (1994) basado en un bootstrap de verosimilitud ponderado con las modificaciones propuestas por Suchard *et al.* (2001) implementadas en el programa Tracer v1.5. Las estimaciones fueron obtenidas usando la importancia de muestreo en Tracer con 1000 réplicas de bootstrap (Suchard *et al.* 2005). Se usó un modelo de reloj molecular relajado lognormal no correlacionado que fue elegido con el Factor de Bayes. Como *prior* se usó un modelo de evolución de secuencias GTR + Γ y un proceso de especiación de Yule. Como puntos de calibración, se usó la divergencia de *T. pallidior-T. elegans* estimada en 6,11 (HPD: 5,92-6,3) Maa y *T. tatei-T. sp* en 4,65 (HPD:

4,46-4,85) (Palma *et al.* 2014). La estimación de la distribución *a posteriori* se obtuvo a través del método MCMC con 20000000 iteraciones y se descartaron 10000 para lograr la convergencia de la distribución de la probabilidad *a posteriori*, muestreando los parámetros cada 10000 pasos. La convergencia de las muestras obtenidas mediante el método de MCMC se visualizó en el programa TRACER v1.5 con un 10% de las iteraciones descartadas (Rambaut & Drummond 2007). La examinación visual del muestreo mediante MCMC se hizo en el programa Tracer v1.5 y sugirió que cada cadena de Markov realizó un muestreo adecuado y presentó una distribución de probabilidades similar. Además, se verificó que el tamaño efectivo del muestreo de todos los parámetros de interés tuviera valores mayores que 500. La credibilidad máxima por grupo monofilético se computó en el programa TreeAnnotator v 1.7.0 (Rambaut & Drummond 2013).

Distribución ancestral de los linajes de T. elegans

Se hizo una reconstrucción del área biogeográfica ancestral de cada nodo, para inferir los procesos de biogeografía histórica de vicarianza, expansión y contracción de distribución y dispersión a gran distancia involucrados en la diversificación y estructuración de los linajes de *T. elegans*. Para esto se usó el árbol ultramétrico de máxima credibilidad obtenido anteriormente, permitiendo proponer un escenario temporal y compararlo con otras hipótesis biogeográficas propuestas para la diferenciación de *T. elegans* (Palma 1995; Meynard *et al.* 2002; Palma *et al.* 2002) y del grupo “*elegans*” (*T. elegans*, *T. pallidior*, *T. tatei* y *T. sp*; Giarla *et al.* 2010, Giarla & Jansa 2014; Palma *et al.* 2014).

Se usó el paquete BioGeoBEARS (‘BioGeography with Bayesian Evolutionary Analysis in R Scripts’, Matzke (2013a) <http://cran.r-project.org/web/packages/BioGeoBEARS/index.html>) para inferir las áreas ancestrales de

los clados de *T. elegans* y otras especies del grupo “*elegans*”. Este análisis reconstruye la distribución ancestral de cada nodo del árbol filogenético calibrado con la diversidad intraespecífica colapsada, con un representante de cada uno de los seis linajes de *T. elegans* y para “*T. pallidior A*”, “*T. pallidior B*”, *T. tatei* y *T. sp.* Este paquete usa un método de MV similar al del programa LAGRANGE (Ree *et al.* 2005; Ree & Smith 2008). BioGeoBEARS infiere áreas ancestrales optimizadas en cada nodo interno y calcula valores de MV de los estados ancestrales como eventos de especiación. Este análisis modela la transición entre estados discretos de rangos biogeográficos a lo largo de las ramas del árbol filogenético en función del tiempo. Este programa permite la implementación del modelo DEC de LAGRANGE (Dispersal Extinction Cladogenesis) y un nuevo modelo llamado BioGeoBEARS DEC + J (ver see Ree *et al.* 2005 y Matzke 2013a, b para mayores detalles). El modelo DEC tiene dos parámetros libres: *d* (tasa de dispersión, *i. e.* tasa de adición de distribución a lo largo de una rama de un árbol filogenético) y *e* (tasa de extinción, *i. e.* tasa de pérdida local de distribución a lo largo de las ramas de un árbol filogenético). El modelo DEC + J le da peso a la dispersión a gran distancia, que asemeja un proceso de especiación por efecto fundador. Cada modelo permite un diferente subgrupo de posibilidades biogeográficas, explorando el rol de diferentes fenómenos como dispersión, vicarianza y extinción (ver Matzke 2013a, b y Fig. 5 de Buckner *et al.* 2014). Estos procesos biogeográficos son implementados en un marco de MV como parámetros libres estimados desde los datos. BioGeoBEARS usa unidades biogeográficas definidas y una de las desventajas del modelo DEC es que deja fijo el modelo de cladogénesis. Los rangos geográficos de un linaje ancestral son heredados a dos linajes hijos por medio de una variedad de posibles escenarios cladogénéticos como simpatría, parapatría o vicarianza, que tienen igual probabilidad de ocurrencia y no discriminan entre escenarios alternativos.

Una ventaja del modelo DEC + J es que agrega el tercer parámetro libre J que representa dispersión a gran distancia, permitiendo que un linaje hijo puede dispersar a un área no adyacente al área geográfica ancestral, asemejando especiación por efecto fundador.

Para este análisis se realizó una exhaustiva búsqueda bibliográfica y se hizo una matriz con la distribución de cada linaje con la ausencia o presencia de éstos en cada provincia biogeográfica. Se usó la clasificación de Morrone (2002, 2006) que se detalla a continuación: A, Atacama (18-28°S); B, Puna (Bolivia, Norte de Argentina y Chile, sur de Perú); C, Coquimbo (28-32°S); D, Santiago (32-34°S); y E, Maule (34-37°S). Los linajes de *T. elegans* habitan las siguientes provincias biogeográficas: linaje Loa en Atacama, *T. e. coquimbensis* en Atacama y Coquimbo, linaje Aconcagua en Santiago, *T. e. elegans* en Santiago, linaje Sur 1 en Santiago y Maule, y linaje Sur 2 en Maule. Como *T. pallidior* es la especie más ampliamente distribuida (Desierto Costero Peruano, Atacama, Prepuna, Puna, Desierto del Monte, Estepa Patagónica y Pampa), se codificó “*T. pallidior* A” en Atacama y Puna; y “*T. pallidior* B” en noreste y sureste de los Andes. *T. sp* se codificó en Puna y *T. tatei* en Desierto Costero Peruano. Finalmente, para seleccionar entre los modelos DEC y DEC+J se usó una prueba de razón de verosimilitud (LRT) que sustenta que el mejor modelo es el DEC + J que fue utilizado para inferir los eventos biogeográficos y áreas más probables de distribución ancestral. La probabilidad de áreas ancestrales fue computada para cada nodo y graficada en un cronograma por regla de la mayoría usando scripts en R. El máximo número de áreas se dejó en 2.

Este análisis biogeográfico permite inferir eventos vicariantes, expansión y contracción del rango de distribución y dispersión a gran distancia para cada nodo de la filogenia. Si se infiere que en un nodo hubo un evento vicariante, se puede sugerir que ríos actuaron como evento vicariante de un linaje ancestral ampliamente distribuido si las dos

ramas del nodo representan linajes estructurados filogeográficamente y la separación de su distribución geográfica coincide con un río. Por otra parte, se puede inferir que un linaje expandió su rango de distribución, no habitando más allá de cierta barrera geográfica como un río o cordón montañoso. En estos casos, se puede sugerir que dicha barrera geográfica impidió que el linaje continuara expandiendo su distribución más allá.

Resultados

Reconstrucción Filogenética

Dado que las filogenias con MV e IB entregaron topologías similares, se muestra sólo el árbol de MV con los valores de bootstrap y probabilidad *a posteriori* de cada nodo (Fig. 2). El AICc identificó al modelo TrN + I + Γ como el mejor modelo de sustitución nucleotídica. La proporción de sitios invariantes fue de 0,5049 y el parámetro de la distribución gamma fue de 0,6729. La proporción de los nucleótidos fue A = 0,3011, C = 0,2575, G = 0,1215 y T = 0,3200. En las topologías con los dos criterios de reconstrucción filogenética se recuperan seis grupos monofiléticos para *T. elegans* con un alto sustento y probabilidad *a posteriori* (Fig. 2). Se observan dos clados principales con un soporte máximo (100/1). Un clado está conformado por los linajes Sur 1 y Sur 2, y el otro agrupa a *T. e. elegans* basal al nodo (*T. e. coquimbensis*, (Loa, Aconcagua)) con un alto sustento (71/0,99). El linaje Loa se distribuye al norte de la Desembocadura del río Loa (21°25'S) (1 localidad, n =6). El linaje Aconcagua desde Longotoma (32°16'S) hasta Hijuelas (32°48'S), abarca unos 100 km desde el río Quilimarí y montañas adyacentes hasta el río Aconcagua (7 localidades, n = 15). *T. e. coquimbensis* con dos especímenes de la localidad tipo Paiguano (30°2'S) y localidades desde la Quebrada El León (26°57'S) hasta el Valle El Mauro (31°58'S). Su límite sur es el río Quilimarí y montañas adyacentes (8 localidades,

n = 19). *T. e. elegans* desde Las Docas (33°8'S), cercano a la localidad tipo Valparaíso, y muestras desde el P. N. La Campana (32°57'S) hasta viña Leyda (33°34'S), entre el río Aconcagua y el Maipo (10 localidades, n = 33). El linaje Sur 1, se distribuye desde San Enrique (33°53'S) a Duao (34°52'S), entre el río Maipo hasta el Mataquito y Teno (7 localidades, n = 13). Finalmente, el linaje Sur 2 con muestras desde Los Queñes (35°0'S) hasta Tregualemu (35°56'S), distribuyéndose entre el río Mataquito y Teno hasta Tregualemu (4 localidades, n = 7) (Fig. 2). El Hap48 y Hap49 son los grupos externos y concuerdan con “*T. pallidior* A” y “*T. pallidior* B” propuestos por Giarla *et al.* (2010), Giarla *et al.* (2014) y Palma *et al.* (2014).

Distancia corregida (K2P) y delimitación de especies

Los valores de distancia corregida (K2P) se observan en la Tabla 2. Los valores van desde 2% entre Sur 1 y Sur 2 hasta 11,9% entre Loa y Sur 1. Los cuatro linajes al norte del Maipo (Loa, *T. e. coquimbensis*, Aconcagua y *T. e. elegans*) comparados con los dos al sur del Maipo (Sur 1 y Sur 2) entregaron un valor de 9,7%. El análisis de delimitación de especies PTP sustenta seis linajes con un valor de $p > 0,5$ usando la aproximación de MV e IB. Sin embargo, ningún valor de sustento de los putativas especies fue mayor a 0,91; valor necesario para ser consideradas como especies válidas (Zhang 2013; Zhang *et al.* 2013).

Estructuración genética

Los haplogrupos al norte del Maipo (Loa, *T. e. coquimbensis*, Aconcagua y *T. e. elegans*) y sur del Maipo (Sur 1 y Sur 2), están separados por 55 pasos mutacionales (Fig. 3). Al sur del río Maipo se observan dos haplogrupos que corresponden a la subespecie Sur 1 y Sur 2 que están separados por 18 pasos mutacionales. Los cuatro haplogrupos al norte del río

Maipo son los que corresponden a las subespecies *T. e. elegans*, *T. e. coquimbensis*, subespecie Aconcagua y subespecie Loa. *T. e. elegans* está separado de *T. e. coquimbensis* por 31 pasos mutacionales y *T. e. coquimbensis* de la subespecie Loa por 34 pasos mutacionales. A las subespecies de Aconcagua y Loa las separan 32 pasos mutacionales. A las subespecies Sur 1 y Sur 2 las separa el río Mataquito y Teno. A *T. e. elegans* y la subespecie de Aconcagua las separa el río Aconcagua. A la subespecie de Aconcagua y *T. e. coquimbensis* las separa el río Quilimarí. Por último, la subespecie del Loa habita al norte de la desembocadura del río Loa.

La detección de discontinuidades genéticas basadas en la variabilidad individual mediante el programa GENELAND entregó un número de “clusters” de $K = 6$ (Fig. 4). El “cluster” 1 corresponde a la subespecie del Loa al norte de la Desembocadura del río Loa. El “cluster” 2 es *T. e. coquimbensis* desde Quebrada El León hasta el río Quilimarí y montañas adyacentes. El “cluster” 3 es la subespecie de Aconcagua desde el río Quilimarí y montañas adyacentes hasta el río Aconcagua. El “cluster” 4 es *T. e. elegans* desde el río Aconcagua hasta el río Maipo. El “cluster” 5 es la subespecie Sur 1 desde el río Maipo hasta el Mataquito y Teno. El “cluster” 6 es la subespecie Sur 2 desde el Mataquito y Teno hasta Tregualemu (Fig. 4). El “cluster” de *T. e. coquimbensis* abarca unos 550 km, y la suma de los “clusters” de las subespecies de Aconcagua, *T. e. elegans*, Sur 1 y Sur 2 abarcan unos 365 km (Fig. 4).

Tiempos de divergencia

La estimación de los tiempos de divergencia fue de 6,11 (HPD: 5,92-6,3) Maa (Mioceno tardío) para el nodo *T. pallidior-T. elegans* (Fig. 5). El nodo que separa los clados norte-centro al norte del Maipo de los del sur, se estimó en 3,14 (HPD: 2,95-3,33) Maa. El nodo

que separa *T. e. elegans* de *T. e. coquimbensis*, subespecie Loa y Aconcagua en 1,84 (HPD: 1,41-2,27) Maa. La divergencia entre *T. e. coquimbensis* y las subespecies del Loa y Aconcagua en 1,41(HPD: 1,07-1,8) Maa. La divergencia entre las subespecies del Loa y Aconcagua fue de 1,28 (HPD: 0,91-1,64) Maa. La divergencia entre las subespecies Sur 1 y Sur 2 en 0,81 (HPD: 0,48-1,2) Maa (Fig. 5). Respecto a los tiempos de divergencia de las otras especies del clado Andino-Costero (*T. pallidior*, *T. tatei* y *T. sp.*; Palma *et al.* 2014), se estimó en 3,35 (HPD: 3,16-3,54) Maa para “*T. pallidior* A”y “*T. pallidior* B”. La divergencia de *T. sp* y *T. tatei* en 4,65 (HPD: 4,46-4,85) Maa, y la divergencia *T. pallidior*-*T. elegans* de *T. tatei*-*T. sp* en 7,64 (HPD: 6,61-8,73) Maa.

Distribución ancestral de los linajes de T. elegans

El modelo que mejor se ajustó a la filogenia y distribución según la prueba de razón de verosimilitud (LRT = 6,5864; p = 0,01) fue DEC + J (lnL = -29,2) comparado con el modelo DEC (lnL= -32,5). Se obtuvieron los siguiente valores de los parámetros: tasa de expansión del rango de distribución (d = 0,023); tasa de pérdida de distribución (e = 0) y tasa de dispersión a gran distancia (j = 0,208). Los resultados del análisis biogeográfico se interpretan en la Figura 6. El ancestro común más reciente (ACMR) para el área de distribución de *T. pallidior*-*T. elegans* fue la provincia biogeográfica de Santiago (D). Desde esta área habrían dispersado siguiendo las siguientes rutas: i) expansión de la distribución del ACMR de *T. elegans*-*T. pallidior* desde la provincia biogeográfica de Santiago (D) a la del Maule (E), quedando el ancestro de *T. elegans* en las provincias biogeográficas de Santiago (D) y Maule (E). Posteriormente ocurrió un evento vicariante entre la provincia biogeográfica del Maule (E) y Santiago (D); (ii) en el linaje al sur del Maipo en la provincia biogeográfica del Maule (E) hubo ampliación de distribución a la de

Santiago (D), quedando en la de Santiago y Maule (DE). Posteriormente, hubo un evento vicariante entre la provincia biogeográfica del Maule (E) y Santiago (D), quedando la subespecie Sur 2 en la del Maule (E) y la subespecie Sur 1 en la de Santiago (D). Posteriormente, expandió a la del Maule (E), quedando en la de Santiago y Maule (DE). Respecto al evento vicariante inicial para el ancestro de *T. elegans*, las poblaciones de yacas al norte del río Maipo se ubicaron en la provincia biogeográfica de Santiago (D), conformando a *T. e. elegans*. Otras poblaciones del ancestro de las yacas al norte del Maipo migraron a gran distancia a la provincia biogeográfica de Atacama (A) y expandieron a la de Coquimbo (C), quedando *T. e. coquimbensis* en Atacama y Coquimbo (AC). Las yacas que se quedaron en la provincia biogeográfica de Atacama (A) conformaron a la subespecie Loa. Otras poblaciones de yacas migraron a gran distancia desde la de Atacama (A) a la de Santiago (D), quedando la subespecie de Aconcagua en la provincia biogeográfica de Santiago (D). Sin embargo, no habrían llegado más al sur que el río Aconcagua, que habría actuado como barrera geográfica a la dispersión. Desde el ancestro de *T. pallidior-T. elegans* en la provincia biogeográfica de Santiago (D) hubo dispersión a gran distancia hacia la de Atacama (A). Posteriormente, expandieron hacia la provincia biogeográfica de Puna (B), quedando en Atacama y Puna (AB). Posteriormente, hubo contracción de su distribución, quedando sólo en Atacama (A). Finalmente, hubo expansión de su distribución, quedando en Atacama (A) y Puna (B) "*T. pallidior* A". Por otro lado, desde el ancestro de *T. pallidior* en la provincia biogeográfica de Atacama (A) y Puna (B), hubo dispersión a gran distancia al noreste de los Andes (F). Posteriormente, expandieron su distribución al sureste de los Andes (G), conformando a "*T. pallidior* B", en el noreste y sureste de los Andes (FG). Por lo tanto, la historia evolutiva del grupo "*elegans*" y de las

subespecies de *T. elegans* fue dominada por eventos de dispersión a gran distancia, expansión de distribución y vicarianza.

Discusión

Reconstrucción filogenética

T. elegans es un grupo monofilético hermano a *T. pallidior*, al igual que estudios anteriores (Giarla *et al.* 2010, 2014; Palma *et al.* 2014). Al norte del Río Maipo, se recuperan cuatro grupos, con dos subespecies descritas anterioremente (*T. e. coquimbensis* y *T. e. elegans*) y dos subespecies no descritas (Loa y Aconcagua). La subespecie del Loa se ubicaría al norte de la Desembocadura del río Loa (21°25'S), *T. e. coquimbensis* desde Quebrada El León (26°57'S) hasta Valle el Mauro (31°58'S), con el río Quilimarí y montañas adyacentes como límite sur. La subespecie de Aconcagua desde Longotoma (32°16'S) hasta Hijuelas (32°48'S) entre el río Quilimarí y montañas adyacentes hasta el río Aconcagua y cordón de Chacabuco y *T. e. elegans* desde el P. N. La Campana hasta viña Leyda (32°57' a 33°34'S) entre el río Aconcagua y cordón Chacabuco hasta el río Maipo. Al sur del Maipo se recuperan dos grupos, siendo dos subespecies no descritas: Sur 1 desde El Ingenio hasta Duao (33°47' a 34°52'S) entre el río Maipo (33°37'S) hasta los ríos Mataquito (35°3'S) y Teno (34°55'S) y Sur 2 desde Los Queñes hasta Tregualemu (35°0' a 35°56'S) entre el río Mataquito y Teno hasta Tregualemu. La subespecie Sur 2 podría ser *T. e. soricinus*. Esto se debe a que en esta subespecie obtuvimos yacas de las localidades de cordillera de la región del Maule (Los Queñes, Altos de Lircay y Vilches Alto). Estas localidades son cercanas a los registros de yacas de Radal Siete Tazas e intersección del río Claro y Maule. Pine *et al.* (1979) asignaron los especímenes de estas localidades a *T. e. soricinus*, luego de ser comparados morfológicamente con el espécimen de la localidad tipo Valdivia

Se creía *T. e. elegans* habitaba desde el sur del Desierto de Atacama hasta el río Biobío. En este estudio se reduce drásticamente su distribución entre el río Aconcagua y el cordón Chacabuco hasta el río Maipo. *T. e. coquimbensis* extiende su distribución a la costa de la región de Atacama y Coquimbo. Se apoya el rol de los ríos para separar subespecies: el río Maipo a *T. e. elegans* de la subespecie Sur 1, río Quilimarí a *T. e. coquimbensis* de la subespecie Aconcagua, río Aconcagua a la subespecie Aconcagua de *T. e. elegans* y ríos Mataquito y Teno a la subespecie Sur 1 de Sur 2. Las montañas adyacentes al río Quilimarí separaron y estructuraron a *T. e. coquimbensis* de la subespecie Aconcagua y el cordón de Chacabuco a la subespecie Aconcagua de *T. e. elegans*. Se debe tomar en cuenta que el río Quilimarí se encuentra en una quebrada encajonada y bastante profunda y está asociada a un cordón montaño que conecta la Cordillera de la Costa con la cordillera de los Andes. El río Aconcagua y Maipo están ubicados en zonas que fueron afectadas por los glaciares de Montaña y tuvieron un mayor cauce en el pasado provocado por los deshielos durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario (Lambrot & Eaton 1997). Respecto al Mataquito y Teno (35° S) se encuentran en el extremo norte hasta el cual alcanzó la lengua glacial durante el UMG, por lo tanto, es probable que esto ocurriera durante los distintos ciclos glaciares del Cuaternario con un efecto de la lenguas glaciales en zonas Andinas (Clapperton 1993; McCulloch *et al.* 2000) y su consiguiente efecto en el aumento del cauce de los ríos de esta zona con los deshielos. Sin embargo, hay que considerar que la influencia de los glaciares más al norte de esta zona, se extendió aproximadamente hasta la latitud de Santiago (33° S) (Lambrot & Eaton 1997).

Distancia corregida (K2P) y delimitación de especies

Los valores de distancia corregida (K2P) van desde 2% entre las subespecies Sur 1 y Sur 2 hasta 11,9% entre las subespecies Loa y Sur 1. Al agrupar las cuatro subespecies al norte del río Maipo y compararlas con los dos al sur, se obtuvo un valor de 9,7%, superior a: 5,4% entre *T. elegans* “norte” y “sur” (Palma *et al.* 2014), 5% entre “*T. pallidior* A” y “*Thylamys pallidior* B”, 5,4% entre “*T. venustus* A” y “*T. venustus* B” y “*T. venustus* C” y 2,5% entre “*T. sponsorius* A” y “*T. sponsorius* B” (Giarla *et al.* 2014). Los valores de distancia génica K2P entre especies del género *Thylamys* fluctúan entre 7-20% (Patton *et al.* 1996; Giarla *et al.* 2010; Palma *et al.* 2014). Por lo tanto, los valores observados en las diferencias genéticas entre los seis linajes de *T. elegans* en el presente estudio pueden ser considerados altos, e incluso a nivel de especies distintas. Los valores para las comparaciones entre las seis subespecies de *T. elegans* (2-11,9%) están en su mayoría dentro del rango 2-11% propuesto por Bradley & Baker (2001). Cuando se está dentro de este rango se sugiere que se deben realizar más estudios para evaluar si son especies distintas o sólo corresponde a variabilidad intraespecífica. Por lo tanto, según el concepto genético de especies propuesto por Bradley & Baker (2001), se sugiere que se hagan más estudios utilizando marcadores nucleares y caracteres morfológicos. Se recomienda realizar una investigación utilizando taxonomía integrativa (Dayrat 2005, Padial *et al.* 2010; Schlick-Steiner *et al.* 2010; Zachos *et al.* 2013). Sin embargo, aunque el análisis de (PTP) entregó una probabilidad de diferencia de linajes mayor a 0,5 para los seis linajes de *T. elegans*, ninguno tuvo un valor mayor al de corte de 0,91 para ser considerado como especie válida (Zhang 2013; Zhang *et al.* 2013). No obstante, las diferencias genéticas significativas encontradas y los límites geográficos que los separan permiten inferir que *T. elegans* tiene seis subespecies coherentes con el concepto fundamental de Mayr (1942).

Esta hipótesis, debe ser evaluada a futuro con taxonomía integrativa usando marcadores nucleares y caracteres morfológicos (Dayrat 2005; Padial *et al.* 2010; Schlick-Steiner *et al.* 2010). Además, hay que tomar en cuenta que Giarla *et al.* (2014) mediante métodos de validación de especies y el uso de marcadores mitocondriales y nucleares, encuentra evidencia que haplogrupos mitocondriales que son morfológicamente crípticos, podrían ser considerados como especies válidas, encontrando dos linajes evolutivos independientes en *T. pallidior*, *T. venustus* y *T. sponsorius*. Sin embargo, estos autores concluyen que estos linajes no se pueden considerar como especies válidas hasta que sea corroboradas de una manera más contundente (De Queiroz 2007).

Estructuración genética

Se recuperan seis haplogrupos que coinciden con los seis clados de la filogenia (Fig. 2, Fig. 3, Tabla 1), y se apoyan las mismas barreras geográficas (los ríos Quilimarí, Aconcagua, Maipo, Mataquito y Teno y los cordones montañosos adyacentes al río Quilimarí y el cordón Chacabuco) para estructurar y limitar las seis subespecies de la filogenia (Fig. 2). Los pasos mutacionales que las separan varían desde un mínimo de 18 (Sur 1 y Sur 2) hasta un máximo de 55 entre las cuatro subespecies al norte del río Maipo (Loa, *T. e. coquimbensis*, Aconcagua y *T. e. elegans*) y dos al sur (Sur 1 y Sur 2). Los pasos mutacionales que separan al resto de las subespecie son los siguientes: *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis* (31), *T. e. coquimbensis* y Loa (34) y Loa y Aconcagua (32). Estos valores son similares a los 34 pasos mutacionales para dos haplogrupos de *Monodelphis domestica* (Caramischi *et al.* 2011), 19 y 23 para tres haplogrupos en *G. agilis* (Faria *et al.* 2013), 19 en dos haplogrupos de *M. domestica* y 35 en dos haplogrupos de *M. brevicaudata* (Carvalho *et al.* 2011). Se apoya un rol de los ríos y montañas en la estructuración genética

de las seis subespecies de *T. elegans* (Fig. 4). Los seis “clusters” inferidos concuerdan con los seis grupos monofiléticos de la filogenia (Fig. 2) y seis haplogrupos (Fig. 3), dando cuenta del rol histórico y actual de los ríos y montañas como barreras al flujo génico y/o límites a la dispersión. Esto habría aislado a las poblaciones por el tiempo suficiente para formar seis subespecies reconocibles por su divergencia genética.

Tiempos de divergencia

Giarla & Jansa (2014) estimaron en 0,6 (0,7-0,8) Maa el nodo *T.pallidior-T.elegans*, lo cual es mucho más reciente que los 6,1 Maa que se estimó en este trabajo (Fig. 5). Esto se debería a que Giarla & Jansa (2014) no usan fósiles de *Thylamys* para calibrar, como en el actual estudio (ver detalles en Palma *et al.* 2014), y usan puntos de calibración de otros géneros de la tribu Thylamyini fuera del clado de *Thylamys* y otros órdenes de marsupiales del Viejo Mundo. Palma *et al.* (2014) usaron como puntos de calibración fósiles de *Thylamys*; *Thylamys pinei* y *Tylamys zetti* del Huayqueriense (formación Cerro Azul, Pampa de Argentina, Goin 1997; Goin *et al.* 2000, 9-6,8 Maa Deschamps *et al.* 2012), con afinidades a *T. elegans* y *T. venustus*, respectivamente. El otro fósil es *Thylamys contrerasi*, formación Montehermoso, Buenos Aires, Argentina, 4-5Maa, Goin 1991; Deschamps *et al.* 2012), con afinidades a *T. pusillus*. En el actual estudio, estimamos tiempos de divergencia desde 3,14 (HPD: 2,95-3,33) Maa al norte y sur del Maipo hasta 0,81 (HPD: 0,48-1,2) Maa para Sur 1 y Sur 2. Los valores estimados de tiempo de divergencia son similares a los estimados para la diversificación del género según Giarla & Jansa (2014) entre 2,75 (HPD: 3,3-2,2) Maa para el nodo basal *T. karimii-T. velutinus* y las otras especies del género hasta 0,3 (HPD: 0,4-0,2) Maa entre *T. sponsorius A* y *T. sponsorius B*. Sin duda, hay una gran diferencia y un sesgo en las estimaciones de los tiempos de divergencia de Jansa *et al.*

(2014) y Giarla & Jansa (2014) dado que se estimó un ancestro común más reciente para el género *Thylamys* de 2,75 (HPD: 2,2-3,3) Maa, sin embargo, existen fósiles de *Thylamys* del Huayqueriense 9-6,8 Maa (Goin *et al.* 2000, Deschamps *et al.* 2012). Las estimaciones de Palma *et al.* (2014) para la dicotomía basal entre *T. karimii* y el resto de las especies del género se estimó en 18,58 (HPD: 11,01-27,22)Maa. Giarla & Jansa (2014) se basan en las estimaciones anteriores de Jansa *et al.* (2014) con un ancestro común más reciente para la familia Didelphidae de hace 21,7 (HPD: 16,8-27)Maa. Es decir, su estimaciones del tiempo de divergencia de la familia son en tiempos similares que las estimaciones para el género *Thylamys* de Palma *et al.* (2014) hace 18,58 (HPD: 11,01-27,2)Maa. La divergencia de *Thylamys* de los outgroup *Lestodelphys halli* y *Marmosops impavidus* fue de 24,19 (HPD: 12,68-39,05) Maa en Palma *et al.* (2014), mientras que la de Jansa *et al.* (2014) para la dicotomía *Thylamys-Lestodelphys* fue de 3.5 (HPD: 2.0-5.1)Maa y de 3,3(HPD: 2,6-4,0) Maa en Giarla & Jansa (2014), dando cuenta de la magnitud de la diferencia entre las estimaciones de Jansa *et al.* (2014) y Giarla & Jansa (2014) con las de Palma *et al.* (2014). Además, las estimaciones de tiempos de divergencia de éste trabajo tienen valores para los distintos linajes de *T. elegans* que van desde 3,14 (HPD: 2,95-3,33) Maa para los linajes al norte y sur del Maipo hasta 0,81 (HPD: 0,48-1,2) Maa para los linajes Sur 1 y Sur 2. Estos valores son similares a los encontrados para la diversificación de todo el género *Thylamys* por Giarla & Jansa (2014) con valores que van desde 2,75 (HPD: 3,3-2,2) Maa para la dicotomía basal del género *Thylamys* entre *T. karimii-T. velutinus* y el resto de las especies del género hasta 0,3 (HPD: 0,4-0,2) entre *T. sponsorius* A y *T. sponsorius* B, lo cual da cuenta de la gran diferencia en los tiempos de divergencia estimados por Giarla & Jansa (2014) y los estimados en este capítulo (Fig. 5). Giarla & Jansa (2015), discuten que esta gran diferencia en los tiempos de divergencia sería causada por el hecho que las

estimaciones de Palma *et al.* (2014) se realizaron sólo con un marcador mitocondrial que tienden a estimar tiempos de divergencia más atrás en el tiempo y con mayor imprecisión. Sin embargo, aunque uno considere esto y se realizaran estudios a futuro que incorporen estimaciones de tiempos de divergencia con marcadores nucleares, en ningún caso los tiempos de divergencia darían tan recientes como los presentados en Giarla & Jansa (2014), dado que no tienen sentido biológico estas estimaciones tan recientes si se tiene los antecedentes que hay fósiles de *Thylamys* del Huayqueriense (9-6,8Maa). Incluso, hay evidencia de fósiles de *Thylamys* tan antiguos como del Friasiense (16,3-15,5 Maa) para los fósiles *Thylamys colombianus* y *Thylamys minutus* (Goin 1997b). Además, Vilela *et al.* (2015), en un reciente estudio filogenético realizado en el género *Monodelphis* mediante el gen *cyt b*, estima tiempos de divergencia más similares a los de Palma *et al.* (2014). Vilela *et al.* (2015) discuten que la leve diferencia de 14 Maa para la dicotomía de *Monodelphis* del resto de los didélfidos y 10 Maa para la diversificación inicial de *Monodelphis* comparado con los 24,19 Maa para la dicotomía de *Thylamys* respecto al resto de los didélfidos y 18,58 Maa para la diversificación inicial en *Thylamys*, se puede deber a la evolución más rápida de un marcador mitocondrial comparado con uno nuclear. Sin embargo, sostiene que la estrategia utilizada por Palma *et al.* (2014) es adecuada dado que el *cyt b* es el único marcador que resuelve la relaciones internas en *Monodelphis* y *Thylamys*. Por último, un inicio de la diversificación de *Thylamys* hace 18,58Maa (Palma *et al.* 2014) es posible, dado la existencia de fósiles de *T. colombianus* y *T. minutus* del Friasiense (16,3-15,5 Maa) (Goin 1997).

Distribución ancestral de las subespecies de T. elegans

Se infiere un rol de la dispersión a gran distancia, aumento de distribución y vicarianza. Con respecto a *T. e. coquimbensis*, se codificó que habitaba en la provincia biogeográfica de Atacama y Coquimbo y la única localidad de esta subespecie que pertenece a la de Atacama es Quebrada El León (26°57'30.63''S). Además, se infiere que el ancestro del clado *T. e. coquimbensis*-Loa, Aconcagua habitaba la provincia biogeográfica de Atacama. El origen de *T. e. coquimbensis* se infirió a partir de una expansión del rango de distribución desde la provincia de Atacama a la de Coquimbo, quedando distribuida esta subespecie en ambas provincias biogeográficas. Por lo tanto, se puede sugerir que la población más ancestral de *T. e. coquimbensis* en los resultados es la de Quebrada el León.

Respecto al origen de *T. pallidior-T. elegans*, el análisis biogeográfico infiere que el ancestro de ambas especies habitaba en la provincia biogeográfica de Santiago. Este escenario no apoya la hipótesis biogeográfica de Meynard *et al.* (2002) con un ancestro de *T. pallidior-T. elegans* en la Puna y posterior desplazamiento hacia el sur por un corredor andino pleistocénico hasta la región de Atacama y Coquimbo. En este desplazamiento habrían especiado por efecto fundador, originando a *T. elegans*. Posteriormente, se habrían desplazado hacia la costa por los valles transversales y finalmente dispersado hacia el norte y sur. Para haber encontrado apoyo a esta hipótesis, los análisis deberían haber inferido un ancestro de *T. elegans* en la provincia biogeográfica de Coquimbo. Para haber encontrado sustento a la hipótesis de Meynard *et al.* (2002), los análisis biogeográficos tendrían que haber inferido un ancestro de *T. elegans* en la provincia biogeográfica de Coquimbo. Por otro parte, tampoco se encuentra apoyo a la hipótesis de Palma (1995) y Palma *et al.* (2002). Esta hipótesis sugiere que el ancestro *T. pallidior-T. elegans* habitaba la Puna y posteriormente usó las quebradas del extremo norte de Chile como corredores biológicos

para dispersar hacia la costa. Posteriormente, habrían dispersado por la costa hacia el sur, especiando a *T. elegans* por efecto fundador. Para haber encontrado apoyo a la hipótesis biogeográfica de Palma (1995) y Palma *et al.* (2002), se debió haber inferido un ancestro de *T. elegans* en la provincia biogeográfica de Atacama. Sin embargo, en este estudio, se infiere que el ancestro de *T. elegans* habitó la provincia biogeográfica de Santiago y Maule y posteriormente ocurrió un evento vicariante que separó un linaje ancestral al sur del Maipo y otro al norte, el cual dispersó a gran distancia a la provincia biogeográfica de Atacama. Por lo tanto, el ancestro de *T. pallidior-T. elegans* que habitaba en la Puna, no se desplazó hacia tierras bajas utilizando las quebradas del extremo norte de Chile. Por el contrario, estas quebradas fueron importantes para que el ancestro de *T. pallidior* se expandiera desde la provincia biogeográfica de Atacama en tierras bajas hacia la Puna, utilizando las quebradas como corredores biológicos, quedando *T. pallidior* en ambas provincias biogeográficas (Fig. 6). En algunas poblaciones hubo contracción de su distribución, quedando en la provincia biogeográfica de Atacama. Posteriormente, expandió a la Puna, quedando “*T. pallidior A*” en ambas. Otras poblaciones del ancestro *T. pallidior* en Atacama y Puna, dispersaron a gran distancia al noreste de los Andes. Posteriormente, ampliaron su distribución al sureste de los Andes, quedando “*T. pallidior B*” en ambas. Las quebradas también fueron importantes en el ancestro *T. tatei-T. sp* de la Puna para bajar a tierras costeras, quedando *T. sp* en la Puna. Otras yacas dispersaron a gran distancia de la Puna al Desierto Costero Peruano, especiando por efecto fundador en *T. tatei* (Fig. 6).

Giarla *et al.* (2010), infieren que a partir del ancestro del grupo “*elegans*” que habitaba al este de los Andes, hubo un evento de dispersión de este a oeste de los Andes, diversificando las cuatro especies del grupo “*elegans*” en la costa de Chile y Perú. Giarla & Jansa (2014) estiman que el ancestro de *T. pallidior* y *T. elegans* dispersó al Bioma

Matorral Chileno. Posteriormente, hubo un evento vicariante, quedando *T. elegans* en el Matorral Chileno y *T. pallidior* en Pastizales montanos. Giarla & Jansa (2014) usan una segunda categorización biogeográfica basada en barreras geográficas (Costa Pacífica al oeste de los Andes y Oeste y Este del río Paraguay). Con esta categorización, infieren que el ancestro *T. pallidior-T. elegans* habitaba Costa Pacífica y Oeste del río Paraguay, quedando *T. elegans* en Costa Pacífica.

Giarla & Jansa (2014) difieren de Palma *et al.* (2014) y el actual estudio (Fig. 6) en: filogenia con *T. karimii* y *T. velutinus* hermanas en la base del género y ambas hermanas a las otras especies del género. En Palma *et al.* (2014), la especie hermana a las otras especies del género es *T. karimii*. Giarla & Jansa (2014), codifican que *T. elegans* habita el bioma Chile central. En cambio, este estudio considera que también habita la provincia biogeográfica de Atacama, la cual abarca los biomas de Chile central y Desierto. Además, el bioma de Chile central no abarca toda el área de las provincias biogeográficas de Santiago y Maule de este estudio. Por último, codifican a *T. tatei* y *T. sp* en bioma Desierto, pero *T. tatei* debió codificarse en Desierto y *T. sp* en Pastizales montanos, ya que en este trabajo se codificó que *T. tatei* habita el Desierto Peruano Costero y *T. sp* la Puna.

Escenario biogeográfico en contexto histórico: el rol de los ríos y montañas

Se apoya la hipótesis de barrera ribereña para la divergencia de las subespecies Sur 1 y Sur 2 por los ríos Mataquito y Teno. Esto se debe a que estas subespecies están conformadas por clados recíprocamente monofiléticos, con cada uno de ellos habitando en riberas opuestas (Sur 1 al norte y Sur 2 al sur del Mataquito y Teno) como resultado de un evento vicariante causado por dichos ríos (Fig. 6). El otro evento vicariante fue el río Maipo para el ancestro de *T. elegans* en la provincia biogeográfica de Santiago y el Maule. Sin

embargo, el río Maipo no sustenta la hipótesis ribereña, dado que separó al sur al ancestro de las subespecies Sur 1 y Sur 2 y al norte del Maipo al ancestro de cuatro subespecies (Loa, *T. e. coquimbensis*, Aconcagua y *T. e. elegans*). Sin embargo, las subespecies contiguas geográficamente al norte y sur del Maipo (*T. e. elegans* y Sur 1), no son recíprocamente monofiléticas (Fig. 2).

La concordancia de las seis subespecies de *T. elegans* apoyada por la filogenia, red de haplotipos y GENELAND, sustentan el rol de los ríos Quilimarí, Aconcagua, Maipo, Mataquito y Teno y cordón de Chacabuco y sur de la región de Coquimbo como agentes estructuradores. El río Quilimarí y montañas del sur de la región de Coquimbo actuaron como barrera a la dispersión al sur en *T. e. coquimbensis*. El río Aconcagua y cordón de Chacabuco habrían actuado barrera a la dispersión al sur en *T. e. elegans*. El río Mataquito y Teno actuaron como evento vicariante entre Sur 1 y Sur 2.

Previos estudios reportaron un quiebre filogeográfico por el río Maipo (Torres-Pérez *et al.* 2007; Sallaberry-Pincheira *et al.* 2010; Viruel *et al.* 2014) y Aconcagua (Torres-Pérez *et al.* 2007; Lamborot *et al.* 2012). En Chile central, después de los deshielos de un período postglacial durante el Plioceno y Pleistoceno, fue mayor el efecto de las glaciaciones. Los ríos de Chile mediterráneo se originan sobre los 3000 m y dependen del deshielo de los glaciares, históricamente su volúmen fue significativamente mayor en el pasado que en la actualidad, formando potenciales barreas a la dispersión de especies (Lamborot & Eaton 1997). Siguiendo este escenario, en el río Aconcagua, Maipo, Mataquito y Teno hubo un mayor cauce que en la actualidad. El levantamiento de los Andes comenzó en el Oligoceno tardío al Mioceno temprano (23 Maa aprox.), pero los peak más intensos de su formación ocurrieron hace 12 Maa (Mioceno medio) y 4,5 Maa (Plioceno) (Folguera *et al.* 2011). Por lo tanto, hace 4,5 Maa ya se habrían formado todos

los valles transversales de Chile mediterráneo. Para Chile central, el aislamiento geográfico actual de los ríos del centro-norte de Chile se originó entre los 8,5-4 Maa (Ramos *et al.* 2002; Giambiagi *et al.* 2003, Charrier *et al.* 2007, Farías *et al.* 2008). Por lo tanto, hace 4 Maa ya se habrían formado todos los ríos de Chile mediterráneo. Hace 3,14 (HPD: 2,93-3,33) Maa, cuando se produjo el quiebre filogeográfico en los linajes al norte y sur del río Maipo, un aumento del cauce posterior a un deshielo postglacial provocó un evento vicariante y separó al ancestro de *T. elegans*. El ancestro del linaje norte del Maipo habría quedado en la provincia biogeográfica de Santiago y el linaje al sur del Maipo en la del Maule.

Hace 1,84 (HPD: 1,41-2,27) Maa, las yacas al norte del río Maipo en la provincia biogeográfica de Santiago, conformarían a *T. e. elegans*. Otras poblaciones migraron a gran distancia desde la provincia biogeográfica de Santiago a la de Atacama. Hace 1,41 (HPD: 1,07-1,8) Maa hubo expansión de yacas de la provincia biogeográfica de Atacama a la de Coquimbo, constituyendo a *T. e. coquimbensis* con el río Quilimarí y montañas adyacentes como barreras a la dispersión sur. Hace 1,28 (HPD: 0,91-1,64) Maa, algunas poblaciones de la provincia biogeográfica de Atacama quedaron al norte de la desembocadura del río Loa, conformando la subespecie Loa. Otras poblaciones de la provincia biogeográfica de Atacama dispersaron a gran distancia a la de Santiago, con el río Aconcagua como barrera a la dispersión sur. Por lo tanto, la subespecie Aconcagua habría quedado restringida entre el río Quilimarí y montañas adyacentes hasta el río Aconcagua.

Las yacas al sur del río Maipo quedaron en la provincia biogeográfica del Maule y posteriormente expandieron a la de Santiago, quedando en ambas. Hace 0,81 (HPD: 0,48-1,2) Maa hubo un evento vicariante causado por el río Mataquito y Teno, dejando a la subespecie Sur 1 entre el Maipo y el Mataquito y Teno. La subespecie Sur 2 quedaría al sur

del Mataquito y Teno hasta Tregualemu. Posteriormente, Sur 1 amplió su distribución desde la provincia biogeográfica del Maule a la de Santiago, quedando en ambas. La subespecie Sur 2 habría quedado en la provincia biogeográfica del Maule.

En el ancestro de las cuatro subespecies al norte del río Maipo, se infirió migración a gran distancia desde la provincia biogeográfica de Santiago a la de Atacama. El escenario descrito para la divergencia de los seis subespecies encontradas en *T. elegans* habría sido facilitado por las glaciaciones del Pleistoceno, con precipitación entre los 30-33°S equivalente a la actual al sur de los 38,5°S. Esto favoreció el desplazamiento al norte en siete grados de latitud de la vegetación austral (Caviedes & Iriarte 1989), quedando la vegetación esclerófila refugiada en la zona costera-norte de Chile central, región de Atacama (Moreno *et al.* 1994, Villagrán 1994). Con el avance de la vegetación, algunas poblaciones migraron a gran distancia a la provincia biogeográfica de Atacama, al norte de la desembocadura del río Loa. Posteriormente, algunas poblaciones de yacas de la provincia biogeográfica de Atacama expandieron su distribución a la de Coquimbo, quedando *T. e. coquimbensis* en ambas. Luego, la población más septentrional de Atacama quedó aislada al norte de la desembocadura del Loa, constituyendo la subespecie Loa. Otras poblaciones de yacas de la provincia biogeográfica de Atacama migraron a gran distancia a la de Santiago. Este escenario fue favorecido por el retroceso postglacial de la vegetación esclerófila que avanzó al norte durante un período glacial, facilitando el avance al sur de la fauna asociada. La subespecie Aconcagua, habría quedado en el valle de Aconcagua, entre el río Quilimarí y montañas adyacentes y río Aconcagua.

Otros estudios han reportado un rol de las montañas de Chile para estructurar los linajes norte-centro y centro en la culebra de cola larga *P. chamissonis* para montañas de Chile central (Sallaberry-Pincheira *et al.* 2010) y el áfido *Eriosoma lanigerum* por las

montañas de Villa Alemana y Ancoa y ríos Claro, Lircay y Maule (Lavandero *et al.* 2009). Algo similar se reportó en el didélfido *G. agilis* por el río São Francisco y Serra Geral de Goiás (Faria *et al.* 2013). Además, en un estudio de filogeografía comparada con lagartijas del género *Liolaemus*, Victoriano *et al.* (2008) encuentran una marcada estructura filogeográfica en *L. tenuis* y *L. lemniscatus* en la región mesomórfica comparada con la hidromórfica. Estos autores discuten que hacia el norte es mayor el efecto de la topografía al aumentar la altitud de los Andes. Este patrón se repite el haplogrupo central de *P. chamissonis*, el cual tiene una distribución restringida comparada con los otros tres haplogrupos. Sin embargo, el haplogrupo central tiene una mayor cantidad de diversidad genética y una distribución de frecuencias pareadas multimodal, lo cual enfatiza el rol de la heterogeneidad de dicha zona geográfica y que el quiebre filogeográfico entre su haplogrupo norte-centro y centro puede estar determinado por la topología geológica de esta región (Sallaberry *et al.* 2010). Esto es similar a los resultados de este estudio para las cuatro subespecies de *T. elegans* al norte del río Maipo (Aconcagua, *T. e. elegans*, Sur 1 y Sur 2), con un área menor en el centro y centro-sur de Chile. Por ejemplo, aunque, la lengua de hielo el Último Máximo Glacial (UMG, 18.000-20.000 años atrás) alcanzó hasta los 43° en las zonas costeras y hasta los 35° S en zonas Andinas (Clapperton 1993; McCulloch *et al.* 2000), sin embargo, la influencia de los glaciares en los hábitats más al norte de Chile se extendió aproximadamente hasta latitud de Santiago (33° S). Esta zona tuvo mayor influencia de las glaciaciones en los ríos y glaciares de alta montaña en los valles de Aconcagua y Maipo, causando descenso de las nieves. Consecuentemente, el volumen de agua generado desde los Andes fue mayor en el pasado que en la actualidad (Lambrot & Eaton 1997). Por el contrario, en *T. e. coquimbensis*, se encuentra una menor estructura filogeográfica y una distribución más amplia que la suma de la distribución de

las subespecies Aconcagua, *T. e. elegans*, Sur 1 y Sur 1 juntas. Esto se debe a que *T. e. coquimbensis* habita los valles y costa de la región de Coquimbo y valles de la región de Atacama y en estas zonas no hubo glaciares de montaña, ni descenso de las nieves, ni cambios en el cauce de los ríos. En esta zona existe una mayor fragmentación de paisaje dada por los valles transversales, sin embargo como no hubo aumento del cauce de los ríos durante un período postglacial las zonas costeras pudieron ser utilizadas como corredores biológicos de las poblaciones de yacas en concordancia con el avance y retroceso de los bosques esclerófilos. Por el contrario, en la zona centro, los glaciares de montaña y el aumento del cauce de los ríos facilitó que las poblaciones de *T. elegans* se estructuraran en 4 linajes bien diferenciados (*T. e. elegans*, Aconcagua, Sur 1 y Sur 2). Finalmente, se debe interpretar el rol de los ríos de Chile mediterráneo en la estructuración y divergencia de linajes de *T. elegans* como barreras dinámicas y no como una barrera constante desde el origen de un río hasta la actualidad, sino que como barreras que fluctúan en el tiempo y que en algún momento después de un período glacial comenzaron a ser efectivas barreras al flujo génico. Este escenario debe ser tomado en cuenta en conjunto con la relación de los ríos con el levantamiento final de los Andes y la instauración de los cordones montañosos, formación de los valles transversales y el actuar de los glaciares de montaña y su efecto sobre el cauce de los ríos durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario.

Leyenda de las figuras

Fig. 1 Localidades de *T. elegans* secuenciadas. Los colores concuerdan con los clados de la filogenia. Se indican los ríos que limitan las seis subespecies de *T. elegans*. Azul: clado A, subespecie Loa al norte de la desembocadura del río Loa. Naranja: clado B, subespecie Aconcagua entre el río Quilimarí y Aconcagua y cordón de Chacabuco. Celeste: *T. e. coquimbensis* desde la Quebrada El León hasta valle El Mauro al norte del río Quilimarí y montañas adyacentes. Gris: *T. e. elegans* entre el río Aconcagua y Maipo. Verde: clado C, subespecie Sur 1 desde el río Maipo hasta el Mataquito y Teno. Rojo: clado D, subespecie Sur 2 desde el río Mataquito y Teno hasta Tregualemu.

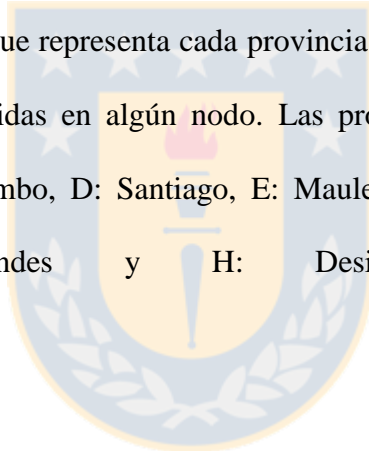
Fig. 2 Relaciones filogenéticas mediante el criterio de MV para las seis subespecies de *T. elegans* basado en el gen mitocondrial *cyt b*. Los números de los nodos representan el valor de bootstrap para MV y probabilidad *a posteriori* de la IB. Azul: subespecie Loa, naranja: subespecie Aconcagua, celeste: *T. e. coquimbensis*, gris: *T. e. elegans*, verde: subespecie Sur 1 y rojo: subespecie Sur 2.

Fig. 3 Red de haplotipos mediante Median-Joining. El tamaño de los círculos es proporcional a su frecuencia. Se señalan los ríos y pasos mutacionales entre subespecies.

Fig. 4 El gráfico de la izquierda es la (Fig 1). El segundo gráfico indica la asignación de las poblaciones en los seis “clusters”. Del gráfico 3 al 8 se observan los seis “clusters” con sus respectivas poblaciones pertenecientes a una unidad panmítica. Los seis “clusters” corresponden a las seis subespecies de *T. elegans* encontradas en este trabajo. Los “cluster” están limitados por los ríos y montañas que limitan cada grupo monofilético en la filogenia (Fig 1) y haplogrupos en la red de haplotipos (Fig. 3). En los “clusters” se representa en blanco y amarillo una mayor probabilidad de pertenecer a una unidad panmítica sustentada por isoclinas de probabilidad *a posteriori*.

Fig. 5 Tiempos de divergencia de las seis subespecies de *T. elegans*. El número de los nodos indica el valor medio y las barras en celeste el 95% de la Highest Posterior Density (HPD) de cada nodo. Se observa una escala de tiempo con las eras geológicas. La zona ensombrecida en gris representa el período entre los 8,5-4 Maa en que se formaron los ríos de Chile Mediterráneo (Charrier *et al.* 2007; Farías *et al.* 2008).

Fig. 6 Distribución ancestral de las seis subespecies de *T. elegans* y especies del clado Costero-Andino. El área biogeográfica ancestral de cada nodo se estimó bajo un modelo DEC + J. Se infiere el evento más probable de biogeografía histórica. El color en las ramas terminales representa la distribución actual de cada especie y subespecie. Al lado derecho se observan las letras y color que representa cada provincia biogeográfica y combinaciones de ellas que fueron reconstruidas en algún nodo. Las provincias biogeográficas son A: Atacama, B: Puna, C: Coquimbo, D: Santiago, E: Maule, F: noreste de los Andes, G: sureste de los Andes y H: Desierto Costero Peruano.



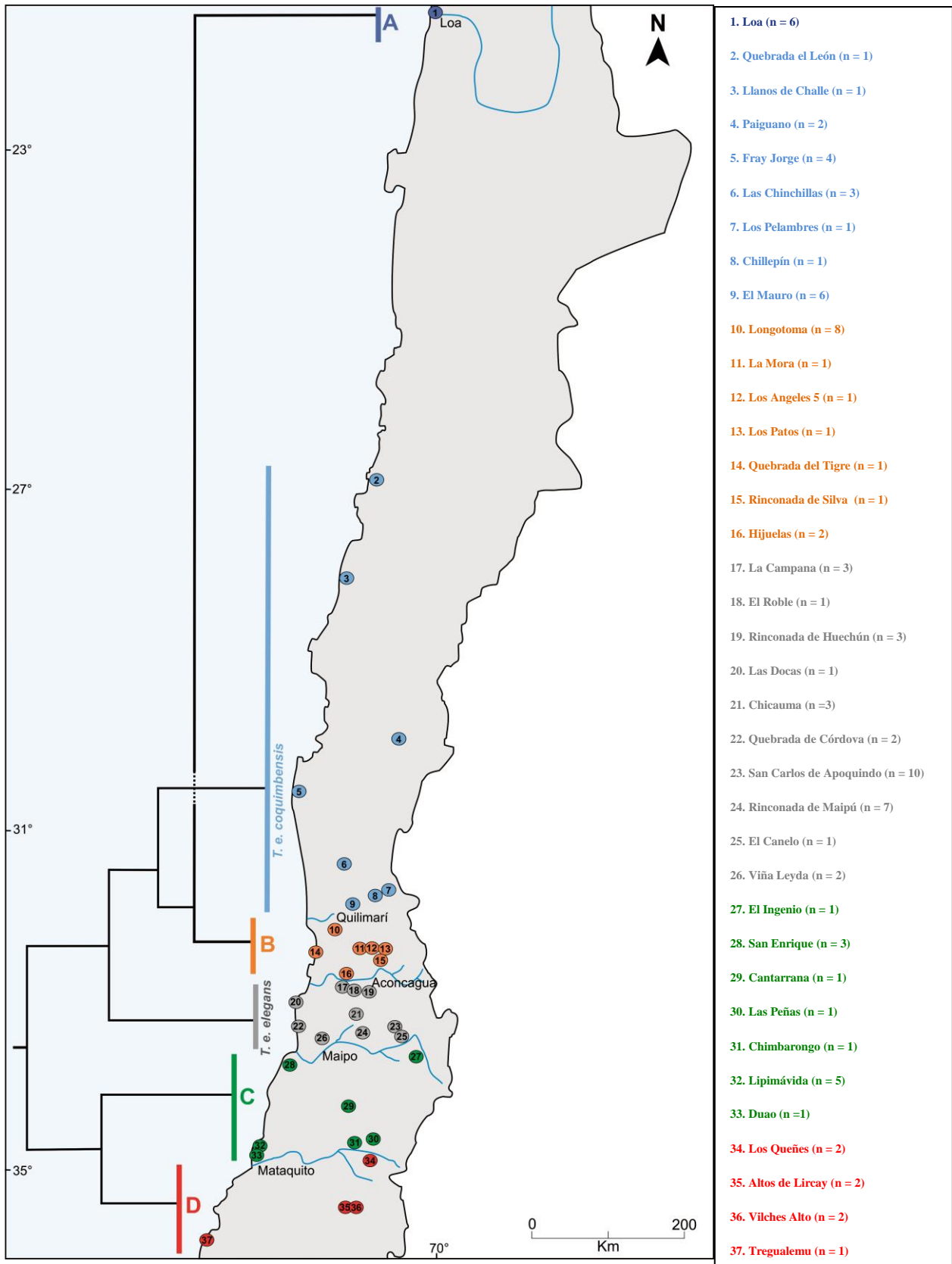


Fig. 1

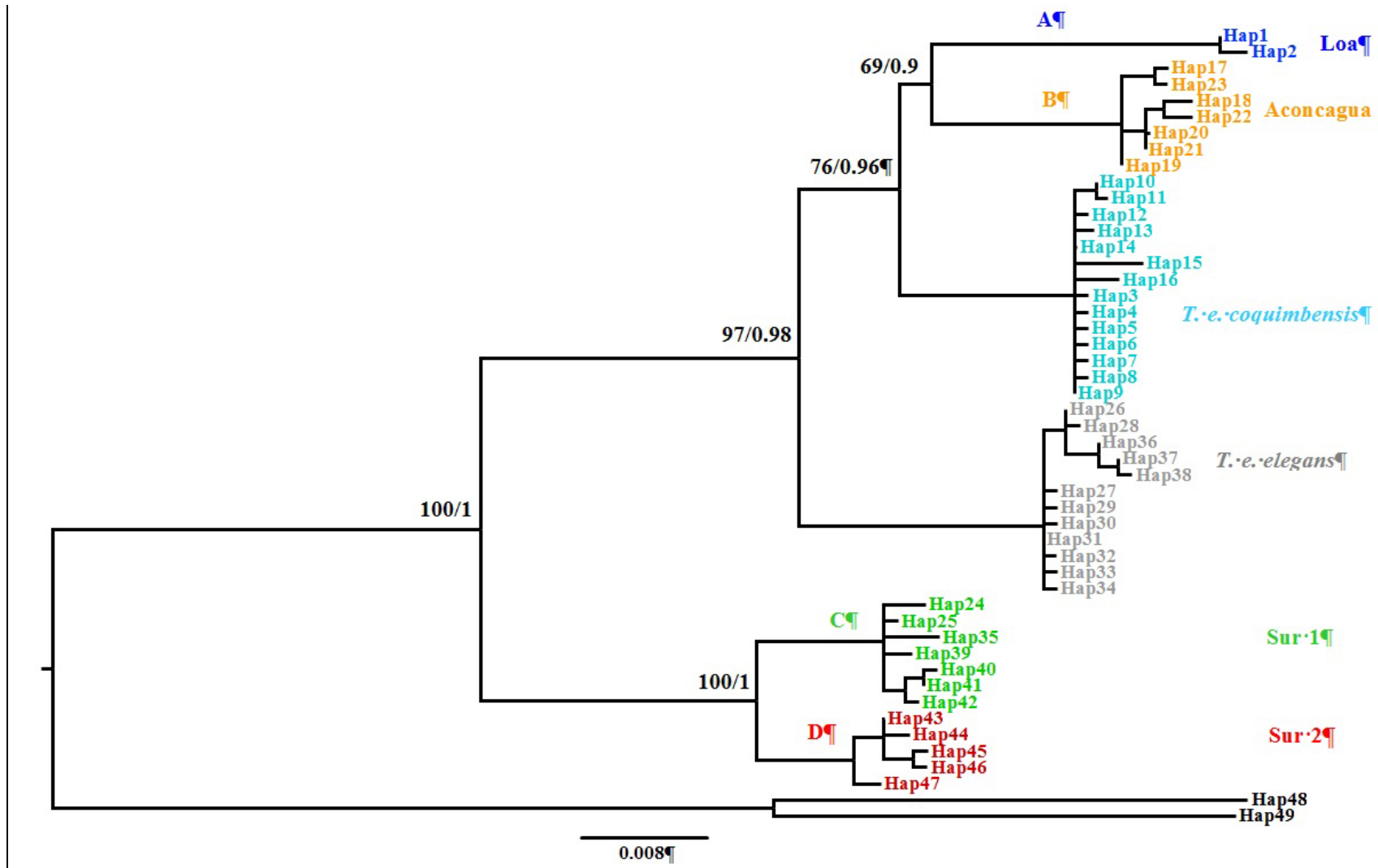


Fig.2

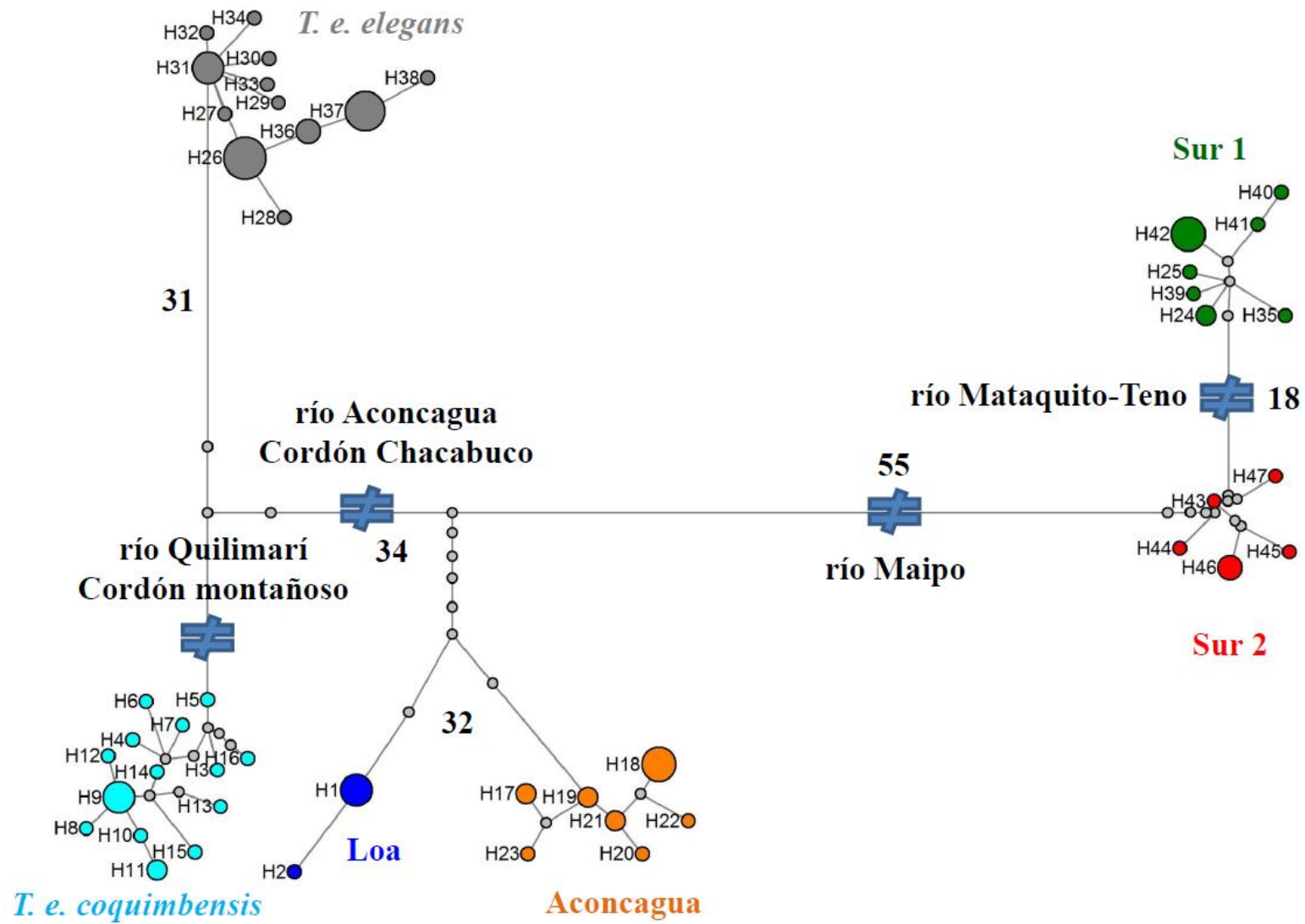


Fig. 3



Fig 4

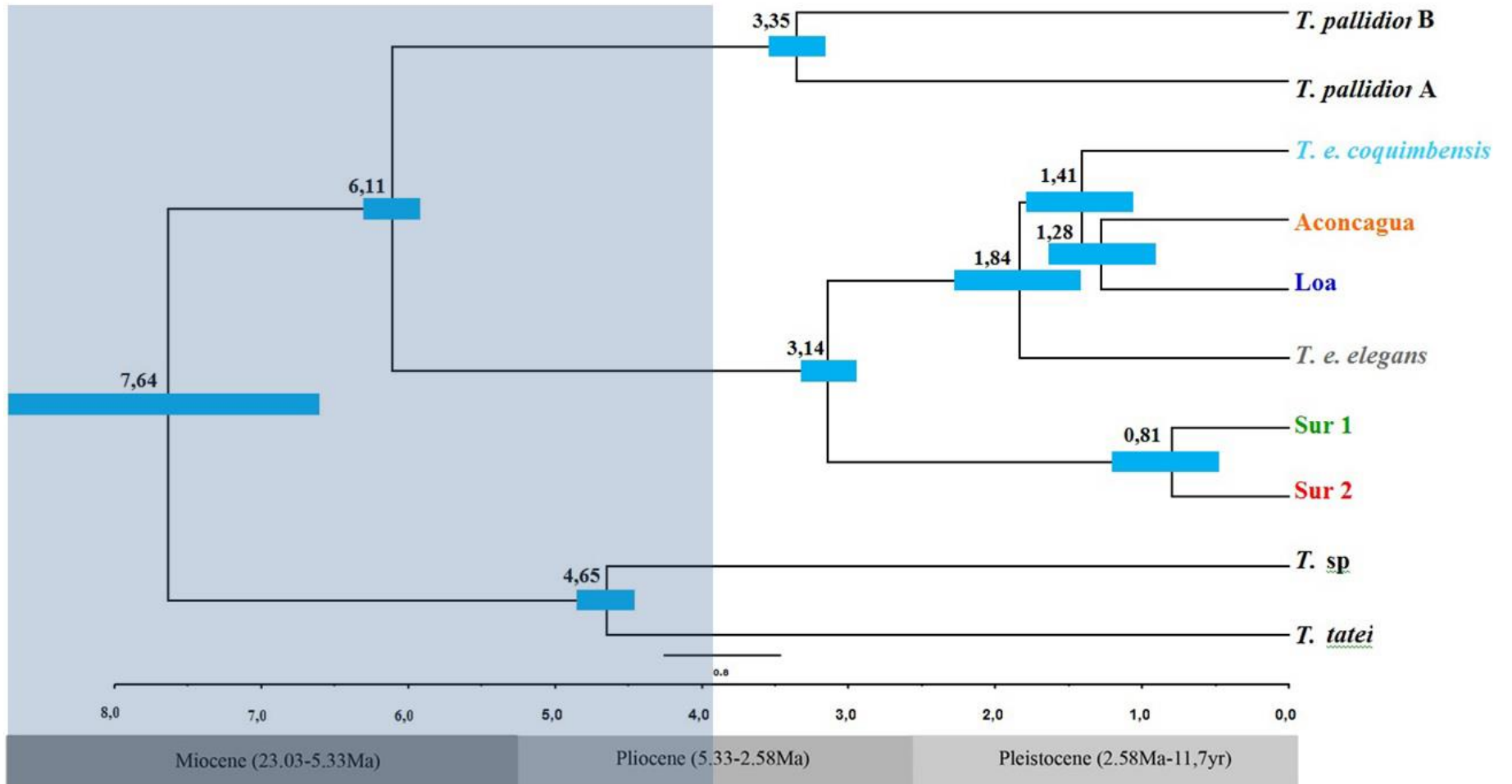


Fig. 5

DEC + J on *Thylamys elegans*, *Thylamys pallidior*, *Thylamys tatei* and *Thylamys* sp
 anstates: global optim. 2 areas max. d = 0.023; e = 0; j = 0.208; LnL = -29.2

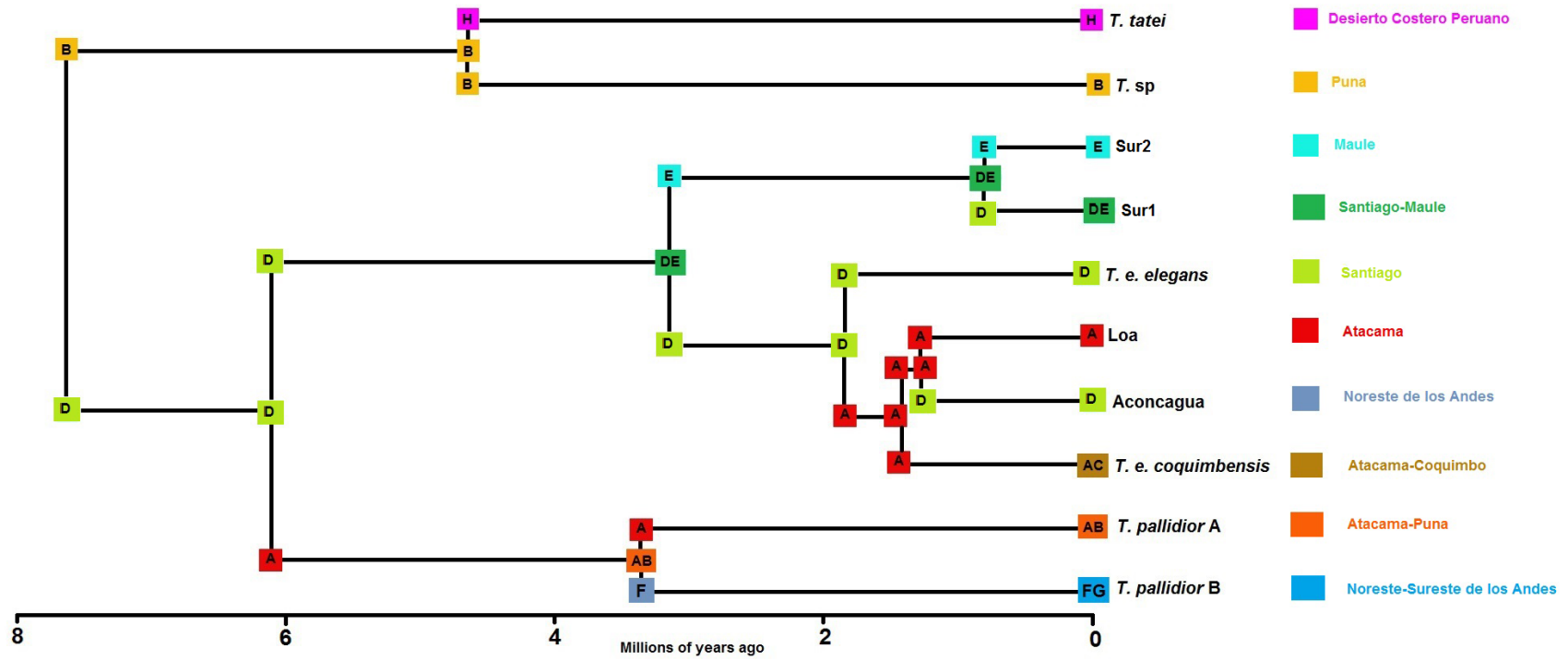


Fig. 6

Tabla 1 Lista de haplotipos que se usó en la filogenia y red de haplotipos, número de catálogo de cada voucher, número de acceso de GenBank, localidades de colecta, coordenadas y fuente bibliográfica. Fuente 1 (Palma *et al.* 2014), 2 (este estudio), 3 (Capítulo 2) y 4 (Giarla *et al.* 2010). * = Secuencias de GenBank.

N° Mapa	Haplotipo	Voucher	GenBank	Localidad	Región	Latitud	Longitud	Fuente
1	1	SSUC519	KF164532*	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43.75''S	70°03'30.35''O	1
1	1	SSUC520	K164533*	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43.75''S	70°03'30.35''O	1
1	1	SSUC522	este capítulo	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43.75''S	70°03'30.35''O	2
1	1	SSUC523	este capítulo	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43.75''S	70°03'30.35''O	2
1	1	SSUC525	este capítulo	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43.75''S	70°03'30.35''O	2
1	2	SSUC524	este capítulo	Desembocadura río Loa	Taparacá	21°25'43.75''S	70°03'30.35''O	2
2	3	CZZA-UTA 252	KP994520	Quebrada El León	Atacama	26°57'30.63''S	70°44'13.8''O	3
3	4	UCK21	KP994521	P. N. Llanos de Challe	Atacama	28°06'57.9''S	71°05'09.9''O	3
4	13	UCK20	KP994524	Paiguano	Coquimbo	30°02'14.6''S	70°27'26.0''O	3
4	14	UCK23	KP994525	Paiguano	Coquimbo	30°02'14.6''S	70°27'26.0''O	3
5	5	NK96879	KF164531*	P. N. Fray Jorge	Coquimbo	30°38'18.276''S	71°39'16.596''O	1
5	6	NK27583	HM583376*	P. N. Fray Jorge	Coquimbo	30°38'18.276''S	71°39'16.596''O	4
5	7	UCK805	este capítulo	P. N. Fray Jorge	Coquimbo	30°38'18.276''S	71°39'16.596''O	2
5	8	UCK806	este capítulo	P. N. Fray Jorge	Coquimbo	30°38'18.276''S	71°39'16.596''O	2
6	9	III14	KP994522	R. N. Las Chinchillas	Coquimbo	31°30'S	71°06'O	3
6	9	III70	este capítulo	R. N. Las Chinchillas	Coquimbo	31°30'S	71°06'O	2
6	10	IV62	este capítulo	R. N. Las Chinchillas	Coquimbo	31°30'S	71°06'O	2
7	15	NK96571	KP994526	Los Pelambres	Coquimbo	31°49'13.7''S	70°34'56.1''O	3
8	16	NK95622	KP994527	Chillepín	Coquimbo	31°53'12.12''S	70°47'47.04''O	3
9	9	UCK810	este capítulo	Valle El Mauro	Coquimbo	31°58'24.01''S	71°0'15.80''O	2
9	9	UCK813	este capítulo	Valle El Mauro	Coquimbo	31°58'24.01''S	71°0'15.80''O	2
9	9	UCK814	este capítulo	Valle El Mauro	Coquimbo	31°58'24.01''S	71°0'15.80''O	2
9	11	UCK809	KP994523	Valle El Mauro	Coquimbo	31°58'24.01''S	71°0'15.80''O	3
9	11	UCK816	este capítulo	Valle El Mauro	Coquimbo	31°58'24.01''S	71°0'15.80''O	2
9	12	UCK812	este capítulo	Valle El Mauro	Coquimbo	31°58'24.01''S	71°0'15.80''O	2
10	17	NK160924	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	17	NK160927	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	18	NK160925	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	18	NK160926	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	18	NK160932	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	18	NK160933	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	18	NK160934	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
10	18	NK160935	este capítulo	Longotoma	Valparaíso	32°16'38.9''S	71°14'13.3''O	2
11	19	UCK10	este capítulo	La Mora	Valparaíso	32°29'45.8''S	70°55'40.2''O	2
12	21	UCK12	este capítulo	Puente Los Angeles 5	Valparaíso	32°30'51.5''S	70°48'06.8''O	2
13	19	UCK8	este capítulo	Los Patos	Valparaíso	32°31'59.3''S	70°39'27.1''O	2
14	23	NK96763	HM583379*	Quebrada del Tigre	Valparaíso	32°33'36.396''S	71°26'18.672''O	4
15	20	UCK9	este capítulo	Rinconada de Silva	Valparaíso	32°38'38.8''S	70°41'39.2''O	2
16	21	NK106072	este capítulo	Hijuelas	Valparaíso	32°48'44.64''S	71°5'20.76''O	2
16	22	NK106075	este capítulo	Hijuelas	Valparaíso	32°48'44.64''S	71°5'20.76''O	2

17	30	EP538	este capítulo	P. N. La Campana	Valparaíso	32°57'42''S	71°07'37''O	2
17	31	EP543	este capítulo	P. N. La Campana	Valparaíso	32°57'42''S	71°07'37''O	2
17	32	NK27606	HM583377*	P. N. La Campana	Valparaíso	32°57'42''S	71°07'37''O	4
18	31	NK108071	este capítulo	Cerro El Roble	Metropolitana	33°0'37.44''S	71°0'46.08''O	2
19	26	NK95966	este capítulo	Rinconada de Huechún	Metropolitana	33°1'3.9''S	70°49'1.31''O	2
19	33	NK95971	KF164530*	Rinconada de Huechún	Metropolitana	33°1'3.9''S	70°49'1.31''O	1
19	34	NK95963	este capítulo	Rinconada de Huechún	Metropolitana	33°1'3.9''S	70°49'1.31''O	2
20	31	UCK22	KP994531	Las Docas	Valparaíso	33°8'7''S	71°42'13.7''O	3
21	26	UCK179	este capítulo	Altos de Chicauma	Metropolitana	33°16'59''S	70°58'14''O	2
21	26	UCK180	este capítulo	Altos de Chicauma	Metropolitana	33°16'59''S	70°58'14''O	2
21	26	UCK184	este capítulo	Altos de Chicauma	Metropolitana	33°16'59''S	70°58'14''O	2
22	26	NK105407	KP994528	Quebrada de Córdova	Valparaíso	33°26'18.06''S	71°39'14.76''O	3
22	27	NK108881	este capítulo	Quebrada de Córdova	Valparaíso	33°26'18.06''S	71°39'14.76''O	2
23	26	NK95677	KF164529*	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	1
23	37	NK95673	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	37	NK96065	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	37	NK96096	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	37	NK96097	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	37	NK95111	HM583378*	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	4
23	37	NK96306	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	37	NK105332	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	37	NK105336	este capítulo	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	2
23	38	NK95691	KF164528*	San Carlos de Apoquindo	Metropolitana	33°28'8.28''S	70°29'18.54''O	1
24	26	NK95358	este capítulo	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	2
24	26	NK96360	este capítulo	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	2
24	26	NK96361	este capítulo	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	2
24	36	NK95436	KF164526*	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	1
24	36	NK95435	este capítulo	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	2
24	31	NK95354	KF164527*	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	1
24	31	NK96791	KF164530*	Rinconada de Maipú	Metropolitana	33°29'40.92''S	70°53'34.5''O	4
25	36	NK108788	este capítulo	El Canelo	Metropolitana	33°33'21.9''S	70°27'16''O	2
26	28	UCK807	KP994529	Viña Leyda	Valparaíso	33°34'08.1''S	71°22'22.3''O	3
26	29	UCK808	este capítulo	Viña Leyda	Valparaíso	33°34'08.1''S	71°22'22.3''O	2
27	35	NK106113	este capítulo	El Ingenio	Metropolitana	33°47'9.96''S	70°14'51''O	2
28	24	UCK17	este capítulo	San Enrique	Valparaíso	33°53'38.6''S	71°44'47.7''O	2
28	24	UCK18	este capítulo	San Enrique	Valparaíso	33°53'38.6''S	71°44'47.7''O	2
28	25	UCK19	este capítulo	San Enrique	Valparaíso	33°53'38.6''S	71°44'47.7''O	2
29	39	UCK16	este capítulo	Cantarrana	O'Higgins	34°23'22.7''S	71°03'16.9''O	2
30	40	NK105928	KF164540*	Las Peñas	O'Higgins	34°46'S	70°46'O	1
31	41	UCK359	este capítulo	Chimbarongo	O'Higgins	34°48'52.3''S	70°59'36.7''O	2
32	42	NK160945	KF164538*	Lipimávida	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''O	1

32	42	NK60947	este capítulo	Lipimávida	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''O	2
32	42	NK160970	este capítulo	Lipimávida	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''O	2
32	42	NK160971	este capítulo	Lipimávida	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''O	2
32	42	NK160972	KF164539*	Lipimávida	Maule	34°52'12.2''S	72°08'50.6''O	1
33	42	NK106178	KF164537*	Duao	Maule	34°52'55.56''S	72°09'15.08''O	1
34	43	UCK14	este capítulo	Los Queñes	Maule	35°00'14.8''S	70°49'54.9''O	2
34	44	UCK15	este capítulo	Los Queñes	Maule	35°00'14.8''S	70°49'54.9''O	2
35	46	GD1131	este capítulo	P. N. Altos de Lircay	Maule	35°35'S	71°02'O	2
35	46	GD1132	este capítulo	P. N. Altos de Lircay	Maule	35°35'S	71°02'O	2
36	45	NK160526	KF164534*	Vilches Alto	Maule	35°35'4.7''S	71°5'28''O	1
36	46	NK160518	KF164535*	Vilches Alto	Maule	35°35'4.7''S	71°5'28''O	1
37	47	NK160466	KF164536*	Tregualemu	Maule	35°56'59.6''S	72°44'38.4''O	1
48	NK96072	este capítulo	Enquelga	Arica-Parinacota	19°13'13.8''S	68°44'42.6''O	2	
49	UP397 (CNP1921)	HM583413*	Estancia Collón Curá	Neuquén	40°14'57''S	70°37'54''O	4	



Tabla 2 Valores de distancia corregida entre las seis subespecies de *T. elegans* mediante el modelo de evolución de secuencias de Kimura 2 parámetros (K2P).

	1	2	3	4	5
1 Loa					
2 <i>T. e. coquimbensis</i>	0.043				
3 Aconcagua	0.041	0.036			
4 <i>T. e. elegans</i>	0.056	0.044	0.051		
5 Sur 1	0.119	0.101	0.087	0.097	
6 Sur 2	0.109	0.085	0.081	0.082	0.020



Conclusiones generales

Se concluye que la diversidad interespecífica de *Thylamys* estaba subrepresentada, encontrando una nueva especie para el Perú, hermana a *T. tatei*. La diversidad intraespecífica de *T. elegans* también estaba subrepresentada, encontrando tres subespecies nuevas (Loa, Aconcagua y Sur 1) y una cuarta denominada Sur 2 que podría corresponder a *T. e. soricinus*. Se validan las subespecies *T. e. elegans* y *T. e. coquimbensis*, pero se modifica considerablemente su distribución. Se amplía la distribución norte de la especie *T. elegans*. Se encuentra a la subespecie Loa al norte de la desembocadura de dicho río. Por lo tanto, el Desierto de Atacama no sería el límite norte de la distribución de *T. elegans*.

Para la historia evolutiva del género, fue importante la dispersión a áreas contiguas y un evento vicariante. En cambio, para inferir los procesos biogeográficos que han gobernado la historia evolutiva de las subespecies de *T. elegans*, fue esencial utilizar un modelo que incorpore la dispersión a gran distancia, que fue inferida con un rol importante. El análisis biogeográfico permitió inferir que algunos ríos de Chile mediterráneo actuaron como un evento vicariante que separó un linaje ampliamente distribuido y otros como una barrera a la dispersión hacia el sur. Finalmente, se reporta por primera vez en Chile un rol histórico y actual de los ríos en la estructuración filogeográfica de un mamífero, generando divergencia genética asignable a subespecies de *T. elegans*.

Bibliografía

- Agrizzi, J., Loss, A. C., Farro, A. P. C., Duda, R., Costa, L. P. & Leite, Y. L. R. (2012). Molecular Diagnosis of Atlantic Forest Mammals Using Mitochondrial DNA Sequences: Didelphid Marsupials. *The Open Zoology Journal*, 5, (Suppl 1-M2) 2-9.
- Akaike, H. (1974). A new look at the statistical model identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 19, 716-723.
- Aldred, A. R., Prapunpoj, P. & Schreiber, G. (1997). Evolution of shorter and more hydrophilic transthyretin N-termini by stepwise conversion of exon 2 into intron 1 sequences (shifting the 3' splice site of intron 1). *European Journal of Biochemistry*, 246, 401-409.
- Balding, D. J. (2003). Likelihood-based inference for genetic correlation coefficients. *Theoretical Population Biology*, 63, 221-230.
- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16, 37-48.
- Baum D. & Shaw, K. (1995). Genealogical perspectives on the species problem. In P. C. Hoch & A. G. Stephenson (Eds) *Experimental and Molecular Approaches to Plant Biosystematics* (pp. 289-303). *Missouri Botanical Garden*.
- Bonvicino, C. R. & Weksler, M. (2012). Speciation in Amazonia: patterns and predictions of a network of hypotheses. In B. D. Patterson & E. P. Costa, (Eds) *Bones, clones and biomes* (pp. 283-306). Chicago (IL): University of Chicago Press.
- Bradley, R. D. & Baker, R. J. (2001). A test of the genetic species concept: cytochrome *b* sequences and mammals. *Journal of Mammalogy*, 83, 960-973.

- Braun, J. K., Van den Bussche, R. A., Morton, P. K. & Mares, M. A. (2005). Phylogenetic and biogeographic relationships of the mouse opossum *Thylamys* (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*) in southern South America. *Journal of Mammalogy*, 86, 147-159.
- Brown, J. H. & Lomolino, M. V. (1998). *Biogeography*, 2nd edn. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.
- Buckner, J. C., Lynch Alfaro, J., Rylands, A. B. & Alfaro, M. E. (2014). Biogeography of the marmosets and tamarins (*Callitrichidae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 413-425.
- Caramischi, F. P., Nascimento, F. F., Cerqueira, R. & Bonvicino, C. R. (2011). Genetic diversity of wild populations of the grey short-tailed opossum, *Monodelphis domestica* (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*), in Brazilian landscapes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 104, 251.
- Carevic, F. S. (2011). Rol del pequén (*Athene cunicularia*) como controlador biológico mediante el análisis de sus hábitos alimentarios en la provincia de Iquique, norte de Chile. *Idesia*, 29(1), 15-21.
- Carmignotto, A. P. & Monfort, T. (2006). Taxonomy and distribution of the Brazilian species of *Thylamys* (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*). *Mammalia*, 2006, 126-144.
- Carvalho, B. D., Oliveira, L. F. B. & Mattevi, M. S. (2009). Phylogeny of *Thylamys* (*Didelphimorphia*, *Didelphidae*) species, with special reference to *Thylamys karimii*. *Iheringia (Serie Zoologica)*, 99, 419-425.
- Carvalho, B., Oliveira, L. F. B., Langguth, A., Freygang, C. C., Ferraz, R. S. & Mattevi, M. S. (2011). Phylogenetic relationships and phylogeographic patterns in *Monodelphis* (*Didelphimorphia*: *Didelphidae*). *Journal of Mammalogy*, 92, 121-133.

- Caviedes, C. N. & Iriarte, J. A. (1989). Migration and distribution of rodents in central Chile since the Pleistocene: the paleogeographic evidence. *Journal of Biogeography*, 16, 181-187.
- Cerqueira, R. & Tribe, C. J. (2008). Genus *Didelphis* Linnaeus, 1758. In (A.L. Gardner, Ed.) *Mammals of South America: Volume 1: Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats*. (pp. 17-25). The University of Chicago Press, Chicago, USA.
- Charrier, R., Pinto, L. & Rodríguez, M. (2007). Tectonostratigraphic evolution of the Andean Orogen in Chile. In T. Moreno & W. Gibbons (Eds) *The Geology of Chile* (pp. 21-114). The Geological Society: London.
- Chemisquy, M. A. & Flores, D. A. (2012). Taxonomy of the southernmost populations of *Philander* (Didelphimorphia, Didelphidae), with implications for the systematics of the genus. *Zootaxa*, 3481, 60-72.
- Clapperton, C. M. (1993). *Quaternary Geology and Geomorphology of South America*. Elsevier, New York.
- Creighton, G. K. (1984). Systematic studies on opossums (Didelphidae) and rodents (Cricetidae). Unpublished Ph. D. dissertation, University of Michigan.
- Creighton, G. K. & Gardner, A. L. 2008 ('2007'). Genus *Thylamys* Gray, 1843. In A. L. Gardner (Ed.) *Mammals of South America. Vol. 1. Marsupials, Xenarthrans, Shrews, and Bats* (pp. 107-117). Chicago: Chicago University Press.
- Cunningham, C. W. (1997). Is incongruence between data partitions a reliable predictor of phylogenetic accuracy? Empirically testing an iterative procedure for choosing among phylogenetic methods. *Systematic Biology*, 46, 464-478.
- Dayrat, B. (2005). Towards integrative taxonomy. *Biological Journal of Linnean Society*, 85, 407-415.

- de la Sancha, N. & D'Elía, G. (2014). Additions to the Paraguayan mammal fauna: the first records of two marsupials (Didelphimorphia, Didelphidae) with comments on the alpha taxonomy of *Cryptonanus* and *Philander*. *Mammalia*, 0(0), pp. -. Retrieved 17 Mar. 2015, from doi:10.1515/mammalia-2013-0176.
- de la Sancha, N. U., D'Elía, G. & Teta, P. (2011). Systematics of the subgenus of mouse opossums *Marmosa (Micoureus)* (Didelphimorphia, Didelphidae) with noteworthy records from Paraguay. *Mammalian Biology*, 77, 229-236.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic Biology*, 56, 879-886.
- Deschamps, C. M., Vucetich, M. G., Verzi, D. H. & Olivares, A. I. (2012). Biostratigraphy and correlation of the Monte Hermoso Formation (early Pliocene, Argentina): the evidence from caviomorph rodents. *Journal of South American Earth Sciences*, 35, 1-9.
- Drummond, A. J. & Rambaut, A. (2007). BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology*, 7, 214.
- Duan, W., Richardson, S. J., Babon, J. J., Heyes, R. J., Southwell, B. R., Harms, P. J., Wettenhall, R. E., Dziegielewska, K. M., Selwood, L., Bradley, A. J., Brack, C. M. & Schreiber, G. (1995). Evolution of transthyretin in marsupials. *European Journal of Biochemistry*, 227, 396-406.
- Faria, M., Nascimento, F. F., de Oliveira, J. A. & Bonvicino, C. R. (2013). Biogeographic Determinants of Genetic Diversification in the Mouse Opossum *Gracilinanus agilis* (Didelphimorphia: Didelphidae). *Journal of Heredity*, 104(5), 613-626.
- Faria, M., Nascimento, F. F., de Oliveira, J. A. & Bonvicino, C. R. (2014). Filogeografia de populações brasileiras de *Marmosa (marmosa) murina* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Revista Nordestina de Biologia*, 21(2), 27-52.

- Farías, M., Charrier, R., Carretier, S., Martinod, J., Fock, A., Campbell, D., Cáceres, J. & Comte, D. (2008). Late Miocene high and rapid surface uplift and its erosional response in the Andes of central Chile (33°-35°S). *Tectonics*, 27, TC1005.
- Farris, J. S., Källersjö, M., Kluge, A. G. & Bult, C. (1994). Testing significance of congruence. *Cladistics*, 10, 315-319.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using bootstrap. *Evolution*, 39, 783-791.
- Flores, D. A., Díaz, M. M. & Barquez, R. M. (2000). Mouse opossums (Didelphimorphia, Didelphidae) of northwestern Argentina: systematics and distribution. *Zeitschrift für Säugetierkunde*, 65, 321-339.
- Flores, D. A., Díaz, M. M. & Barquez, R. M. (2007). Systematics and distribution of marsupials in Argentina: a review. *University of California Publications in Zoology*, 134, 579-669.
- Formoso, A., Udrizar Sauthier, D. E., Teta, P. & Pardiñas, U. F. J. (2011). Dense-sampling reveals a complex distributional pattern between the southernmost marsupials *Lestodelphys* and *Thylamys* in Patagonia, Argentina. *Mammalia*, 75, 371-379.
- Folguera, A., Orts, D., Spagnuolo, M., Rojas Vera, E., Litvak, V., Sagripanti, L., Ramos, M. E. & Ramos, V. A. (2011). A review of Late Cretaceous to Quaternary palaeogeography of the southern Andes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 250-268.
- Gardner, A. L. (1993). In D. E. Wilson & D. M. Reeder (Eds) *Mammal species of the world*, 2nd ed. (pp. 15-23). Washington: Smithsonian Institution Press.
- Gardner, A. L. (2005). In D. E. Wilson & D. M. Reeder (Eds) *Mammal species of the world*, 3rd ed. (pp. 3-18). Baltimore: Johns Hopkins University Press.

- Gardner, A. L. (Ed). (2008). *Mammals of South America. Vol. 1: marsupials, xenarthrans, shrews, and bats*. Chicago: University of Chicago Press.
- Gardner, A. L. & Creighton, G. K. (1989). A new generic name for Tate's (1933) *microtarsus* group of South American mouse opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*, 102, 3-7.
- Gelman, A., Carlin J. B., Stern H. S. & Rubin, D. B. (1995). *Bayesian Data Analysis*. Chapman and Hall, London.
- Giambiagi, L. B., Ramos, V. A., Godoy, E., Álvarez, P. P. & Orts, S. (2003). Cenozoic deformation and tectonic style of the Andes, between 33° and 34° south latitude. *Tecton*, 22, 1041.
- Giarla, T. C. & Jansa, S. A. (2014). The role of physical geography and habitat type in shaping the biogeographical history of a recent radiation of Neotropical marsupials (*Thylamys*: Didelphidae). *Journal of Biogeography*, 41, 1547-1558.
- Giarla, T. C. & Jansa, S. A. (2015). The impact of Quaternary climate oscillations on divergence times and historical population sizes in *Thylamys* opossums from the Andes. *Molecular Ecology*. doi:10.1111/mec.13173
- Giarla, T. C., Voss, R. S. & Jansa, S. A. (2010). Species limits and phylogenetic relationships in the didelphid marsupial genus *Thylamys* based on mitochondrial DNA sequences and morphology. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 346, 1-67.
- Giarla, T. C., Voss, R. S. & Jansa, S. A. (2014). Hidden diversity in the Andes: Comparison of species delimitation methods in montane marsupials. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 70, 137-151.

- Giara, T. C. & Jansa, S. A. (2015). The impact of Quaternary climate oscillations on divergence times and historical population sizes in *Thylamys* opossums from the Andes. *Molecular Ecology*, 24, 2495-2506. doi: 10.1111/mec.13173.
- Goin, F. J. (1997a). *Thylamys zettii*, una nueva especie de marmosino (Marsupialia, Didelphidae) del Cenozoico de la región pampeana. *Ameghiniana*, 34, 481-484.
- Goin, F. J. (1997b). New clues for understanding Neogene Marsupial radiations. In (R. Kay, R. Madden, R. Cifelli, & J. Flynn (Eds.) *Vertebrate Paleontology in the Neotropics. Miocene Fauna of La Venta, Colombia*. (pp- 187-206). Smithsonian Institution Press, Washington.
- Goin, F. J., Montalvo, C. I. & Visconti, G. (2000). Los marsupiales (Mammalia) del Mioceno superior de la Formación Cerro Azul (Provincia de La Pampa, Argentina). *Estudios Geológicos*, 56, 101-126.
- Greer, J. K. (1965). Mammals of Malleco province, Chile. *Publications of the Museum, Michigan State University, biological series*, 3, 49-152.
- Guillot, G., Estoup, A., Mortier, F. & Cosson, J. F. (2005). A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*, 170, 1261-1280.
- Guillot, G., Santos, F. & Estoup, A. (2008). Analysing georeferenced population genetics data with Geneland: a new algorithm to deal with null alleles and a friendly graphical user interface. *Bioinformatics*, 24, 1406-1407.
- Hall, T. A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleid Acids Symposym Series*, 41, 95-98.
- Huelsenbeck, J. P. & Ronquist, F. (2001). MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, 17, 754-755.

- Ihaka, R. & Gentleman, R. (1996). R: a language for data analysis and graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5, 299-314.
- Iriarte, W. A. (2008). *Mamíferos de Chile*. Lynx edicions, Barcelona, España.
- Irwin, D. M., Kocher, T. D. & Wilson, A. C. (1991). Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution*, 32, 128-144.
- Jansa, S. A. & Voss, R. S. (2000). Phylogenetic studies on didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. *Journal of Mammalian Evolution*, 7, 43-77.
- Jansa, S. A. & Voss, R. S. (2005). Phylogenetic relationships of the marsupial genus *Hyladelphys* based on nuclear gene sequences and morphology. *Journal of Mammalogy* 86, 853-865.
- Jansa, S. A., Barker, F. K. & Voss, R. S. (2014). The early diversification history of didelphid marsupials: A window into South America's "splendid isolation." *Evolution*, 68 (3), 684-695.
- Jobb, G. (2008). TREEFINDER version of October 2008. Munich, Germany. Distributed by the author at www.treefinder.de.
- Kimura, M. (1981). Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. *Proceeding of National Academy of Science*, 78, 454-458.
- Kirsch, J. A. W. & Palma, R. E. (1995). DNA/DNA hybridization studies of carnivorous marsupials V. A further estimate of relationships among opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Mammalia*, 59, 403-425.
- Lamborot, M. & Eaton, L. C. (1997). The Maipo River as a biogeographical barrier to *Liolaemus monticola* (Tropiduridae) in the mountain ranges of central Chile. *Journal of Zoological and Systematic Evolutionary Research*, 35, 105-111.

- Lambrot, M., Ossa, C. G. & Vásquez, M. (2012). Population cytogenetics of the “Northern Mod 1” chromosomal race of *Liolaemus monticola* Müller & Helmich (Iguanidae) from Central Chile. *Gayana*, 76(1), 10-21.
- Lavandero, B., Miranda, M., Ramirez, C. C. & Fuentes-Contreras, E. (2009). Landscape composition modulates population genetic structure of *Eriosoma lanigerum* (Hausmann) on *Malus domestica* Borkh in central Chile. *Bulletin of Entomological Research*, 99, 97-105.
- Longmire J. L., Lewis, A. K., Brown, N. C., Buckingham, J. M., Clark, L. C., Jones, M. D., Meincke, L. J., Meyne, J., Ratliff, R. L., Ray, F. A., Wagner, R. P. & Morris, R. K. (1988). Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. *Genomics*, 2, 14-24.
- Mann, G. (1978). Los pequeños mamíferos de Chile. *Gayana, Zoología*, 40, 1-132.
- Marelli, C. A. (1931). Los vertebrados exhibidos en los Zoológicos del Plata. *Memorias del Jardín Zoológico de la Plata*, 4, 1-302.
- Marquet, P. A. (1994). Diversity of small mammals in the Pacific coastal desert of Peru and Chile and in the adjacent Andean area: biogeography and community structure. *Australian Journal of Zoology*, 42, 527-542.
- Martin, G. M. (2009). Sobre la identidad de *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) del oeste pampeano y centro-sur del espinal, Argentina. *Mastozoología Neotropical*, 16, 333-346.
- Matzke, N. (2013a). BioGeoBEARS: BioGeography with Bayesian (and Likelihood) Evolutionary Analysis in R Scripts. University of California, Berkeley, CA. <http://CRAN.R-project.org/package=BioGeoBEARS>.

- Matzke, N. J. (2013b). Thesis abstract: probabilistic historical biogeography: new models for founder-event speciation, imperfect detection, and fossils allow improved accuracy and model-testing. *Frontiers in Biogeography*, 5 (4), 242-248.
- Mayr, E. (1942). *Systematics and the origin of species*. New York, NY: Columbia University Press.
- McCulloch, R. D., Bentley, M. J., Purves, R. S., Hulton, N. R. J., Sugden, D. E. & Clapperton, C. M. (2000). Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary Science* 15, 409-417.
- Meserve, P. L. & Glanz, W. E. (1978). Geographical ecology of small mammals in the northern Chilean arid zone. *Journal of Biogeography*, 5, 135-148.
- Meynard, A. P., Palma, R. E. & Ribera-Milla, E. (2002). Filogeografía de las yacas chilenas del género *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) en base a secuencias del gen mitocondrial citocromo *b*. *Revista Chilena de Historia Natural*, 75, 299-306.
- Mones, A. (1980). Sobre una colección de vertebrados fósiles de Monte Hermoso (Plioceno Superior) Argentina, con la descripción de una nueva especie de *Marmosa* (Marsupialia: Didelphidae). *Comunicaciones Paleontológicas del Museo de Historia Natural de Montevideo*, 1, 159-169.
- Moreno, P. I., Villagrán, C., Marquet, P. A. & Marshall, L. G. (1994). Quaternary paleobiogeography of northern and central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 67, 487-502.
- Morrone, J. J. (2002). Biogeographical regions under track and cladistic scrutiny. *Journal of Biogeography*, 29, 149-152.

- Morrone, J. J. (2006). Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of entomofauna. *Annual Review of Entomology*, 51, 467-494.
- Murray, V. (1989). Improved double-stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Research*, 17, 8889.
- Nei, M. & Kumar, S. (2000). *Molecular Evolution and Phylogenetics*. New York, USA: Oxford University Press.
- Newton, M. A. & Raftery, A. E. (1994) Approximate Bayesian inference by the weighted likelihood bootstrap. *Journal of the Royal Statistical Society, Series B*, 56, 3-48.
- Nicholson, G. A., Smith, V., Jónsson, F., Gústafsson, O., Stefánsson, K. & Donnelly, P. (2002). Assessing population differentiation and isolation from single nucleotide polymorphism data. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 64, 695-715.
- Ortiz-Jaureguizar, E. & Cladera, G. A. (2006). Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments*, 66, 498-532.
- Osgood, W. H. (1943). *The mammals of Chile*. Chicago: Field Museum of Natural History, Zoology Series.
- Padial, J. M., Miralles, A., De la Riva, I. & Vences, M. (2010). The integrative future of taxonomy. *Frontiers in Zoology*, 7, 16.
- Pagel, M. & Meade, A. (2004). A phylogenetic mixture model for detecting pattern-heterogeneity in gene sequence or character state data. *Systematic Biology*, 53, 571-581.
- Pagel, M. & Meade, A. (2005). Mixture models in phylogenetic inference. In O. Gascuel (Ed.) *Mathematics of Evolution and Phylogeny* (pp. 121-142). Oxford, United Kingdom: Oxford University Press.

- Pagel, M. & Meade, A. (2006). Bayesian analysis of correlated evolution of discrete characters by reversible-jump Markov chain Monte Carlo. *American Naturalist*, 167, 808-825.
- Palma, R. E. (1995). Range expansion of two South American Mouse opossums (*Thylamys*, Didelphidae) and their biogeographic implications. *Revista Chilena de Historia Natural*, 68, 515-522.
- Palma, R. E. (1997). *Thylamys elegans*. *Mammalian species*, 572, 1-4.
- Palma, R. E., Ribera-Milla, E., Yates, T. L., Marquet, P. A. & Meynard, A. P. (2002). Phylogenetic and biogeographic relationships of the mouse opossum *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) in southern South America. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 245-253.
- Palma, R. E., Boric-Bargetto, D., Jayat, J. P., Flores, D. A., Zeballos, H., Pacheco, V., Cancino, R. A., Alfaro, F. D., Rodríguez-Serrano, E. & Pardiñas, U. F. J. (2014). Molecular phylogenetics of mouse opossums: new findings on the phylogeny of *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae). *Zoologica Scripta*, 43, 217-234.
- Patton, J. L. & da Silva, M. N. (1997). Definition of Species of Pouched Four-Eyed Opossums (Didelphidae, *Philander*). *Journal of Mammalogy*, 78, 90-102.
- Patton, J. L. & da Silva, M. F. (1998). Rivers, refuges, and ridges: the geography of speciation of Amazonian mammals. In D. Howard & S. Berlocher (Eds) *Endless forms: modes and mechanisms of speciation* (pp. 202-213). Oxford: Oxford University Press.
- Patton, J. L. & Costa, L. P. (2003). Molecular phylogeography and species limits in rainforest didelphid marsupials of South America. In M. E. Jones, C. R. Dickman & M. Archer (Eds) *Predators with pouches: The biology of carnivorous marsupials* (pp. 73-81). CSIRO Publishing, Collingwood.

- Patton, J. L., Dos Reis, S. F. & Da Silva, M. N. F. (1996). Relationships among didelphid marsupials based on sequence variation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Journal of Mammalian Evolution*, 3, 3-29.
- Patton, J. L., da Silva, M. N. F. & Malcolm, J. R. (2000). Mammals of the rio Juruá and the evolutionary and ecological diversification of Amazonia. *Bulletin of American Museum of Natural History*, 244, 1-306.
- Philippi, R. A. (1894). Beschreibung einer dritten Beutelmaus aus Chile. *Archiv für Naturgeschichte*, 60, 36 (not seen, cited in Tate 1933).
- Pine, R. H., Miller, S. D. & Schamberger, M. L. (1979). Contributions to the Mammalogy of Chile. *Mammalia*, 43, 339-376.
- Pons, J., Barraclough, T. G., Gomez-Zurita, J., Cardoso, A., Duran, D., Hazell, S., Kamoun, S., Sumlin, W. & Vogler, A.P. (2006). Sequence-based species delimitation for the DNA taxonomy of undescribed insects. *Systematic Biology*, 55, 595-609.
- Potts, R. & Behrensmeyer, A. K. (1992). Late cenozoic terrestrial ecosystems. In A. K. Behrensmeyer, J. D. Damuth, W. A. DiMichele, R. Potts, S. Hans-Dieter, S. L. Wing, (Eds) *Terrestrial Ecosystems through Time: Evolutionary Paleocology of Terrestrial Plants and Animals* (pp. 419-541). Chicago, USA: The University of Chicago Press.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. (2007). Molecular evolution, phylogenetics and epidemiology website. Available: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>. Accessed April 10, 2012.
- Rambaut, A. & Drummond, A. J. (2013). TreeAnnotator v1.7.0, Available from: <http://beast.bio.ed.ac.uk> (Accessed 16 October 2013).
- Ramos, V. A., Cristallini, E. O. & Pérez, D. J. (2002). The pampean flatslab of the Central Andes. *Journal of South American Earth Sciences*, 15, 59-78.

- Ree, R. H. & Smith, S. A. (2008). Maximum likelihood inference of geographic range evolution by dispersal, local extinction, and cladogenesis. *Systematic Biology*, 57, 4-14.
- Ree, R. H., Moore, B. R., Webb, C. O. & Donoghue, M. J. (2005). A likelihood framework for inferring the evolution of geographic range on phylogenetic trees. *Evolution* 59, 2299-2311.
- Reig, O. A., Kirsch, J. A. W. & Marshall, L. G. (1985). New conclusions on the relationships of the opossum-like marsupials, with an annotated classification of the Didelphimorphia. *Ameghiniana*, 21, 335-343.
- Reig, O. A., Kirsch, J. A. W. & Marshall, L. G. (1987). Systematic relationships of the living and Neocenozoic American 'opossum-like' marsupials (Suborder Didelphimorphia), with comments on the classification of these and of the Cretaceous and Paleogene New World and European metatherians. In M. Archer (Ed) *Possums and Opossums: Studies in Evolution* (pp. 1-89). New South Wales: Surrey Beatty and Sons and the Royal Zoological Society of New South Wales.
- Reise, D. & Venegas, W. (1987). Catalogue of records, localities and biotopes from research work on small mammals in Chile and Argentina. *Gayana Zoología*, 51, 103-130.
- Rodríguez, F., Oliver, J. F., Marín, A. & Medina, J. R. (1990). The general stochastic model of nucleotide substitution. *Journal of Theoretical Biology*, 142, 485-501.
- Ryder, O. A. (1986). Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. *Trends in Ecology and Evolution*, 1, 9-10.
- Sallaberry-Pincheira, N., Garín, C. F., González-Acuña, D., Sallaberry, M. A. & Vianna, J. A. (2010). Genetic divergence of Chilean long-tailed snake (*Philodryas chamissonis*)

across latitudes: conservation threats for different lineages. *Diversity and Distributions*, 17, 152-162.

Schlick-Steiner, B. C., Steiner, F. M., Seifert, B., Stauffer, C., Christian, E. & Crozier R. H. (2010). Integrative taxonomy: a multisource approach to exploring biodiversity. *Annual Review of Entomology*, 55, 421-438.

Scotese, C. R. (2004). Cenozoic and Mesozoic paleogeography: changing terrestrial biogeographic pathways. In M. V. Lomolino & L. R. Heaney (Eds) *Frontiers of Biogeography: New Directions in the Geography of Nature* (pp. 9-26). Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. Publishers.

Sikes, R. S., Gannon, W. L. & the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. (2011). Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild animals in research. *Journal of Mammalogy*, 92, 235-253.

Solari, S. (2002). Sistemática de *Thylamys* (Mamalia: Didelphimorphia: Marmosidae). Un estudio de las poblaciones asignadas a *Thylamys elegans* en Perú. Unpublished MSc thesis, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.

Solari, S. (2003). Diversity and distribution of *Thylamys* (Didelphidae) in South America, with emphasis on species from the western side of the Andes. In M. E. Jones, C. R. Dickman & M. Archer (Eds). *Predators with Pouches: The Biology of Carnivorous Marsupials* (pp. 82-101). Melbourne: SCIRO Press.

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

- Stamatakis, A. T. (2006). RAxML-VI-HPC: maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models. *Bioinformatics*, 22, 2688-2690.
- Steiner, C., Tilak, M., Douzery, E. J. P. & Catzeflis, F. M. (2005). New DNA data from a transthyretin nuclear intron suggest an Oligocene to Miocene diversification of living South America opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 35, 363-379.
- Suchard, M. A., Weiss, R. E. & Sinsheimer, J. S. (2001). Bayesian selection of continuous-time Markov chain evolutionary models. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 1001-1013.
- Suchard, M. A., Weiss, R. E. & Sinsheimer, J. S. (2005). Models for estimating Bayes factors with applications to phylogeny and tests of monophyly. *Biometrics*, 61, 665-673.
- Swofford, D. L. (2002). PAUP*: *Phylogenetic Analyses Using Parsimony (* and other methods)*. Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers.
- Tamayo, M. & Frassinetti, D. (1980). Catálogo de los mamíferos fósiles y vivientes de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Chile*, 37, 323-399.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739.
- Tang, C. Q., Humphreys, A. M., Fontaneto, D. & Barraclough, T. G. (2014). Effects of phylogenetic reconstruction on the robustness of species delimitation methods using single-locus data. *Methods in Ecology and Evolution*, 5, 1086-1094.

- Tate, G. H. H. (1931). Brief diagnoses of twenty-six apparently new forms of *Marmosa* (Marsupialia) from South America. *American Museum Novitates*, 493, 1-14.
- Tate, G. H. H. (1933). Systematic revision of the marsupial genus *Marmosa*, with a discussion of the adaptive radiation of the murine opossums (*Marmosa*). *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 66, 1-250.
- Tavaré, S. (1986). Some probabilistic and statistical problems on the analysis of DNA sequences. In R. M. Miura (Ed). *Some Mathematical Questions in Biology-DNA Analysis* (pp. 57-86). Providence, RI, USA: American Mathematical Society.
- Teta, P., D'Elía, G., Flores, D. & de la Sancha, N. (2009). Diversity and distribution of the mouse opossums of the genus *Thylamys* (Didelphimorphia, Didelphidae) in north-eastern and central Argentina. *Gayana*, 73, 180-199.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. & Higgins, D. G. (1997). The CLUSTAL_X Windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 25, 4876-4882.
- Torres-Pérez, F., Lamborot, M., Boric-Bargetto, D., Hernández, C., Ortiz, J. C. & Palma, R. E. (2007). Phylogeography of a mountain lizard species: an ancient fragmentation process mediated by riverine barriers in the *Liolaemus monticola* complex (Sauria: Liolaemidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 45, 72-81.
- Victoriano, P., Ortíz, J. C., Benavides, E., Byron, J. & Sites, J. (2008). Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology*, 17, 2397-2416.

- Vilela, J. F., Alves de Oliveira, J. & Russo, C. A. d. M. (2015). The diversification of the genus *Monodelphis* and the chronology of Didelphidae (Didelphimorphia). *Zoological Journal of the Linnean Society*. doi: 10.1111/zoj.12240.
- Villagrán, C. (1994). Quaternary history of the Mediterranean vegetation of Chile. In M. T. Kalin, P. Zedler, & M. Fox, (Eds) *Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile, California and Australia* (pp. 3-19). Springer-Verlag, New York.
- Viruel, J., Catalán, P. & Segarra-Moragues, J. G. (2014). Latitudinal Environmental Niches and Riverine Barriers Shaped the Phylogeography of the Central Chilean Endemic *Dioscorea humilis* (Dioscoreaceae). *PLoS ONE* 9(10), e110029.
- Voss, R. S. & Jansa, S. A. (2003). Phylogenetic studies on didelphid marsupials II. Nonmolecular data and new IRBP sequences: Separate and combined analyses of didelphine relationships with denser taxon sampling. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 1-82.
- Voss, R. S. & Jansa, S. A. (2009). Phylogenetic relationships and classification of didelphid marsupials, an extant radiation of New World metatherian mammals. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 322, 1-177.
- Voss, R. S., Gardner, A. L. & Jansa, S. A. (2004a). On the relationships of '*Marmosa*' *formosa* Shamel, 1930 (Marsupialia: Didelphidae), a phylogenetic puzzle from the Chaco of northern Argentina. *American Museum Novitates*, 3442, 1-18.
- Voss, R. S., Tarifa, T. & Yensen, E. (2004b). An introduction to *Marmosops* (Marsupialia: Didelphidae), with the description of a new species from Bolivia and notes on the taxonomy and distribution of other Bolivian forms. *American Museum Novitates*, 3466, 1-40.

- Voss, R. S., Lunde, D. P. & Jansa, S. A. (2005). On the contents of *Gracilinanus* Gardner and Creighton, 1989, with the description of a previously unrecognized clade of small didelphid marsupials. *American Museum Novitates*, 3482, 1-34.
- Voss, R. S., Myers, P., Catzeflis, F., Carmignotto, A. P. & Barreiro, J. (2009). The six opossums of Felix de Azara: identification, taxonomic history, neotype designations, and nomenclatural recommendations. In R. S. Voss & M. Carleton (Eds). *Systematic Mammalogy: Contribution in Honor of Guy G. Musser* (pp. 406-433). New York, NY, USA: Bulletin of the American Museum of Natural History.
- Wilcox, T. P., Zwickl, D. J., Heath, T. A. & Hillis, D. M. (2002). Phylogenetic relationships of the dwarf boas and a comparison of Bayesian and bootstrap measures of phylogenetic support. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 25, 361-371.
- Zachos, F. E., Apollonio, M., Bärmann, E. V., Festa-Bianchet, M., Gohlich, U., Habel, J. C., Haring, E., Kruckenhauser, L., Lovari, S., McDevitt, A. D, Pertoldi, C., Rossner, G. E., Sanchez-Villagra, M. R, Scandura, M. & Suchentrunk, F. (2013). Species inflation and taxonomic artefacts – a critical comment on recent trends in mammalian classification. *Mammalian Biology*, 78, 1-6.
- Zhang, J. (2013). Species delimitation server. Available online: <http://species.h-its.org/ptp/>
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P. & Stamatakis, A. (2013). A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29, 2869-2876.