



**Universidad de Concepción
Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas
Programa de Magister en Ciencias con mención en Zoología**

**FILOGEOGRAFÍA DE UNA ESPECIE POCO VÁGIL Y CON BAJA
CONECTIVIDAD DE HÁBITAT: LA HISTORIA DEL CAMARÓN DE VEGA
Parastacus pugnax (DECAPODA: PARASTACIDAE) (POEPPIG, 1835) EN
CUENCAS COSTERAS Y ANDINAS EN EL CENTRO-SUR DE CHILE.**

Tesis presentada a la Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas de la
Universidad de Concepción para optar al grado académico Magíster en Ciencias
con mención en Zoología.

Por: Lorena Alejandra Rivera Vera

Profesor Guía: Dr. Pedro F. Victoriano S.

marzo 2021
Concepción, Chile

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

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis y programa de magister fue financiada por la Agencia Nacional de Investigación y Desarrollo (ANID)/ Beca Magister Nacional/ 2018- 22180523.

Mis agradecimientos al proyecto Fondecyt 1161650 por entregarme los recursos y herramientas necesarios para llevar a cabo el proceso de investigación. En particular quiero reconocer a mi tutor, el Dr. Pedro F. Victoriano Sepúlveda, por guiar ésta tesis, por su apoyo, orientación y consejo en cada etapa durante el transcurso del programa de magister. También quiero agradecer al equipo humano del mismo proyecto (Christian Muñoz- Escobar, Carla Muñoz- Mendoza, Karina Vega-Drake, Humberto Godoy y Melissa Pincheira) por su colaboración en muestreos, en el manejo de laboratorio, análisis de datos y por hacer más ameno el transcurso de estos años.

Agradezco a todos los y las docentes que fueron parte fundamental del proceso de aprendizaje en los cursos del programa de magister. En especial a la Dra. Lucila Moreno (exdirectora del programa Magister en Cs. Mención en Zoología) y al Dr. Enrique Rodríguez (actual director del programa Magister en Cs. Mención en Zoología) por su incondicional apoyo, empatía y paciencia.

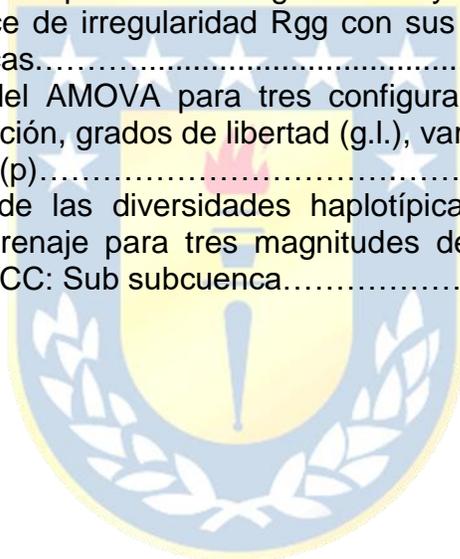
Finalmente, quiero expresar mi gratitud hacia los estudiantes del programa de Magister en Ciencias con mención en Zoología y del Doctorado en Sistemática y Biodiversidad, por su compañerismo en todo momento. De manera especial a mis amigos más cercanos Beatriz, Samuel, Clarita y Felipe, y por supuesto a mi familia: Mónica, Daniel, Camilo, Daniela, Mauricio y Giovanni, por estar siempre presente.

CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS.....	iii
CONTENIDOS.....	iv
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE ILUSTRACIONES.....	vi
RESUMEN.....	vii
ABSTRACT.....	viii
INTRODUCCIÓN.....	1
HIPÓTESIS.....	9
OBJETIVOS.....	11
Objetivo general.....	11
Objetivos específicos.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS.....	12
Escenario geográfico y procedimiento de muestreo.....	12
Extracción de ADN y PCR.....	14
Análisis moleculares.....	15
Modelos de idoneidad de hábitat.....	16
Ruta de mínimo costo (LCP).....	18
RESULTADOS.....	21
Atributos del área geográfica y estabilidad de hábitat.....	21
Variabilidad genética y patrones estructuración.....	23
Genética del paisaje.....	32
DISCUSIÓN.....	38
Diversidad intraespecífica.....	38
Estructuración.....	39
Estabilidad demográfica.....	44
Genética del paisaje.....	46
CONCLUSIONES.....	50
REFERENCIAS.....	53
Anexo 1.....	65
Anexo 2.....	68

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Valores de diversidad genética para las diez cuencas. Se presentan: Sitios (mismos acrónimos que en la Figura 1), Número de sitios (n° sitios), número de individuos (N), n° de sitios segregantes (S), n° de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y su desviación estándar (d.e. Hd), diversidad nucleotídica (π) y su desviación estándar (d.e. π).....	24
Tabla 2. Resultados de expansión demográfica F_s y valores de significancia asociados p (F_s), índice de irregularidad Rgg con sus valores de significancia p (Rgg) para diez cuencas.....	28
Tabla 3. Resultados del AMOVA para tres configuraciones de cuencas. Se indican: fuente de variación, grados de libertad (g.l.), variación (%), estadístico F y valor de significancia (p).....	31
Tabla 4. Correlación de las diversidades haplotípica y nucleotídica con el tamaño del área de drenaje para tres magnitudes de cuenca; CC: Cuenca; SCC: Subcuenca; y SSCC: Sub subcuenca.....	32



ÍNDICE DE ILUSTRACIONES

Figura 1. Mapa del área de estudio. Cada sigla corresponde a un sitio de estudio. Los colores indican las diferentes cuencas. Los triángulos y círculos muestran la condición de andina y costera. (Coordenadas geográficas, nombre de los sitios, número de individuos por sitios se encuentran en el Anexo 1).....	13
Figura 2. Proyecciones de modelos de idoneidad de hábitat para los tiempos Ultimo Máximo Glacial (UMG) y presente. La línea punteada gris representa el límite del borde costero durante el UMG. Las líneas negras representan el límite de las cuencas hidrográficas en estudio (las mismas en la Figura 1). Los tonos cálidos (rojos) indican una alta idoneidad de hábitat, mientras que los tonos fríos (azules) una baja idoneidad.....	23
Figura 3. Red de haplotipos. Cada círculo representa un haplotipo, y su tamaño la frecuencia. El color indica la cuenca de procedencia. Las siglas señalan los sitios de estudios (mismos que en Figura 1). Las distancias entre haplotipos mayores a tres pasos mutacionales son señalados con números.....	27
Figura 4. Frecuencias de distribuciones de desajuste entre pares bajo un modelo de expansión. El color de los histogramas de cada cuenca coincide con el color de la cuenca en el mapa del área de estudio (Figura 1).....	29
Figura 5. Gráfico de correlación entre pares de sitios de estudio. El eje X representa la distancia geográfica entre poblaciones, y el eje Y la distancia genética <i>p-distance</i>	30
Figura 6. Gráfico de los valores FCT (negro) y FSC (gris) para cada número de grupo probado con SAMOVA. Los puntos rojos indican n°grupos=14.....	33
Figura 7. Rutas de mínimo costo entre los grupos definidos por SAMOVA sobre el mapa de distribución de idoneidad de hábitat del tiempo presente. Cada círculo y número señalan un grupo identificado por SAMOVA. Las líneas en azul corresponden a las rutas de mínimo costo (LCP) entre grupos.....	35
Figura 8. Resultado del test de correlación de Spearman entre distancia genética <i>Fst</i> y distancia lineal (km) entre pares de grupos de SAMOVA. En el gráfico se indican el coeficiente de correlación (<i>r</i>) y su valor de significancia (<i>p</i>).....	36
Figura 9. Resultado del test de correlación de Spearman entre distancia genética <i>Fst</i> y la distancia estimada por la ruta de mínimo costo entre pares de grupos de SAMOVA. En el gráfico se indican el coeficiente de correlación (<i>r</i>) y su valor de significancia (<i>p</i>).....	37

RESUMEN

En Chile, el camarón dulceacuícola *Parastacus pugnax* habita en ambientes que a lo largo de su distribución incluyen áreas con atributos geográficos, climáticos e históricos contrastantes. Hasta ahora, el conocimiento de esta especie se ha enfocado hacia aspectos biológicos y ecológicos, pero no ahonda en su diversidad evolutiva y los procesos asociados. Esto último constituye el objetivo principal de esta tesis. Analizamos la diversidad genética de *P. pugnax* utilizando un fragmento COI y sus asociaciones con atributos del paisaje en el rango centro-sur de su distribución. Los niveles de diversidad y estabilidad demográfica resultaron contrastantes asociado a la condición andino – costera de las cuencas. El número de grupos genéticos que maximiza las diferencias entre ellos (FCT) fue de 14. Nuestros resultados indican que existe estructuración entre cuencas costeras y que historias paleoclimáticas complejas guiaron su configuración actual en el paisaje. No existe correlación significativa entre la distancia genética y geográfica lineal, ni con las distancias estimadas por la ruta de mínimo costo. Considerando los principales resultados de esta tesis proponemos que futuros planes de conservación deben considerar el acervo genético de las poblaciones de *P. pugnax* con énfasis en su distribución costera debido a la susceptibilidad asociada a pequeños tamaños efectivos.

ABSTRACT

In Chile, the freshwater crayfish *Parastacus pugnax* inhabits environments that throughout their distribution include areas with contrasting geographical, climatic and historical attributes. Until now, the knowledge of this species has focused on biological and ecological aspects, but does not delve into its evolutionary diversity and associated processes. The latter constitutes the main objective of this thesis. We analyzed the genetic diversity of *P. pugnax* using a COI fragment and its associations with landscape features in the central-southern range of its distribution. The levels of diversity and demographic stability were contrasting associated with the Andean-coastal condition of the basins. The number of genetic groups that maximizes the differences between them (FCT) was 14. Our results indicate that there is structuring between coastal basins and that complex paleoclimatic histories guided its current configuration in the landscape. There is no significant correlation between genetic and linear geographic distance or with the distances estimated by the least cost path. Considering the main results of this thesis, we propose that future conservation plans should consider the genetic pool of *P. pugnax* populations with emphasis on their coastal distribution due to the susceptibility associated with small effective sizes.

INTRODUCCIÓN

La estructuración genética en una especie es influenciada por la interacción entre atributos biológicos, características del paisaje y factores históricos a lo largo del desarrollo de su historia evolutiva (Hughes y Hilley 2003). Aquellas especies antiguas y poco vágiles, que se han mantenido en hábitats disgregados, tienden a presentar poblaciones altamente divergentes, en comparación a especies vágiles y de origen reciente (Scalici y Bravi 2012, Helms et al. 2015). Las características del paisaje, como la configuración geomorfológica, la presencia de barreras geográficas y gradientes climáticos, juegan un rol en procesos de flujo génico y por lo tanto en la estructuración de las poblaciones. En este contexto, los efectos de las oscilaciones paleoclimáticas han sido reconocidos como importantes conductores en los procesos de estructuración filogeográfica (Avice 2000). Para taxa antiguos, los eventos paleoclimáticos que han implicado la reducción de tamaños efectivos, pudo generar procesos de deriva y haber tenido como consecuencia la pérdida de variabilidad y subsecuente diferenciación interpoblacional (Avice 2009, Irwin 2002). De este modo, comprender el contexto paleoclimático y características del paisaje en el que se ha desarrollado la historia evolutiva de una especie

ayuda a esclarecer los procesos que configuraron sus patrones espaciales de variabilidad genética.

En Sudamérica, la inestabilidad climática provocada por las glaciaciones en el Pleistoceno registró ciclos que alteraron los regímenes térmicos y de pluviosidad, incidiendo en las condiciones ambientales y en la geomorfología. Destacan entre ellas la Gran Glaciación Patagónica (~ 1,1 Ma), la glaciación más fría del Pleistoceno (~ 0,7 Ma), y el Último Máximo Glacial (UMG ~ 25000 a 23000 años) (Rabassa et al. 2011; Hulton et al. 2002; McCulloch et al. 2000), que tuvieron gran impacto en la distribución y diversidad de la biota (Hewitt 2004; Provan y Bennet 2008). Desde los 36° a los 42°S los avances y retrocesos de las lenguas glaciales modificaron el paisaje generando cambios en los cursos hídricos y promoviendo la formación de refugios. Para el escenario del centro-sur de Chile tales efectos fueron más intensos en especies con distribuciones que abarcaban rangos andinos, en comparación con aquellas remitidas a relieves costeros (Sérsic et al. 2011), a lo que se agrega un gradiente de incremento latitudinal de los efectos glaciales. En especies dulceacuícolas esto ha sido documentado varias veces (Unmack et al. 2009, Muñoz-Ramírez et al. 2014, Ruzzante et al. 2006).

En particular las especies dulceacuícolas limitadas por la disposición y tipo de sistema que habitan, se ven afectadas por la interacción entre los procesos

paleoclimáticos y por los atributos del relieve, esto último generando aislamientos entre distintos sistemas hidrográficos (Hurwood y Hughes 2001; McGlashan y Hughes 2001). Junto a lo anterior, los cambios eustáticos en el nivel del mar durante el Pleistoceno oscilaron entre descensos de 125 m (Fleming et al. 1998) y elevaciones de 140 m (Rabassa 2008). Esto último probablemente tuvo consecuencias como la pérdida de hábitat, y a su vez afectó la distribución costera de especies dulceacuícolas (Roxo et al. 2014, Tschá et al. 2017). En Chile estos cambios eustáticos produjeron transgresiones que afectaron procesos sedimentarios (Bernhardt et al. 2015) y la formación de terrazas (Jara-Muñoz y Melnick 2014), modificando la extensión y distribución del hábitat de muchas especies. Por lo anterior, especies antiguas que habitan tanto áreas costeras como la depresión intermedia probablemente posean linajes que han sido afectados de distinta manera durante la historia paleoclimática. Un caso con tal situación geográfica son los camarones de la familia Parastacidae. Las especies de esta familia son especialistas en hábitat acuáticos o terrestres saturados de agua, que tienden distribuirse discontinuamente en zonas bajas y planas.

La familia Parastacidae está representada actualmente por 175 especies (15 géneros) con distribución gondwánica. Tres géneros componen el clado sudamericano (*Parastacus*, *Samastacus* y *Virilastacus*) y muestran monofilia recíproca con los restantes géneros de origen Australasiano (Crandall et al.

2000). El uso de registro fósil (Feldmann y Pole 1994, Martin et al. 2008) permitió situar la radiación de esta familia en 134 Ma, y los linajes Sudamericanos se habrían originado hace c. 85 Ma (Toon et al. 2010). En Chile están presentes tres géneros: *Samastacus*, *Virilastacus* y *Parastacus*. Dentro de este último en Chile existen dos especies (*P. nicoleti* y *P. pugnax*) emparentadas con el resto de las especies del género distribuidas en Brasil, norte de Argentina y Uruguay. En particular, *P. pugnax* es la especie hermana de las especies del lado atlántico, mientras que la otra especie chilena de *Parastacus* (*P. nicoleti*) corresponde a un clado de divergencia más basal (Crandall et al. 2000). Según lo anterior, se podría inferir que sus ancestros existieron previos a la formación de la geomorfología actual, incluyendo Los Andes. Acorde con la notable antigüedad de este género, los procesos como orogénesis y modificación de los cursos fluviales debieron influir en la divergencia de sus linajes.

Los estudios acerca de Parastacidae nativos de Sudamérica se han enfocado en su historia natural y en la descripción de nuevas especies (Palaoro et al. 2015, Rudolph y Almeida 2010, Ribeiro et al. 2017), sin que hayan sido estudiados en el marco de la variación geográfica (Silva-Castiglioni et al. 2011, Dalosto y Santos 2011, Pinheiro y Oliveira 2016, Salgado y Tacon 2015, Costa et al. 2016, Yáñez et al. 2018, Dalosto et al. 2015, Vega et al. 2017). Algunas especies, como *Parastacus brasiliensis*, *P. pugnax* y *P. nicoleti*, son

catalogadas como excavadores primarios, y poseen requerimientos en los niveles de saturación de agua (Rudolph 2013). Además, los representantes de esta familia poseen desarrollo directo, lo que sumado a los atributos de su hábitat (baja conectividad), sugieren una baja vagilidad. Para taxa dulceacuícolas antiguos estos atributos podrían contribuir a generar altos niveles de estructuración (Abell et al. 2008). Un estudio reciente (Miranda et al. 2018) acerca de la diversidad de *P. brasiliensis* evidencia señales de aislamiento y acentuada divergencia entre linajes. Similares casos de diversidad genética probablemente se encuentren en otras especies de camarones sudamericanos del mismo género. En este sentido, varios estudios concuerdan en que la estructuración genética de los camarones dulceacuícolas es consistente con los límites de sus hábitats (Dawkins et al. 2010, Miller et al. 2014). Acorde con lo anterior, algunos taxa dulceacuícolas tienden a contener diversidad críptica, es decir, la diferenciación genética no se acompaña de una evidente diferenciación morfológica (Cook et al. 2008, Wood et al 2018, Xu et al. 2009), y los camarones dulceacuícolas parecen mostrar este tipo de diversidad (Buhay et al. 2007, Mathews et al. 2008, Larson et al. 2012, Dawkins et al. 2017).

De las siete especies pertenecientes a la familia Parastacidae en Chile, la especie endémica *Parastacus pugnax* (Poeppig 1835) posee el mayor rango de distribución, que se extiende de manera disgregada entre la cuenca del río

Aconcagua (32°50'S) y la cuenca del río Imperial (38°4'S), tanto en la costa como en los valles. Su hábitat consiste en áreas depositacionales con alta saturación de agua llamadas “vegas”, donde construye sistemas de galerías subterráneas (Rudolph 2013). La edad del taxón *P. pugnax* ha sido estimada en aproximadamente 30 Ma, basado en COI (Victoriano & D'Elía en revisión). Considerando lo anterior, *P. pugnax* representa un modelo particular para estudios filogeográficos, el cual podría evidenciar patrones espaciales en rangos geográficos reducidos a lo largo de su distribución. Además de su singularidad ecológica y evolutiva, posee alto valor cultural y es motivo de las llamadas “fiesta del camarón” en las que es sometido a una fuerte presión extractiva (Silva y Spoerer 2006). Lo anterior justifica aún más indagar acerca de los patrones espaciales de diversidad y la historia que los ha generado, con el fin de sustentar planes de conservación considerando el acervo de sus poblaciones. Frente a un escenario en el cual el hábitat de la especie se encuentra evidentemente muy estructurado, se torna relevante conocer cuáles han sido las rutas más probables de conectividad entre poblaciones. En tal caso, algunas herramientas de análisis espacial, como las rutas de mínimo costo (LCP, *Least-cost path*), pueden aportar información útil para estudiar la influencia del paisaje.

El rango de hábitat de *P. pugnax* incluye áreas de drenaje que difieren en atributos como tamaño, historia paleoclimática y conectividad. Las cuencas

costeras de pequeño tamaño deberían albergar menos poblaciones por cuenca en comparación a aquellas de mayor tamaño ubicadas en los valles de la depresión intermedia y que se originan en Los Andes. Como consecuencia, aquellas poblaciones con tamaños efectivos pequeños podrían haber sido más propensas al efecto de la deriva, mientras que grandes tamaños podrían contribuir a mantener la variabilidad genética. De acuerdo a la distribución espacial de los efectos glaciales en Chile, éstos habrían sido diferentes en rangos costeros y andinos. Estos últimos debido a su extensa área podrían evidenciar más de una historia paleoclimática dentro de una misma cuenca. Por una parte, las poblaciones en los valles de la depresión intermedia, debido a periodos de conexión entre drenajes ocasionado por deshielos y la suavidad del relieve, podrían evidenciar flujo histórico inter e intracuenca. A su vez, poblaciones ubicadas al interior de cuencas andinas en zonas afectadas por la inestabilidad paleoclimática, permafrost y la extensión de glaciares, posiblemente muestren señales de reducción poblacional histórica. Por otra parte, las cuencas costeras que no fueron afectadas directamente por cambios asociados a la temperatura y deshielos (mayor estabilidad de hábitat), debieron haber sido afectadas principalmente por las variaciones en el nivel del mar, por lo que, asociado a su menor tamaño (menores tamaños poblacionales), podrían mostrar menor diversidad intracuenca y mayor diferenciación intercuenca, en comparación con cuencas Andinas.

Debido a las diferencias de condiciones dentro del rango de distribución de *P. pugnax*, sus atributos biológicos y las posibles consecuencias de lo señalado anteriormente, surge la pregunta: ¿Cuál es la estructura genética de las poblaciones de *P. pugnax* y qué asociación podría tener con atributos físicos de las cuencas hidrográficas? El objetivo principal de esta tesis es responderla utilizando herramientas moleculares y modelos de distribución espacial, en el marco de la genética del paisaje y la filogeografía. Para lograr esto consideramos la diversidad presente en un gen mitocondrial, generando información que permita inferir acerca de procesos neutrales que pudieron influir en los patrones de estructuración histórica de esta especie.

HIPÓTESIS

A lo largo de la distribución de *P. pugnax* existen cuencas de diversa magnitud y que sufrieron distintos procesos a lo largo de su historia paleoclimática. La discontinuidad del ambiente de vegas, que habita *P. pugnax*, se ve marcada tanto a gran escala por el efecto de la Cordillera de la Costa y por las divisorias de agua intercuenas, como a menor escala por el aislamiento de vegas dentro de áreas de drenaje. Lo anterior en conjunto con los rasgos biológicos de la especie (baja vagilidad, conducta excavadora, requerimientos de hábitat y antigüedad), habrían modelado su estructura y diversidad genética de tal manera que:

Hipótesis 1: *P. pugnax* posee alta diversidad genética beta, acorde con los atributos geográficos de las cuencas hidrográficas (conectividad, atributos físicos y posición relativa: costeras o andinas).

Predicción 1: Al realizar análisis de estructuración (ej. AMOVA) es esperable encontrar resultados significativos de estructuración donde las mayores varianzas genéticas son explicadas al comparar entre cuencas.

Predicción 2: Al aplicar un análisis de estimación de grupos poblacionales (SAMOVA) es esperable encontrar un $k > 1$ donde las mayores subdivisiones se asocian a cuencas de origen costero.

Hipótesis 2: En cuanto a la diversidad intra cuenca, es hipotetizable que el tamaño de las cuencas y la idoneidad histórica al interior de éstas se asocien con los niveles de variabilidad genética.

Predicción 1: De acuerdo a la hipótesis anterior es esperable obtener correlaciones significativas positivas entre los tamaños de las cuencas y diversidad genética.

Predicción 2: Áreas de mayor estabilidad como cuencas andinas deberían mostrar mayor frecuencia de indicadores de equilibrio, en cambio en áreas costeras debieran existir más casos de desequilibrio demográfico.

OBJETIVOS

Objetivo general

Estimar los patrones de estructuración filogeográfica de *P. pugnax* y los factores históricos que pudieron modelar tal diversidad.

Objetivos específicos

1. Investigar la estructura filogeográfica de *P. pugnax* y relacionarla con los atributos físicos de las cuencas en que se distribuyen dentro del área de estudio.
2. Comparar los atributos del escenario geográfico de la distribución de *P. pugnax* dentro del área de estudio y evaluar si muestran relación con la diversidad genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Escenario geográfico y procedimiento de muestreo

El área de estudio abarca parte de la distribución de *Parastacus pugnax* en la zona centro sur de su distribución, concretamente entre los 36°S y 38°S. El diseño de muestreo fue realizado sobre la división de áreas de cuencas hidrográficas proporcionada por la DGA (www.dga.mop.gob.cl). Para capturar escenarios contrastantes en cuanto a historia paleoclimática y grado de continentalidad, se seleccionaron siete cuencas costeras (ubicadas exclusivamente en la Cordillera de la Costa), dos de origen Andino (que desembocan en el mar pero con origen en la Cordillera de los Andes) y la Isla Santa María (que en episodios pasados constituyó parte de una cuenca costera) (Tabla 1, Figura 1). En total se muestrearon 55 sitios. Los muestreos fueron realizados durante el invierno de los años 2016, 2017 y 2018. La época de muestreo fue escogida para facilitar la captura de individuos debido al anegamiento de áreas depositacionales y a la actividad más superficial. Para esto fueron utilizadas bombas de vacío de fabricación artesanal que evitan destruir las galerías de los camarones al extraerlos. Las localidades muestreadas fueron georreferenciadas y los individuos fueron preservados

individualmente en alcohol potable 95° para la posterior extracción de tejido. Para todos los trabajos de obtención de muestras en terreno, se contó con los respectivos permisos emitidos por los servicios públicos pertinentes (SubPesca).

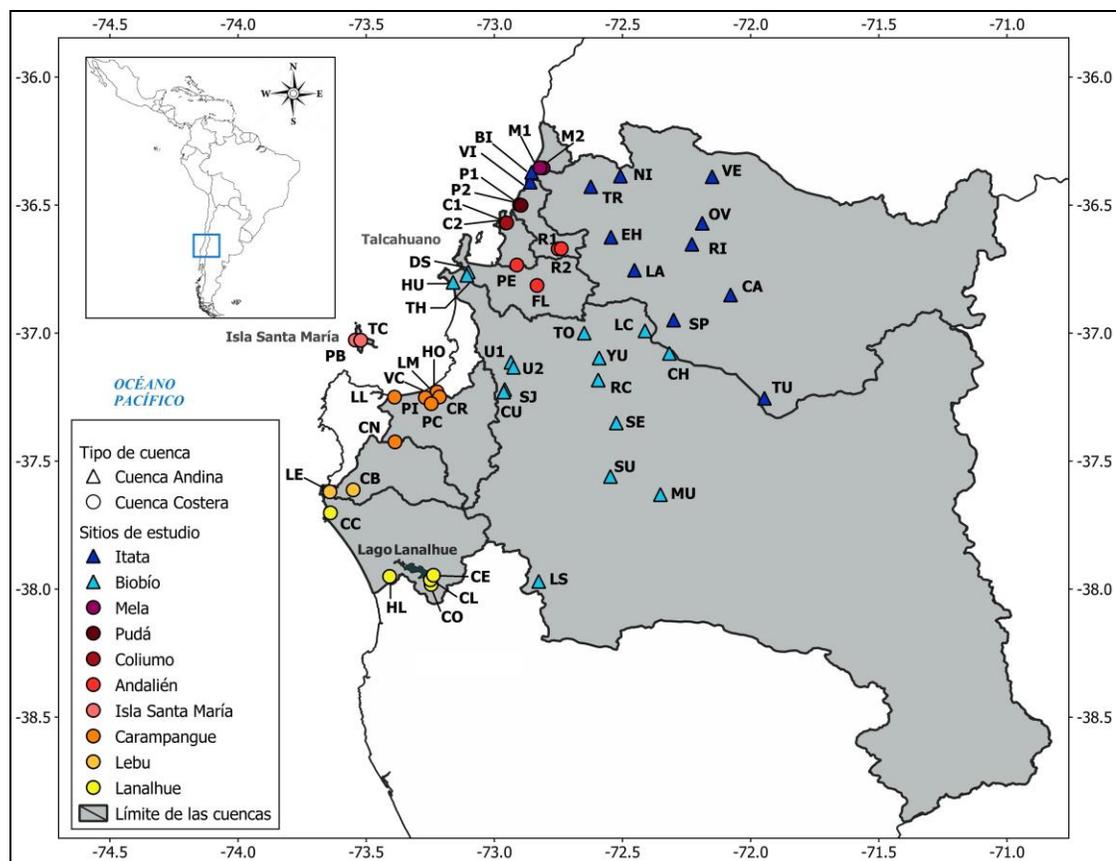


Figura 1. Mapa del área de estudio. Cada sigla corresponde a un sitio de estudio. Los colores indican las diferentes cuencas. Los triángulos y círculos muestran la condición de andina y costera. (Coordenadas geográficas, nombre de los sitios, número de individuos por sitios se encuentran en el Anexo 1).

Extracción de ADN y PCR

Se seleccionaron 475 individuos distribuidos en: dos cuencas hidrográficas de origen en Los Andes (la cuenca del río Biobío y la cuenca del río Itata) y, dentro del mismo rango de latitudes, en siete cuencas de origen costero: Mela, Pudá, Coliumo, Andalién, Carampangue, Lebu y Lanalhue (Fig. 1), además se consideró la Isla Santa María.

Se extrajo ADN desde el tejido muscular de las quelas utilizando el kit Wizard SV Genomic DNA Purification (Promega). Un fragmento de la región COI fue amplificado por PCR utilizando partidores LCO 1490 (5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO 2198 (5'-TAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'). Las concentraciones de los componentes de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) por cada reacción de 25 μ l fueron: 5 μ M de DNA, 1 μ L de cada partidador con concentración inicial de 10 μ M y 12,5 μ L DreamTaqPCR Master Mix (2x) (cod: K1072, Thermofisher). Las amplificaciones se realizaron según indica Victoriano et al. (2008). Los productos obtenidos por PCR fueron enviados a MacroGen Inc. para su purificación y secuenciación. Las secuencias de ADN fueron editadas y alineadas utilizando el programa CodonCodeAligner v.3.5 (CodonCode Corporation, Dedham, MA, USA). Posteriormente, fueron traducidas a aminoácidos con el fin de verificar la ausencia de codones de término.

Análisis moleculares

Para describir la diversidad genética de *P. pugnax* estimamos la diversidad haplotípica (H_d), diversidad nucleotídica (π) y sitios segregantes (S) para cada sitio y cuenca. Se obtuvo los valores de área de unidades hidrográficas (km^2) para las categorías “cuenca”, “subcuenca” y “sub-subcuenca” (DGA, www.dga.mop.gob.cl), y se correlacionaron con la diversidad genética (H_d y π). Para estimar la estabilidad demográfica se aplicó el test de neutralidad F_s de Fu (Fu 1997) para cada cuenca. Los análisis de las distribuciones de desajuste de las comparaciones pareadas (*mismatch*) y las estimaciones del índice de desigualdad (R_{gg}) junto a sus respectivos valores de probabilidad (valor de significancia $p < 0,05$) fueron obtenidos utilizando el algoritmo coalescente con 1000 pseudo réplicas en el programa DnaSP v.5 (Librado y Rozas 2009).

Para recuperar las relaciones genealógicas se identificaron los haplotipos y sus respectivas frecuencias en el programa TCS (Clement et al. 2000) generando una red por medio del algoritmo Median-Joining (Bandelt et al. 1999). La red fue editada con el programa PopArt (Leigh y Bryant 2015). Para evaluar si existe aislamiento por distancia entre pares de localidades realizamos un test de Mantel entre la distancia geográfica lineal y distancia genética (*p-distance*).

Para evaluar la estructuración se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA) en el programa Arlequín 3.11 (Excoffier y Schneider 2005) para tres agrupaciones definidas *a priori*: 1) todas las cuencas, 2) sólo cuencas de origen andino, y 3) sólo cuencas de origen costero. Para evaluar la estructuración geográfica e identificar las unidades poblacionales y su distribución, fue utilizado el análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA, Dupanloup et al. 2002). De acuerdo a un análisis preliminar, con más de 31 grupos la diferenciación no es plausible y el valor del estimador de varianza entre grupos FCT no alcanza un *pik*. Se probaron con grupos (K) desde K=2 hasta K=31 para 55 localidades. Para cada K se llevaron a cabo 100 procesos de anillo con condiciones de 10000 permutaciones. Se obtuvieron las matrices de distancia genética (FST) y geográfica (km) de los grupos inferidos con SAMOVA utilizando los programas Arlequín 3.11 (Excoffier y Schneider 2005) y Past v.2.17c (Hammer et al. 2001), respectivamente. Con el fin de evaluar la probable existencia de asociación entre distancia espacial y genética, fue estimado el grado de correlación de ambas hemi-matrices mediante un test de Mantel (Mantel 1967) utilizando el paquete “vegan” v.2.5-5 (Oksanen et al. 2019) implementado en R v3.5.3 (R Development Core Team, 2019).

Modelos de idoneidad de hábitat

Con el fin de estimar las probabilidades de ocurrencia de la especie a lo largo del espacio geográfico, tanto para el presente, como para el pasado (y de esta

manera inferir niveles de estabilidad ambiental), fueron generados modelos de idoneidad de hábitat presente y para el último Máximo Glacial (UMG). Para esto fueron utilizadas las 19 variables bioclimáticas (para ambos tiempos) desde la base de datos WorldClim (Hijmans et al. 2005, <https://www.worldclim.org>) con resolución de 30 s (~1 km). Debido a que la correlación entre variables puede conducir a un sobreajuste de los modelos, seleccionamos un subconjunto de las variables bioclimáticas. Para realizar esto último, las capas de las variables fueron superpuestas utilizando el programa Qgis 2.18 (Quantum GIS Development Team 2016) y se extrajeron los conjuntos de variables para cada registro de presencia. Con esos datos se realizó un análisis de componentes principales (PCA) y se estimó el coeficiente de correlación de Pearson evidenciando aquellas menos correlacionadas ($r < 0.5$) (Dormann et al. 2013), con las que finalmente se construyeron los modelos de idoneidad. Estos análisis fueron realizados utilizando el paquete de R “vegan” (Oksanen et al. 2019).

Las variables bioclimáticas utilizadas correspondieron a Bio4 (estacionalidad de temperatura), Bio5 (temperatura máxima del mes más cálido), Bio6 (temperatura mínima del mes más frío), Bio13 (precipitación del mes más húmedo), Bio14 (precipitación del mes más seco) y Bio15 (estacionalidad de precipitación) para construir y proyectar los modelos. El rendimiento del modelo construido se evaluó utilizando el AUC (área bajo la curva ROC). Un total de 89

registros de presencia a través de la distribución total de la especie fueron obtenidos por el proyecto FONDECYT 1161650.

Rutas de mínimo costo (LCP).

Para construir el modelo de idoneidad de hábitat presente a partir del cual fueron inferidas las rutas de mínimo costo, utilizamos 19 variables bioclimáticas de la base de datos WorldClim (Hijmans et al. 2005, <https://www.worldclim.org>). Debido al hábito excavador de *P. pugnax*, incorporamos en el modelo 16 capas de variables edáficas (ocho variables físicas más pH a 1 y 0.3 m de profundidad cada una) obtenidas desde el servidor SoilGrid (Hengl et al. 2014, <http://www.soilgrids.org>) y la altitud obtenida desde el servidor <http://www.earthenv.org/topography> con la misma resolución (~1 km). La selección de las variables utilizadas para reconstruir el modelo siguió la metodología descrita anteriormente. Se utilizó la librería “biomod2” versión 3.1-25 (Thuiller et al. 2012) implementada en R (R Development Core Team, 2009) para generar modelos de distribución de especies (SDM). Fueron evaluadas siete técnicas de modelado: 'MAXENT.Phillips', 'GLM', 'RF', 'GAM', 'GBM', 'MARS' y 'FDA'. Los datos de presencia fueron divididos en un conjunto que contenía el 75% de los puntos de datos utilizados para calibrar los modelos (datos de entrenamiento) y un conjunto con el 25% de los puntos de datos para evaluar el modelo (datos de prueba). Para cada una de las técnicas se realizaron diez réplicas y los datos de presencia se seleccionaron al azar por

validación cruzada. Las técnicas de modelado implementadas en biomod2 necesitan datos de presencia y ausencia de distribución. Debido a que nuestros conjuntos de datos contienen sólo registros de presencia, se seleccionaron aleatoriamente 1000 pseudo-ausencias utilizando diez réplicas (Barbet-Massin et al. 2012). El poder predictivo se evaluó con el área bajo la curva característica operativa relativa (AUC) y el estadístico de habilidad real (TSS). El modelo ensamblado se obtuvo utilizando el enfoque de predicción por conjuntos implementado en biomod2 que utiliza un método de consenso promedio ponderado para reducir la incertidumbre basada en el modelo y excluye los resultados de las técnicas con bajo poder de predicción (Marmion et al. 2009; Thuiller et al. 2009). Los puntajes TSS superiores a 0.7 se usaron para construir el modelo ensamblado final. Este último fue empleado para calcular las rutas de mínimo costo (LCP; Wang et al. 2008) utilizando Qgis y para generar una matriz de distancia entre pares para los grupos identificados previamente mediante SAMOVA.

Se calcularon los centroides entre las localidades de cada grupo identificado con SAMOVA con el fin de usarlos para estimar la distancia geográfica y LCP. Para el análisis de correlación entre las rutas de mínimo costo y distancia genética, se generó la matriz de distancia genética entre pares de grupos estimados usando SAMOVA y evaluó la correlación con la matriz LCP. Las

correlaciones fueron realizadas en R utilizando la librería “vegan” v2.5-5 (Oksanen et al., 2019).

RESULTADOS

Atributos del área geográfica y estabilidad de la idoneidad de hábitat.

En el área de estudio, el hábitat de *P. pugnax* se distribuye de manera discontinua por la poca conexión entre áreas de drenaje provocada por la heterogeneidad del paisaje. Como era esperable, las cuencas andinas, que abarcan los valles de la depresión intermedia, resultaron de mayor tamaño que las cuencas costeras. Por ejemplo, la cuenca del Itata (14.144 km²) que es la más pequeña de las andinas fue por lo menos seis veces el tamaño de la cuenca Lanalhue (2.143 km²), que es la más grande entre las cuencas costeras.

Los modelos de idoneidad de hábitat para el presente y el UMG, presentaron una estimación del rendimiento aceptable AUC=0.983 (d.e.=0.019). Nuestro modelo para el tiempo presente sugiere que entre los 36°S y 38°S la distribución del hábitat de *P. pugnax* presenta altos valores de idoneidad en zonas con bajo relieve y altitud, tanto en las cuencas andinas de los valles de la depresión intermedia como en las cuencas costeras (Figura 2B, Figura 7). En

especial se encontraron altos valores de idoneidad en áreas circundantes al curso de los ríos Itata y Biobío, atravesando la Cordillera de la Costa. Entre los 37°S y 38° S las áreas que abarcan las cuencas costeras Carampangue, Lebu y Lanalhue presentaron los valores más grandes de idoneidad. A partir de los 38° y hacia el Sur los valores de idoneidad decrecen. Contrastando escenarios del presente y la proyección al UMG, ambas concordaron en un alto valor de hábitat idóneo sobre las planicies litorales. De manera opuesta, en el modelo del UMG las cuencas de origen Andino entre los 36°S y 37,5°S mostraron valores de idoneidad que van desde bajos a moderados, mientras que en el presente éstas áreas presentan valores de moderados a altos. En ambos tiempos, la Cordillera de la Costa presenta valores pequeños de idoneidad de hábitat.

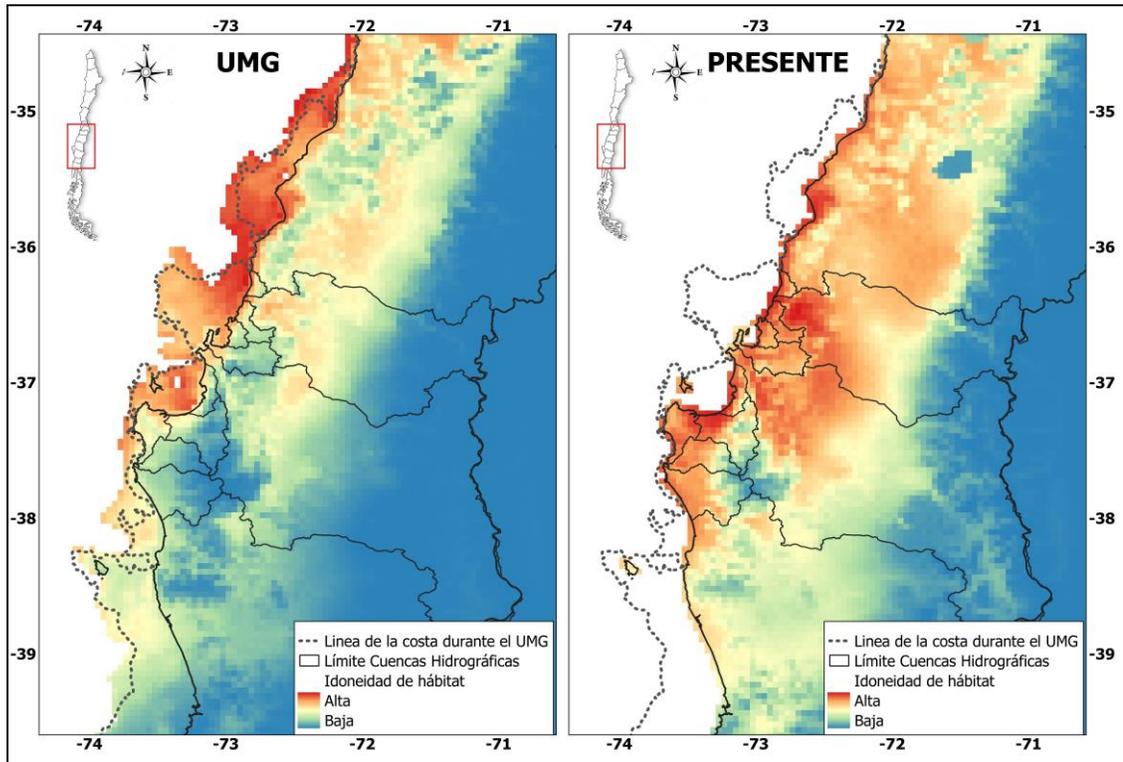


Figura 2. Proyecciones de modelos de idoneidad de hábitat para los tiempos Ultimo Máximo Glacial (UMG) y presente. La línea punteada gris representa el límite del borde costero durante el UMG. Las líneas negras representan el límite de las cuencas hidrográficas en estudio (las mismas en la Figura 1). Los tonos cálidos (rojos) indican una alta idoneidad de hábitat, mientras que los tonos fríos (azules) una baja idoneidad.

Variabilidad genética y patrones de estructuración.

Se obtuvo un total de 475 secuencias de 678 pb de largo. Cada sitio de estudio con su nombre y sigla, número de individuos, georreferenciación (longitud, latitud), índices de diversidad haplotípica y nucleotídica, y sus correspondientes desviaciones estándar, se informan en el Anexo 1. Los mismos indicadores pero estimados por cuenca se presentan en la Tabla 1. Los mayores valores de

diversidad haplotípica por cuenca corresponden a las dos cuencas de origen andino, que son las de mayor tamaño; contienen más sitios de muestreo y por lo tanto más secuencias (Itata sitios=12, N= 95; Biobío sitios=16, N=150). Para el índice de diversidad nucleotídica el valor máximo corresponde a la cuenca Biobío ($\pi= 0,07$), mientras que los valores mínimos en general corresponden a las cuencas costeras que tienen solo dos sitios de estudio. La excepción la constituyó la cuenca Carampangue que a pesar de poseer 79 individuos en ocho localidades tuvo una diversidad nucleotídica baja ($\pi=0,001 \pm 0,0001$).

Tabla 1. Valores de diversidad genética para las diez cuencas. Se presentan: Sitios (mismos acrónimos que en la Figura 1), Número de sitios (n° sitios), número de individuos (N), n° de sitios segregantes (S), n° de haplotipos (h), diversidad haplotípica (Hd) y su desviación estándar (d.e. Hd), diversidad nucleotídica (π) y su desviación estándar (d.e. π).

Cuenca	Sitios de muestreo	n° sitios	N	S	h	Hd	d.e. Hd	π	d.e. π
Mela	M1-M2	2	11	5	6	0,8	0,114	0,002	0,000
Itata	VE-NI-TR-OV-EH-RI-LA-CA-SP-TU	12	95	80	48	0,973	0,007	0,025	0,001
Pudá	P1-P2	2	18	8	7	0,765	0,073	0,002	0,000
Coliumo	C1-C2	2	19	4	5	0,696	0,077	0,001	0,000
Andalién	R1-R2-PE-FL	4	40	50	11	0,728	0,068	0,030	0,001
Biobío	DS-TH-HU-LC-TO-CH-YU-U1-U2-RC-SJ-CU-SE-SU-MU-LS	16	150	67	25	0,905	0,012	0,070	0,001
Isla Santa María	PB-TC	2	12	7	6	0,818	0,084	0,003	0,000
Carampangue	HO-LM-VC-LL-PI-CR-PC-CN	8	79	10	11	0,673	0,033	0,001	0,000
Lebu	CB-LE	2	17	13	5	0,507	0,14	0,003	0,001
Lanahue	CC-CE-HL-CL-CO	5	34	63	7	0,72	0,06	0,052	0,002

Para las relaciones genealógicas recuperadas en la red se individualizaron 148 haplotipos, de los cuales sólo dos fueron compartidos entre cuencas distintas (Itata y Mela, VI y M1: Figura 3). En general los haplotipos se comportaron bajo un patrón de divergencia congruente con su disposición geográfica. Las cuencas costeras Coliumo, Mela y Pudá se muestran agrupadas y separados por pocos pasos mutacionales de las localidades más costeras de la cuenca del río Itata (i.e. VI, BI, Fig. 3). Los haplotipos de la cuenca del Itata, en general, presentaron pocos pasos mutacionales entre ellos y forman un haplogrupo en forma de estrella con un haplotipo dominante. Los haplotipos pertenecientes a la cuenca del Biobío no forman un haplogrupo único, pero mostraron una tendencia a formar haplogrupos por sitio, de los que algunos fueron relacionados con localidades de la cuenca del río Itata (SP, Figura 3) y del río Andalién (FL y PE, Figura 3). Los cuatro haplotipos de la Isla Santa María se encuentran relacionados con los de la cuenca del Carampangue. Éstos últimos se distribuyen en dos haplotipos con frecuencia de aproximadamente diez y nueve haplotipos con menor frecuencia, separados entre sí por uno o dos pasos mutacionales. Los haplotipos de la cuenca Lebu se encuentran cercanos en la red a los de Carampangue y a uno de los sitios de la cuenca del Lanalhue (HL). En aproximadamente la misma latitud (38°S, Figura 1), el haplogrupo de la cuenca del Lanalhue mostró una gran diferenciación en la red (>40 pasos mutacionales) con el haplogrupo LS (Los Sauces) de la cuenca del Biobío. Este

último haplogrupo mostró la mayor divergencia respecto a todos los demás haplotipos en el análisis.

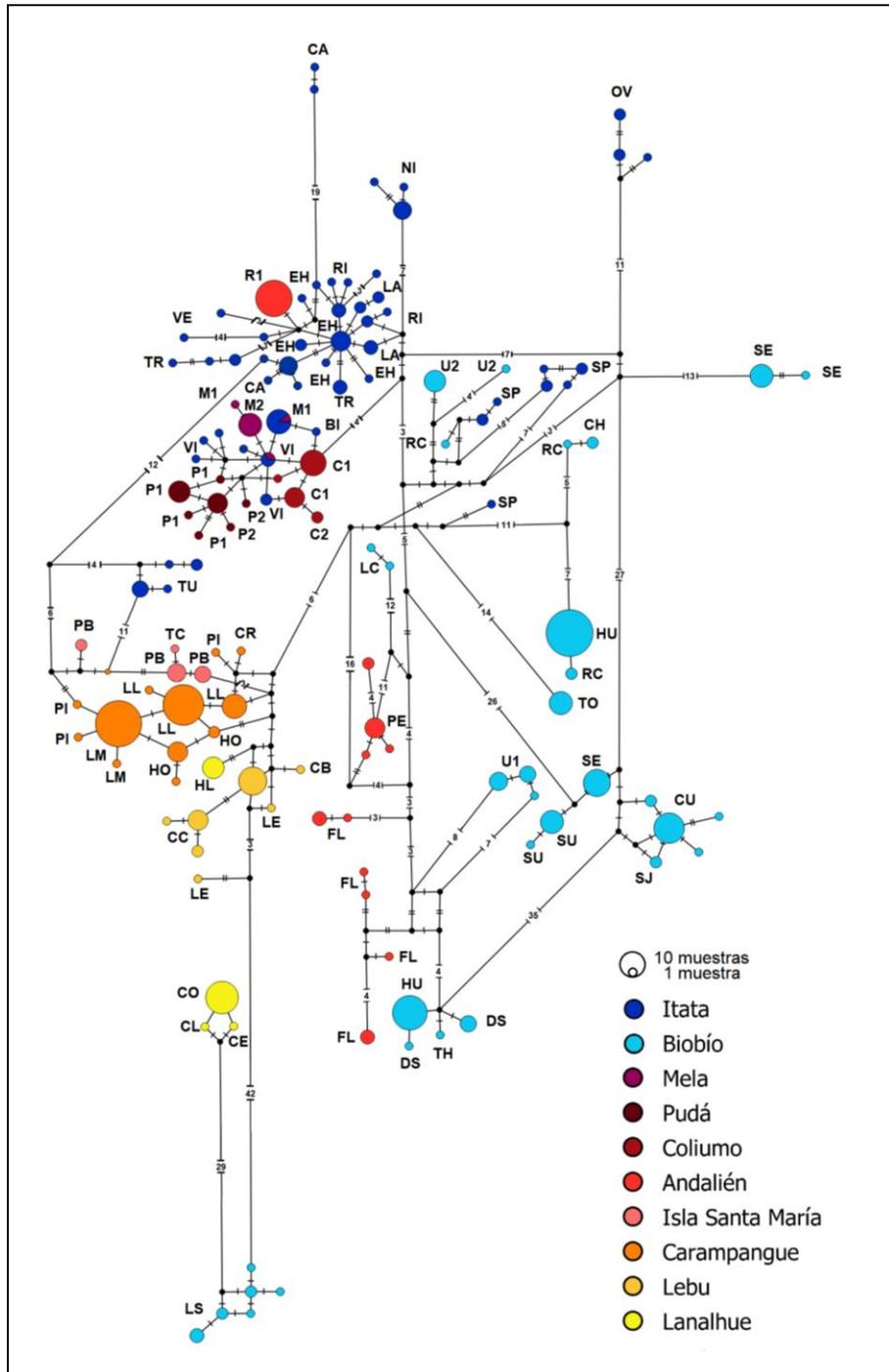


Figura 3. Red de haplotipos. Cada círculo representa un haplotipo, y su tamaño la frecuencia. El color indica la cuenca de procedencia. Las siglas señalan los sitios de estudios (mismos que en Figura 1). Las distancias entre haplotipos mayores a tres pasos mutacionales son señalados con números.

El indicador de estabilidad demográfica F_s fue negativo y significativo para cuatro cuencas (Mela, Itata, Pudá y Carampangue) sugiriendo un modelo de expansión demográfica, aunque para las dos últimas, estos valores resultaron cercanos a cero. Según el índice de R_{gg} la cuenca del Itata presentó señales de expansión demográfica, para las otras cuencas, los valores de R_{gg} no fueron significativos (Tabla 2). Los gráficos de frecuencia de desajuste evidenciaron que las cuencas de origen en Los Andes presentan una distribución multimodal (Figura 1 A y B) y las cuencas costeras una unimodal (Figura 1 C-J). Las excepciones a esto fueron las cuencas Andalién y Lanalhue que presentan una distribución bimodal.

Tabla 2. Resultados de expansión demográfica F_s y valores de significancia asociados p (F_s), índice de irregularidad R_{gg} con sus valores de significancia p (R_{gg}) para diez cuencas.

Cuenca	F_s	$p(F_s)$	R_{gg}	$p(R_{gg})$
Mela	-2,508	0,019	0,067	0,087
Itata	-12,356	0,013	0,005	0,021
Pudá	-2,584	0,034	0,083	0,163
Coliumo	-1,385	0,103	0,156	0,316
Andalién	9,337	0,990	0,119	0,998
Biobío	11,486	0,969	0,013	0,854
Isla Santa María	-0,848	0,281	0,060	0,132
Carampangue	-6,061	0,002	0,124	0,269
Lebu	0,958	0,709	0,476	0,965
Lanalhue	23,528	1	0,108	1

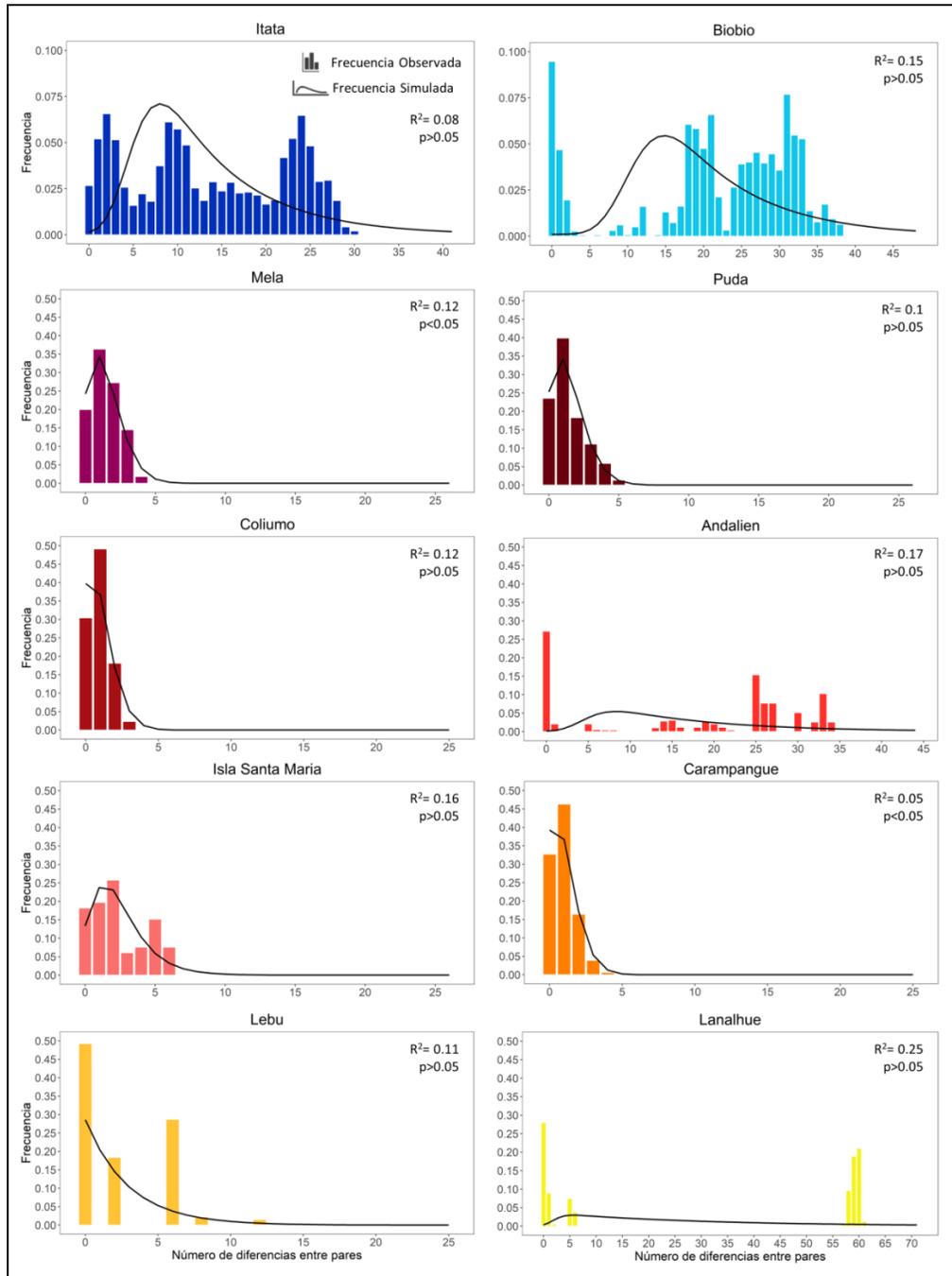


Figura 4. Frecuencias de distribuciones de desajuste entre pares bajo un modelo de expansión. El color de los histogramas de cada cuenca coincide con el color de la cuenca en el mapa del área de estudio (Figura 1).

El resultado del análisis de correlación entre el promedio de la distancia genética entre pares de poblaciones y la distancia geográfica entre ellas, indicó que existe una asociación positiva y significativa ($Rho=0,426$ $p=0,001$) (Figura 2), sugiriendo un patrón de aislamiento por distancia. Además, observando la distribución de las comparaciones, fue posible apreciar tres grupos genéticos independientes de la distancia geográfica (Fig. 5).

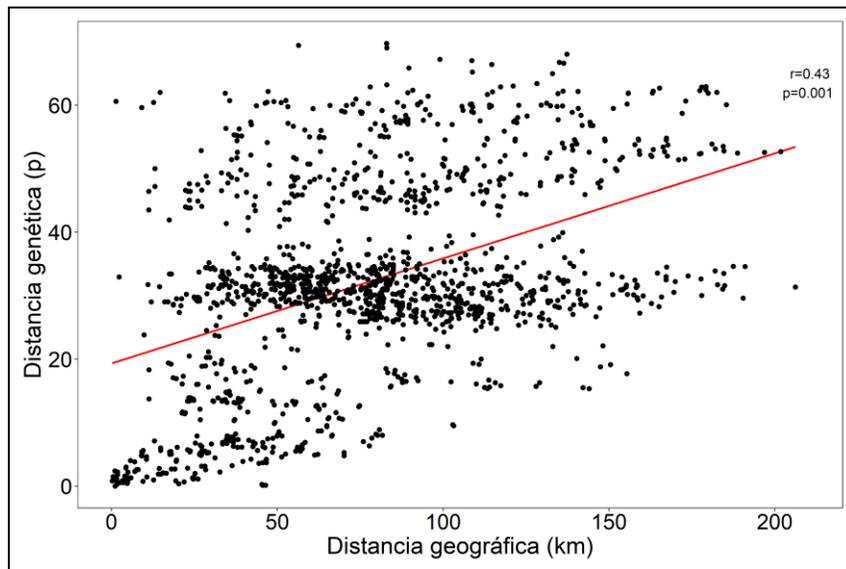


Figura 5. Gráfico de correlación entre pares de sitios de estudio. El eje X representa la distancia geográfica entre poblaciones, y el eje Y la distancia genética *p-distance*.

En el análisis de AMOVA entre los tres criterios de agrupaciones evaluadas (Total cuencas, Cuencas Andinas y Cuencas Costeras), la agrupación 'Total Cuencas' mostró un bajo porcentaje de variación entre grupos (32,83% FCT=0,328) y alto entre poblaciones dentro de grupos. Se observó un resultado similar para la agrupación 'Cuencas Andinas', pero ambos resultados fueron no significativos. Un resultado significativo se obtuvo para la comparación entre 'Cuencas Costeras' (56,4% FCT=0,563, Cuencas: Mela, Pudá, Coliumo, Andalién, Isla Santa María, Carampangue, Lebu, Lanalhue), lo que evidenció un mayor aporte de las Cuencas Costeras a distinguir grupos entre cuencas.

Tabla 3. Resultados del AMOVA para tres configuraciones de cuencas. Se indican: fuente de variación, grados de libertad (g.l.), variación (%), estadístico F y valor de significancia (p).

	Fuente de variación	g.l.	Variación (%)	Estadístico F	p
Total cuencas (10)	Entre grupos	9	32.83	FCT= 0.328	0
	Entre poblaciones dentro de grupos	45	60.25	FSC= 0.897	0
	Dentro de poblaciones	420	6.92	FST= 0.930	0
Cuencas Andinas	Entre grupos	1	23.12	FCT= 0.231	0
	Entre poblaciones dentro de grupos	26	68.44	FSC= 0.890	0
	Dentro de poblaciones	217	8.44	FST= 0.915	0
Cuencas Costeras	Entre grupos	7	56.40	FCT= 0.563	0
	Entre poblaciones dentro de grupos	19	39.04	FSC= 0.895	0
	Dentro de poblaciones	203	4.56	FST= 0.954	0

Genética del paisaje

El área (km²) para tres categorías de área de drenaje: Cuenca (CC), subcuenca (SCC) y Sub-subcuenca (SSCC) y los sitios que en ellas se incluyen se informan en el Anexo 2. El número de localidades dentro de las cuencas varió entre 2 y 16, y dentro de SSCC entre 1 y 5 sitios, El coeficiente de correlación de Pearson entre el área y la diversidad haplotípica resultó no significativo ($p > 0,05$) para las tres categorías de cuencas (CC), (SCC) y (SSCC) (Tabla 4). Para la diversidad nucleotídica se encontró una fuerte correlación positiva a nivel de cuencas ($\rho = 0,745$ $p = 0,033$), y moderada aunque significativa para SSCC ($\rho = 0,392$; $p = 0,035$).

Tabla 4. Correlación de las diversidades haplotípica y nucleotídica con el tamaño del área de drenaje para tres magnitudes de cuenca; CC: Cuenca; SCC: Subcuenca; y SSCC: Sub subcuenca.

	Hd			π		
	g.l.	Rho	p	g.l.	Rho	p
CC	6	0,523	0,183	6	0,745	0,033*
SCC	17	0,211	0,383	17	0,366	0,122
SSCC	27	0,268	0,159	27	0,392	0,035*

* Indica los valores significativos ($p < 0,05$).

Los resultados de SAMOVA mostraron que el número de grupos genéticos y la configuración de éstos que maximiza sus diferencias fue de 14 (FCT= 0.806, %

variación= 80.61). Con mayor número de grupos los valores de FCT continúan aumentando pero no de manera relevante. Los sitios incluidos en cada grupo son (las ubicaciones de los sitios por número de grupo se encuentran en la Figura 7): (1: U2) (2: SJ-CU) (3: SP-TU) (4: PB-TC-VC-HO-LM-PI-LL-PC-CR-CN-LE-CB-CC) (5: FL-DS-TH-HU-U1) (6: LC-CH-YU-RC) (7: SU-MU) (8: M1-M2-BI-VI-P1-P2-C1-C2) (9: NI-VE-TR-OV-EH-RI-LA-CA-R1-R2)(10: LS)(11: CE-CL-CO)(12: HL)(14: TO-SE)(13: PE).

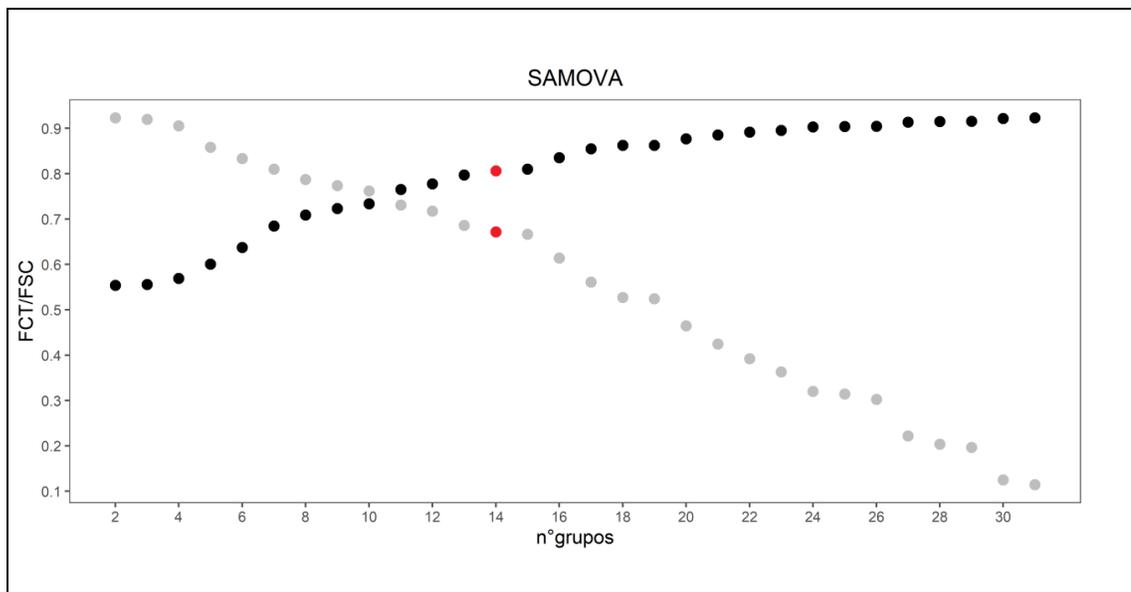


Figura 6. Gráfico de los valores FCT (negro) y FSC (gris) para cada número de grupo probado con SAMOVA. Los puntos rojos indican n°grupos=14.

A partir del modelo de idoneidad de hábitat (Figura 7) el análisis de las rutas de mínimo costo entre los grupos identificados previamente por SAMOVA sugirió

una tendencia a presentar conectividad en áreas centrales de la depresión intermedia y, de manera paralela, en el borde costero de las planicies litorales. Además evidenció tres rutas que conectan poblaciones a través de áreas deprimidas de la Cordillera de la Costa: a), entre los puntos 9 y 8 en el valle del río Itata, b) entre los puntos 5 y 1 en el valle del río Biobío, y c) entre los puntos 11 y 10, que corresponde a la falla de Nahuelbuta (Glodnyet al. 2008) que atraviesa a Cordillera de la Costa cerca de los 38°S (Figura 7). La correlación entre la distancia genética de los grupos inferidos con SAMOVA y la distancia geográfica lineal resultó no significativa (Figura 8). Encontramos la misma ausencia de significancia de correlación utilizando las distancias conducidas por la ruta de mínimo costo (Figura 9).

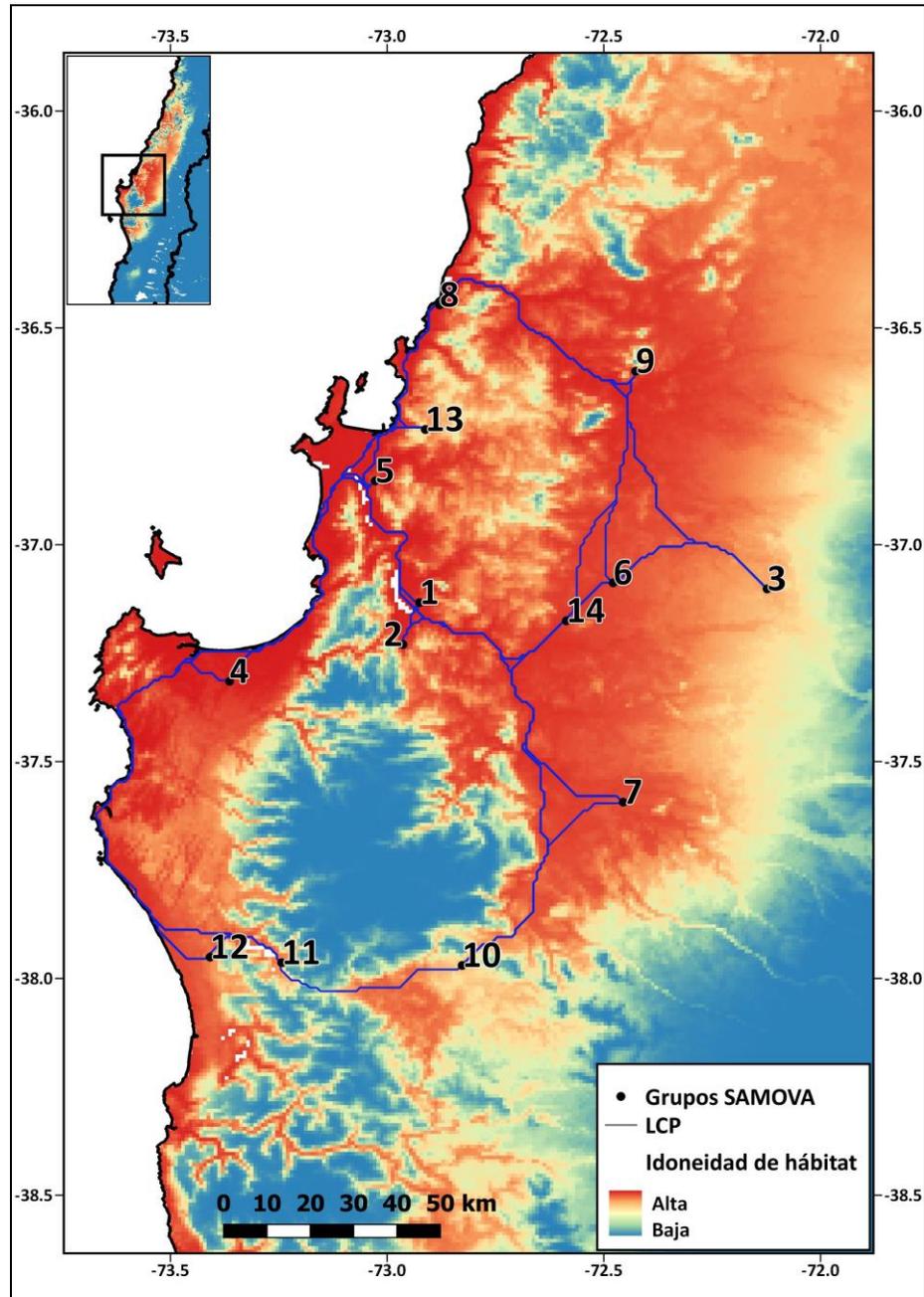


Figura 7. Rutas de mínimo costo (LCP) entre los grupos definidos por SAMOVA sobre el mapa de distribución de idoneidad de hábitat del tiempo presente. Cada círculo y número señalan un grupo identificado por SAMOVA. Las líneas en azul corresponden a las rutas de mínimo costo (LCP) entre grupos.

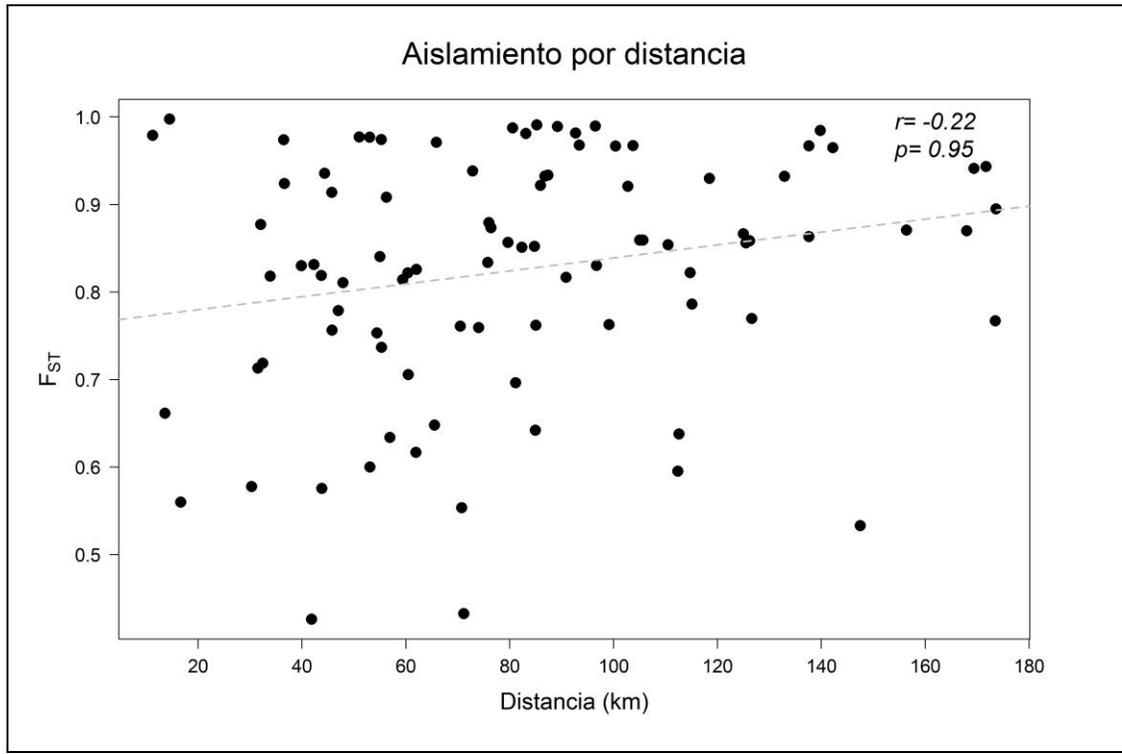


Figura 8. Resultado del test de correlación de Spearman entre distancia genética F_{ST} y distancia lineal (km) entre pares de grupos de SAMOVA. En el gráfico se indican el coeficiente de correlación (r) y su valor de significancia (p).

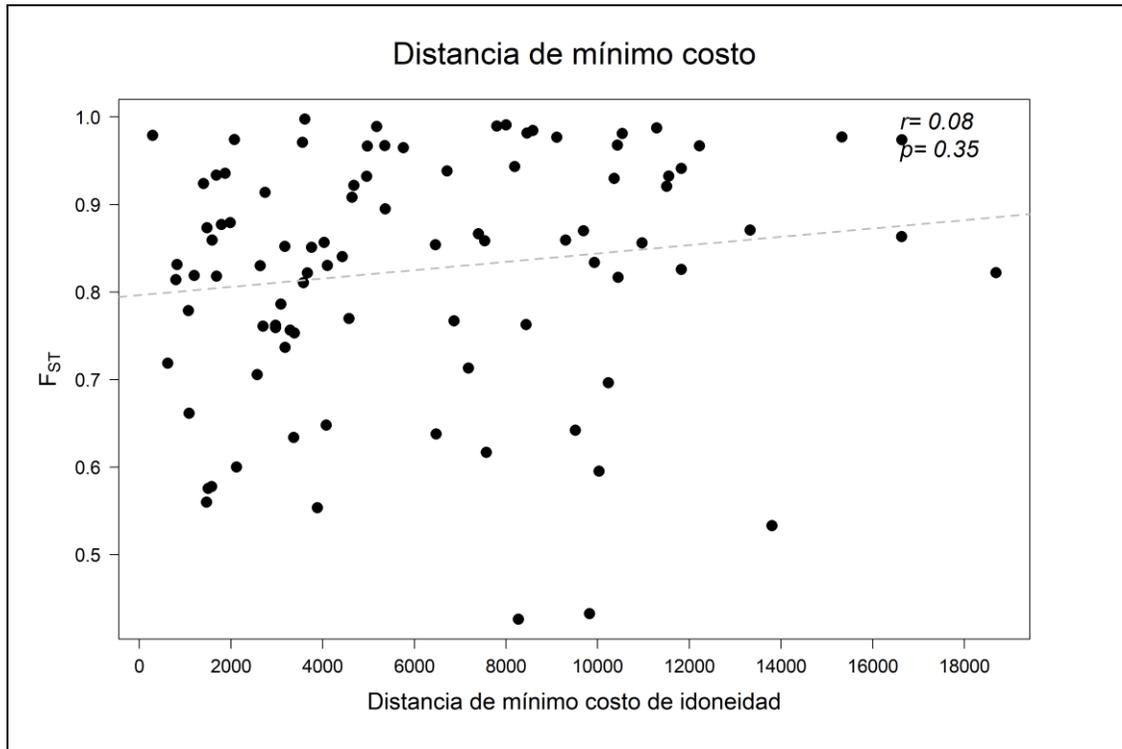


Figura 9. Resultado del test de correlación de Spearman entre distancia genética F_{ST} y la distancia estimada por la ruta de mínimo costo entre pares de grupos de SAMOVA. En el gráfico se indican el coeficiente de correlación (r) y su valor de significancia (p).

DISCUSIÓN

Diversidad intraespecífica

En este estudio encontramos niveles de variabilidad contrastantes al comparar poblaciones de *P. pugnax* de cuencas costeras con cuencas de origen andino. Esto sugiere que diferencias eventualmente marcadas por la condición andina-costera de las cuencas tendrían impacto en los niveles de diversidad de *P. pugnax*. Esas diferencias podrían estar relacionadas con atributos geográficos de las cuencas. Por ejemplo, el tamaño de las cuencas es distinto comparando entre andinas y costeras. Las primeras, que además de tener una mayor área, parecen haber sido más estables, por lo que podrían albergar y mantener más poblaciones. Lo anterior en conjunto con el relieve poco pronunciado pudo permitir mayor conectividad histórica intra cuenca, promoviendo el flujo entre poblaciones y por ende una mayor diversidad. Por otra parte, las cuencas costeras que son más pequeñas que las andinas y albergan menos poblaciones, es probable que hayan sido inestables debido a eventos como transgresiones marinas. Esto podría implicar que un menor número de poblaciones contribuyan con los bajos niveles de diversidad encontrados.

La variabilidad genética intraespecífica de la Familia Parastacidae en Sudamérica no ha sido ampliamente estudiada, aunque destaca un estudio reciente realizado por Miranda et al., (2018) en *Parastacus brasiliensis*, una especie excavadora con extenso rango de distribución en Brasil y Uruguay. Estos autores investigaron la variabilidad de tres genes (16S, 28S y COI) e identificaron seis linajes. Ellos sugieren que los niveles de variabilidad de *P. brasiliensis sensu stricto* dentro de poblaciones son más bajos que entre poblaciones, y que esto posiblemente se encuentre relacionado a una mayor diversidad en algunas áreas y a los altos niveles de diferenciación entre poblaciones locales. Además destacan la estructuración de algunas poblaciones y la contribución del hábito excavador restringiendo el flujo génico entre cuencas. *P. brasiliensis* y *P. pugnax* son especies filogenéticamente cercanas (Toon et al. 2010), incluso más que con la otra especie del mismo género nativa en Chile *P. nicoleti* (Crandall et al. 2000). Debido a esta cercanía filogenética y considerando la similitud en el hábito excavador (Palaoro et al. 2013, Rudolph 2013), podría esperarse que *P. pugnax* (así como otros Parastacidae endémicos de Sudamérica) muestren niveles y patrones espaciales de variabilidad genética similares.

Estructuración

Nuestros resultados de AMOVA muestran que la variación entre grupos es significativa solo en cuencas costeras. Esto indica que existe estructuración en

poblaciones costeras y ausencia de ella en cuencas andinas. Es posible que los efectos de los periodos glaciales e interglaciales tengan relación con la ausencia de estructuración encontrada en cuencas andinas. Por ejemplo, el retroceso de las capas glaciares (Glasser et al., 2008) y la acumulación de aguas de deshielo en los valles de la depresión intermedia (Muratli et al., 2010) incrementaron la densidad de los drenajes durante el cuaternario (Rehak et al., 2010). Estos sucesos pudieron favorecer el anegamiento de áreas depositacionales y la conectividad de hábitats dulceacuícolas. Para especies restringidas a ese tipo de hábitat, dichos procesos podrían haber aumentado la permeabilidad al flujo entre drenajes adyacentes y con ello impedir que se generara estructuración, especialmente en la depresión intermedia. Lo anterior podría reflejar el comportamiento de las cuencas andinas en este estudio. Pudimos observar, en la red de haplotipos, que algunos haplogrupos de la cuenca del río Itata se encuentran relacionados con los de la cuenca del río Biobío. Un estudio filogeográfico en el anuro *Rhinella arunco* ha documentado alta diversidad haplotípica y ausencia de estructuración en sus poblaciones en el área del Itata (Vásquez et al. 2013). Para el camarón de vega, el flujo entre cuencas cercanas en el área del Itata es posible, pese a ser un excavador primario, porque debido a su dependencia a hábitats dulceacuícolas, durante periodos de anegamiento su capacidad de dispersión puede ser mayor en terrenos inundables con bajo relieve, lo cual habría ocurrido también a escala

histórica. El flujo génico entre cuencas vecinas ha sido evidenciado en otras especies de la familia Parastacidae (Schultz et al. 2008, Gouws 2010).

En eventos como transgresiones marinas y alzas en el nivel del mar que ocurrieron durante las glaciaciones del Pleistoceno, las planicies costeras de Chile, que son naturalmente estrechas, pudieron quedar parcialmente sumergidas. Como consecuencia, la estructuración de las poblaciones en cuencas costeras podría ser resultado de la reducción de la planicie costera en el pasado, que pudo disminuir el hábitat de *P. pugnax* y dejar poblaciones aisladas al oeste de la Cordillera de la Costa. Un estudio en el camarón dulceacuícola excavador *Engaeus sericatus* (Decapoda: Parastacidae) basado en variación del gen 16S indica que la conectividad entre paleodrenajes y también entre los drenajes actuales explicarían los patrones geográficos de divergencia genética encontrada (Schultz et al. 2008). Ellos indican que en especies como *E. sericatus* (y otros camarones dulceacuícolas) la conectividad que se observa entre pequeños drenajes costeros adyacentes posiblemente sea mejor explicada por vías de migración entre paleo drenajes. Además, los autores señalan que la variación genética entre individuos dentro de poblaciones es mínima. De manera similar, en nuestros resultados encontramos que la variación dentro de poblaciones es baja. Otros estudios en camarones dulceacuícolas coinciden en encontrar baja variabilidad dentro de poblaciones y alta estructuración a nivel de drenajes (Gouws et a., 2006, Gouws et al. 2010,

Schultz et al., 2007 Dawkins et al., 2010, Miranda et al., 2018, Breinholt et al., 2011, Hurry 2015).

Un aspecto interesante es que las poblaciones al Este del lago Lanalhue (CL, CO y CE en la red), son genéticamente distantes a la encontrada al extremo Oeste del mismo lago (HL). Esta cuenca experimentó varios procesos paleoclimáticos y geológicos, los que modificaron su geomorfología, por ejemplo transgresiones, el alzamiento del margen continental y luego la sedimentación de cursos fluviales para formar el lago Lanalhue (Stefer et al 2010, Pedoja et al. 2011). Es posible que esos eventos hayan jugado un rol en el reordenamiento de las poblaciones de especies dulceacuícolas, entre ellas las de *P. pugnax*. Dada la divergencia con el resto de los haplotipos en la red podríamos inferir que esas tres poblaciones (CL, CO y CE) pertenezcan a un linaje distinto, pero para corroborar esto sería necesario considerar otros marcadores moleculares.

El análisis de estructuración (SAMOVA) indica que el número y composición de grupos genéticos no coincide con la delimitación de las cuencas. En ellos, casi el total de las poblaciones costeras se distribuyen en dos grupos que reúnen sitios geográficamente cercanos. Estos resultados sugieren que existió conectividad entre cuencas costeras vecinas, aunque la estructuración entre cuencas costeras es la mayor según el AMOVA. Durante las glaciaciones,

debido a los descensos del nivel del mar, las planicies costeras hoy sumergidas quedaron expuestas (Rabassa 2008, Jara-Muñoz y Melnick 2014), y los periodos de conectividad entre cuencas en una planicie costera más amplia y con alta idoneidad de hábitat posiblemente generaron flujo entre poblaciones cercanas. Esto coincide con los pocos pasos mutacionales que separan los haplogrupos costeros en nuestra red de haplotipos. Pero para especies dulceacuícolas la conectividad entre paleodrenajes costeros puede variar dependiendo de las características de la plataforma y de los atributos biológicos de la especie (Baggio 2017). Aproximadamente en los 36° y los 37,5° tienen lugar las desembocaduras de los ríos Itata y Biobío (respectivamente) que atraviesan la Cordillera de la Costa. En la plataforma costera ambos ríos poseen cañones submarinos, pero es mucho más acentuado el del río Biobío (Völker et al. 2012). Esto último también se asoció a un mayor flujo de sedimentos producto de la erosión glacial en los Andes durante el Plioceno (Melnick et al. 2009). En contraste, el cañón del Itata es menos profundo y acentuado respecto al del Biobío, y ubicado sobre una parte de la plataforma con poca pendiente. En el pasado, estos bajos relieves posiblemente permitieron el flujo entre la cuenca del río Itata y las cuencas costeras en latitudes cercanas. Acorde con nuestros resultados, en la red los únicos haplotipos compartidos entre cuencas corresponden a la cuenca del río Itata y la cuenca costera Mela ubicadas en el mismo rango latitudinal. Respecto a la relación entre las poblaciones de las cuencas de los ríos Biobío y la cuenca

costera adyacente Andalién, éstas limitan en áreas de recurrente inundación histórica (Link et al. 2019), por lo que era esperable encontrar señales de conectividad en especies dulceacuícolas. Nuestros resultados concuerdan con esto último, encontramos que uno de los grupos inferidos por SAMOVA posee localidades del Biobío y Andalién, y similar cercanía se muestra en la red de haplotipos. De manera análoga, indicios de conectividad entre las cuencas Itata, Biobío y Andalién, también han sido documentados en otros estudios en peces (Unmack et al. 2009), anuros (Vásquez et al. 2013) y grillos (Alfaro et al. 2018).

Estabilidad demográfica

Según nuestros resultados, las cuencas de origen Andino (Itata y Biobío) presentan diferencias en los estimadores de estabilidad demográfica. Estos comportamientos distintos entre cuencas andinas es posible que hayan surgido por el rango latitudinal y longitudinal que ocupan. En nuestros resultados de la red de haplotipos no existe un haplogrupo único para las poblaciones de la cuenca de río Biobío, sino varios haplogrupos conformados por uno o dos sitios de estudio. En ese sentido, poblaciones al interior de la cuenca del río Biobío pudieron verse más afectadas que las del río Itata por las condiciones periglaciares, como por ejemplo la formación de *permafrost* y por la erosión generada por los procesos de deshielo. Además el relieve es más rugoso y pronunciado en la cuenca del río Biobío, que fue erosionada por el avance y retroceso de glaciares (Rehak et al., 2010). Lo anterior pudo tener como

resultado discontinuidad en la distribución del hábitat de *P. pugnax* y a su vez afectar el flujo entre poblaciones geográficamente distantes. En contraste, la cuenca del río Itata posee un haplogrupo en forma de estrella en la red y varios haplotipos de baja frecuencia, lo que sugiere un proceso de expansión demográfica reciente. En el área de la cuenca del río Itata el efecto de períodos interglaciales (como acumulación de agua de deshielo y la modificación de los cursos de los ríos) pudieron mantener la conectividad entre poblaciones cercanas del camarón, favoreciendo procesos de expansión. Otras especies han mostrado señales de expansión genética en la cuenca del río Itata (Muñoz-Ramírez et al., 2014). Es posible que en el área de la depresión intermedia las condiciones ambientales hayan sido promotoras de tales procesos para especies asociadas a hábitats dulceacuícolas.

Es conocido que áreas con condiciones estables en el tiempo son promotoras de alta diversidad intraespecífica (González-Wevar et al., 2015). Varios estudios sugieren que parte del rango costero del sur de Chile corresponde a áreas de estabilidad bioclimática que permitieron el mantenimiento de refugios durante las glaciaciones (Victoriano et al., 2008, Sérsic et al. 2011,). La exposición de la plataforma costera actual sucedió durante el Mioceno al Plioceno Temprano ~5 Ma y su contracción desde el Plioceno Tardío ~3 Ma (Melnick y Echtler, 2006). La contracción de la línea de la costa provocada por las alzas del nivel del mar (Rabassa2008, Bernhardt et al. 2015) y por el hundimiento de la plataforma

litoral (Rehak et al. 2008, Jara-Muñoz y Melnick 2014), debió reducir el hábitat disponible para el camarón de vega, ubicado normalmente en áreas inundables en baja altitud. Por lo anterior, entre las poblaciones actuales del camarón de vega, ubicadas en el presente en las planicies costeras emergidas, en el pasado probablemente hayan sufrido un proceso de extinción local, con posterior recolonización, debido a episodios pasados de desaparición del hábitat.

En nuestros resultados las cuencas del rango costero, que presentan desviaciones de neutralidad según el análisis F_s de F_u , no muestran diferencias significativas con el modelo nulo del índice de raggedness, lo que sugiere que sus poblaciones han experimentado expansión. Ese patrón es avalado por un escenario de alta idoneidad de hábitat para *P. pugnax* durante el UMG y el tiempo presente (ver resultados de modelos de nicho). Pero también es posible que sea ocasionado por el pequeño número de sitios muestreados en cada cuenca costera. Debido al reducido tamaño de esas cuencas, el número de poblaciones encontradas es naturalmente menor comparado a cuencas de origen en Los Andes.

Genética del paisaje

Encontramos una correlación positiva entre la diversidad nucleotídica y el tamaño de área para las categorías cuenca y sub subcuenca. Estos resultados

sugieren que los niveles de diversidad genética se encuentran asociados al tamaño de la cuenca hidrográfica, y podría implicar que las poblaciones en cuencas costeras (de menor tamaño), han sido susceptibles a procesos de deriva y aislamiento. También es posible que el tamaño de las cuencas andinas, asumiendo que áreas mayores pueden albergar también mayores tamaños efectivos poblacionales (Avice 2009, Irwin 2002, Berger 2018), sea promotor de la diversidad genética encontrada. Aunque este parámetro (tamaño de cuenca) no ha sido ampliamente estudiado en especies excavadoras restringidas a ambientes dulceacuícolas, sobre todo en Sudamérica, algunos estudios en peces coinciden en encontrar una correlación positiva entre el área de drenaje y la diversidad genética (Kovach et al. 2015, Kremer et al. 2017). Muñoz-Ramírez et al. 2014 sugieren que el pequeño tamaño de las cuencas del lado Pacífico de Sudamérica puede contribuir con tamaños efectivos reducidos por el área disponible, y se esperarían poblaciones poco diversas genéticamente.

Al igual que la gran mayoría de los parastácidos de Sudamérica, *P. pugnax* es un excavador (primario) y como todos presenta desarrollo directo, estas características sugieren una limitada capacidad de dispersión. Además, el hábitat restringido a sistemas hídricos discontinuos en un relieve heterogéneo podría influir de manera negativa en la conectividad entre poblaciones, incluyendo aquellas ubicadas dentro de la misma cuenca. Si la discontinuidad

de hábitat del camarón de vega es influenciada por un gradiente en las condiciones ambientales, podría existir una correlación positiva entre la distancia genética (F_{ST}) y la ruta que los conecta usando el mínimo costo de idoneidad del modelo de nicho de *P. pugnax*. Pero en nuestros resultados no encontramos una correlación significativa. Esto podría sugerir que independiente de la idoneidad de hábitat y de la cercanía geográfica, las poblaciones de *P. pugnax* pueden mostrar altos niveles de diferenciación. Por lo anterior, otros factores como la sinuosidad del relieve podrían haber jugado un rol protagónico modelando la estructura genética de las poblaciones de *P. pugnax*.

Observamos discrepancias entre los dos análisis de aislamiento por distancia lineal (Mantel) realizados en este estudio, donde solo uno resultó significativo. Estos análisis se diferencian en el número de muestras a comparar. El resultado significativo compara entre todos los sitios de estudio (55 sitios), mientras que el no significativo compara entre las agrupaciones de los resultados de SAMOVA (14 grupos). Lo anterior da soporte a la idea que las poblaciones de *P. pugnax* podrían mostrar un alto grado de diferenciación aún a nivel de “vega”. Por otra parte, nuestros análisis de distancia (Mantel y LCP) entre los grupos inferidos por SAMOVA resultaron ambos no significativos. En el primero, la distancia lineal fue estimada entre cada grupo, y en el segundo, la distancia corresponde a la ruta en la que la suma de los costos parciales tiene

el menor costo acumulado, la cual no es necesariamente lineal sino que depende de la heterogeneidad del paisaje. Pero debido a que éste análisis (LCP) considera una sola ruta (la de menor costo) entre cada grupo, probablemente no logra capturar la distinta magnitud de conectividad del paisaje entre áreas de variada separación geográfica. También, para algunos puntos geográficamente distantes pero genéticamente cercanos no podemos considerar reales las ubicaciones de los centroides que se comparan, lo que pudo afectar las estimaciones de la distancia geográfica, como sería el caso del grupo 3 (SP-TU). Wang et al. (2008) investigaron la aplicabilidad de evaluar la conectividad del paisaje incorporando modelos de idoneidad de hábitat en el análisis de ruta de mínimo costo (LCP). Ellos mencionan que ese análisis (LCP) no considera factores como el tamaño y la delimitación de los parches de hábitat. Particularmente, la distribución del hábitat de *P. pugnax* se encuentra disgregada en parches de áreas depositacionales (“vegas”) actualmente poco conectadas entre ellas. Por esto, en futuros estudios sería más realista incorporar la delimitación del hábitat (áreas depositacionales o vegas) y considerar no sólo una ruta de dispersión.

CONCLUSIONES

La influencia de la condición de origen de las cuencas (origen andino y origen costero), y en algunos casos (cuencas del Lanalhue, de Lebu y del Carampangue) sumado al efecto vicariante de la Cordillera de la Costa, posiblemente configuraron a gran escala la estructura filogeográfica de *P. pugnax* en el rango centro sur de su distribución. El patrón de variabilidad que encontramos (mayor diversidad en cuencas de origen andino que en cuencas costeras) está asociado al tamaño de las cuencas. Como el tamaño de las cuencas, a su vez, se debe a la configuración geomorfológica en el centro-sur de Chile, también estaría relacionado con la condición Andina o Costera. Las variaciones en el nivel del mar posiblemente promovieron la estructuración presente en las poblaciones de las cuencas costeras. De manera paralela en los valles de la depresión intermedia, los efectos periglaciares, como anegamiento de áreas producto del deshielo y la modificación de redes de drenaje, permitieron una mayor disponibilidad de hábitat y favorecieron la conectividad entre y dentro de cuencas de origen en los Andes, impidiendo que se haya generado estructuración. Estas conclusiones sugieren historias complejas con resultados contrastantes para las distribuciones costeras y

Andinas del camarón de vega. Además podrían indicar patrones emergentes para otras especies dulceacuícolas excavadoras de la misma familia.

No tenemos evidencia para rechazar nuestra primera hipótesis (alta diversidad genética beta acorde a los atributos de las cuencas), porque en general encontramos una diversidad genética mayor en cuencas andinas que en cuencas costeras. Pero debemos remarcar que la mayor estructuración encontrada corresponde a cuencas de origen costero. Además de esto, el análisis de estimación de grupos poblacionales evidenció que las mayores subdivisiones intracuencas se asocian a cuencas de origen andino, específicamente a la cuenca del río Biobío, lo que posiblemente se asocie a las características topográficas de la cuenca. Acerca de nuestra segunda hipótesis, no encontramos evidencia para rechazarla, esto principalmente porque encontramos correlación entre características del paisaje (tamaño de las cuencas) y los niveles de diversidad genética.

Finalmente, las características biológicas de *P. pugnax*, como el hábito excavador (primario) y la naturaleza del relieve, seguramente restringieron el flujo entre cuencas de origen Andino y costeras. Las mismas características pudieron parcialmente impedir el flujo entre poblaciones geográficamente distantes. Estudios futuros deberían investigar los patrones de variabilidad considerando la distribución completa del camarón de vega, aumentando el

número de unidades hidrográficas andinas (en este estudio solamente hay dos), para esclarecer si la condición Andina o costera de las cuencas es un factor influyente en todo el rango o sólo en el centro-sur de Chile. Sugerimos que las poblaciones costeras de *P. pugnax*, debido a su pequeño tamaño efectivo poblacional y baja diversidad, son susceptibles a reducciones de sus tamaños efectivos, por lo que requieren mayor atención en un contexto de conservación. Esas características, bajo un escenario de constante presión extractiva y sin resguardo de las tallas de captura, podrían conducir a la pérdida de parte del acervo genético de *P. pugnax*. Por éstos motivos instamos a la regularización de su consumo estableciendo cuotas y períodos de extracción y fiscalizando la sobreexplotación en actividades culturales.

REFERENCIAS

Abell, R., Thieme, M.L., Revenga, C., Bryer, M., Kottelat, M., Bogutskaya, N., ... Petry, P. (2008). Freshwater Ecoregions of the World: A New Map of Biogeographic Units for Freshwater Biodiversity Conservation. *BioScience*, 58(5), 403.

Alfaro, F.M., Muñoz-Ramírez, C.P., Zúñiga-Reinoso, A., Trewick, S.A., & Méndez, M.A. (2018). Phylogeography of the Chilean red cricket *Cratomelus armatus* (Orthoptera: Anostomatidae) reveals high cryptic diversity in central Chile. *Biological Journal of the Linnean Society*, 123(4), 712–727.

Avice J.C. (2000). *Phylogeography, the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.

Avice, J.C. (2009). Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography*, 36(1), 3–15.

Baggio, R.A., Stoiev, S.B., Spach, H.L., & Boeger, W.A. (2017). Opportunity and taxon pulse: the central influence of coastal geomorphology on genetic diversification and endemism of strict estuarine species. *Journal of Biogeography*, 44(7), 1626–1639.

Bandelt, H.J., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.

Barbet-Massin, M., Jiguet, F., Albert, C.H., & Thuiller, W., 2012. Selecting pseudo-absences for species distribution models: how, where and how many? *Methods Ecol. Evol.* 3 (2), 327–338.

Berger, C., Štambuk, A., Maguire, I., Weiss, S., & Füreder, L. (2018). Integrating genetics and morphometrics in species conservation—A case study on the stone crayfish, *Austropotamobius torrentium*. *Limnologica*, 69,28–38.

Bernhardt, A., Melnick, D., Jara-Muñoz, J., Argandoña, B., González, J., & Strecker, M. R. (2015). Controls on submarine canyon activity during sea-level highstands: The Biobío canyon system offshore Chile. *Geosphere*, 11(4), 1226–1255.

Breinholt, J., Moler, P., & Crandall, K. (2011). Population structure of two crayfish with diverse physiological requirements. *Crustacean Issues*, 9(18), 323–343.

Buhay, J. E., Moni, G., Mann, N., & Crandall, K. A. (2007). Molecular taxonomy in the dark: Evolutionary history, phylogeography, and diversity of cave crayfish in the subgenus *Aviticambarus*, genus *Cambarus*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 42(2), 435–448.

Clement, M., Posada, D., & Crandall, K.A., 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9, 1657–1659.

Costa, J.R., Dalosto, M. M., Palaoro, A.V., & Santos, S. (2016). Contest duration and dynamics are affected by body size in a potentially subsocial crayfish (Crustacea: Decapoda). *Ethology*, 122(6), 502–512.

Cook, B.D., Page, T.J., & Hughes, J.M. (2008). Importance of cryptic species for identifying “representative” units of biodiversity for freshwater conservation. *Biological Conservation*, 141(11), 2821–2831.

Crandall, K.A., Fetzner, J.W., Jara, C.G., & Buckup, L. (2000). On the phylogenetic positioning of the South American freshwater crayfish genera (Decapoda: Parastacidae). *Journal of Crustacean Biology*, 20(1991), 530–540.

Dalosto, M., & Santos, S. (2011). Differences in oxygen consumption and diel activity as adaptations related to microhabitat in Neotropical freshwater decapods (Crustacea). *Comparative Biochemistry and Physiology*, 160(4), 461–466.

Dalosto, M.M., Palaoro, A.V., Souty-Grosset, C., De Siqueira-Bueno, S.L., Loureiro, T.G., Almerão, M.P., & Santos, S. (2015). One step ahead of the enemy: investigating aggressive interactions between invasive and native crayfish before the contact in nature. *Biological Invasions*, 17(12), 3503-3515.

Dawkins, K.L., Furse, J.M., Wild, C.H., & Hughes, J.M. (2017). A novel genus and cryptic species harboured within the monotypic freshwater crayfish genus *Tenuibranchiurus* Riek, 1951 (Decapoda: Parastacidae). *PeerJ*, 5(e3310).

Dawkins, K.L., Furse, J.M., Wild, C.H., & Hughes, J. M. (2010). Distribution and population genetics of the threatened freshwater crayfish genus *Tenuibranchiurus* (Decapoda: Parastacidae). *Marine and Freshwater Research*, 61.

Dupanloup I, Schneider S, & ExcoYer L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11:2571–2581

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

Feldmann, R.M., & Pole, M. (1994). A new species of *Paranephrops* White, 1842: A fossil freshwater crayfish (Decapoda: Parastacidae) from the Manuherikia Group (Miocene), Central Otago, New Zealand. *New Zealand Journal of Geology and Geophysics*, 37, 163–167.

Fleming, K., Johnston, P., Zwart, D., Yokoyama, Y., Lambeck, K., & Chappell, J. (1998). Refining the eustatic sea-level curve since the Last Glacial Maximum using far and intermediate-field sites. *Earth and Planetary Science Letters*, 163(1–4), 327–342.

Fu, Y.X. (1997). Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics Society of America*, (147), 915–925.

Glasser, N.F., Jansson, K.N., Harrison, S., & Kleman, J. (2008). The glacial geomorphology and Pleistocene history of South America between 38°S and 56°S. *Quaternary Science Reviews*, 27(3–4), 365–390.

Glodny, J., Echtler, H., Collao, S., Ardiles, M., Burón, P., & Figueroa, O. (2008). Differential Late Paleozoic active margin evolution in South-Central Chile (37°S–40°S)- the Lanahue Fault Zone. *Journal of South American Earth Sciences*, 26(4), 397–411.

González-Wevar, C.A., Salinas, P., Hüne, M., Segovia, N.I., Vargas-Chacoff, L., Astorga, M., ... Poulin, E. (2015). Phylogeography in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) along Two Biogeographical Provinces in the Chilean Coast. *PLoS ONE*, 10(7), 1–20.

Gouws, G., Stewart, B.A., & Daniels, S.R. (2010). Phylogeographic structure in the gilgie (Decapoda: Parastacidae: *Cherax quinquecarinatus*): A south-western Australian freshwater crayfish. *Biological Journal of the Linnean Society*, 101(2), 385–402.

Gouws, G., B.A. Stewart & S.R. Daniels. (2006). Phylogeographic structure of a freshwater crayfish (Decapoda: Parastacidae: *Cherax preissii*) in south-western Australia. *Mar. Freshw. Res.* 57: 837–848

Hammer, O., Harper, D.A.T., & Ryan, P.D. (2001). Past: paleontological statistics software package for education and data analysis. 4(1), 1–9.

Helms, B.S., Vaught, R.C., Suci, S.K., & Santos, S.R. (2015). Cryptic diversity within two endemic crayfish species of the Southeastern US revealed by molecular genetics and geometric morphometrics. *Hydrobiologia*, 755(1), 283–298.

Hengl, T., de Jesus, J.M., MacMillan, R.A., Batjes, N.H., Heuvelink, G.B.M., Ribeiro, E., ... Gonzalez, M.R. (2014). SoilGrids1km—Global soil information based on automated mapping. PLoS One, 9(8), e105992.

Hewitt, G.M. (2004). Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences, 359(1442), 183–195; 195.

Hijmans, R.J. et al. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. Int. J. Climatol. 25: 1965-1978.

Hughes, J.M., & Hillyer, M.J. (2003). Patterns of connectivity among populations of *Cherax destructor* (Decapoda:Parastacidae) in western Queensland, Australia. Marine and Freshwater Research, 54(5), 587–596.

Hulton, N.R.J., Purves, R.S., McCulloch, R.D., Sugden, D.E., & Bentley, M.J. (2002). The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. Quaternary Science Reviews, 21(1–3), 233-241.

Hurry, C.R., Schmidt, D.J., & Hughes, J.M. (2015). Phylogeography and limited distribution of the endangered freshwater crayfish, *Euastacus urospinosus*. Australian Journal of Zoology, 63(4), 236–244.

Hurwood, D. & Jane M. Hughes. (2001). Nested clade analysis of the freshwater shrimp, *Caridina zebra* (Decapoda: Atyidae), from north-eastern Australia. Molecular Ecology, 10, 113–125.

Irwin, D.E. (2002). Phylogeographic breaks without geographic barriers to gene flow. Evolution 56:2383–2394.

Jara-Muñoz, J., & Melnick, D. (2014). Unraveling sea-level variations and tectonic uplift in wave-built marine terraces, Santa María Island, Chile. Quaternary Research, 83(1), 216–228.

Kovach, R.P., Muhlfeld, C.C., Wade, A.A., Hand, B.K., Whited, D.C., Dehaan, P.W., ... Luikart, G. (2015). Genetic diversity is related to climatic variation and vulnerability in threatened bull trout. *Global Change Biology*, 21(7), 2510–2524.

Kremer, C.S., Vamosi, S.M., & Rogers, S.M. (2017). Watershed characteristics shape the landscape genetics of brook stickleback (*Culaea inconstans*) in shallow prairie lakes. *Ecology and Evolution*, 7(9), 3067–3079.

Larson, E.R., Abbott, C.L., Usio, N., Azuma, N., Wood, K.A., Herborg, L.M., & Olden, J.D. (2012). The signal crayfish is not a single species: cryptic diversity and invasions in the Pacific Northwest range of *Pacifastacus leniusculus*. *Freshwater Biology* 1–16.

Leigh, J.W. & Bryant, D. (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, 6, 1110–1116.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25, 1451–1452.

Link, O., Brox-Escudero, L.M., González, J., Aguayo, M., Torrejón, F., Montalva, G., & Eguibar-Galán, M. (2019). A paleo-hydro-geomorphological perspective on urban flood risk assessment. *Hydrological Processes*, 33(25), 3169–3183.

Mantel, N. (1967). The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209–220.

Marmion, M., Parviainen, M., Luoto, M., Heikkinen, R.K., & Thuiller, W., (2009). Evaluation of consensus methods in predictive species distribution modelling. *Divers. Distrib.* 15 (1), 59–69.

Martin, A.J., Rich, T.H., Poore, G.C.B., Schultz, M.B., Austin, C.M., Kool, L., & Vickers-Rich, P. (2008). Fossil evidence in Australia for oldest known freshwater crayfish of Gondwana. *Gondwana Research*, 14(3), 287–296.

Mathews, L.M., Adams, L., Anderson, E., Basile, M., Gottardi, E., & Buckholt, M.A. (2008). Genetic and morphological evidence for substantial hidden biodiversity in a freshwater crayfish species complex. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), 126–135.

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(4), 409–417.

McGlashan, D.J., & Hughes, J.M. (2001). Low levels of genetic differentiation among populations of the freshwater fish *Hypseleotris compressa* (Gobiidae: Eleotridinae): Implications for its biology, population connectivity and history. *Heredity*, 86(2), 222–233.

Melnick, D., & Echtler, H.P. (2006). Inversion of forearc basins in south-central Chile caused by rapid glacial age trench fill. *Geology*, 34(9), 709–712.

Melnick, D., Bookhagen, B., Strecker, M.R., & Echtler, H.P. (2009). Segmentation of megathrust rupture zones from fore-arc deformation patterns over hundreds to millions of years, Arauco peninsula, Chile. *Journal of Geophysical Research: Solid Earth*, 114, 1–23.

Miller, A. D., Sweeney, O. F., Whiterod, N. S., Van Rooyen, A. R., Hammer, M., & Weeks, A. R. (2014). Critically low levels of genetic diversity in fragmented populations of the endangered Glenelg spiny freshwater crayfish *Euastacus bispinosus*. *Endangered Species Research*, 25(1), 43–55.

Miranda, I., Gomes, K.M., Ribeiro, F.B., Araujo, P.B., Souty-Grosset, C., & Schubart, C.D. (2018). Molecular systematics reveals multiple lineages and cryptic speciation in the freshwater crayfish *Parastacus brasiliensis* (von Martens 1869) (Crustacea: Decapoda: Parastacidae). *Invertebrate Systematics*, 32, 1265–1281

Muñoz-Ramírez, C.P., Unmack, P.J., Habit, E., Johnson, J.B., Cussac, V.E., & Victoriano, P. (2014). Phylogeography of the ancient catfish family

Diplomystidae: Biogeographic, systematic, and conservation implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 73(1), 146–160.

Muratli, J.M., Chase, Z., McManus, J., & Mix, A. (2010). Ice-sheet control of continental erosion in central and southern Chile (36°-41°S) over the last 30,000 years. *Quaternary Science Reviews*, 29(23–24), 3230–3239.

Oksanen, J. et al. (2019). *vegan: Community Ecology Package* R package version 2.5-6.

Palaoro, A.V., del Valle, E., & Thiel, M. (2015). Life history patterns are correlated with predictable fluctuations in highly seasonal environments of semi-terrestrial burrowing crayfish. *Hydrobiologia*, 767(1), 51–63.

Palaoro, A.V., Dalosto, M.M., Coutinho, C., & Santos, S. (2013). Assessing the importance of burrows through behavioral observations of *Parastacus brasiliensis*, a neotropical burrowing crayfish (Crustacea), in laboratory conditions. *Zoological Studies*, 52(1), 1.

Pedoja, K., Husson, L., Regard, V., Cobbold, P.R., Ostanciaux, E., Johnson, M.E., ... Delcaillau, B. (2011). Relative sea-level fall since the last interglacial stage: Are coasts uplifting worldwide?. *Earth-Science Reviews*, 108(1–2), 1–15.

Pinheiro, L.C., & Oliveira, G.T. (2016). Oxidative status profile in different tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a seasonal cycle. *Journal of Experimental Zoology*, 325(5), 318-328.

Poeppig, E. (1835). *Reise in Chile, Peru und auf dem Amazonenstrome während der Jahre 1827-1832*. Vol. 1: 464 pp

Provan, J., & Bennett, K. D. (2008). Phylogeographic insights into cryptic glacial refugia. *Trends in Ecology and Evolution*, 23(10), 564–571.

R Core Team. (2019) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.

Rabassa, J., Coronato, A., & Martínez, O. (2011). Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 316–335.

Rabassa, J. (2008). Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an update review. *Developments in Quaternary Sciences*, 11, 151–204.

Rehak, K., Bookhagen, B., Strecker, M.R., & Echtler, H.P. (2010). The topographic imprint of a transient climate episode: The western Andean flank between 15.5° and 41.5°S. *Earth Surface Processes and Landforms*, 35(13), 1516–1534.

Rehak, K., Strecker, M.R., & Echtler, H.P. (2008). Morphotectonic segmentation of an active forearc, 37°-41°S, Chile. *Geomorphology*, 94(1–2), 98–116.

Ribeiro, F.B., Huber, A.F., Schubart, C.D., & Araujo, P.B. (2017). A new species of *Parastacus* Huxley, 1879 (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) from a swamp forest in southern Brazil. *Nauplius*, 25, e2017008.

Roxo, F.F., Albert, J.S., Silva, G.S.C., Zawadzki, C.H., Foresti, F., & Oliveira, C. (2014). Molecular phylogeny and biogeographic history of the armored neotropical catfish subfamilies Hypoptopomatinae, Neoplecostominae and Otothyriinae (Siluriformes: Loricariidae). *PLoS ONE*, 9(8).

Rudolph, E.H. (2013). *Parastacus pugnax* (Poepig, 1835) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae): conocimiento biológico, presión extractiva y perspectivas de cultivo. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41(4), 611–632.

Rudolph, E., & Almeida, A. (2010). On the sexuality of South American Parastacidae (Crustacea, Decapoda). *Invertebrate Reproduction & Development*, 37:3, 249-257.

Ruzzante, D.E., Walde, S.J., Cussac, V.E., Dalebout, M.L., Seibert, J., Ortubay, S., & Habit, E. (2006). Phylogeography of the Percichthyidae (Pisces) in Patagonia: Roles of orogeny, glaciation, and volcanism. *Molecular Ecology*, 15(10), 2949–2968.

Salgado-Leu, I., & Tacon, A.G. 2015. Effects of different protein and carbohydrate contents on growth and survival of juveniles of southern Chilean freshwater crayfish, *Samastacus spinifrons*. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 43(5).

Scalici, M., & Bravi, R. (2012). Solving alpha-diversity by morphological markers contributes to arranging the systematic status of a crayfish species complex (Crustacea, Decapoda). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 50(2), 89–98.

Schultz, M.B., Daniel A.I., Smith, S.A., Horwitz, P., Richardson, A.M.M., Crandall, K.A., & Austin, C.M. (2008). Sea-level changes and palaeo-ranges: reconstruction of ancient shorelines and river drainages and the phylogeography of the Australian land crayfish *Engaeus sericatus* Clark (Decapoda: Parastacidae). 5291–5314.

Schultz, M.B., Smith, S.A., Richardson, A.M.M., Horwitz, P., Crandall, K.A., & Austin, C.M. (2007). Cryptic diversity in *Engaeus* Erichson, *Geocharax* Clark and *Gramastacus* Riek (Decapoda: Parastacidae) revealed by mitochondrial 16S rDNA sequences. *Invertebrate Systematics*, 21(6), 569.

Stefer, S., Moernaut, J., Melnick, D., Echtler, H.P., Arz, H.W., Lamy, F., ... Haug, G.H. (2010). Tectonophysics Forearc uplift rates deduced from sediment cores of two coastal lakes in south-central Chile. *Tectonophysics*, 495(1–2), 129–143.

Sérsic, A.N., Cosacov, A., Cocucci, A.A., Johnson, L.A., Pozner, R., Avila, L.J., ... Morando, M. (2011). Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103(2), 475–494.

Silva-Castiglioni, D., Oliveira, G.T., & Buckup, L. (2011). Metabolic responses in two species of crayfish (*Parastacus defossus* and *Parastacus brasiliensis*) to post-hypoxia recovery. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 159(3), 332–338.

Silva, P. & M. Spoerer. (2006). Estudio de prefactibilidad para la comercialización de camarones de vega. Tesis, Ingeniería Industrial, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, 177 pp.

Toon, A., Pérez-Losada, M., Schweitzer, C.E., Feldmann, R.M., Carlson, M., & Crandall, K.A. (2010). Gondwanan radiation of the Southern Hemisphere crayfishes (Decapoda: Parastacidae): Evidence from fossils and molecules. *Journal of Biogeography*, 37(12), 2275–2290.

Tschá, M.K., Bachmann, L., Abilhoa, V., & Boeger, W.A. (2017). Past connection and isolation of catchments: The sea-level changes affect the distribution and genetic variability of coastal freshwater fishes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 190, 31–39.

Thuiller, W., Lafourcade, B., Engler, R., & Araujo, M.B. (2009). BIOMOD a platform for ensemble forecasting of species distributions. *Ecography*, 32: 369-373

Georges D, Thuiller W. (2012). Multi-species distribution modeling with biomod2. *R-CRAN Proj. 1*: 1–12.

Unmack, P.J., Bennin, A.P., Habit, E.M., Victoriano, P.F., & Johnson, J.B. (2009). Impact of ocean barriers, topography, and glaciation on the phylogeography of the catfish *Trichomycterus areolatus* (Teleostei: Trichomycteridae) in Chile. *Biological Journal of the Linnean Society*, 97(4), 876–892.

Vásquez, D., Correa, C., Pastenes, L., Eduardo Palma, R., & Méndez, M.A. (2013). Low phylogeographic structure of *Rhinella arunco* (Anura: Bufonidae), an endemic amphibian from the Chilean Mediterranean hotspot. *Zoological Studies*, 52(35), 1–11.

Vega, R., De Los Ríos-Escalante, P., Encina, F., & Mardones, A. (2017). Ecology of benthic crustaceans in the Cautin river (38 S, Araucania region, Chile). *Crustaceana*, 90(6), 709-719.

Victoriano, P.F., Ortiz, J.C., Benavides, E., Adams, B.J., & Sites, J.W. (2008). Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropiduridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology*, 17(10), 2397–2416.

Völker, D., Geersen, J., Contreras-Reyes, E., Sellanes, J., Pantoja, S., Rabbel, W., ... Weinrebe, W.R. (2012). Morphology and geology of the continental shelf and upper slope of southern Central Chile (33°S–43°S). *International Journal of Earth Sciences*, 103(7), 1765–1787.

Wang, Y.H., Yang, K.C., Bridgman, C.L. & Lin, L.K. (2008). Habitat suitability modelling to correlate gene flow with landscape connectivity. 989–1000.

Wood, L.E., Grave, S.E., & Daniels, S.R. (2018). A comparative evolutionary study reveals radically different scales of genetic structuring within two atyid shrimp species (Crustacea: Decapoda: Atyidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 20, 1–13.

Xu, J., Pérez-Losada, M., Jara, C.G., & Crandall, K.A. (2009). Pleistocene glaciation leaves deep signature on the freshwater crab *Aegla alacalufi* in Chilean Patagonia. *Molecular Ecology*, 18(5), 904–918

Yáñez-Alvarado, M., Rudolph-Latorre, E., & Orellana-Olave, J. (2018). Growth of the burrowing crayfish *Parastacus nicoleti* (Philippi, 1882) (Crustacea, Decapoda, Parastacidae). *Nauplius*, 26(0), 1–9.

ANEXO 1

Datos de identificación de los sitios de estudio: nombre, georreferenciación y estimadores de diversidad genética.

Tabla A1. Se indican: Cuenca de cada sitio (Cuenca), sigla (Sitio), nombre de cada sitio (Nombre), georreferenciación (Latitud y Longitud), número de individuos *Parastacus pugnax* por sitio (N), número de sitios segregantes (S), diversidad haplotípica (Hd) y su desviación estándar (d.e. Hd) diversidad nucleotídica (π) y su desviación estándar (d.e. π). Las siglas son las utilizadas en el mapa de estudio (Figura 1), red de haplotipos (Figura 3) y SAMOVA.

Cuenca	Sitio	Nombre	Latitud	Longitud	N	S	Hd	d.e. Hd	π	d.e. π
Mela	M1	Mela 1	-36,3543167	-72,8216	2	1	1	0,5	0,00147	0,00074
Mela	M2	Mela 2	-36,3547167	-72,8098833	9	3	0,694	0,147	0,00154	0,00045
Itata	BI	Boca Itata	-36,3713667	-72,8543167	9	1	0,222	0,166	0,00034	0,00026
Itata	NI	Ninhue	-36,3865	-72,508278	7	4	0,524	0,209	0,00172	0,00077
Itata	VE	Verquico	-36,388854	-72,150101	3	9	1	0,272	0,00954	0,0032
Itata	VI	Vegas del Itata	-36,41	-72,86	8	5	0,929	0,084	0,00271	0,00047
Itata	TR	Treguaco	-36,427833	-72,623667	7	11	0,81	0,13	0,00832	0,00123
Itata	OV	Oro Verde	-36,570639	-72,188694	5	6	0,9	0,161	0,0042	0,0011
Itata	EH	El Huape	-36,624967	-72,5449	10	8	0,756	0,13	0,00263	0,00095
Itata	RI	Ruta Itata	-36,652833	-72,229083	10	9	0,911	0,077	0,00346	0,00072
Itata	LA	Laguna Avendaño	-36,754111	-72,453194	8	3	0,821	0,101	0,00229	0,00036
Itata	CA	Calle Alegría	-36,850917	-72,078333	10	32	0,778	0,137	0,01622	0,00661
Itata	SP	San Pedro Pemuco	-36,948861	-72,300528	10	26	0,933	0,062	0,01321	0,00303
Itata	TU	Tucapel	-37,25433333	-71,94601167	8	4	0,75	0,139	0,00263	0,00058
Pudá	P1	Pudá 1	-36,4991667	-72,9013056	10	6	0,667	0,163	0,00205	0,00076
Pudá	P2	Pudá 2	-36,5005556	-72,8958333	8	4	0,464	0,2	0,00178	0,00081
Coliumo	C1	Coliumo 1	-36,5691667	-72,9519444	10	1	0,556	0,075	0,00084	0,00011
Coliumo	C2	Coliumo 2	-36,5695833	-72,9545278	9	4	0,806	0,12	0,00203	0,00045

Tabla A1. (Continuación) Se indican: Cuenca de cada sitio (Cuenca), sigla (Sitio), nombre de cada sitio (Nombre), georreferenciación (Latitud y Longitud), número de individuos *Parastacus pugnax* por sitio (N), número de sitios segregantes (S), diversidad haplotípica (Hd) y su desviación estándar (d.e. Hd) diversidad nucleotídica (π) y su desviación estándar (d.e. π). Las siglas son las utilizadas en el mapa de estudio (Figura 1), red de haplotipos (Figura 3) y SAMOVA.

Andalién	R1	Rafael 1	-36,670917	-72,750833	10	0	0	0	0	0
Andalién	R2	Rafael 2	-36,669806	-72,738917	10	0	0	0	0	0
Andalién	PE	Penco	-36,734056	-72,912028	10	7	0,644	0,152	0,00327	0,00116
Andalién	FL	Florida	-36,8138889	-72,83336111	10	21	0,867	0,085	0,01588	0,00172
Biobío	DS	Denavi Sur	-36,760383	-73,101317	5	3	0,7	0,218	0,0018	0,00073
Biobío	TH	Talcahuano	-36,773717	-73,107	10	4	0,711	0,117	0,00263	0,00044
Biobío	HU	Hualpén	-36,801418	-73,16093895	10	33	0,2	0,154	0,01091	0,00841
Biobío	LC	Laguna Caulles	-36,991028	-72,412111	10	31	0,378	0,181	0,01622	0,00728
Biobío	TO	Tomeco	-36,999694	-72,649278	8	0	0	0	0	0
Biobío	CH	Charrua	-37,0791157	-72,3167213	10	13	0,2	0,154	0,0039	0,00301
Biobío	YU	Yumbel	-37,09725	-72,591	10	0	0	0	0	0
Biobío	U1	Unihue 1	-37,113694	-72,934972	10	4	0,644	0,101	0,00173	0,0007
Biobío	U2	Unihue 2	-37,133139	-72,925167	8	7	0,25	0,18	0,00262	0,00189
Biobío	RC	Río Claro	-37,183055	-72,59444	10	34	0,756	0,13	0,01481	0,00586
Biobío	SJ	Santa Juana	-37,2298	-72,9633	10	1	0,356	0,159	0,00109	0,00049
Biobío	CU	Curalí	-37,229867	-72,963367	10	5	0,667	0,163	151	0,00052
Biobío	SE	Santa Elena	-37,3508	-72,5241	10	48	0,378	0,181	0,01526	0,01123
Biobío	SU	La Suerte	-37,33594	-72,3282	9	1	0,222	0,166	0,00034	0,00025
Biobío	MU	Mulchen	-37,630000	-72,350000	10	0	0	0	0	0
Biobío	LS	Los Sauces	-37,969778	-72,826861	10	6	0,911	0,077	0,00349	0,00056
Isla Santa María	PB	Playa las Ballenas	-37,027028	-73,542083	6	6	0,867	0,129	0,00373	0,00131
Isla Santa María	TC	Tres Cuevas	-37,027694	-73,521194	6	7	0,867	0,129	0,00419	0,00128
Carampangue	VC	Vega Chillancito	-37,229333	-73,223667	10	0	0	0	0	0

Tabla A1. (Continuación) Se indican: Cuenca de cada sitio (Cuenca), sigla (Sitio), nombre de cada sitio (Nombre), georreferenciación (Latitud y Longitud), número de individuos *Parastacus pugnax* por sitio (N), número de sitios segregantes (S), diversidad haplotípica (Hd) y su desviación estándar (d.e. Hd) diversidad nucleotídica (π) y su desviación estándar (d.e. π). Las siglas son las utilizadas en el mapa de estudio (Figura 1), red de haplotipos (Figura 3) y SAMOVA.

Carampangue	HO	Horcones	-37,236829	-73,228034	9	2	0,556	0,165	0,00104	0,00036
Carampangue	LM	Los Maitenes	-37,241133	-73,230567	10	2	0,378	0,181	0,0006	0,00031
Carampangue	PI	Pichilo	-37,249167	-73,213806	12	6	0,455	0,17	0,0015	0,00081
Carampangue	LL	LLico	-37,25	-73,38927444	9	2	0,417	0,191	0,00092	0,00045
Carampangue	PC	Punta Carampangue	-37,251889	-73,269056	9	1	0,556	0,09	0,00088	0,00014
Carampangue	CR	Carampangue	-37,278	-73,2504	10	2	0,2	0,154	0,00065	0,0005
Carampangue	CN	Curanilahue Norte	-37,424889	-73,387389	10	1	0,2	0,154	0,00035	0,00027
Lebu	LE	Lebu	-37,6121	-73,550617	9	7	0,417	0,191	0,00275	0,00153
Lebu	CB	Curicó Lebu	-37,619667	-73,641583	8	7	0,607	0,164	0,00466	0,00147
Lanahue	CC	Curaco	-37,56735	-73,14255	9	2	0,556	0,165	0,00102	0,00036
Lanahue	CE	Camino Elicura	-37,57811	-73,14957	7	1	0,286	0,196	0,00043	0,00029
Lanahue	CL	Calebu	-37,701983	-73,6395	8	1	0,25	0,18	0,00037	0,00027
Lanahue	HL	Huentelolen	-37,9505	-73,408556	7	0	0	0	0	0
Lanahue	CO	Contulmo	-37,981722	-73,246361	3	0	0	0	0	0

ANEXO 2

Datos utilizados para las correlaciones entre el área y diversidad genética para tres categorías de cuenca (Cuenca, SubCuenca y SubSubCuenca)

Tabla A2. Se indican por cada categoría de cuenca Cuenca, SubCuenca y SubSubCuenca. Código de cada una obtenido desde la Dirección General de Aguas de Chile (Código DGA, www.dga.mop.gob.cl), área (km²), número de sitios presentes en el área (n Sitios), Sitios de estudio (cada sigla corresponde a un sitio de estudio, nombres y número de individuos se encuentran en Anexo 1), diversidad haplotípica (Hd), desviación estándar de Hd, diversidad nucleotídica (π) y desviación estándar de π .

Categoría	Código DGA	Área (km ²)	n Sitios	Sitios de estudio	Hd	d.e. Hd	π	d.e. π
Cuenca	080 (Mela)	172,41	2	M1, M2	0,80000	0,11400	0,00200	0,00050
	081 (Itata)	11326,37	12	BI, NI, VE, VI, TR, OV, EH, RI, LA, CA, SP, TU	0,97300	0,00700	0,02500	0,00190
	082 (Pudá)	378,42	2	P1, P2	0,76500	0,07300	0,00200	0,00050
	082 (Coliumo)	239,07	2	C1, C2	0,69600	0,07700	0,00100	0,00020
	082 (Andalién)	1498,59	4	R1, R2, PE, FL	0,72800	0,06800	0,03000	0,00190
	083 (Biobío)	24368,8	16	DS, TH, HU, LC, TO, CH, YU, U1, U2, RC, SJ, CU, SE, SU, MU, LS	0,90500	0,01200	0,07000	0,00140
	084 (Isla Santa María)	30,8	2	PB, TC	0,81800	0,08400	0,00300	0,00080
	085 (Carampangue)	1262,08	8	VC, HO, LM, PI, LL, PC, CR, CN	0,67300	0,03300	0,00100	0,00010
	087 (Lebu)	857,89	2	LE, CB	0,50700	0,14000	0,00300	0,00140
	088 (Lanahue)	1695,71	5	CC, CE, CL, HL, CO	0,72000	0,06000	0,05200	0,00240
SubCuenca	801	213,91	2	M1, M2	0,80000	0,11400	0,00231	0,00053
	814	2401,68	5	BI, VI, TR, NI, EH	0,87000	0,04500	0,01622	0,00149
	811	3695,99	2	VE, OV	0,92900	0,08400	0,02680	0,00554
	813	3470,65	3	RI, LA, CA	0,93100	0,02700	0,02894	0,00310
	812	2316,36	2	SP, TU	0,93500	0,03800	0,02373	0,00151
	820	471,20	4	P1, P2, R1, R2	0,67900	0,06700	0,01097	0,00056
	821	297,91	3	C1, C2, PE	0,83300	0,04100	0,02205	0,00274

Tabla A2 (Continuación). Se indican por cada categoría de cuenca Cuenca, SubCuenca y SubSubCuenca. Código de cada una obtenido desde la Dirección General de Aguas de Chile (Código DGA, www.dga.mop.gob.cl), área (km²), número de sitios presentes en el área(n Sitios), Sitios de estudio (cada sigla corresponde a un sitio de estudio, nombres y número de individuos se encuentran en Anexo 1), diversidad haplotípica (Hd), desviación estándar de Hd, diversidad nucleotídica (π) y desviación estándar de π .

	822	991,84	1	FL	0,86700	0,08500	0,01588	0,00172
	839	1710,40	7	DS, TH, HU,U1, U2, SJ, CU	0,81000	0,02700	0,05398	0,00247
	838	2407,01	5	TO, LC, YU, CH, RC	0,53400	0,07900	0,01923	0,00339
	836	3352,92	1	SE	0,37800	0,18100	0,01526	0,01123
	833	2125,85	2	SU, MU	0,57300	0,06100	0,00200	0,00022
	835	3596,51	1	LS	0,91100	0,07700	0,00349	0,00056
	840	38,54	2	PB, ST	0,81800	0,08400	0,00364	0,00086
	852	431,23	5	LM, HO, VC, PI, CR	0,67700	0,06000	0,00175	0,00027
	853	408,67	3	LL, PC, CN	0,65900	0,05900	0,00139	0,00020
	872	205,03	2	LE, CB	0,50700	0,14000	0,00390	0,00140
	880	267,04	1	CC	0,55600	0,16500	0,00102	0,00036
	882	1536,81	4	HL, CE, CL, CO	0,53000	0,08600	0,04309	0,00837
SubSubCuenca	8000	213,91	2	M1, M2	0,80000	0,11400	0,00231	0,00053
	8145	294,28	2	BI, VI	0,66200	0,12600	0,00153	0,00039
	8144	447,68	2	TR, NI	0,84600	0,07400	0,01426	0,00132
	8118	850,68	1	VE	1,00000	0,27200	0,00954	0,00320
	8115	204,90	1	OV	0,90000	0,16100	0,00420	0,00110
	8140	429,34	1	EH	0,75600	0,13000	0,00263	0,00095
	8134	873,80	2	RI, CA	0,92600	0,04300	0,01134	0,00388
	8133	369,28	1	LA	0,82100	0,10100	0,00229	0,00036
	8124	902,03	1	SP	0,93300	0,06200	0,01321	0,00303
	8122	261,92	1	TU	0,75000	0,13900	0,00263	0,00058
	8200	471,20	4	P1, P2, R1, R2	0,67900	0,06700	0,01097	0,00056

Tabla A2 (Continuación). Se indican por cada categoría de cuenca Cuenca, SubCuenca y SubSubCuenca. Código de cada una obtenido desde la Dirección General de Aguas de Chile (Código DGA, www.dga.mop.gob.cl), área (km²), número de sitios presentes en el área(n Sitios), Sitios de estudio (cada sigla corresponde a un sitio de estudio, nombres y número de individuos se encuentran en Anexo 1), diversidad haplotípica (Hd), desviación estándar de Hd, diversidad nucleotídica (π) y desviación estándar de π .

	8210	297,91	3	C1, C2, PE	0,88300	0,04100	0,02205	0,00274
	8220	991,84	1	FL	0,86700	0,08500	0,01588	0,00172
	8394	389,52	3	DS, TH, HU	0,47000	0,11200	0,00558	0,00386
	8392	465,09	2	U1, U2	0,75800	0,06000	0,02842	0,00260
	8384	567,97	2	TO, LC	0,63400	0,06900	0,02857	0,00301
	8385	567,07	3	YU, RC, CH	0,36100	0,10900	0,00653	0,00291
	8391	298,25	2	SJ, CU	0,27900	0,12300	0,00089	0,00041
	8366	432,00	1	SE	0,37800	0,18100	0,01526	0,01123
	8334	272,20	1	SU	0,22200	0,16600	0,00034	0,00025
	8333	611,45	1	MU	0	0	0	0
	8355	466,09	1	LS	0,91100	0,07700	0,00349	0,00056
	8400	38,54	2	PB, ST	0,81800	0,08400	0,00364	0,00086
	8520	431,23	5	LM, HO, VC, PI, CR	0,67700	0,06000	0,00175	0,00027
	8530	408,67	3	LL, PC, CN	0,65900	0,05900	0,00139	0,00020
	8720	205,03	2	LE, CB	0,50700	0,14000	0,00390	0,00140
	8800	267,04	1	CC	0,55600	0,16500	0,00102	0,00036
	8823	111,14	1	HL	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
	8822	554,73	3	CE, CL, CO	0,21600	0,12400	0,00034	0,00020