



Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas

**RELACIONES FILOGENÉTICAS DE LOS LAGARTOS GRUÑIDORES
(LEIOSAURIDAE, *PRISTIDACTYLUS* FITZINGER 1843) PRESENTES EN CHILE:
UNA APROXIMACIÓN MOLECULAR.**

Seminario de título para optar al título profesional de Biólogo

Por: Jesús Alexander Morales Bustos
Profesor Guía: Dr. Claudio Correa Quezada

Concepción, Chile 2020

Se autoriza la reproducción total o parcial, con fines académicos, por cualquier medio o procedimiento, incluyendo la cita bibliográfica del documento

Este seminario de título fue desarrollado en el Laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos del Departamento de Zoología de la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción

DR. CLAUDIO CORREA

DR. JUAN CARLOS ORTIZ



DR. LUIS PARRA

DR. VÍCTOR HERNÁNDEZ

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, mi hermana Dangenne Morales y especialmente a mi madre, Paola Bustos por todo el apoyo y amor incondicional brindado durante mi formación de biólogo a pesar de la distancia, una gran mujer que me ha enseñado a perseverar por mis metas.

A Jazmín Toledo Rioseco, un pilar primordial desde mi llegada a Concepción, por el amor, apoyo incondicional, vivencias, consejos, quien ha contribuido de forma significativa al crecimiento personal y sobre todo emocional.

También agradezco al Dr. Claudio Correa Quezada por confiar en mí y el apoyo incondicional de mis ideas. Las vivencias, conversaciones y comentarios que me han nutrido de forma positiva en el ámbito académico y personal, de igual modo, al Dr. Juan Carlos Ortiz quien me permitió ser partícipe de su laboratorio de Sistemática y Conservación de Herpetozoos desde muy temprano de mi formación académica.

A Gustavo Fica, Pablo Fuentes, Cristóbal Araneda, Tomas Lepe, Catalina Marín, por su amistad leal y sincera, y sobre todo las vivencias y campañas de terreno.

Tabla de contenidos

RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
INTRODUCCIÓN	1
El clado Leiosauridae	1
El género <i>Pristidactylus</i>	2
Historia taxonómica del género <i>Pristidactylus</i>	3
<i>PRISTIDACTYLUS</i> CHILENOS	6
La sistemática	10
Marcadores moleculares	11
PREGUNTA	12
HIPÓTESIS	13
OBJETIVO GENERAL	13
OBJETIVOS ESPECIFICOS	13
MATERIALES Y MÉTODOS	14
Obtención de muestras y procedimientos de laboratorio	14
Edición y análisis de secuencias	16
Análisis filogenético de árbol de especie	16
RESULTADOS	18
Obtención de muestras y procedimiento de laboratorio	18
Árbol de especies	19
DISCUSIÓN	21
CONCLUSIÓN	26
REFERENCIAS	28

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Especies y localidades muestreadas de <i>Pristidactylus</i> en Chile. Se incluye el número de ejemplares por localidad (n). El asterisco indica la localidad tipo.	15
Tabla 2. Secuencias de <i>Pristidactylus</i> de Chile obtenidas en este estudio. La X indica los genes que se lograron amplificar con éxito en el respectivo individuo.	18
Tabla 3. Longitudes de los fragmentos génicos obtenidos en este estudio, en pares de bases (Pb).	19

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Especies de <i>Pristidactylus</i> de Chile. A. <i>P. valeriae</i> ; B. <i>P. alvaroi</i> ; C. <i>P. torquatus</i> ; D. <i>P. volcanensis</i>	7
Figura 2. Hipótesis filogenéticas del clado Leiosaurinae de las últimas dos décadas. (A) Frost et al. (2001), caracteres moleculares. (B) Frost et al. (2001), caracteres morfológicos. (C) Frost et al. (2001), morfología y molecular. (D) Abdala et al. (2009), caracteres miológicos. (E) Abdala et al. (2009), combinación de caracteres miológicos y moleculares de Frost et al. (2001). (F) Townsend et al. (2011), genes nucleares. (G) Pyron et al. (2013), caracteres moleculares. (H) Wiens et al. (2012), genes nucleares. (I) Morando et al. (2015), caracteres moleculares. (J) Femenias et al. (2020), caracteres moleculares.	9
Figura 3. Distribución de las muestras cada especie incluidas en este estudio de los géneros del clado Leiosaurinae: <i>Leiosaurus</i> , <i>Diplolaemus</i> y <i>Pristidactylus</i> (de izquierda a derecha, respectivamente).	17
Figura 4. Árbol de especies del clado Leiosaurinae inferido en *BEAST. Los números a la derecha de los nodos indican los valores de probabilidad a posteriori. A. Clado <i>Pristidactylus</i> argentino; B. Clado <i>Pristidactylus</i> chileno.	20
Figura 5. Detalles de las escamas suboculares de especies de la subfamilia Leiosaurinae. A. <i>Leiosaurus belli</i> ; B. <i>Diplolaemus bibronii</i> ; C. <i>Diplolaemus darwinii</i> ; D. <i>Pristidactylus valeriae</i> ; E. <i>Pristidactylus torquatus</i> ; F. Esquemas de las escamas suboculares utilizadas por Cei (1973) para diferenciar a los géneros.	23
Anexo 1.	37

RESUMEN

El clado Leiosaurinae está compuesto por especies de lagartos poco conocidas y endémicas de la región austral de Sudamérica. Su morfología altamente conservada ha limitado el conocimiento taxonómico y la comprensión de la diversidad e historia evolutiva de este linaje. *Pristidactylus* es el género con mayor número de especies dentro de la subfamilia, y a su vez, el que ha presentado el mayor número de problemas taxonómicos a nivel de género desde que fue propuesto. En este estudio se estimaron por primera vez las relaciones filogenéticas del clado chileno de *Pristidactylus* (*P. alvaroi*, *P. torquatus*, *P. valeriae* y *P. volcanensis*) utilizando marcadores moleculares: dos genes mitocondriales (cytb y 12s) y dos nucleares anónimos (ANL-D90 y ANL-D92). Los resultados indican que *Pristidactylus*, tal como está definido actualmente, es un grupo polifilético, por lo que sus caracteres diagnósticos morfológicos deben ser reevaluados. Además, el clado chileno es un grupo natural que probablemente comenzó su diversificación a causa de eventos climáticos y orogénicos del Plioceno/Mioceno. *Pristidactylus torquatus* es el taxón más divergente dentro de este clado, por lo que las especies de Chile central se encuentran estrechamente emparentadas (*P. alvaroi* + (*P. valeriae* + *P. volcanensis*)). Finalmente, el grupo hermano del clado chileno es el género *Leiosaurus*, relación soportada con un elevado valor de probabilidad a posteriori, por lo que se discute la implicancia taxonómica de esta nueva hipótesis.

Palabras claves: Clado chileno, *Pristidactylus*, *Leiosaurus*, marcadores moleculares, monofilia.

ABSTRACT

The Leiosaurinae clade is composed of little-known lizard species endemic to the southern region of South America. Its highly conserved morphology has limited taxonomic knowledge and understanding of the diversity and evolutionary history of this lineage. *Pristidactylus* is the genus with the largest number of species within the subfamily, and in turn, the one that has presented the greatest number of taxonomic problems at the genus level since it was proposed. In this study, the phylogenetic relationships of the Chilean *Pristidactylus* clade (*P. alvaroi*, *P. torquatus*, *P. valeriae* and *P. volcanensis*) were estimated for the first time using molecular markers: two mitochondrial genes (*cytb* and *12s*) and two anonymous nuclear (ANL-D90 and ANL-D92). The results indicate that *Pristidactylus*, as it is currently defined, is a polyphyletic group, therefore its morphological diagnostic characters should be re-evaluated. Furthermore, the Chilean clade is a natural group that probably began its diversification due to Pliocene / Miocene orogenic and climatic events. *Pristidactylus torquatus* is the most divergent taxon within this clade, which is why the species from central Chile are closely related (*P. alvaroi* + (*P. valeriae* + *P. volcanensis*)). Finally, the sister group of the Chilean clade is the genus *Leiosaurus*, a relationship supported with a high posterior probability value, so the taxonomic implication of this new hypothesis is discussed.

Key words: Chilean clade, *Pristidactylus*, *Leiosaurus*, molecular markers, monophilia

INTRODUCCIÓN

El continente sudamericano está compuesto por varias regiones biogeográficas que albergan la mayor biodiversidad del mundo (Pino et al. 2016). Las interacciones entre las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y los eventos orogénicos del Plioceno/Mioceno han contribuido a dar forma y distribución de la biota que conocemos actualmente, tanto en las regiones tropicales como en las regiones templadas del continente (Turchetto-Zolet et al. 2013). El conocimiento que se tiene de los reptiles sudamericanos aún es limitado, ya que en algunos linajes se desconocen los patrones y procesos responsables de dar forma a su asombrosa diversidad de especies (Turchetto-Zolet et al. 2013; Morando et al. 2015). Además, el descubrimiento de nuevos linajes no ha ayudado a solucionar estas interrogantes, puesto que en muchos casos han estado marcados por problemas taxonómicos (Troncoso et al. 2019).

El clado Leiosauridae

Leiosaurinae es una subfamilia de la familia Leiosauridae (Frost et al. 2001), que está compuesta por algunos de los taxa de lagartos con las distribuciones más australes del mundo. Las especies que componen esta subfamilia se encuentran tanto en Chile como Argentina, habitando diversos ambientes y son conocidos comúnmente como “gruñidores” y “matuastos” en cada país, respectivamente. Actualmente se reconocen tres géneros: *Leiosaurus* Duméril & Bibron 1837,

Diplolaemus Bell 1843 y *Pristidactylus* Fitzinger 1843, con un total de 18 especies (Morando et al. 2015). La morfología de estos lagartos es altamente conservada, lo cual dificulta la distinción entre las especies y géneros, lo que a su vez limita la comprensión de la historia evolutiva del clado (Femenias et al. 2020). Durante mucho tiempo, los géneros que actualmente conforman el clado han sufrido cambios taxonómicos tanto en la composición de especies como en sus diagnósticos, las cuales han sido poco claras y conflictivas, en muchas ocasiones involucrando géneros del clado Enyaliinae (subfamilia hermana), particularmente el género *Urostrophus* (Etheridge & Williams 1985; Etheridge & Williams 1991; Cei 2004). No obstante, la monofilia de ambas subfamilias (Leiosaurinae y Enyaliinae) se encuentra fuertemente soportada tanto por caracteres morfológicos como genéticos (Frost et al. 2001; Abdala et al. 2009; Wiens et al. 2012; Pryon et al. 2013; Reeder et al. 2015).

El género *Pristidactylus*

Pristidactylus es el género más representativo en cuanto a número de especies dentro de la subfamilia, con 10 especies reconocidas en la actualidad (Morando et al. 2015). Tiene una distribución disjunta separada por la cordillera de los Andes, con seis especies exclusivamente en territorio argentino (*P. araucanus*, *P. fasciatus*, *P. nigroiugulus*, *P. scapulatus*, *P. achalensis* y *P. casuhatiensis*) y

cuatro en territorio chileno (*P. volcanensis*, *P. valeriae*, *P. alvaroi* y *P. torquatus*) (Figura 1). Algunos autores mencionan que ambos grupos son notablemente diferentes, tanto en morfología como ecología (Cei 1986). Morfológicamente se diferencian principalmente en la lepidosis: el grupo chileno se caracteriza por poseer escamas más grandes, lo que implica un menor número de estas; por ejemplo, la escama nasal está en contacto directo con la escama postrostral lateral, no así en el grupo argentino, en donde la escama nasal está separada por una o dos escamas de la postrostral lateral. Otra diferencia está en el número de las escamas que bordean las escamas supralabiales, 8 a 15 en el grupo chileno y 15 a 23 en el grupo argentino (Etheridge & Williams 1985, Frost et al. 2001). En cuanto al hábitat, el grupo chileno habita ambientes principalmente boscosos donde predominan especies arbóreas del género *Nothofagus*, en cambio el grupo argentino habita en ambientes más secos y rocosos (Cei 1986). Estas características morfológicas y ecológicas evidencian dos grupos bien diferenciados entre sí.

Historia taxonómica del género *Pristidactylus*

Pristidactylus, desde que fue propuesto como un género por Fitzinger (1843) a partir de un único ejemplar juvenil de *Leiosaurus fasciatus*, ha sido difícil de definir, lo cual se ve reflejado en su compleja historia taxonómica. Actualmente,

no hay una diagnosis clara que defina con exactitud al género a pesar de los distintos esfuerzos realizados durante las últimas décadas (Etheridge & Williams 1985; Cei et al. 2001; Cei et al. 2004). Boulenger (1885) no proporciona argumentos claros, define a *Pristidactylus* únicamente para la especie *P. fasciatus* y transfiere a *L. torquatus*, actualmente *P. torquatus* (que fue descrita inicialmente dentro del género *Leiosaurus* por Philippi (1861)), al género *Urostrophus*. Posteriormente, Boulenger (1889) transfiere a *L. scapulatus* Burmeister 1861 a *Urostrophus*. Durante mucho tiempo, estas propuestas taxonómicas no fueron cuestionadas, hasta que Gallardo (1964) indica que existen pocos caracteres morfológicos internos que sirvan para diferenciar los géneros *Leiosaurus* y *Urostrophus*. Sin embargo, reconoce caracteres externos para diferenciar a *Urostrophus scapulatus* del género y de esta forma proponer un nuevo género, *Cupriganus*, con *C. scapulatus* como especie tipo y adicionando dos nuevas especies (*C. achalensis* y *C. araucanus*). Según este autor, *Cupriganus* se diferenciaba “notablemente” de *Leiosaurus* por las escamas subdigitales comprimidas y salientes, pectinadas, en el primer, segundo y tercer dígito trasero, dicromatismo sexual y banda negra antehumeral. Sin embargo, a pesar de que el análisis morfológico se basó exclusivamente en especies argentinas, Gallardo (1964) sugiere que probablemente *Urostrophus torquatus* debería ser transferido a este nuevo género o al género *Leiosaurus*, lo cual sugiere que las características de la especie no estaban del todo claras.

Barrio (1969) basándose en caracteres morfológicos y a la variación de estos en la distribución geográfica de *C. araucanus*, evidencia que existen caracteres compartidos entre esta especie y *P. fasciatus*, por lo que propone que *C. araucanus* es sinonimia menor de *P. fasciatus*. Más tarde Paull *et al.* (1976) considerando lo propuesto por Barrio (1969), discutiendo que *P. fasciatus* (especie tipo de *Pristidactylus*) comparte caracteres genéricos con *C. achalensis* (especie tipo de *Cupriganus*), por lo tanto consideraron que el género *Cupriganus* es sinonimia menor de *Pristidactylus*, dejando al género propuesto por Gallardo (1964) no válido. Etheridge y Williams (1985) proponen una diagnosis para *Pristidactylus*, destacando que algunos caracteres diagnósticos propuestos como tales (e.g. escamas infradigitales pectinadas de los dígitos traseros, escama subocular alargada) no eran compartidos por todas las especies dentro del género. La nueva diagnosis que proponen indica que *Pristidactylus* se puede diferenciar del resto de los géneros (*Diplolaemus* y *Leiosaurus*) por la marcada banda negra antehumeral, el dicromatismo sexual, dientes pterigoides y autotomía caudal. Posteriormente, tanto Cei *et al.* (2001) como Cei *et al.* (2004), proporcionan diagnosis para el género basadas únicamente en las especies de *Pristidactylus* argentinas, y en ambos casos separan al grupo chileno únicamente por el número y tamaño de las escamas, sin realizar un análisis más profundo ni estimar sus relaciones filogenéticas.

***PRISTIDACTYLUS* CHILENOS**

Los *Pristidactylus* chilenos no han jugado un rol muy importante o decisivo al momento de definir una diagnosis para el género. No obstante, constantemente se ha mencionado que las diferencias que las pueden separar del grupo argentino son escamas más grandes, un menor número alrededor de la mitad del cuerpo y el arreglo de algunas escamas rostrales (Etheridge y Williams 1985; Cei 1986; Cei et al. 2001; Cei et al. 2004). Evidencias paleoclimáticas y paleogeológicas sugieren que el linaje chileno de *Pristidactylus* y el clado argentino se diferenciaron de un ancestro común antes del levantamiento de la Cordillera de los Andes (Formas et al. 1979; Cei et al. 2004). Actualmente, el grupo chileno se compone de cuatro especies todas en categoría de conservación con el criterio de la RCE: *P. alvaroi* (En Peligro), *P. torquatus* (Vulnerable), *P. valeriae* (En Peligro) y *P. volcanensis* (En Peligro). (Figura 1) asociadas a bosques de *Nothofagus* (en menor grado *P. volcanensis*).

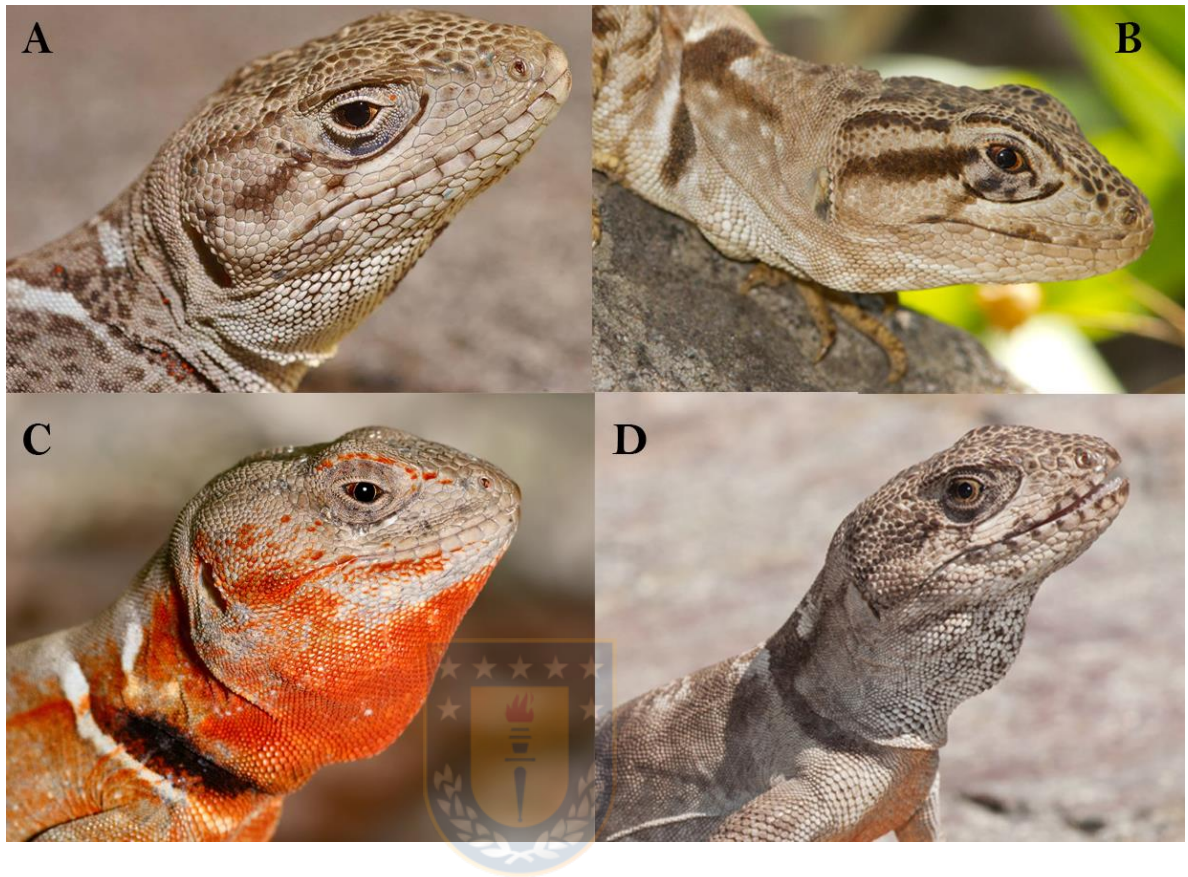


Figura 1. Especies de *Pristidactylus* de Chile. A. *P. valeriae*; B. *P. alvaroi*; C. *P. torquatus*; D. *P. volcanensis*.

Hipótesis filogenéticas dentro de Leiosaurinae

Las relaciones filogenéticas de los géneros dentro de la subfamilia Leiosaurinae aún no han sido resueltas completamente (Morando et al. 2015; Femenias et al. 2020; Figura 2). Estudios filogenéticos realizados exclusivamente con caracteres morfológicos externos indican que *Pristidactylus* es un grupo natural (Frost et al. 2001; Abdala et al. 2009). Sin embargo, otros estudios con datos moleculares

desafían la hipótesis de que *Pristidactylus* es un grupo monofilético (Abdala et al. 2009; Pyron et al. 2013; Morando et al. 2015, Femenias et al. 2020). Morando et al. (2015) evaluaron las relaciones dentro de Leiosaurae, utilizando exclusivamente datos moleculares de todas las especies de *Diplolaemus* y *Leiosaurus*, con la excepción del género *Pristidactylus*, del cual se incluyeron solo 6 de las 10 especies descritas, excluyendo por falta de datos a una especie argentina y tres especies chilenas (*P. casuhatiensis*, *P. alvaroi*, *P. valeriae* y *P. volcanensis*). De acuerdo a las dos últimas hipótesis filogenéticas propuesta por Morando et al. (2015) y Femenias et al. (2020), *P. torquatus* es el taxón hermano del clado *Leiosaurus*, indicando que *Pristidactylus* es polifilético, lo cual es congruente con algunos estudios previos (Abdala et al. 2009; Pyron et al. 2013). Cei (1986) indica que “las especies chilenas de *Pristidactylus* son notablemente diferentes de las especies argentinas tanto en morfología y ecología”, postulando, además, que la vida arborícola en relictos de bosques es un carácter plesiomórfico (Cei 1973). Esto último fue cuestionado por Frost et al. (2001), quienes postulan que el hábito arborícola de las especies chilenas es un carácter secundario derivado.

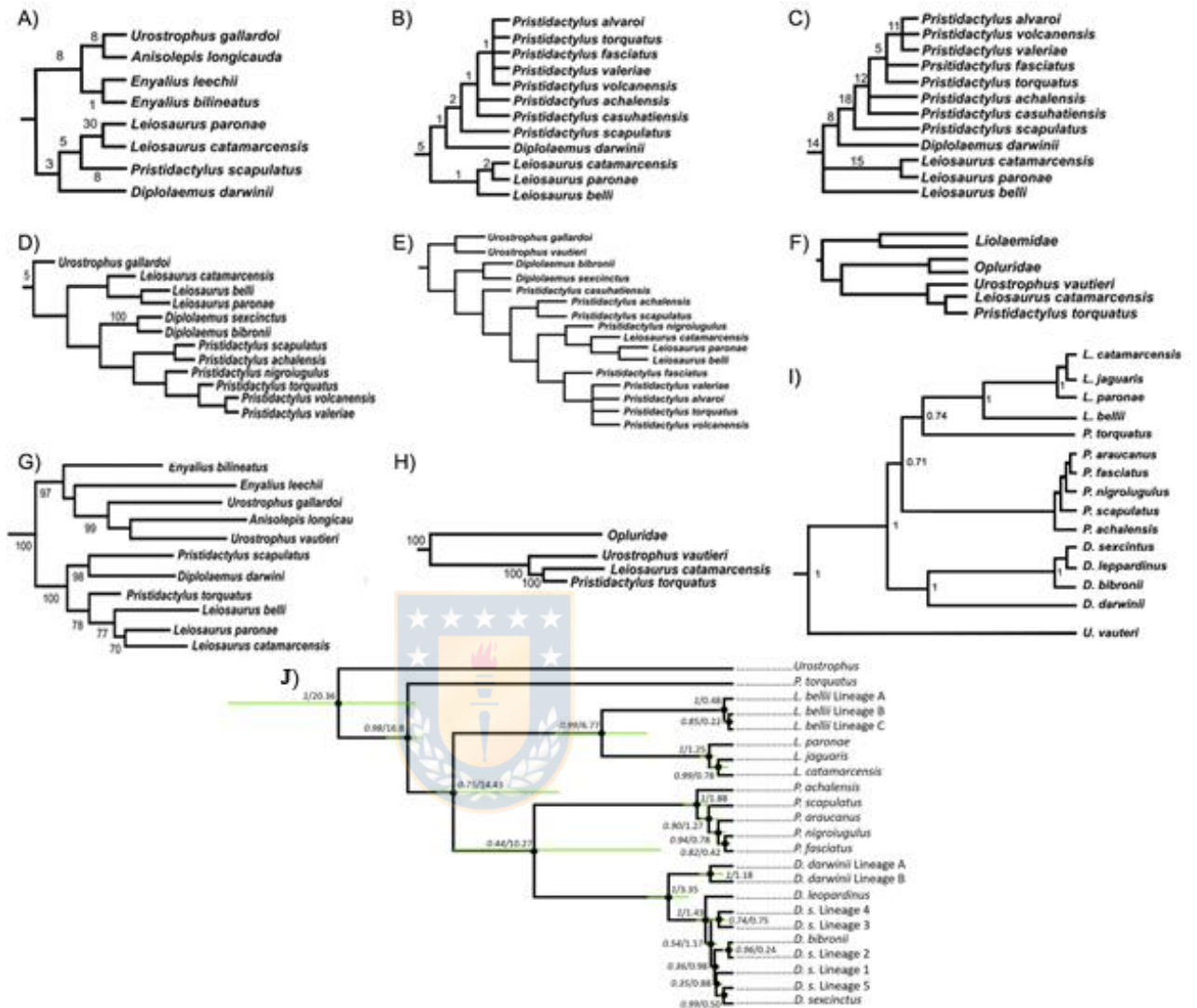


Figura 2. Hipótesis filogenéticas del clado Leiosaurinae de las últimas dos décadas. (A) Frost et al. (2001), caracteres moleculares. (B) Frost et al. (2001), caracteres morfológicos. (C) Frost et al. (2001), morfología y molecular. (D) Abdala et al. (2009), caracteres miológicos. (E) Abdala et al. (2009), combinación de caracteres miológicos y moleculares de Frost et al. (2001). (F) Townsend et al. (2011), genes nucleares. (G) Pyron et al. (2013), caracteres moleculares. (H) Wiens et al. (2012), genes nucleares. (I) Morando et al. (2015), caracteres moleculares. (J) Femenias et al. (2020), caracteres moleculares.

Debido a que las hipótesis filogenéticas propuestas con caracteres moleculares han incluido solamente a una especie chilena de *Pristidactylus* (*P. torquatus*), no han permitido establecer las relaciones filogenéticas entre las cuatro especies chilenas y evaluar si estas conforman un grupo natural que sería el clado hermano del género *Leiosaurus* o sería parte del género *Pristidactylus*. En los únicos estudios en que han sido incluidas las cuatro especies de Chile, como Frost et al. (2001) y Abdala et al. (2009), donde se realizaron análisis con caracteres morfológicos, el grupo chileno forma una politomía, que incluso se relaciona estrechamente con una especie argentina (*P. fasciatus*, Frost et al. 2001).



La sistemática

La sistemática es una disciplina de la biología comparada que estudia las relaciones jerárquicas de los linajes (Eliosa & Navarro 2005). La sistemática aborda tres aspectos fundamentales: 1) reconocer la biodiversidad, es decir, identificar a las especies y definir otros taxa superiores, 2) reconstruir la filogenia o historia evolutiva de los taxa, y 3) elaborar clasificaciones fieles a la filogenia (Felsenstein 1985; Harvey & Pagel 1991; Wiley et al. 1991; Villaseñor & Dávila 1996; Eliosa & Navarro 2005). Desde este punto de vista, la sistemática conforma la base para otros campos de la biología comparada, al proporcionar las hipótesis

filogenéticas que se utilizan, por ejemplo, para interpretaciones en un marco evolutivo (Lipscomb 1998; Morrone 2006).

Marcadores moleculares

Los marcadores moleculares en la actualidad se han convertido en una pieza fundamental del conjunto de herramientas de la biología moderna. Existe una amplia gama de marcadores que son directamente responsables de los avances en varias áreas de investigación, como la genética de poblaciones, e incluso han tomado una importante relevancia en la inferencia de filogenias de especies (Thomson et al. 2010).



El ADN mitocondrial (ADNmt) es la región del ADN más utilizada en análisis filogenéticos en un sinfín de taxa (e.g. Montero & Autino 2009, Cardoso 2014, Beltrán-Torres & Hernández-Fernández 2020). Esta molécula es de pequeño tamaño, posee un alto contenido de residuos adenina-timina, carece de bases metiladas, no sufre recombinación, corresponde a una molécula haploide (n), se hereda exclusivamente por vía materna, posee regiones universalmente conservadas y otras variables, presenta una rápida tasa de evolución y es relativamente fácil de obtener. Por estas razones y características, ha sido la principal fuente de secuencias de ADN para realizar análisis filogenéticos (Avice 1986; Hillis 1987; Caterino et al. 2000; Burns et al. 2003; Mandal et al. 2014).

En cambio, el ADN nuclear (ADNn) presenta una baja tasa de mutación, por lo que es mucho más conservado. En el ADNn podemos encontrar los denominados loci nucleares anónimos (ANL, del inglés “Anonymous Nuclear Loci”). Estos marcadores tienen una distribución relativamente uniforme a lo largo del genoma, aleatoria y en principio con una alta probabilidad de estar en regiones no codificantes (Thomson et al. 2010). No estarán ligados ni sesgados en un área del genoma y lo cual implica que están sometidos a una evolución neutra que permite la acumulación de variación informativa para muchos estudios evolutivos (Bertozzi et al. 2012). Estos marcadores han sido utilizados en estudios a nivel filogeográfico, genética de poblaciones y filogenético (Brito & Edwards 2009; Thomson et al. 2010; Bertozzi et al. 2012; Lemmon & Lemmon 2013), siendo este último el enfoque que se aplicará en este estudio para resolver la problemática del género *Pristidactylus*.

PREGUNTA

Los trabajos sistemáticos moleculares más recientes de los *Pristidactylus* se han centrado principalmente en las especies argentinas, mostrando que este género, tal como lo conocemos actualmente, es polifilético, con *P. torquatus* como taxón

hermano de *Leiosaurus*. Teniendo en cuenta esta situación, surge la incógnita de cuales sería las posiciones topológicas y sus relaciones filogenéticas del resto de las especies de *Pristidactylus* presentes en Chile, ya que nunca han sido incorporadas a estudios de filogenia molecular. De aquí surgen dos hipótesis que se requieren poner a prueba para posteriormente entender mejor la historia evolutiva de este grupo en Chile.

HIPÓTESIS



H1: Las cuatro especies de *Pristidactylus* presentes en Chile conforman un grupo natural.

H2: El grupo chileno constituye el clado hermano del género *Leiosaurus*.

OBJETIVO GENERAL

Estimar las relaciones filogenéticas de las especies de *Pristidactylus* presentes en Chile con datos moleculares.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Obtener por primera vez secuencias de ADN mitocondrial y nuclear de tres de las cuatro especies de *Pristidactylus* presentes en Chile.

- Obtener una hipótesis filogenética robusta entre las especies de *Pristidactylus* presentes en Chile.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de muestras y procedimientos de laboratorio.

Entre los meses de noviembre de 2018 y febrero de 2020 se capturaron 11 ejemplares de cuatro especies de *Pristidactylus*, provenientes de seis localidades (Tabla 1). Para tres especies se incluyeron ejemplares capturados en sus respectivas localidades tipo, con excepción de *P. alvaroi*, los que fueron capturados en Altos de Chicauma, a 23 km de la localidad tipo: Cerro el Roble (Tabla 1). La obtención de tejido para extraer ADN se realizó con un método no invasivo, que consistió en la toma de una muestra de mucosa bucal con tómulas Copan 503CS01. Posteriormente, todos los individuos fueron liberados en el mismo sitio donde fueron capturados.

Tabla 1. Especies y localidades muestreadas de *Pristidactylus* en Chile. Se incluye el número de ejemplares por localidad (n). El asterisco indica la localidad tipo.

Especie	Localidad	n	Coordenadas	
			Y	X
<i>P. valeriae</i>	Alhué*	2	-34.0269012	-71.0998993
<i>P. torquatus</i>	Alto Huemul	2	-34.8927002	-70.6691971
<i>P. alvaroi</i>	Altos de Chicauma	2	-33.2151985	-70.9129028
<i>P. torquatus</i>	Shangrila	1	-36.8896110	-71.4717220
<i>P. torquatus</i>	Concepción*	2	-36.8409004	-73.0223007
<i>P. volcanensis</i>	El Volcán*	2	-33.7887001	-70.1363983

Se extrajo el DNA de las tómulas utilizando el kit de extracción Promega Wizard SV DNA Purification System. Se amplificaron cuatro fragmentos génicos, de los cuales dos corresponden al genoma mitocondrial, citocromo b (Primer: GluDGL TCACTTGAARAACCAAYCGTTG; Cytb3 GGCAAATAGGAARTATCATTC; Palumbi 1996) y 12S (Primer: tPhe AAAGCACRGCCTGAAGATGA; 12e GTRCGCTTACCWTGTTACGACT; Wiens et al. 1999), y dos a loci nucleares anónimos (ANL), ANL-D90 (Primer: F GCTTCTCCATATCCCACCAG; R: CATCCACAAACTCCAGGTCA) y ANL-D92 (Primer F: TGATAGCCTTTGGCTAAGCAC; R: CGCAGCATGTGGTTTTAATC; Morando et al. 2015). Ambos fragmentos mitocondriales se amplificaron siguiendo el protocolo de PCR de Morando et al. (2003, 2004), y los ANL siguiendo el protocolo de Morando et al. (2015), con modificaciones en las concentraciones finales de algunos reactivos (por muestra: 2,6 µL dNTPs [2,5 mM], 2,2 µL cada primer [10 µM], 3 µL MgCl [25 mM], 0,2 µL Taq DNA Polimerasa [5U/µL; Promega

Corp., Madison, WI], para un total de 30 μ L de volumen de la reacción). Los productos de PCR de cada gen se chequearon por electroforesis en geles de agarosa al 2%. Posteriormente, los productos de PCR se secuenciaron en ambas direcciones en Macrogen, Korea.

Edición y análisis de secuencias.

Las secuencias fueron editadas utilizando el Software Codon Code Aligner (CodonCode Corporation, Dedham, MA). Se evaluó si los genes mitocondriales se encuentran saturados mediante un test de saturación (Xia & Lemey 2009) en DAMBE V. 7.0.35 (Xia, 2018) y para cada gen nuclear se evaluó si hay señales de recombinación utilizando el programa RDP v3.44 (Martin & Rybicki 2000; Health et al. 2006).

Análisis filogenético de árbol de especie.

Para estimar el árbol de especie se utilizó el complemento StarBEAST 2 (Ogilvie et al. 2017), implementado en BEAST 2.5 (Bouckaert et al. 2019). Para este análisis se utilizaron matrices separadas de cada gen, de un total de 71 individuos pertenecientes a 17 especies de Leiosaurinae, obtenidas de GenBank de

Morando et al. (2015) y Femenias et al. (2019) (Figura 3; Anexo 1). Posteriormente, las matrices fueron combinadas en BEAST, asignándole el modelo de sustitución molecular GTR+I+G y un reloj molecular random local clock (RLC) a cada locus. La tasa de mutación de cada gen fue asignada según lo indicado en Morando et al. (2015). El análisis consistió de 2×10^8 generaciones de Cadenas de Markov Monte Carlo (MCMC), con un muestreo cada 1000 generaciones y un burning del 10%, realizado posteriormente con TreeAnnotator V2.5. El árbol consenso fue visualizado en FigTree v1.4.2 y en DensiTree V2.5 (Bouckaert et al. 2019).

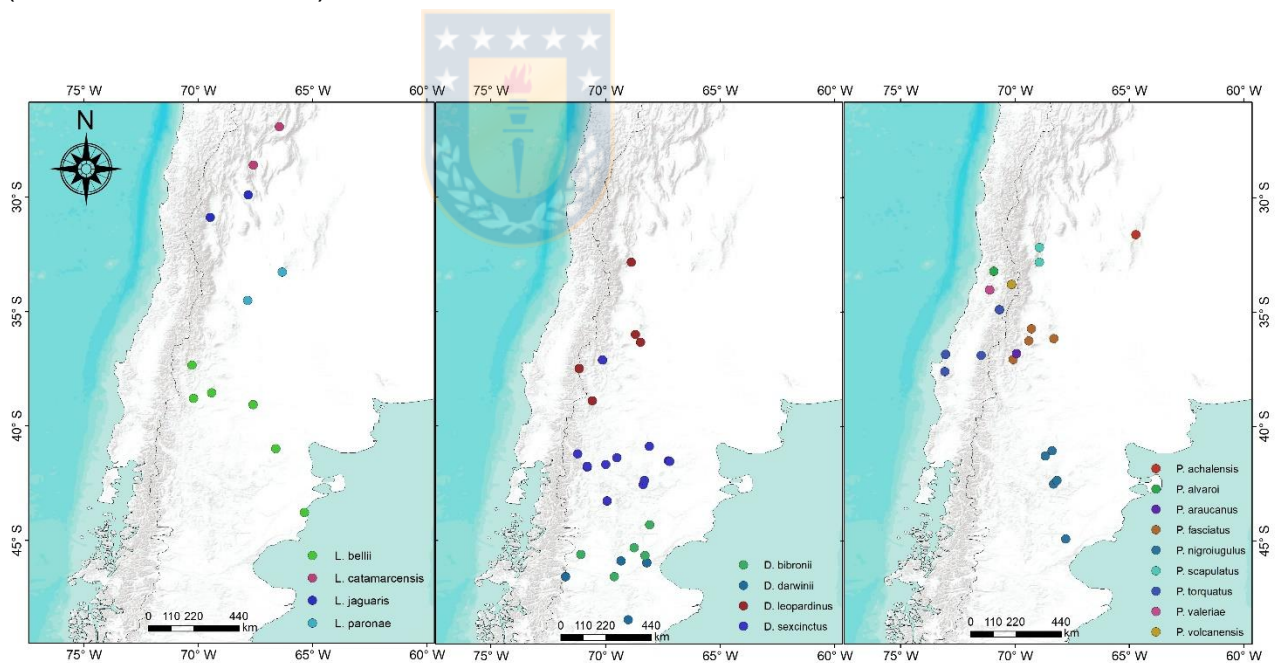


Figura 3. Distribución de las muestras cada especie incluidas en este estudio de los géneros del clado Leiosaurinae: *Leiosaurus*, *Diplolaemus* y *Pristidactylus* (de izquierda a derecha, respectivamente).

RESULTADOS

Obtención de muestras y procedimiento de laboratorio.

Se logró amplificar con éxito, por primera vez, genes mitocondriales en tres especies de *Pristidactylus* (*P. alvaroi*, *P. valeriae* y *P. volcanensis*) y genes nucleares para las cuatro especies de *Pristidactylus* presentes en Chile, siendo estos los primeros datos nucleares para estas especies. Cabe destacar que se amplificó entre dos a cuatro genes por individuo, de manera que cada especie cuenta con al menos un representante con todos los genes amplificados; excepto *P. torquatus*, del cual solo se logró amplificar tres genes para un individuo (Tabla 2). No se observó saturación en los genes mitocondriales, ni señales de recombinación en los genes nucleares utilizados. Para el gen mitocondrial *citocromo b*, se obtuvieron secuencias sin gaps y sin codones de término intermedios. El largo de las secuencias obtenidas se resume en la Tabla 3.

Tabla 2. Secuencias de *Pristidactylus* de Chile obtenidas en este estudio. La **X** indica los genes que se lograron amplificar con éxito en el respectivo individuo.

Código	Especie	Provincia/Region	Localidad	Genes			
				Cytb	12s	ANL-D90	ANL-D92
PAL1	<i>Pristidactylus alvaroi</i>	Región Metropolitana (Chile)	Altos de Chicauma	X	X	X	X
PAL2	<i>Pristidactylus alvaroi</i>	Región Metropolitana (Chile)	Altos de Chicauma	X	X	-	-
PTOR1	<i>Pristidactylus torquatus</i>	VII Región del Maule (Chile)	Alto Huemul	X	X	-	-
PTOR2	<i>Pristidactylus torquatus</i>	VII Región del Maule (Chile)	Alto Huemul	X	X	-	-
PTOR_SL1	<i>Pristidactylus torquatus</i>	VIII Región del Biobío (Chile)	Shangrila	X	-	X	X
PTOR_CON1	<i>Pristidactylus torquatus</i>	VIII Región del Biobío (Chile)	Concepción	X	X	-	-
PTOR_CON2	<i>Pristidactylus torquatus</i>	VIII Región del Biobío (Chile)	Concepción	X	-	-	X
PVAL1	<i>Pristidactylus valeriae</i>	Región Metropolitana (Chile)	Alhué	X	X	-	-
PVAL2	<i>Pristidactylus valeriae</i>	Región Metropolitana (Chile)	Alhué	X	X	X	X
PVOL3	<i>Pristidactylus volcanensis</i>	Región Metropolitana (Chile)	El Volcán	X	X	-	-
PVOL4	<i>Pristidactylus volcanensis</i>	Región Metropolitana (Chile)	El Volcán	X	X	X	X

Tabla 3. Longitudes de los fragmentos génicos obtenidos en este estudio, en pares de bases (Pb).

	Loci mitocondrial		Loci nuclear anónimos		total
	Cyt- <i>b</i>	12s	ANL-D90	ANL-D92	
largo (Pb)	809	909	590	598	2906

Árbol de especies

Según este análisis, Leiosaurinae es un grupo monofilético (PP= 1) y dentro de este clado las relaciones presentan en general elevados valores de soporte estadístico (Figura 4). El género *Pristidactylus*, tal como está definido actualmente en la literatura, es un grupo polifilético, separado en dos clados fuertemente soportados con un alto valor estadístico: el clado argentino (*P. araucanus* + *P. fasciatus* + *P. nigroiugulus* + *P. scapulatus* + *P. achalensis*; PP=1), el cual correspondería al grupo hermano del género *Diplolaemus* (aunque esta relación está débilmente soportada, PP=0,78), y el clado chileno (*P. alvaroi* + *P. valeriae* + *P. volcanensis* + *P. torquatus*; PP=1), el cual correspondería al grupo hermano del género *Leiosaurus*, con un elevado valor de probabilidad a posteriori (PP=0,98). Dentro del clado chileno, *P. torquatus* es la especie que diverge primero, siendo el taxón hermano de las otras tres especies; entre ellas, *P. alvaroi* es taxon hermano (PP = 1) del clado *P. valeriae* + *P. volcanensis*, aunque este último con un valor de probabilidad a posteriori moderado (PP= 0,86).

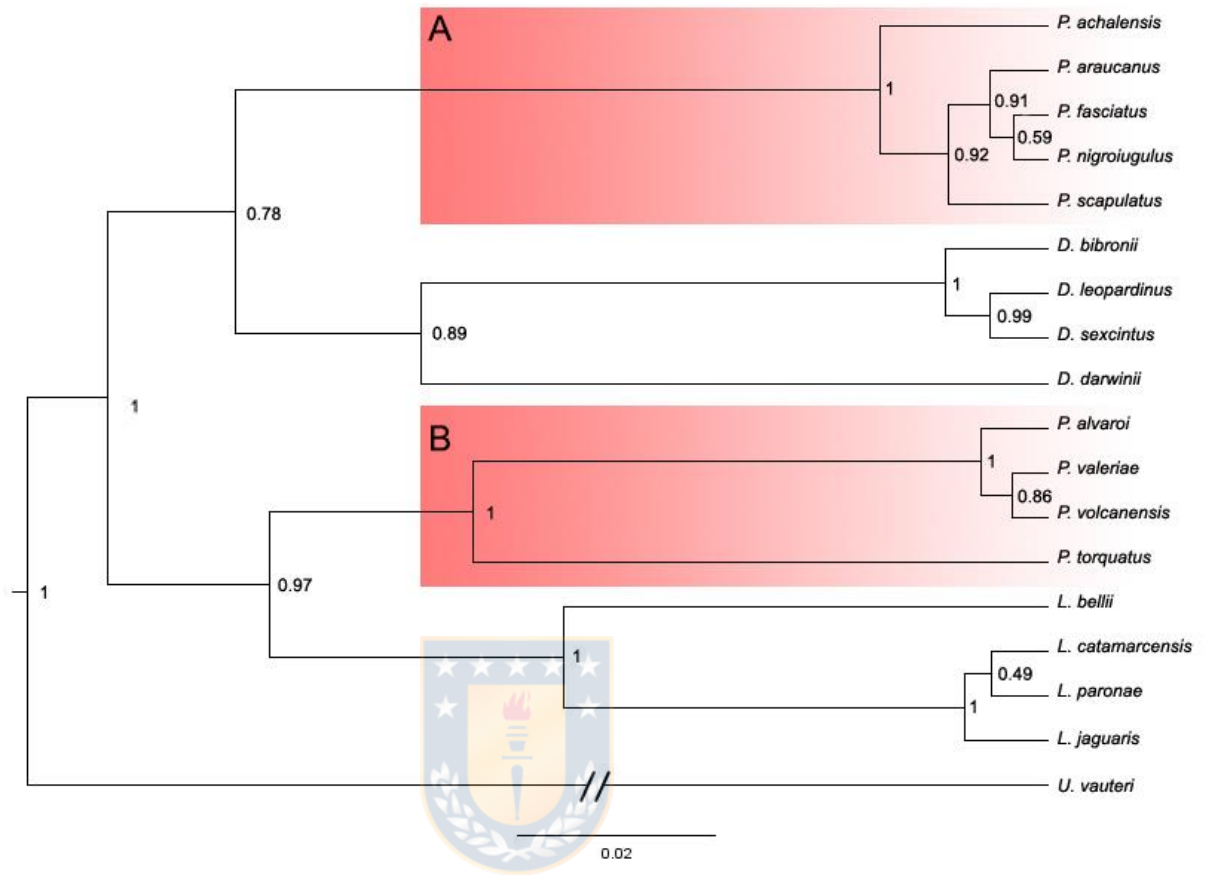


Figura 4. Árbol de especies del clado Leiosaurinae inferido en *BEAST. Los números a la derecha de los nodos indican los valores de probabilidad a posteriori. **A.** Clado *Pristidactylus* argentino; **B.** Clado *Pristidactylus* chileno.

DISCUSIÓN

En este trabajo se obtuvo la hipótesis filogenética molecular más completa de la subfamilia Leiosaurinae a la fecha, incluyendo todas las especies de *Diplolaemus* y *Leiosaurus*, cinco de las seis especies de *Pristidactylus* del clado argentino y, por primera vez, todas las especies chilenas de *Pristidactylus*. En estudios filogenéticos previos también se habían incluido las cuatro especies de Chile, pero utilizando caracteres morfológicos (Frost et al. 2001; Abdala et al 2009). Los caracteres morfológicos utilizados en estos estudios aparentemente no han sido los adecuados ya que las relaciones filogenéticas entre las especies chilenas aparecen como una politomía. En la matriz utilizada por Frost et al. (2001), muchos caracteres fueron codificados en forma incompleta, por lo que es probable que la politomía se deba a esta falta de información. Un resultado similar se obtuvo en el análisis de Abdala et al. (2009), ya que estos autores también utilizaron la matriz de Frost et al. (2001). En contraste, la utilización de marcadores mitocondriales y nucleares en este estudio, analizados con una aproximación de árbol de especies, permitieron mejorar la resolución y resolver las relaciones a nivel de géneros y especies, incluyendo el clado de las especies chilenas. Esto se debe principalmente al mayor número de caracteres informativos presentes en los cuatro genes utilizados y a que en conjunto, estos representan a ambos genomas, mitocondrial y nuclear.

La hipótesis filogenética obtenida en este estudio es parcialmente congruente con la topología obtenida por Morando et al. (2015), en donde el único *Pristidactylus* de Chile incluido, *P. torquatus*, es el taxón hermano del género *Leiosaurus*, pero con un valor de probabilidad a posteriori mediano ($PP = 0,74$). En este estudio, al incorporar todas las especies chilenas de *Pristidactylus*, se obtiene la misma topología pero esta vez con un valor alto de $PP = 1$. Los valores

medianos o bajos de *PP* como el obtenido en Morando et al. (2015) ocurren principalmente cuando dos o más linajes no se unen inmediatamente con su ancestro más reciente (Bouckaert et al. 2019). A diferencia de la congruencia parcial obtenida con el estudio de Morando et al. (2015), nuestra hipótesis filogenética difiere de la obtenida por Femenias et al. (2020), específicamente con la posición topológica de *P. torquatus*, la cual aparece como la especie hermana de todos los otros taxones. Sin embargo, los valores de *PP* de los nodos que representan las relaciones entre los géneros son bajos en el análisis de Femenias et al. (2020) (ver Figura 2), a diferencia de este estudio donde los valores de *PP* en general son altos, excepto en el nodo *Pristidactylus* (Argentino) + *Diplolaemus*, donde el valor de *PP* es 0,78 (Figura 4).

El clado chileno (*P. alvaroi* + *P. valeriae* + *P. volcanensis* + *P. torquatus*; Figura 4.B) es el clado hermano del género *Leiosaurus*, un resultado congruente con las topologías de Morando et al. (2015) y Pyron et al. (2013). La alta divergencia genética entre los *Pristidactylus* de Chile y los de Argentina concuerda con lo mencionado por Cei (1986), quien indicó que estos linajes son notablemente diferentes. Si bien estos clados comparten similitudes morfológicas de acuerdo a su diagnosis, también estos caracteres no son consistentes ni exclusivos dentro de estos clados (Etheridge & Williams 1985; Cei et al. 2001; Cei et al. 2004). Por ejemplo, la banda antehumeral negra, la cual debería estar presente en todos los *Pristidactylus*, pero se encuentra ausente en *Pristidactylus valeriae* (Donoso-Barros 1966), o el dicromatismo sexual, el cual también es compartido con al menos una especie de *Leiosaurus*, pero está ausente en *P. volcanensis* (Lamborot & Díaz 1987). La autotomía caudal está presente en todos los *Pristidactylus*; sin embargo, Gallardo (1961) indica que en *Leiosaurus* la cola no se fractura con facilidad, poniendo en duda este carácter. Estos y otros caracteres morfológicos externos indican que la subfamilia tiene un alto porcentaje de

morfología conservada (e.g. escamas suboculares, Figura 5) en sus linajes a nivel de género (Femenias et al. 2020).

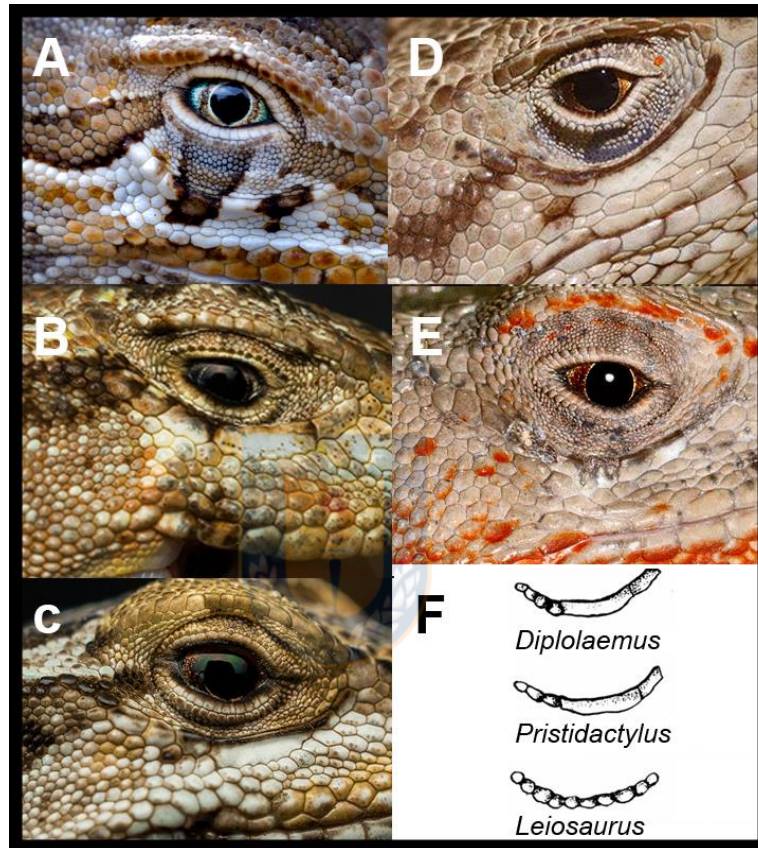


Figura 5. Detalles de las escamas suboculares de especies de la subfamilia Leiosaurinae. **A.** *Leiosaurus belli*; **B.** *Diplolaemus bibronii*; **C.** *Diplolaemus darwini*; **D.** *Pristidactylus valeriae*; **E.** *Pristidactylus torquatus*; **F.** Esquemas de las escamas suboculares utilizadas por Cei (1973) para diferenciar a los géneros.

La divergencia de *P. torquatus* y el género *Leiosaurus* ocurrió hace 15,31 millones de años (Morando et al. 2015). Formas et al. (1979) y Cei (1986) sugieren que el grupo chileno es derivado de los taxos argentinas y esto ocurrió antes del levantamiento de los Andes. Estas hipótesis están basadas en *Pristidactylus*

como un grupo natural, sin embargo con este nuevo resultado, se deben reevaluar. Albino et al. (2017) describe un fósil de *Pristidactylus* de hace 20-18 Ma aproximadamente en territorio argentino, el cual comparte similitudes morfológicas *P. torquatus*, por lo que este fósil podría ser el ancestro del grupo chileno de *Pristidactylus*. Estudios geológicos, estiman que el levantamiento de los Andes comenzó a finales del Oligoceno y Mioceno temprano, hace unos 23 Ma. Sin embargo, el peak, con un levantamiento abrupto, ocurrió durante el Mioceno medio (12 Ma) y el Plioceno temprano, aproximadamente hace unos 4,5 Ma (Garzione et al. 2008; Hoorn et al. 2010; Folguera et al. 2011). La condición arbórea característica de grupo chileno se considera un carácter plesiomórfico dentro de la subfamilia, y la especiación posterior en ambientes xéricos sería el carácter sinapomórfico (Etheridge & de Queiroz 1988), como se observa actualmente en los taxones argentinos. Las evidencias paleoclimáticas y paleogeológicas (Vizcaino et al. 2012) y registros fósiles de *Pristidactylus* en territorio argentino, que lo reconocen como un taxón arbóreo (Albino et al. 2017), son concordantes con las hipótesis propuestas por Formas et al. (1979) y Cei (1986) y la condición plesiomorfica arbórea del grupo chileno. También evidencias paleoclimáticas indican que las glaciaciones cuaternarias dieron origen a la fragmentación de las tierras forestales en islas continentales mediante las introgresiones marinas, modificando abruptamente el paisaje, promoviendo la diferenciación de los linajes sudamericanos arborícolas (Hooghiemstra & van der Hammen 1998; Teixeira et al. 2005).

Los *Pristidactylus* chilenos presentan una fuerte asociación a los bosques de *Nothofagus* tanto en la cordillera de los Andes como en los parches relictos de la cordillera de la Costa. *Pristidactylus torquatus* presenta una mayor asociación a estos hábitats, mientras que la menor asociación a los bosques corresponde a *P. volcanensis* (Lamborot & Díaz 1987). La asociación a los bosques como un

carácter plesiomórfico concuerda con la divergencia temprana observada en *P. torquatus* dentro del clado chileno. A partir del retroceso y la fragmentación de los bosques, las demás especies de *Pristidactylus* fueron quedando aisladas en los actuales bosques relictos de *Nothofagus* (e.g. Altos de Cantillana, Cerro el Roble, Chicauma) y debido al aislamiento comenzaron a divergir. Sin embargo, *P. volcanensis* se encuentra en una formación abierta rocosa, lejos de los bosques de *Nothofagus*. Lamborot & Díaz (1987) proponen que *P. volcanensis* quedó aislado en un refugio boscoso de la zona central y posteriormente colonizó las áreas en las que se encuentra actualmente (El volcán, R.N. Rio Clarillo). Este podría corresponder a un ejemplo de especiación ecogeográfica (Vanzolini & Williams 1981), lo cual es concordante con la evidencia paleogeológica, ya que hace aproximadamente 43 – 10 Ma Chile central estaba dominado por vegetación de *Nothofagus* y coníferas. Los relictos de bosque que conocemos actualmente en esta zona son remanentes de la última glaciación (Villagrán et al. 1988; Villagrán 2001; Solari 2007), los cuales sirven de refugio a poblaciones aisladas de *Pristidactylus* y a otros taxa de origen austral.

CONCLUSIÓN

En este trabajo se obtuvo la hipótesis filogenética con datos moleculares de la subfamilia Leiosaurinae más completa y robusta a la fecha. Uno de los resultados más relevantes es que *Pristidactylus* es un género polifilético. Esta propuesta se diferencia de las hipótesis filogenéticas con caracteres morfológicos, las cuales difieren en su topología dependiendo de que caracteres son utilizados, ya que actualmente se reconoce que algunos de estos caracteres no son adecuados por su heterogeneidad.

Con respecto a las hipótesis, se acepta la primera, según la cual el grupo de *Pristidactylus* de Chile conforma un grupo natural con una historia evolutiva independiente del resto de sus congéneres argentinos. Además, este grupo comparte con los *Leiosaurus* un ancestro común, por lo que también se acepta la segunda hipótesis, de que el clado chileno constituye el grupo hermano del género *Leiosaurus*.

La posición filogenética de los *Pristidactylus* chilenos nos indica que este clado ya no debería seguir considerándose *Pristidactylus* (ya que la especie tipo se distribuye en Argentina). Sin embargo, esto implica que deben reevaluarse los caracteres diagnósticos tanto de los *Pristidactylus* argentinos como del grupo chileno, para determinar el estatus taxonómico de ambos clados con base en caracteres morfológicos. También queda pendiente la inclusión del clado chileno al género *Leiosaurus*, ya que se necesitan más estudios que incorporen otras líneas de evidencia para determinar si los *Pristidactylus* chilenos son *Leiosaurus* o pertenecen a un linaje evolutivo independiente que debe ser elevado a nivel de género.

La estrecha relación entre el clado chileno de *Pristidactylus* y el género *Leiosaurus*, que se distribuye en Argentina, sigue siendo compatible con la idea de que el levantamiento de los Andes promovió la divergencia entre estos linajes y el posterior aislamiento de los *Pristidactylus* de Chile. El levantamiento de los Andes también produjo cambios climáticos que, en conjunto con las glaciaciones, modificaron la distribución de los bosques de *Nothofagus*, hábitat actual de los *Pristidactylus*. La consecuente fragmentación de estos bosques derivó, a la larga, en una especiación ecogeográfica que originó a los linajes que se encuentran presentes en los relictos de *Nothofagus* de Chile central.

La obtención por primera vez de secuencias de ADN mitocondriales y sobre todo de secuencias nucleares de los *Pristidactylus* de Chile mediante un protocolo no invasivo, es un avance que abre la posibilidad de nuevas investigaciones y responder preguntas sobre los procesos de diversificación e historia evolutiva de estos linajes, actualmente en categoría de conservación siguiendo el criterio de la RCE (En Peligro: *P. alvaroi*, *P. valeriae* y *P. volcanensis*; Vulnerable: *P. torquatus*), lo cual es de suma relevancia para tomar medidas correctas de conservación de este linaje endémico.

REFERENCIAS

- Abdala, V., Manzano, A., Nieto, L., & Diogo, R. (2009). Comparative myology of Leiosauridae (Squamata) and its bearing on their phylogenetic relationships. *Belgian Journal of Zoology*, 139, 109-09.
- Albino, A., Brizuela, S., & Vizcaíno, S. (2017). The southernmost fossil record of Squamates. *Amphibia-Reptilia*, 38(1), 15-30.
- Avise, J. C. (1986). Mitochondrial DNA and the evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*, 312(1154), 325-342.
- Barrio, A. (1969). Sobre la real ubicación generica de *Leiosaurus fasciatus* d'Orbigny. *Physis. Buenos Aires*, 28, 268-270.
- Beltrán-Torres, G. C., & Hernández-Fernández, J. (2020). Nuevos marcadores mitocondriales mejoran la filogenia de la tortuga carey *Eretmochelys imbricata* (Testudines: Cheloniidae).
- Bertozzi, T., Sanders, K. L., Siström, M. J., & Gardner, M. G. (2012). Anonymous nuclear loci in non-model organisms: making the most of high-throughput genome surveys. *Bioinformatics*, 28(14), 1807-1810.
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A. & Matschiner, M. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, 15(4), e1006650.
- Boulenger, G. A. (1889). On some specimens of Lizards in the Zoological Museum of Halle (Saale). In *Proceedings of the Zoological Society of London* (Vol. 57, No. 2, pp. 143-145). Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd.

- Boulenger, G. A. (1885). Catalogue of the Lizards in the British Museum (Natural History): Iguanidæ, Xenosauridæ, Zonuridæ, Anguidæ, Anellidæ Helodermatidæ, Varanidæ, Xantusiidæ, Teiidæ, Amphisbœnidæ. 1885 (Vol. 2). order of the Trustees.
- Brito, P. H., & Edwards, S. V. (2009). Multilocus phylogeography and phylogenetics using sequence-based markers. *Genetica*, 135(3), 439-455.
- Burns, K., J. Hackett, S., & K. Klein, N. (2003). Phylogenetic relationships of Neotropical honeycreepers and the evolution of feeding morphology. *Journal of Avian Biology*, 34(4), 360-370.
- Cardoso, Y. P. (2014). Filogenia molecular, biogeografía y procesos de diversificación de peces neotropicales, familia Loricariidae (Siluriformes) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de La Plata).
- Caterino, M. S., Cho, S., & Sperling, F. A. (2000). The current state of insect molecular systematics: a thriving Tower of Babel. *Annual review of entomology*, 45(1), 1-54.
- Cei, J. M. (1973). Comentarios sobre algunos géneros de iguánidos: *Diplolaemus*, *Leiosaurus*, *Aperopristis* y *Cupriganus*. *Physis*, 32(85), 269-276
- Cei, J. M. (1986). Reptiles del centro, centro-oeste y sur de la Argentina: Herpetofauna de las zonas áridas y semiáridas.
- Cei, J. M., Scolaro, J. A., & Videla, F. (2001). The present status of Argentinean polychrotid species of the genus *Pristidactylus* and description of its southernmost taxon as a new species. *Journal of Herpetology*, 597-605

- Cei, J. M., Scolaro, J. A., & Videla, F. (2004). An updated biosystematic approach to the leiosaurid genus *Pristidactylus*. *Bolletino Museo Regionale di Scienze Naturali, Torino*, 21, 159-192.
- Mandal, P. K., Ferreira, L. M., Collins, R., Meissner, T. B., Boutwell, C. L., Friesen, M & Musunuru, K. (2014). Efficient ablation of genes in human hematopoietic stem and effector cells using CRISPR/Cas9. *Cell stem cell*, 15(5), 643-652.
- Donoso-Barros, R. (1970). *Catálogo herpetológico chileno*.
- Eliosa, H. & Navarro, M. (2005). *La sistemática en México*. *Elementos* 57: 13-19.
- Etheridge, R., & de Queiroz, K. (1988). A phylogeny of Iguanidae. *Phylogenetic relationships of the lizard families*, 283-367.
- Etheridge, R., & Williams, E. E. (1985). Notes on *Pristidactylus* (Squamata: Iguanidae). *Museum of Comparative Zoology, Harvard University*
- Etheridge, R., Williams, E. E., & Williams, E. E. (1991). A review of the South American lizard genera *Urostrophus* and *Anisolepis* (Squamata: Iguania: Polychridae): *Bulletin of the Museum of Comparative Zoology*.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Femenias, M. M., Avila, L. J., Sites Jr, J. W., & Morando, M. (2020). The enigmatic Leiosaurae clade: Phylogeography, species delimitation, phylogeny and historical biogeography of its southernmost species. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 144, 106725.
- Fitzinger, L. (1843). *Systema Reptilium, fasciculus primus, Amblyglossae*. Braumüller et Seidel, Wien: 106 pp.

- Folguera A, Orts D, Spagnuolo M et al. (2011) A review of LateCretaceous to Quaternary palaeogeography of the southernAndes. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 250–268
- Formas JR. (1979). La herpetofauna de los bosques temperados de Sudamérica. En: Duellman WE (ed) *The South American herpetofauna*: 341-379. Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, Kansas, USA, Monograph 7
- Frost, D. R., Etheridge, R., Janies, D., & Titus, T. A. (2001). Total evidence, sequence alignment, evolution of polychrotid lizards, and a reclassification of the Iguania (Squamata: Iguania). *American Museum Novitates*, 2001(3343), 1-39.
- Gallardo, J. M. (1964). Los géneros *Urostrophus* D. et B. y *Cupriganus* gen. nov. Sauria, Iguanidae) y sus especies. *Neotropica*, 10(33), 125-136.
- Gallardo, J. M. (1961). Estudio zoogeográfico del género *Leiosaurus* (Reptilia, Sauria). *Physis*, 22(63), 113-118.
- Garzzone, C. N., Hoke, G. D., Libarkin, J. C., Withers, S., MacFadden, B., Eiler, J. & Mulch, A. (2008). Rise of the Andes. *science*, 320(5881), 1304-1307.
- Harvey P. & Pagel M. (1991). *The Comparative Method in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Oxford, Oxford Series in Ecology and Evolution. 239 pp.
- Heath, L., Van Der Walt, E., Varsani, A., & Martin, D. P. (2006). Recombination patterns in aphthoviruses mirror those found in other picornaviruses. *Journal of Virology*, 80(23), 11827-11832.

- Hillis D. (1987). Molecular versus Morphological approaches to systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 23-42.
- Hooghiemstra H & van der Hammen T (1998) Neogene and Quaternary development of the neotropical rain forest: the forest refugia hypothesis, and a literature overview. *Earth-Science Reviews*, 44, 147–183.
- Hoorn C, Wesselingh FP, ter Steege H et al. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science*, 330, 927–931.
- Lambrot, M., & Diaz, N. F. (1987). A new species of *Pristidactylus* (Sauria: Iguanidae) from central Chile and comments on the speciation in the genus. *Journal of Herpetology*, 29-37.
- Lemmon, E. M., & Lemmon, A. R. (2013). High-throughput genomic data in systematics and phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 44, 99-121.
- Lipscomb D. (1998). *Basics of Cladistics Analysis*. George Washington University, Washington D.C, USA. 75 pp.
- Martin, D., & Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16(6), 562-563.
- Montero, R., & Autino, A. G. (2009). *Sistemática y filogenia de los Vertebrados. Con énfasis en la fauna argentina*.
- Morando, M., Avila, L. J., & Sites Jr, J. W. (2003). Sampling strategies for delimiting species: genes, individuals, and populations in the *Liolaemus elongatus-kriegi* complex (Squamata: Liolaemidae) in Andean–Patagonian South America. *Systematic Biology*, 52(2), 159-185.
- Morando, M., Avila, L. J., Baker, J., & Sites Jr, J. W. (2004). Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata:

- Liolaemidae): evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution*, 58(4), 842-859.
- Morando, M., Olave, M., Avila, L. J., Baker, E., & Sites Jr, J. W. (2015). Molecular phylogeny of the lizard clade Leiosaurae endemic to Southern South America. *Herpetologica*, 71(4), 322-331.
- Morrone JJ (2006) Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean islands based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology*, 51, 467–494
- Ogilvie, H. A., Bouckaert, R. R., & Drummond, A. J. (2017). StarBEAST2 brings faster species tree inference and accurate estimates of substitution rates. *Molecular biology and evolution*, 34(8), 2101-2114.
- Palumbi, S. R. (1996). Nucleic acids II: the polymerase chain reaction. *Molecular systematics*, 205-247.
- Paull, D., Williams, E. E., & Hall, W. P. (1976). Lizard karyotypes from the Galapagos Islands: chromosomes in phylogeny and evolution. *Museum of Comparative Zoology*.
- Philippi R. (1861) En: Philippi RA & Landeck L. (1861). Neue Wirbelthiere von Chile. *Archiv für Naturgeschichte* 27: 289–301
- Pino, M., Martel-Cea, A., Vega, R. M., Fritte, D., & Soto-Bollmann, K. (2016). Geología y geomorfología del sitio Pilauco. El Sitio Pilauco, Osorno, Patagonia Noroccidental de Chile. Valdivia, Chile: Universidad Austral de Chile—Imprenta América, 12-46
- Pyron, R. A., Burbrink, F. T., & Wiens, J. J. (2013). A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes. *BMC evolutionary biology*, 13(1), 93.

- Reeder, T. W., Townsend, T. M., Mulcahy, D. G., Noonan, B. P., Wood Jr, P. L., Sites Jr, J. W., & Wiens, J. J. (2015). Integrated analyses resolve conflicts over squamate reptile phylogeny and reveal unexpected placements for fossil taxa. *PLOS one*, 10(3), e0118199.
- Solari M. (2007) Historia ambiental holocénica de la región sur-austral de Chile (X-XII región). *Revista Austral de Ciencias Sociales* 13: 79-92.
- Teixeira, R. L., Roldi, K., & Vrcibradic, D. (2005). Ecological comparisons between the sympatric lizards *Enyalius bilineatus* and *Enyalius brasiliensis* (Iguanidae, Leiosaurinae) from an Atlantic Rain-Forest area in southeastern Brazil. *Journal of Herpetology*, 39(3), 504-509.
- Thomson, R. C., Wang, I. J., & Johnson, J. R. (2010). Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. *Molecular Ecology*, 19(11), 2184-2195.
- Townsend, T. M., Mulcahy, D. G., Noonan, B. P., Sites Jr, J. W., Kuczynski, C. A., Wiens, J. J., & Reeder, T. W. (2011). Phylogeny of iguanian lizards inferred from 29 nuclear loci, and a comparison of concatenated and species-tree approaches for an ancient, rapid radiation. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 61(2), 363-380.
- Troncoso-Palacios, J., De Gamboa, M. R., & Langstroth, R. (2019). Without a body of evidence and peer review, taxonomic changes in Liolaemidae and Tropicuridae (Squamata) must be rejected. *ZooKeys*, (813), 39.
- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular ecology*, 22(5), 1193-1213

- Vanzolini, P. E., & Williams, E. E. (1981). The vanishing refuge: a mechanism for ecogeographic speciation. *Papéis Avulsos de Zoologia*, 34(23), 251-255.
- Villagran, C. (2001). Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista chilena de historia natural*, 74(4), 793-803.
- Villagrán, C., Le-Quesne, C., Aravena, J. C., Jiménez, H., & Hinojosa, F. (1998). El rol de los cambios de clima del Cuaternario en la distribución actual de la vegetación de Chile central-sur. *Bamberger Geographische Schriften*, 15, 227-242.
- Villaseñor J. & Davila P. (1996). Breve introducción a la Metodología Cladística. Facultad de Ciencias UNAM, México. 48 pp.
- Vizcaíno S., Kay, R. & Bargo M. (2012). Early Miocene paleobiology in Patagonia: high-latitude paleocommunities of the Santa Cruz Formation. Cambridge University Press.
- Wiens, J.J., T.W. Reeder, and A. Nieto Montes de Oca. (1999). Molecular phylogenetics and evolution of sexual dichromatism among populations of the Yarrow's spiny lizard (*Sceloporus jarrovii*). *Evolution* 53:1884–1897.
- Wiens, J. J., Hutter, C. R., Mulcahy, D. G., Noonan, B. P., Townsend, T. M., Sites Jr, J. W., & Reeder, T. W. (2012). Resolving the phylogeny of lizards and snakes (Squamata) with extensive sampling of genes and species. *Biology letters*, 8(6), 1043-1046.
- Wiley E., Siegel-Causey D., Brooks D. & Funk V. (1991). The complete cladistics: A primer of phylogenetic procedures. Special publication

N° 19, Museum of Natural History, University of Kansas, Lawrence, USA. 171 pp.

Xia, X., & Lemey, P. (2009). Assessing substitution saturation with DAMBE. *The phylogenetic handbook: a practical approach to DNA and protein phylogeny*, 2, 615-630.

Xia, X. (2018). DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. *Molecular biology and evolution*, 35(6), 1550-1552.



ANEXOS

Anexo 1. Especímenes incluidos en el análisis de árbol de especie y los correspondientes códigos de acceso GenBank de los cuatro genes utilizados.

Voucher	Especie	Provincia/Region	Localidad	Codigo acceso GenBank			
				Cytb	12s	ANL-D90	ANL-D92
6503	<i>D. bilbronii</i> Lineage A	Chubut	Prov. Rte. 51, 2.8 km S Ricardo Rojas	MN705594	-	MN700786	MN700834
10211	<i>D. bilbronii</i> Lineage A	Chubut	Prov. Rte. 26, 21.1 km NO junction Prov. Rte. 37, 29.1 km NO junction Natl. Rte.26, 3.9 km SO Estancia Rancho Grande	MN705685	MN700697	-	MN700840
3847	<i>D. bilbronii</i> Lineage A	Chubut	Prov. Rte. 26, 52.3 km O junction Prov. Rte. 25, plateau after ascent from Pampa de los Guanacos	MN705552	MN700679	MN700777	MN700823
3899	<i>D. bilbronii</i> Lineage A	Chubut	Prov. Rte. 24, 59.2 km N junction Prov. Rte. 23, front to Laguna Seca	MN705554	MN700681	MN700779	MN700826
3895	<i>D. bilbronii</i> Lineage B	Chubut	Prov. Rte. 27, 78.1 km S El Sombrero and Prov. Rte. 53	KT342882.1	KT342909.1	KT342986.1	KT343003.1
10203	<i>D. bilbronii</i> Lineage B	Chubut	Holdich Station	MN705684	-	MN700791	MN700839
13208	<i>D. bilbronii</i> Lineage B	Santa Cruz	Prov. Rte. 43, 16 Km E Las Heras	KT342881.1	KT342908.1	KT342985.1	KT343002.1
10025	<i>D. darwinii</i> Lineage A	Santa Cruz	Prov. Rte. 77, 66.6 km NO junction Prov. Rte. 25, 9.1 km SE Estancia Vega Grande	KT342883.1	KT342910.1	KT342987.1	KT343004.1
48512	<i>D. darwinii</i> Lineage A	Aysén (Chile)	Lago Gral. Carrera 5km O Chile Chico	KT342884.1	KT342911.1	KT342988.1	KT343005.1
9204	<i>D. darwinii</i> Lineage B	Chubut	Holdich Station	MN705637	MN700696	MN700790	MN700838
11422	<i>D. darwinii</i> Lineage B	Chubut	Holdich Station	MN705703	MN700699	MN700792	MN700841
2798	<i>D. leopardinus</i>	Mendoza	Vallecitos	MN705527	MN700667	MN700764	MN700812
4002	<i>D. leopardinus</i>	Mendoza	Prov. Rte. 180, 90 Km S El Nihuil	MN705557	MN700682	MN700780	MN700827
4200	<i>D. leopardinus</i>	Mendoza	Prov. Rte. 180, 116 Km S El Nihuil	MN705560	MN700683	MN700781	MN700828
12933	<i>D. sexcinctus</i> Lineage 1	Río Negro	Prov. Rte. 80, road to Cerro Bernal, 19.5 km S junction access to Bariloche Airport	MN705732	-	MN700797	MN700847
12134	<i>D. sexcinctus</i> Lineage 2	Neuquén	Laguna Tromen, Área Natural Protegida Tromen, Prov. Rte. 37	MN705719	-	MN700793	MN700842
12135	<i>D. sexcinctus</i> Lineage 2	Neuquén	Laguna Tromen, Área Natural Protegida Tromen, Prov. Rte. 37	MN705720	-	MN700794	MN700843
14190	<i>D. sexcinctus</i> Lineage 2	VIII Región (Chile)	Paso Pichachen, Rute Antuco-Los Barros-Moncol, 10 km E from Barros	KT342885.1	MN700707	KT342989.1	KT343006.1
14210	<i>D. sexcinctus</i> Lineage 2	Neuquén	Primeros Pinos	KT342886.1	KT342913.1	KT342990.1	KT343007.1
6088	<i>D. sexcinctus</i> Lineage 5	Río Negro	Meseta de Somuncurá, between Cerro Corona Grande and Cerro Corona Chico	MN705584	MN700689	MN700785	-
3310	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Somuncurá, 14.5 km NO to Puesto Luis Ovejero	MN705532	-	MN700769	MN700817
3445	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Chubut	Prov. Rte. 67, 30.3 km N Gan Gan (Sitio Aguadas)	MN705540	-	MN700772	MN700820
3838	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Chubut	Prov. Rte. 4, 32.8 km E Gan Gan	MN705551	MN700678	MN700776	-
154	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Los Menucos	MN705508	MN700660	MN700759	MN700805
3487	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Natl. Rte.40, 6.2 km N junction Prov. Rte. 6, near to entry of Estancia Fitalacao	MN705541	MN700675	MN700773	MN700821
3488	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Natl. Rte.40, 9.8 km N junction Prov. Rte. 6	MN705542	MN700676	MN700774	MN700822
3550	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Prov. Rte. 76, 23.5 km S junction Natl. Rte.23, S from Ingeniero Jacobacci	KT342887.1	KT342914.1	KT342991.1	KT343008.1
3666	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Prov. Rte. 6, 5 km NO Ojos de Agua	KT342888.1	KT342915.1	KT342992.1	KT343009.1
12177	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Prov. Rte. 6, 18 km N Colan Conhué	MN705721	MN700700	MN700795	MN700844
12292	<i>D. sexcinctus sensu stricto</i>	Río Negro	Prov. Rte. 6, 37,7 km N Colan Conhué	MN705727	MN700702	MN700796	MN700845
2451	<i>L. bellii</i> Lineage A	Chubut	Isla Escondida Bay	KT342889.1	KT342916.1	-	KT343010.1
13204	<i>L. bellii</i> Lineage A	Río Negro	Prov. Rte. 60, 10 km SW Chipauquil (meseta Somuncurá)	MN705741	MN700704	-	MN700850
14161	<i>L. bellii</i> Lineage A	Neuquén	Natl. Rte.40, 17.6 km N junction Prov. Rte. 13, 18.6 km N Zapala, 1 km N Covunco stream	MN705751	MN700706	-	MN700852
2450	<i>L. bellii</i> Lineage B	Río Negro	5 Km N Godoy	MN705518	MN700663	-	MN700810
5205	<i>L. bellii</i> Lineage B	Neuquén	Natl. Rte.40, 14.5 Km N Chos Malal	MN705570	MN700684	-	MN700830
7816	<i>L. bellii</i> Lineage C	Neuquén	Prov. Rte. 10, 17.1 km S Paso de los Indios	MN705629	MN700693	-	MN700836
4329	<i>Leiosaurus catamarcensis</i>	Catamarca	Ruta Nacional 40, 37 Km W Punta de Balasto	KT342891.1	KT342918.1	-	MN700829
4742	<i>Leiosaurus catamarcensis</i>	La Rioja	Way between Chañarmuyo and Campanas, 3 km N Chañarmuyo, Rio Las Talas	KT342892.1	KT342919.1	-	KT343013.1
1973	<i>Leiosaurus jaguaris</i>	La Rioja	Talampaya National Park, Provinc. Rte. 26, Km 139. 1303 m	KT342894.1	KT342920.1	-	-
12521	<i>Leiosaurus jaguaris</i>	San Juan	Provinc. Rte. 412, junction Provinc. Rte. 425, 26 km N Villa Nueva	KT342893.1	-	-	KT343014.1
4537	<i>Leiosaurus paronae</i>	San Luis	San Luis city	KT342896.1	KT342923.1	-	KT343016.1
12852	<i>Leiosaurus paronae</i>	Mendoza	Provinc. Rte. 153, 38.3 km S Aristides Villanueva, 7 km N Monte Coman, 1 km N junction Ruta Nacional 146	KT342895.1	KT342922.1	-	KT343015.1
407	<i>Pristidaactylus achalensis</i>	Cordoba	Posta de Pampa de Achala, Quebrada del Condorito National Park	KT342897.1	KT342924.1	KT342993.1	KT343017.1
10327	<i>Pristidaactylus araucanus</i>	Neuquén	Provinc. Rte. 37, 24,6 km N junction Ruta Nacional 40, Paraje Los Ranchos	KT342898.1	KT342925.1	KT342994.1	KT343018.1
10328	<i>Pristidaactylus araucanus</i>	Neuquén	Provinc. Rte. 37, 24,6 km N junction Ruta Nacional 40, Paraje Los Ranchos	KT342899.1	KT342926.1	KT342995.1	KT343019.1
7722	<i>Pristidaactylus fasciatus</i>	Neuquén	Provinc. Rte. 37, 16.9 km N entry to Cerro Wayle	-	MN700692	MN700787	MN700835
7978	<i>Pristidaactylus fasciatus</i>	Mendoza	Provinc. Rte. 183, Volcano Payun Smooth	-	MN700694	MN700788	MN700837
4123	<i>Pristidaactylus fasciatus</i>	La Pampa	Provinc. Rte. 10, 9.1 Km E Agua Escondida	KT342900.1	KT342927.1	KT342996.1	KT343020.1
7911	<i>Pristidaactylus fasciatus</i>	Mendoza	La Payunia Provincial Reserve, Pampas Negras, 5 km S Yacimiento cerro Fortunoso	KT342901.1	KT342928.1	-	KT343021.1
3089	<i>Pristidaactylus nigraiolugulus</i>	Río Negro	Provinc. Rte. 5, 40 Km SE Maquinchao	-	MN700669	MN700766	MN700814
3090	<i>Pristidaactylus nigraiolugulus</i>	Río Negro	Natl. Rte. 23, 14 Km W Aguada de Guerra	-	MN700670	MN700767	MN700815
3841	<i>Pristidaactylus nigraiolugulus</i>	Chubut	Telsen. 10 km N Gan Gan	KT342902.1	KT342929.1	KT342998.1	-
3897	<i>Pristidaactylus nigraiolugulus</i>	Chubut	Provinc. Rte. 27, 14.2 km S El Sombrero and Provinc. Rte. 53	-	MN700680	MN700778	MN700825
6045	<i>Pristidaactylus nigraiolugulus</i>	Chubut	Aguada Oveja Muerta, Prov. Rte. 4, 40 km W Gan Gan	KT342903.1	KT342930.1	-	KT343023.1
12179	<i>Pristidaactylus nigraiolugulus</i>	Chubut	Provinc. Rte. 58, 3.2 km N El Escorial	MN705722	MN700701	-	KT343022.1
UNSJ109	<i>Pristidaactylus scapolatus</i>	Mendoza	Prov. Rte. 153, 20 Km W Santa Clara, Las Heras.	KT342905.1	KT342932.1	-	KT343025.1
2736	<i>Pristidaactylus scapolatus</i>	Mendoza	Provinc. Rte. 319, 8 km SW El Portezuelo. 2500 msnm	KT342904.1	KT342931.1	KT342999.1	KT343024.1
48263	<i>Pristidaactylus torquatus</i>	VIII Región del Biobío (Chile)	Cordillera de Nahuelbuta	KT342906.1	KT342933.1	KT343001.1	KT343026.1
LG1153	<i>Urostrophus vauitieri</i>	São Paulo	Sao Roque City	KT342907.1	-	-	KT343028.1
LG487	<i>Urostrophus vauitieri</i>	São Paulo	Jundáí City	MN705799	-	-	KT343027.1