

NCH-FC
MAD-EBE
N 964
C.1

DIVERSIDAD GENÉTICA DE *AEXTOXICON PUNCTATUM*

(*AEXTOXICACEAE*) EN CHILE: IMPLICANCIAS

BIOGEOGRÁFICAS



Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

En cumplimiento parcial de los requisitos

Para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en

Ecología y Biología Evolutiva.

Facultad de Ciencias

por

Mariela Cecilia Núñez Ávila

Julio, 2004.

Director de Tesis: Dr. Juan J. Armesto Z.

Co-Director de Tesis: Dr. Mark HersHKovitz.

FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN
TESIS DE MAGISTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de
Magister presentada por la candidata

MARIELA CECILIA NÚÑEZ ÁVILA

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al
grado de Magister en Ciencias con Mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el
exámen de Defensa de Tesis rendido el día 3 de Mayo de 2004.

Director de Tesis:

Dr. Juan J. Armesto Z.

Co-Director de Tesis:

Dr. Mark Hershkovitz

Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra. Carolina Villagrán

Dr. Elie Poulin



Handwritten signature of Juan J. Armesto Z. over a dotted line.

Handwritten signature of Mark Hershkovitz over a dotted line.

Handwritten signature of Carolina Villagrán over a dotted line.

Handwritten signature of Elie Poulin over a dotted line.



A los bosques de olivillo.....

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecer a todos los profesores del programa de Ecología y Biología Evolutiva (EBE), de quienes obtuve una diversa gama de conocimientos y puntos de vista con respecto a la Ecología y Evolución.

En especial quiero agradecer a mi tutor, el Dr. Juan Armesto, pilar fundamental de mi formación científica en esta Universidad, de esta tesis y además, un excelente compañero de trabajo. Mas que agradecer, quiero hacer un homenaje a la Dra. Carolina Villagrán y a la Dra. Mary Kalin Arroyo, a quienes admiro y respeto por la excelente trayectoria que han desarrollado en sus líneas de investigación, a través de la que han contribuido enormemente al conocimiento científico sobre la Biogeografía Histórica y la Biología reproductiva de las especies nativas de nuestro país. También me gustaría agradecer al Dr. Juan Correa, por permitir el análisis de las muestras de esta tesis en el Laboratorio de Diversidad Molecular del Departamento de Ecología de la Universidad Católica, del que está a cargo.

Agradezco a todas las personas que hicieron posible la realización de esta tesis, en especial con quienes compartí la belleza de los bosques de olivillo. Cristián Frêne, Ale Frêne, Vicente Frêne, Anita Abarzúa, Ana León, Cecilia Smith, Olga Barbosa, Nely Pohl, Juan Armesto, Juan Luis Celis, Álvaro Gutiérrez, Duncan Cristi, Iván Díaz, Marcos Méndez, Eduardo Soto y Cristián Figueroa, gracias por compartir esta increíble aventura a través de Chile, y por los buenos y malos momentos que vivimos juntos, de los cuales pude obtener un gran conocimiento sobre la vida y el real significado del trabajo en equipo, los quiero mucho.

Esta tesis fue financiada por la beca de Magíster del Núcleo Milenio (P99-103F-ICM), por el Centro de Estudios Avanzados en Ecología y Biodiversidad (Proyecto FONDAP 1501-0001), por el proyecto BIOCORES (Contract ICA 4-CT-2001-10095 Biocores project funded by EC under INCO IV programme) y por la Beca del Departamento de Postgrado y Postítulo de la Universidad de Chile (PG/28/02).

ÍNDICE DE MATERIAS

	PÁGINA
PÁGINAS PRELIMINARES	
Página de título	i
Informe de aprobación	
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
Índice de materias	iv
Lista de Tablas	vi
Lista de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xiii
INTRODUCCIÓN	
	1
• La especie de estudio	2
• Historia biogeográfica del olivillo	7
HIPÓTESIS DE TRABAJO	
	12
OBJETIVO	
	12

ÍNDICE DE MATERIAS

(Continuación)

	PÁGINA
MATERIALES Y MÉTODOS	13
• Muestreo	13
• Extracción de ADN	15
• Reacción de PCR	16
• Análisis de datos	19
RESULTADOS	25
DISCUSIÓN	40
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO	62

LISTA DE TABLAS

	PÁGINA
Tabla 1: Poblaciones de <i>Aextoxicon punctatum</i> consideradas en el estudio, con su respectiva ubicación geográfica y número de muestras por población.	14
Tabla 2: Partidores que presentaron patrones reproducibles de polimorfismo inter-poblacional, considerados en el presente estudio poblacional de <i>Aextoxicon punctatum</i> .	18
Tabla 3: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de RAPD (R, número de regiones; P, número de poblaciones; N, número de muestras, SC, suma de cuadrados, SCR, suma de cuadrados entre regiones, SCP, suma de cuadrado entre poblaciones, SCD, suma de cuadrados dentro de poblaciones, CM, cuadrados medios, CMR, cuadrados medios entre regiones; CMP, cuadrados medios entre poblaciones; CMD, cuadrados medio dentro de poblaciones; CV, componentes de varianza).	21
Tabla 4: Distancias geográficas (Km lineales) entre pares de poblaciones de olivillo en Chile (Abreviaturas mostradas en la Tabla 1).	24
Tabla 5: Pares de bases de cada locus polimórfico.	26
Tabla 6: Diversidad genética medida mediante el Índice de Shannon (I) con su Desviación estándar (SD) y el Porcentaje de Polimorfismo (%P) para todas las poblaciones consideradas en el estudio y el promedio poblacional. Abreviaturas mostradas en la Tabla 1.	28

LISTA DE TABLAS
(Continuación)

	PÁGINA
Tabla 7: Resumen de los porcentajes de varianza mostrados por el AMOVA, correspondiente a diferencias entre regiones, entre poblaciones dentro de regiones y dentro de poblaciones. Las comparaciones se realizaron entre las cuatro regiones geográficas definidas a priori (ZN= zona norte; ZC= zona centro; CCS= Cordillera de la Costa de la zona sur; FA = faldeos andinos y depresión intermedia de la zona sur) y posteriormente se realizaron comparaciones entre pares de regiones geográficas (ZN vs. ZC; ZC vs. CCS y CCS vs. FA).	30
Tabla 8: Valores de Φ generados por el AMOVA para las comparaciones realizadas entre regiones geográficas (ZN= zona norte; ZC= zona centro; CCS= Cordillera de la Costa de la zona sur; FA = faldeos andinos y depresión intermedia de la zona sur) definidas a priori en el presente estudio. Φ_{CT} = tasa de varianza regional con respecto a la varianza total, Φ_{SC} = tasa de varianza dentro de regiones con respecto a la varianza poblacional, Φ_{ST} = tasa de varianza entre poblaciones con respecto a la varianza total.	31

LISTA DE TABLAS
(Continuación)

	PÁGINA
Tabla 9: Diferenciación genética entre poblaciones (diagonal superior) mostrado por los valores de P generados por el test exacto (en negrita los valores no significativos) y valores de Φ_{ST} calculados por AMOVA entre pares de poblaciones (diagonal inferior, en negrita los valores no significativos). Abreviaturas mostradas en la Tabla 1.	33
Tabla 10: Valor de R^2 y significancia generado por el Test de Mantel. Las correlaciones entre distancia geográfica (km) y distancia genética (Φ_{st}) se realizaron para todo el ámbito de distribución geográfico de <i>Aextoxicon punctatum</i> y a distintas escalas geográficas.	34
Tabla 11: Diversidad genética promedio poblacional (S_{pop}) medida mediante el Índice de diversidad de Shannon (I) en diferentes especies de árboles cuyos datos se obtuvieron usando el marcador molecular RAPD utilizado en el presente estudio.	41

LISTA DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 1: Distribución geográfica de <i>Aextoxicon punctatum</i> (olivillo) en Chile (CONAF- CONAMA et al. 1999) y los puntos de muestreo de las 16 poblaciones consideradas en este estudio. Las abreviaturas son mostradas en la Tabla 1.	4
Figura 2: Fotografías de los geles de agarosa mostrando los patrones de bandeo de los cuatro partidores utilizados en el presente estudio (C2, X1, X7 y X17).	27
Figura 3: Grafico mostrando la tendencia a una mayor distancia genética (Φ_{st}) a medida que aumenta la distancia geográfica (km) entre pares de poblaciones muestreadas en este estudio. Abreviaturas mostradas en la Tabla 1.	35
Figura 4: Dendrograma UPGMA basado en distancias genéticas de Nei (1978). Poblaciones en rojo pertenecen a la zona norte, poblaciones en amarillo pertenecen a la zona centro y poblaciones en verde pertenecen a la zona sur. Las abreviaturas se muestran en la Tabla 1.	37
Figura 5: Análisis de coordenadas principales (PCo) de los fenotipos individuales RAPD (circulo rojo = fenotipos de los individuos de la zona norte, circulo verde = fenotipos de los individuos de la zona centro y sur, circulo amarillo = fenotipos de los individuos pertenecientes a Quebrada del tigre). Abreviaturas mostradas en la Tabla 1.	39

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN: Ácido dexoxiribonucleico

AMOVA: Análisis de Varianza Molecular.

CTAB: Cetil Trimetil Bromuro de Amonio

DAP: Diámetro a la altura del pecho

PCO: Análisis de Coordenadas Principales

PCR: Polimerase Chain Reaction.

PVP: Polivinilpirrolidona

RAPD: Randomly Amplified Polymorphic DNA.

rpm: revoluciones por minuto

UPGMA: Unweighted Pair Group Method whit Arithmetic mean

RESUMEN

Aextoxicon punctatum (olivillo), único representante de la familia endémica Aextoxicaceae, es una especie arbórea de los bosques templados del sur de Sudamérica, con un rango de distribución geográfica que se extiende desde los 30° a los 43° S. Se caracteriza por presentar un patrón disyunto, con poblaciones aisladas en cimas de cerros de la Cordillera de la Costa de la zona semiárida (30°-32° S), poblaciones ubicadas en quebradas costeras de la zona mediterránea (32° - 39° S), bosques continuos en la Cordillera de la Costa entre los 39° y 43° S, y fragmentos aislados ubicados en la Depresión Intermedia y faldeos andinos entre los 39° y 41° S. Esta disyunción es el resultado de eventos tectónicos y climáticos ocurridos en el cono sur de América desde fines del Terciario, que finalmente desencadenaron el aislamiento geográfico de las poblaciones de olivillo del extremo norte. Por otra parte, estudios palinológicos postulan que la distribución actual de las poblaciones más australes y andinas de *Aextoxicon punctatum* sería el resultado de eventos de expansión postglaciales a partir de refugios ubicados en los sitios bajos de la Cordillera de la Costa, al norte de los 40° S. En el presente estudio se analizó cómo esta historia biogeográfica se refleja en la estructura y diversidad genética de las poblaciones de *Aextoxicon punctatum*. Se analizaron 16 poblaciones de olivillo a través de su rango latitudinal y altitudinal de distribución en Chile, usando 33 loci polimórficos generados mediante el marcador molecular RAPD.

Los resultados del AMOVA, UPGMA y PCo mostraron una alta diferenciación genética de dos poblaciones aisladas en las cimas de cerros costeros de la zona semiárida (Norte Chico), en contraste con una baja diferenciación genética entre las poblaciones

ubicadas en las quebradas de la zona mediterránea, poblaciones de bosques continuos de la Cordillera de la Costa, poblaciones ubicadas en la Depresión Intermedia y faldeos andinos de la zona sur. Este resultado apoya la hipótesis de que el aislamiento geográfico histórico de las poblaciones en cimas de cerros costeros del Norte Chico, habría restringido por largo tiempo el intercambio genético con el complejo de poblaciones centro-sur, provocando la diferenciación entre ambas áreas.

Las poblaciones que presentan mayor diversidad genética, medida a través del índice de Shannon, fueron Santa Inés ($31^{\circ}56'$ S), Los Ruiles ($35^{\circ}37'$ S) y Temuco ($38^{\circ}43'$ S), apoyando la hipótesis de la existencia de poblaciones con mayor diversidad genética ubicadas al norte de los 40° S. Al analizar solamente las poblaciones ubicadas en la Cordillera de la Costa de Chile, la distancia genética se correlaciona positivamente con la distancia geográfica, en coherencia con un modelo de aislamiento genético por distancia. Sin embargo, considerando sólo las poblaciones ubicadas en la depresión intermedia y faldeos andinos de la zona sur, no hubo una correlación significativa entre distancia genética y distancia geográfica. Probablemente, la dispersión de los frutos de olivillo por las aves frugívoras entre estas poblaciones geográficamente más cercanas, podría haber mantenido un alto intercambio genético durante el proceso de expansión postglacial hacia el este.

ABSTRACT

Aextoxicon punctatum (olivillo), the only representative of the endemic family Aextoxicaceae, is an arboreal species of temperate forests of southern South America, with a geographic distribution range that extends from 30° to 43° S. This species exhibits a disjunct distribution pattern, with isolated populations occurring on coastal hilltops of the Chilean semiarid region (30°- 32° S), small populations located in the coastal gorges of central Chile (32° - 39° S), more continuous forests along the Coastal range from 39° to 43° S, and isolated fragments in the Central Depression and Andean foothills between 39° - 41° S. This geographic disjunction is the result of major climatic and tectonic events that took place in the southern cone of America since the late Tertiary, which eventually led to the isolation of the northernmost populations of olivillo. On the other hand, according to palynological evidence, the present distribution of the Andean and southernmost populations of *Aextoxicon punctatum* were originated by postglacial population expansion from refuges located at low elevations on the Coastal Range, north of 40° S. This study examined how this biogeographic history is reflected in the present population genetic structure and diversity of *Aextoxicon punctatum*. I analyzed 16 populations distributed throughout the latitudinal and altitudinal range of olivillo in Chile, using 33 polymorphic loci generated by RAPD molecular marker.

The results of AMOVA, UPGMA and PCo showed a high genetic differentiation of the two northernmost populations isolated on coastal hilltops of the semiarid region (Norte Chico), in contrast to a low genetic differentiation among the populations of

coastal gorges of central Chile, continuous Coastal Range forests, populations of the southern Central Depression and Andean foothills. This study supports the hypothesis that the history geographic isolation of olivillo populations in the semiarid region would have restricted genetic exchange with the complex of populations of south-central Chile, causing the differentiation between the two areas. The populations exhibiting higher genetic diversity were those of Santa Inés (31°56'S), Los Ruiles (35°37'S) and Temuco (38°43'S), supporting the hypothesis of increased genetic diversity north of 40° S. Considering all the populations (N=11) occurring along the Chilean Coastal Range, there was a positive correlation between genetic distance and geographic distance, in accordance with a process of isolation by distance. However, taking into account only the populations of the Central Depression and the Andes of southern Chile there was no significant correlation between genetic and geographic distance. Probably, seed dispersal of *Aextoxicon punctatum* by birds in this zone of greater geographic continuity, could maintain high genetic flow among populations during their eastward expansion in the Holocene.

INTRODUCCIÓN

Ciclos de clima glacial e interglacial a partir de 1.5 millones de años atrás son factores históricos que pueden explicar la actual variación geográfica de la diversidad genética en poblaciones de plantas (Pielou 1991, Broyles 1998), particularmente en regiones templadas como el cono sur de Sudamérica, donde los ciclos glaciales provocaron contracciones y expansiones de los rangos geográficos de muchas especies de plantas (Heusser 1999, Villagrán 2001).

Los árboles de zonas templadas, caracterizados por sus extensos rangos geográficos, son interesantes ya que gran parte de su historia postglacial es conocida a partir del análisis de polen fósil (Heusser 1999, Villagrán 2001). Debido a sus largos ciclos generacionales, los árboles pueden ser de particular valor para examinar procesos poblacionales y genéticos en una escala temporal más extensa (Newton et al. 1999), pudiendo así servir para apoyar o rechazar hipótesis sobre la historia biogeográfica de sus poblaciones.

La relevancia de la biogeografía histórica en la determinación de los patrones actuales de variación genética intraespecífica en especies arbóreas ha sido demostrada en varios estudios usando técnicas moleculares (Gabrielsen et al. 1997, Taberlet 1998, Tollefsrud et al. 1998, Zhivotovsky 1999, Newton et al. 1999, Allnut et al. 1999, 2001, 2003, Etisham-UI-Haq 2001, Bekessy 2002). El conocimiento de las consecuencias genéticas de la historia biogeográfica en especies arbóreas es crucial para proponer adecuadas estrategias de conservación y manejar sustentablemente los recursos genéticos.

La especie de estudio

Aextoxicon punctatum Ruiz & Pav. (Olivillo, tique) es un árbol endémico de los bosques templados del sur de Sudamérica y único representante de la familia endémica Aextoxicaceae. Olivillo es un árbol dioico, que en la madurez alcanza entre los 18 y 20 metros de altura. Presenta flores poco conspicuas, que entran en antesis en mayo (Riveros y Smith 1995). Se desconoce su modo de polinización, sin embargo se ha especulado que sería entomófilo (Aizen & Ecurra 1998). Su fruto es una drupa de color violáceo que madura entre Abril y Junio. Sus semillas son dispersadas por animales, principalmente las aves *Turdus falklandii* (zorzal) y *Columba araucana* (Torcaza) (Salvande et al, manuscrito). En 20 horas de observación al norte de Chiloé, Salvande et al. (manuscrito) encontraron que el zorzal fue el principal dispersor de esta especie. Ellos observaron que las semillas de olivillo defecadas por estas aves germinaron en mayor porcentaje que las semillas no consumidas.

La filogenia de las angiospermas, basada en secuencias de ADN nuclear y cloroplástico (Savolainen et al. 2000), agrupa a la familia monotípica *Aextoxicaceae* como grupo hermano de la familia *Berberidopsidaceae*. Debido a su aislamiento taxonómico, los autores sugieren que *Aextoxicon* y *Berberidopsis* probablemente representen relictos especializados de una flora muy antigua, presumiblemente Gondwánica, cuyos ancestros han desaparecido (Savolainen et al. 2000). Anteriormente, Troncoso et al. (1980) postularon un origen tropical de la familia debido a su requerimiento de temperaturas relativamente cálidas, bajo condiciones de clima oceánico en la mayor parte de su distribución. La presencia de troncos fósiles afines a

Aextoxicon, está registrada en la Formación Cerro Dorotea (51°33' S), cuya data corresponde al Paleoceno inferior (Nishida et al. 1988).

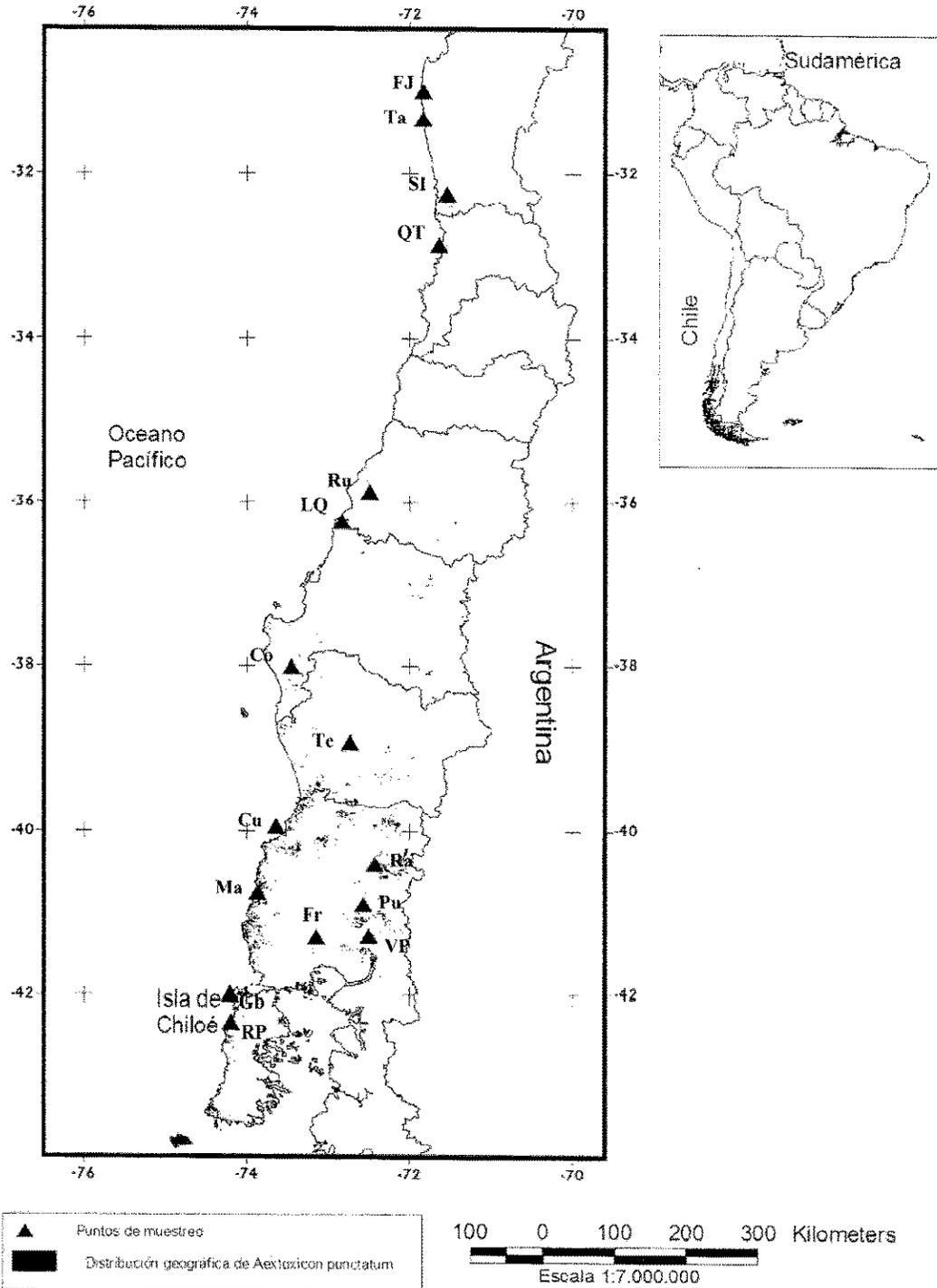
En cuanto a su estado de conservación, olivillo se encuentra fuera de peligro de extinción; sin embargo la comunidad que sustenta esta especie presenta un precario estado de conservación a lo largo de su distribución, en particular las poblaciones más boreales (Norte Chico y Chile central).

La distribución geográfica del bosque con dominancia de olivillo excede los márgenes del bosque templado austral, extendiéndose hacia el norte, a modo de bosquetes relictos aislados, en quebradas costeras de Chile central y en cimas de cerros costeros aislados de la zona semiárida. El límite sur de su distribución se extiende hasta la Isla Guafo (43°30' S), por la costa y, hasta aproximadamente los 41° S por la Cordillera de los Andes. También se encuentran bosquetes de olivillo en los grupos de islas de Guapikilán, al sur de la Isla Grande de Chiloé y en la Isla Mocha (38° S), frente a Arauco (LeQuesne & Villagrán 1999).

El extenso rango de distribución geográfica del olivillo (Figura 1) puede ser dividido a-priori en tres grandes zonas, basándose tanto en su ubicación latitudinal, topografía, zona climática, así como en los distintos eventos históricos que habrían afectado a las poblaciones:

- Poblaciones aisladas en la cima de cerros de la Cordillera de la Costa de la zona semiárida (Norte Chico), entre los 30° y 32° de latitud S, con menos de 250 mm de precipitación anual (Pérez & Villagrán 1994). Los bosquetes se encuentran actualmente fragmentados y restringidos a la cima de los cerros entre 450 y 700 m.s.n.m. La presencia de olivillo en esta región no está directamente determinada

Figura 1: Distribución geográfica de *Aextoxicon punctatum* (olivillo) en Chile (CONAF-CONAMA et al. 1999) y los puntos de muestreo de las 16 poblaciones consideradas en este estudio. Las abreviaturas son mostradas en la Tabla 1.



por el régimen climático regional, sino por el mesoclima que generan las neblinas costeras. Estimaciones realizadas por Kummerow (1966) en Fray Jorge indican una precipitación promedio anual al interior del bosque de 1000 mm, debido al aporte de neblinas. Estimaciones más recientes postulan un máximo de 400 mm provenientes de neblina (Vidiella, datos no publicados). Los bosquetes más boreales, Fray Jorge y Talinay (30°40' y 30°50' S respectivamente), se encuentran separados por el lecho del río Limarí. Estos a su vez se distancian por aproximadamente 140 km del bosque Santa Inés (31°56' S). Algunos bosquetes de las cimas de cerros costeros han desaparecido debido a incendios locales y alteración antrópica, tal es el caso de Huentelauquén sobre el cerro Talinay (31°29' S).

- Poblaciones en quebradas de la Cordillera de la Costa de Chile central, entre los 32° y 39° de latitud sur, ubicados en la zona mediterránea templada cálida con humedad suficiente para el desarrollo del olivillo (Pérez & Villagrán 1994). Estas poblaciones se encuentran separadas por más de 60 km de los relictos del Norte Chico, generalmente reducidas a las profundas quebradas en la vertiente occidental de la Cordillera de la Costa entre los 20 y 400 m.s.n.m. El bosque más boreal de esta zona corresponde a Quebrada del Tigre. Existía un bosque en la quebrada el Roble (34°20' S), entre las poblaciones de quebrada de Córdoba (33°25' S) y el Parque Nacional Los Ruyales (35°37' S), que fue devastado por un incendio. También podemos encontrar remanentes de olivillo en la Reserva Nacional Los Queules (35°59' S).

La presencia de algunos individuos aislados de olivillo en diversas otras quebradas de Chile central al sur de Valparaíso (Villagrán, Armesto & Medina, Informe Botánico de Quebrada de Córdoba, manuscrito), reflejan la mayor continuidad geográfica que existió históricamente entre estas poblaciones de Chile central.

- Poblaciones al sur de los 39°, ubicadas en la zona templado-lluviosa de Chile. Las poblaciones en esta zona se distribuyen continuamente a lo largo de la vertiente occidental de la Cordillera de la Costa. Olivillo forma bosques casi puros desde el nivel del mar hasta casi los 150 m.s.n.m., mezclándose a mayores altitudes con los elementos característicos del bosque siempreverde hasta aproximadamente los 250 m.s.n.m. (Pérez & Villagrán 1994). Separadas de las poblaciones de olivillo de la vertiente occidental de la Cordillera de la Costa se encuentran las poblaciones aisladas en la depresión intermedia y los faldeos andinos. Las poblaciones de la depresión intermedia están muy fragmentadas por acción antrópica, como es el caso del cerro Ñielol (Temuco), Padre las casas (38°43'S), Río Bueno (40°33'S) y Pto. Octay (40°59'). Las poblaciones de olivillo ubicadas en los faldeos andinos se encuentran a una altura máxima de 250 m.s.n.m., como Lago Ranco (40°13'S) y el Parque Nacional Vicente Pérez Rosales (40°45'S). Se conoce sólo una población al este de los Andes (Puelo), al sur del Parque Nacional Vicente Pérez Rosales. Entre las poblaciones de la depresión intermedia y los faldeos andinos no existe una barrera geográfica que impida el intercambio génico, al parecer las poblaciones se habrían extendido de manera continua durante el período de la pre-colonización Europea.

Historia biogeográfica del olivillo

La distribución geográfica actual de olivillo es continua por la Cordillera de la Costa, al sur de los 39° S. Hacia Chile central se restringe a las quebradas húmedas del litoral central (entre 32° y 39° S) y, en la zona semiárida, las poblaciones relictas de olivillo se encuentran aisladas en las cimas de los cerros de la cordillera de la costa (entre 30° y 32° S). Esta distribución es el resultado de una serie de eventos tectónicos y climáticos que afectaron al territorio de Chile durante el Terciario y Cuaternario (Villagrán et al. 2004).

El origen y subsistencia de los relictos más boreales de olivillo (Fray Jorge y Talinay) ha llamado la atención de ilustres naturalistas nacionales y extranjeros. Philippi (1884) es el primer botánico que planteó concreta y ampliamente el problema, descartando la posibilidad de transporte a larga distancia de los elementos constituyentes de esta comunidad. Diversas hipótesis han sido planteadas desde entonces, las cuales pueden ser sintetizadas en dos posiciones alternativas: i) aquella sustentada por Looser (1935), Skottsberg (1948), con algunas modificaciones por Muñoz & Pisano (1947) y por Wolffhügel (1949), quienes consideraron a los bosques de Fray Jorge y Talinay como relictos originados por el desplazamiento hacia el norte de la vegetación austral, durante los ciclos glacial-interglaciales del Cuaternario y, ii) la sustentada por Schmithüsen (1956) y Hinojosa & Villagrán (1997), quienes postularon un origen terciario, remanentes del antiguo poblamiento del sur de Sudamérica con bosques cálidos y húmedos procedentes del Neotrópico. Troncoso et al. (1980) y Villagrán et al. (2004) analizaron críticamente las hipótesis formuladas y revisaron la distribución geográfica, historia paleoambiental y linajes de la flora de estos bosques. Separaron cuatro diferentes componentes del problema: i) origen del elemento florístico del

bosque, ii) edad de la llegada de dicho elemento al territorio, iii) origen y edad de la comunidad tipo Fray Jorge y iv) edad del bosque en Fray Jorge. Sobre esta base formularon una nueva hipótesis que reconoce el origen terciario de la flora de este tipo de comunidad, como lo sostuvo Schmithüsen, y explica su actual distribución aislada en cimas costeras como consecuencia de los cambios climáticos ocurridos durante el último ciclo glacial-interglacial, como lo formularon Looser y Skottsberg (Troncoso et al. 1980, Villagrán et al. 2004).

En el caso de *Aextoxicon*, su origen y relaciones filogenéticas no están totalmente dilucidadas. Sin embargo, el registro fósil del terciario del sur de Sudamérica y Antártica muestra que ya estaba presente en el Paleoceno inferior en el sur de Chile (Formación Cerro Dorotea, 51°33'S, Nishida et al. 1988).

La comunidad que domina olivillo habría prosperado en los sitios bajos de la Cordillera de la Costa de Chile central (30°- 42° S) durante los repetidos avances glaciales del Pleistoceno, favorecida por el clima húmedo predominante en esas latitudes (Troncoso et al. 1980). Los antecedentes geológicos muestran que la llegada de dicha hipotética comunidad a la cima de los cerros del Norte Chico sería posterior a la emergencia de los bloques constitutivos de los altos del Talinay, proceso ocurrido durante el Pleistoceno temprano a medio (Troncoso et al. 1980).

Las causas del aislamiento de los bosques de olivillo en la cima de los cerros del Norte Chico, estarían relacionadas con los cambios climáticos y florísticos ocurridos en Chile central desde fines del Terciario y durante el Cuaternario (Villagrán & Armesto 1980, Villagrán et al. 2004). En Chile central se ha evidenciado un aumento paulatino de la aridez desde fines del Terciario (Paskoff 1977). Durante el Holoceno temprano a

medio (entre 9000 y 5000 años A.P.) se produjo un marcado incremento de esta aridez en Chile centro-norte (Villagrán & Varela 1990, Villa-Martínez & Villagrán 1997, Jenny et al. 2002, Maldonado & Villagrán 2002) y fuertes fluctuaciones en los montos de precipitación anual durante el Holoceno tardío, después de 5000 años A.P. (Maldonado & Villagrán 2002). La aridización gradual, provocó la expansión de la vegetación xerofítica, proveniente desde el norte, a través del valle central y los faldeos andinos de Chile central. La distribución del bosque esclerófilo, presente desde el Plioceno en el valle central (Hinojosa & Villagrán 1997), durante el Holoceno se habría desplazado hacia la Cordillera de la Costa. La comunidad tipo Fray Jorge con dominancia de olivillo, se habría restringido a las quebradas húmedas de la vertiente occidental de la Cordillera de la Costa y se habría fragmentado en las cimas de cerros del Norte Chico, subsistiendo favorecida por las constantes neblinas costeras. Este acontecimiento explicaría el actual aislamiento de los relictos en las cumbres costeras y la discontinuidad del bosque de olivillo en Chile central, presentado en esta última zona una alta mezcla con el elemento esclerófilo (Villagrán & Armesto 1980, Pérez & Villagrán 1985).

Sobre la base de estos antecedentes se puede inferir que, si la discontinuidad en el rango de distribución geográfica del olivillo se produjo en el Cuaternario, desde el norte hacia el sur, paralelamente el flujo génico podría haber disminuido entre las poblaciones aisladas en las cimas de cerros del Norte Chico y las poblaciones de quebradas de Chile central, lo que gradualmente habría provocado la diferenciación genética entre estos dos grupos de poblaciones.

Con respecto a las poblaciones de olivillo de la zona sur, podemos inferir su historia biogeográfica a través del modelo propuesto por Villagrán (1991, 2001) sobre la dinámica histórica de la vegetación de la Región de Los Lagos de Chile, basado en datos palinológicos. Esta autora postula que el bosque laurifolio tipo Valdiviano se habría refugiado en la Cordillera de la Costa al norte de los 40° S durante la última glaciación. El modelo muestra un cambio importante en la composición de los bosques en la interfase Pleistoceno–Holoceno (entre 11.000 y 9.500 años AP), correspondiente a una fase de expansión hacia el sur y este de los elementos más termófilos del actual bosque templado lluvioso, representados por *Eucryphia*, *Caldcluvia*, *Weinmannia trichosperma* y *Aextoxicon punctatum*. Se registró una clara expansión de este bosque hacia el sector andino sur de la Región de Los Lagos, abarcando la costa oriental de Chiloé durante el lapso 9500–3000 años AP (Villagrán 1991).

De acuerdo al modelo de biogeografía histórica propuesto en los trabajos de Villagrán (1991, 2001) se espera que en la Cordillera de la Costa, al norte de los 40° S, se encuentren poblaciones de olivillo con alta diversidad genética. En el presente estudio se postula que las poblaciones de olivillo fundadas postglaciación hacia el sur y hacia el este (depresión intermedia y faldeos andinos), a partir de los refugios para el bosque valdiviano al norte de los 40° S postulados por Villagrán (1991), podrían representar un subconjunto de la diversidad genética original, con cada sucesiva población fundada teniendo menor diversidad genética.

En base a los antecedentes mencionados, se formulan las siguientes preguntas: ¿Existen diferencias genéticas entre las poblaciones de olivillo aisladas en las cimas de los cerros del norte y las poblaciones de olivillo de Chile centro-sur? ¿Existen

poblaciones con mayor diversidad genética ubicadas en la zona de refugios glaciales para el bosque Valdiviano, en la Cordillera de la Costa al norte de 40° S (Villagrán 2001)? ¿Cuáles son los efectos de la expansión postglacial hacia el sur y hacia el este, en los patrones de diversidad genética de las poblaciones de *Aextoxicon punctatum*?

HIPÓTESIS DE TRABAJO

- 1) Se esperara encontrar una alta diferenciación genética entre las poblaciones aisladas en cimas de cerros de la zona semiárida, y las poblaciones de Chile centro-sur, debido a que las primeras se han mantenido geográficamente aisladas de las segundas, al menos desde inicios del Holoceno.
- 2) Las poblaciones de la Cordillera de la Costa al norte de los 40° S presentarían una mayor diversidad genética intra-poblacional, debido a su posible condición de refugio durante las glaciaciones.
- 3) La variabilidad genética de las poblaciones de olivillo disminuiría hacia el sur y hacia el este, debido a la expansión de su rango geográfico durante el Holoceno.

OBJETIVO GENERAL

Describir los patrones de variabilidad genética molecular dentro y entre poblaciones de la especie arbórea endémica *Aextoxicon punctatum* (Aextoxicaceae), a través de su rango de distribución geográfica en Chile, utilizando la técnica molecular RAPD (“randomly amplified polymorphic DNA”, Williams et al. 1990).

MATERIALES Y MÉTODOS



Muestreo

Se colectaron muestras para el análisis genético en 16 poblaciones de *Aextoxicon punctatum* abarcando gran parte de su distribución geográfica en Chile (Figura 1), tanto en el ámbito latitudinal como altitudinal. Las poblaciones seleccionadas, con sus respectivas coordenadas geográficas y número de muestras por población, se muestran en la Tabla 1. Debido al grave impacto antrópico que presentan los bosques de olivillo, es prácticamente imposible encontrar poblaciones en estado absolutamente prístino (excepto Guabún), por esta razón se contemplaron poblaciones de olivillo que no mostraran efectos recientes de perturbación, descartando poblaciones degradadas por fuego o tala reciente, o con unos pocos individuos de olivillos aislados. En cada población se realizó un muestreo al azar, colectando hojas nuevas de las ramas de entre 9 y 34 individuos (Tabla 1), a lo largo de un transecto que atravesaba toda el área del bosque, con el fin de tomar muestras representativas de la diversidad genética de la población. Para reducir la probabilidad de muestrear individuos cercanamente emparentados, se colectaron hojas de individuos separados por una distancia mínima de 30 m, con un DAP mayor a 30 cm. Las hojas de cada individuo se almacenaron en bolsas rotuladas, conteniendo sílica gel, con el fin de realizar un rápido secado del material, evitando así la degradación del ADN. Una vez secas, las hojas se trituraron en un mortero con N₂ líquido, en el laboratorio. Posteriormente, el material molido y seco se almacenó en tubos Eppendorf en un refrigerador a 4° C.

Tabla 1: Poblaciones de *Aextoxicon punctatum* consideradas en el estudio, con su respectiva ubicación geográfica y número de muestras por población.

Localidad	Ubicación (° lat S-long W)	Región*	N° de individuos muestreados
Fray Jorge (FJ)	30° 40' - 71° 40'	ZN	34
Talinay (Ta)	31° 00' - 71° 40'	ZN	11
Santa Inés (SI)	31° 56' - 71° 22'	ZN	19
Quebrada del Tigre (Qt)	32° 33' - 71° 28'	ZC	21
Los Ruiles (Ru)	35° 37' - 72° 20'	ZC	20
Los Queules (Lq)	35° 59' - 72° 41'	ZC	18
Contulmo (Co)	37° 48' - 73° 19'	ZC	9
Temuco (Te)	38° 43' - 72° 35'	FA	17
Curíñanco (Cu)	39° 45' - 73° 30'	CCS	20
Lago Ranco (Ra)	40° 13' - 72° 16'	FA	19
Maicolpue (Ma)	40° 35' - 73° 44'	CCS	18
Puyehue (Pu)	40° 44' - 72° 25'	FA	15
Vicente Pérez Rosales (VP)	41° 07' - 72° 21'	FA	15
Frutillar (Fr)	41° 08' - 73°	FA	8
Guabún (Gb)	41° 50' - 74° 05'	CCS	30
Parque Nacional Chiloé (RP)	42° 10' - 74° 04'	CCS	21

* ZN= poblaciones aisladas en cimas de cerros costeros de la zona semiárida (Norte Chico). ZC= poblaciones ubicadas en las quebradas costeras de Chile central con clima mediterráneo. CCS= poblaciones de la Cordillera de la Costa de la zona sur. FA= poblaciones de la depresión intermedia y faldeos andinos de la zona sur.

Extracción de ADN

La extracción de ADN del material foliar se realizó mediante el método CTAB (Doyle & Doyle 1990), modificado para la especie de estudio, como se detalla a continuación:

- Se adicionó aproximadamente 50 μ L de tejido de hoja molida en un tubo Eppendorf de 1.5 ml
- Se agregó igual volumen de PVP mezclando muy bien los sólidos.
- Se adicionó 700 μ L de buffer de extracción (CTAB 3%, Tris-HCL 1M, pH 8.0, Na Cl 1.4 M, EDTA 20 mM) y se mezcló usando la misma punta de la pipeta como vástago.
- Se agregó 4 μ L de ARNasa activada.
- Se incubó agitando cada 10 minutos durante 40 minutos a 60°C en un baño termoregulado.
- Se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 20°C.
- Se tomó el sobrenadante sin interfase en un tubo de 1.5mL limpio.
- Se agregó 700 μ L de Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1 y se mezcló durante 1 minuto.
- Se centrifugó a 12.000 rpm por 20 minutos a 20° C.
- Se tomó el sobrenadante sin interfase en un tubo de 1.5mL limpio.
- Se precipitó mezclando 0.6 volúmenes de Isopropanol 100% y dejando a -20°C por más de 3 horas.
- Se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos a - 4° C.

- Se eliminó el sobrenadante y se agregó 200µL de EtOH 70%, soltando el pelet de ADN del fondo del tubo con suaves golpes.
- Se centrifugó a 14.000 rpm por 20 minutos a 4° C.
- Se eliminó el EtOH 70% y se dejó secar el pelet de ADN.
- Una vez seco, se diluyó con agua destilada ultrapura (aproximadamente 50µL) y se almacenó a 4° C.

La purificación se realizó mediante el método CHELEX. En el caso de olivillo, es aconsejable la purificación con este agente quelante para que la amplificación por PCR del ADN extraído sea exitosa. Este método se describe a continuación:

- Se agregó CHELEX (Chelex 5%, Tris-HCL 90mM, pH 8, EDTA 5µM) 4 veces el volumen de ADN concentrado.
- Se incubó en baño termoregulado a 100° por 15 minutos.
- Se homogenizó para luego enfriar a -20° por 1 minuto.
- Se centrifugó a 14.000 rpm por 1 minuto a 20°C
- Se recuperó el sobrenadante.

Posteriormente, se midió la concentración de ADN de cada muestra con un espectrofotómetro, para luego diluir a una concentración de 15 ng/µL.

Reacción de PCR

Para determinar la concentración de los reactivos utilizados en un volumen total de 20 µL se estandarizó la reacción de PCR realizando gradientes de concentración de cada reactivo hasta generar un claro patrón de bandeo reproducible. Las concentraciones finales utilizadas fueron: 8.5µL de agua ultrapura (GIBCO technologies), 2µL de

Buffer PCR (10X), 1.6µL de MgCl₂ (25mM), 1.6 µL de dNTPs (2.5mM), 3 µL de Partidor (10µM, Invitrogen), 3 µL de ADN (15ng/µL) y 0.3 µL de Taq polimerasa (5 U/µL, Fermentas #EP0402). La amplificación se realizó en un termociclador Applied Biosystems (MODELO 9700), mediante el siguiente programa: Denaturación por 5 minutos a 94°C, 35 ciclos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a 38°C, 90 segundos a 72°C, y una extensión final por 10 minutos a 72°C .

El producto de cada amplificación se mezcló con Loading Buffer y se cargó en un gel de agarosa al 1.5 % preparado con BrEt (1µL cada 100mL), adicionando en los carriles de cada extremo un marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder, Fermentas #SM0241). El gel se sometió a 90 Volt durante 3 horas aproximadamente en buffer TAE 1X. Posteriormente, el gel fue visualizado en un transiluminador y fotografiado con una cámara digital.

Con el fin de seleccionar partidores que tuviesen buena amplificación, se tomó ADN proveniente de un individuo y se realizó PCR con 20 partidores de 10pb. Con los 17 partidores que presentaron buena amplificación se hizo PCR al ADN de un individuo por cada población, seleccionando finalmente cuatro partidores (Tabla 2) que presentaron polimorfismo interpoblacional. Con estos cuatro partidores se realizó la PCR con el ADN de 283 individuos pertenecientes a 16 poblaciones. Para probar si el patrón de bandeo era reproducible, se seleccionaron tres individuos por población al azar y se repitió la amplificación con todos los partidores seleccionados y con las mismas condiciones especificadas anteriormente.

Tabla 2: Partidores que presentaron patrones reproducibles de polimorfismo inter-poblacional, considerados en el presente estudio poblacional de *Aextoxicon punctatum*.

Partidor	Secuencia	N° de bandas polimorficas
X-01	5' CTG GGC ACG A 3'	7
X-07	5' GAG CGA GGC T 3'	7
X-17	5' GAC ACG GAC C 3'	9
C-02	5' GTG AGG CGT C 3'	10

Análisis de datos

Los productos de amplificación (bandas) de cada individuo fueron distinguidos como presencia (1) o ausencia (0). Se construyó una matriz de datos binarios (1-0) derivados de la presencia y ausencia de bandas RAPD (Anexo). Para evitar el sesgo en el análisis genético poblacional atribuido a la dominancia de los marcadores RAPD, en los análisis donde se utilizó las frecuencias de bandas RAPD, éstas fueron calculadas siguiendo los métodos y correcciones empleados por Lynch y Milligan (1994). Por lo tanto, sólo en el caso del cálculo de porcentaje de polimorfismo se consideraron además de las bandas polimórficas, las bandas monomórficas. La población de Talinay fue eliminada del análisis debido a que no presentó un patrón reproducible con el partidador X7 (Tabla 2, Anexo).

Como medida de diversidad genética se calculó el porcentaje de loci polimórficos (TPFGA 1.3, Miller M 1997) a nivel intrapoblacional, el promedio poblacional y para la especie como una unidad, utilizando la siguiente formula:

$$\text{Porcentaje de loci polimórficos: } (P * 100) / T$$

Donde P es el número de bandas polimórficas y T es la suma de bandas polimórficas y bandas monomórficas.

Para obtener una estimación relativa de la diversidad dentro y entre cada población se obtuvo el índice de diversidad de Shannon (Lewontin 1972), mediante el programa POPGEN (versión 1.32) utilizando la siguiente formula:

$$S_0 = -\sum p_i \log_2 p_i$$

Donde p_i es la frecuencia de la presencia o ausencia de cada una de las bandas RAPD (tratando a cada una de las bandas como un único locus, de acuerdo a Lewontin 1992). S_0 puede ser calculado para dos niveles: Diversidad promedio poblacional (S_{pop}), y diversidad dentro de la especie (S_{sp}). (Chalmers et al. 1992, Martín et al. 1997).

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre la diversidad genética intrapoblacional al norte de los 40° S y la diversidad genética intrapoblacional al sur de los 40° S, se realizó una prueba estadística mediante un test de permutación (Manly 1997), utilizando el programa Rndom Projects 1.1 (Jadwiszczak 2003).

Para evaluar la estructura genética poblacional se realizó un AMOVA (Excoffier et al. 1992), usando el programa computacional AMOVA 1.55 (L. Excoffier, <http://acasunl.unige.ch/LGB/Software/Windoze/amova>). Se utilizó el programa AMOVAPREP 1.01 (Miller M 1998) para construir la matriz de distancias genéticas requeridas por el AMOVA (Distancias Euclidianas, según Excoffier et al. 1992).

El AMOVA es usado para estimar los componentes de varianza de los fenotipos RAPD, dividiendo la varianza total dentro de niveles jerárquicos: entre individuos dentro de la población, entre poblaciones dentro de regiones geográficas y entre regiones geográficas. Con el fin de probar la significancia se realizaron permutaciones (1000 replicas) bajo la hipótesis nula “no existe estructura poblacional”. El AMOVA genera ‘ Φ ’ estadísticos, análogo al F_{st} de Wright (Wright 1951) y, por lo tanto, permite la comparación con otros estudios poblacionales.

Los tres niveles del estadístico Φ (usando las siguientes ecuaciones) son mostrados en la Tabla 3:

$$\Phi_{CT} = \frac{S^2_R}{S^2_W + S^2_P + S^2_R} \qquad \Phi_{SC} = \frac{S^2_P}{S^2_W + S^2_P}$$

$$(1-\Phi_{ST}) = (1-\Phi_{CT})(1-\Phi_{SC})$$

donde S^2_R = varianza entre regiones, S^2_P = varianza entre poblaciones, S^2_W = varianza dentro de poblaciones; Φ_{CT} = proporción de varianza regional con respecto a la varianza total, Φ_{SC} = proporción de varianza dentro de regiones con respecto a la varianza poblacional, Φ_{ST} = proporción de varianza entre poblaciones con respecto a la varianza total.

Tabla 3: Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para RAPD (g.l.: grados de libertad, R: número de regiones, P: número de poblaciones, N: número de muestras, SC: suma de cuadrados, SCR: suma de cuadrados entre regiones, SCP: suma de cuadrados entre poblaciones, SCD: suma de cuadrados dentro de poblaciones, CM: cuadrados medios, CMR: cuadrados medios entre regiones, CMP: cuadrados medios entre poblaciones, CMD: cuadrados medios dentro de poblaciones, CV: componentes de varianza).

Curso de variación	g.l.	SC	CM	CV	Φ
Entre regiones	(R-1)	SCR	CMR	S^2_R	Φ_{CT}
Entre poblaciones dentro de regiones	(P-R)	SCP	CMP	S^2_P	Φ_{SC}
Entre individuos dentro de poblaciones	(N-P)	SCD	CMD	S^2_W	Φ_{ST}

Las regiones geográficas a comparar (Tabla 1) se definieron a priori como poblaciones actualmente aisladas en cimas de cerros de la Cordillera de la Costa del Norte Chico (ZN), poblaciones ubicadas en las quebradas de la Cordillera de la Costa de la zona centro (ZC), poblaciones de bosques continuos de la Cordillera de la Costa de la zona sur (CCS), y poblaciones de los faldeos andinos de la zona sur (FA). Esta última zona incluye algunas poblaciones de la depresión intermedia, debido a que no existe una barrera geográfica entre las poblaciones de olivillo de estas dos zonas. Se analizó las diferencias genéticas entre las cuatro regiones mencionadas y además se realizaron comparaciones entre pares de regiones (ZN vs. ZC; ZC vs. CCS y CCS vs. FA).

Para conocer si existen diferencias genéticas entre poblaciones, se realizó un test exacto (Raymond & Rousset 1995) mediante el programa TPFGA 1.3 (Miller 1997). Este es un análisis no-paramétrico que utiliza una tabla de contingencia RxC (test de Fisher) para determinar si existen diferencias significativas en las frecuencias de cada marcador RAPD entre pares de poblaciones (R poblaciones y C marcadores por locus). En base a un análisis de Monte Carlo se estimó si las diferencias entre poblaciones eran significativas ($p < 0.05$).

Se utilizó el correlograma de Mantel (Mantel 1967) para conocer las relaciones entre distancia genética y distancia geográfica entre poblaciones. Las distancias geográficas entre pares de poblaciones (Tabla 4) se obtuvieron ingresando las coordenadas geográficas de cada población en la página web de Internet (<http://www.wcrl.ars.usda.gov>). Las medidas de distancias genéticas utilizadas fueron los valores de Φ_{st} entre pares de poblaciones generados por el AMOVA. Las distancias genéticas y

distancias geográficas fueron transformadas a distancias euclidianas en el programa STATISTICA 6.0. Para cada uno de los coeficientes de auto-correlación (Mantel R) se realizó una prueba de significancia (1000 replicas "bootstrap"). Primero, se efectuó una correlación utilizando todas las poblaciones de olivillo consideradas en este estudio. Luego se realizó un análisis por regiones geográficas, separando las siguientes zonas: poblaciones de la Cordillera de la Costa (ZN, ZC y CCS); poblaciones de la ZC y CCS; sólo las poblaciones de la CCS y, finalmente, un análisis considerando sólo las poblaciones de los faldeos andinos y la depresión intermedia (FA).

Para conocer las agrupaciones entre las poblaciones se construyó un dendrograma mediante el algoritmo UPGMA (Rohlf 1992), basado en las distancias genéticas de Nei (1978), usando el programa TFPGA (Miller M 1997). Para saber donde se agrupaba la población de Talinay se hizo además un dendrograma con tres partidores (se eliminó todos los loci pertenecientes al partidor X7 que no presentó amplificación en esta población).

Con el fin de obtener una representación gráfica de las relaciones entre los fenotipos RAPD individuales, se realizó un análisis de coordenadas principales (PCo, Gower 1966) mediante el programa NTSYS-PC (Rohlf 1992).

Tabla 4: Distancias geográficas (km lineales) entre pares de poblaciones de olivillo en Chile (Abreviaturas de las poblaciones mostradas en la Tabla 1).

	FJ	SI	Qt	Ru	Lq	Co	Te	Cu	Ra	Ma	Pu	Vp	Fr	Gb	Rp
FJ	0														
SI	144	0													
Qt	210	69	0												
Ru	554	419	350	0											
Lq	598	466	398	52	0										
Co	807	676	607	258	210	0									
Te	898	762	693	345	304	120	0								
Cu	1023	890	821	471	425	217	139	0							
Ra	1063	924	855	511	472	283	169	117	0						
Ma	1118	984	915	565	519	311	230	95	131	0					
Pu	1121	982	913	569	528	335	225	143	59	112	0				
Vp	1163	1024	955	611	571	378	267	180	100	131	43	0			
Fr	1169	1033	963	616	573	371	271	159	119	87	66	54	0		
Gb	1259	1126	1057	707	661	453	369	237	235	142	185	165	119	0	
Rp	1296	1162	1093	743	697	489	403	273	264	178	210	184	145	37	0

RESULTADOS

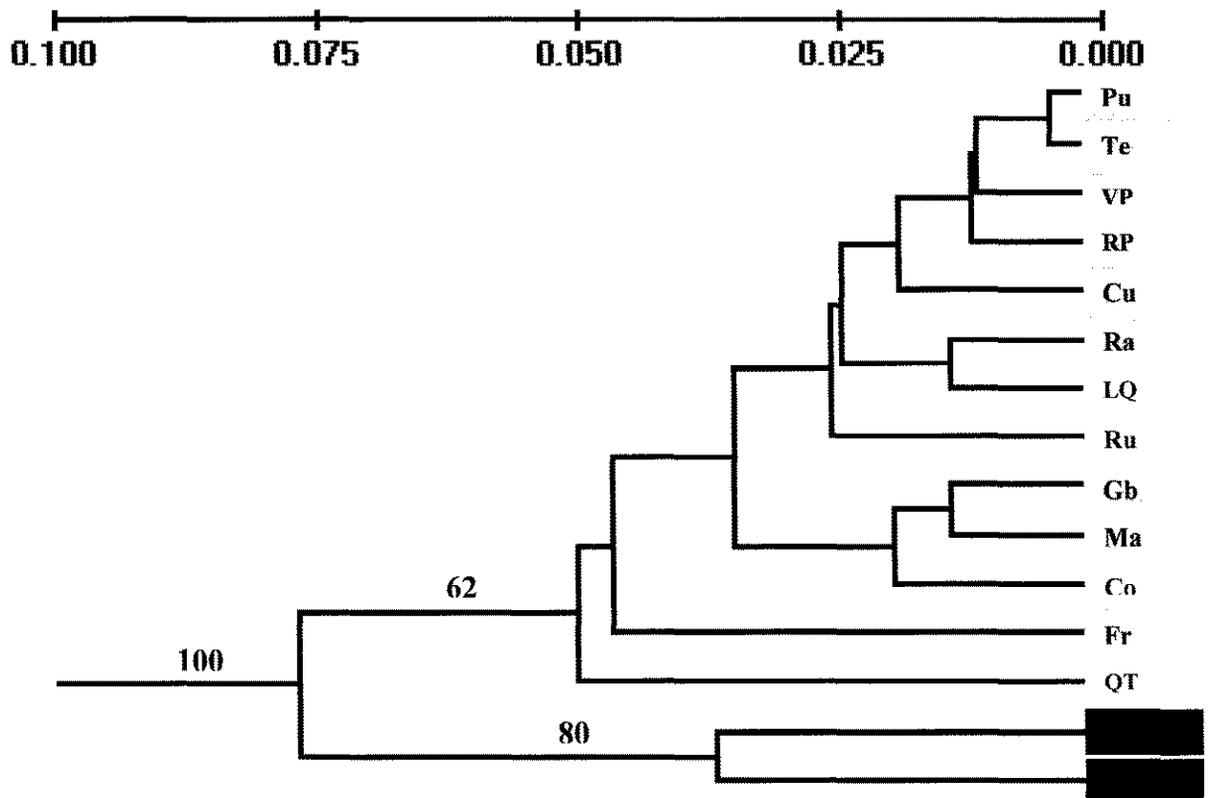
En el presente estudio se identificaron un total de 39 bandas reproducibles, de las cuales 33 fueron polimórficas (Tabla 5, Figura 2). El porcentaje de loci polimórficos intrapoblacional varió desde 51,3% (Contulmo) a 71,8% (Quebrada del Tigre, Los Ruiles y Temuco). El porcentaje de loci polimórfico promedio poblacional fue de 63,7% (Tabla 6) y el valor para la especie en todo el ámbito geográfico estudiado fue de 84,6%. La diversidad genética intrapoblacional calculada mediante el Índice de Shannon varió desde 0,31 (Maicolpue) hasta 0,41 (Santa Inés). La diversidad genética promedio para todas las poblaciones (S_{pop}) fue 0,36 y el valor estimado para la especie (S_{sp}) correspondió a 0,45 (Tabla 6). Las poblaciones con mayor diversidad genética correspondieron a Santa Inés ($I = 0,41$), Los Ruiles ($I = 0,40$) y Temuco ($I = 0,41$). Estas tres poblaciones con alta diversidad genética están ubicadas al norte de los 40° S. Sin embargo, no existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores de diversidad genética, medidos tanto por el Índice de Shannon como por el porcentaje de polimorfismo, entre las poblaciones ubicadas al norte y las ubicadas al sur de los 40° S.

Los resultados del AMOVA considerando las poblaciones de todo el ámbito de distribución geográfica de olivillo indicaron que existían diferencias significativas entre las cuatro regiones estudiadas ($P = 0,005$; 1000 replicaciones) y entre las poblaciones de olivillo dentro de cada región (Tabla 7 y 8). Una alta proporción del total de diversidad genética de la especie correspondió a diferencias entre individuos de olivillo dentro de las poblaciones (81,8 %), y una significativa proporción fue atribuible a diferencias entre poblaciones dentro de cada región (12,1%) y entre regiones (6,1%).

El dendrograma basado en distancias genéticas de Nei (1978) agrupó las poblaciones más boreales de la distribución geográfica del olivillo (Fray Jorge y Santa Inés) separadas de las demás poblaciones del centro y sur de Chile (Figura 4), con un alto valor de “bootstrap” (Valor =100). El nodo que separa a la población de Fray Jorge de la población Santa Inés también presenta un alto valor de bootstrap (Valor = 80), sugiriendo una alta diferenciación entre ambas poblaciones. Al realizar el análisis incorporando la población de Talinay y eliminado el partidador X7, que no amplificó el ADN de los individuos de esta población (Anexo), se obtuvo un dendrograma (no mostrado) con la misma topología, agrupando la población de Talinay junto con las poblaciones de cimas de cerros del Norte Chico (Fray Jorge y Santa Inés).

La población de Quebrada del Tigre no se agrupó con los relictos de las cimas de cerros del norte Chico, a pesar de corresponder a la población más boreal de la zona central, separada aproximadamente 70 Km del bosque relictivo de Santa Inés. Los valores de “bootstrap” en el grupo heterogéneo que contiene las poblaciones de las zonas centro y sur fueron bajos (valor < 50), no mostrando relación con su ubicación geográfica (Figura 4).

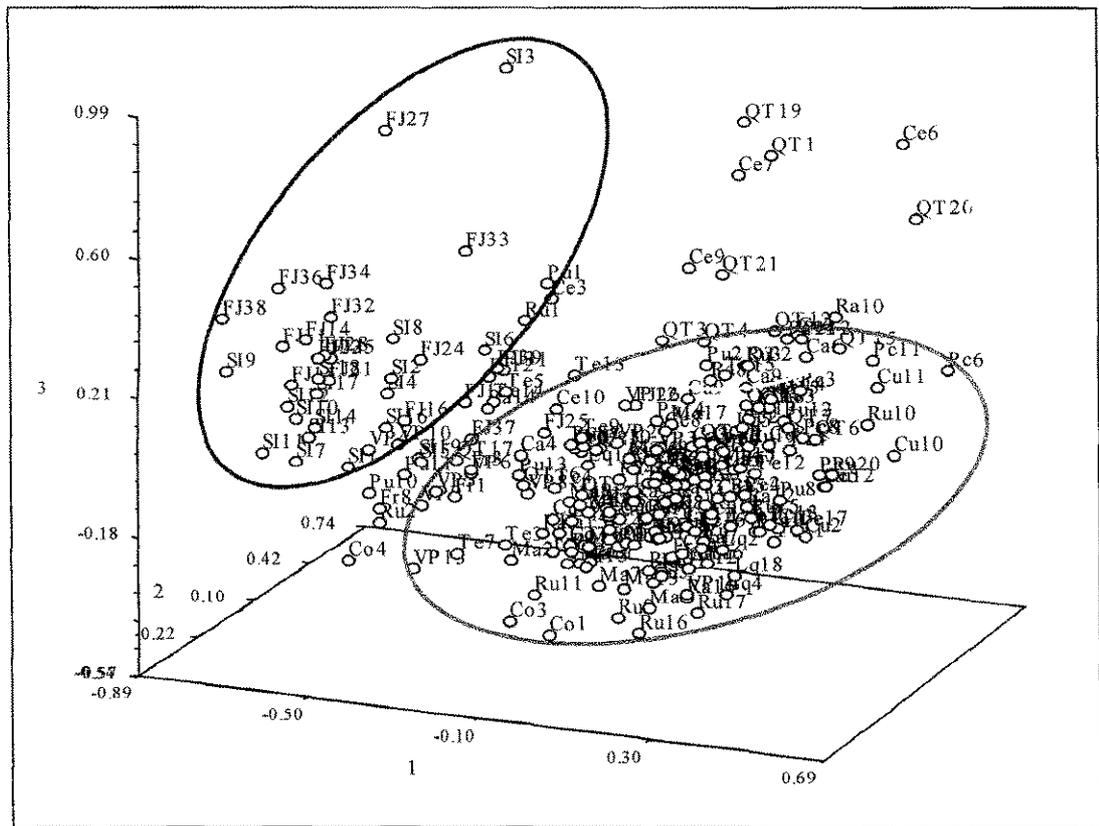
Figura 4: Dendrograma UPGMA basado en distancias genéticas de Nei (1978). Poblaciones en rojo pertenecen a la zona norte, poblaciones en amarillo pertenecen a la zona centro y poblaciones en verde pertenecen a la zona sur. Las abreviaturas se muestran en la Tabla 1.



Este resultado concuerda con la baja estructura genética entre las poblaciones de la zona centro y las poblaciones de la zona sur mostrada por los bajos valores de Φ_{st} provenientes del AMOVA (Tabla 8).

En cuanto al Análisis de Coordinadas Principales (PCo), mostró una leve tendencia al agrupamiento de los fenotipos RAPD de los individuos provenientes de las poblaciones de la zona norte (circulo rojo, Figura 5) separados de los fenotipos provenientes de las poblaciones de la zona centro y sur (circulo verde, Figura 5). También se observó un grupo constituido por fenotipos de individuos pertenecientes a la población de Quebrada del Tigre, separados levemente del grupo de la zona norte y zona sur (circulo amarillo, Figura 5). Sin embargo, un bajo porcentaje de la variabilidad (24,18%) fue explicada por los 3 primeros ejes del PCo.

Figura 5: Análisis de coordenadas principales (PCo) de los fenotipos individuales RAPD. Circulo rojo = fenotipos de los individuos de la zona norte; circulo verde = fenotipos de los individuos de la zona centro y sur; circulo amarillo = fenotipos de los individuos pertenecientes a Quebrada del tigre. Abreviaturas mostradas en la Tabla 1.



DISCUSIÓN

El conocimiento de la magnitud y distribución de la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de olivillo permite examinar el efecto de la historia biogeográfica sobre los patrones de diversidad genética actuales en esta especie arbórea. Además, contribuye al conocimiento de la magnitud de la diversidad genética en esta especie en los márgenes de su distribución y en zonas degradadas por impacto humano, permitiendo la aplicación de esta información en estrategias de conservación.

El promedio poblacional de diversidad genética para olivillo, estimado a partir del índice de Shannon ($S_{pop} = 0,36$) fue relativamente bajo, si lo comparamos con estadísticos similares para otras especies arbóreas estudiadas en bosques de Chile y del hemisferio norte (Tabla 11). Por ejemplo, en las especies de coníferas nativas de Chile, *Fitzroya cupressoides* (Allnutt et al. 1999), *Podocarpus salignus* (Allnutt et al. 2001a) y *Araucaria araucana* (Bekessy et al. 2002), caracterizadas por presentar actualmente una distribución geográfica restringida, se han documentado valores de diversidad genética mayores al observado en olivillo y más altos de lo esperado sobre la base de su restringida distribución geográfica actual (0,54; 0,64 y 0,65 respectivamente). En cuanto a la conífera más austral de Sudamérica, *Pilgerodendron uviferum*, de distribución actualmente extensa latitudinalmente, pero restringida principalmente a la costa, se encontró un valor de diversidad de 0,57. Otras especies de árboles del hemisferio norte con extensos rangos de distribución geográfica, como *Populus tremuloides* (Yeh et al. 1995) y *Cedrela odorata* (Gillies et al. 1997) también presentaron valores más altos que olivillo (0,65 y 0,42 respectivamente).

Tabla 11: Diversidad genética promedio poblacional (S_{pop}) medida mediante el Índice de diversidad de Shannon (I) en diferentes especies de árboles cuyos datos se obtuvieron usando el marcador molecular RAPD utilizado en el presente estudio.

Especies	Distribución actual	N	I	Referencia
<i>Aextoxicon punctatum</i>	extensa	283	0.36	Este estudio
<i>Araucaria araucana</i>	restringida	192	0.65	Bekessy et al. 2002
<i>Fitzroya cupressoides</i>	restringida	89	0.54	Allnut et al. 1999
<i>Podocarpus saligna</i>	restringida	41	0.64	Allnut et al. 2001
<i>Pilgerodendron uviferum</i>	extensa	192	0.57	Allnut et al. 2003
<i>Populus tremuloides</i>	extensa	249	0.65	Yeh et al. 1995
<i>Cedrela odorata</i>	extensa	68	0.42	Gillies et al. 1997



La distribución geográfica del olivillo es actualmente muy extensa (1200 Km), excediendo el límite norte del bosque templado del sur de Sudamérica. Sobre la base de su amplia distribución y su carácter dioico, se podría esperar un elevado valor de diversidad genética para el olivillo (Hamrick et al. 1992). Sin embargo, el valor es bajo comparado con las especies de coníferas chilenas de distribución actualmente restringida y otras especies del hemisferio norte de distribución amplia (Tabla 11).

Varios de los estudios realizados en especies arbóreas del bosque templado de Sudamérica austral, especialmente especies con rangos geográficos restringidos, muestran las huellas de la historia glacial en la estructura genética de sus poblaciones (*Araucaria araucana*, Bekessy 2002; *Fitzroya cupressoides*, Allnutt et al. 1999; *Pilgerodendron uviferum*, Allnutt et al. 2001; *Beberidopsis corallina*, Etisham-Ul-Haq et al. 2001). Los estudios de diversidad genética citados proponen la ocurrencia de múltiples refugios restringidos a áreas de la Cordillera de la Costa de Chile durante el último máximo glacial. Estudios con especies de amplia distribución geográfica actual y con requerimientos de clima más termófilos, como es el caso de olivillo, son de singular importancia para entender los impactos de la glaciación, debido a que pueden mostrar los efectos de la contracción y fragmentación de su rango, evidenciando una respuesta opuesta a la de especies más tolerantes al clima glacial, como la conífera *Fitzroya cupressoides*, las que ampliaron su distribución en la zona sur en los períodos glaciales y presentan rangos más restringidos en los interglaciales como el actual (Heusser 1999, Villagrán & Roig 2004).

Durante las glaciaciones del Pleistoceno, olivillo habría experimentado la contracción de su rango geográfico en el extremo sur, al igual que los elementos del actual bosque Valdiviano (hacia el norte de los 40° S por la Cordillera de la Costa, Villagrán 1991). Esta contracción, asociada a los períodos glaciales, podría haber llevado a una pérdida significativa de su diversidad genética interpoblacional, lo cual se vería reflejado en la baja diversidad genética de la especie encontrada en el presente estudio. En contraste, las coníferas más tolerantes al frío, como *Fitzroya*, con un patrón de distribución geográfico actualmente restringido, expandieron su rango durante el máximo glacial como lo indican los registros de polen y de troncos fósiles (Heusser 1999, Villagrán & Roig 2004), reflejando en el presente las consecuencias genéticas de su amplia distribución durante las glaciaciones, es decir, una alta diversidad genética.

La diversidad genética intrapoblacional es similar entre las distintas poblaciones de olivillo, mostrando una leve tendencia a la disminución hacia el sur de los 40° S (Tabla 6). Sin embargo, no hubo diferencias significativas entre los valores diversidad genética (Índice de Shannon y porcentaje de polimorfismo) de las poblaciones ubicadas al norte de los 40° S y los valores de diversidad genética de las poblaciones ubicadas al sur de los 40°.

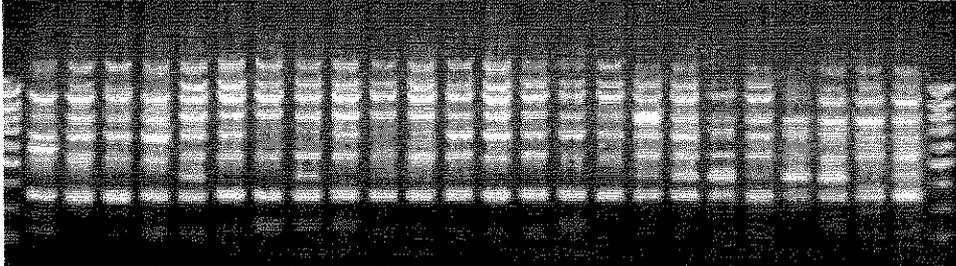
Al norte de los 40° S, se ubican las poblaciones que presentaron la mayor diversidad genética en este estudio (Santa Inés, Los Ruiles y Temuco; Tabla 6), lo que concuerda con la hipótesis de posibles refugios glaciales ubicados en esta área (Villagrán 1991). Sin embargo, en esta zona también se ubicaron poblaciones con bajos valores de diversidad genética (Los Queules, Contulmo; Tabla 6). Estas dos últimas son pequeñas poblaciones que han quedado aisladas en áreas sometidas a extensos

Tabla 5: Pares de bases de cada locus polimórfico considerado en el estudio.

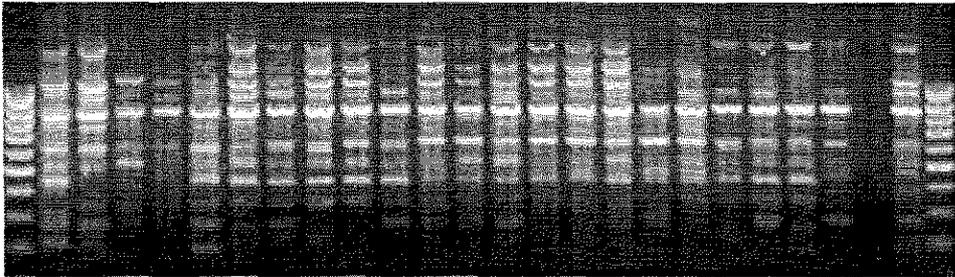
Partidor	X17	C2	X7	X1
locus				
1	1400	1200	1031	1300
2	1300	1100	900	1200
3	1100	900	800	1100
4	950	800	700	1000
5	800	700	600	950
6	700	600	550	800
7	650	500	500	700
8	450	480		
9	400	450		
10		400		

Figura 2: Fotografías de los geles de agarosa mostrando los patrones de bandeo de los cuatro partidores utilizados en el presente estudio (C2, X1, X7 y X17).

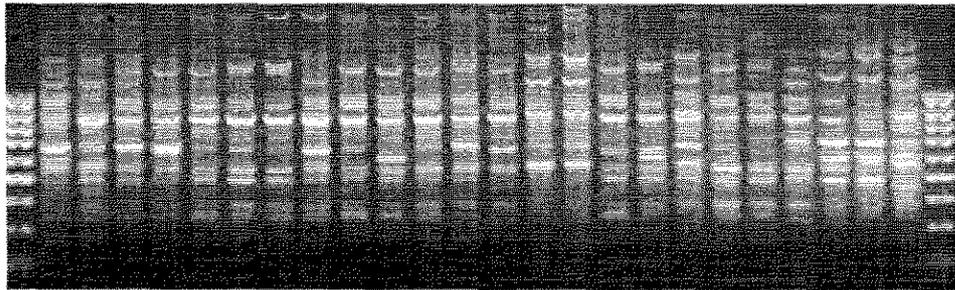
C2



X1



X7



X17

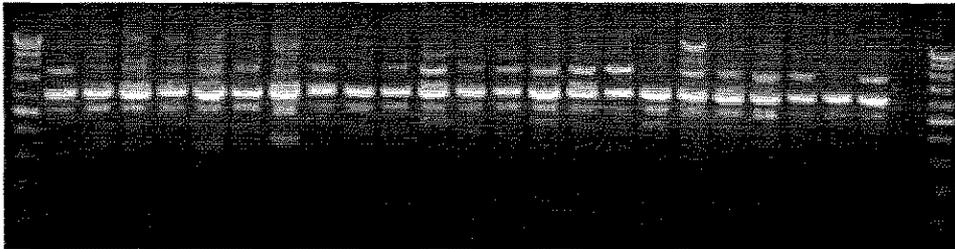


Tabla 6: Diversidad genética medida mediante el Índice de Shannon (I) con su Desviación estándar (SD) y el Porcentaje de Polimorfismo (%P) para todas las poblaciones consideradas en el estudio, el promedio poblacional y el valor para la especie. P.N.= Parque Nacional; R.N.: Reserva Nacional

Localidad	Ubicación (° lat S-long W)	Región*	I	SD	%P
P.N. Fray Jorge	30° 40' - 71° 40'	ZN	0,36	0,28	58.9
Santa Inés	31° 56' - 71° 22'	ZN	0,41	0,26	69.2
Quebrada del Tigre	32° 33' - 71° 28'	ZC	0,38	0,26	71.8
R.N. Los Ruiles	35° 37' - 72° 20'	ZC	0,40	0,25	71.8
R.N. Los Queules	35° 59' - 72° 41'	ZC	0,32	0,28	56.4
R.N. Contulmo	37° 48' - 73° 19'	ZC	0,34	0,30	51.3
R.N. Temuco	38° 43' - 72° 35'	FA	0,41	0,24	71.8
Curíñanco	39° 45' - 73° 30'	CCS	0,36	0,25	66.7
Lago Ranco	40° 13' - 72° 16'	FA	0,36	0,25	69,2
Maicolpue	40° 35' - 73° 44'	CCS	0,31	0,29	53.8
Puyehue	40° 44' - 72° 25'	FA	0,35	0,24	66.7
P.N. Vicente Pérez Rosales	41° 07' - 72° 21'	FA	0,38	0,28	58.9
Frutillar	41° 08' - 73°	FA	0,34	0,31	53.8
Guabún	41° 50' - 74° 05'	CCS	0,39	0,26	71.8
P.N. Chiloé	42° 10' - 74° 04'	CCS	0,36	0,26	64.1
<i>Promedio poblacional (S_{pop})</i>			0,36		63.7
<i>Total (S_{sp})</i>			0.45	0.21	84.6

* ZN= poblaciones aisladas en cimas de cerros costeros de la zona semiárida (Norte Chico). ZC= poblaciones ubicadas en las quebradas costeras de Chile central con clima mediterráneo. CCS= poblaciones ubicadas en la Cordillera de la Costa de la zona sur. FA= poblaciones ubicadas en la depresión intermedia y faldeos andinos de la zona sur.

La comparación entre la ZN y la ZC, mostró que las dos regiones son significativamente distintas, aumentando a un 21,7% el porcentaje de diversidad genética atribuible a diferencias entre regiones. Por el contrario, las comparaciones realizadas entre ZC vs. CCS y, por otra parte, entre la CCS vs. FA, no presentaron diferencias significativas entre regiones (Tabla 7).

En cuanto a los valores de Φ , Wright (1978) sugiere que el rango entre 0-0,05 podría indicar una baja diferenciación genética; 0,05-0,15 moderada diferenciación, 0,15-0,25 una alta diferenciación y sobre 0,25 indicaría una muy alta diferenciación genética. Los valores de Φ entre regiones entregados por el AMOVA, muestran diferencias genéticas leves, pero significativas entre las cuatro zonas definidas en este estudio ($\Phi_{CT} = 0,06$; Tabla 8). Sin embargo, al realizar las comparaciones entre pares de regiones, se observó una alta diferencia genética entre la ZN y ZC ($\Phi_{CT} = 0,217$; Tabla 8). En contraste, la ZC, CCS y FA, no presentaron diferencias significativas entre regiones (Tabla 8). Esto indica que las diferencias genéticas entre las cuatro regiones en conjunto, son debidas principalmente a la notable diferencia genética que presenta la zona norte (ZN). Se destaca especialmente la alta magnitud de las diferencias genética encontrada entre poblaciones de la ZN y la ZC ($\Phi_{ST} = 0,325$; $p < 0,001$; Tabla 8), en contraste a la baja magnitud de la diferenciación que existe entre las poblaciones de la ZC y CCS ($\Phi_{ST} = 0,147$; $p < 0,001$; Tabla 8) y entre las poblaciones de la CCS y FA ($\Phi_{ST} = 0,113$; $p < 0,001$; Tabla 8). Esto muestra que, a pesar que las poblaciones de la zona centro y la zona sur son distintas genéticamente, ha existido mayor intercambio génico entre ellas que con las poblaciones de la zona norte.

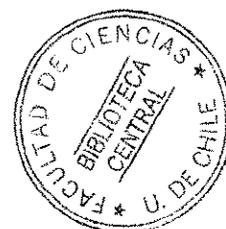


Tabla 7: Resumen de los porcentaje de varianza mostrados por el AMOVA, correspondiente a diferencias entre regiones, entre poblaciones dentro de regiones y dentro de poblaciones. Las comparaciones se realizaron entre las cuatro regiones geográficas definidas a priori (ZN= zona norte; ZC= zona centro; CCS= Cordillera de la Costa de la zona sur; FA = faldeos andinos y depresión intermedia de la zona sur) y posteriormente se realizaron comparaciones entre pares de regiones geográficas (ZN vs. ZC; ZC vs. CCS y CCS vs. FA).

Fuente de variación	g.l	Varianza	% del total de varianza
ZN/ZC/CCS/FA			
Entre regiones	3	0.32	6.06
Entre poblaciones dentro de regiones	11	0.65	12.13
Dentro de poblaciones	240	4.40	81.80
ZN / ZC			
Entre regiones	1	1.37	21.7
Entre poblaciones dentro de regiones	4	0.68	10.77
Dentro de poblaciones	91	4.27	67.53
ZC/ CCS			
Entre regiones	1	0.06	1.32
Entre poblaciones dentro de regiones	6	0.68	13.33
Dentro de poblaciones	146	4.36	85.34
CCS/ FA			
Entre regiones	1	0.0	0.0
Entre poblaciones dentro de regiones	7	0.6	12
Dentro de poblaciones	153	4.49	88.69

Tabla 8: Valores de Φ generados por el AMOVA para las comparaciones realizadas entre regiones geográficas (ZN= zona norte; ZC= zona centro; CCS= Cordillera de la Costa de la zona sur; FA = faldeos andinos y depresión intermedia de la zona sur) definidas a priori en el presente estudio. Φ_{CT} = tasa de varianza regional con respecto a la varianza total, Φ_{SC} = tasa de varianza dentro de regiones con respecto a la varianza poblacional, Φ_{ST} = tasa de varianza entre poblaciones con respecto a la varianza total.

Fuente de variación	Φ	Valor de P
ZN/ZC/CCS/FA		
Entre regiones (Φ_{CT})	0.061	0.005
Entre poblaciones dentro de regiones(Φ_{SC})	0.129	< 0.001
Entre poblaciones (Φ_{ST})	0.182	< 0.001
ZN / ZC		
Entre regiones (Φ_{CT})	0.217	< 0.001
Entre poblaciones dentro de regiones (Φ_{SC})	0.138	< 0.001
Entre poblaciones (Φ_{ST})	0.325	< 0.001
ZC/ CCS		
Entre regiones (Φ_{CT})	0.013	0.2
Entre poblaciones dentro de regiones (Φ_{SC})	0.135	< 0.001
Entre poblaciones (Φ_{ST})	0.147	< 0.001
CCS/ FA		
Entre regiones (Φ_{CT})	0.0	0.6
Entre poblaciones dentro de regiones (Φ_{SC})	0.119	< 0.001
Entre poblaciones (Φ_{ST})	0.113	< 0.001

Mientras más altos son los valores de Φ_{ST} , las poblaciones son más distintas genéticamente. Se destaca los altos valores de Φ_{ST} entre las poblaciones aisladas de Fray Jorge y Santa Inés (Norte Chico), con respecto a las demás poblaciones de la zona centro y zona sur (Tabla 9). Probablemente, el aislamiento geográfico histórico de las poblaciones de la zona norte, ha sido suficientemente prolongado para provocar una alta diferenciación genética de estas poblaciones. Los valores de Φ_{ST} entre pares de poblaciones sugieren una tendencia a la disminución en la diferencia genética, a medida que las poblaciones se encuentran a mayores latitudes (Tabla 9).

Los resultados del test exacto muestran que varios pares de poblaciones pertenecientes a la zona centro y zona sur no presentaron diferencias significativas (Tabla 9). En cuanto a las poblaciones de las cimas de cerros de la zona norte, siempre fueron significativamente distintas de las poblaciones de la zona centro y zona sur.

La correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas para todo el ámbito de distribución geográfica del olivillo fue alta y significativa (Tabla 10, Figura 3), al igual que la correlación estimada sólo para las poblaciones pertenecientes a la Cordillera de la Costa de la ZN, ZC y CCS; Cordillera de la Costa de la ZC y CCS; y CCS de la zona sur ($R^2= 0,78$; $R^2= 0,72$; $R^2= 0,59$ y $R^2= 0,7$ respectivamente; $p<0,005$; Tabla 10). Sin embargo, al realizar el análisis sólo para las poblaciones de los FA de la zona sur, la correlación entre distancia genética y distancia geográfica no fue significativa (Tabla 10).

Tabla 9: Diferenciación genética entre poblaciones (diagonal superior) mostrado por los valores de P generados por el test exacto (en negrita los valores no significativos) y valores de Φ_{ST} calculados por AMOVA entre pares de poblaciones (diagonal inferior, en negrita los valores no significativos). Abreviaturas mostradas en la Tabla 1.

	Fj	SI	Qt	Ru	Lq	Co	Te	Cu	Ra	Ma	Pu	Vp	Fr	Gb	Rp
Fj		0.00	0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
SI	0.16		0.00	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Qt	0.34	0.37		0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Ru	0.30	0.32	0.22		0.055	0.168	0.065	0.005	0.000	0.001	0.111	0.001	0.095	0.002	0.002
Lq	0.33	0.36	0.09	0.08		0.477	0.083	0.001	0.601	0.174	0.002	0.001	0.122	0.001	0.006
Co	0.29	0.28	0.18	0.11	0.09		0.829	0.004	0.036	0.493	0.036	0.762	0.835	0.933	0.443
Te	0.21	0.24	0.18	0.08	0.08	0.06		0.628	0.000	0.005	0.879	0.382	0.649	0.000	0.912
Cu	0.33	0.35	0.18	0.12	0.14	0.15	0.03		0.000	0.000	0.002	0.000	0.000	0.000	0.004
Ra	0.29	0.31	0.13	0.14	0.06	0.13	0.15	0.19		0.119	0.001	0.000	0.000	0.000	0.000
Ma	0.34	0.36	0.23	0.15	0.11	0.09	0.13	0.22	0.09		0.000	0.054	0.693	0.000	0.000
Pu	0.23	0.29	0.20	0.06	0.11	0.13	0.01	0.10	0.12	0.15		0.851	0.011	0.000	0.073
Vp	0.22	0.26	0.22	0.11	0.13	0.07	0.06	0.17	0.13	0.09	0.05		0.600	0.001	0.548
Fr	0.32	0.26	0.23	0.12	0.12	0.08	0.07	0.19	0.18	0.09	0.16	0.08		0.076	0.144
Gb	0.29	0.27	0.21	0.09	0.10	0.03	0.11	0.16	0.11	0.08	0.14	0.10	0.09		0.000
Rp	0.24	0.25	0.23	0.13	0.12	0.09	0.02	0.12	0.14	0.13	0.08	0.06	0.12	0.10	

Tabla 10: Valor de R^2 y significancia generado por el Test de Mantel. Las correlaciones entre distancia geográfica (km) y distancia genética (Φ_{ST}) se realizaron para todo el ámbito de distribución geográfico de *Aextoxicon punctatum* y a distintas escalas geográficas.

Rango geográfico	Mantel	
	R^2	Valor de P
ZN+ZC+CCS+FA	0.78	< 0.005
ZN+ZC+CCS	0.72	< 0.005
ZC+CCS	0.59	< 0.005
CCS	0.7	< 0.025
FA	0.1	NS

reemplazos de bosques nativos por plantaciones forestales con especies introducidas (pino y eucaliptos). Es posible que los centros de alta diversidad genética que subsistieron durante las glaciaciones (Villagrán 1991), sirviendo como fuente de propágulos para las poblaciones andinas y australes, estén perdiendo su variabilidad poblacional debido a la creciente fragmentación de los bosques nativos. Es imposible discriminar mediante el método utilizado en este estudio, si la baja diversidad de estas poblaciones es debida a pérdidas de variabilidad reciente. Sin embargo, las poblaciones que presentaron altos valores de diversidad genética también se encuentran en un estado de conservación precario, lo que sugiere que la situación es más compleja.

La antigüedad del aislamiento geográfico de las poblaciones de olivillo ubicadas en la cimas de cerros del Norte Chico podría ser la causa de la alta diferenciación genética de estas poblaciones (Fray Jorge, Talinay y Santa Inés), respecto al grueso de las poblaciones de Chile centro-sur (Tabla 8 y 9). Todos los resultados presentados en este estudio avalan esta alta diferenciación. La gran antigüedad y aislamiento de los relictos del Norte Chico es también documentada por un estudio de filogeografía de las especies del género *Drymis* presentes en Chile y Argentina (Jara et al. 2002), realizado con el mismo marcador utilizado en este estudio (RAPD). Este trabajo muestra una gran divergencia genética de la población de *Drymis winteri* ubicada en Fray Jorge, tanto respecto a las poblaciones de los sitios bajos de su misma región, como con las demás poblaciones de *Drymis* en Chile (Jara et al. 2002).

Mientras que las barreras para el intercambio génico promueven la diferenciación de poblaciones debido a deriva génica, mutación y/o selección, la migración restringe la diferenciación genética, incrementando la similitud entre poblaciones separadas

geográficamente (Gabrielsen et al. 1997). El aislamiento geográfico de las poblaciones de olivillo de la zona semiárida habría restringido el intercambio genético, produciendo la alta diferenciación genética observada; probablemente, a través de una limitada dispersión de polen y/o semillas. Sin embargo, al parecer el flujo génico se ha mantenido entre las poblaciones de la zona centro y zona sur de Chile (Tabla 7 y 8).

Quebrada del Tigre (QT), la población más boreal de Chile central, presentó una condición particular, ya que mostró mayor similitud genética con las poblaciones más lejanas de la zona centro-sur que con la población más cercana hacia el norte, ubicada en el Cerro Santa Inés (QT vs. SI, $\Phi_{ST} = 0,37$; QT vs. Ru, $\Phi_{ST} = 0,22$; Tabla 9). Esto se ve reflejado en el dendrograma, donde la población de QT no se agrupó con las localidades geográficamente más cercanas del Norte Chico (Figura 4). Por otra parte, el PCo muestra tres grupos, los individuos de la zona norte, los individuos de la zona centro-sur y, un tercer grupo constituido por individuos de la población de QT (Figura 5). Si bien dentro del grupo de las poblaciones de la zona centro-sur, QT es la población más distinta, los resultados sugieren que desde la población de QT hacia el sur, olivillo habría presentado una distribución geográfica con mayor continuidad. Existe evidencia que en varias quebradas costeras de la zona central (ubicadas entre los 32 y 34° S, aproximadamente) se encuentran individuos aislados o pequeñas poblaciones de olivillo (Villagrán, Armesto y Medina, Informe Botánico de Quebrada de Córdoba, manuscrito) que representarían los eslabones entre QT y las poblaciones más continuas de la Cordillera de la Costa del centro-sur. Estas pequeñas poblaciones en quebradas no fueron incluidas en este estudio, debido a su notorio estado de degradación (por incendios, pastoreo y extracción de agua) y escaso número de individuos. Si estas

poblaciones han conservado al menos una parte de su diversidad genética original, se trataría de poblaciones clave en términos genéticos, siendo relevante su estudio con fines de conservación y restauración. Probablemente, en un estudio de filogeografía, los individuos aislados en las quebradas del litoral de Chile central se agruparían con la población de Quebrada del Tigre, que representaría el eslabón más boreal de esta cadena de bosques de olivillo de quebradas costeras.

Los resultados provenientes del AMOVA muestran que el porcentaje de diversidad genética de la especie que correspondió a diferencias entre poblaciones dentro de cada región es de un 12,1%, similar a los observados en otras especies nativas de Chile usando la técnica molecular RAPD. Por ejemplo, en las coníferas *Podocarpus saligna* (Allnutt et al. 2001a), *Pilgerodendron uviferum* (Allnutt et al. 2001b), *Fitzroya cupressoides* (Allnutt et al. 1999) y *Araucaria araucana* (Bekessy 2002), se encontró que un 7%, 18,6%, 14% y 11% respectivamente, de la variación genética total era atribuible a diferencias entre poblaciones. Un valor mucho más alto, evidenciando una alta diferenciación entre poblaciones fue encontrado en el caso de la enredadera nativa *Beberidopsis corallina* (54,8%, Etisham-Ul-Haq et al. 2001). Esta especie, actualmente en peligro de extinción, presenta pequeñas poblaciones restringidas y aisladas entre los 36° S y 41° S. Para el caso de *Podocarpus saligna*, Allnutt et al. (2001b) explicaron el bajo porcentaje de la varianza entre poblaciones debido a que esta especie presenta dispersión de semillas por aves frugívoras, lo que incrementa el flujo génico (Hamrick & Godt 1989). Esta situación es diferente a las coníferas *Fitzroya* y *Pilgerodendron*, cuyas semillas son dispersadas por el viento. La dispersión de semillas de olivillo también es efectuada por aves frugívoras (Salvande et al., manuscrito), lo que podría favorecer un

elevado intercambio génico, reduciendo las diferencias genéticas entre poblaciones de la zona sur. Sin embargo, debido al extenso rango geográfico del olivillo (aprox. 1.200 km), es probable que la eficiencia en la dispersión no alcance a cubrir todo su rango geográfico, como lo indica la alta diferenciación genética entre las poblaciones de las cimas de cerros del Norte Chico y las poblaciones de quebradas costeras de la zona central (Tabla 8).

Al realizar el AMOVA sólo para las poblaciones de la zona centro (ZC) y zona sur (CCS vs. FA), no presentaron diferencias significativas entre estas tres regiones (Tabla 7 y 8). Sin embargo, las poblaciones de olivillo dentro de cada una de estas zonas difieren entre sí, pero sus valores asociados de Φ_{st} son bajos, evidenciando una baja diferenciación genética entre ellas. Incluso, las comparaciones entre pares de poblaciones (Tabla 9) mostraron que varias localidades de la zona sur no presentaron diferencias significativas. Esto se refleja en el dendrograma, el que presentó bajos valores de “bootstrap” (<50) para el grupo que incluye el conjunto de las poblaciones de la zona centro y la zona sur, y que no muestra una topología relacionada con la ubicación geográfica de las poblaciones. Más aún, las poblaciones dentro de cada zona y entre las dos zonas se encuentran mezcladas. Probablemente aumentando el número de loci informativos en el análisis se podría obtener una mayor resolución de este grupo en el dendrograma. Esta alta mezcla entre individuos de la zona centro y sur también se ve graficada en el PCo (círculo verde, Figura 5).

Olivillo es una especie con frutos carnosos, que presenta como principales dispersores en Chiloé a las aves *Turdus falklandii* (zorzal) y *Columba araucana* (Torcaza) (Salvande, manuscrito). Se desconoce cuál es la efectividad de las aves

dispersoras de semillas de olivillo en mantener el flujo genético entre poblaciones a través de su ámbito de distribución. Olivillo fructifica en el periodo otoño-invierno, periodo en el que el principal frugívoro de los bosques templados del centro y sur de Chile, el Tyrannidae *Elaenia albiceps* (fio-fío) ya ha migrado (Armesto et al. 1995). El conocimiento de los vectores de semillas a través del ámbito de distribución geográfico del olivillo, de las distancias máximas de dispersión de estas especie frugívoras, y del rango de distribución de las especies dispersantes de semillas en el período en que olivillo presenta sus frutos maduros, podría ser relevante para explicar los patrones de estructura genética encontrados en este estudio. Probablemente, la efectividad en el transporte de semillas por aves frugívoras puede abarcar una escala de varios kilómetros, debido a que el olivillo está presente en bosques de la Isla Mocha (90 km al este del continente) y es la especie dominante en bosques de las islas al sur de Chiloé (Villagrán et al. 2004). En consecuencia, la dispersión de semillas principalmente por aves frugívoras (Salvande, Armesto & Figueroa, manuscrito), podría ser el mecanismo que explicaría la escasa diferenciación genética encontrada entre las poblaciones de olivillo en Chile centro-sur.

Se encontró una correlación positiva y significativa entre distancia genética y distancia geográfica de las poblaciones de olivillo ubicadas en la Cordillera de la Costa de Chile centro-sur (Tabla 10), reflejando un modelo de aislamiento genético por distancia. En cuanto a las poblaciones de la depresión intermedia y los faldeos andinos (FA) de la zona sur, no hubo una correlación significativa entre distancias genéticas y distancias geográficas (Tabla 10). Es posible que la colonización hacia el este se haya producido a partir de varios refugios ubicados en la Cordillera de la Costa. Sin embargo,

también podría ser que la conectividad geográfica de estos bosques y posiblemente la efectividad del transporte de semillas por las aves dispersoras, hayan mantenido una baja diferenciación genética entre las poblaciones fundadas durante el proceso de colonización postglacial hacia el este.

Los eventos históricos que han afectado a Sudamérica austral, sin duda han influido en la estructura poblacional de las especies arbóreas nativas de Chile (Allnutt et al. 1999, 2001a, 2001b, Etisam UL Haq 2001, Bekessy 2001). Cada especie debiera responder en forma diferencial a los fenómenos históricos dependiendo de sus atributos fisiológicos, ecológicos y reproductivos. Sería interesante contrastar el patrón de variación documentado en este estudio con los de otras especies que pertenecen a esta comunidad relictas, que presenten un patrón de distribución disyunto y que tengan otros rasgos de historia de vida que pudiesen estar influenciando una respuesta similar o distinta a los cambios climáticos del Cuaternario. Entre las especies con un patrón de distribución disyunto, similar al de olivillo, podemos mencionar a: *Azara microphylla*, *Griselinia scandens*, *Nertera granadensis*, *Mitraria coccinea*, *Sarmienta repens* y varios helechos, musgos y hepáticas (Villagrán et al. 2004). Si el aislamiento geográfico ha provocado diferenciación genética en olivillo, un árbol de tiempo generacional de al menos 200 años, sin duda en especies de plantas con menores tiempos generacionales asociadas a las comunidades que domina olivillo, en la cima de cerros o quebradas de Chile central, debieran presentar una mayor diferenciación genética.

En cuanto a la conservación de las poblaciones de olivillo, son de singular importancia las poblaciones del extremo norte de su distribución, debido a su distintividad y alta diversidad genética, en particular la población actualmente aislada en

el Cerro Santa Inés, la que presentó uno de los mayores valores de diversidad genética. Estas islas relictas, refugios actuales de una comunidad que se extendió de manera continua hace miles de años atrás, y dejó su legado histórico en la cima de los cerros del Norte Chico, podrían extinguirse inevitablemente en un futuro cercano debido a la aridez de la zona. Estos fragmentos dependen en gran parte del aporte de agua y nutrientes de las neblinas costeras, encontrándose sólo en zonas donde existe un alto flujo de nubosidad. Existe evidencia que muestra una alta mortalidad de individuos en la zona opuesta al borde del bosque que enfrenta la neblina en los fragmentos de Fray Jorge (Armesto, Jones & Marquet, datos no publicados). Esto sugiere la alta dependencia de la intensidad y frecuencia del flujo de neblina para la sobrevivencia de los individuos en los fragmentos. En un contexto de cambio climático global, si ocurren fluctuaciones en los aportes de neblinas, podrían desencadenar expansiones o contracciones del área de estos relictos, desencadenando cambios importantes en su estructura y composición genética. Por otra parte, poblaciones de quebradas de la zona central también son de gran importancia, debido a su alta diversidad genética (e.g., Los Ruiles) y al grave estado de conservación que se encuentran, sumergidas en una matriz de plantaciones de pino, con alto riesgo de desaparecer debido a incendios. En esta misma zona se encuentra la población remanente de la Reserva Nacional Los Queules que, en contraste, presentó una baja diversidad genética. Estas dos poblaciones representan los últimos fragmentos de bosques de olivillo de tamaño significativo en la VII región de Chile, por lo que es de crucial importancia su conservación. Es recomendable que el germoplasma de las poblaciones más amenazadas de la zona norte y centro sea colectado y propagado, con el fin de asegurar su disponibilidad en futuros proyectos de restauración.

BIBLIOGRAFÍA

Aizen M A & C Ezcurra (1998) High incidence of plant-animal mutualisms in the woody flora of the temperate forest of southern South America: biogeographical origin and present ecological significance. *Ecología Austral* 8: 217-236.

Allnutt TR, AC Newton, A Lara, A Premoli, JJ Armesto, R Vergara & M Gardner (1999) Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Ecology* 8: 975-987.

Allnutt TR, Curtis JR, Gardner M & Newton AC (2001) Genetic variation and wild Chilean and cultivated British populations of *Podocarpus salignus* D. Don (*Podocarpaceae*). *Edinburgh Journal of Botany* 58: 459-473.

Allnutt TR, AC Newton, A Premoli & A Lara (2003) Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. *Biological Conservation* 114: 245-253.

Armesto JJ, C Villagrán, JC Aravena, C Perez, C Smith-Ramírez, M Cortez & L Hedin (1995) "Conifer forest of the Chilean coastal range". En: Enright NJ & RS Hill (eds.) *Ecology of the Southern Conifers*, pág. 56-170. Melbourne University Press, Australia.

Armesto JJ, JC Aravena, C Villagrán, C Pérez & GG Parker (1996) "Bosques templados de la Cordillera de la Costa". En: JJ Armesto, C Villagrán y MT Kalin Arroyo (eds.) *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*, pág. 199- 213, Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Bekessy SA, TR Allnutt, AC Premoli, A Lara, RA Ennos, MA Burgman, M Cortes & AC Newton (2002) Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity* 88: 243-249.

Broyles SB (1998) Postglacial migration and the loss of allozyme variation in northern populations of *Asclepias exaltata*. *American Journal of Botany* 85: 1091- 1097.

Buso GSC, PH Rangel & ME Ferreira (1998) Analysis of genetic variability of South American wild rice populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology* 7: 107-117.

Chalmers KJ, R Waugh, JL Sprent, AJ Simons & W Powell (1992) Detection of genetic variation between and within populations of *Gliricidia sepium* and *G. Maculata* using RAPD markers. *Heredity* 69: 465-472.

Cwynar LC & GM Mac Donald (1988) Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution* 42: 995-1005.

CONAF-CONAMA, BIRF, Universidad Austral de Chile, Pontificia Universidad Católica de Chile, Universidad Católica de Temuco (1999) “Catastro y Evaluación de los Recursos vegetacionales nativos de Chile”. Informe Nacional con Variables ambientales, Santiago, Chile.

Demesure B, B Comps & RJ Petit (1996) Chloroplast beech (*Fagus sylvatica*) in Europe. *Evolution* 50: 2515-2520.

Dolan R (1994) Patterns of isozyme variation in relation to population size, isolation, and phytogeographic history in Royal catchfly (*Silene regia*, *Cariophyllaceae*). *American Journal of Botany* 81: 965-972.

Donoso C & A Lara (1996) “Utilización de los bosques nativos de Chile: pasado, presente y futuro”. En: JJ Armesto, C Villagrán y MT Kalin Arroyo (eds.) *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*, pág. 363- 387, Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

- Doyle JJ & DJ Doyle (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Ennos RA (1996) "Utilising genetic information in plant conservation programmes". En: ME Hochberg, J Clobert & R Barbault (eds.) *Aspects of the genesis and maintenance of biological diversity*, pág. 278-291. Oxford University Press, Oxford.
- Excoffier L, PE Smouse & JM Quattro (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Etisham-Ul-Haq M, TR Allnutt, C Smith-Ramírez, MF Gardner, JJ Armesto & AC Newton (2001) Patterns of Genetic Variation in *in* and *ex situ* Populations of the Threatened Chilean Vine *Berberidopsis corallina*, detected Using RAPD Markers. *Annals of Botany* 87: 813-821.
- Ferris C, RP Oliver, AJ Davy & GM Hewitt (1993) Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Molecular Ecology* 2: 337-344.
- Gabrielsen TM, K Bachmann, KS Jacobsen & C Brochmann (1997) Glacial survival does not matter: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga oppositifolia*. *Molecular Ecology* 6: 831-842.
- Gillies ACM, JP Cornelius, AC Newton, C Navarro, M Hernández & J Wilson (1997) Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata*, assessed using RAPDs. *Molecular Ecology* 6: 1133-1145.
- Gower JC (1966) Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika* 53: 325-338.

Hagen AR, H Giese & C Brochmann (2001) Trans-atlantic dispersal and phylogeography of *Cerastium arcticum* (Caryophyllaceae) inferred from RAPD and SCAR markers. *American Journal of Botany* 88: 103-112.

Hamrick JL & MJ Godt (1989) "Allozyme diversity in plant species". En: Brown AH, MT Clegg, AL Kahler & BS Weir (eds.) *Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources*, pág. 43-63. Souderland, MA: Sinauer Associates Inc.

Hamrick JL, MJ Godt & SL Sherman-Broyles (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forest* 6: 95-124.

Heusser CJ, LE Heusser, TV Lowell (1999) Paleocology of the Southern Chilean Lake District Isla Grande de Chiloé during middle-late Llanquihue Glaciation and deglaciation. *Geografiska Annaler* 81: 231-284.

Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, end their role in divergence and speciation. *Biological Journal of Linnean Society* 58: 247-276.

Hinojosa LF & C Villagrán (1997) Historia de los bosques del sur de Sudamerica I: Antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 225-239.

Hollin JT & DH Schilling (1981) Late Wisconsin-Weichselian mountain glaciers and small ice caps. En: Denton G & TJ Hughes (Eds.) *The last great ice sheets*. Wiley, New York.

Jara P, FA Squeo & M Hershkovitz (2002) Divergencia genética en *Drimys* (canelo) en Chile, mediante análisis con RAPD. *Biological Research* 35:R-54.

Jadwiszczak P (2003) Rndom projects: an application for randomization and bootstrap testing, version 1.1.

Jenny B, BL Valero-Garcés, R Villa-Martínez, R Urrutia, M Geyh & H Veit (2002). Early to Mid-Holecene aridity in central Chile and the southern westerlies: The Laguna Aculeo record (34° S). *Quaternary Research* 58: 1-11.

Kummerow J (1966) Aporte al conocimiento de las condiciones climáticas del bosque de Fray Jorge. *Boletín Técnico de la Facultad de Agronomía, Universidad de Chile* 24: 21-28.

Lequesne C, C Villagrán & R Villa (1999) Historia de los bosques relictos de “olivillo” (*Aextoxicon punctatum*) y Mirtáceas de la Isla Mocha, durante el Holoceno tardío. *Revista Chilena de Historia Natural* 72: 31-47.

Lewontin RC (1972) The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology* 6: 381-398.

Lynch M & BG Milligan (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

Looser G (1935) Argumentos botánicos a favor de un cambio de clima en Chile central en tiempos geológicos recientes. *Revista Universitaria* 20 (6-7): 843-857.

Loveless MD & JL Hamrick (1988) Genetic organization and evolutionary history in two north American species of *cirsium*. *Evolution* 42: 254-265.

Maldonado A & C Villagrán (2002). Paleoenvironmental changes in the semiarid coast of Chile (32° S) during the last 6200 cal years inferred from a swamp forest pollen records. *Quaternary Research* 58: 130-138.

Manly, B.F.J. 1997: Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology. 2nd edition, Chapman & Hall.

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

Martin C, ME González-Benito & JM Iriondo (1997) Genetic diversity within and among populations of a threatened species: *Erodium paularense* Fern. Gonz. & Izco. *Molecular Ecology* 6: 813-820.

Miller MP (1997) Tools for population genetic analyses (TFPGA) 1.3: A windows programs for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Computer software distributed by author.

Miller MP (1998) AMOVA-PREP 1.01: A program for the preparation of AMOVA input file from dominant-marker raw data. Computer software distributed by author.

Moritz G & DP Faith (1998) Comparative phylogeography and the identification of geneticament divergent area for conservation. *Molecular Ecology* 7: 419-429.

Muñoz C & E Pisano (1947) Estudio de la vegetación y flora de los Parques Nacionales de Fray Jorge y Talinay. *Agricultura Técnica* 7: 71-190.

Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

Newton AC, JR Allnutt, ACM Gillies, AJ. Love & RA Ennos (1999) Molecular Phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trend in Evolution and Ecology* 14:140-145.

Noss RF (2001) Beyond Kyoto: Forest Management in a Time of rapid Climate Change. *Conservation Biology* 15: 578-590.

Nishida M, H Nishida & T Ohsawa (1988) Preliminary notes on the petrified woods from the Tertiary of Cerro Dorotea, Ultima Esperanza, Chile. A Report of the Botanical Survey to Bolivia and Southern Chile (1986-87), Faculty of Science, Chiba University, Japan: 16-25. (Citado por Villagrán et al. 2004).

Parker KC, JL Hamrick, AJ Parker & EA Stacy (1997) Allozyme diversity in *Pinus virginiana* (Pinaceae): intraspecific and interspecific comparisons. *American Journal of Botany* 84: 1372-1382.

Paskoff R (1977) Quaternary of Chile: The State of Research. *Quaternary Research* 8: 2-31.

Pérez C & Villagrán (1985). Distribución de abundancias de especies en bosques relictos de la zona mediterránea de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 58: 157-170.

Pérez C & C Villagrán (1994) Influencias del clima en el cambio florístico, vegetacional y edáfico de los bosques de "olivillo" (*Aextoxicon punctatum* R. et Pav.) de la Cordillera de Costa de Chile: implicancias biogeográficas. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 77-90.

Philippi F (1884) A visit to the Northernmost forest of Chile. *Journal of Botany* 22: 202-211.

Pielou EC (1991) After the ice age: the return of life to glaciated North America. University of Chicago Press, Chicago, IL.

Raymond ML & F Rousset (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution* 49: 1280-1283.

Rohlf FL (1992) NTSYS-PC: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter Software, New York.

Savolainen V, MW Chase, SB Hoot, Cm Morton, DE Soltis, C Bayer, MF Fay, Ayde Bruijn, S Sullivan & Y Long Qiu (2000) Phylogenetics of Flowering Plants Based on Combined Analysis of Plastid *atpB* and *rbcL* Gene Sequences. *Systematic Biology* 49: 306-362.

Schaal BA, DA Hayworth, KM Olsen, JT Rauscher & WA Smith (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.

Schwaegerle KE & BA Schaal (1979) Genetic variability and founder effect in the pitcher plant *Sarracenia purpurea* L. *Evolution* 33: 1210-1218.

Schmithüsen J (1956) Die räumliche Ordnung der chilenischen Vegetation. *Bonn. Geogra. Abhand* 17: 1-86 (citado por Troncoso et al. 1980).

Skottsberg C (1984) Apuntes sobre la historia y vegetación de Fray Jorge (Coquimbo, Chile). *Acta Horti Gotoburgensis* 18: 91-184.

Soltis DE (1982) Allozymic variability in *Sullivantia* (Saxifragaceae). *Systematic Botany* 7: 26-34

Steinger T, Korner C & Schmid B (1996) Long-term persistence in a changing climate: DNA analysis suggests very old ages of clones of alpine *Carex curvula*. *Oecologia* 105: 94-99.

Taberlet P (1998) Biodiversity at the intraspecific level: The comparative phylogeographic approach. *Journal of Biotechnology* 64: 91-100.

Taberlet P, L Fumagalli, AG Wust-Saucy & JF Cossons (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.

Tollefsrud MM, K Bachmann, KS Jakobsen & C Brochmann (1998) Glacial survival does not matter-II: RAPD phylogeography of Nordic *Saxifraga cespitosa*.

Troncoso A, C Villagrán & M Muñoz (1980) Una nueva hipótesis acerca del origen y edad del bosque de Fray Jorge (Coquimbo, Chile). *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Chile* 37: 117-152.

Van Husen C (1967) Klimagliederung in Chile auf der Basis von Häufigkeitsverteilungen der Niederschlagssummen. *Freiburger geographische Hefte* 4: 1-113 (citado en Perez & Villagrán 1994).

Veit H & K Garleff (1996) "Evolución del paisaje cuaternario y los suelos en Chile Central-Sur" En: JJ Armesto, C Villagrán & MT Kalin Arroyo (eds.) *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*, pág. 29 - 49, Editorial Universitaria, Santiago.

Villa-Martínez R & C Villagrán (1997). Historia de la vegetación de los bosques pantanosos de la costa de Chile central durante el Holoceno medio y tardío. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 391-401.

Villagrán C (1991) Historia de los Bosques Templados del Sur de Chile durante el Tardiglacial y Postglacial. *Revista Chilena de Historia Natural* 64: 447-460.

- Villagrán C (2001) Un modelo de la Historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 793-803.
- Villagrán C & JJ Armesto (1980) Relaciones florísticas entre las comunidades relictuales del Norte Chico y la Zona Central con el bosque del sur de Chile. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural de Chile* 37: 87-101.
- Villagrán C, JJ Armesto, LF Hinojosa, J Cuvertino, C Pérez & C Medina (2004) “El Enigmático Origen del Bosque Relicto de Fray Jorge”. En: FA Squeo, JR Gutiérrez & IR Hernández (eds.) *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*, pág. 3 – 42. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Villagrán C & LF Hinojosa (1997) Historia de los bosques del sur de Sudamérica II: Análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 241-267.
- Villagrán C, P Moreno & R Villa (1996) “Antecedentes Palinológicos acerca de la Historia Cuaternaria de los bosques chilenos”. En: JJ Armesto, C Villagrán y MT Kalin Arroyo (eds.) *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*, pág. 51 - 69, Editorial Universitaria, Santiago.
- Villagrán C & F Roig (2004) “Historia Glacial de dos coníferas milenarias: el alerce y el ciprés de las Guaitecas”. Corporación Nacional Forestal, Región de Los Lagos.
- Villagrán C & J Varela (1990). Palynological Evidence for Increased Aridity on the Central Chilean Coast during the Holocene. *Quaternary Research* 34: 198-207.
- Wheeler NC & RP Guries (1982) Biogeography of lodpole pine. *Canadian Journal of Botany* 60: 1805-1814.

Williams JGK, AR Kubelik, KJ Livak, JA Rafalski & SV Tingey (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research* 18: 6531-6536.

Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-354.

Wolffhügel K (1949) Rätsel der Notohylaea. *Revista Sudamericana de Botánica* 8: 45-58 (citado por Troncoso et al. 1980).

Yeh FC, Chong DKX & Yang RC (1995) RAPD variation within and among natural populations of trembling aspen (*Populus tremuloides* Michx.) from Alberta. *Journal of Heredity* 86: 454-460.

Yeh FC (1999) POPGENE 1.31 University of Alberta, Canada.

Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology* 8: 907-913.

ANEXO

Tabla 1: Matriz de datos binarios obtenida a partir de los patrones de bandeo polimórficos de cada partidador, utilizando el marcador molecular RAPD.

Partidador	X17									C2									X1							X7																					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	2	3	4	5	6	7	1	2	3	4	5	6	7														
Muestra																																															
QT 1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0									
QT 2	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1								
QT 3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1								
QT 4	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1									
QT 5	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1							
QT 6	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1							
QT 7	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1						
QT 8	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0						
QT 9	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0						
QT 10	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1						
QT 11	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1						
QT 12	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0						
QT 13	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0						
QT 14	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0					
QT 15	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0					
QT 16	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0					
QT 17	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1					
QT 18	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1						
QT 19	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1					
QT 20	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1				
QT 21	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1			
SI 1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1					
SI 2	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1				
SI 3	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0		
SI 4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1		
SI 5	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
SI 6	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SI 7	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
SI 8	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
SI 9	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

SI 10	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1		
SI 11	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
SI 12	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
SI 13	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
SI 14	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
SI 15	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	
SI 16	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1		
SI 17	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1		
SI 18	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	
SI 19	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	
Ta 1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1		
Ta 2	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 3	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 5	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 6	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 7	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 8	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 9	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 10	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ta 11	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Ru 1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
Ru 2	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Ru 3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	
Ru 4	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	
Ru 5	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
Ru 6	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
Ru 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	
Ru 8	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	
Ru 9	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	
Ru 10	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	
Ru 11	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
Ru 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
Ru 13	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	
Ru 14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	
Ru 15	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	

Te 5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1		
Te 6	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	
Te 7	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	
Te 8	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	
Te 9	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	
Te 10	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	
Te 11	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1
Te 12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Te 13	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
Te 14	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	
Te 15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	
Te 16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	
Te 17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
Cu 1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
Cu 2	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
Cu 3	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	
Cu 4	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	
Cu 5	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
Cu 6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	
Cu 7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	
Cu 8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	
Cu 9	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	
Cu 10	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	
Cu 11	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	
Cu 12	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	
Cu 13	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	
Cu 14	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	
Cu 15	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0
Cu 16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	
Cu 17	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	
Cu 18	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	
Cu 19	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	
Cu 20	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
Ra 1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	
Ra 2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Ra 3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	

Ra 4	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1			
Ra 5	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0		
Ra 6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
Ra 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1		
Ra 8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	
Ra 9	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	
Ra 10	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
Ra 11	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
Ra 12	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ra 13	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ra 14	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
Ra 15	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	
Ra 16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	
Ra 17	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Ra 18	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1
Ra 19	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0
Ma 1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
Ma 2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
Ma 3	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1
Ma 4	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Ma 5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Ma 6	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
Ma 7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Ma 8	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	
Ma 9	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0
Ma 10	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	
Ma 11	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	
Ma 12	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ma 13	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0
Ma 14	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Ma 15	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	
Ma 17	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0
Fr 1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0
Fr 2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0
Fr 3	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
Fr 4	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0

Fr 5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1
Fr 6	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
Fr 7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
Fr 8	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
Fr 9	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	
Fr 10	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
VP 1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
VP 2	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	
VP 3	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	
VP 4	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	
VP 5	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	
VP 6	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	
VP 7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
VP 8	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	
VP 9	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	
VP 10	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
VP 11	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	
VP 12	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	
VP 13	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	
VP 14	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	
VP 15	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
Pu 1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	
Pu 2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
Pu 3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	
Pu 4	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Pu 5	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
Pu 6	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
Pu 7	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	
Pu 8	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	
Pu 9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	
Pu 10	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	
Pu 11	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
Pu 12	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	
Pu 13	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
Pu 14	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	
Pu 15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	

FJ 1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1					
FJ 2	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1				
FJ 3	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1				
FJ 4	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1			
FJ 5	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1				
FJ 6	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1			
FJ 7	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1				
FJ 8	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1			
FJ 9	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	0			
FJ 10	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1			
FJ 11	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1			
FJ 12	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
FJ 13	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1			
FJ 14	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1		
FJ 15	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1			
FJ 16	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	
FJ 17	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1			
FJ 18	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1		
FJ 19	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1		
FJ 20	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1			
FJ 21	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1			
FJ 22	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
FJ 23	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0		
FJ 24	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0		
FJ 25	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1		
FJ 26	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	
FJ 27	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	
FJ 28	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1		
FJ 29	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1		
FJ 30	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	1	
FJ 31	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	
FJ 32	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	
FJ 33	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	
FJ 34	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Rp 1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	
Rp 2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

Rp 3	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1			
Rp 4	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0		
Rp 5	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
Rp 6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1		
Rp 7	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0		
Rp 8	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
Rp 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0		
Rp 10	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1		
Rp 11	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1		
Rp 12	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1		
Rp 13	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1		
Rp 14	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1		
Rp 15	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0		
Rp 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0		
Rp 17	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
Rp 18	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
Rp 19	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1		
Rp 20	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
Gb 1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1		
Gb 2	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
Gb 3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
Gb 4	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	
Gb 5	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1		
Gb 6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1
Gb 7	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	
Gb 8	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	
Gb 9	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	
Gb 10	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	
Gb 11	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	
Gb 12	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	
Gb 13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1
Gb 14	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	
Gb 15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
Gb 16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1	
Gb 17	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	
Gb 18	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	

Gb 19	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	
Gb 20	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1		
Gb 21	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	
Gb 22	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
Gb 23	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	
Gb 24	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0		
Gb 25	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
Gb 26	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
Gb 27	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0
Gb 28	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1
Gb 29	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1
Gb 30	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1