



UCSC



**Magíster en
Ecología Marina UCSC**
Universidad Católica de la Santísima Concepción

FACULTAD DE CIENCIAS

**ANÁLISIS DEL PATRÓN ESPACIAL DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN
METACERCARIAS DE *Tylodelphys* sp. (DIESING, 1850) (PLATYHELMINTHES:
DIGENEA) OBTENIDAS DE *Galaxias maculatus* (JENYNS, 1842) (PISCES:
GALAXIIDAE) EN SISTEMAS ACUÁTICOS CONTINENTALES DEL CENTRO-SUR DE
CHILE**

Por

FRANCO ENZO ERAZO AGUILERA

Tesis

MAGÍSTER EN ECOLOGÍA MARINA

Director de Tesis: KONRAD GÓRSKI

Co-Director de Tesis: ANTONIO BRANTE RAMÍREZ & MARIO GEORGE-NASCIMENTO

FAILLA

Concepción, Chile

2024



Universidad Católica de la Santísima Concepción

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

En Concepción de Chile, a 27 de JUNIO de 2024 , vista y revisados los requisitos de Título/Grado presentados por:

Don **FRANCO ENZO ERAZO AGUILERA**

RUT 19153872-2

Alumno de la Carrera de **MAGISTER EN ECOLOGIA MARINA**

Sede **CONCEPCIÓN** Jornada **DIURNO**

De la Universidad Católica de la Santísima Concepción, la Comisión Examinadora ha otorgado las siguientes calificaciones:

"ANÁLISIS DEL PATRÓN ESPACIAL DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN METACERCARIAS DE TYLODELPHYS SP. (DIESING, 1850) (PLATYHELMINTHES: DIGENEA) OBTENIDAS DE GALAXIAS MACULATUS (JENYNS, 1842) (PISCES: GALAXIIDAE) EN SISTEMAS ACUÁTICOS CONTINENTALES DEL CENTRO-SUR DE CHILE"

Nombre	Calificación
SARA RODRIGUEZ SAN MARTIN MIEMBRO INTERNO COMISIÓN DE TESIS	5,50 (CINCO , CINCUENTA)
MELISSA REBOLLEDO SANTIBAÑEZ MIEMBRO EXTERNO COMISIÓN DE TESIS	5,50 (CINCO , CINCUENTA)
KONRAD GÓRSKI BIELECKI DIRECTOR DE TESIS	
ANTONIO BRANTE RAMIREZ CO-DIRECTOR DE TESIS	
SERGIO CONTRERAS QUINTANA MINISTRO DE FE	
CALIFICACION FINAL DE EXAMEN	5,50 (CINCO , CINCUENTA)


SECRETARIO ACADÉMICO


DECANO

TABLA DE CONTENIDOS

Introducción.....	1
Hipótesis.....	9
Objetivos.....	10
Métodos.....	11
Resultados.....	16
Discusión.....	30
Conclusión.....	43
Referencias bibliográficas.....	44
Anexo 1 [Árbol de inferencia bayesiana para el gen COI].....	56
Anexo 2 [Árbol filogenético de Neighbour Joining para el gen 28S].....	57
Anexo 3 [Árbol filogenético de Maximum Likelihood para el gen 28S].....	58
Anexo 4 [Análisis dbMEM para especie Z, ajustada por clones].....	59
Anexo 5 [Árbol filogenético bayesiano para el gen 28S].....	60
Anexo 6 [Resultados análisis genéticos poblacionales (COI) bajo enfoque riguroso].....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localización de los sitios de muestreo.....	11
Tabla 2. Tamaños de muestra y Estadísticos genéticos poblacionales asociados al gen COI	22
Tabla 3. Tamaños de muestra y Estadísticos genéticos poblacionales asociados al gen 28S	23
Tabla 4. Estadísticos AMOVA para la especie putativa <i>Tylodelphys</i> sp. W, gen COI.....	23
Tabla 5. Estadísticos AMOVA para la especie putativa <i>Tylodelphys</i> sp. Z, gen COI.....	24
Tabla 6. Estadísticos AMOVA para la especie putativa <i>Tylodelphys</i> sp. W, gen 28S.....	25
Tabla 7. Estadísticos AMOVA para la especie putativa <i>Tylodelphys</i> sp. Z, gen 28S.....	25

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema del ciclo de vida para Diplostomidae.....	3
Figura 2. Área de estudio.....	12
Figura 3. Resultado de análisis ABGD para el gen COI.....	17
Figura 4. Red de haplotipos para el gen 28S	19
Figura 5. Red de haplotipos para el gen COI.....	20
Figura 6. Diferenciación genética pareada entre sitios (F_{ST}) para gen COI.....	26
Figura 7. Diferenciación genética pareada entre sitios (F_{ST}) para gen 28S.....	27
Figura 8. Resultado de análisis dbMEM, especie W.....	29

RESUMEN

La genética poblacional en parásitos es un elemento que permite inferir las dinámicas de reproducción, infección y propagación que presentan a nivel ecológico, aunque por lo general no ha sido caracterizada acabadamente para la gran mayoría de especies, particularmente en regiones del sur global. Un taxón de parásitos común en la fauna dulceacuícola mundial son los digeneos: tremátodos parásitos-obligados que completan su desarrollo a través de múltiples organismos hospederos, es decir, con ciclos de vida indirectos. Se ha descrito que estos constituyen componentes que ejercen influencia sobre las comunidades acuáticas en las que co-habitan, como, por ejemplo, aumentando en algunos casos la vulnerabilidad de sus hospederos a la depredación. En el presente trabajo, me propuse caracterizar genéticamente las poblaciones para un género representativo de dicho taxón, *Tylodelphys* sp., que utiliza al pez nativo *Galaxias maculatus* como segundo hospedero intermediario. El objetivo principal fue evaluar la presencia (o ausencia) de estructuración genética para este taxón a través de distintas cuencas del centro sur de Chile. Para lograr tal objetivo, se secuenciaron los genes COI y 28S (mitocondrial y nuclear, respectivamente) en larvas metacercarias del género *Tylodelphys* muestreadas desde 16 sitios asociados a 6 distintas cuencas hidrográficas ubicadas entre las Regiones de La Araucanía y de Los Lagos. A partir de las tasas de diferenciación genética se infirieron un total de 2 especies presentes en el área de estudio. Posteriormente, se estimaron parámetros genéticos poblacionales tradicionales y se evaluó la estructura genética espacial para cada especie putativa detectada. Los resultados arrojaron diferencias significativas entre los patrones genéticos poblacionales para ambas especies putativas, observándose estructuración genética espacial solamente para una de éstas. Finalmente, se plantean posibles procesos ecológicos que explicarían los distintos patrones genéticos poblacionales observados para ambas especies putativas detectadas.

Palabras claves: digenea, genética, huésped, intermediario, parasitismo, peces de agua dulce, sistemas acuáticos continentales.

Introducción

Se ha descrito en el continente americano un desconocimiento generalizado de la genética poblacional para muchos parásitos de organismos de agua dulce e incluso, en muchos casos, de aspectos básicos de su biología y ecología (Scholz & Choudhury 2014, Choudhury *et al.* 2016). Lo anterior limita los estudios de procesos ecológicos comunitarios, ya que los parásitos son componentes importantes de las tramas tróficas en los ecosistemas acuáticos (Poulin 2014, Fischhoff *et al.* 2020). Su estudio es además relevante por el potencial de éstos de constituir bioindicadores de: condiciones ambientales, sub-poblaciones de sus especies hospederas, interacciones tróficas existentes a nivel comunitario, entre otras; a partir de la caracterización de su diversidad de especies y abundancia en los ecosistemas (Hudson *et al.* 2006, Valtonen *et al.* 2010, Catalano *et al.* 2014, Matiucci *et al.* 2014, Sures *et al.* 2017). Además, los parásitos pueden constituir objetivos de conservación biológica por su alta susceptibilidad a procesos de extinción, dada por la dependencia que poseen de sus hospederos (Gómez & Nichols 2013, Kwak *et al.* 2020).

Un grupo diverso y representativo a nivel mundial corresponde al clado de los Digeneos, subclase de la clase Trematoda del filo Platyhelminthes, el que a su vez contiene a la familia Diplostomidae. En esta última se agrupan endoparásitos obligados de organismos acuáticos, es decir, parásitos que han evolucionado para desarrollarse principalmente dentro del cuerpo de sus hospederos. Estos se caracterizan por poseer ciclos de vida indirectos, requiriendo utilizar a una o varias especies como hospederos (intermediarios y definitivos) para completar su desarrollo, empleando para ello múltiples mecanismos de transmisión y estrategias reproductivas (Niewiadomska & Pojmanska 2011, Criscione *et al.* 2022). El hecho de que este grupo de parásitos utiliza como hábitat las cavidades internas de una serie de organismos que abarcan a distintos taxones les confiere un alto potencial de dispersión y de uso de hábitats (Blasco-Costa & Poulin 2013). Dicho grupo también potencialmente aporta conectividad ecológica a la topología de las tramas tróficas en que están presentes (*sensu* Abarca-Arenas *et al.* 2022; Poulin *et al.* 2013), dado que pueden incrementar la vulnerabilidad de sus hospederos a la depredación (al tiempo que disminuyen su efectividad como depredadores), por el alojamiento de los parásitos digeneos en tejidos claves para la capacidad motriz o perceptiva (Hatcher *et al.* 2006, Muñoz *et al.* 2017) y por desarrollar, en algunos casos, mecanismos de manipulación activa del comportamiento de sus hospederos (Poulin 2010, Niewiadomska & Pojmanska 2011).

La distribución espacial de los parásitos depende directamente del desplazamiento que les otorgan sus distintos hospederos (Poulin *et al.* 2011). A pesar de esto, no es posible inferir aspectos poblacionales de los parásitos (*e.g.* distribución espacial o diversidad genética) meramente caracterizando a sus respectivas comunidades de hospederos, ya que las interacciones que establecen con ellas están mediadas por complejos factores que involucran a: (1) la inmunidad biológica de los individuos hospederos, así como sus procesos ecológicos inherentes (tales como su movilidad y rangos de hábitat) (Blasco-Costa & Poulin 2013), (2) la adaptabilidad diferencial entre especies de parásitos a distintos taxones de hospederos (Johnson *et al.* 2009, Leggett *et al.* 2013), (3) ciclos temporales (*e.g.* circadianos o estacionales) que inciden sobre procesos metabólicos tanto de los parásitos como de sus hospederos (Martínez-Bakker & Helm 2015), (4) factores ambientales que modulan la capacidad infectiva y la supervivencia de los parásitos en sus estadios de vida libre (Pietroock & Marcogliese 2003), y (5) procesos de coevolución entre parásitos y hospederos, esto es, de especiación concomitante entre linajes (o subpoblaciones) de ambos tipos de organismos, operando como carreras armamentistas evolutivas (Desdevises 2007). El sometimiento continuo a tales procesos ecológicos ha promovido una alta capacidad de especiación en muchos representantes del clado Digenea (y en parásitos en general: Huyse *et al.* 2005), a lo que se complementa el hecho de que habrían sido comunes los cambios de hospederos a escalas evolutivas, de acuerdo a lo evidenciado por diversos autores (Gibson & Bray 1994, Locke *et al.* 2015, Martens 2023). Por tanto, estos parásitos constituyen interesantes objetos de estudio para la ecología de sistemas acuáticos, en cuanto a evaluar su taxonomía, evolución, su abundancia relativa en distintos hospederos locales, así como su capacidad de promover interacciones ecológicas.

Un taxón del clado Digenea es el género *Tylodelphys* (Diesing, 1850; Digenea: Diplostomidae): parásitos principalmente de organismos de sistemas acuáticos continentales, de los cuales existen al menos 29 especies descritas (Niewiadomska 2002, Blasco-Costa *et al.* 2016). Las especies del género *Tylodelphys* generalmente requieren, para su desarrollo, infectar a dos especies distintas de hospederos intermediarios antes de alcanzar su capacidad reproductiva en un hospedero definitivo (Figura 1) (Rauch *et al.* 2005, Blasco-Costa & Poulin 2013). Como primeros hospederos intermediarios utilizan a gastrópodos de agua dulce, desde los cuales se reproducen asexualmente, liberando larvas cercarias clonales al ambiente que infectan al siguiente hospedero (Cribb *et al.* 2001). Entre sus segundos hospederos intermediarios figuran crustáceos, anfibios y peces, en los que, como larva metacercaria, pueden albergarse en distintas cavidades internas

(retina, cavidad craneal, pericardiaca, visceral, etc.) (Drago & Lunaschi 2008). Cabe destacar que en dicha fase de su desarrollo suelen ser generalistas en cuanto a las especies de hospederos intermediarios en que se pueden alojar (*i.e.* abarcan un amplio rango de hospederos) (Achatz *et al.* 2022). De estos últimos pasan a sus hospederos definitivos mediante transmisión trófica. Como hospederos definitivos se han descrito aves piscívoras de los órdenes falconiformes, ciconiiformes, pelecaniformes, podicipediformes, anseriformes, gaviiformes y strigiformes (Niewiadomska 2002, Drago & Lunaschi 2008), y mamíferos (Achatz *et al.* 2022).

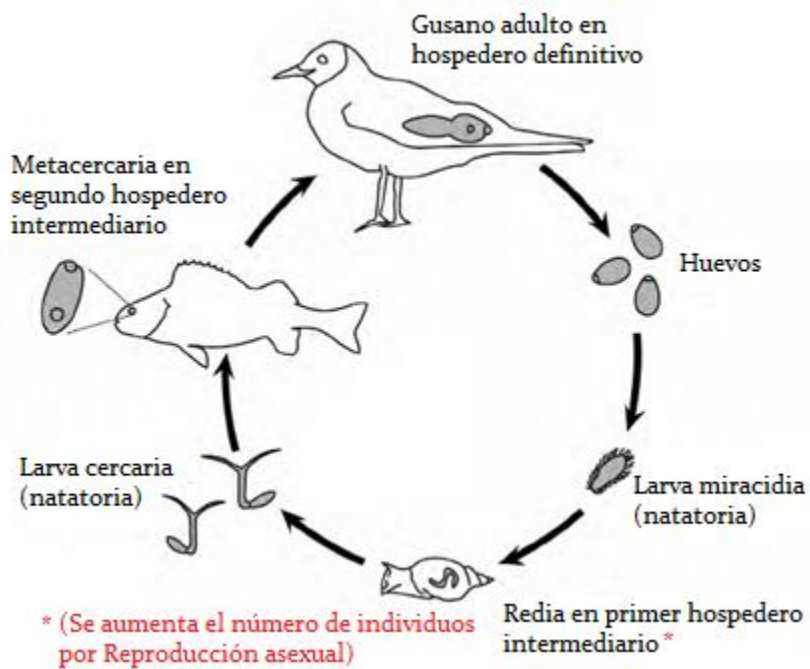


Figura 1. Esquema del ciclo de vida para Diplostomidae. (Figura modificada de Behrmann-Godel & Brinker 2016).

El estudio taxonómico de *Tylodelphys* spp. y de otros digeneos ha sido desarrollado principalmente a través de enfoques morfológicos, que involucran la observación y medición de caracteres morfológicos observables para el discernimiento taxonómico (*e.g.* Niewiadomska 2002). Sin embargo, el hecho de que presenten plasticidad fenotípica (esto es, la presencia de morfologías diversas en individuos de una misma especie, dadas por procesos adaptativos a nivel local) dificulta el uso de tal método (Pérez-Ponce de León 1995, Otachi *et al.* 2015). Lo anterior sumado a su ciclo de vida indirecto, así como al hecho que existan diferencias morfológicas poco acentuadas entre

especies para determinados estadios de vida hacen que la efectividad de este método se vea comprometida (Flores & Baccalá 1998, Faltýnková *et al.* 2016). En este contexto, técnicas moleculares se han descrito como apropiadas para complementar el enfoque morfológico de identificación taxonómica, siendo cada vez más utilizadas en los organismos parásitos (Perkins *et al.* 2011, Froeschke & Heyden 2014, Selbach *et al.* 2019). Las mismas han servido además para complementar la información existente para las especies del género *Tylodelphys*, permitiendo, por ejemplo, identificar relaciones filogenéticas (Locke *et al.* 2015, Soldánová *et al.* 2017), complementar la descripción de especies (Blasco-Costa *et al.* 2016, Heneberg & Sitko 2021), discernir especies a través de sus distintos estadios de desarrollo (Chibwana *et al.* 2015, García-Varela *et al.* 2016), así como caracterizar los procesos de su divergencia e historia evolutiva (Achatz *et al.* 2022). A este respecto, se ha descrito que los parásitos del género *Tylodelphys* presentan, por lo general, una alta diversidad genética espacial a través de los ecosistemas que habitan (*e.g.* Choudhury *et al.* 2016, Soldánová *et al.* 2017, Duan *et al.* 2021).

Múltiples factores bióticos y abióticos influyen en los patrones espaciales de la genética poblacional de los organismos endoparásitos. A nivel intraespecífico, la diversidad y estructuración genética poblacional observada en digeneos responde a procesos de interacción ecológica con sus hospederos a través de escalas de tiempo evolutivas, muchas veces infiriéndose escenarios de co-evolución con los mismos (Cribb *et al.* 2001, Achatz *et al.* 2022). También son importantes los eventos de cambios de hospederos, que influyen directamente en los procesos de especiación, y que han ocurrido múltiples veces (Cribb *et al.* 2001, Achatz *et al.* 2022).

Sustentando los procesos a escalas evolutivas, pero en escalas de tiempo ecológicas, se encuentran dinámicas inherentes a la reproducción y al flujo genético entre poblaciones, las que al ocurrir de manera diferencial a nivel espacial promueve la especiación en aquellas poblaciones de parásitos menos conectadas por la movilidad de los hospederos (Tripet *et al.* 2002). El rango de hospederos, también llamado el grado de generalismo de los parásitos, y la diversidad de grupos taxonómicos a los que ocupan como hospederos, poseen implicancias en la capacidad de distribución de los parásitos a través del paisaje (Cribb *et al.* 2001, Poulin & Cribb 2002, Criscione *et al.* 2010, Blasco-Costa & Poulin 2013). A su vez, la movilidad de los hospederos está intrínsecamente determinada por aspectos abióticos, por lo que en ambientes con amplios gradientes físico-químicos o ciertos elementos moderadores (como la dirección del caudal de un río), tales aspectos pueden actuar como barreras ecológicas que inhiban la movilidad de ciertas especies de hospederos a través del espacio y, por ende, influirán en el flujo genético de los parásitos que estos portan

(Zbikowska & Nowak 2009, Thieltges *et al.* 2011, Duan *et al.* 2021, Janecka *et al.* 2021). No obstante, el grado de generalismo de los parásitos sería un factor que puede contrarrestar tal restricción del flujo genético por gradientes o barreras ambientales, en el caso de existir especies de hospederos que si sean capaces de atravesarlas (Gupta *et al.* 2019). El grado de generalismo en los parásitos también representa una capacidad adaptativa, ya que al ser mayor se disminuye la competencia intra-específica (Johnson *et al.* 2009), y aumenta la probabilidad de supervivencia durante eventos ambientales disruptivos (Lebedeva *et al.* 2023). Pese a lo anterior, existen ventajas asociadas a la especificidad (*i.e.* rango de hospederos restringido a una o pocas especies), las que incluyen un mayor desempeño a nivel competitivo en la infectividad, supervivencia, reproducción y uso de hábitat dentro de esas especies de hospederos a las que estén más adaptadas (Poulin & Cribb 2002, Poulin 2007). Por lo tanto, el aspecto del grado de generalismo actúa como un factor de diferenciación genética para las poblaciones de parásitos (Smith 1966, Pérez-Ponce de León *et al.* 2022).

Complementariamente, la supervivencia de digeneos también suele estar condicionada por las características físico-químicas e hidrológicas en los sistemas acuáticos que habitan, estando restringida su distribución a sitios que presenten un rango adecuado de condiciones (Molnár *et al.* 2013, Sereno-Uribe *et al.* 2019, Falke & Preston 2021, Zhang *et al.* 2021). También su supervivencia y flujo genético están influidos por factores tales como comportamientos de selección activa o predilección de hospederos (fase cercaria), plasticidad fenotípica asociada a la historia de vida individual, la capacidad infectiva diferencial entre clones (fase de redias), así como la influencia de la presencia de clones a través de distintos individuos hospederos y la reproducción entre clones que reducen la variabilidad genética observada (Poulin 1996, Koehler *et al.* 2011, Niewiadomska & Pojmanska 2011, Criscione *et al.* 2022). Todas las interacciones hasta ahora mencionadas: poblacionales y a nivel parásito-hospedero, de carácter altamente dinámico, seguramente influyen en la alta diversidad genética que presenta este género taxonómico a través de los sistemas espaciales en que habita (*e.g.* Faltýnková *et al.* 2016, Soldánová *et al.* 2017, Vermaak 2021).

El estudio de parásitos en peces nativos de Chile continental es aún incipiente (Olmos & Muñoz 2006). Ello se condice con los importantes vacíos de información que existen para la ictiofauna dulceacuícola local en general (Habit *et al.* 2006, 2019). En este sentido, el conocimiento

sobre el género *Tylodelphys* en Chile es también escaso. La única especie registrada ha sido *T. destructor* (Szidat et Nani, 1951); con *Basilichthys microlepidotus* (Jenyns, 1841) (*sensu* Veliz et al. 2012) como segundo hospedero intermediario en el lago Riñihue, e identificada mediante la observación de caracteres morfológicos (Torres et al. 1996, Siegmund et al. 1997). Recientemente se reportó que *Tylodelphys* sp. parasita a *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842; Osmeriforme: Galaxiidae) en sistemas acuáticos continentales del centro-sur del país, siendo el taxón preponderante de su parasitofauna (George-Nascimento et al. 2020). Este género taxonómico de parásito es capaz de infectar también a otras especies de peces nativos como *Geotria australis* (Gray, 1851), *Diplomystes nahuelbutaensis* (Arratia, 1987), *Aplochiton zebra* (Jenyns, 1842), *Cheirodon galusdae* (Eigenmann, 1927) y *Percichthys trucha* (Cuvier & Valenciennes, 1840) (Fernández et al. 2012, Habit-Victoriano 2023).

Complementariamente, se reportó la presencia de *Tylodelphys* spp. parasitando sobre *G. maculatus* en un conjunto de lagos de Argentina próximos al centro sur de Chile (Fernández et al. 2015), región donde también existen registros en el mismo hospedero de las especies *T. destructor*, *T. barilochensis* (Quaggiotto et Valverde, 1992), *T. argentinus* (Quaggiotto et Valverde, 1992) y *T. crubensis* (Quaggiotto et Valverde, 1992) (Flores & Baccalá 1998, Flores & Semena 2002, Viozzi et al. 2009). En dicha región también se ha reportado la presencia de *Tylodelphys* spp. en salmónidos (*Oncorhynchus mykiss*, *Salmo trutta*, *Salvelinus fontinalis*) (Rauque et al. 2018), especies exóticas introducidas con amplia distribución en Chile (Soto et al. 2006), y que potencialmente podrían también actuar como hospedadores intermediarios en el contexto local.

En particular, *Galaxias maculatus* como segundo hospedero intermediario de *Tylodelphys* spp. en sistemas acuáticos de Chile, presenta un patrón general de marcada estructuración genética a nivel de cuenca hidrográfica. Esto es, que en esta región geográfica pueden distinguirse en una misma cuenca subpoblaciones anádromas estuarinas y otras residentes habitando aguas arriba en ríos y lagos (Górski et al. 2018, Delgado et al. 2019, Ramírez-Álvarez et al. 2022). Este patrón es respaldado por diferencias morfológicas y metabólicas (McDowall 2003, Delgado et al. 2020, Rojo et al. 2020), así como por la evidencia de poco flujo genético entre dichas subpoblaciones (Victoriano et al. 2012, González-Wevar et al. 2015, Delgado et al. 2019). En Chile centro-sur las subpoblaciones residentes poseen menor flujo genético entre sí que las diádromas (estuarinas),

presentando altos grados de diferenciación entre cuencas y bajos tamaños poblacionales estimados (Delgado *et al.* 2019, Rojo *et al.* 2020). Las subpoblaciones diádromas de *G. maculatus* poseen mayor diversidad genética que sus contrapartes residentes (Delgado *et al.* 2019). En ese contexto, es esperable que *Tylodelphys* spp. presente alta estructuración genética espacial y mayor diversidad genética en zonas estuarinas, si sus procesos poblacionales están directamente correlacionados a los de su hospedador *G. maculatus*. Por otro lado, de no observarse tal patrón serían otros factores, posiblemente la influencia de otros hospedadores (ya sea, intermediarios o definitivos), los que estarían influyendo en aportar un mayor desplazamiento y, por ende, flujo genético entre las poblaciones de este parásito. De observarse una correlación entre el patrón de desplazamiento de *G. maculatus* y de *Tylodelphys* spp., la información genética poblacional espacial de este último podría ser usada para caracterizar subpoblaciones de *G. maculatus* (*i.e.* parásito como bioindicador), lo que sería factible e incluso deseable para tomar acciones de manejo adecuadas ante las distintas amenazas que enfrentan estos peces para su conservación en Chile (Habit *et al.* 2019, Rojas *et al.* 2019, Cussac *et al.* 2020).

El estudio genético de las poblaciones de *Tylodelphys* spp. permitiría contar con una mejor noción de la riqueza taxonómica de especies de parásitos en organismos acuáticos de Chile continental; más aun considerando que al parecer son abundantes y ejercen influencia sobre las dinámicas ecológicas comunitarias a través de la región (George-Nascimento *et al.* 2020, López-Rodríguez *et al.* 2021, Habit-Victoriano 2023). Se desconoce la variabilidad genética que presentaría la población de *Tylodelphys* sp. observada por George-Nascimento *et al.* (2020) en sistemas acuáticos continentales del centro sur de Chile. Incluso es posible que dicha clasificación taxonómica provisoria abarque a más de una especie de *Tylodelphys*, considerando el potencial de especiación de dicho género taxonómico (Soldánová *et al.* 2017, Achatz *et al.* 2022), y los registros de presencia de diversas especies de este género en regiones geográficamente cercanas de Argentina en el mismo hospedero (Flores & Semenas 2002).

Considerando el ciclo de vida indirecto que presentan estos parásitos, podemos prever que existe un transporte constante de individuos entre zonas geográficas distantes, otorgado principalmente por el desplazamiento de sus segundos hospederos intermediarios y definitivos. Dichos desplazamientos pueden ocurrir dentro de las cuencas por el movimiento de peces

hospederos con amplio rango de hábitat (Piedra *et al.* 2012, Ramírez-Álvarez *et al.* 2022), así como por las aves hospederas (hospedero definitivo), en cuyos gremios serían comunes las migraciones estacionales entre humedales costeros y de aguas-arriba (Estades *et al.* 2017). También los desplazamientos pueden producirse a través de distintas cuencas por las migraciones tanto de poblaciones de peces hospederos diádromas (Delgado *et al.* 2019) como de especies de aves hospederas definitivas (Oyarzún-Ruiz & Gonzáles-Acuña 2021). Esta alta movilidad potencial, sujeta a las dinámicas de desplazamiento de sus hospederos, pudiese otorgar a *Tylodelphys* spp. una capacidad de infección amplia a través del espectro espacial regional, e incidir directamente en el grado de conectividad genética de sus poblaciones. No obstante, es posible que el desplazamiento de sus hospederos definitivos (aves) se encuentre sesgado hacia determinados tipos de sistemas acuáticos que posean ciertas propiedades físicas características en común (González-Gajardo *et al.* 2009, Soto-Mora 2013, Estades *et al.* 2017). En este sentido, si este fenómeno de selección de hábitat fuese persistente en el tiempo por parte de la(s) especie(s) de ave que actúa(n) como hospedero definitivo, posiblemente dejaría para las poblaciones de parásitos una firma genética diferenciada entre los distintos tipos de hábitat acuáticos. Por último, es esperable hallar una importante diversidad para estos parásitos por la alta riqueza de especies de hospederos locales disponibles, considerando la relación descrita en literatura entre dichos factores (Hechinger & Lafferty 2005, Thielges *et al.* 2011, Poulin *et al.* 2011). En este sentido, el área de estudio conforma la zona con la mayor diversidad de especies de peces continentales del país (Habit *et al.* 2019), y la diversidad de aves también es importante (MMA 2018).

Hipótesis

Hipótesis General

La diversidad y estructura genética de *Tylodelphys* sp. está estrechamente relacionada a la estructura genética poblacional de su principal hospedador *Galaxias maculatus*, presentando estructuración a nivel de cuencas, y entre sistemas estuarinos y aguas-arriba dentro de las cuencas.

Hipótesis Específicas

1. Existe más de una especie de *Tylodelphys* a través de todo el rango espacial del estudio.
2. Las poblaciones de *Tylodelphys* sp. presentan estructuración genética espacial diferenciada a nivel de cuenca, con todas las poblaciones estuarinas relacionadas entre sí, mientras que cada cuenca en su tramo superior (aguas-arriba) alberga subpoblaciones diferentes.
3. Las poblaciones de *Tylodelphys* sp. presentan mayor diversidad genética en las mismas zonas que su hospedador *G. maculatus*.

Objetivos

Objetivo General

Evaluar la estructura genética de poblaciones de metacercarias de *Tylodelphys* sp. hospedando sobre *Galaxias maculatus* en distintas cuencas de Chile Centro-sur, usando los genes COI e 28S (mitocondrial y nuclear, respectivamente).

Objetivos Específicos

- Inferir el número de especies de *Tylodelphys* presentes en el sistema de estudio a partir de datos genéticos.
- Estimar la diversidad genética para *Tylodelphys* sp. en los sitios muestreados.
- Estimar el grado de diferenciación genética entre poblaciones de *Tylodelphys* sp. de distintas cuencas y tramos de ríos dentro de las mismas.

Métodos

Se obtuvieron 125 individuos adultos de *Galaxias maculatus* mediante captura con redes (durante los meses de enero y febrero del año 2013), los que fueron sacrificados en terreno con sobredosis de benzocaína y almacenados en etanol 95%. Los sitios de muestreos se localizaron en cuencas hidrográficas del sur de Chile (N=16; Tabla 1, Figura 2). Por cada cuenca se realizaron muestreos en distintos tramos de la misma, distinguiendo zonas estuarinas, ríos y lagos. Las cuencas incluidas fueron: Imperial, Toltén, Cruces, Valdivia, Bueno, Maullín y Puelo (Figura 2, Tabla 1). Los peces muestreados fueron llevados a la Facultad de Ciencias de la Universidad Católica de la Santísima Concepción para ser procesados.

Tabla 1. Localización de los sitios de muestreo. Se señala además el tipo de ecosistema acuático.

Sitio	Latitud	Longitud	Ecosistema acuático
Imperial 1	38° 38' 9.9'' S	72° 25' 47.9'' O	Fluvial
Imperial 2	38° 45' 0.7'' S	73° 24' 29.2'' O	Estuarino
Imperial 3	38° 46' 49.7'' S	72° 56' 42.3'' O	Fluvial
Quepe	38° 51' 13'' S	72° 32' 43'' O	Fluvial
Toltén 1	38° 57' 29.6'' S	72° 25' 33.3'' O	Fluvial
Toltén 2	39° 02' 6.4'' S	72° 42' 49.9'' O	Fluvial
Cruces 1	39° 22' 19.8'' S	72° 37' 30.8'' O	Fluvial
Cruces 3	39° 45' 27'' S	73° 15' 41.8'' O	Estuarino
Valdivia 2	39° 46' 18.2'' S	72° 27' 35.4'' O	Lacustre
Valdivia 4	39° 51' 16.9'' S	73° 19' 57.1'' O	Estuarino
Bueno 5	40° 15' 9.3'' S	72° 37' 7.8'' O	Lacustre
Bueno 6	40° 19' 24.6'' S	73° 5' 28.3'' O	Fluvial
Bueno 3	41° 40' 28.2'' S	73° 7' 23.9'' O	Fluvial
Maullín 1	41° 12' 33.2'' S	73° 1' 54.2'' O	Lacustre
Maullín 2	41° 38' 35.9'' S	73° 34' 19.6'' O	Estuarino
Puelo	41° 38' 53.8'' S	72° 17' 43.2'' O	Estuarino

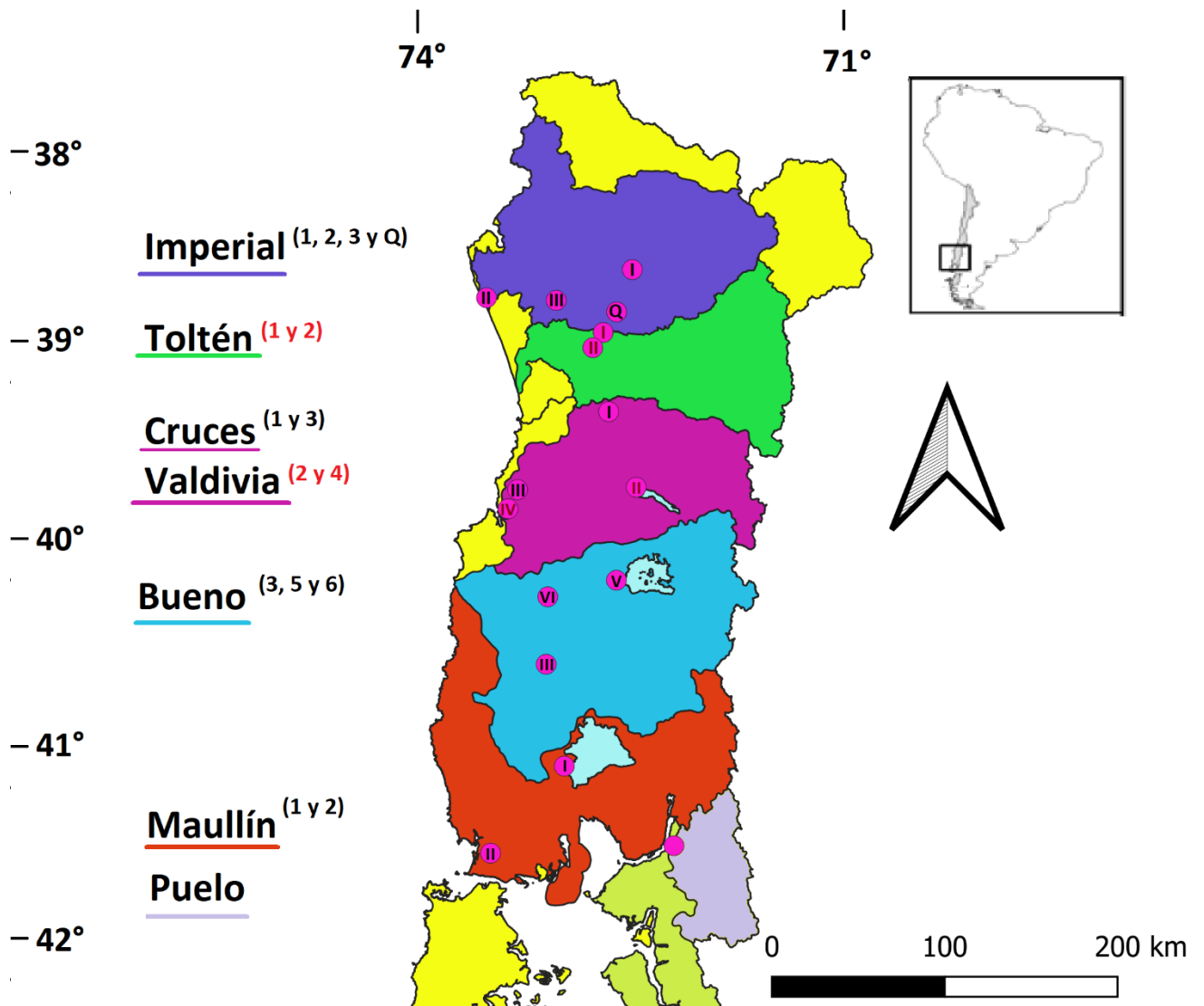


Figura 2. Área de estudio. Cada punto rosa representa un sitio de muestreo. Los polígonos de colores representan cuencas hidrográficas. En la izquierda figuran los nombres de las distintas cuencas hidrográficas subrayadas con su respectivo color, así como, entre paréntesis, el código en numeración de los distintos sitios de muestreo que se abarcaron en cada cuenca, los que se condicen con los números romanos dentro de los puntos del mapa.

Una vez en laboratorio, de cada pez se extrajeron al menos 2 individuos de metacercarias de *Tylodelphys* spp. desde la cavidad craneal, los que fueron procesados individualmente para la extracción de su ADN, mediante el kit comercial InnuPREP DNA (Analytik Jena), siguiendo las indicaciones del fabricante. El ADN extraído fue amplificado mediante reacción en cadena de la

polimerasa (PCR), utilizando para ello los marcadores del gen COI Plat-diploCOX1F y Plat-diploCOX1R (Moszczyńska *et al.* 2009), y los marcadores DPL600F y DPL700R del gen 28S del ADN nuclear ribosomal (Achatz *et al.* 2022), de manera independiente entre ambos genes. La enzima polimerasa utilizada fue GoTaq G2 Flexi DNA (Promega).

Los volúmenes de reactivos por muestra utilizados para la PCR del gen COI incluyeron: 6 μL de Buffer; 0,2 μL de albúmina de suero bovino (a 0,2 mg/ml de concentración); 0,6 μL de dNTP (a concentración de 0,2 mM); 1,8 μL de Cloruro de Magnesio (a 1,5 mM); 1,5 μL de marcador Forward y la misma cantidad de marcador Reverse (ambos a 0,5 μM); 0,4 μL de polimerasa GoTaq (a 0,06 U/ μL); 2 ng/ μL de ADN y 15,9 μL de agua de grado molecular. Para el gen 28S el volumen de reactivos fue el mismo, salvo el Cloruro de Magnesio con 1,6 μL (a 1,3 mM) y el agua grado molecular con 16,2 μL por muestra. El programa de termociclado de las muestras para el gen COI incluyó una fase inicial de denaturalización a 94°C por 1 minuto 54 segundos, seguido de 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, alineamiento a 50°C por 30 segundos y extensión 72°C por 36 segundos; tras lo cual se sometió a una fase de extensión final a 72°C por 5 minutos. Para el gen 28S el programa de termociclado fue similar, aunque con 40 ciclos, con la etapa de alineamiento desarrollada a 53°C y con cada extensión programada a 2 minutos. La integridad (calidad) del ADN fue evaluada mediante electroforesis, corroborando la presencia de una única banda visible por carril de muestra. Se enviaron las muestras que mostraron una banda única de ADN en el paso previo a la sucursal de la empresa biotecnológica Macrogen (Chile), para su secuenciación con técnicas de próxima generación: Illumina.

Las secuencias obtenidas fueron pre-procesadas, revisando manualmente la asignación de nucleótidos a partir de los espectrogramas asociados mediante el software Geneious (Kearse *et al.* 2012), tras lo cual se alinearon mediante el algoritmo MUSCLE integrado en MEGA 11 (Tamura *et al.* 2021). Se corroboró la pertenencia al género taxonómico *Tylodelphys* buscando una muestra de las secuencias nucleotídicas en la base de datos GenBank (NCBI), y notando las secuencias de especies descritas más similares a las aquí obtenidas.

Delimitación de especies o linajes putativos

Para inferir la existencia de especies (o linajes) putativas de *Tylodelphys* en este estudio se utilizó la metodología ABGD: Automatic Barcode Gap Discovery (Puillandre *et al.* 2012). Primero se consideró la tasa de diferenciación genética entre muestras asociadas al gen mitocondrial COI, estimada en

base a metodología *Maximum Composite Likelihood* con el software MEGA 11 (tasas entre sitios bajo distribución gamma; tratamiento de incongruencias con enfoque de delección pareada). Para determinar el umbral de distinción inter-especies (“barcode gap”) se ingresaron las matrices de distancia genética de ambos genes en la plataforma web <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdweb.html>, usando el valor estándar de 10 particiones iterativas. Como input adicional, se ingresaron los valores referenciales de máxima divergencia intra-específica (*P*) 0,01 y 0,024 para el gen COI en base a los valores máximos de divergencia intra-específica para ese gen en representantes del género *Tylodelphys* observados por García-Varela (*et al.* 2016) y Otachi (*et al.* 2015), respectivamente. Para el gen 28S se usaron los parámetros de máxima divergencia incluidos por defecto en la plataforma.

Para corroborar esta asociación en especies o linajes putativos, se generó un árbol filogenético por cada gen basado en el método de inferencia bayesiana de Cadenas de Markov Monte-Carlo, bajo el modelo de tasa evolutiva tipo gamma inversa, usando el software MrBayes (Ronquist *et al.* 2012) y graficados con el software FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018). También se generaron árboles filogenéticos adicionales para ambos genes con las metodologías *Neighbour Joining* y *Maximum Likelihood*. Para ambas aproximaciones, se usó el modelo de sustitución de tiempo reversible general y una distribución de tasas gamma con sitios invariantes (GTR G+I), y con pruebas de ajuste Bootstrap a 5000 y 1000 permutaciones respectivamente, usando el software MEGA11. En estos análisis se usaron como *outgroup* a secuencias de las especies *Posthodiplostomum sp.* (código de acceso OP071208) para el gen COI, y *Neococodricola georgiana* (código de acceso MT622333) para el gen 28S recopiladas desde la base de datos GenBank.

Con el objetivo de visualizar las asociaciones entre secuencias idénticas en la data genética, se generaron redes de haplotipos usando el software Network (fluxus-engineering.com), mediante la metodología *Neighbour Joining*, llevando primero los datos haplotípicos a un formato compatible con el software anterior usando DnaSP 6.12.03 (Rozas *et al.* 2017).

Para la clasificación de especies putativas de secuencias para el gen 28S (cuya discriminación con el análisis ABGD no fue fructífera) en un primer momento se utilizó como base la clasificación de individuos secuenciados para ambos genes y a su vez clasificados a especies en función de los resultados de ABGD para el gen COI, la que fue contrastada con la distribución en los árboles filogenéticos del gen 28S. A partir de lo anterior fue notado que la segregación entre especies

putativas en la red de haplotipos de 28S, estaba respaldada en este caso por la identidad de una base nucleotídica singular en la posición 963 de las secuencias del gen 28S. Por tanto, se consideró en adelante este factor para delimitar las especies en secuencias de dicho gen, clasificándolas como Especie W si en esta posición se hallaba una adenina, mientras que como Especie Z de observarse una guanina. Los análisis poblacionales posteriores fueron realizados tras clasificar las secuencias en especies putativas bajo este último enfoque para dicho gen (28S).

Análisis genético poblacional

Los parámetros de genética poblacional: número de haplotipos, número de sitios polimórficos (S), y diversidad de nucleótidos (π) fueron estimados mediante el software DnaSP. La comparación de los resultados de los mencionados parámetros de diversidad de cada sitio de muestreo, fueron comparados con la mediana del total de secuencias por especie, para determinar los sitios con diversidad genética superior o inferior a la media (Goodall-Copestake *et al.* 2012).

Para vislumbrar posibles patrones filogeográficos, por cada gen y especie putativa se aplicó un test de análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el software ARLEQUIN (Excoffier & Lischer 2010). Se agruparon los datos manualmente según cuenca y por sitio de muestreo, para realizar comparaciones de los estadísticos de diferenciación genética poblacional obtenidos. También se desprendió la data de diferenciación genética poblacional pareada entre sitios con los parámetros estándar del software ARLEQUIN para datos haplotípicos (1000 permutaciones, F_{ST} de Weir & Cockerman 1984), evaluando los sitios que presentaron diferenciación genética significativa entre sí para ambos genes, en base a un valor mínimo de significancia (p) de 0,05. Para graficar los resultados de las matrices arrojadas por este último análisis, se utilizó el software PAST (Hammer *et al.* 2001).

Para evaluar la relación entre distancia genética y distancia geográfica, se efectuó un test de Mantel mediante el software PASSaGE 2 (Rosenberg & Anderson 2011) para el gen COI. Del mismo se obtuvo un valor del estadístico de este test más su valor p asociado de significancia para cada especie (a partir de 1000 permutaciones). Para detectar estructuras espaciales que modelen la variabilidad de la data genética y corroborar la existencia de autocorrelación espacial en los datos del gen COI se realizó un análisis de Mapas de eigenvectores de Moran basados en distancia (por sus siglas en inglés: dbMEM) (Legendre & Legendre 2012). Dicho análisis se basa en la descomposición dimensional de la matriz de distancia geográfica entre sitios (previo truncamiento

de los valores máximos de diferenciación en esa matriz) por análisis de coordenadas principales (PCoA), y en la posterior elección de estructuras espaciales (a distintas escalas geográficas) que mejor expliquen la varianza en la matriz de diferenciación genética, mediante análisis de redundancia (RDA) (Galpern *et al.* 2014). Este análisis dbMEM ha sido utilizado para caracterizar el flujo genético de poblaciones a través del paisaje (*e.g.* Garroway *et al.* 2013), siendo más informativo y apropiado que el test de Mantel para tal propósito (Legendre & Fortin 2010, Cushman *et al.* 2013). Se efectuó tal análisis dbMEM en el software R (R Core Team 2023), con la función 'mgQuick', del paquete 'memgene' (Galpern *et al.* 2014), incluyendo 10.000 permutaciones para el test de modelo nulo usado para la selección de los eigenvalores útiles (positivos). Se seleccionó el umbral de máximas distancias geográficas (entre sitios) por defecto de la función, previamente transformándolas a distancias euclidianas con la función 'dist' del paquete 'stats' (R Core Team 2023). El resultado del análisis fue mapeado con el software QGIS 3.28 (QGIS Association).

Resultados

Tras el proceso de limpiado de secuencias y alineamiento, se obtuvo un total de 242 y 192 secuencias de ADN para los genes COI y 28S, respectivamente. Las secuencias obtenidas fueron genéticamente cercanas a *Tylodelphys variabilis* y a *T. immer* colectados en Norteamérica para el gen 28S (Códigos de acceso: OL435552 y MH521252), superando el 99% de similitud entre esas especies disponibles en la base de datos BLAST (NCBI) y las secuencias de este estudio. Para el gen COI, las secuencias más similares halladas fueron *Tylodelphys robrauschi* para la especie putativa Z (90,27% de similitud) y *Tylodelphys* sp. para la especie putativa W (91,14 % de similitud); ambas también procedentes de ejemplares de Norteamérica (Códigos de acceso: MZ323304 y MH368947).

Delimitación de especies o linajes putativos

El método de inferencia de especies ABGD reconoce 2 especies o linajes putativos ($p = 0,0218$ a la novena iteración del modelo) para el gen COI, con un umbral de diferenciación genética (*barcode gap*) de 4.5% (Figura 3). En cambio, utilizando el gen 28S el algoritmo no determinó la presencia de más de un linaje en los datos. Las especies o linajes putativos inferidos por el gen COI, serán llamadas desde ahora *Tylodelphys* sp. W y *Tylodelphys* sp. Z (o simplemente especie W y Z). La distribución

geográfica de ambas especies estuvo conformada por secuencias de individuos de prácticamente todos los sitios de muestreos, aunque con diferencias significativas en las abundancias relativas de cada uno (Tabla 2).

n° pares de secuencias

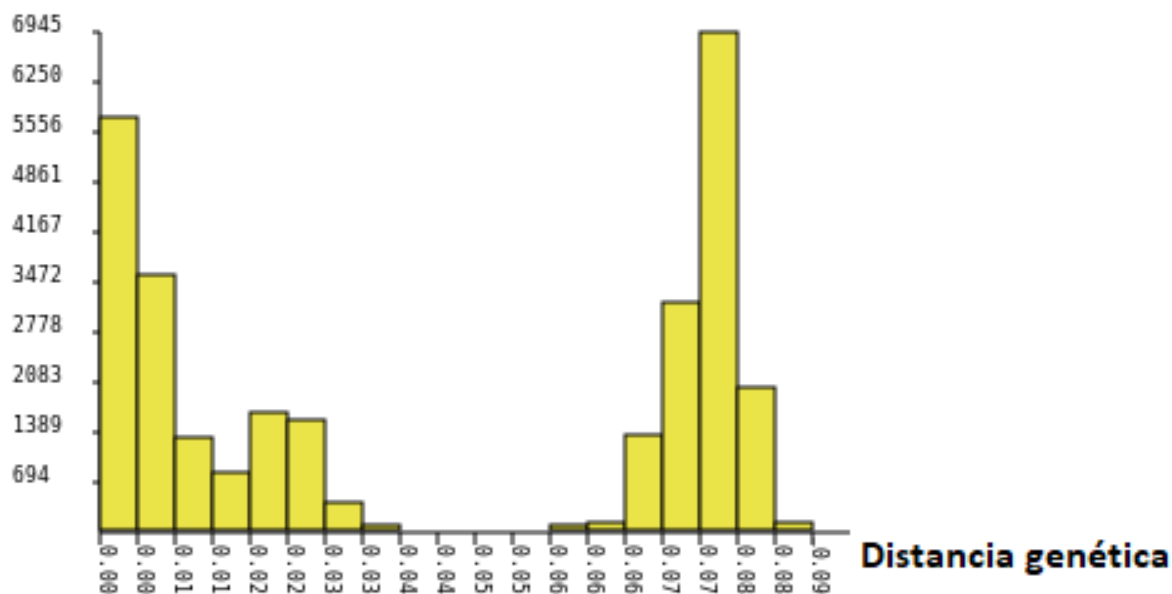


Figura 3.- Frecuencia de las magnitudes de las distancias genéticas para el gen COI, hallada por el método ABGD, entre todos los pares de secuencias individuales. En el eje Y figura el número de pares de secuencias halladas de manera acumulada en las distintas iteraciones del modelo, mientras que en el eje X lo hace la magnitud de los valores de distancias o diferencias genéticas pareadas entre distintas muestras, expresada en decimales (Barcode gap= 0,045; p -valor en partición final= 0,02177).

En cuanto a los árboles filogenéticos obtenidos, para el gen COI en todos ellos se observa una discriminación efectiva entre las especies putativas, agrupadas éstas en clados diferentes, concordando así con la asignación de especies dada por el método ABGD (Anexo 1). Lo mismo se observa en términos generales para el gen 28S, aunque con algunas secuencias aisladas cuya ubicación en los dendogramas y su clasificación de especie putativa basada en COI escapa a

una discriminación completa para el conjunto de datos (Anexos 2 y 3). Por otro lado, el árbol de inferencia bayesiana para el gen 28S agrupó a todas las secuencias en un único clado, y con un muy alto soporte de nodo, posiblemente por un sobreajuste del modelo (Anexo 5). Cabe comentar que en todos los árboles estimados para este gen (salvo en el estimado con metodología bayesiana) se observó un bajo soporte de nodos.

Análisis genético poblacional

Respecto a la diversidad genética del gen 28S, se observó un número total de 12 haplotipos, con 7 presentes por cada especie putativa (en base a 5 y 10 sitios segregantes para las especies W y Z, respectivamente) (para un total de 125 y 67 secuencias de W y Z, respectivamente; Tabla 3). El número total de haplotipos para el gen COI fue de 82. Por especie putativa el número de haplotipos fue de 52 para la especie W (con 44 sitios segregantes) y 33 para la especie Z (con 24 sitios segregantes) (para un total de 148 y 94 secuencias de W y Z, respectivamente; Tabla 2). Para ambos genes, las redes de haplotipos muestran dos haplogrupos diferenciados (Figuras 4 y 5). La distinción entre especies putativas para el gen 28S está basado en la identidad de un único nucleótido en la posición 963. Por otra parte, para el gen COI se observan al menos 10 pasos mutacionales entre ambas especies putativas. El haplogrupo de la especie Z en el gen COI conforma una estructura de tipo estrellada, con dos haplogrupos centrales más comunes, y distintos haplotipos a su alrededor de baja abundancia relativa (más raros) y que difieren levemente de los anteriores (Figura 5) (López *et al.* 2015). Por su parte, en el gen COI la especie W muestra una mayor disgregación entre los distintos haplotipos, conformando una red más compleja, con hasta 5 haplotipos de mayor abundancia, de los que se desprenden otros menos frecuentes. Incluso se aprecia un subgrupo con secuencias principalmente de la cuenca de Maullín, algo más alejados del resto (Figura 5). En la red de haplotipos del gen 28S (Figura 4), la morfología de los haplogrupos es similar para ambas especies, con un haplotipo principal de mayor frecuencia para cada una, con unos cuantos otros haplotipos a su alrededor que difieren hasta por 5 pasos mutacionales de aquel principal.

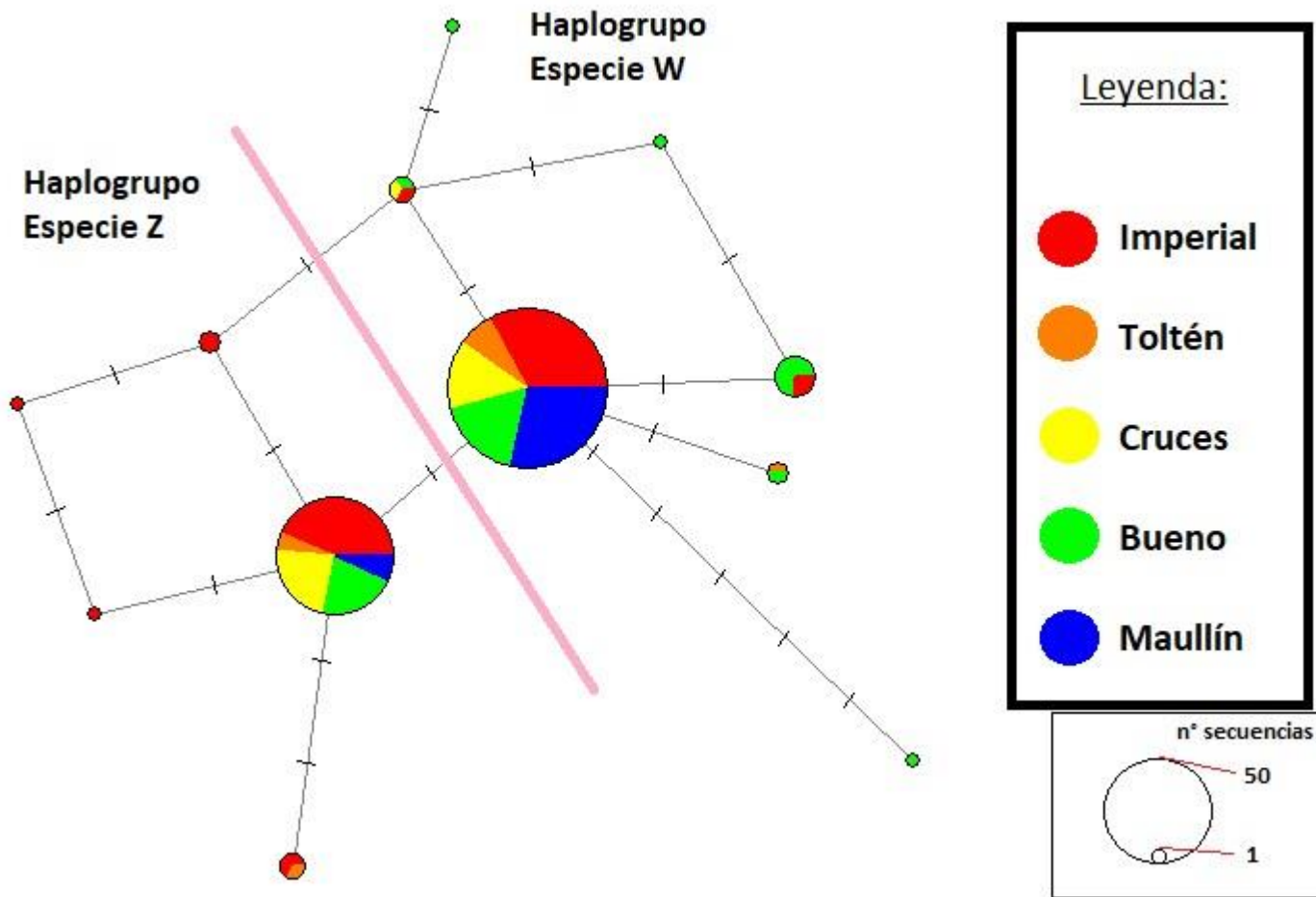


Figura 4.- Red de haplotipos del gen 28S. El tamaño de los círculos hace referencia al número de secuencias por haplotipo. El color dentro de cada círculo se refiere a la cuenca de las secuencias que contiene (indicada en el cuadro de la derecha), cuya proporción se condice con la porción de la circunferencia que abarca dicho color. Las líneas cortas perpendiculares representan pasos mutacionales intermedios. La línea rosada representa de manera arbitraria la delimitación de los dos haplogrupos principales, cada cual asociado a una especie putativa particular, y basada en la identidad de un único nucleótido (un paso mutacional) en la posición n°963 de la secuencia.

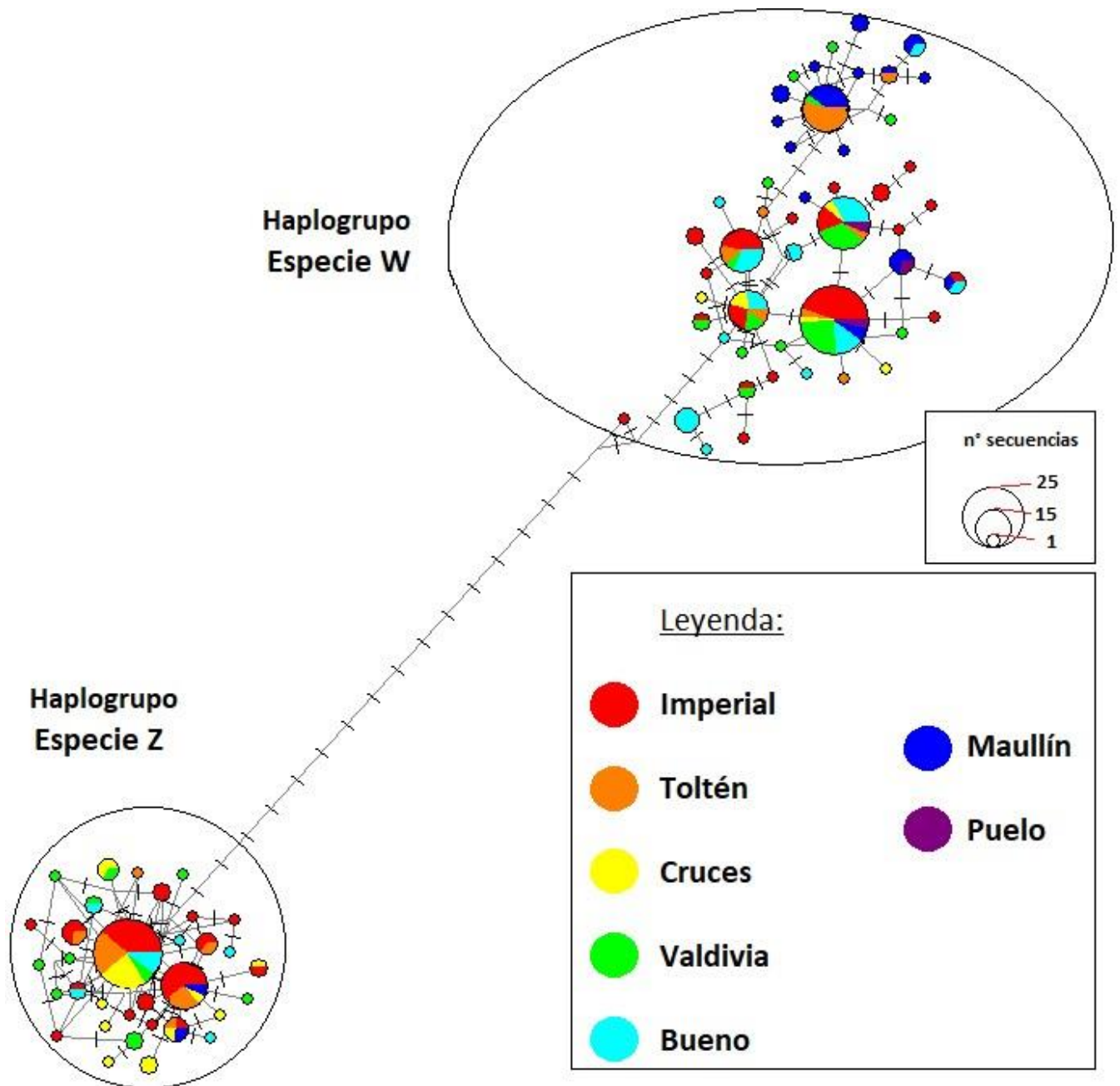


Figura 5. Red de haplotipos del gen COI. El tamaño de los círculos hace referencia al número de secuencias que incluye cada nodo (haplotipo). El color dentro de cada círculo se refiere a la cuenca de las secuencias que contiene (indicada en el cuadro de la derecha), cuya proporción se condice con la porción de la circunferencia que abarca dicho color. Las líneas cortas perpendiculares representan pasos mutacionales intermedios. Las líneas que engloban los conjuntos de haplotipos representan de manera arbitraria la delimitación de los dos haplogrupos principales, cada cual asociado a una especie putativa particular.

En la estimación de parámetros genéticos poblacionales, para el gen COI la diversidad de nucleótidos (π) global fue de 0,01159 para la especie W, y de 0,00415 para la especie Z (Tabla 2). En cuanto a la diversidad de nucleótidos por sitios, ésta varió entre valores de entre 0,00438 a 0,01959 para la especie *Tylodelphys* sp. W; y de entre 0,00227 a 0,01136 para la especie *Tylodelphys* sp. Z. Los sitios con la mayor diversidad de nucleótidos relativa para la especie W fueron: Maullín 2, Bueno 6, Toltén 1, Valdivia 2 y Toltén 2; mientras que para la especie Z fueron: Cruces 3, Bueno 3, Valdivia 4 e Imperial 2 (Tabla 2). Por el contrario, los sitios con menor diversidad de nucleótidos observada fueron para la especie W fueron: Bueno 5, Cruces 1, Puelo, Imperial 1, Quepe y Valdivia 4; mientras que para la especie Z lo fueron: Maullín 1, Toltén 1, Quepe, Imperial 3 e Imperial 1. El número de sitios polimórficos (S) en las secuencias de ADN mostró ser variable y parece guardar cierta relación con la diversidad de nucleótidos (Tabla 2). Para el gen 28S la diversidad nucleotídica global fue de 0,00028 para la especie W y de 0,00033 para la Z (Tabla 3). El rango de dicha diversidad nucleotídica por sitios fue de entre 0,00011 y 0,00216 para la especie W, y de entre 0,00012 y 0,00156 para la especie Z. La diversidad global de haplotipos fue de 0,24, con 7 haplotipos para la especie W; y de 0,225, con 7 haplotipos para la especie Z. Los sitios con mayor diversidad en ambos parámetros fueron todos los de la cuenca de Bueno y Maullín 2 para *Tylodelphys* sp. W; y Quepe, Imperial 1 y Toltén 1 para Z. Por el contrario, los con menor diversidad fueron para la especie W fueron Imperial 1, Maullín 1, Quepe y Cruces 1; y para la especie Z Imperial 3, sin considerar los sitios sin presencia de la respectiva especie (Tabla 3).

Respecto a los patrones filogeográficos observados con AMOVA, para el gen COI se obtuvieron valores globales de diferenciación genética poblacional (Φ_{ST}) entre sitios de muestreo de 0,28 y 0,093 para las especies *Tylodelphys* sp. W y *Tylodelphys* sp. Z, respectivamente; ambos valores estadísticamente significativos según su valor p asociado (Tablas 4 y 5). El porcentaje de la variación explicado por la diferenciación genética 'entre' las distintas cuencas abarcó un 22,12% y un 5,98% para W y Z, respectivamente (si bien solo para W fue significativo estadísticamente); mientras que el porcentaje explicado por la diferenciación 'dentro' de las cuencas abarcó un 5,87% y un 15,32% en las mismas especies (ambos significativos estadísticamente) (Tablas 4 y 5).

Tabla 2.- Tamaños de muestra y Estadísticos genéticos poblacionales (diversidad y número de haplotipos, diversidad de nucleótidos y número de sitios polimórficos) asociados al gen COI.

Sitio	N° peces muestreados	N° <i>Tylodelphys</i> Especie W	Especie W			N° <i>Tylodelphys</i> Especie Z	Especie Z		
			Diversidad nucleótidos (π) (sp. W)	Diversidad de haplotipos & (n° haplotipos)	N° sitios polimórficos (S) (sp. W)		Diversidad nucleótidos (π) (sp. Z)	Diversidad de haplotipos & (n° haplotipos)	N° sitios polimórficos (S) (sp. Z)
Imperial 1	14	17	0,0062	0,838 [10]	14	9	0,00379	0,944 [7]	6
Imperial 2	16	0	-	-	-	3	0,00459	1 [3]	3
Imperial 3	17	8	0,01052	1 [8]	15	21	0,00368	0,852 [11]	9
Quepe	6*	17	0,00812	0,904 [11]	15	6	0,00302	0,8 [4]	4
Toltén 1	3	9	0,01235	0,806 [5]	11	15	0,00299	0,8 [7]	7
Toltén 2	2	7	0,01109	0,857 [5]	12	0	-	-	-
Cruces 1	12	6	0,00438	0,933 [5]	5	16	0,00473	0,858 [9]	10
Cruces 3	2	0	-	-	-	2	0,01136	1 [2]	5
Valdivia 2	6	10	0,01219	0,867 [7]	16	2	0,00454	1 [2]	2
Valdivia 4	10	16	0,00831	0,892 [10]	17	10	0,00576	0,978 [9]	8
Bueno 5	14	16	0,00591	0,917 [9]	11	1	-	-	-
Bueno 6	8	11	0,01598	0,964 [9]	21	1	-	-	-
Bueno 3	3	2	0,01136	1 [2]	5	6	0,00828	1 [6]	9
Mauullín 1	12	21	0,01021	0,914 [13]	19	2	0,00227	1 [2]	1
Mauullín 2	4	5	0,01959	1 [5]	15	0	-	-	-
Puelo	2	3	0,0061	1 [3]	4	0	-	-	-
GLOBAL	125	148	0,01159	0,929 [52]	44	94	0,00415	0,864 [33]	24

* Cifra incluye 2 ejemplares de *Basilichthys microlepidotus*

Tabla 3.- Tamaños de muestra y Estadísticos genéticos poblacionales (diversidad y número de haplotipos, diversidad de nucleótidos y número de sitios polimórficos) asociados al gen 28S.

Sitio	N° peces muestreados	N° <i>Tylodelphys</i> <i>Especie W</i>	Especie W			N° <i>Tylodelphys</i> <i>Especie Z</i>	Especie Z		
			Diversidad nucleótidos (π) sp. W	Diversidad de haplotipos & (número haplotipos)	N° Sitios polimórficos (S) (sp. W)		Diversidad nucleótidos (π) sp. Z	Diversidad de haplotipos & (número haplotipos)	N° Sitios polimórficos (S) (sp. Z)
Imperial 1	12	15	0,00011	0,133 [2]	1	8	0,00098	0,64 [3]	3
Imperial 2	3	1	-	-	-	5	-	[1]	-
Imperial 3	8	2	-	[1]	-	13	0,00012	0,2 [2]	1
Quepe	5*	21	0,00015	0,181 [2]	1	6	0,00156	0,9 [5]	4
Toltén 1	3	8	0,00021	0,25 [2]	1	4	0,00081	0,5 [2]	2
Toltén 2	1	1	-	-	-	-	-	-	-
Cruces 1	12	10	0,00016	0,2 [2]	1	13	-	[1]	-
Cruces 3	3	6	0,00027	0,33 [3]	1	1	-	-	-
Bueno 5	10	17	0,00069	0,625 [4]	3	1	-	-	-
Bueno 6	5	9	0,00216	0,83 [5]	10	-	-	-	-
Bueno 3	6	4	0,00081	0,5 [2]	2	12	-	[1]	-
Maullín 1	16	26	-	[1]	-	4	-	[1]	-
Maullín 2	3	5	0,00081	0,8 [3]	2	-	-	-	-
GLOBAL		125	0,00028	0,24 [7]	9	67	0,00033	0,225 [7]	5

*Cifra incluye 2 ejemplares de *Basilichthys microlepidotus*

Tabla 4.- Estadísticos asociados al análisis AMOVA para la especie W, y el gen COI.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación	Índices de fijación	Valor de estadístico	Valor <i>p</i> asociado
Entre cuencas	5	22,12	Φ CT	0,221	0,023
Entre sitios dentro de las cuencas	8	5,87	Φ SC	0,075	0,01
Dentro de los sitios	134	72	Φ ST	0,280	< 0,0001
Total	147				

Tabla 5.- Estadísticos asociados al análisis AMOVA para la especie Z, y el gen COI.

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación		Índices de fijación	Valor de estadístico	Valor <i>p</i> asociado
Entre cuencas	4	-5,98		Φ_{CT}	-0,059	0,704
Entre sitios dentro de las cuencas	8	15,32		Φ_{SC}	0,144	0,005
Dentro de los sitios	81	90,66		Φ_{ST}	0,093	0,0002
Total	93					

Para el gen 28S, los valores globales de diferenciación genética poblacional entre sitios de muestreo fueron de 0,12 y 0,198 para las especies W y Z (Tablas 6 y 7). Por su parte, el porcentaje de la variación explicado por el factor ‘cuenca’ fue de 7,03% para W y de 7,2% para Z (ninguno de estos fue significativo estadísticamente); mientras que el porcentaje de la variación dentro de cada cuenca fue de 19,03% y de 26,97% respectivamente para las mismas (ambos valores estadísticamente significativos) (Tablas 6 y 7).

En cuanto al análisis de diferenciación genética entre sitios pareados, los sitios que mostraron diferenciación genética significativa entre sí fueron, mayormente, distintos entre especies y congruentes (aunque no totalmente) entre genes (Figuras 6 y 7). Para la especie W ambos genes coinciden en mostrar diferenciación significativa entre los siguientes diez pares de sitios: Imperial1 y Toltén1, Imperial1 y Maullín2, Bueno5 y Bueno6, Quepe y Maullín1, Bueno5 y Maullín1, Bueno5 y Maullín2, Maullín1 y Maullín2, Toltén1 y Bueno5, Bueno6 e Imperial1, y Bueno6 y Maullín1 (Figuras 6 y 7). Para la especie Z, los pares de sitios con diferencia genética significativa detectada para ambos genes fueron tres: Toltén1 y Bueno3, Imperial1 e Imperial3, e Imperial2 y Toltén1 (Figuras 6 y 7).

Respecto a los resultados del test de Mantel entre las matrices de distancia genética del gen COI y de distancia geográfica entre los individuos muestreados, se encontró que existe correlación (*r*) positiva significativa estadísticamente entre dichos factores solamente para *Tylodelphys* sp. W (especie W: $r = 0,1726$, $p = 0,001$; Especie Z: $r = 0,0723$, $p = 0,152$).

Tabla 6.- Estadísticos asociados al AMOVA para la especie W y el gen 28S.

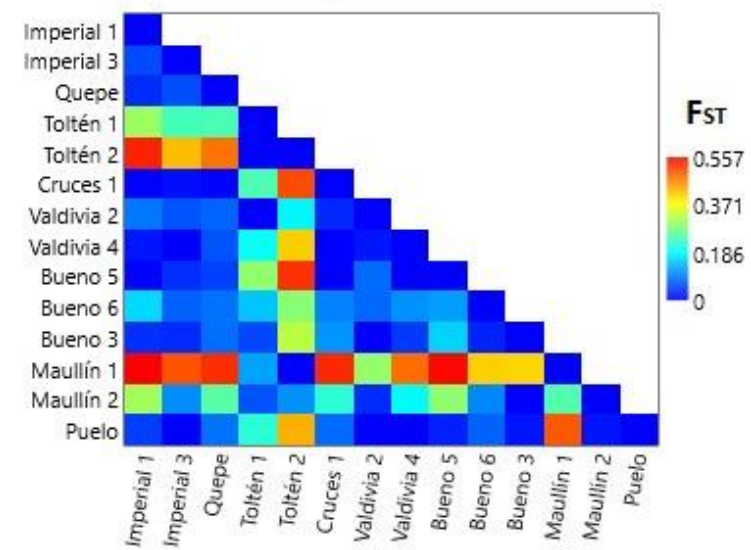
Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación		Índices de fijación	Valor de estadístico	Valor <i>p</i> asociado
Entre cuencas	4	-7,03		Φ_{CT}	-0,07	0,96
Entre sitios dentro de las cuencas	8	19,03		Φ_{SC}	0,178	0,001
Dentro de los sitios	112	88		Φ_{ST}	0,12	0,014
Total	124					

Tabla 7.- Estadísticos asociados al AMOVA para la especie Z y el gen 28S.

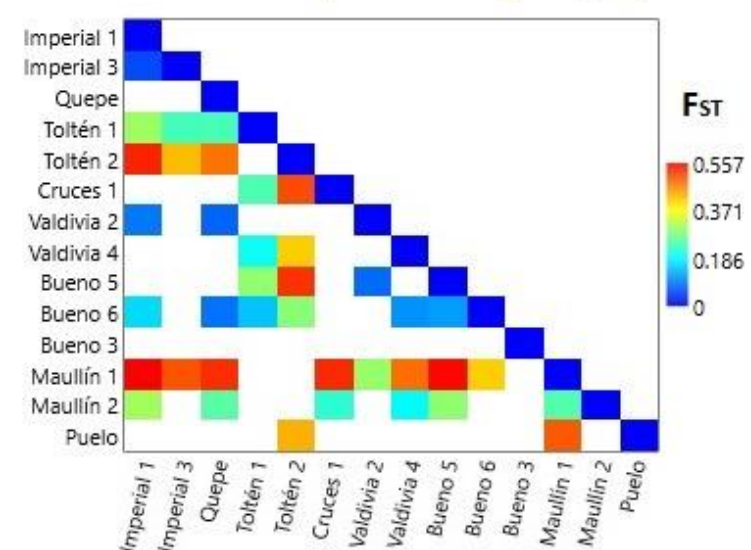
Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación		Índices de fijación	Valor de estadístico	Valor <i>p</i> asociado
Entre cuencas	4	-7,2		Φ_{CT}	-0,072	0,6
Entre sitios dentro de las cuencas	5	26,97		Φ_{SC}	0,2516	0,003
Dentro de los sitios	57	80,22		Φ_{ST}	0,198	0,008
Total	66					

Gen COI

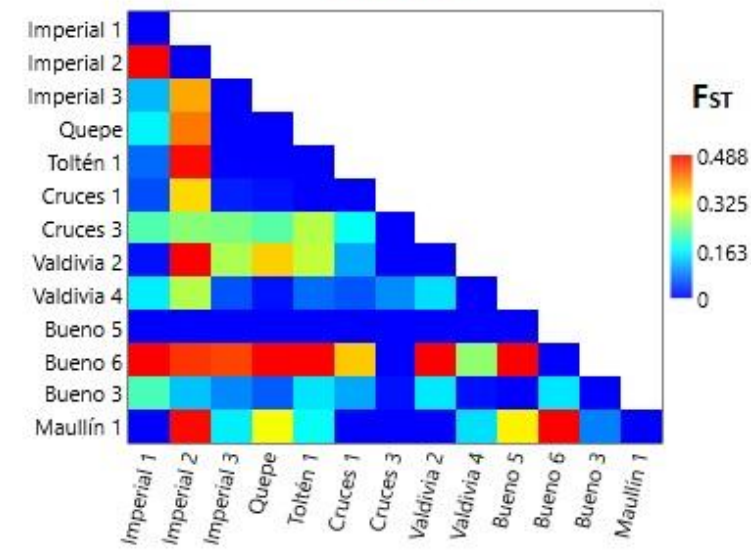
Especie W



Especie W (p < 0,05)



Especie Z



Especie Z (p < 0,05)

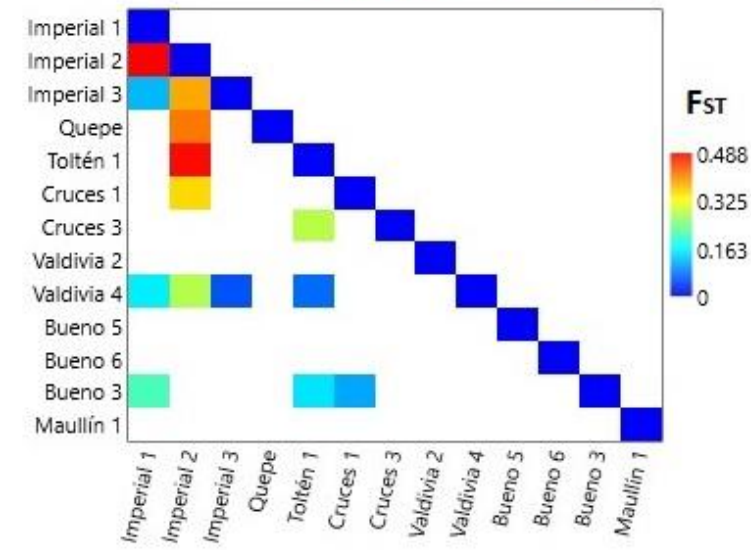


Figura 6.- Matrices de diferenciación genética (F_{ST}) pareada entre sitios para el gen COI, para las especies putativas *Tylodelphys* sp. W y Z. En las matrices de la derecha figuran solamente los valores de diferenciación genética pareada con valores p asociados menores a 0,05 (también la comparación de cada sitio consigo mismo, meramente como apoyo visual); considerándose por lo tanto tales pares de sitios como significativamente diferentes genéticamente entre sí.

Gen 28S

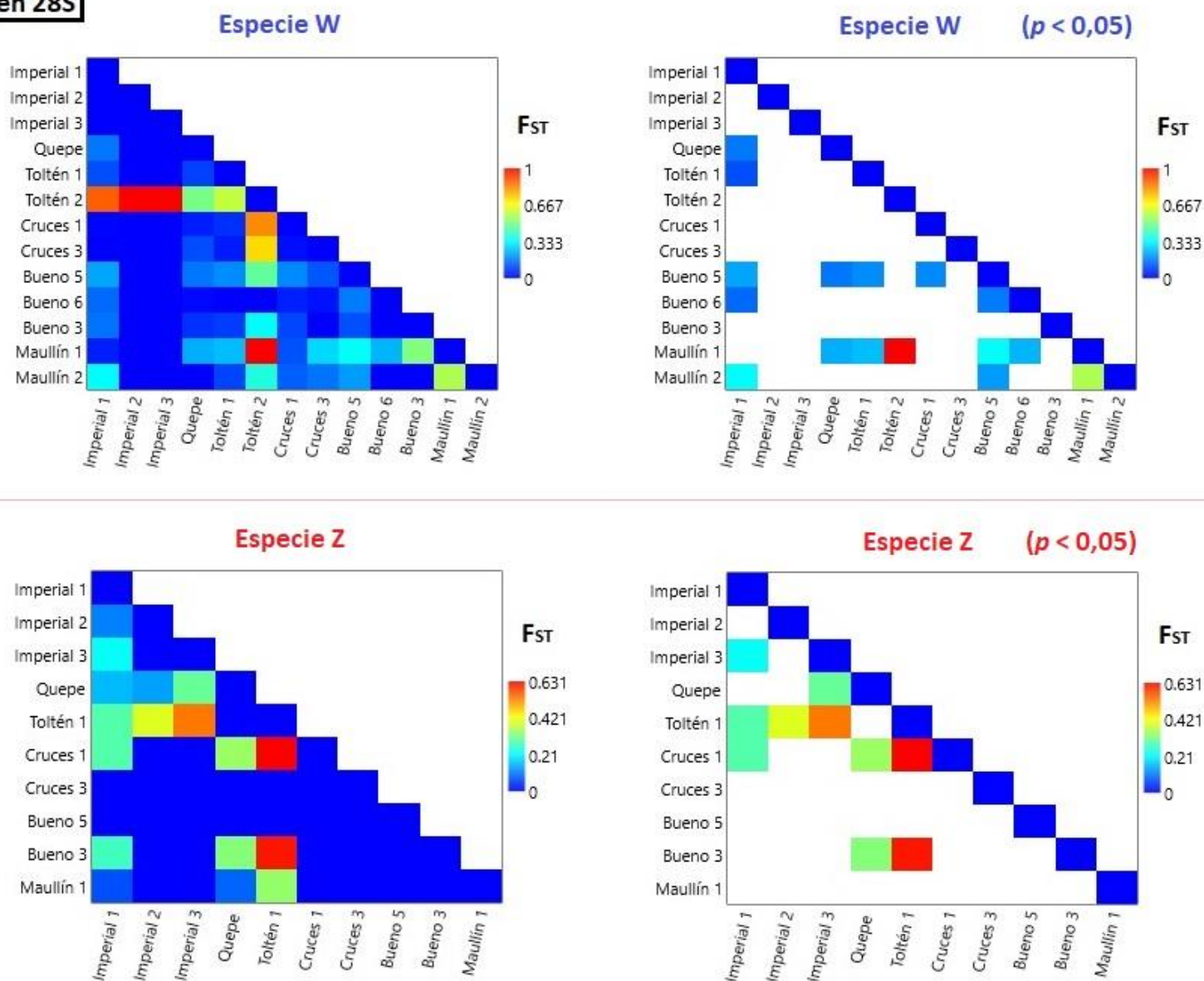


Figura 7.- Matrices de diferenciación genética (F_{ST}) pareada entre sitios para el gen 28S, para las especies putativas *Tyloodelphys* sp. W y Z. En las matrices de la derecha figuran solamente los valores de diferenciación genética pareada con valores p asociados menores a 0,05 (también la comparación de cada sitio consigo mismo, meramente como apoyo visual); considerándose por lo tanto tales pares de sitios como significativamente diferentes genéticamente entre sí.

En el análisis de mapas de eigenvectores de Moran basados en distancia (dbMEM) para la especie W, el coeficiente de determinación (R^2) ajustado del modelo obtenido fue de 0,21916 como la proporción explicada de su variabilidad genética a partir de las estructuras espaciales arrojadas ($p = 0,002$). Para la especie Z, el análisis no fue capaz de detectar patrones espaciales que modelen la genética poblacional observada, aunque sí pudo detectar ciertos patrones (si bien con un bajo R^2) tras reducir manualmente la base de datos a un único representante de cada haplotipo por sitio (Anexo 4). Para la especie W, la metodología seleccionó 4 conjuntos de eigenvectores con autocorrelación espacial positiva (“Variables MEMGENE”, *sensu* Galpern *et al.* 2014) (Figura 8). Solo los tres primeros conjuntos o Variables MEMGENE dieron cuenta de la mayor parte (99,99%) del ajuste del modelo (por esto se omitió el cuarto conjunto de la Figura 6). Cabe señalar que un R^2 bajo (o una variable MEMGENE con baja proporción de variación explicada) debiera interpretarse como un patrón espacial que ocurre en una menor parte de la población muestral, y no como un bajo poder del modelo para explicar la variación observada en los datos (Galpern *et al.* 2014: Apéndice S1).

Proporción de la variación (R^2) explicada por cada variable MEMGENE :valor $p = 0,002$

{ 89,5% 6,42% 4,07% }

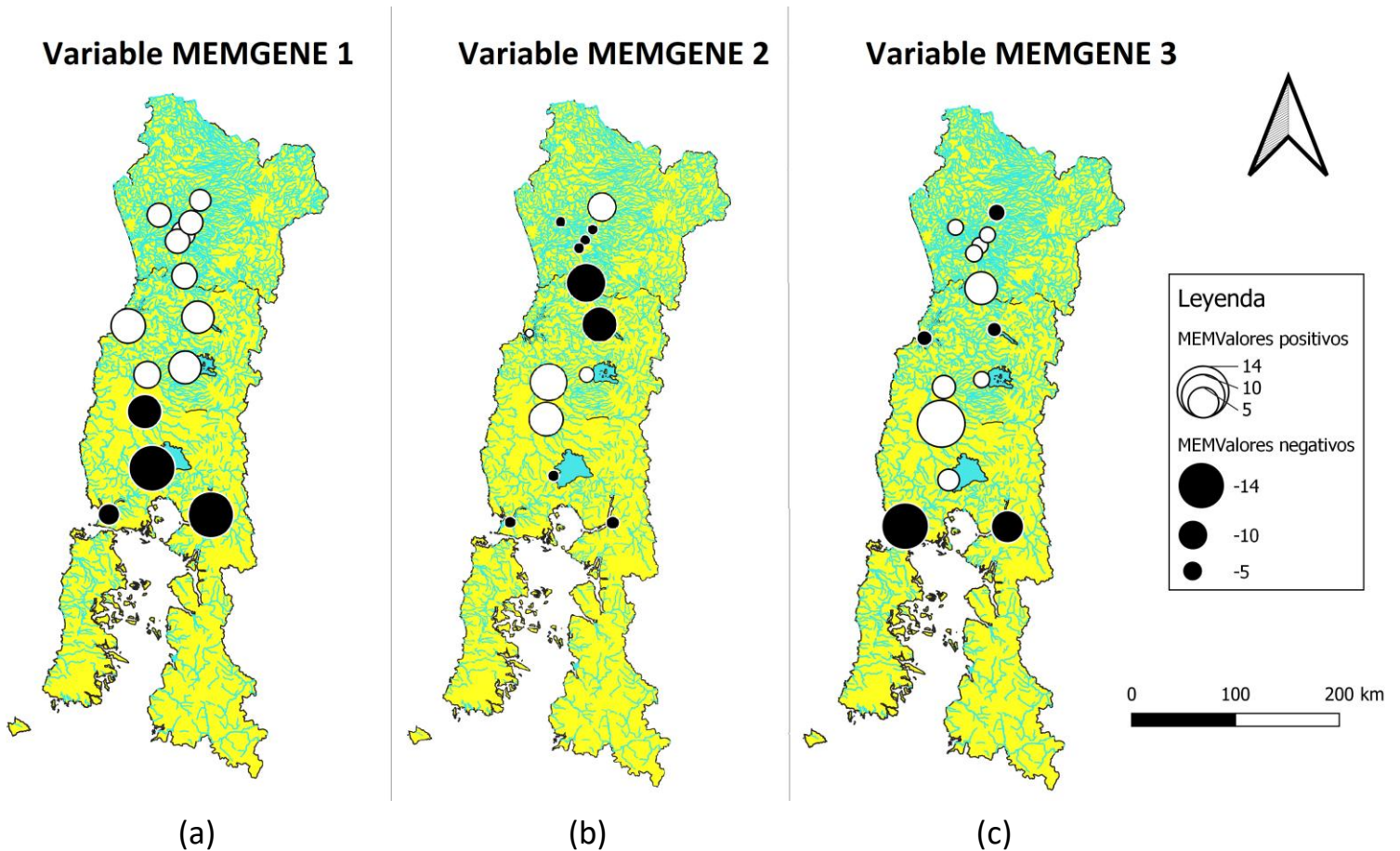


Figura 8.- Resultado de análisis dbMEM entre individuos (a partir de matriz de distancias pareadas) de la Especie W. Mapa de los valores para los tres conjuntos de eigenvectores ('Variables MEMGENE') seleccionados por el modelo (a, b y c), y que dan cuenta de patrones espaciales observados que modelan la variabilidad genética. La existencia de mayor semejanza genética (*i.e.* menor distancia genética) entre sitios es denotada por cada color de punto. El tamaño de los puntos hace referencia a la magnitud de tal semejanza (o sea, puntos más grandes, alta similitud; y viceversa). Modelo (R^2_{ajustado}) explica un 21,9% de la variación genética observada ($p = 0,002$). La Variable MEMGENE 1 (a) informa un 89,5% de la varianza total explicada por el modelo (R^2), mientras que la variable MEMGENE 2 (b) lo hace para un 6,42% del total explicado, y la MEMGENE 3 (c) explica un 4,07% del total.

Discusión

En base a los análisis efectuados, se generó evidencia que sugiere la presencia de dos especies diferentes de *Tylodelphys* para la zona de estudio. Por otro lado, se observa que los patrones de movilidad potencialmente conferidos por el hospedero intermediario *Galaxias maculatus* pudiesen poseer cierta influencia sobre la genética poblacional espacial del parásito *Tylodelphys* spp., al ser estos factores similares. Se observó para los parásitos estructuración genética a nivel de cuenca (y entre cuencas) en el área de estudio, si bien no fue así en todos los casos. Más aún, se observó asociación genética entre la mayoría de las poblaciones de zonas estuarinas. Del mismo modo, hubo cierta tendencia a presentar una mayor diversidad genética relativa en estos tipos de sistemas acuáticos, particularmente para una de las dos especies (Z). A partir de ello, cabe plantear que la influencia de este hospedero intermediario existiría (sobre todo en la especie Z y en determinadas cuencas que más adelante detallo), aunque su efecto neto en la genética de las poblaciones no sería predominante, posiblemente por existir procesos de conectividad complementarios; por ejemplo, la influencia de la movilidad otorgada por otras especies de hospedadores (intermediarios y definitivo), que le conferirían un flujo genético al parásito más allá de las barreras biogeográficas impuestas por aquel hospedero particular (*G. maculatus*).

La identidad taxonómica de las secuencias aquí obtenidas, de acuerdo a la comparación con la base de datos BLAST (NCBI) y a árboles filogenéticos estimados incluyendo múltiples taxones como *outgroup* (resultados no mostrados), corresponde al género taxonómico *Tylodelphys*. No parecen haber registros de otras secuencias de este taxón provenientes del cono sur americano (se pretende subir a dicha plataforma algunas secuencias del presente estudio). Las especies putativas observadas tal vez se correspondan con las halladas por Flores & Semenas (2002) en lagos de la región contigua a mi área de estudio, en Argentina. Dichas especies son *Tylodelphys barilochensis* y *T. crubensis*, las cuales también fueron obtenidas de *G. maculatus* y se describieron habitando en simpatria en los distintos lagos allí estudiados (incluso a nivel de individuo hospedero). Más aun, según lo conjeturado por las autoras en base a parámetros de prevalencia e intensidad media de infección, ambas especies de *Tylodelphys* tendrían dinámicas de dispersión diferentes, teniendo *T. barilochensis* una mayor capacidad de dispersión que *T. crubensis*. Por ende, cabe sugerir que se

correspondan respectivamente con las especies putativas *Tylodelphys* sp. Z y W del presente estudio, de acuerdo a los distintos patrones de flujo genético que presenta cada una en base a los resultados aquí obtenidos, y que detallaré más adelante. No obstante, serían necesarias pruebas adicionales para corroborar lo anterior. Alternativamente, alguna de las especies putativas se podría corresponder con *Tylodelphys destructor*, conforme a la observación registrada de larvas metacercarias de esa especie efectuada por Torres (*et al.* 1996) y Siegmund (*et al.* 1997) en el lago Riñihue, de la cuenca de Valdivia.

Tanto el método de inferencia de especies ABGD, como los árboles filogenéticos y las redes de haplotipos arrojaron evidencia sobre la presencia de dos especies diferenciadas de *Tylodelphys* en el conjunto de individuos analizados en este estudio. Para las secuencias del gen COI, la forma del gráfico por ABGD se ajusta a la forma descrita para cuando existe presencia de más de una especie, esto es, con una distribución discontinua de las magnitudes de las diferencias genéticas pareadas observadas (Figura 3) (Puillandre *et al.* 2012). Del mismo análisis se obtuvo que el umbral de detección entre las especies putativas halladas en este estudio fue de 4,5% de diferenciación para el gen COI. Dicho valor se encuentra dentro de lo esperable para la distinción entre especies del género *Tylodelphys* para ese gen, de acuerdo a lo reportado en literatura (*e.g.* Söldánova *et al.* 2017, Sereno-Uribe *et al.* 2019, Achatz *et al.* 2022). Por otra parte, todos los árboles filogenéticos desprendidos del gen COI coincidieron en segregar en clados diferentes a las mismas secuencias clasificadas a una u otra especie putativa por el método ABGD (Anexo 1), teniendo siempre esta separación un alto soporte de nodo. Así mismo, la red de haplotipos para el gen COI muestra una significativa diferenciación, con múltiples pasos mutacionales, entre las especies putativas (Figura 5), al tiempo que la red de haplotipos del gen 28S figura una diferenciación discernible entre las mismas (Figura 4).

Las secuencias del gen 28S de los individuos de *Tylodelphys* aquí estudiados muestran ser más conservadas en cuanto a su variabilidad genética interindividual que las del gen COI (máximo de 0,009 de diferenciación entre sitios pareados), coincidiendo con lo hallado por otros autores (Blasco-Costa *et al.* 2016, Achatz *et al.* 2022), y siendo por tanto el gen mitocondrial COI más sensible

a cambios demográficos y de dispersión poblacional (Mazé-Guilmo *et al.* 2016). Probablemente fue por tal baja variabilidad genética que el gen 28S no fue capaz de discernir entre las especies putativas meramente con ABGD, debiendo recurrirse a la asignación manual de sus secuencias a las especies putativas con dos métodos diferentes (a partir de la asignación hecha para el gen COI ó según la identidad del nucleótido polimórfico específico considerado para el gen 28S, en la posición 963). La asignación de secuencias a especies putativas fue similar entre ambas metodologías, pero no completamente idéntica, habiendo un número reducido de secuencias (< 10) que fueron clasificadas en distintas especies según el método. A grandes rasgos, en los árboles filogenéticos estimados para el gen 28S se observó de manera predominante la segregación de las secuencias asignadas a ambas especies putativas en clados distintos (Anexos 2 y 3). No obstante, con ambos métodos de asignación usados para clasificar las secuencias de 28S en una u otra especie putativa, existieron excepciones de algunas pocas secuencias identificadas para una especie putativa que se agruparon en clados con presencia mayoritaria de la otra. Esto podría deberse a que, para esos clados, exista una mayor similitud a través del resto de sus secuencias nucleotídicas, a pesar de esa diferencia en el nucleótido polimórfico usado para discriminar a las especies en el gen 28S. Lo anterior pudiera, presumiblemente, originarse en un proceso reciente (en generaciones previas) de recombinación genética basada en reproducción sexual entre ambas especies (hibridación) en esos casos aislados, provocando esa mayor semejanza a través de las secuencias nucleotídicas para dicho gen en su conjunto (Mallet 2005). Eso explicaría que se observen algunos clados con presencia conjunta de secuencias de ambas especies putativas (Anexos 2 y 3) en los respectivos árboles de este gen nuclear propenso a recombinación, proceso que ocurriría en una baja proporción de la comunidad (por posibles motivos ecológicos que explicaré más adelante), al tiempo que no se observa algo similar en el gen mitocondrial COI, no sometido a recombinación sexual. Otra explicación plausible, no excluyente con la anterior, sería la mutación singular del nucleótido polimórfico en la posición 963 que permite discernir a la especie putativa, más probable en aquellas secuencias singulares que figuran aisladas de otras de su misma especie en la topología del árbol filogenético.

En este punto, cabe mencionar que me circunscribo a la definición de especies de Maddison & Whitton (2023) como “*comunidades reproductivas del pasado reciente, sostenidas hasta el presente, dentro de las cuales existió el suficiente flujo genético (u otros procesos cohesivos) para mantener la coherencia en genealogía y en rasgos fenotípicos*”. A este respecto, distintos procesos ecológicos han influido en que la diferenciación entre estas especies putativas (W y Z) se haya mantenido en el tiempo, conservando cada cual rasgos genéticos poblacionales diferentes entre sí (en los que ahondaré más adelante). Si consideramos además que más de un gen sugiere la distinción entre las mismas, la nomenclatura propuesta de dichas entidades como especies putativas adquiere mayor robustez (Maddison & Whitton 2023). No sería un fenómeno extraño el que ocurra especiación de tremátodos aún en simpatria (Huyse *et al.* 2005, Garant *et al.* 2007), como habría sido en este caso. Tal fenómeno tendría lugar cuando individuos de distintas poblaciones están bajo selección directa para evitar reproducirse con otras, al estar adaptadas a ambientes (o posiblemente en este caso, a hospederos) distintos, que les imponen una alta presión de selección a sus genotipos, provocando que los linajes híbridos tengan un menor *fitness* (Trouvé *et al.* 1998, Garant *et al.* 2007). El mecanismo que lo dicta pudiera ser la selección activa de parejas reproductivas por parte de los individuos en el hospedero definitivo, prefiriendo a otras de su misma especie (Tchuem-Tchuente *et al.* 1993, Trouvé *et al.* 1999), tras reconocerse mediante interacciones químicas. También pudiese influir la ubicación de los individuos en el tracto digestivo del hospedero definitivo, ya que se ha descrito que pueden ocupar nichos discretos diferenciados dentro del mismo (Rieger *et al.* 2013). Se ha observado en representantes de la misma clase taxonómica que solo en el caso que los individuos no tuvieran acceso a parejas reproductivas de su misma especie en el hospedero definitivo, éstos recurrirían a la hibridación (Tchuem-Tchuente *et al.* 1993).

En cuanto a la ecología de las dos especies putativas halladas, si bien ambas son simpátricas, coexistiendo en la mayoría de los sitios muestreados (e incluso co-infectando al mismo individuo hospedero, en algunos casos), ambas tendrían dinámicas propias de dispersión a través del área de estudio. Lo anterior estaría respaldado por distintas evidencias. Por ejemplo, en ambos genes los pares de sitios de muestreo que son identificados como significativamente distintos entre sí en base

a su genética poblacional (Figuras 6 y 7) son diferentes para cada especie putativa (salvo un par en el gen 28S: Toltén1 e Imperial1, y dos pares en el gen COI: Imperial1 e Imperial3, Valdivia4 y Toltén1; significativamente diferentes para ambas especies), por lo que los procesos de flujo genético no serían idénticos. Otro aspecto que contribuye al planteamiento de que estas especies putativas poseen dinámicas propias de dispersión son las diferencias que presentan ambas especies en las abundancias relativas por sitio, siendo más preponderantes en algunos sitios específicos diferentes entre sí (por ejemplo, menor abundancia de la especie Z en sitios de más al sur, como Maullín y Puelo) (Tabla 2), si bien esto debe tomarse con cautela por la posibilidad de que ello esté influenciado por el esfuerzo de muestreo. La existencia de diferencias en las dinámicas ecológicas de ambas especies putativas también es respaldada por las diferencias en los parámetros genéticos poblacionales (Tabla 2), cuyos respectivos sitios de mayor y menor diversidad nucleotídica son diferentes entre sí (salvo algunos de menor diversidad concordantes entre sí como Imperial 1 y Toltén 1). Más aún, en ambos genes, tanto la diversidad nucleotídica global observada (solo en COI), la diversidad de haplotipos, como el número de sitios polimórficos total son menores (hasta por un orden de magnitud) en la especie Z, siendo ésta, por tanto, más homogénea genéticamente a nivel espacial (Tablas 2 y 3). También, los valores del análisis AMOVA en COI refuerzan el planteamiento anterior, siendo notablemente menor la influencia de las distintas cuencas para la variabilidad genética global observada en la especie Z que en la W (Tablas 4 a 7), aunque ocurre lo contrario a nivel de sitios dentro de la cuenca. Por último, se encuentra el hecho de que el grado de correlación entre la distancia genética y geográfica es también diferente entre especies, estando la especie W más influenciada por la distancia geográfica (al menos por un orden de magnitud) que la especie Z, de acuerdo al valor de correlación entre dichos factores (r) estimado por el test de Mantel. Así mismo, el análisis dbMEM fue capaz de modelar espacialmente la variabilidad genética observada en la especie W (Figura 8), explicando una porción significativa de la varianza observada ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,219$), mientras que no pudo hallar patrones espaciales en la genética poblacional de Z como tal. Aún al ajustar los datos de la especie Z para incluir un único representante de cada haplotipo por sitio (lo que permitió modelar la variabilidad con dbMEM), la proporción de la varianza genética explicada por la componente espacial ($R^2_{\text{ajustado}} = 0,0467$) fue menor que en W (Anexo 4). Por todo ello, los distintos análisis sugieren que (en comparación con la W) la especie Z posee una mayor capacidad neta de dispersión a través del área de estudio, provocando una mayor homogeneidad en el componente genético global del estudio para el gen mitocondrial.

La movilidad de los hospederos intermediarios pudiera influenciar en cierto grado la genética poblacional observada para las especies de *Tylodelphys* aquí estudiadas, aunque es difícil discernirla de otros procesos ecológicos. Más aun, la influencia del hospedero *Galaxias maculatus* como tal pudiera enmascarse, ya que varios componentes de las comunidades de peces presentan un patrón de zonificación entre zonas altas y bajas de las cuencas (Habit & Victoriano 2005) (si bien ello acentuaría la relación entre desplazamiento limitado de hospederos y estructura genética de parásitos que se busca explorar). De acuerdo a los gráficos derivados del análisis dbMEM, para la especie W hay evidencia de una división genética discernible entre poblaciones de distintos sitios de la misma cuenca, ocurriendo más evidentemente en la cuenca del río Bueno para la estructura espacial principal detectada (Figura 8a) y de manera menos frecuente para las cuencas de Valdivia (Figura 8b), Cruces, Imperial (Figura 8b y 8c), y Maullín (Figura 8c). Para esta última, tal diferenciación a nivel de cuenca estaría respaldada también por el análisis de F_{ST} pareado para COI, mostrando una diferenciación genética significativa entre sus distintos sitios (Figura 6). Adicionalmente, la prueba de F_{ST} entre pares de sitios hecha para el otro gen (28S) corrobora la estructuración genética para las cuencas de Bueno y Maullín (Figura 7) en esa especie. En tales cuencas, por tanto, el factor de la movilidad del hospedero intermediario pudiera ser un limitante para el flujo genético; aunque para otras (*e.g.* Valdivia) no habría evidencia de estructuración genética a través de la cuenca, sugiriendo un desplazamiento neto a nivel de cuenca de las poblaciones de *Tylodelphys* sp. W superior a lo que posiblemente le pudiera ser otorgado meramente por el hospedero intermediario *G. maculatus* en aquel río. De esto se infiere, por tanto, la influencia de otros peces hospederos intermediarios de mayor movilidad en esta cuenca sobre el desplazamiento de las poblaciones de esta especie de parásito, posiblemente ocurriendo en dirección aguas-abajo (Piedra *et al.* 2012), o bien una extendida movilidad a nivel de cuenca de la especie de ave hospedera definitiva. En cuanto a la especie Z, el análisis dbMEM arroja diferencias a nivel de cuenca para las cuencas de Imperial y Cruces en su componente principal (Anexo 4a), para Cruces en su componente secundario (Anexo 4b) y para Imperial en su componente terciario (Anexo 4c). El análisis F_{ST} corrobora una diferenciación genética a nivel de cuenca para Imperial, con ambos genes (Figuras 6 y 7), para esta especie. Todo lo anterior, por tanto, nos sugiere que: (1) existe una potencial influencia de la movilidad reducida de *Galaxias maculatus* a nivel de cuenca sobre la estructuración genética de los parásitos, (2) tal estructuración fue detectada sólo para algunas cuencas antes mencionadas (*i.e.* no en todas sería un factor limitante), y (3) las cuencas que muestran estructuración genética serían (en su mayoría) diferentes para cada especie putativa.

Complementariamente, el patrón descrito para el hospedero *G. maculatus* de menor estructuración genética entre sitios estuarinos, así como de mayor diversidad genética en tales sitios (Delgado *et al.* 2019, Rojo *et al.* 2020), se observó prácticamente en todos los casos para las especies putativas de parásitos. De acuerdo a los análisis de F_{ST} y dbMEM para el gen COI y la especie W (Figuras 6 y 8), los pares de sitios estuarinos que no poseen diferencias genéticas significativas entre sí serían: Puelo y Maullín2, y Puelo y Valdivia4 (el primer par respaldado por todos los productos del dbMEM, mientras el segundo sólo en una variable MEMGENE). Entre Valdivia4 y Maullín2 existiría tan sólo una subpoblación en ambas que no sería genéticamente diferente, por evidenciarse asociación en una única variable MEMGENE del análisis dbMEM (Figura 8c), lo cual no sería detectado por el otro análisis (F_{ST}) que en su conjunto las cataloga como diferentes entre sí. Todas las secuencias del gen 28S asociadas a sitios estuarinos para la especie W (Imperial2, Cruces3 y Maullín2) son similares genéticamente entre sí, de acuerdo al análisis F_{ST} (Figura 7). Por otra parte, para las secuencias de la especie Z asociadas a sistemas estuarinos (Imperial2, Cruces3, Valdivia4; estos dos últimos aleatoriamente geográficamente entre sí) los análisis dan cuenta de que no hay diferenciación para la totalidad de secuencias del gen 28S entre los sitios Imperial2 y Cruces3 (Figura 7), mientras que solamente una subpoblación perteneciente a tales sitios no sería significativamente diferente entre sí, de acuerdo al resultado principal del dbMEM para el gen COI (Imperial2 y Valdivia4) (Figura 8a), y a que el análisis F_{ST} los clasifica en su conjunto como diferentes (Figura 6). De todo lo anterior se infiere que habría una ausencia de estructuración genética entre las poblaciones de parásitos de los sitios estuarinos para ambas especies, aunque mientras en algunos casos toda la población de esos sitios estaría relacionada con las de otros estuarios, en otros sólo algunas subpoblaciones dentro de los mismos guardarían tal relación y estarían más directamente influenciados, presumiblemente, por la movilidad del hospedero intermediario *G. maculatus*. Complementariamente, similar a lo descrito para dicho hospedero, existió una tendencia a presentar mayor diversidad genética (diversidad nucleotídica) respecto al promedio global en algunos de los sitios estuarinos para *Tylodelphys* spp.; principalmente, Maullín2 para la especie W para ambos genes (no así para los sitios Puelo y Valdivia4 de la especie W con el gen COI) (Tablas 2 y 3), mientras que todos los sitios estuarinos de la especie Z evaluados con el gen COI (Imperial2, Cruces3 y Valdivia4) presentaron una diversidad genética superior a la media, con el sitio Cruces3 como el de mayor diversidad para toda el área de estudio (Tablas 2 y 3), lo que nos habla de una mayor diversidad genética en el componente parasítico en conformidad con una mayor diversidad genética del hospedero intermediario *G.*

maculatus en tales áreas (Delgado *et al.* 2019, Rojo *et al.* 2020). Por lo tanto, la influencia del hospedero intermediario en cuanto a la migración entre sitios estuarinos pudiera ser importante de acuerdo a lo observado, aunque ésta no sería homogénea para todas las poblaciones de parásitos presentes en esos sitios, posiblemente por existir vías alternativas de flujo a través del paisaje (otros hospedadores, y diferentes historias de vida individuales).

El principal factor ecológico que pudiera estar determinando las diferencias (entre e intra-) cuencas previamente comentadas en cuanto a la genética poblacional de las dos especies putativas de *Tylodelphys*, posiblemente sea el hecho de que ambas estén adaptadas a especies de hospederos definitivos diferentes entre sí. En tremátodos suele ser el hospedero más móvil el que ejerce una mayor influencia sobre la variación genética poblacional (Criscione *et al.* 2005, Blasco-Costa & Poulin 2013). Sin embargo, ningún hospedero definitivo para *Tylodelphys* spp. ha sido identificado entre las aves acuáticas de Chile (Hinojosa-Sáez & González-Acuña 2005, Olmos & Muñoz 2006). Presumiblemente, el hospedero definitivo de la especie Z sería un ave piscívora con amplia capacidad de desplazamiento a través de la zona de estudio, lo que explicaría su alta homogeneidad genética espacial observada (Mazé-Guilmo *et al.* 2016). La especie de ave nativa que cumple esas condiciones y que pudiese actuar como un hospedero definitivo para la especie Z, posiblemente sea la gaviota común *Larus dominicanus* (Lichtenstein, 1823), ya registrada como hospedero para este género de parásitos en la Patagonia norte argentina (Casalins 2022), y que además posee un patrón de baja estructuración genética regional (y por ende un flujo genético geográficamente extenso, determinado por sus patrones de desplazamiento), al conformar una única subpoblación a través de la franja costera en la zona centro-sur de Chile, que a su vez mantendría cierta conectividad con subpoblaciones andinas (Kasinsky *et al.* 2024). Por otra parte, el hospedero definitivo de la especie W no sería tan móvil entre sitios, provocando la mayor prevalencia del fenómeno de aislamiento por distancia que en Z, de acuerdo a los resultados de los test de Mantel y dbMEM. En este sentido, un posible candidato del hospedero definitivo para la especie W sería algún ave de menor capacidad migratoria, pero que de todos modos se pueda desplazar entre distintas cuencas. Una especie capaz de conferirle tal capacidad, al tiempo que puede habitar en cualquiera de los distintos tipos de sistemas acuáticos considerados, sería, por ejemplo, la garza blanca *Ardea alba* (Linnaeus, 1758), cuyos patrones de desplazamiento comprenden migraciones regionales parciales y residencia entre

temporadas (Lumpkin *et al.* 2023, Hayes *et al.* 2023). También pudiera ser alguno de los miembros de la familia Podicipedidae, considerando que algunas de las secuencias genéticas más similares de *Tylodelphys* (respecto a las acá obtenidas) provenientes de Norteamérica fueron descritas en tales hospederos, aunque los patrones de desplazamiento regionales de sus representantes locales son poco conocidos.

Un aspecto adicional relativo a la influencia de los hospederos definitivos sobre la genética poblacional observada sería que la firma genética observada en ambas especies muestra un quiebre biogeográfico entre las cuencas de Bueno y Valdivia, para las especies W y Z, respectivamente (Figura 8a y Anexo 4b), separando una parte de las poblaciones del norte y el sur de las mismas en genotipos diferenciados entre sí, lo que presumiblemente estaría dado por dinámicas de desplazamiento de sus hospederos definitivos. Por otro lado, cabe comentar un patrón espacial que ocurriría en cierta proporción de la población de la especie W, de acuerdo al análisis dbMEM, el cual agrupa de manera conjunta a sitios alejados geográficamente correspondientes a zonas fluviales de la cuenca del Bueno, con sectores de los ríos Imperial (Figura 8b) y Cruces (Figura 8c), sugiriendo la existencia de una ruta migratoria de su hospedero definitivo a través de esos sistemas. Tal conectividad posiblemente ocurra al compartir, estos sistemas, características de hábitat similares entre sí para las aves (Estades *et al.* 2017), influyendo así en la transmisión de los parásitos y en su estructuración genética (Hechinger & Lafferty 2005, Janecka *et al.* 2021).

El hecho de que se hayan detectado pocos individuos en sitios lacustres y de aguas arriba en la especie Z (así como en sitios más al sur) podría responder a un efecto de fuente-sumidero, lo que explicaría a su vez la homogeneidad genética de la misma a través del área de estudio. Esto es, que las poblaciones de los sitios con menor abundancia relativa y diversidad para la especie Z (sumideros) estén recibiendo individuos altamente relacionados genéticamente entre sí a partir de sitios 'fuente' con mayor diversidad genética (Garant *et al.* 2007), por acción del hospedero definitivo que le otorgaría una alta capacidad de desplazamiento. Tal movilidad ocurriría, de acuerdo a lo que es posible inferir, desde ciertas zonas fluviales con mayor abundancia y diversidad genética asociadas, hacia el resto de sitios y tipos de sistemas acuáticos. El sitio con la mayor diversidad genética observada para *Tylodelphys* sp. Z es Cruces 3 (Tabla 2), de tipo estuarino. Otros

sitios con alta diversidad genética para esta especie son Valdivia 4 (a poca distancia geográfica del sitio anterior), Cruces 1 y Bueno 3; perfilándose por tanto la cuenca de Cruces y Valdivia como una probable zona ‘fuente’ para la genética poblacional de esta especie dado que aglomeran la mayoría de sitios de más diversidad. También debiera contemplarse que hubiera sitios ‘fuente’ más al norte de la zona de estudio, en afluentes del río Biobío, donde se ha descrito una importante prevalencia de *Tyloodelphys* sp. a través de múltiples especies de peces hospederos (Habit-Victoriano 2023), y por ser el río con mayor diversidad de peces del país (Dyer 2000). Lo anterior cobra más sentido aún si consideramos que se ha descrito que las zonas ‘fuente’ (o núcleo) de diversidad de parásitos ocurren en zonas biogeográficas de transición con movilidad limitada de hospederos (Pérez-Ponce de León & Choudhury 2005), y a este respecto, que la cuenca del Biobío se ubica geográficamente entre las provincias biogeográficas diferenciadas ‘Andina’ y de ‘Los Lagos Valdivianos’, descritas para la fauna de peces de agua dulce en Chile (Rojas *et al.* 2019).

Para la especie W, no hay evidencia de que la dinámica ecológica tipo fuente-sumidero sea la prevalente a través de la zona de estudio (o si se quiere, tendría múltiples zonas ‘fuente’). Por el contrario, al tener ésta cierto grado de aislamiento por distancia, poseería una mayor adaptación local a los hospederos, al existir mayor flujo genético entre poblaciones cercanas con adaptaciones genéticas relativamente coherentes entre sí, lo que le otorga más chances de retener alelos ventajosos para la adaptación a sus hospederos en su genética poblacional (ante procesos de deriva genética; Nadler 1995), y potencialmente un mayor rango de hospederos intermediarios que para la especie (Z) con flujo genético a través de un área más extensa (Garant *et al.* 2007, Johnson *et al.* 2020). Esto explicaría que la proporción de la variabilidad genética a nivel de cuenca para la especie W sea menor en ambos genes respecto a la de la especie Z, de acuerdo a lo observado con AMOVA (Tablas 4 a 7). Siguiendo tal razonamiento, la especie Z al no estar potencialmente tan adaptada a los hospederos locales por ser generalista, la misma sería más dependiente de la movilidad otorgada por *Galaxias maculatus*, lo que explica que presente un menor flujo genético relativo a nivel de cuenca que W. Más aún, la genética poblacional de la especie Z presenta más semejanza (que la W) con los patrones genéticos poblacionales de dicho hospedero intermediario, en cuanto a que también presenta mayor diversidad genética en sistemas acuáticos estuarinos (diferiendo de W), como se explicó anteriormente. Por lo tanto, el grado de influencia de la movilidad otorgada por el hospedero intermediario *G. maculatus* sobre el flujo genético, sería diferente entre las especies de

Tylodelphys, poseyendo una mayor influencia relativa sobre la genética poblacional de la especie Z.

Podemos notar que ambas especies de *Tylodelphys* muestran algún grado de estructuración genética para la cuenca del Imperial. Ello nos lleva a pensar que podría existir un factor en este río que afecte la circulación de peces, explicando así este patrón común. Según lo observado por Ramírez-Álvarez y cols. (2022), en esta cuenca hubo una mayor tendencia de individuos de *G. maculatus* de permanecer en determinados tramos del río a lo largo de toda su historia de vida, si lo comparamos con otras cuencas (las mismas del presente estudio), lo que pudiera promover la estructuración genética observada en ambas especies de parásitos. Algo similar describieron para la cuenca de Maullín, sustentando la estructuración observada en una subpoblación de la especie W antes comentada. Por lo tanto, ello nos otorga más evidencia de que la influencia de la movilidad otorgada por el hospedero intermediario si pudiera representar un aspecto significativo en la estructuración genética poblacional observada en estos parásitos.

Se debe considerar que la segregación entre niveles altos y bajos de las cuencas que experimentan las poblaciones de *Galaxias maculatus*, podría haberse visto acentuada en los últimos años por desplazamientos ocasionados por la competencia con salmónidos introducidos, y por actividades humanas que alteran las condiciones de los cursos de agua, afectando significativamente la distribución y abundancia de ésta y otras especies de peces nativos (Habit *et al.* 2010), con los posibles efectos que ello tendría para los parásitos aquí estudiados. Cabe señalar también que el carácter fluctuante de este sistema ecológico comunitario (parásitos-hospederos) hace que lo aquí observado pueda cambiar significativamente en el tiempo, correspondiendo más a un patrón que a un fenómeno totalmente establecido y persistente para cada sitio particular.

El hecho de que la morfología del haplogrupo del gen COI en esta especie putativa (Figura 5) sea de tipo estrellada (un par de haplotipos centrales más abundantes, rodeados por haplotipos similares más raros), así como su mayor homogeneidad genética, sugiere un proceso de expansión poblacional reciente (posterior a un fenómeno de cuello de botella poblacional) para la especie Z (Nadler 1993, López *et al.* 2015), lo que da indicios de una historia evolutiva diferente para ambas especies de parásitos.

Otro aspecto a comentar es el hecho de que existió simpatria de las especies putativas a nivel de individuo hospedero (o de infrapoblación) (resultados no mostrados). En este sentido, el que un individuo hospedero intermediario aglomere parásitos de distintos genotipos a través de su historia de vida es un fenómeno común en la naturaleza (Lambrechts *et al.* 2006), lo cual reduciría las chances de reproducción entre clones (cuyas consecuencias sobre la genética poblacional son idénticas a las que tendría la autofertilización) en el hospedero definitivo (Criscione & Blouin 2006). Ahondando en lo anterior, posiblemente al existir el traspaso trófico a un determinado hospedero definitivo sea una de las especies la que tenga un desempeño superior por sobre la otra en cuanto a su capacidad infectiva, dependiendo de la identidad taxonómica del hospedero definitivo al que hayan sido transferidas, y actuando en base a la especialización y adaptaciones que tendría cada especie putativa a un hospedero definitivo en particular.

Es relevante comentar también el hecho de que la metodología genética empleada no permitió un discernimiento taxonómico a nivel de individuo de los ejemplares de *Tylodelphys*; por ejemplo, para discriminar a individuos clonales de individuos genéticamente emparentados. El no considerar los clones en los análisis es equiparable a contar más de una vez al mismo individuo, lo que seguramente provocó un aumento artificial de los valores de diferenciación genética (F_{ST} , Φ_{ST}) observados (Criscione *et al.* 2005). No obstante, los marcadores de todas formas fueron capaces de obtener una resolución a nivel de poblaciones para los taxones de parásitos aquí estudiados, permitiendo explorar y caracterizar su ecología en la región. Más aún, al realizar los análisis del gen COI bajo un enfoque extremadamente riguroso a este respecto, dejando una única secuencia representante de cada haplotipo por sitio, los resultados generales no mostraron cambios tales que contrariaran las conclusiones a las que se llegó bajo el enfoque utilizado (Anexo 6).

A futuro debieran estudiarse diversos aspectos con tal de abarcar de mejor forma el estudio de este grupo de parásitos. Entre ellos, por ejemplo, la caracterización bajo enfoques morfológicos y/o morfométricos de larvas metacercarias para la identificación taxonómica de estas posibles especies putativas, de ser posible comparándolas morfológica y genéticamente con especímenes identificados de la Patagonia Argentina, con tal de evaluar si corresponden o no a especies distintas. También el uso de otras metodologías genéticas de mayor resolución, que permitan una identificación a nivel de individuos (como SNP o microsatélites), serían más eficaces para caracterizar dinámicas ecológicas ocurriendo a nivel local; por ejemplo, evaluando la influencia de las fases clonales en las poblaciones. En su defecto, el cotejar un conjunto mayor de genes adicionales pudiera otorgar más robustez a la clasificación de especies putativas aquí conjeturada. Complementariamente, como prioridad para el estudio de este grupo debiese plantearse el identificar, mediante muestreos parasitarios, a las especies de aves que actúan como hospederos definitivos. Tal enfoque, junto con aportar importantes antecedentes sobre aspectos ecológicos que determinan la distribución de los parásitos (e incluso identificar subpoblaciones de las propias aves, al usar a los parásitos como bioindicadores), permitiría contar con individuos en estado adulto para realizar análisis taxonómicos y la descripción formal de nuevas especies, de corresponder. Existen amplios vacíos de conocimiento, a la vez que un amplio potencial de investigar sobre este componente parasítico y su influencia sobre las comunidades acuáticas locales. Solo aumentando el esfuerzo investigativo se pueden allanar vías para promover la conservación de este gremio, ante las distintas amenazas que enfrenta actualmente (Carlson *et al.* 2020).

Conclusión

Mediante un enfoque genético, se logró inferir la presencia de dos especies de *Tyloodelphys* en sistemas acuáticos continentales de la región centro-sur de Chile. Estas dos especies putativas tendrían dinámicas ecológicas diferenciadas entre sí. Los patrones genéticos espaciales observados entregan indicios sobre los patrones de desplazamiento de sus hospederos definitivos a través de distintas cuencas. Así mismo a nivel de cuenca se evidencia cierta estructuración genética en algunas de estas, que estaría dada por los patrones de desplazamiento otorgados por el hospedero intermediario *Galaxias maculatus* y posiblemente también por otros peces nativos. Se evidencia la complejidad inherente a la ecología del taxón estudiado, la que involucra múltiples factores bióticos y abióticos que permanecen por ser investigados.

Referencias bibliográficas

Abarca-Arenas, L., Valero-Pacheco, E., Delfín-Alfonso, C., Mortero-Ortiz, E., & Franco-López, J. (2022). Redes tróficas como herramienta para el estudio de la diversidad y complejidad de ecosistemas. *Revista mexicana de biodiversidad*, 93, e93416.

Achatz, T., Martens, J., Kostadinova, A., Pulis, E., Orlofske, S., Bell, J., Fecchio, A., Oyarzún-Ruiz, P., Syrota, Y., & Tkach V. (2022). Molecular phylogeny of *Diplostomum*, *Tylodelphys*, *Austrodiplostomum* and *Paralaria* (Digenea: Diplostomidae) necessitates systematic changes and reveals a history of evolutionary host switching events. *International Journal for Parasitology*, 52(1), 47-63.

Behrmann-Godel, J., & Brinker, A. (2016). Biology and ecology of perch parasites. En: Couture, P., & Pyle, G. (eds.), *Biology of Perch* (pp. 193-229). CRC Press, Florida.

Blasco-Costa, I., & Poulin, R. (2013). Host traits explain the genetic structure of parasites: a meta-analysis. *Parasitology*, 140, 1316-1322.

Blasco-Costa, I., Poulin, R., & Presswell, B. (2016). Morphological description and molecular analyses of *Tylodelphys* sp. (Trematoda: Diplostomidae) newly recorded from the freshwater fish *Gobiomorphus cotidianus* (common bully) in New Zealand. *Journal of Helminthology*, 91(3), 332-345.

Bowles, J., & McManus, D. (1993). Rapid discrimination of *Echinococcus* species and strains using a polymerase chain reaction-based RFLP method. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 57, 231-240.

Carlson, C., Hopkins, S., Bell, K., Doña, J., Godfrey, S., Kwak, M., Lafferty, K., Moir, M., Speer, K., Strona, G., Torchin, M., & Wood, C. (2020). A global parasite conservation plan. *Biological Conservation*, 250, 108596.

Casalins, L. 2022. La parasitofauna de *Larus dominicanus* en el Parque Nacional Nahuel Huapi. Tesis de doctorado, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche.

Catalano, S., Whittington, I., Donnellan, S., & Gillanders, B. (2014). Parasites as biological tags to assess host population structure: Guidelines, recent genetic advances and comments on a holistic approach. *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 3(2), 220-226.

Chibwana, F.D., Nkwengulila, G., Locke, S.A., McLaughlin, J.D., & Marcogliese, D.J. (2015). Completion of the life cycle of *Tylodelphys mashonense* (Sudarikov, 1971) (Digenea: Diplostomidae) with DNA barcodes and rDNA sequences. *Parasitology Research*, 114, 3675-3682.

- Choudhary, K., Kumar-Verma, A., Swaroop, S., & Agrawal, N. (2015). A review on the molecular characterization of digenean parasites using molecular markers with special reference to ITS region. *Helminthologia*, 52(3), 167-187.
- Choudhury, A., Aguirre-Macedo, M., Curran, S., de Núñez, M., Overstreet, R., Pérez-Ponce de León, G., & Santos, C. (2016). Trematode diversity in freshwater fishes of the Globe II: 'New World'. *Systematic Parasitology*, 93, 271-282.
- Cribb, T., Bray, R., & Littlewood, J. (2001). The nature and evolution of the association among digeneans, molluscs and fishes. *International Journal for Parasitology*, 31(9), 997–1011.
- Criscione, C., & Blouin, M. (2006). Minimal selfing, few clones, and no among-host genetic structure in a hermaphroditic parasite with asexual larval propagation. *Evolution*, 60(3), 553-562.
- Criscione, C., Anderson, J., Sudimack, D., Subedi, J., Upadhyay, R., Jha, B., Williams, K., Williams-Blangero, S., & Anderson, T. (2010). Landscape genetics reveals focal transmission of a human macroparasite. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4(4), e665.
- Criscione, C., Hulke, J., & Goater, C. (2022). Trematode clone abundance distributions: An eco-evolutionary link between parasite transmission and parasite mating systems. *The Journal of Parasitology*, 108(6), 565-576.
- Cushman, S., Wasserman, T., Landguth, E., & Shirk, A. (2013). Re-Evaluating causal modeling with Mantel tests in landscape genetics. *Diversity*, 5, 51-72.
- Cussac, V.E., Barrantes, M., Boy, C.C., Górski, K., Habit, E., Lattuca, M., & Rojo, J.H. (2020). New insights into the distribution, physiology and life histories of south American Galaxiid fishes, and potential threats to this unique fauna. *Diversity*, 12(5), 178.
- Delgado, M. L., Górski, K., Habit, E., & Ruzzante, D. (2019). The effects of diadromy and its loss on genomic divergence: The case of amphidromous *Galaxias maculatus* populations. *Molecular Ecology*, 28(24), 5217-5231.
- Delgado L., Manosalva A., Urbina, M., Habit, E., Link, O., & Ruzzante D. (2020). Genomic basis of the loss of diadromy in *Galaxias maculatus*: Insights from reciprocal transplant experiments. *Molecular Ecology*, 29, 4857-4870.
- Desdevises, Y. (2007). Cophylogeny: insights from fish-parasite systems. *Parassitologia*, 49, 125-128.
- Drago, F., & Lunaschi, L. (2008). Description of a new species of *Tylodelphys* (Digenea, Diplostomidae) in the wood stork, *Mycteria americana* (Aves, Ciconiidae) from Argentina. *Acta Parasitológica*, 53(3), 263-267.

- Duan, Y., Al-Jubury, A., Kania, P.W., & Buchmann, K. (2021). Trematode diversity reflecting the community structure of Danish freshwater systems: molecular clues. *Parasites & Vector*, 14, 43.
- Dyer, B. (2000). Systematic review and biogeography of the freshwater fishes of Chile. *Estudios Oceanológicos*, 19, 77-98.
- Estades, C., Vukasovic, A., & Aguirre, J. (2017). Birds in coastal wetlands of Chile. En: Fariña, J., & Camaño, A. (eds.), *The Ecology and Natural History of Chilean Saltmarshes* (pp 47-70). Springer, New York.
- Excoffier, L & Lischer H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567.
- Falke, L., & Preston, D. (2021). Freshwater disease hotspots: Drivers of fine-scale spatial heterogeneity in trematode parasitism in streams. *Freshwater Biology*, 67(3), 487-497.
- Faltýnková, A., Sures, B., & Kostadinova, A. (2016). Biodiversity of trematodes in their intermediate mollusc and fish hosts in the freshwater ecosystems of Europe. *Systematic Parasitology*, 93, 283-293.
- Fernández, V., Semenas, L., & Viozzi, G. (2012). Parasites of the “peladilla”, *Aplochiton zebra* (Osmeriformes: Galaxiidae), from Patagonia (Argentina and Chile). *Comparative Parasitology*, 79(2), 231-237.
- Fernández, V., Garibotti, G., Semenas, L., & Viozzi, G. (2015). Influence of biotic and abiotic factors on the metazoan parasite communities of a native prey fish: study in 28 Andean Patagonian lakes. *Ecología Austral*, 25(3), 221-230.
- Fischhoff, I., Huang, T., Hamilton, S., Han, B., LaDeau, S., Ostfeld, R., Rosi, E., & Solomon, C. (2020). Parasite and pathogen effects on ecosystem processes: A quantitative review. *Ecosphere*, 11(5), e03057.
- Flores, V., & Baccalá, N. (1998). Multivariate analyses in the taxonomy of two species of *Tylodelphys* Diesing, 1850 (Trematoda: Diplostomidae) from *Galaxias maculatus* (Teleostei: Galaxiidae). *Systematic Parasitology*, 40, 221-227.
- Flores, V., & Semenas, L. (2002). Infections patterns of *Tylodelphys barilochensis* and *T. Crubensis* (Trematoda: Diplostomidae) metacercariae in *Galaxias maculatus* (Osmeriformes: Galaxiidae) from two Patagonian lakes and observations on their geographical distribution in the southern Andean region, Argentina. *The Journal of Parasitology*, 88(6), 1135-1139.

- Froeschke, G., & Heyden, S. (2014). A review of molecular approaches for investigating patterns of coevolution in marine host-parasite relationships. *Advances in Parasitology*, 84(C), 209-252.
- Galpern, P., Peres-Neto, P., Polfus, J., & Manseau, M. (2014). MEMGENE: Spatial pattern detection in genetic distance data. *Methods in Ecology and Evolution*, 5(10), 1116-1120.
- Garant, D., Forde, S., & Hendry, A. (2007). The multifarious effects of dispersal and gene flow on contemporary adaptation. *Functional Ecology*, 21, 434-443.
- García-Varela, M., Sereno-Urbe, A.L., Pinacho-Pinacho, C.D., Hernández-Cruz, E., & Pérez-Ponce de León, G. (2016). An integrative taxonomic study reveals a new species of *Tyloodelphys* Diesing, 1950 (Digenea: Diplostomidae) in central and northern Mexico. *Journal of Helminthology*, 90(6), 668-679.
- Garroway, C., Radersma, R., Sepil, I., Santure, A., Cauwer, I., Slate, J., & Sheldon, B. (2013). Fine-scale genetic structure in a wild bird population: The role of limited dispersal and environmentally based selection as causal factors. *Evolution*, 67(12), 3488-3500.
- George-Nascimento, M., López-Rodríguez, R., & Górski, K. (2020). Geographic variation in composition of metazoan parasite infracommunities in *Galaxias maculatus* Jenyns 1842 (Osmeriformes: Galaxiidae) in southern Chile (38-47° S). *Revista Chilena de Historia Natural*, 93(2).
- Gibson, D., & Bray, R. (1994). The evolutionary expansion and host-parasite relationships of the digenea. *International Journal for Parasitology*, 24(8), 1213-1226.
- Gómez, A., & Nichols, E. (2013). Neglected wild life: Parasitic biodiversity as a conservation target. *International Journal of Parasitology: Parasites and Wildlife*, 2, 222-227.
- González, A. L., Vukasovic, M., & Estades, C. F. (2011). Temporal variability in the abundance and diversity of aquatic birds in the Itata River wetland, Bio-Bio Region, Chile. *Gayana (Concepción)*, 75(2), 170-181.
- González-Gajardo, A., Victoriano, P., & Schlatter, R. (2009). Waterbirds assemblages and habitat characteristics in wetlands: Influence of temporal variability on species-habitat relationships. *Waterbirds*, 32(2), 225-233.
- González-Wevar, C., Salinas, P., Hune, M., Segovia, N., Vargas-Chacoff, L., Astroga, M., Cañete, J., & Poulin, E. (2015). Phylogeography in *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1848) along two biogeographical provinces in the Chilean coast. *PLoS ONE*, 10(7), e0131289.
- Goodall-Copestake, W., Tarling, G., & Murphy, E. (2012). On the comparison of population-level estimates of haplotype and nucleotide diversity: a case study using the gene *cox1* in animals. *Heredity*, 109, 50-56.

- Górski, K., Habit, E., Pingram, M., & Manosalva, A. (2018). Variation of the use of marine resources by *Galaxias maculatus* in large Chilean rivers. *Hydrobiologia*, 814, 61-73.
- Gupta, P., Vishnudas, C., Ramakrishnan, U., Robin, V., & Dharmarajan, G. (2019). Geographical and host species barriers differentially affect generalist and specialist parasite community structure in a tropical sky-island archipelago. *Proceedings of the Royal Society B*, 1904(286), 20190439.
- Habit, E., Dyer, B., & Vila, I. (2006). Estado de Conocimiento de los peces dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, 70(1), 100-113.
- Habit, E., & Victoriano, P. (2005). Peces de agua dulce de la Cordillera de la Costa. En: Smith-Ramírez, C., Armesto, J., & Valdovinos, C. (eds.). Historia, biodiversidad y ecología de los bosques costeros de Chile (pp. 392-406), Editorial Universitaria.
- Habit, E., Piedra, P., Ruzzante, D., Walde, S., Belk, M., Cussac, V., González, J., & Colin, N. (2010). Changes in the distribution of native fishes in response to introduced species and other anthropogenic effects. *Global Ecology and Biogeography*, 19(5), 697-710.
- Habit, E., Górski, K., Alò, D., Ascencio, E., Astorga, A., Colin, N., Contador, T., de los Ríos, P., Delgado, V., Dorador, C., Fierro, P., García, K., Parra, O., Quezada-Romegialli, C., Ried, B., Rivera, P., Soto-Azat, C., Valdovinos, C., Vera-Escalona, I., & Woelfl S. (2019). Biodiversidad de Ecosistemas de Agua Dulce, 64 pp. Mesa Biodiversidad-Comité Científico COP25; Ministerio de Ciencia, Tecnología, Conocimiento e Innovación.
- Habit-Victoriano, L. (2023). Parasitismo por *Tylodelphys* sp. en peces dulceacuícolas del Centro-Sur de Chile y su efecto sobre el nicho isotópico de los peces hospedadores. Tesis de grado, Universidad de Concepción.
- Hammer, O., Harper, D., & Ryan, P. (2001). PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontologia Electronica*, 4(1), 1-9.
- Hatcher, M., Dick, J., & Dunn, A. (2006). How parasites affect interactions between competitors and predators. *Ecology Letters*, 9(11), 1253-1271.
- Hayes, F., Nakamura, L., Hiss, N., & Capllonch, P. (2023). Seasonal distribution of the Cocoli Heron (*Ardea cocoi*) and Great Egret (*Ardea alba*) in southern South America: Evidence for partial migration. *Journal of Heron Biology and Conservation*, 8(4), 2.
- Hechinger, R., & Lafferty, K. (2005). Host diversity begets parasite diversity: bird final hosts and trematodes in snail intermediate hosts. *Proceedings of the Royal Society B*, 272, 1059-1066.
- Heneberg, P., & Sitko, J. (2021). Cryptic speciation among *Tylodelphys* spp.: the major helminth pathogens of fish and amphibians. *Helminthology*, 120, 1687-1697.

- Hinojosa-Sáez, A., & González-Acuña, D. (2005). Estado actual del conocimiento de helmintos en aves silvestres de Chile. *Gayana*, 69(2), 241-253.
- Hudson, P., Dobson, A., & Lafferty, K. (2006). Is a healthy ecosystem one that is rich in parasites? *Trends in Ecology & Evolution*, 21(7), 381-385.
- Huyse, T., Poulin, R., & Théron, A. (2005). Speciation in parasites: a population genetics approach. *Trends in Parasitology*, 21(10), 469-475.
- Janecka, M., Rovenolt, F., & Stephenson, J. (2021). How does host social behavior drive parasite non-selective evolution from the within-host to the landscape-scale?. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 75, 150.
- Johnson, K., Malenke, J., & Clayton, D. (2009). Competition promotes the evolution of host generalists in obligate parasites. *Proceedings of the Royal Society B*, 276, 3921–3926.
- Johnson, P., Calhoun, D., Moss, W., McDevitt-Galles, T., Riepe, T., Hallas, J., Parchman, T., Feldman, C., Achatz, T., Tkach, V., Cropanzano, J., Bowerman, J., & Koprivnikar, J. (2020). The cost of travel: How dispersal ability limits local adaptation in host-parasite interactions. *Journal of Evolutionary Biology*, 34, 512-524.
- Kasinsky, T., Rosciano, N., Vianna, J., Yorio, P., & Campagna, L. (2024). Population structure and connectivity among coastal and freshwater Kelp Gull (*Larus dominicanus*) populations from Patagonia. *PLoS ONE*, 19(4): e0301004.
- Keeney, D., King, T., Rowe, D., & Poulin, R. (2009). Contrasting mtDNA diversity and population structure in a direct-developing marine gastropod and its trematode parasites. *Molecular Ecology*, 18, 4591–4603.
- Koehler, A., Springer, P., Randhawa, T., Leung, F., Keeney, D., & Poulin, R. (2011). Genetic and phenotypic influences on clone-level success and host specialization in a generalist parasite. *Journal of Evolutionary Biology*, 25, 66-79.
- Kwak, M., Heath, A., & Cardoso, P. (2020). Methods for the assessment and conservation of threatened animal parasites. *Biological Conservation*, 248: 108696.
- Lambrechts, L., Fellous, S., & Koella, J. (2006). Coevolutionary interactions between host and parasite genotypes. *Trends in Parasitology*, 22(1), 12-16.
- Lebedeva, D., Zietara, M., Mendsaikhan, B., Ermolenko, A., & Lumme, J. (2023). Survivors from a Pliocene climate catastrophe: *Gyrodactylus* (Platyhelminthes, Monogenea) parasites of the relict fishes in the Central Asian internal drainage basin of Mongolia. *Diversity*, 15(7), 860.

Legendre, P., & Fortin, M. (2010). Comparison of the Mantel test and alternative approaches for detecting complex multivariate relationships in the spatial analysis of genetic data. *Molecular Ecology Resources*, 10(5), 831-844.

Legendre, P., & Legendre, L. (2012). *Numerical Ecology*. Elsevier.

Leggett, H., Buckling, A., Long, G., & Boots, M. (2013). Generalism and the evolution of parasite virulence. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(10), 592–596.

Locke, S., Al-Nasiri, F., Caffara, M., Drago, F., Kalbe, M., Lapierre, A., McLaughlin, D., Nie, P., Overstreet, R., Souza, G., Takemoto, R., & Marcogliese, D. (2015). Diversity, specificity and speciation in larval Diplostomidae (Platyhelminthes: Digenea) in the eyes of freshwater fish, as revealed by DNA barcodes. *International Journal for Parasitology*, 45(13), 841-855.

López, Z., Cárdenas, L., Runil, F., & González, M. (2015). Contrasting definitive hosts as determinants of the genetic structure in a parasite with complex life cycle along the south-eastern Pacific. *Molecular Ecology*, 24(5), 1060-1073.

López-Rodríguez, R., George-Nascimento, M., & Górski, K. (2021). Effects of the cranial parasite *Tylodelphys* sp. on the behavior and physiology of puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842). *PeerJ*, 9, e11095.

Lumpkin, D., Jennings, S., Warnock, N., & Condeso, T. (2023). Partial migration by Great Egrets *Ardea alba* in coastal California. *Waterbirds*, 45(2), 150-158.

Maddison, W., & Whitton, J. (2023). The Species as a reproductive community emerging from the past. *Bulletin of the Society of Systematic Biologists*, 2(1), 1-35.

Mallet, J. (2005). Hybridization as an invasion of the genome. *Trends in Ecology and Evolution*, 20(5), 229-237.

Manosalva, A., Pérez, S., Toledo, B., Colin, N., Habit, E., & Górski, K. (2021). Variation of stomach content and isotopic niche of puye *Galaxias maculatus* (Jenyns, 1842) in large river systems of southern Chile. *Freshwater Biology*, 66(6), 1110-1122.

Martens, J. (2023). Diversity, phylogenetics and life cycles of diplostomoidean (Digenea: Diplostomoidea) of the upper Midwest. Tesis de Magíster, University of North Dakota, Grand Forks.

Martínez-Bakker, M., & Helm, B. (2015). The influence of biological rhythms on host-parasite interactions. *Trends in Ecology and Evolution*, 30(6), 314-326.

Mattiuci, S., Cimmaruta, R., Cipriani, P., Abaunza, P., Bellisario, B., & Nascetti, G. (2014). Integrating *Anisakis* spp. parasites data and host genetic structure in the frame of a holistic approach for stock identification of selected Mediterranean Sea fish species. *Parasitology*, 142(1), 90-108.

- Mazé-Guilmo, E., Blanchet, S., McCoy, K., & Loot, G. (2016). Host dispersal as the driver of parasite genetic structure: a paradigm lost?. *Ecology Letters*, 19(3), 336-347.
- McDowall R. (2003). Variation in vertebral number in galaxiid fishes (Teleostei: Galaxiidae): a legacy of life history, latitude and length. *Environmental Biology of Fishes*, 66, 361-381.
- Ministerio del Medio Ambiente. (2018). Biodiversidad de Chile: Patrimonio y Desafíos, tercera edición, Tomo I. Santiago.
- Molnár, P., Dobson, A., & Kutz, S. (2013). Gimme shelter - The relative sensitivity of parasitic nematodes with direct and indirect life cycles to climate change. *Global Change Biology*, 19(11), 3291-3305.
- Moszczyńska, A., Locke, S., McLaughlin, D., Marcogliese, D., & Crease, T. (2009). Development of primers for the mitochondrial cytochrome c oxidase I gene in digenetic trematodes (Platyhelminthes) illustrates the challenge of barcoding parasitic helminthes. *Molecular Ecology Resources*, 9(1), 75-82.
- Muñoz, J., Staks, G., & Knopf, K. (2017). The eye fluke *Tylodelphys clavata* affects prey detection and intraspecific competition of European perch (*Perca fluviatilis*). *Parasitology research*, 116(9), 2561-2567.
- Nadler, S. (1995). Microevolution and the genetic structure of parasite populations. *The Journal of Parasitology*, 81(3), 395-403.
- Niewiadomska K. 2002. Family Diplostomidae Poirier, 1886. En: Gibson, D., Jones, A., & Bray, R. (eds.) Keys to the Trematoda, Vol. 1 (pp. 167-196). CABI Publishing & The Natural History Museum, Wallingford.
- Niewiadomska, K., & Pojmanska, T. (2011). Multiple strategies of digenetic trematodes to complete their life cycles. *Annals of Parasitology*, 57, 233-241.
- Olmos, V., & Muñoz, G. (2006). Estado de conocimiento de los parásitos eumetazoos de organismos dulceacuícolas de Chile. *Gayana*, 70(1), 122-139.
- Otachi, E., Locke, S., Jirsa, F., Fellner-Frank, C., & Marcogliese, D. (2015). Morphometric and molecular analyses of *Tylodelphys* sp. metacercariae (Digenea: Diplostomidae) from the vitreous humour of four fish species from Lake Naivasha, Kenya. *Journal of Helminthology*, 4, 1-11.
- Oyarzún-Ruiz, P., & González-Acuña, D. (2021). Checklist and state of knowledge of helminths in wild birds from Chile: an update. *Austral Journal of Veterinary Sciences*, 53(1), 63-72.

- Pérez-Ponce de León, G. (1995). Host-induced morphological variability in adult *Posthodiplostomum minimum* (Digenea: Neodiplostomidae). *The Journal of Parasitology*, 81(5), 818-820.
- Pérez-Ponce de León, G., & Choudhury, A. (2005). Biogeography of helminth parasites of freshwater fishes in Mexico: the search for patterns and processes. *Journal of Biogeography*, 32(4), 645-659.
- Pérez-Ponce de León, G., Sereno-Uribe, A., Pinacho-Pinacho, C., & García-Varela, M. (2022). Assessing the genetic diversity of the metacercariae of *Posthodiplostomum minimum* (Trematoda: Diplostomidae) in Middle American freshwater fishes: one species or more?. *Parasitology*, 149(2), 239-252.
- Perkins, S., Martinsen, E., & Falk, B. (2011). Do molecules matter more than morphology? Promises and pitfalls in parasites. *Parasitology*, 138(13), 1664-1674.
- Piedra, P., Habit, E., Oyanedel, A., Colin, N., Solis-Lufí, K., González, J., Jara, A., Ortiz, N., & Cifuentes, R. (2012). Patrones de desplazamiento de peces nativos en el Río San Pedro (cuenca del Río Valdivia, Chile). *Gayana (Concepción)*, 76, 59-70.
- Pietroock, M., & Marcogliese, D. (2003). Free-living endohelminth stages: at the mercy of environmental conditions. *Trends in Parasitology*, 19(7), 293–299.
- Poulin, R. (1996). The evolution of life history strategies in parasitic animals. *Advances in Parasitology*, 37, 107-134.
- Poulin, R. (2007). Evolutionary ecology of parasites. 2nd Edition. Princeton University Press, Princeton.
- Poulin, R. (2010). Parasite manipulation of host behavior: An update and frequently asked questions. *Advances in the Study of Behavior*, 41, 151-186.
- Poulin, R., Krasnov, B., Mouillot, D., & Thieltges D. (2011). The comparative ecology and biogeography of parasites. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, 366, 2379-2390.
- Poulin, R., Krasnov, B., Pílosof, S., & Thieltges, D. (2013). Phylogeny determines the role of helminth parasites in intertidal food webs. *Journal of Animal Ecology*, 82(6), 1265-1275.
- Poulin, R. (2014). Parasite biodiversity revisited: frontiers and constraints. *International Journal for Parasitology*, 44(9), 581-589.
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., & Achaz, G. (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21, 1864-1877.
- R Core Team. (2023). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Ramírez-Álvarez, R., Contreras, S., Vivancos, A., Reid, M., López-Rodríguez, R., & Górski, K. (2022). Unpacking the complexity of longitudinal movement and recruitment patterns of facultative amphidromous fish. *Nature Scientific Reports*, 12 (3164), 1-12.
- Rambaut, A. (2018). FigTree v1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rauch, G., Kalbe, M., & Reusch, B. (2005). How a complex life cycle can improve a parasite's sex life. *Journal of Evolutionary Biology*, 18(4), 1069-1075.
- Rauque, C., Viozzi, G., Flores, V., Vega, R., Waicheim, A., & Salgado-Maldonado, G. (2018). Helminth parasites of alien freshwater fishes in Patagonia (Argentina). *International Journal for Parasitology: Parasites and Wildlife*, 7(3), 369-379.
- Rieger, J., Haase, D., Reusch, T., & Kalbe, M. (2013). Genetic compatibilities, outcrossing rates and fitness consequences across life stages of the trematode *Diplostomum pseudospathaceum*. *International Journal for Parasitology*, 43(6), 485-491.
- Rojas, P., Vila, I., Habit, E., & Castro, S. (2019). Homogenization of the freshwater fish fauna of the biogeographic regions of Chile. *Global Ecology and Conservation*, 19, e00658.
- Rojo, J., Fernández, D., Figueroa, D., & Boy, C. (2020). Phenotypic and genetic differentiation between diadromous and landlocked puyen *Galaxias maculatus*. *Journal of Fish Biology*, 96(4), 956-967.
- Ronquist, F., Teslenko, P., van der Mark, D., Ayres, A., Darling, S., Höhna, B., Larget, L., Liu, M., Suchard, M., & Huelsenbeck, J. (2012). MRBAYES 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. *Systematic Biology*, 61, 539-542.
- Rosenberg, M.S., & C., Anderson. (2011). PASSaGE: Pattern Analysis, Spatial Statistics and Geographic Exegesis. Version 2. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(3), 229-232.
- Rozas, J., A., J., Ferrer-Mata, Sánchez-Del Barrio, S., Guirao-Rico H., Librado, P., Ramos-Onsins, S., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP v6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution*, 34, 3299-3302.
- Sandaña, A. (2018). Biodiversidad de parásitos digeneos en tres especies de invertebrados endémicos de la Antártica. Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad Austral de Chile, Valdivia.
- Selbach, C., Jorge, F., Dowle, E., Bennett, J., Chai, X., Doherty, J., Eriksson, A., Filion, A., Hay, E., Herbison, R., Lindner, J., Park, E., Presswell, B., Ruehle, B., Sobrinho, P., Wainwright, E., & Poulin, R. (2019). Parasitological research in the molecular age. *Parasitology*, 146(11), 1361-1370.

- Sereno-Urbe, A., Andrade-Gómez, L., Pérez-Ponce de León, G., & García-Varela, M. (2019). Exploring the genetic diversity of *Tylodelphys* (Diesing, 1850) metacercariae in the cranial and body cavities of Mexican freshwater fishes using nuclear and mitochondrial DNA sequences, with the description of a new species. *Parasitology Research*, 118, 203-217.
- Scholz, T., & Choudhury, A. (2014). Parasites of freshwater fishes in North America: Why so neglected?. *The Journal of Parasitology*, 100(1), 26-45.
- Siegmund, I., Franjola, R., & Torres, P. (1997). Diplostomatid metacercariae in the brain of silversides from Lake Riñihue, Chile. *Journal of Wildlife Diseases*, 33(2), 362-364.
- Smith, J. (1966). Sympatric speciation. *The American Naturalist*, 916, 637-650.
- Soldánová, M., Georgieva, S., Roháčová, J., Knudsen, R., Kuhn, J., Henriksen, E., Siwertsson, A., Shaw, J., Kuris, A., Amundsen, P., Scholz, T., Lafferty, K., & Kostadinova, A. (2017). Molecular analyses reveal high species diversity of trematodes in a sub-Arctic lake. *International Journal for Parasitology*, 47(6), 327-345.
- Soto, D., Arismendi, I., González, J., Sanzana, J., Jara, F., Jara, C., Guzmán, E., & Lara, A. (2006). Southern Chile, trout and salmon country: invasion patterns and threats for native species. *Revista Chilena de Historia Natural*, 79, 97-117.
- Soto-Mora, Y. (2013). Determinación de áreas de conservación en las cuencas de los ríos Baker y Pascua, Chile, basada en la estructura taxonómica de los ensambles de aves acuáticas continentales (tesis). Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Concepción.
- Sures, B., Nachev, M., Selbach, C., & Marcogliese, D. (2017). Parasite responses to pollution: what we know and where we go in 'Environmental Parasitology'. *Parasites & Vectors*, 10, 65.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution*, 38, 3022-3027.
- Tchuem-Tchuente, L., Imbert-Estabet, D., Delay, B., & Jourdane, J. (1993). Choice of mate, a reproductive isolating mechanism between *Schistosoma intercalatum* and *S. mansoni* in mixed infections. *International Journal for Parasitology*, 23(2), 179-185.
- Thieltges, D., Hof, C., Dehling, D., Brandle, M., Brandl, R., & Poulin, R. (2011). Host diversity and latitude drive trematode diversity patterns in the European freshwater fauna. *Global Ecology and Biogeography*, 20, 675-682.
- Torres, P., Franjola, R., & Montefusco, A. (1996). Seasonal infection by metacercaria of *Diplostomum* (*Austrodiplostomum*) *mordax* (Szidat and Nani, 1951) and *Tylodelphys*

destructor Szidat and Nani, 1951 in the Chilean silverside, *Basilichtys australis* Eigenmann, 1927 (Pisces: Atherinidae) in Lake Riñihue. *Boletín Chileno de Parasitología*, 51, 15-19.

Tripet, F., Christe, P., & Moller, A. (2002). The importance of host spatial distribution for parasite specialization and speciation: A comparative study of bird fleas (Siphonaptera: Ceratophyllidae). *Journal of Animal Ecology*, 71(5), 735-748.

Trouvé, S., Renaud, F., Durand, P., & Jourdane, J. (1998). Experimental evidence of hybrid breakdown between genetically distinct populations of *Echinostoma caproni*. *Parasitology*, 117, 133-135.

Trouvé, S., Renaud, F., Durand, P., & Jourdane, J. (1999). Reproductive and mate choice strategies in the hermaphroditic flatworm *Echinostoma caproni*. *The Journal of Heredity*, 90(5), 582-585.

Valtonen, E., Marcogliese, D., & Julkunen, M. (2010). Vertebrate diets derived from tropically transmitted fish parasites in the Bothnian Bay. *Oecologia*, 162, 139-152.

Veliz, D., Catalán, L., Pardo, R., Acuña, P., Díaz, A., Poulin, E., & Vila, I. (2012). The genus *Basilichtys* (Teleostei: Atherinopsidae) revisited along its Chilean distribution range (21° to 40° S) using variation in morphology and mtDNA. *Revista Chilena de Historia Natural*, 85(1), 49-59.

Vermaak, A. (2021). Diversity of digenean trematodes of *Clinus superciliosus* (Linnaeus, 1758) from the coast of South Africa. Master Dissertation, NorthWest University, Kirkland, Estados Unidos.

Victoriano, P., Vera, I., Olmos, V., Dib, M., Insunza, B., Muñoz-Ramírez, C., Montoya, R., Jara, A., & Habit, E. (2012). Patrones idiosincráticos de diversidad genética de los peces nativos del río San Pedro (cuenca del río Valdivia), un sistema de la región glaciada del sur de Chile. *Gayana*, 76, 71-85.

Viozzi, G., Semenas, L., Brugni, N., & Flores, V. (2009). Metazoan parasites of *Galaxias maculatus* (Osmeriformes: Galaxiidae) from Argentinean Patagonia. *Comparative Parasitology*, 76(2), 229-239.

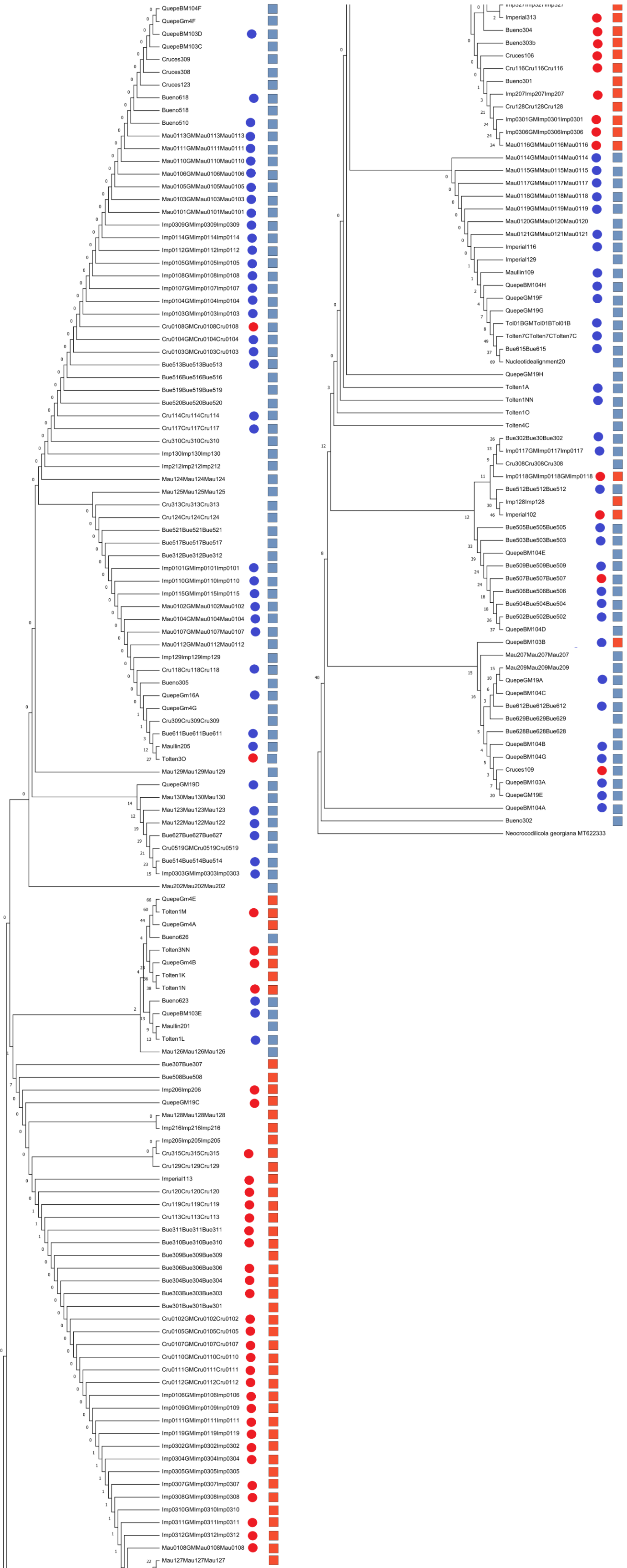
Weir, B., & Cockerman, C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370.

Zbikowska, E., & Nowak, A. (2009). One hundred years of research on the natural infection of freshwater snails by trematode larvae in Europe. *Parasitology Research*, 105, 301-311.

Zhang, F., Wang, J., & Zeng, Y. (2021). The selectivity for the second intermediate host (fish) of *Clonorchis sinensis* in the Jialing River basin, China, from the perspective of fish ecological viewpoint. *Biologia*, 76, 91-100.

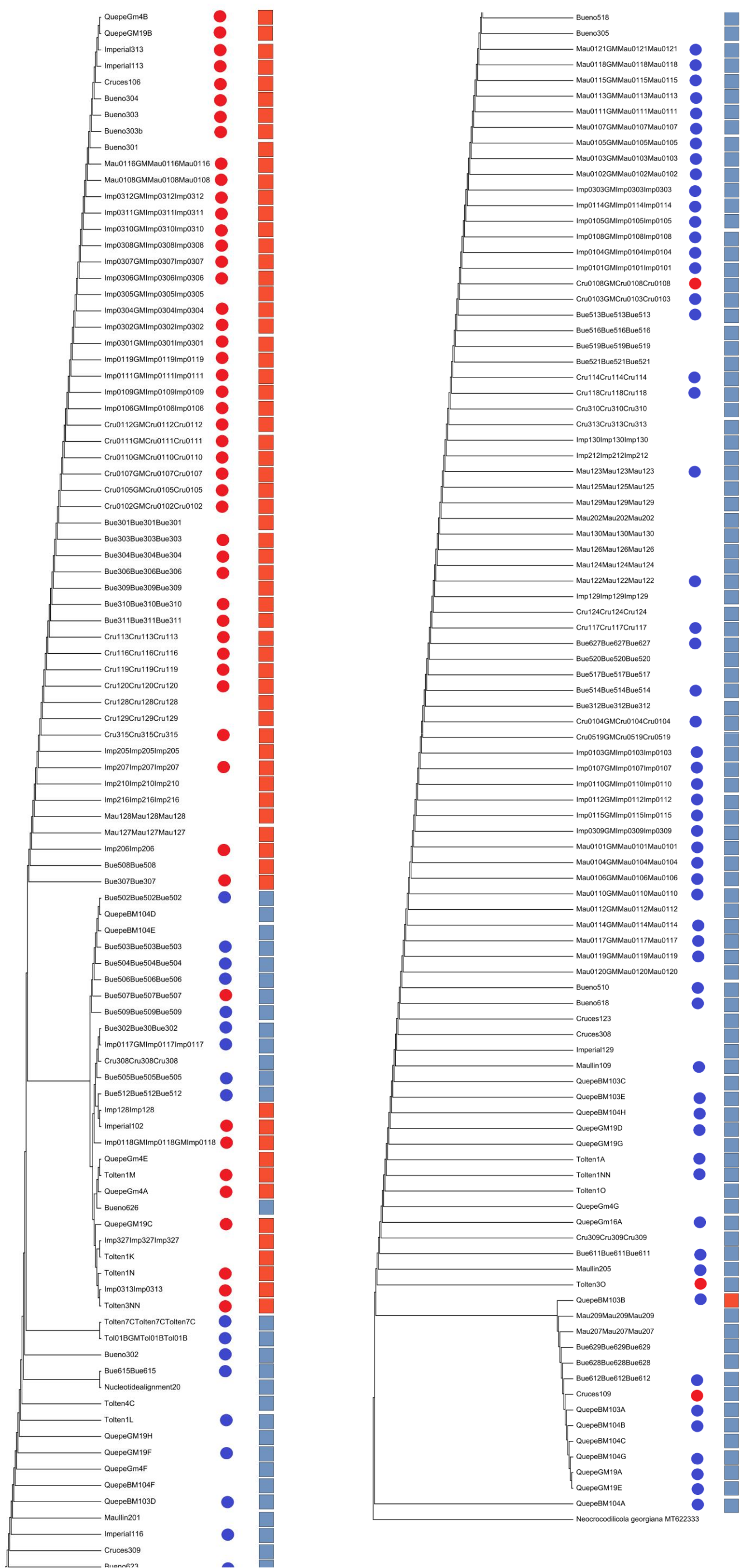
Anexo 2: Árbol filogenético Neighbour Joining para gen 28S

Porcentaje de soporte de nodos indicados sobre cada rama. Los círculos representan la clasificación de las secuencias a especies putativas hecha a partir del análisis ABGD para el gen COI. Los cuadrados representan la clasificación hecha por la identidad del nucleótido n°963 del gen 28S (Especie Z = rojo, Especie W = azul, para ambos símbolos). El árbol fue dividido, siendo el gráfico de la derecha la continuación hacia abajo del anterior.



Anexo 3: Árbol filogenético Maximum Likelihood para gen 28S

Los círculos representan la clasificación de las secuencias a especies putativas hecha a partir del análisis ABGD para el gen COI. Los cuadrados representan la clasificación hecha por la identidad del nucleótido n°963 del gen 28S (Especie Z = rojo, Especie W = azul, para ambos símbolos). El árbol fue dividido, siendo el gráfico de la derecha la continuación hacia abajo del anterior.

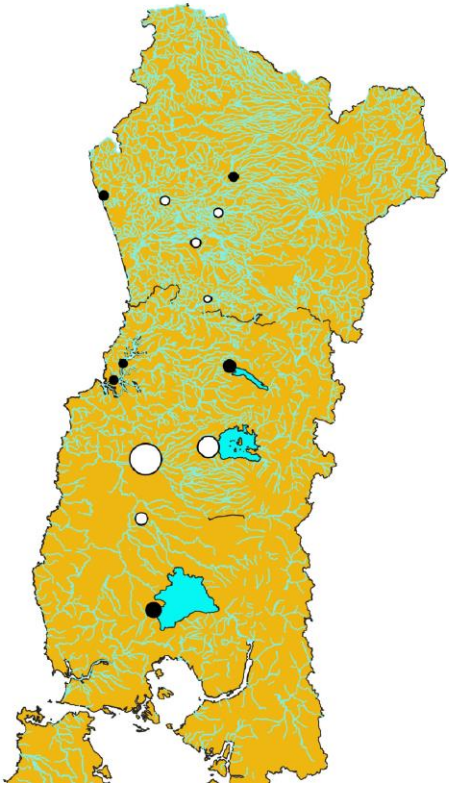


Anexo 4: Análisis dbMEM para la especie Z, ajustada por clones

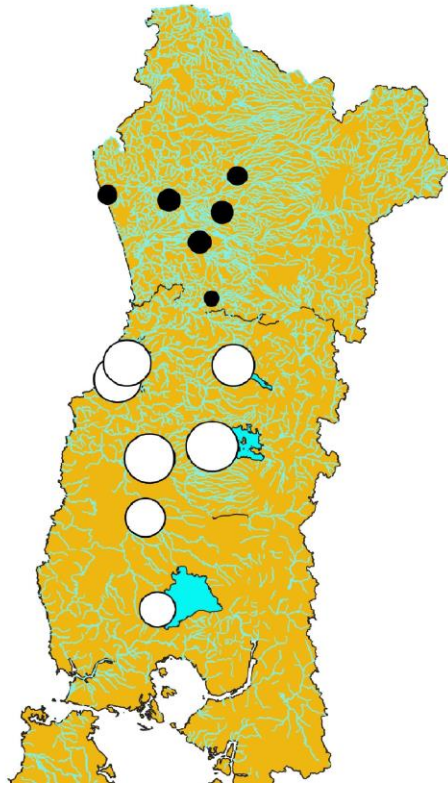
Análisis efectuado tras remover "Pseudo-clones" del gen COI. Esto consistió en que al existir dos o más secuencias idénticas por sitio, se dejó una única secuencia representante de cada haplotipo por sitio. Lo anterior con tal de reducir la inflación artificial de los valores de diferenciación genética (F_{ST}) para ese gen (Criscione *et al.* 2005).

		R^2_{ajustado} del modelo global = 0,0467		
<u>Proporción de la variación (R^2) explicada por cada variable MEMGENE :</u>		valor $p = 0,002$		
{	57,3%	30,9%	11,9%	}

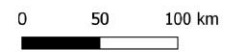
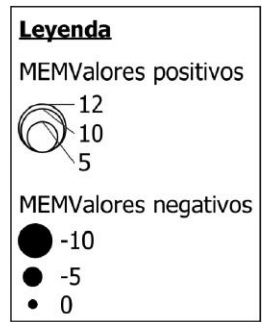
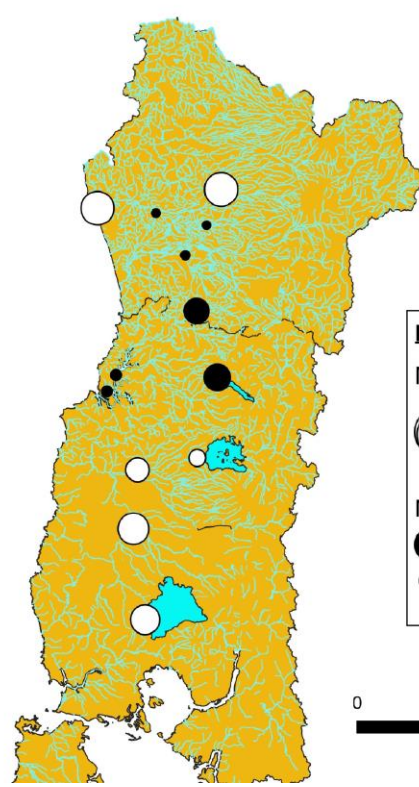
Variable MEMGENE 1



Variable MEMGENE 2



Variable MEMGENE 3



Anexo 6: Resultados Análisis genéticos poblacionales (COI) bajo enfoque riguroso

Para los análisis se dejó tan solo una secuencia representativa de cada haplotipo del gen COI por sitio, aunando las de los sitios con distancias menores a 7 kms entre sí (Toltén1 y 2; Cruces3 y Valdivia4). Ello con tal de inhibir la influencia de posibles individuos clones en los datos (“pseudo-clones”), lo que aumentaría artificialmente los valores de diferenciación genética cuando no fuera considerado (Criscione *et al.* 2005). Descripción de cada tabla y figura es homologable a la presente en el texto principal de esta tesis.

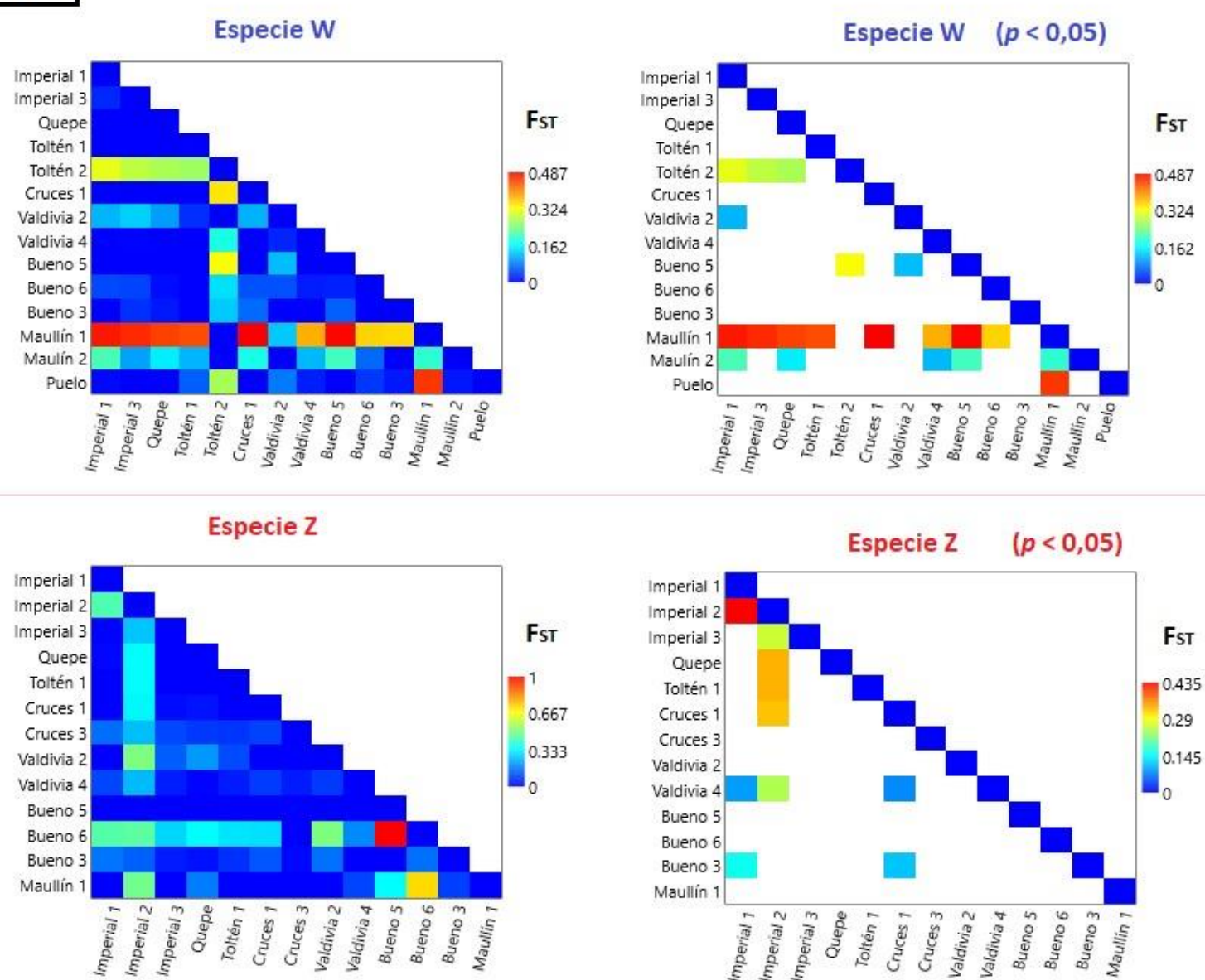
Sitio	N° peces muestreados	Tylo delphys Especie W	Diversidad nucleótidos (π) (sp. W) ^o	N° Pseudo- ** clones (sp. W)	N° sitios polimórficos (S) (sp. W)	Tylo delphys Especie Z	Diversidad nucleótidos (π) (sp. Z) ^o	N° Pseudo- ** clones (sp. Z)	N° sitios polimórficos (S) (sp. Z)
Imperial 1	14	17	0,008877	7	14	9	0,00433	2	6
Imperial 2	16	0	-	-	-	3	0,00459	-	3
Imperial 3	17	8	0,01052	-	15	21	0,00551	10	9
Quepe	6*	17	0,01073	6	15	6	0,00454	2	4
Toltén 1	3	9	0,00605	5	5	15	0,00519	8	7
Toltén 2	2	7	0,01406	2	12	0	-	-	-
Cruces 1	12	6	0,0499	1	5	16	0,00605	7	10
Cruces 3	2	0	-	-	-	2	0,01136	-	5
Valdivia 2	6	10	0,01512	3	16	2	0,00454	-	2
Valdivia 4	10	16	0,01048	6	17	10	0,00698	2	8
Bueno 5	14	16	0,00794	7	11	1	-	-	-
Bueno 6	8	11	0,01653	1	21	1	-	-	-
Bueno 3	3	2	0,01136	-	5	6	0,00828	-	9
Mauilín 1	12	21	0,01130	6	19	2	0,00227	-	1
Mauilín 2	4	5	0,01959	-	15	0	-	-	-
Puelo	2	3	0,00610	-	4	0	-	-	-
GLOBAL	125	148	0,01217	44	44	94	0,00555	31	25

* Cifra incluye 2 ejemplares de *Basilichthys microlepidotus*

** N° de secuencias de pseudo-clones removidas de análisis posteriores (Por cada sitio se dejó una representante de cada haplotipo de pseudo-clones)

^o [π] Calculada tras remover las secuencias de pseudo-clones (excepto una)

Gen COI



Especie W

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación	Índices de fijación	Valor de estadístico	Valor p asociado
Entre cuencas	6	12,61	Φ_{CT}	0,126	0,169
Entre poblaciones dentro cuencas	7	6,65	Φ_{SC}	0,076	0,028
Dentro de poblaciones	90	80,74	Φ_{ST}	0,193	< 0,0001
Total	103				

Especie Z

Fuente de variación	Grados de libertad	Porcentaje de variación	Índices de fijación	Valor de estadístico	Valor p asociado
Entre cuencas	5	-2,87	Φ_{CT}	-0,029	0,62
Entre poblaciones dentro cuencas	7	8,78	Φ_{SC}	0,085	0,12
Dentro de poblaciones	50	94,1	Φ_{ST}	0,059	0,025
Total	62				