

Filogeografía de las llacas chilenas del género *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) en base a secuencias del gen mitocondrial citocromo b

Phylogeographic relationships of the Chilean llacas of the genus *Thylamys* (Marsupialia, Didelphidae) based on sequences of the cytochrome b mitochondrial gene

ANDRÉS P. MEYNARD¹, R. EDUARDO PALMA¹ & ERIC RIVERA-MILLA^{1,2}

¹Departamento de Ecología, Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile, Casilla 114-D, Santiago 6513677, Chile

²Dirección actual: Developmental Neurobiology, Department of Biology, University of Konstanz, Konstanz D-78475, Germany

RESUMEN

Seis especies de llacas o “mouse opossums” del género *Thylamys* se han descrito para Sudamérica, de las cuales investigamos las relaciones evolutivas de aquellas localizadas en el Altiplano y las quebradas de la Primera Región de Chile, y en localidades ubicadas al sur del Desierto de Atacama hasta los 37° S. Luego de secuenciar el gen mitocondrial citocromo b en ejemplares de diversas localidades del norte y centro de Chile, analizamos filogenéticamente las secuencias bajo los criterios de parsimonia, distancia y verosimilitud con el programa PAUP 4.0. Los diferentes análisis filogenéticos usados fueron concordantes, mostrando dos clados claramente definidos: uno constituido por *Thylamys pallidior* que incluyó especímenes de la Quebrada de Camarones y de la pre-cordillera de la Primera Región de Chile, y el otro conformado por *Thylamys elegans* de poblaciones al sur del Desierto de Atacama. Demostramos de este modo, que las poblaciones de las quebradas de la Primera Región de Chile corresponden a *T. pallidior*, lo cual estaría facilitado por la continuidad biogeográfica entre estas quebradas y la Prepuna andina, mientras que las llacas localizadas al sur del Desierto de Atacama, se reconocen como *T. elegans*. Lo anterior ratifica la existencia de dos especies de llacas en Chile.

Palabras clave: filogeografía, *Thylamys*, llacas, Chile, citocromo b.

ABSTRACT

Six mouse opossum species are currently recognized for the genus *Thylamys* in South America, of which we hypothesized the evolutionary relationships for those located in the Andean Altiplano and canyons of the Region I of Chile, as well as for those located south of the Atacama Desert down to 37° S. To that goal we sequenced the cytochrome b mitochondrial gene and data were analyzed using different phylogenetic criteria such as parsimony, distance and likelihood available in the program PAUP 4.0. The different phylogenetic approaches agreed in recovering two well defined clades: one constituted by *Thylamys pallidior* that included specimens from the coast and the “pre-cordillera” of the Region I of Chile, and the other clade constituted by *Thylamys elegans* that included populations located south to the Atacama Desert. Therefore, we demonstrate that populations located in the canyons and andean areas of northern Chile belong to *T. pallidior*, while those located south to the Atacama desert are recognized as *T. elegans*, results that confirm the occurrence of two thylamyine species in Chile.

Key words: phylogeography, *Thylamys*, llacas, Chile, cytochrome b.

INTRODUCCIÓN

Los marsupiales tipo ratón o “mouse opossums” del género *Thylamys* (Didelphidae) se diferencian del resto de las comadrejas enanas sudamericanas por habitar biomas abiertos y secos (exceptuando *T. macrura*), y por presentar una serie de adaptaciones a este tipo de ambientes, tales como la capacidad de almacenar grasa en la cola (en las especies de ambientes más extremos), el pequeño tamaño de los pies y las garras en rela-

ción al cuerpo, los orificios nasales estrechos que no se prolongan hacia la sutura maxilo-frontal, un hueso timpánico más prominente, y una región interorbital más estrecha en comparación a otros miembros de la familia (Tate 1933, Creighton 1984).

Actualmente se reconocen seis especies dentro del género *Thylamys*, circunscritas cada una a un bioma más o menos característico en la región centro-sur de Sudamérica: *T. macrura* en Paraguay oriental, *T. velutinus* en la Caatinga y Cerra-

do de Brasil, *T. pusilla* en la región del Chaco, *T. venusta* en el sur de Bolivia y Monte argentino, *T. pallidior* en la región de la pre-cordillera y Puna andina, y *T. elegans* en la zona costera de Perú y Chile y valle central de este último país (Gardner 1993, Palma 1997). El género se considera hoy como un grupo monofilético -y no como un "complejo" de especies más dentro del género *Marmosa*, tal como lo proponía Tate (1933)- lo cual ha sido confirmado por una serie de estudios sistemáticos basados en análisis morfológicos, cromosómicos, alozímicos y por métodos de hibridación de ADN (Reig et al. 1985, Reig et al. 1987, Kirsh & Palma 1995, Palma & Yates 1998).

Dos especies de *Thylamys* se reconocen actualmente en Chile: *T. pallidior*, en el Altiplano Andino, y *Thylamys elegans*, en el desierto costero de Chile y Perú (Fig. 1, Palma 1995). La clasificación original de *Thylamys pallidior*, efectuada por Thomas (1902), proponía un rango de distribución para esta especie que se limitaba a la precordillera en la vertiente oriental de Los Andes, en el sur de Bolivia y el noroeste de Argentina. Sin embargo, Palma (1995), en un análisis basado en caracteres morfológicos, demostró que los especímenes de *Thylamys* de la Prepuna Andina chilena y de las quebradas en la costa de la Primera Región de Chile - adscritos tradicionalmente a *Thylamys elegans*- correspondían a *T. pallidior*. El reconocimiento de una misma especie entre las poblaciones del desierto costero de la Primera Región y aquellas de áreas andinas, se explicaría por la existencia de una serie de quebradas transversales, que mantienen una continuidad biogeográfica (vegetacional, con pequeños cursos de agua desde la cordillera), entre estas dos áreas (Sarmiento 1975, Romero 1986, Marquet 1989, Meserve & Kelt 1990). Respecto de *T. elegans*, Gardner (1993) reconoce la existencia de una sola especie distribuida a lo largo de la costa de Perú y Chile en un rango de distribución que comprendería la región que va desde los 10° S en Perú, hasta los 37° S (río Bío-Bío) en Chile, abarcando además los valles transversales hasta aproximadamente los 1.800 m de altura en la precordillera de este último país.

Los objetivos del presente trabajo fueron demostrar que las poblaciones de *Thylamys* de la quebradas transversales y de la prepuna de la Primera Región de Chile (tradicionalmente clasificados como *Thylamys elegans*) corresponderían a *Thylamys pallidior* tal como lo propuso Palma (1995) sobre la base de comparaciones morfológicas analizadas fenéticamente, y que consideró un número limitado de especímenes. Un segundo objetivo fue evaluar si las llacas ubicadas al sur del Desierto de Atacama (en el

valle central, la costa y la precordillera andina) pertenecerían o no a una misma especie, *T. elegans*, puesto que las poblaciones de este taxón habrían quedado aisladas geográficamente de las ubicadas al norte del desierto. Del mismo modo pretendemos evaluar el estatus taxonómico de las poblaciones de las zonas precordilleranas de la zona mediterránea de Chile (al sur de los 30° S). Nuestra hipótesis a priori -basada en los antecedentes aportados por Palma (1995)- era que todas las llacas al sur del desierto de Atacama corresponderían a *T. elegans*, mientras que aquellas ubicadas al norte del desierto, y particularmente en los valles transversales y la pre-cordillera del norte de Chile deberían reconocerse como *T. pallidior*. Para cumplir con los objetivos anteriores, secuenciamos y analizamos filogenéticamente el gen mitocondrial citocromo b en llacas chilenas representantes de diversas poblaciones localizadas en los rangos de distribución adscritos a cada una de ellas.

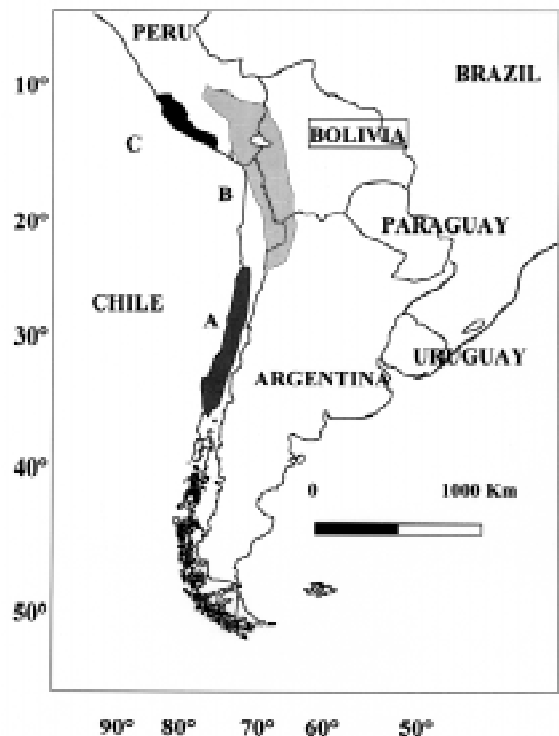


Fig. 1: Distribución aproximada de las especies de *Thylamys* en la región Andino-Pacífico Sur: (A) *T. elegans*, (B) *T. pallidior*, (C) *T. tatei* (sensu Sergio Solari, ver Discusión).

Approximate distribution of the *Thylamys* species in the Southern Andean-Pacific region: (A) *T. elegans*, (B) *T. pallidior*, (C) *T. tatei* (sensu Sergio Solari, see Discussion).

MATERIALES Y MÉTODOS

Especímenes analizados

Los especímenes de los cuales se extrajo ADN para la posterior amplificación y secuenciación del gen citocromo b, se detallan en la Tabla 1 y las referencias (“voucher specimens”) están depositadas en el Museo Nacional de Historia Natural, Perú (MUSM); Colección de Flora y Fauna Profesor Patricio Sánchez Reyes (SSUC); del catálogo de campo de Eduardo Palma (EP); y de la Colección de Tejidos Congelados del Museum of Southwestern Biology, The University of New Mexico, USA, bajo un número especial de colección, NK (New Mexico “kryovoucher”). Las secuencias del gen citocromo b para los siguientes especímenes han sido depositadas en el GenBank (números de acceso en paréntesis): *T. elegans* (Lima, Perú; AF434179), *T. elegans* (Fray Jorge, Chile; AF431929), *T. elegans* (Maipú, Chile; AF431925), *T. elegans* (Colina, Chile; AF434178), *T. elegans* (Minera Pelambres, Chile; AF434176), *T. elegans* (Salamanca, Chile; AF434177), *T. pallidior* (Arica, Chile; AF431923), *T. pallidior* (Tarija, Bolivia; AF431924), *T. pallidior* (Colchane, Chile; AF431930).

La extracción del ADN genómico de los especímenes de *Thylamys* fue realizada a partir de tejido congelado (principalmente hígado) basándose en la técnica propuesta por Longmire et al. (1988), o a partir de pieles donadas por museos

usando Chelex (Walsh et al. 1991). La amplificación del citocromo b a partir del ADN aislado, fue llevada a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR; Saiki et al. 1988), utilizando Taq ADN polimerasa (Gibco-BRL) y los partidores L14724 (Kocher et al. 1989), L15162 (Irwin et al. 1991) y H15767 (Edwards et al. 1991). Las letras con que se inician los nombres de los partidores (L ó H) indican si estos pertenecen a la hebra liviana (“light strand”) o a la hebra pesada (“heavy strand”) del ADN mitocondrial (ADNmt). Los números siguientes hacen referencia a la posición del extremo 3’ del oligonucleótido, de acuerdo a la secuencia del ADNmt de *Mus musculus* propuesta por Bibb et al. (1981). Los PCR de los especímenes de *Thylamys* se realizaron basándonos en el siguiente perfil térmico: denaturación a 94 °C (por 1 min 10 s), unión o “annealing” a 52 °C (45 s), y extensión a 72 °C (1 min 30 s), por 35 ciclos. En la etapa siguiente, los productos de PCR de doble hebra fueron purificados mediante los métodos de Wizard-PCR (Promega) y QIA-Quick (QiaGen). Los productos de PCR purificados fueron luego secuenciados por medio de secuenciación cíclica (Murray 1989), empleando los partidores L14724, L15162 y H15767, y marcando las bases nucleotídicas con los fluoróforos del “Big Dye Terminator” de Perkin Elmer. Las secuencias fueron analizadas en un secuenciador automático ABI Prism 310, y una vez obtenidas fueron alineadas por medio del programa Clustal W (Higgins et al. 1996).

TABLA 1

Especímenes analizados en este trabajo. Para ambas especies se indica la localidad y el número de museo/colección de procedencia

Specimens analyzed in this study. For both species we show the specific locality, and the museum/collection source

| Nombre científico | Localidad | Identificación | Fuente |
|---------------------------|---|---------------------|-------------------|
| <i>Thylamys elegans</i> | Chile, Coquimbo, Parque Nacional Fray Jorge* | NK 27583 | MSB ¹ |
| | Chile, Coquimbo, Choapa, Salamanca* | NK 95622 | MSB |
| | Chile, Coquimbo, Choapa, Minera Los Pelambres* | NK 96571 | MSB |
| | Chile, R. Metropolitana, Maipú, Quebrada de la Plata* | NK 95436 | MSB |
| | Chile, R. Metropolitana, Colina, Huechún* | NK 95963 | MSB |
| | Perú, Lima, Chancay, Reserva Nacional Lachay* | 10738 | MUSM ² |
| <i>Thylamys pallidior</i> | Bolivia, Tarija, Serranía Sama, 3.200 m* | NK 23533 | MSB |
| | Chile, Tarapacá, Iquique, Colchane, 3.900 m* | NK 96057 | MSB |
| | Chile, Tarapacá, Arica, Quebrada Camarones* | EP 440 ³ | SSUC ⁴ |

¹Museum of Southwestern Biology, The University of New Mexico, Albuquerque, New Mexico 87131

²Museo Nacional de Historia Natural de Lima, Perú

³Catálogo de terreno de R. Eduardo Palma

⁴Colección de Flora y Fauna Profesor Patricio Sánchez Reyes, P. Universidad Católica de Chile, Santiago, Chile

*Secuencias depositadas en el GenBank

Análisis filogenéticos

Un primer análisis de reconstrucción filogenética se llevó a cabo usando máxima-parsimonia disponible en el programa PAUP 4.0b8 (“Phylogenetic Analysis Using Parsimony”, implementado por David L. Swofford). Todos los caracteres fueron analizados asumiéndolos como no ordenados (“unordered”), con cuatro estados posibles (A, C, G, T), y excluyendo aquellos caracteres filogenéticamente no-informativos. La búsqueda del árbol más parsimonioso se realizó a través de la opción exhaustiva del PAUP. Los árboles fueron enraizados siguiendo el criterio de “grupos externos” (“outgroup”), usando como tales las secuencias de citocromo b disponibles en el GenBank de las comadrejas tipo ratón *Marmosa rubra* (número de acceso U34668) y *Micoureus demerarae* (U34674). Adicionalmente, para el análisis de parsimonia calculamos el índice de decaimiento de Bremer (Bremer 1988) obtenido a través del programa AutoDecay (Eriksson 1999). Un segundo tipo de análisis filogenético fue realizado a través del algoritmo “vecino más próximo” (“neighbor-joining”) luego de generar una matriz de distancias a partir de la opción “Kimurados-parámetros” disponible en PAUP 4.0b8. Finalmente, analizamos los datos a través del criterio de máxima-verosimilitud (“maximum-likelihood”) a través de una búsqueda heurística bajo el supuesto de variación de dos parámetros para frecuencias distintas de las secuencias nucleotídicas (modelo de Hasegahua-Kishino-Yano), igualmente disponible en PAUP. Los nodos de los respectivos árboles de parsimonia, “vecino más próximo” (distancia), y máxima-verosimilitud fueron evaluados a través de “bootstrap” (Felsenstein 1985), con 10.000 réplicas para parsimonia, y 1.000 para distancia y verosimilitud. Por último, obtuvimos las frecuencias de bases nucleotídicas, el número de transiciones y transversiones entre cada par de taxa, y la tasa de transición-transversión mediante el programa PAUP.

RESULTADOS

El análisis de máxima-parsimonia dio como resultado un único árbol más parsimonioso, de 386 pasos, con un índice de consistencia (CI) de 0,6684, un índice de homoplasia (HI) de 0,3316, y un índice de retención (RI) de 0,7111. De un total de 1.001 caracteres, 207 resultaron ser filogenéticamente informativos los que mayoritariamente correspondieron a la segunda mitad del gen. El árbol más parsimonioso (Fig. 2A)

mostró que *T. pallidior* y *T. elegans* constituyen taxa hermanos con valores de “bootstrap” de 100 %. De los 207 caracteres diagnósticos incluidos en este análisis, 31 caracteres constituyeron sinapomorfías que diferenciaron al clado de *T. pallidior*, mientras que 26 sitios constituyeron sinapomorfías para el clado de *T. elegans* (lista de apomorfías no mostrada, pero disponibles a quien lo solicite). Dentro de *T. pallidior* ambas poblaciones de la pre-cordillera representadas por las muestras de Bolivia (Tarija) y Chile (Colchane) están más relacionadas entre sí que cada una de ellas con los representantes de la Quebrada de Camarones (Arica) de la costa de la Primera Región, con valores de “bootstrap” para ambos nodos de un 100 %, y un índice de Bremer de 24 y 16 (Fig. 2A). Por otro lado, *T. elegans* exhibe dos clados hermanos, uno representado por las poblaciones pre-cordilleranas de Pelambres y Salamanca situadas al sur del Desierto de Atacama (Región de Coquimbo), y el otro por las poblaciones costeras y del valle central de Chile tales como Fray Jorge, Maipú y Colina. Ambos clados de la pre-cordillera y del valle central-costa mostraron un valor de “bootstrap” de 100 %, y un valor de Bremer de 14. El árbol de distancia (Fig. 2B) obtenido mediante el algoritmo “vecino más próximo” fue similar al obtenido a través de máxima-parsimonia tanto en la topología como en los valores de “bootstrap”.

La tasa de transición-transversión entre todos los taxa de *Thylamys*, incluyendo los grupos externos *Micoureus* y *Marmosa*, fue de 2,99, siendo las transiciones del tipo TC las más frecuentes. Al interior de *Thylamys*, la divergencia en las secuencias nucleotídicas entre las poblaciones de la Puna y de las quebradas de la Primera Región fueron menores a un 10 %, al igual que la divergencia en las secuencias de las poblaciones de *Thylamys* localizadas al sur del Desierto de Atacama (valores promedios representados en la Fig. 2B). La divergencia entre los dos especímenes de *T. pallidior* de la pre-cordillera (Tp Bolivia y Tp Colchane) fue de 1,03 %, en tanto que *T. pallidior* de la costa de Arica (Quebrada de Camarones) mostró una divergencia promedio de 6,35 % con respecto a las dos poblaciones anteriores (Fig. 2B).

Los mayores valores de distancia en la divergencia de las secuencias para las poblaciones de *T. elegans* ubicadas al sur del Desierto de Atacama, se registraron entre las poblaciones de la pre-cordillera de la Cuarta Región (Te Pelambres y Te Salamanca) y las del valle central y la cordillera de La Costa (Fray Jorge, Maipú y Colina) con un promedio de 8,64 % (Fig. 2B). Por otro lado, los menores valores de divergencias en las secuen-

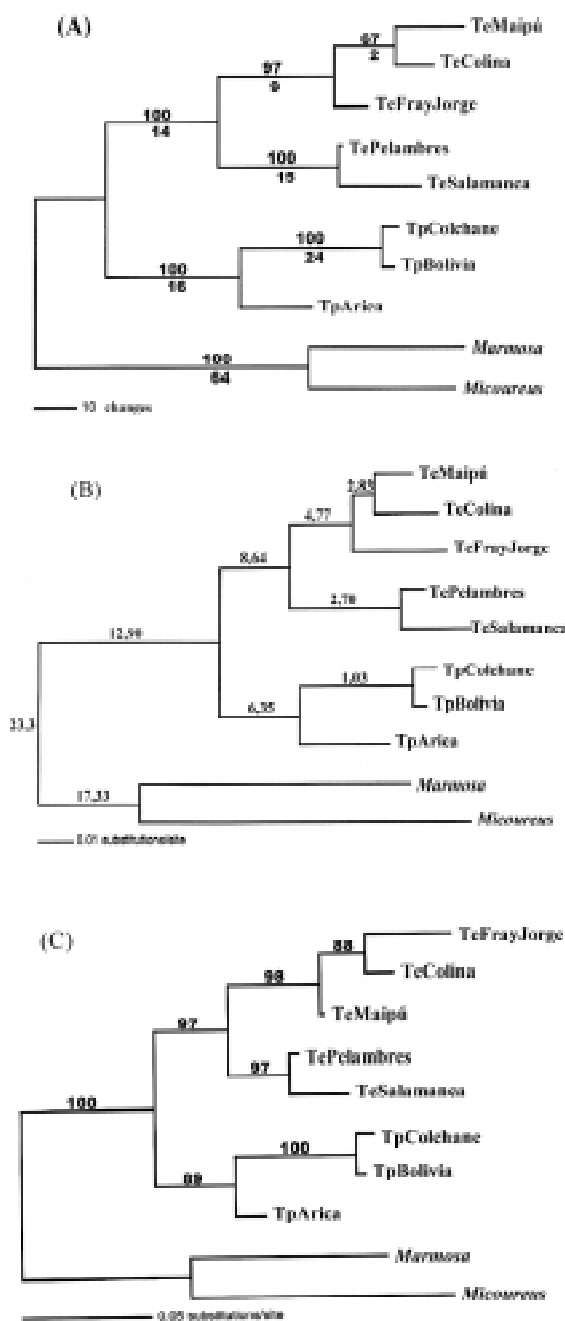


Fig. 2: (A) Árbol de máxima-parsimonia obtenido a través de una búsqueda exhaustiva. Los valores de 10.000 réplicas del “bootstrap” están representados sobre las ramas, mientras que bajo las ramas se presenta el índice de Bremer. (B) Árbol generado a través del análisis del “vecino más próximo” obtenido a partir de la matriz de distancia Kimura-2-parámetros (K2P). Los valores sobre las ramas representan los porcentajes de distancia (obtenidos de la matriz K2P) entre las poblaciones y taxa analizados. (C) Árbol de máxima verosimilitud obtenido a través del modelo de evolución de Hasegawa-Kishino-Yano. Los valores sobre los nodos representan 1.000 réplicas en el “bootstrap”; (Te) *Thylamys elegans*, (Tp) *Thylamys pallidior*.

(A) Maximum-parsimony tree obtained through an exhaustive search. The numbers above the branches represent 10,000 bootstrap replicate values, while those below the branches represent the Bremer index. (B) Neighbor-joining tree obtained from a Kimura-2-parameter distance matrix. (C) Maximum-likelihood tree obtained through the Hasegawa-Kishino-Yano model. Values on the nodes represent 1,000 bootstrap replicates; (Te) *Thylamys elegans*, (Tp) *Thylamys pallidior*.

cias dentro de *T. elegans* estuvieron dados por aquellas poblaciones pertenecientes a los alrededores de la Región Metropolitana (TeColina y TeMaipú, con un 2,83 %), comparable a los valores de las poblaciones que habitan la pre-cordillera (TePelambres y TeSalamanca, con un 2,7 %). La población del Parque Nacional Fray Jorge de la costa de la Cuarta Región, presentó una divergencia promedio respecto de las de la Región Metropolitana de un 4,77 %. Finalmente, la diferencia promedio en las secuencias entre *T. elegans* y *T. pallidior* fue de 12,90 % (Fig. 2B).

La reconstrucción obtenida a través de máxima-verosimilitud generó un único árbol (- Ln likelihood = 3732,99415) similar a aquellos obtenidos a través de parsimonia y distancia, con valores de "bootstrap" que fluctuaron entre 88 y 100 % (Fig. 2C). Sin embargo, esta reconstrucción colocó a *T. elegans* de Fray Jorge junto a una de las llacas del valle central de Chile (Te Colina) y no como una población separada como ocurrió en los árboles generados con los otros dos algoritmos (Fig. 2C).

DISCUSIÓN

En *T. pallidior* los análisis filogenéticos generados a través de los diferentes algoritmos demostraron que las poblaciones de la pre-cordillera andina están estrechamente relacionadas, lo cual nos permitiría hipotetizar la ocurrencia de un alto flujo génico que mantendría la cohesión de las poblaciones andinas y que mantiene una escasa diferenciación de las poblaciones. Esto queda demostrado por el bajo valor de secuencia de divergencias (1 %) entre los representantes de Bolivia (Tarija) y Colchane, y el reducido largo de ramas obtenido principalmente en los árboles de "vecino más próximo" y de máxima-parsimonia que representan a ambas poblaciones. Esta fuerte cohesión de las poblaciones andinas contrasta con los valores de distancia entre estas últimas y la población costera de Quebrada de Camarones en la Primera Región, que mostró un valor de aproximadamente 6,5 %. Esta diferencia en los valores de divergencia puede ser explicada por el rango altitudinal que separa ambos ambientes, el cual oscila en alrededor de 3.000 m, de lo cual se puede inferir que las poblaciones de baja altura y de la prepuna exhiben un cierto grado de divergencia por distancia. Sin embargo, y a pesar del alto valor de divergencia entre las poblaciones de *T. pallidior* en el gradiente altitudinal, éste es significativamente menor que el que existe entre el clado que conforma esta especie y el de *T. elegans*. Lo anterior nos permite entonces ratifi-

car que las poblaciones de la costa y la precordillera andina del norte de Chile corresponden o constituyen un clado que reconocemos como *T. pallidior*, tal como fue previamente sugerido por Palma (1995). Este último estudio consideró algunas características corporales y craneanas, las cuales fueron analizadas fenéticamente, resultados que permitieron concluir que los especímenes de las quebradas corresponderían a *T. pallidior*.

El clado que representa las poblaciones de *T. elegans* exhibió un patrón de diferenciación similar al de *T. pallidior*, pues claramente las poblaciones de altura se diferenciaron con las del valle central y costa al sur de los 30° S (Te Pelambres y Te Salamanca). Es decir, todas las topologías mostraron la separación de los representantes de la precordillera con aquellos del valle central y la costa. Para las afinidades de las poblaciones de *T. elegans*, preferimos las topologías obtenidas a través de los análisis de distancia y parsimonia por sobre el de máxima-verosimilitud debido a que en los primeros la posición de *Thylamys elegans* de Fray Jorge aparece diferenciada respecto de los especímenes del valle central representados por las poblaciones de Colina y Maipú. De hecho las poblaciones que representan estas últimas localidades están geográficamente más próximas entre sí que cualquiera de ellas con las del Parque Nacional Fray Jorge en la Cuarta Región de Chile (separados por aproximadamente 400 km).

Consideraciones biogeográficas

De acuerdo a un estudio filogenético-molecular que incluye gran parte de las llacas sudamericanas, el ancestro común de *T. pallidior* y *T. elegans* sería *T. venusta*, la cual habita el "Monte Espinoso" en la vertiente oriental de los Andes, en el sureste boliviano y el norte de Argentina (E. Palma, E. Rivera-Milla, T.L. Yates, P.A. Marquet & A.P. Meynard resultados no publicados). En este último estudio se propone que aislados periféricos de *T. venusta* se habrían dispersado a través de la Cordillera de los Andes, especiando en *T. pallidior*. La diferenciación de este último taxón habría ocurrido durante el Plio-Pleistoceno, durante el gran levantamiento de los Andes, cuando se comienzan a generar elevaciones similares a las actuales quedando poblaciones aisladas de la llaca andina en altura (Potts & Behrensmeier 1992). Esto habría gatillado la diferenciación de este taxon en la Prepuna. Postulamos además que, en eventos adicionales de dispersión hacia el oeste, aislados periféricos de *T. pallidior* habrían igualmente alcanzado las tierras bajas y la costa

del sur de Perú y norte de Chile, para posteriormente migrar hacia el sur y el norte, dando origen a *Thylamys elegans* tal como se reconoce hoy en el borde costero chileno y valle central de Chile. Respecto de la ocurrencia de *T. elegans* hasta los aproximadamente 10° S en la costa peruana, Handley (1956) reconoció esta forma como *T. tatei*. Sin embargo, Gardner (1993) adscribe estas poblaciones a *T. elegans*.

Un estudio morfológico en curso que está comparando poblaciones de *T. elegans* tanto de la costa peruana, *T. elegans* de Chile, *T. pallidior* (así como otras llacas sudamericanas), permite diferenciar las formas de Perú como un taxon diferente a *T. elegans*, revalidando así *T. tatei* (S. Solari comunicación personal). Sin embargo, al secuenciar el gen citocromo b de un único individuo de la zona de Lima, Perú, éste tuvo una posición filogeográfica incierta, pues en algunas topologías apareció incluida como perteneciente a *T. pallidior*, y en otras dentro de *T. elegans* con valores de "bootstrap" por debajo del 50 %. Consideramos que el estatus taxonómico de la forma peruana, al menos a nivel molecular, deberá ser evaluado incluyendo representantes de varias poblaciones dentro del rango de distribución adscrito para este taxon (ver Fig. 1, para la distribución de *Thylamys* de la Región andino-pacífico).

La presencia de *T. pallidior* en la vertiente occidental de Los Andes y las tierras bajas de la Primera Región de Chile sería explicable por la ocurrencia de un hábitat favorable facilitado por la existencia de valles profundos con vegetación (quebradas) que atraviesan la depresión árida del desierto del norte chileno y el sur peruano (Sarmiento 1975, Villagrán et al. 1983). Ello facilitaría la ocurrencia de formas conespecíficas, tales como micromamíferos, a través de áreas costeras, quebradas y pre-cordillera (Marquet 1989, Meserve & Kelt 1990, Marquet 1994, Moreno et al. 1994).

La dispersión de aislados periféricos de *Thylamys* desde el norte hacia latitudes mayores en Chile habría ocurrido probablemente a lo largo del flanco oeste de Los Andes en una estrecha área con vegetación entre los 23 y 24° S, especialmente durante el Pleistoceno, en que se formaron allí lagos de alto nivel de aguas (en los lugares en donde se ubican actualmente los grandes salares del Desierto de Atacama y de la precordillera de Los Andes en esas latitudes; Moreno et al. 1994). Durante los episodios de glaciación del Cuaternario (Rabassa & Clapperton 1990), habría existido este corredor (de altura) del desierto hacia el sur, el que habría coincidido con el límite oeste de los salares actuales entre los 18 y 29° S. Desde ahí la migración de la vegetación y los animales del Cuaternario

pudo haber continuado por los valles transversales de la Cuarta Región de Chile, que conectan los Andes con las tierras bajas (Moreno et al. 1994). El escenario biogeográfico postulado por estos últimos autores concuerda con las agrupaciones filogenéticas de poblaciones del clado de llacas chilenas (Fig. 2A) y con la ubicación geográfica actual de éstas. En el árbol de máxima-parsimonia, los especímenes de la precordillera andina alrededor de los 31° S (Te Pelambres y Te Salamanca) corresponderían a poblaciones locales que quedaron relegadas en dichas latitudes en el proceso de migración hacia el sur por el corredor del desierto existente durante las glaciaciones del Pleistoceno. Por otro lado, las poblaciones restringidas al valle central y a la Cordillera de La Costa se habrían desplazado a través de los valles transversales alcanzando latitudes como las de la Cuarta Región (Te Fray Jorge), así como también a través de la región mediterránea de Chile o Chile central (Te Colina y Te Maipú).

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido parte del Seminario de Investigación (BIO 296) del Programa de Licenciatura en Biología (Facultad de Ciencias Biológicas, P. Universidad Católica de Chile) de APM. Los autores agradecen los comentarios de Marco A. Méndez y Fernando Torres-Pérez en una versión previa del manuscrito. Asimismo, agradecemos al Museum of Southwestern Biology, University of New Mexico, la Colección de Flora y Fauna Profesor Patricio Sánchez Reyes, y al Museo Nacional de Historia Natural de Lima (Perú) por el préstamo de especímenes. Agradecemos también al Servicio Agrícola y Ganadero (SAG) y a la Corporación Nacional Forestal (CONAF) por autorizarnos el transporte y captura de muestras en áreas protegidas de Chile. Finalmente, agradecemos el apoyo económico de los proyectos FONDECYT 1990156 y NIH-ICIDR 1 U19 AI45452-01 (USA).

LITERATURA CITADA

- BIBB MJ, RA VANETTEN, CT WRIGHT & MW WALBERG (1981) Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell* 26: 167-180.
- BREMER K (1988) The limits of the amino-acid sequence data in angiosperm phylogenetic reconstruction. *Evolution* 42: 795-803.
- CREIGHTON GK (1984) Systematic studies on opossums (Didelphidae) and rodents (Cricetidae). Unpublished Ph.D. Dissertation, University of Michigan, Ann Arbor, Michigan. 220 pp.

- EDWARDS SV, P ARCTANDER & AC WILSON (1991) Mitochondrial resolution of a deep branch in the genealogical tree for perching birds. *Proceedings of the Royal Society of London B* 243: 99-107.
- ERIKSSON T (1999) AutoDecay ver 4.0 (programa distribuido por el autor). Bergius foundation. Royal Swedish Academy of Sciences, Stockholm, Sweden.
- FELSENSTEIN J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- GARDNER AL (1993) Order Didelphimorphia. En: Wilson DE & DM Reeder (eds) *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference*: 15-23. Smithsonian Institution Press, Washington, District of Columbia.
- HANDLEY CO (1956) A new species of murine opossum (genus *Marmosa*) from Peru. *Journal of the Washington Academy of Sciences* 46: 402-404.
- HIGGINS DG, JD THOMPSON & TJ GIBSON (1996) Using CLUSTALW for multiple sequence alignment. *Methods in Enzimology* 266: 383-402.
- IRWIN DM, TD KOCHER & AC WILSON (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *Journal of Molecular Evolution* 32: 128-144.
- KIRSCH JAW & RE PALMA (1995) DNA/DNA hybridization studies of carnivorous marsupials. V. A further estimate of relationships among opossums (Marsupialia: Didelphidae). *Mammalia* 59: 403-425.
- KOCHER TD, WK THOMAS, A MEYER, SV EDWARDS, S PAABO, FX VILLABLANCA & AC WILSON (1989) Dynamics of mitochondrial DNA evolution in mammals: amplification and sequencing with conserved primers. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 86: 6196-6200.
- LONGMIRE JL, AK LEWIS, NC BROWN, JM BUCKINGHAM, LC CLARK, MD JONES, LJ MEINCKE, J MEYNE, RL RATLEEF, FA RAY, RP WAGNER & RK MOYZIS (1988) Isolation and molecular characterization of a highly polymorphic centromeric tandem repeat in the family Falconidae. *Genomics* 2: 14-24.
- MARQUET PA (1989) Paleobiogeography of South American cricetid rodents: a critique to Caviedes & Iriarte. *Revista Chilena de Historia Natural* 62: 193-197.
- MARQUET PA (1994) Diversity of small mammals in the Pacific coastal desert of Peru and Chile and in the adjacent Andean area: biogeography and community structure. *Australian Journal of Zoology* 42: 527-542.
- MESERVE PL & DA KELT (1990) The role of aridity and isolation in central Chilean small mammal: a reply to Caviedes & Iriarte. *Journal of Biogeography* 17: 681-684.
- MORENO PI, C VILLAGRÁN, PA MARQUET & LG MARSHALL (1994) Quaternary paleobiogeography of northern and central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 487-502.
- MURRAY V (1989) Improved double stranded DNA sequencing using the linear polymerase chain reaction. *Nucleic Acid Research* 17: 8889.
- PALMA RE (1995) Range expansion of two South American mouse opossums *Thylamys*, Didelphidae and their biogeographic implications. *Revista Chilena de Historia Natural* 68: 515-522.
- PALMA RE (1997) *Thylamys elegans*. American Society of Mammalogists, *Mammalian Species* 572: 1-4.
- PALMA RE & TL YATES (1998) Phylogeny of southern South American mouse opossums (*Thylamys*, Didelphidae) based on allozyme and chromosomal data. *Zeitschrift für Säugetierkunde* 63: 1-15.
- POTTS R & AK BEHRENSMEYER (1992) Late Cenozoic terrestrial ecosystems. En: Behrensmeyer AK, JD Damuth, WA DiMichelle, R Potts, HD Sues & SL Wing (eds) *Terrestrial ecosystems through time: evolutionary paleoecology of terrestrial plants and animals*: 419-541. University of Chicago Press, Chicago, Illinois.
- RABASSA J & CM CLAPPERTON (1990) Quaternary glaciations of the southern Andes. *Quaternary Science Reviews* 9: 153-174.
- REIG OA, JAW KIRSCH & LG MARSHALL (1985) New conclusions on the relationships of the opossum-like marsupials with an annotated classification of the Didelphimorphia. *Ameghiniana* 21: 335-343.
- REIG OA, JAW KIRSCH & LG MARSHALL (1987) Systematic relationships of the living and Neocenozoic American "opossum-like" marsupials (Suborder Didelphimorphia), with comments on the classification of these and of the Cretaceous and Paleogene New World and European metatherians. En: Archer M (ed) *Possums and opossums: studies in evolution*: 1-89. Royal Zoological Society, North South Wales, Sydney, Australia.
- ROMERO EJ (1986) Paleogene phytogeography and climatology of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 73: 449-461.
- SAIKI RK, GELFAND, S STOFFEL, SJ SCHARF, R HIGUCHI, GT HORN, KB MULLIS & HA ERLICH (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SARMIENTO G (1975) The dry plant formations of South America and their floristic connections. *Journal of Biogeography* 2: 233-251.
- TATE GH (1933) Systematic revision of the marsupial genus *Marmosa*, with a discussion of the adaptive radiation of the murine opossums (*Marmosa*). *Bulletin of the American Museum of Natural History* 66: 1-250.
- VILLAGRÁN C, MT KALIN-ARROYO & C MARTICORENA (1983) Efectos de la desertización en la distribución de la flora andina de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 56: 137-157.
- WALSH PS, DA METZGER & R HIGUCHI (1991) Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material. *BioTechniques* 10: 506-513.