

UCH-FC  
B. Ambiente  
A 594  
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**PATRONES EVOLUTIVOS DEL GÉNERO *Ectinogonia***  
**(Coleoptera, Buprestidae) DURANTE EL PLIO-**  
**PLEISTOCENO EN CHILE**

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente

**SIMÓN ANGUITA SALINAS**

Director del Seminario de Título: Elie Poulin

Co-Directores: Álvaro Zuñiga Reinoso y Rodrigo Barahona Segovia

Abril, 2017

Santiago – Chile





**INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO**  
**PATRONES EVOLUTIVOS DEL GÉNERO *Ectinogonia***  
**(Coleoptera, Buprestidae) DURANTE EL PLIO-**  
**PLEISTOCENO EN CHILE**

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el Sr. **Simón Anguita Salinas**

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Biólogo con mención en Medio Ambiente

Director Seminario de Título:

Comisión Revisora y Evaluadora

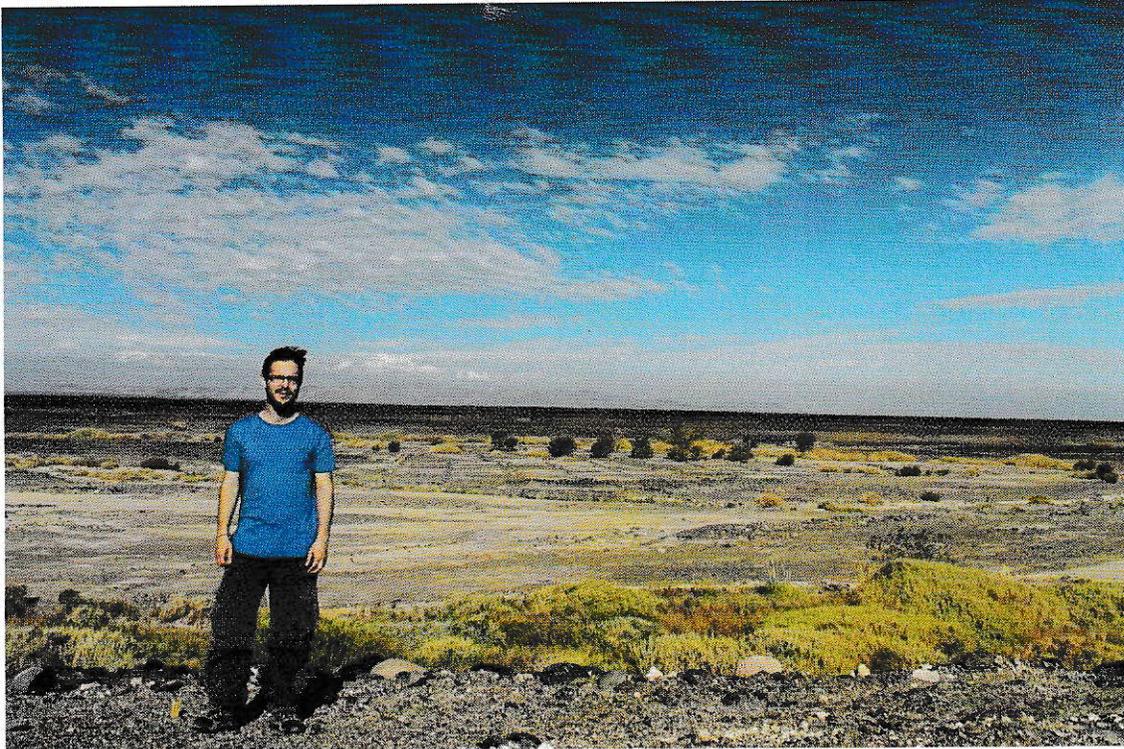
Presidente Comisión:

Evaluador:



Santiago de Chile, 13 de Abril de 2017.

## BIOGRAFÍA



Nací en Machalí el día 18 de marzo de 1992. Crecí en una familia muy unida, reuniéndonos periódicamente en Pemuco y la Cruz donde tuve mucho contacto con la naturaleza desde temprana edad. Ingresé al colegio en 1999 y en los años posteriores comenzó una serie de traslado de ciudades viviendo varios años en Iquique, La Serena, Rancagua y Santiago, lo cual me permitió conocer distintos territorios de Chile y hacer amigos en estas distintas latitudes. De este modo se sembró en mí la pasión y fascinación por las ciencias naturales y la ecología. El año 2010 me gradué de 4to medio en el colegio Coya de Machalí e ingrese a la carrera de Biología Ambiental de la Universidad de Chile en el año 2011 siguiendo mi vocación, para terminar mis estudios el 2017, luego de realizar una tesis enriquecedora que aportó constantemente a mi aprendizaje tanto académico como personal. Por lo pronto, con el desarrollo del Magister en ciencias biológicas que, iniciado este año, continuaré con mi desarrollo académico y crecimiento personal, el cual nunca se detendrá, asombrándome tanto de la vida como de mí mismo.

A mis padres, tutor y  
todos quienes creyeron  
en este proyecto  
construido como castillo  
en el cielo

## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a mi familia, a mis padres *Alberto Anguita* y *Mónica Salinas* que han respetado y apoyado mis decisiones de entrar a estudiar Biología Ambiental y realizar un seminario de título fuera de un proyecto formal, de mostrarme las bases de mi vocación, contenerme y mucho más. A mis hermanas *Consuelo* y *Paloma* por la paciencia, preocuparse tanto por mí y siempre considerarme. A mi sobrina *Francisquita* por enseñarme el valor de la paciencia y que todos somos maravillosos a nuestro modo. A mis abuelos, tías, tíos, primos y primas por la motivación, compañía y cariño.

A mi tutor, *Elie Poulin*, por acogerme en el LEM (teniendo yo ninguna noción de ecología molecular), apoyarme en la realización de este proyecto y ser un agente activo en mi formación académica. A mis cotutores *Álvaro Zúñiga* y *Rodrigo Barahona* que me alentaron apoyaron, enseñaron y ayudaron durante la realización de la tesis. A los profesores *Claudio Veloso*, *Marco Méndez* y *Felipe Hinojosa* que me han aconsejado y tienen un rol importantísimo en mi formación académica durante el paso por pregrado y la realización de la tesis. A *Karin Maldonado*, mi mentora, por iniciarme en el quehacer científico y las ciencias ecológicas.

A mis amigos de la Chile; *Seba*, *Nai*, *Felipe*, *Chio*, *Pancho*, *Tefo*, *Chalele*, *Nicol*, *Sophie*, *Violeta*, *Lilo*, *Cesar*, *Mari*, *Robert*, *Pedro*, *Sofi*, *Claudio* y tantos más, por inculcarme el valor del compañerismo, aceptarme tal cual como soy, enseñarme tantas cosas y apañarme en muchas otras más. A mis compañeros del LEM *Claudia*, *Javier*, *Fran*, *Seba*, *Franco*, *Esteban*, *Zambra*, *Jóse*, *Constanza* y *Claudio* por enseñarme de sus distintas aristas del mundo molecular, accesibilidad y buena onda.

A *Andrés Ramírez*, *Mauricio Cid*, *Marco Cortes* y *Cristian Fierro* por compartir conmigo consejos y valiosos ejemplares, imprescindibles para esta investigación. A *Don Mario Elgueta* y *Francisco Urra*, del MNHN, por su preocupación y consejos. A *Vicente Valdez* por su entusiasmo y excelentes fotografías. Al *Tío Marcelo*, *Joaquin*, *Nicol*, *Sophie* y mis papas por acompañarme a terreno aun cuando volvíamos con las manos vacías. A mis tíos *Alberto Prado* y *Gigi Blei* por su hospitalidad. Y a todos quienes pararon en la carretera mientras hice dedo para seguir muestreando.

Al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) por los fondos ICM P02-005 y PFB-23, a los funcionarios de CONAF, especialmente Jaime Cárcamo, administrador del Parque Nacional Nahuelbuta, y José Gutiérrez, administrador del Parque Nacional Pan de Azúcar, por la amabilidad y disposición para trabajar en las unidades.

Y gracias a la vida que me ha dado tanto.

## **Índice de Contenidos**

Índice de Tablas.....	vii
Índice de Figuras.....	viii
Resumen.....	x
Abstract.....	xii
Introducción.....	1
Hipótesis.....	8
Objetivos.....	8
Metodología.....	9
Resultados.....	15
Discusión.....	26
Conclusiones.....	34
Bibliografía.....	37

## **Índice de Tablas**

**Tabla 1.** Lista de especies utilizadas para este estudio incluyendo grupos externos, códigos de procedencia, n° de individuos, localidades y posición geográfica georeferenciada.

**Tabla 2.** Desglose de individuos secuenciados y número de secuencias registradas. n COI: Número de individuos que amplificaron el fragmento COI. K COI: Número de secuencias distintas registradas para COI. n 16S: Número de individuos que amplificaron el fragmento 16S. K 16S: Número de secuencias distintas registradas para 16S.

## Índice de Figuras

**Figura 1.** Distribución moderna de pisos vegetacionales de Chile Norte, inferido después de Villagrán & Arroyo 1983. Las flechas indican migración de especies vegetales durante el cuaternario (Moreno et al 2007).

**Figura 2.** Vista dorsal de *E. buqueti* hembra (A), *E. chalyboeiventris wagenknechti* posada sobre follaje de *Senecio* sp. (B), *E. darwini* forrajeando flores de *Copiapoa cinérea* (C), Hábitat de *E. buqueti* en provincia del Ñuble (D) y Hábitat de *E. pulverea* en Putre (E).

**Figura 3.** Distribución latitudinal de especies de *Ectinogonia*. Se divide el territorio en 3 zonas geográficas; Planicie litoral, Depresión intermedia-Cordillera de la Costa y Cordillera de los Andes. Cada barra representa el rango latitudinal de la distribución de una especie.

**Figura 4.** Hipótesis filogenéticas inferidas con los tres métodos, Inferencia Bayesiana (A, B y C)), Máxima Verosimilitud (D, E, y F) y Máxima Parsimonia (G, H e I) para las tres matrices de 16S (A, D y G), COI (B, E y H) y 16S+COI (C, F e I). En amarillo el clado norte y en azul se representa los clados del grupo sur.

**Figura 5.** Hipótesis filogenéticas para el género *Ectinogonia* obtenida a partir de secuencias concatenados (COI+16S) por MP, MV e IB. Valores sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de MP, MV y probabilidad a posteriori de IB. El asterisco representa valores de bootstrap sobre 75 y valores de probabilidad a posteriori sobre 95. El guion representa valores de bootstrap bajo 75 y valores de probabilidad a posteriori bajo 95. La equis corresponde a la no coincidencia entre topologías. Los clados del “grupo sur” coloreado con azul y el clado del “grupo norte” coloreado con naranja.

**Figura 6.** Estimación de los tiempos de divergencia de la filogenia de *Ectinogonia* en escala de millón de año, entre paréntesis acrónimo de origen geográfico de los linajes; Ñuble (Ñub), Chile Central (Ch.c.), Andes Sur (A.Su.), Altos de Cantillana (A.Ca.), La Higuera (Hig.), Litoral de Chañaral (L.ch.), Litoral de Atacama (L.At.), Domeyko (Dom.), Los Vilos (Vil.), Cordillera de Santiago (C. St.), Cordillera del Elquí (C.El.), San Pedro de Atacama (S.P.A.), Putre (Put.), Tarapacá (Tar.) y Punta Choros (P.Ch.).

**Figura 7.** Red de haplotipos del género *Ectinogonia* en base al gen COI.

**Figura 8.** Redes de haplotipos del género *Ectinogonia*, para el grupo norte, en base a COI, etiquetado según especie nominal (A) y origen geográficos de los haplotipos (B).

**Figura 9.** Mapa con zonas geográficas de procedencia de los ejemplares del grupo norte (En circunferencias). (Rosado) Putre, (Amarillo) Atacama, (Azul) San Pedro de Atacama, (Cian) Domeyko, (Café) Punta Choros, (Lila) La Higuera, (Verde Oliva) Cordillera del Elqui, (Naranja) Los Vilos y (Verde) Cordillera de Santiago. En circunferencias verde claro sitios costeros entre Huasco, Caldera y Chañaral. Formaciones Vegetacionales; Altoandina (rosado), Desierto (amarillo), Semidesierto (amarillo oscuro), Matorral estepario (café), Matorral (café claro) y Bosque (verde).

**Figura 10.** Diagramas de modelos de especiación contrastados. A: Cladogenesis dicotómica en la que desaparece la especie antecesora (modificado de De Queiroz 2007). B: Cladogenesis radiativa en la que continua la especie antecentral.

## Resumen

Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (OCP) generaron una serie de transformaciones en el paisaje vegetacional sudamericano. Se han relacionado la diversificación de distintos grupos con los cambios en el paisaje, principalmente debido al efecto de las OCP. En el caso de ambientes áridos, las oscilaciones en el paisaje vienen de la mano con el desplazamiento de los límites de extensión de los desiertos, lo que podría estar explicando los eventos de diversificación de los taxa de ambientes áridos y semiáridos. El género *Ectinogonia* Spinola, 1837 (Coleoptera, Buprestidae) contiene 17 especies de escarabajos que habitan en vegetación de ambientes áridos y semiáridos de la vertiente occidental de la cordillera de los Andes, de las cuales 9 especies son simpátricas en la zona del desierto costero, entre los 26°S hasta los 30°S. Por lo tanto, dado la evidencia se presume que *Ectinogonia* habría especiado producto del efecto indirecto de las OCP, y entonces se esperaría que los eventos de divergencia de este grupo sean coincidentes con el inicio del Pleistoceno (2.6 Ma). Para resolver esta interrogante se trabajó con los marcadores mitocondriales que codifican para la proteína Citocromo C Oxidasa subunidad 1(COI) y RNA ribosomal 16S (16S) de las distintas especies muestreadas del género *Ectinogonia*, con el fin de reconstruir las relaciones filogenéticas mediante diferentes métodos de reconstrucción (MP, MV, IB), adicionalmente se estimó los tiempos de divergencia y por último se construyeron redes de haplotipos. *Ectinogonia* es un grupo monofilético y se identificaron cuatro clados principales dentro del género, los cuales se agrupan en dos grupos según su distribución geográfica, el primero de distribución centro-sur conformado por 3 clados, mientras que el segundo grupo conformado por un único clado nortino, reúne 13 especies nominales definidas por la morfología. Los eventos de divergencia del genero *Ectinogonia* habrían comenzado durante el Plioceno,

separándose los cuatro clados desde hace 3.9 Ma en adelante. La diversificación del clado nortino habría comenzado durante el Pleistoceno hace 2.12 Ma. Tanto en las reconstrucciones filogenéticas como en las redes de haplotipos hay coincidencias parciales con la taxonomía tradicional del grupo, sin embargo las unidades que se rescatan en las dos aproximaciones coinciden entre ellas y se corresponden también con la procedencia geográfica.



## **Abstract**

The climatic oscillations of the Pleistocene (COP) generated a series of transformations in the South American vegetation landscape. The diversification of different groups has been related to the changes in the landscape, mainly due to the effect of the COP. In the case of arid environments, the oscillations in the landscape come together with the displacement of the limits of the deserts, which could be explaining the diversification events of arid and semi-arid environments taxa. The genus *Ectinogonia* Spinola, 1837 (Coleoptera, Buprestidae) contains 17 species of beetles that live in arid and semi-arid vegetation of the western slope of the Andes mountain range, of which 9 species are sympatric in the coastal desert zone, Between 26 ° S and 30 ° S. Therefore, given the evidence it is presumed that *Ectinogonia* would have speciated product of the indirect effect of COP, and then it would be expected that the divergence events of this group coincide with the onset of Pleistocene (2.6 Ma). In order to solve this question we worked with the mitochondrial markers encoding the protein Cytochrome C Oxidase subunit 1 (COI) and 16S ribosomal RNA (16S) of the different species sampled from the genus *Ectinogonia*, in order to reconstruct the phylogenetic relationships by different methods of reconstruction (MP, ML, IB), additionally we estimated the times of divergence and finally haplotype networks were constructed. *Ectinogonia* is a monophyletic group and identified four main clades within the genus, which are grouped into two groups according to their geographic distribution, the first of the south-central distribution made up of 3 clades, while the second group formed by a single northern clade, grouping 13 nominal species defined by the morphology. The divergence events of the genus *Ectinogonia* would have begun during the Pliocene, separating the four clades from 3.9 Ma onwards. The diversification of the northern clade would have begun during the

Pleistocene 2.12 Ma. In both the phylogenetic reconstructions and in the haplotype networks there are partial coincidences with the traditional taxonomy of the group, however the units that are rescued in the two approaches coincide between them and they also correspond to the geographical origin.

## **Introducción**

### *El escenario*

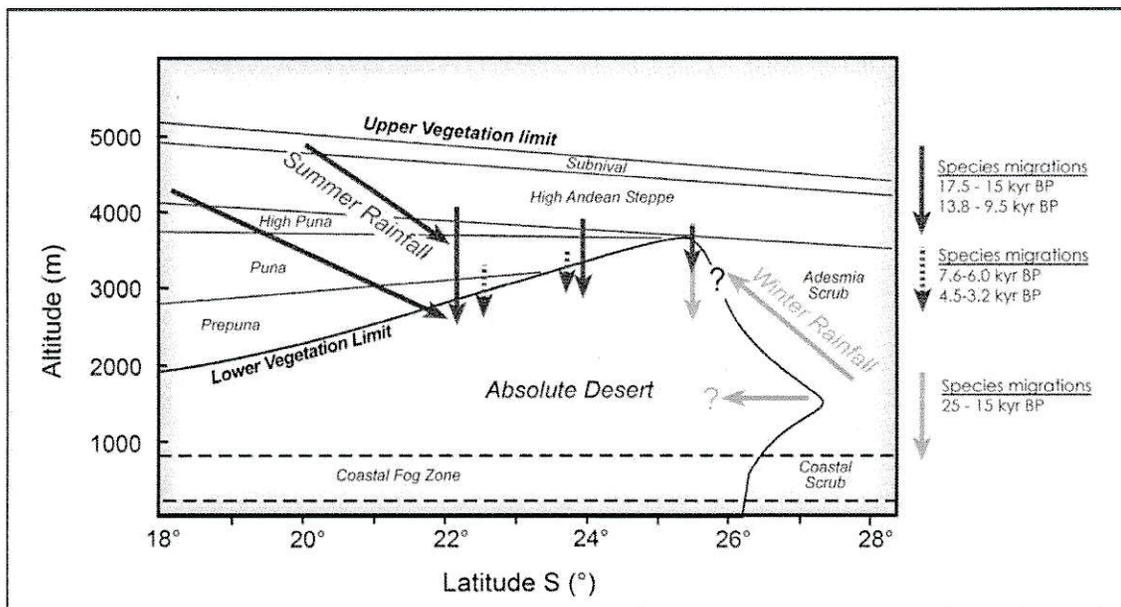
La historia geológica y climatológica de Sudamérica ha modelado la biodiversidad en Sudamérica durante el transcurso de los últimos 65 Ma. (Hinojosa & Villagran 1997, Hinojosa 2005). Adicionalmente la diversificación a nivel de género y especie en diversos grupos habrían ocurrido durante el Cuaternario (0-2.6 Ma), debido probablemente al efecto de las oscilaciones climáticas propias de esta época (Hewitt 2000). Turcheto-Zolet et al. (2013) sugieren que el 57% de los eventos de divergencia citados para Sudamérica ocurrieron durante el Pleistoceno y que este patrón se habría repetido en todas las zonas geográficas del continente.

Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (OCP) fueron una serie de cambios en los regímenes climáticos donde se alternaba entre fases glaciales de clima más frío y húmedo respecto al actual y fases interglaciares con clima más parecidos al régimen actual (Petit et al. 1999, Pinot et al. 1999, Zachos et al. 2001, Kaplan et al. 2008, Rojas et al. 2009). Durante el Pleistoceno, las fases glaciales abarcaron el 80% de la duración de este periodo (Rull 2009). Estas oscilaciones habrían provocado cambios en el paisaje, los cuales están ampliamente descritos, especialmente para la zona sur de Sudamérica (Heusser 1990, Villagran 1990, Clapperton 1994, Denton 1999, Villagran 2001, Premoli et al. 2002, Kaplan et al. 2008, Quiroga & Premoli 2010, Mathiasen & Premoli 2010, Premoli et al. 2010). Durante las fases glaciales una extensa capa de hielo habría cubierto gran parte de la porción sur del continente y las cimas de los Andes por el norte (Villagran 1990, Clapperton 1994, Denton et al. 1999, Villagran 2001, Kaplan et al. 2008). Pese al efecto

de los hielos, se han identificado zonas en donde la biota pudo persistir dentro de las áreas impactadas (Premoli et al 2002, 2010, Mathiasen & Premoli 2010), conociéndose estas como “refugios glaciales”, las cuales serían espacios geográficos acotados que pueden albergar comunidades propias de zonas más templadas cuando las condiciones generales no son favorables (Bennett & Provan 2008). Tanto la presencia de los hielos, como el desplazamiento hacia el norte de los vientos del oeste mantenían las vegetaciones de bosque en latitudes más bajas a su distribución actual (Villagran 2001). En el caso de los taxa de altura, estos podrían haber expandido su distribución durante las fases glaciares y estarían actualmente en “refugios interglaciales” ubicados en la cima de montañas y cordilleras, por lo que la definición de refugio se construye en función del nicho ecológico del grupo en estudio (Bennet & Provan 2008, Holderegger & Thiel-Egenter 2009, Steward et al. 2010).

Por otra parte, zonas áridas como el desierto de Atacama también experimentaron cambios en el paisaje durante el Cuaternario, debido a que durante las fases glaciales los límites sur y éste del desierto de Atacama se contraían hacia el centro de aridez producto del aumento en las precipitaciones durante estos períodos (Latorre et al. 2002, Maldonado et al. 2005, Moreno et al. 2007) por lo que el desierto era en parte reemplazado por vegetación de puna y matorral estepario (Fig. 1) (Villagran 2001, Moreno et al. 2007, Gayo et al. 2012, Diaz et al. 2012), mientras que durante los episodios interglaciales y máximos glaciales los límites sur y éste del desierto se extendería hasta una posición similar a lo que acontece actualmente debido a la falta de precipitaciones. Por lo tanto, la extensión y contracción del desierto absoluto, podría tener un efecto similar sobre la biota

del desierto, a lo que habría ocurrido con los hielos en las latitudes mayores. En analogía con los refugios glaciales, durante los periodos de máxima extensión del desierto absoluto, podrían existir zonas estables, tales como quebradas y/o valles, que pudieron haber actuado como “refugios desérticos” (Mujica et al. 2014). En contraste, durante las transiciones de fases glaciales-interglaciales, las comunidades propias de desierto sobrevivirían en “refugios xéricos” durante la contracción del desierto (Ossa 2013).



**Figura 1.** Distribución moderna de pisos vegetacionales de Chile Norte, inferido después de Villagrán & Arroyo 1983. Las flechas indican migración de especies vegetales durante el cuaternario (Moreno et al 2007).

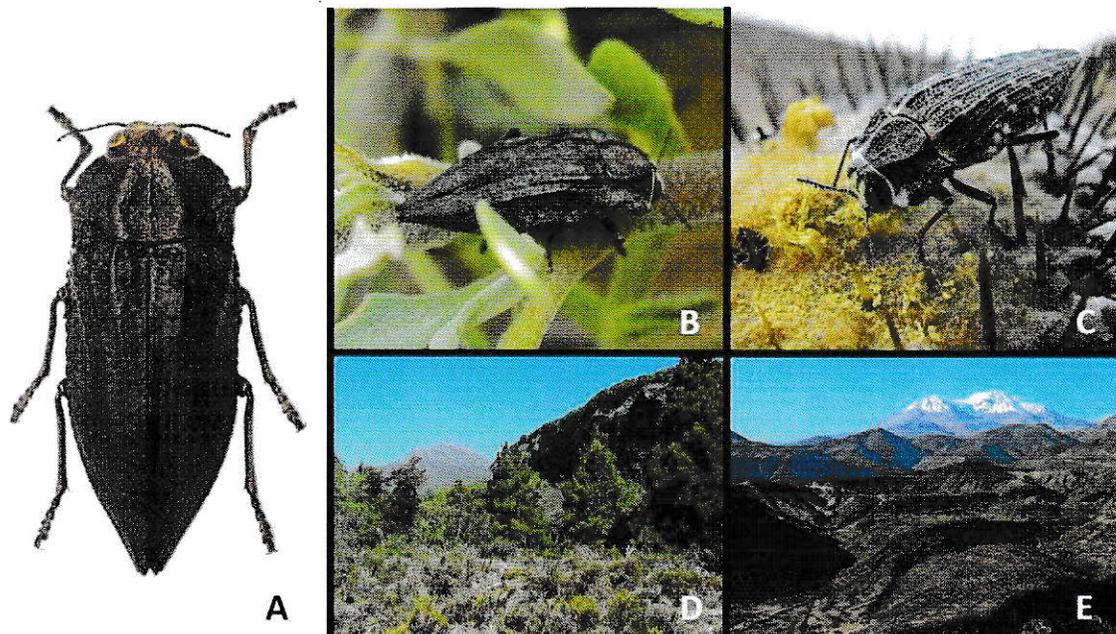
En este escenario, el desplazamiento de la vegetación hacia menores alturas durante las fases glaciales, podría aumentar el rango de distribución de taxa de altura, mientras que durante la fase interglacial, los pisos vegetacionales se elevaban y los rangos de distribución de diversos grupos asociados se fragmentaban (Vuilleumier 1971, Fuentes &

Jaksic 1979). Por lo tanto, se podría esperar que la extensión y contracción del desierto absoluto podría haber favorecido eventos de diversificación, así como también eventos de extinción, pérdida de diversidad genética y cambio constante en el rango de distribución. (Fuentes & Jaksic 1979, Knowles 2000, 2001, Zuñiga-Reinoso 2015).

### ***El modelo biológico***

El género *Ectinogonia* Spinola, 1837, es un grupo de escarabajos de la familia Buprestidae compuesto por 17 especies nominales, tres de ellas con dos subespecies cada una (Cobos 1953, Moore 1994, Bellamy 2006). El género ha tenido una historia taxonómica dinámica, desde que fue descrito por Spinola en 1837, con una única especie, *Ectinogonia buqueti* (Fig. 2A). Posteriormente, Solier (1849) movió esta especie al género *Latipalpis* y luego Kerremans (1903), reestableció el género *Ectinogonia* con una detallada descripción de los rasgos morfológicos que validan este género. Consecutivamente, Olave (1935) creó dos géneros a partir de algunas especies de *Ectinogonia*: *Achardella* y *Pseudolampetis*, los cuales aún son válidos. En la revisión de *Ectinogonia* por Cobos (1972), se cuestiona la posición sistemática del género y el número de especies descritas la cual se propone como sobrestimada. Finalmente, Moore (1994) revisó nuevamente el grupo, añadiendo cinco nuevas especies y dos subespecies en base a morfología, legando la taxonomía que actualmente se usa para el grupo. Una dificultad de la sistemática de este grupo está asociada a la alta variabilidad morfológica intraespecífica (eg. *E. fastidiosa*, *E. roitmani*, *E. atacamensis*, *E. costata*, *E. chalyboeiventris*, *E. minor gutierrezii* y *E. buqueti*) (Cobos 1953, Moore 1994), la cual hace difícil la delimitación morfológica entre especies. Esto conlleva a que exista una gran cantidad de especies crípticas, ya que son

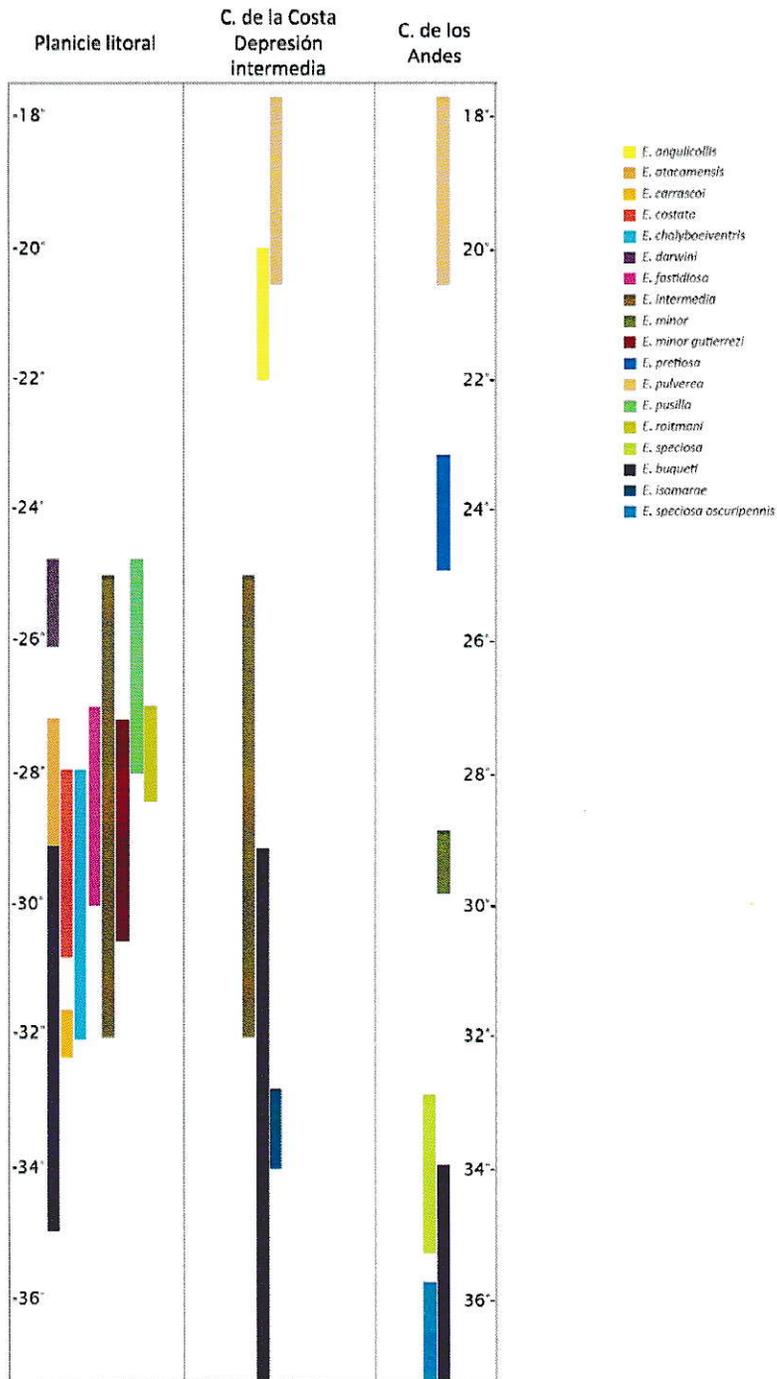
morfológicamente similares entre ellas (c *E. roitmani*, *E. atacamensis*, *E. minor gutierrezii*, *E. fastidiosa*), dando cuenta la necesidad de usar nuevas herramientas, como las filogenéticas, que permitan evaluar de forma más rigurosa, la validez de estas especies nominales en un contexto ancestro-descendiente.



**Figura 2.** Vista dorsal de *E. buqueti* hembra (A), *E. chalyboeiventris wagenknechti* posada sobre follaje de *Senecio* sp. (B), *E. darwini* forrajeando flores de *Copiapoa cinérea* (C), Hábitat de *E. buqueti* en provincia del Ñuble (D) y Hábitat de *E. pulverea* en Putre (E).

Estas especies se distribuyen principalmente en ambientes áridos y semiáridos de la vertiente occidental de la Cordillera de los Andes (Bellamy 2006) (Fig. 2D y 2E). Estos escarabajos son de vágilidad moderada, debido a que son capaces de hacer vuelos de corta distancia y son altamente dependientes de vegetación arbustiva xérica. Esto se debe a que su ciclo biológico depende de este tipo de vegetación, ya que las larvas barrenadoras se desarrollan dentro de troncos y ramas de estos arbustos y los adultos se alimentan de las

partes florales y/o foliares (Fig. 2B y 2C) (Moore 1994, Bellamy 2006, Moore & Vidal 2015). Se encuentran distribuidos entre los 18°S y los 38°S, abarcando hábitats contrastantes como las planicies litorales y alturas sobre los 3000 m.s.n.m. en la cordillera de los Andes (Fig. 3) (Moore 1994, Moore & Vidal 2015). Adicionalmente, en este rango de distribución la riqueza de especie no es homogénea, ya que en la zona litoral de la tercera y cuarta región (26°S-30°S), habrían 9 especies, pudiendo encontrarse de tres a cuatro especies viviendo en simpatria en una misma localidad (Moore 1994, Anguita obs. pers), compartiendo incluso el mismo sustrato/forraje. Por otra parte, en Chile central (desde Santiago hacia el sur), hay pocas de estas especies, una especie (*E. buqueti*) con un amplio rango de distribución, mientras que las otras poseen distribución bien acotada a las cumbres de la cordillera de la Costa y de los Andes (Fig. 3). Por lo tanto, *Ectinogonia* parece ser un modelo de estudio atractivo, debido a su patrón de distribución, con una zonas norte de alta diversidad de especies (franja litoral entre los 26°S a los 30°S), mientras que en el sur, se observa una zona pobre en especies lo que estaría reflejando patrones evolutivos diferenciados latitudinalmente.



**Figura 3.** Distribución latitudinal de especies de *Ectinogonia*. Se divide el territorio en 3 zonas geográficas; Planicie litoral, Depresión intermedia-Cordillera de la Costa y Cordillera de los Andes. Cada barra representa el rango latitudinal de la distribución de una especie.

### **Hipótesis**

Debido a que numerosos taxa diversificaron durante el Pleistoceno por los cambios en el paisaje a consecuencia de las oscilaciones climáticas y que estas tuvieron un impacto latitudinalmente diferenciado, se propone que las oscilaciones climáticas del Pleistoceno son las responsables del proceso de diversificación en *Ectinogonia*.

Predicción: Se espera que los tiempos de divergencia dentro del género *Ectinogonia* ocurran durante el Pleistoceno (2.6 - 0.01 Ma).

### **Objetivos**

**Objetivo General:** Inferir los efectos de las oscilaciones climáticas del Pleistoceno en la historia evolutiva del género *Ectinogonia* por medio de análisis filogenéticos

#### **Objetivos específicos:**

- Reconstruir una filogenia con marcadores moleculares para el género *Ectinogonia*.
- Estimar los tiempos de divergencia de la filogenia de *Ectinogonia*.
- Relacionar los tiempos de divergencia con eventos climáticos ocurridos durante el Cuaternario.

## **Metodología**

**Muestreo:** El material recolectado considera todo el rango de distribución de *Ectinogonia* en Chile. Los ejemplares se recolectaron manualmente durante su época de actividad (por lo general temporada estival) en las distintas localidades consideradas (Tabla 1), las cuales se eligieron según datos de recolectas personales y siguiendo la información de Moore & Vidal (2015) (Tabla 1). Se recolectaron máximo 5 individuos por especie registrada en la localidad, los cuales fueron fijados en etanol al 96% para posterior extracción de DNA. Se logró muestrear ejemplares de 18 de las 20 unidades taxonómicas descritas a la fecha, considerando especies y subespecies (faltando *E. catemulata* y *E. chalyboeiventris chalyboeiventris*) más dos morfos que no pudieron ser adscritos a ninguna especies descritas.

**Tabla 1.** Lista de especies utilizadas para este estudio incluyendo grupos externos, códigos de procedencia, n° de individuos, localidades y posición geográfica georeferenciada.

Especie	Código	Nro. Ind.	Localidad	Región	Latitud	Longitud
<i>C. souverbi</i>	CsouCUR	1	Curicó	VII	?	?
<i>Ep. Pictus</i>	EpicTRAN	1	Termas de Chillan	VIII	36°54'20.54"S	71°24'31.33"O
<i>Achardella sp</i>	AspARG	1	Argentina	-	?	?
<i>E. angulicollis</i>	EangSOG	5	Camino a Soga	I	19°51'4.08"S	69°41'50.94"O
<i>E. angulicollis</i>	EangCUR	5	Poso de Curaña	I	19°48'25.44"S	69°40'39.54"O
<i>E. angulicollis</i>	EangHUA	5	Huara	I	20° 3'32.70"S	69°44'19.44"O
<i>E. angulicollis</i>	EangTIR	5	La Tirana	I	20°19'36.78"S	69°43'27.60"O
<i>E. atacamensis</i>	EataCHO	2	Los Choros	III	29°16'33.18"S	71°23'19.47"O
<i>E. atacamensis</i>	EataPAJ	4	Caleta Pajonales	III	27°44'38.51"S	71° 0'58.40"O
<i>E. atacamensis</i>	EataCBA	1	Carrizal Bajo	III	?	?
<i>E. buqueti</i>	EbuqMAU	1	Cordillera del Maule	VII	?	?
<i>E. buqueti</i>	EbuqOBR	4	La Obra	RM	33°35'17.45"S	70°29'30.40"O
<i>E. buqueti</i>	EbuqVAL	3	Lo Valdez	RM	33°49'39.19"S	70° 2'54.13"O
<i>E. buqueti</i>	EbuqCOM	9	Las Comadres	VIII	36°53'20.58"S	71°33'45.96"O
<i>E. buqueti</i>	EbuqCLA	1	Rio Clarillo	RM	33°43'26.86"S	70°29'21.75"O
<i>E. buqueti</i>	EbuqLEÑ	2	Valle las Leñas	VI	34°23'24.90"S	70°16'32.69"O
<i>E. buqueti</i>	EbuqSAU	1	Los Sauces	VIII	?	?
<i>E. buqueti</i>	EbuqCAN	3	Altos de Cantillana	RM	33°53'46.10"S	70°59'51.44"O
<i>E. chalyboeiventris wagenknechti</i>	EchaMOR	8	El Morado	III	28°57'31.70"S	71°11'16.29"O
<i>E. chalyboeiventris wagenknechti</i>	EchaCBA	1	Carrizal Bajo	III	?	?
<i>E. costata</i>	EcosTOY	4	Los Toyos	III	28°21'1.72"S	71° 8'40.98"O
<i>E. carrascoi</i>	EcarVIL	5	Los Vilos	IV	31°56'5.22"S	71°30'13.37"O
<i>E. darwini</i>	EdarCHAÑ	3	Chañaral	III	26°15'12.72"S	70°38'6.70"O
<i>E. fastidiosa</i>	EfasMOR	1	El Morado	III	28°57'31.70"S	71°11'16.29"O
<i>E. fastidiosa</i>	EfasTOY	1	Los Toyos	III	28°21'1.72"S	71° 8'40.98"O
<i>E. fastidiosa</i>	EfasPAJ	2	Caleta Pajonales	III	27°44'38.51"S	71° 0'58.40"O
<i>E. fastidiosa</i>	EfasCAL	1	Camino a Caldera km872	III	27°13'4.56"S	70°47'7.31"O
<i>E. intermedia</i>	EintHIG	2	La Higuera	IV	29°30'34.06"S	71°13'50.52"O
<i>E. intermedia</i>	EintGUA	1	Guanaqueros	IV	30°10'53.94"S	71°22'56.70"O
<i>E. isamarae</i>	EisaCAN	7	Altos de Cantillana	RM	33°53'46.10"S	70°59'51.44"O
<i>E. minor minor</i>	EminHED	6	Termas las Hediondas	IV	29°55'7.11"S	70° 2'4.22"O
<i>E. minor gutierrezzi</i>	EmingutCHO	1	Los Choros	III	29°16'33.18"S	71°23'19.47"O
<i>E. minor gutierrezzi</i>	EmingutPAJ	1	Caleta Pajonales	III	27°44'38.51"S	71° 0'58.40"O
<i>E. minor gutierrezzi</i>	EmingutCBA	1	Carrizal Bajo	III	?	?
<i>E. pretiosa</i>	EpreSPE	1	San Pedro de Atacama	II	22°54'31.35"S	68°11'58.98"O
<i>E. pusilla</i>	EpusCPO	7	Aeropuerto Copiapó	III	27°15'46.55"S	70°46'20.45"O
<i>E. pusilla</i>	EpusCAL	9	Playa las Machas	III	27° 7'36.48"S	70°51'16.70"O
<i>E. pusilla</i>	EpusTOY	1	Los Toyos	III	28°21'1.72"S	71° 8'40.98"O
<i>E. pulvereae</i>	EpulSOC	4	Socoroma	XV	18°16'16.50"S	69°35'36.06"O
<i>E. pulvereae</i>	EpulZAP	2	Zapahuira	XI	18°14'55.44"S	69°33'49.02"O
<i>E. roitmani</i>	EroiCHO	5	Los Choros	III	29°16'33.18"S	71°23'19.47"O
<i>E. roitmani</i>	EroiCHAL	3	Llanos del Challe	III	28°14'12.78"S	71° 8'55.99"O
<i>E. roitmani</i>	EroiTOY	1	Los Toyos	III	28°21'1.72"S	71° 8'40.98"O
<i>E. roitmani</i>	EroiPAJ	2	Caleta Pajonales	III	27°44'38.51"S	71° 0'58.40"O
<i>E. speciosa speciosa</i>	EspePOT	2	Potrero Grande	RM	?	?
<i>E. speciosa speciosa</i>	EspePAR	5	La Parva	RM	33°19'50.34"S	70°17'34.26"O
<i>E. speciosa oscuripennis</i>	EspeoscTran	2	Termas de Chillan	VIII	36°54'20.54"S	71°24'31.33"O
<i>E. speciosa oscuripennis</i>	EspeoscDES	2	Descabezado Grande	VII	35°35'6.05"S	70°50'13.48"O

**Extracción de DNA, amplificación y secuenciación:** El DNA se extrajo de musculatura de pronoto y genitalia usando una modificación del método de sales de Jowett (1986). Se amplificaron los genes mitocondriales Citocromo C Oxidasa subunidad I (COI) para 150 individuos y RNA ribosomal 16S (16S) para 164 individuos. Se utilizaron los partidores C1-J-2183 (CAA CAT TTA TTT TGA TTT TTT GG) y TL2-N-3014 (TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A) diseñados por Simon et al. (1994) para amplificar COI. La mezcla para la reacción de amplificación incluyó 21.2  $\mu$ L de agua, 3  $\mu$ L de buffer 10X (Invitrogen), 1.8  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50 mM, 0.6  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 0.6  $\mu$ L de partidior forward 10  $\mu$ mol/ $\mu$ L, 0.6  $\mu$ L de partidior reverse 10  $\mu$ mol/ $\mu$ L, 0.2  $\mu$ L de Taq Polimerasa 5U/ $\mu$ L (Invitrogen) y 2  $\mu$ L de DNA (50 ng/ $\mu$ L). Se utilizaron los partidores LR-J-12961 (TTT AAT CCA ACA TCG AGG) y LR-N-13398 (CGC CTG TTT AAC AAA AAC AT) diseñados por Simon et al. (1994) y Cognato & Volder (2001) respectivamente, para amplificar 16S. La mezcla para la reacción de amplificación incluyó 21.5 uL de agua, 3 uL de buffer 10X (Invitrogen), 1.5  $\mu$ L de  $MgCl_2$  50mM, 0.5  $\mu$ L de dNTPs 10 mM, 0.6  $\mu$ L de partidior forward 10  $\mu$ mol/ $\mu$ L, 0.6  $\mu$ L de partidior reverse 10  $\mu$ mol/ $\mu$ L, 0.3  $\mu$ L de Tal Polimerasa 5U/ $\mu$ L (Invitrogen) y 2  $\mu$ L de DNA (50 ng/uL). El perfil térmico de la reacción para ambos marcadores fue el mismo: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, 36 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45 segundos, empalme a 45°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 60 segundos, seguido por elongación final a 72°C por 2 minutos. Se verificó la amplificación de los fragmentos haciendo migrar 4uL de producto de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Los productos de

amplificación se enviaron a Macrogen Inc. (Seul, Corea) para purificar y secuenciar los fragmentos amplificados. Las secuencias de cada individuo fueron revisadas y editadas en el programa ProSeq 2.91 (Filatov 2002) y posteriormente alineadas usando CLUSTAL W (Thompson et al. 1994) en el programa Bioedit 7.2.5 (Hall 1999).

**Reconstrucciones filogenéticas:** Se realizaron reconstrucciones filogenéticas usando los algoritmos de Máxima Parsimonia (MP), Máxima Verosimilitud (MV) e Inferencia Bayesiana (IB). Todas las reconstrucciones se hicieron con secuencias de COI, secuencias de 16S y secuencias de COI concatenados con secuencias de 16S. Para enraizar los árboles se usaron como grupo externo las especies *Conognatha souverbi*, *Epistomentis pictus* y *Achardella sp*, ya que también son bupréstidos sudamericanos y *Achardella* es sugerida como genero hermano de *Ectinogonia* (Hołyński 1999, Bellamy 2006).

Para la reconstrucción por Máxima Parsimonia todos los caracteres fueron considerados como no ordenados y de igual peso. El soporte de los nodos fue obtenido a partir de análisis de bootstrap (Felsenstein 1985) con 1000 pseudoreplicas. Para Máxima Verosimilitud e Inferencia Bayesiana, se seleccionó previamente el mejor modelo de evolución de secuencias mediante el Akaike Information Criterion (AIC) utilizando el programa jModelTest 2.1.7 (Darriba et al. 2012). El mejor ajuste encontrado para las secuencias fueron los modelos TrN+I+G para COI y HKY+G para 16S. Posteriormente se realizó una búsqueda heurística y el soporte de nodos al igual que en MP. Para la reconstrucción por MP se realizó con el programa PAUP 4.0 (Swofford 2002), mientras que para la reconstrucción por MV se utilizó el programa RaxML (Miller et al. 2010) en el cluster de <https://www.phylo.org>. Por último la reconstrucción por IB se realizó con el

programa Mr Bayes (Huelsenbeck & Ronquist 2001), utilizando el método Markov Chain Monte Carlo (MCMC). Para la búsqueda de árboles con IB se consideró 30 millones de generaciones, con un muestreo cada 1000 generaciones. De los 30000 árboles muestreados se tomaron los valores de verosimilitud de cada árbol y se graficaron para examinar la convergencia de las distribuciones de probabilidad de los parámetros. Posteriormente se descartaron los árboles que no se encuentran en la etapa previa a la fase estacionaria de la cadena de Markov. Luego se construyó un árbol de consenso por regla de la mayoría y la consistencia de los nodos se obtuvo por la probabilidad *a posteriori*. Finalmente, los resultados fueron visualizados y editados en FIGTREE 1.4.2 (Rambaut 2014)

**Estimación de tiempos de divergencia:** Las estimaciones de tiempo de divergencia se realizaron mediante inferencia bayesiana implementada en el programa BEAST 1.8.0 (Drummond et al. 2012). Se consideró el modelo de sustitución GTR+I+G para ambas particiones, ya que anida en complejidad a los modelos de sustitución para las particiones. Además se corrió el programa con todos los modelos preestablecidos en BEAST y se seleccionó el modelo de Reloj Relajado Exponencial mediante factor de Bayes en TRACER 1.6 (Drummond et al. 2012). El modelo de especiación que se utilizó fue el de proceso de Yule. Para la calibración de la estimación se utilizó la tasa de mutación de 2% para genes mitocondriales, propuesta para insectos (Farrel 2001, Barraclough & Vogler 2002) y asumida en otros trabajos con bupréstidos (Kajtoch et al. 2014). Para la estimación de tiempos de divergencia se realizó una corrida de 30 millones de generaciones, muestreando cada mil generaciones. Se resumió la muestra de árboles en una sola

topología con el programa TreeAnnotator 1.8.0 (Drummond et al. 2012) del paquete BEAST, quemando el 10% de los árboles (300 árboles) y fijando probabilidad *a posteriori* de 0.5. Finalmente, los resultados fueron visualizados y editados en FIGTREE 1.4.2 (Rambaut 2014).

**Redes de Haplotipos:** Se generaron redes de haplotipos por medio del algoritmo de Median-Joining (MJ) (Bandelt et al 1999) usando el programa PopART 1.7 (Leigh & Bryant 2015). Se construyeron redes tanto para COI como 16S por separado, los cuales se rotularon según especie nominal y luego por localidad muestreada en paralelo.

## **Resultados**

Para COI se pudo amplificar fragmentos de 838 pb y para 16S se amplificaron fragmentos de 448 pb. Se registró un total de 99 secuencias distintas para COI y 62 secuencias distintas para 16S. Se trabajó con 90 secuencias de los genes COI y 16S concatenados, las cuales tenían una longitud de 1286 pb.

**Tabla 2.** Desglose de individuos secuenciados y número de secuencias registradas. n COI: Número de individuos que amplificaron el fragmento COI. K COI: Número de secuencias distintas registradas para COI. n 16S: Número de individuos que amplificaron el fragmento 16S. K 16S: Número de secuencias distintas registradas para 16S.

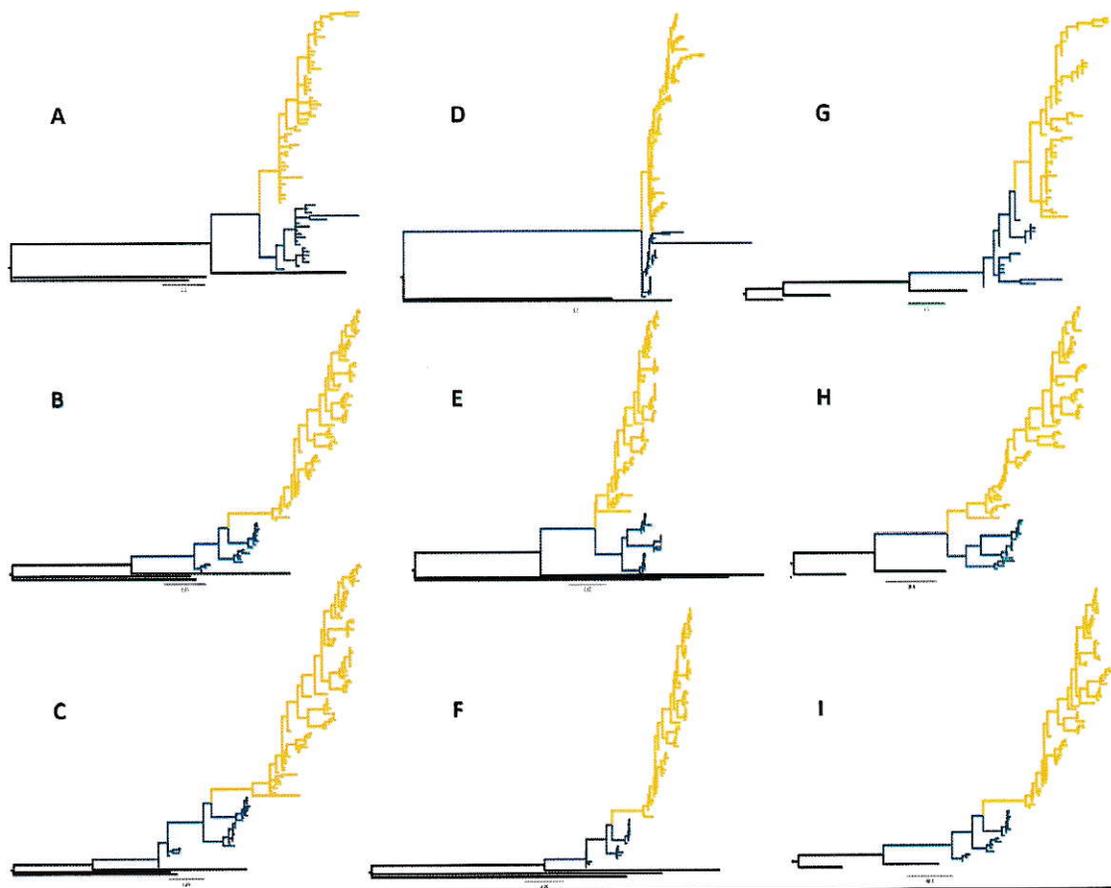
Especie	n COI	K COI	n 16S	K 16S
<i>E. angullicollis</i>	21	10	23	13
<i>E. atacamensis</i>	9	9	8	6
<i>E. buqueti</i>	17	11	27	15
<i>E. carrascoi</i>	5	5	5	4
<i>E. chalyboeiventris wagenknechti</i>	4	4	4	3
<i>E. costata</i>	5	4	5	5
<i>E. darwini</i>	3	3	3	3
<i>E. fastidiosa</i>	9	7	10	8
<i>E. intermedia</i>	3	3	3	3
<i>E. isamarae</i>	7	4	7	4
<i>E. minor minor</i>	6	2	6	6
<i>E. minor gutierrezii</i>	3	3	4	4
<i>E. pulverea</i>	12	6	11	5
<i>E. pusilla</i>	16	15	16	8
<i>E. roitmani</i>	10	9	10	9
<i>E. speciosa speciosa</i>	6	4	7	5
<i>E. speciosa oscuripennis</i>	4	4	4	3
<i>E. sp</i>	2	2	3	2

**Reconstrucciones filogenéticas:** Para el gen 16S, dos de los tres métodos de reconstrucción (i.e. IB y MV) muestran la misma topología general, donde *Ectinogonia* se divide en dos clados (Fig. 4 A y D). Usando MP, se reconstruyeron 300 árboles igualmente parsimoniosos (TL=176, CI=0.5739 y RI=0.4829), todos con una topología desbalanceada (Fig. 4 G). Los árboles construidos con 16S son poco informativos en las relaciones terminales, ya que no resuelven las relaciones entre las especies nominales.

Por otra parte, los árboles construidos para COI difieren en la topología general del árbol, según el método de reconstrucción. En la topología de MP (TL=671, CI=0.4739 y RI=0.872) y MV muestran dos clados principales, mientras que con IB, la topología muestra nuevamente una topología desbalanceada con cuatro clados (Fig. 4 B).

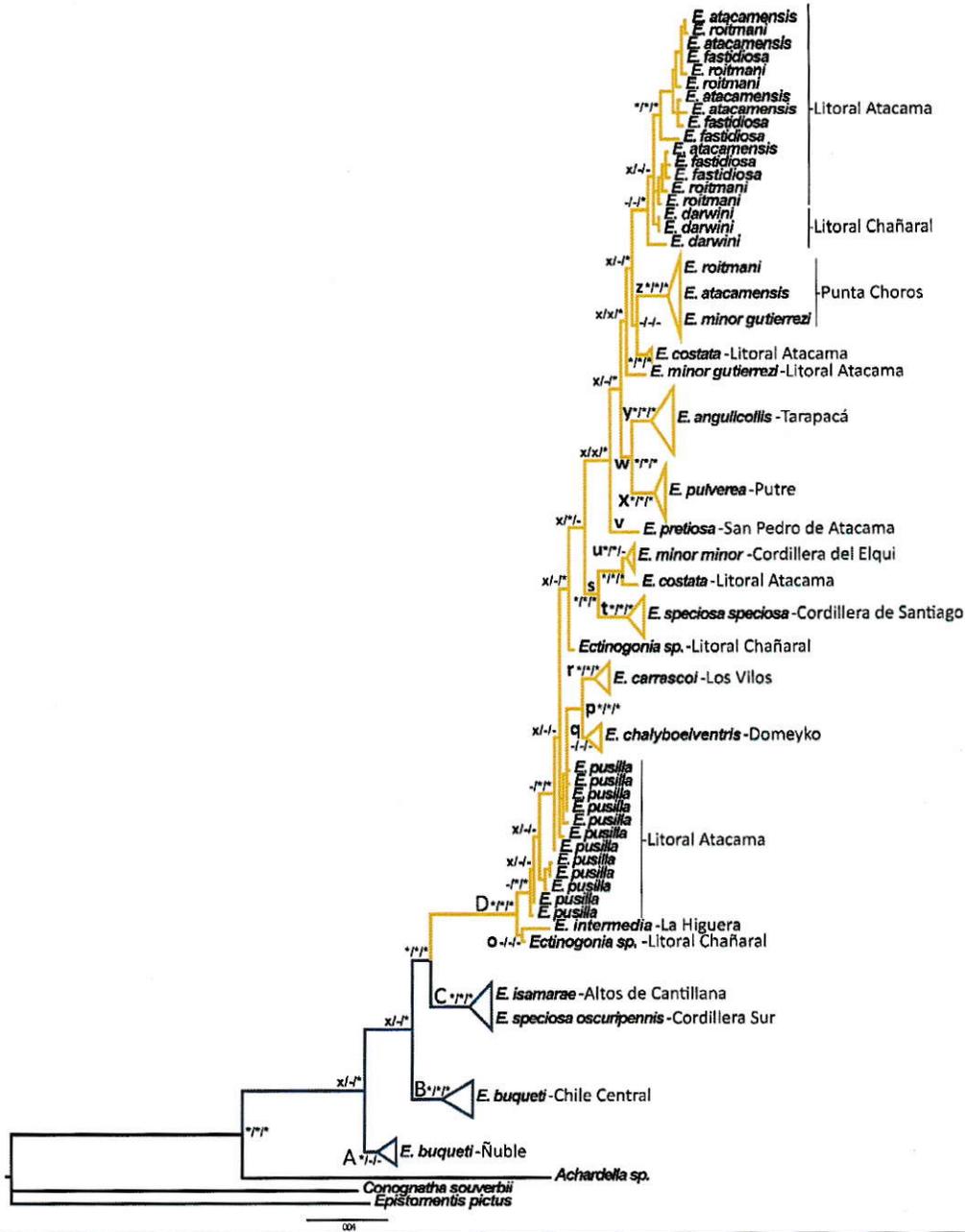
Los árboles construidos a partir de los genes concatenados (COI+16S) según los métodos de reconstrucción MV e IB sugieren una topología desbalanceada con cuatro clados para el género *Ectinogonia*. De los 1000 árboles más parsimoniosos obtenidos por MP, 100 mostraron una topología similar a MV e IB (TL=775, CI=0.5123 y RI=0.8730). Esto sugiere, que en base a genes concatenados el árbol sería desbalanceado, donde *Ectinogonia* sería un grupo monofilético y aparentemente el género *Achardella* sería el que está más relacionado con el ingroup. En esta topología se reconocen cuatro clados dentro del género *Ectinogonia*, el primer clado (clado A), es hermano de todo el resto y está constituido por ejemplares de *E. buqueti* de la provincia del Ñuble. Luego aparece el clado B, que reúne a los individuos de *E. buqueti* de las regiones de Coquimbo, Metropolitana, O'Higgins y Maule (Chile central). Posteriormente, aparecen los clados C y D, donde C está constituido de las especies nominales *E. isamarae* y *E. speciosa*

*oscuripennis* provenientes de Altos de Cantillana y los Andes Sur. Finalmente, el clado D reúne a todas las especies nominales provenientes del norte, desde el norte de los Andes metropolitanos, hasta Tarapacá (Fig. 5). Ya que en la MV e IB los clados A, B y C son de distribución sur y en los 900 árboles de MP se agrupan en un solo clado, se llamará a este “grupo sur”.



**Figura 4.** Hipótesis filogenéticas inferidas con los tres métodos, Inferencia Bayesiana (A, B y C), Máxima Verosimilitud (D, E, y F) y Máxima Parsimonia (G, H e I) para las tres matrices de 16S (A, D y G), COI (B, E y H) y 16S+COI (C, F e I). En amarillo el clado norte y en azul se representa los clados del grupo sur.

En cuanto al clado D, puede observarse que las especies *E. pusilla*, *E. atacamensis*, *E. costata*, *E. minor gutierrezii*, *E. roitmani*, *E. fastidiosa* y *E. darwini*, no conforman clados y se encuentra distribuidas por todo el clado norte. Sin embargo, a pesar de la poca estructura del clado D, se rescata la presencia de subclados conformados por especies nominales; por ejemplo **p**, está constituido por *E. chalyboeiventris* (subclado **q**) y por *E. carrascoi* (subclado **r**); por otra parte, el subclado **s**, conformado por *E. speciosa speciosa* (subclado **t**), *E. minor minor* (subclado **u**) y un linaje de *E. costata*; finalmente, el subclado **w** que reúne a todos los individuos de *E. pulverea* (subclado **x**) y *E. angulicollis* (subclado **y**).



**Figura 5.** Hipótesis filogenéticas para el género *Ectinogonia* obtenida a partir de secuencias concatenados (COI+16S) por MP, MV e IB. Valores sobre las ramas corresponden a valores de bootstrap de MP, MV y probabilidad a posteriori de IB. El asterisco representa valores de bootstrap sobre 75 y valores de probabilidad a posteriori sobre 95. El guion representa valores de bootstrap bajo 75 y valores de probabilidad a posteriori bajo 95. La equis corresponde a la no coincidencia entre topologías. Los clados del “grupo sur” coloreado con azul y el clado del “grupo norte” coloreado con naranja.

Desde el punto de vista geográfico, se reconocen clados y subclados propios del Ñuble (clado A), Chile central (clado B), Altos de Cantillana-Cordillera de los Andes Sur (clado C), La Higuera (linaje del subclado o), Domeyko (subclado q), Los Vilos (subclado r), Cordillera de Santiago (subclado t), Cordillera del Elqui (subclado u), San Pedro de Atacama (subclado v), Putre (subclado x), Tarapacá (subclado y) y Punta Choros (subclado z). Este último subclado reúne individuos de distintas especies nominales (ie. *E. atacamensis*, *E. minor gutierrezii* y *E. roitmani*). El resto de linajes están compuesto por individuos muestreados provenientes de localidades desde Huasco hasta Chañaral, y se encuentran distribuidas en dos partes dentro del clado D. En primera instancia, están las ramas más internas del clado D, el cual está compuesto por una serie de linajes de *E. pusilla*, dos linajes de *E. costata* y uno de *E. minor gutierrezii*. Posteriormente, la segunda parte, se encuentra en subclado más externo, reuniendo varias especies nominales que surgen de un mismo nodo (ie. *E. atacamensis*, *E. roitmani*, *E. fastidiosa* y *E. darwini*).

**Tiempos de divergencia:** La divergencia entre *Ectinogonia* con el grupo externo (*Achardella*) habría ocurrido hace 5.07 Ma (HPD: 3.13-8.14), en el Plioceno temprano. El proceso de diversificación en *Ectinogonia* habría comenzado hace 3.8 Ma (HPD: 2.37-5.77) en el Plioceno medio, con la separación entre el clado A del “Ñuble” del resto de las especies que conforman el género. Posteriormente, la separación del clado B de “Chile central”, del resto de las *Ectinogonia*, habría ocurrido hace 3.29 Ma (HPD: 2.1-4.9) durante el Plioceno tardío. La divergencia entre el clado C, de Altos de Cantillana-Andes-Sur con el clado D, se habría iniciado hace 2.94 Ma (HPD: 1.91-4.37), también durante Plioceno tardío. Finalmente, la diversificación del clado D habría comenzado hace 2.12

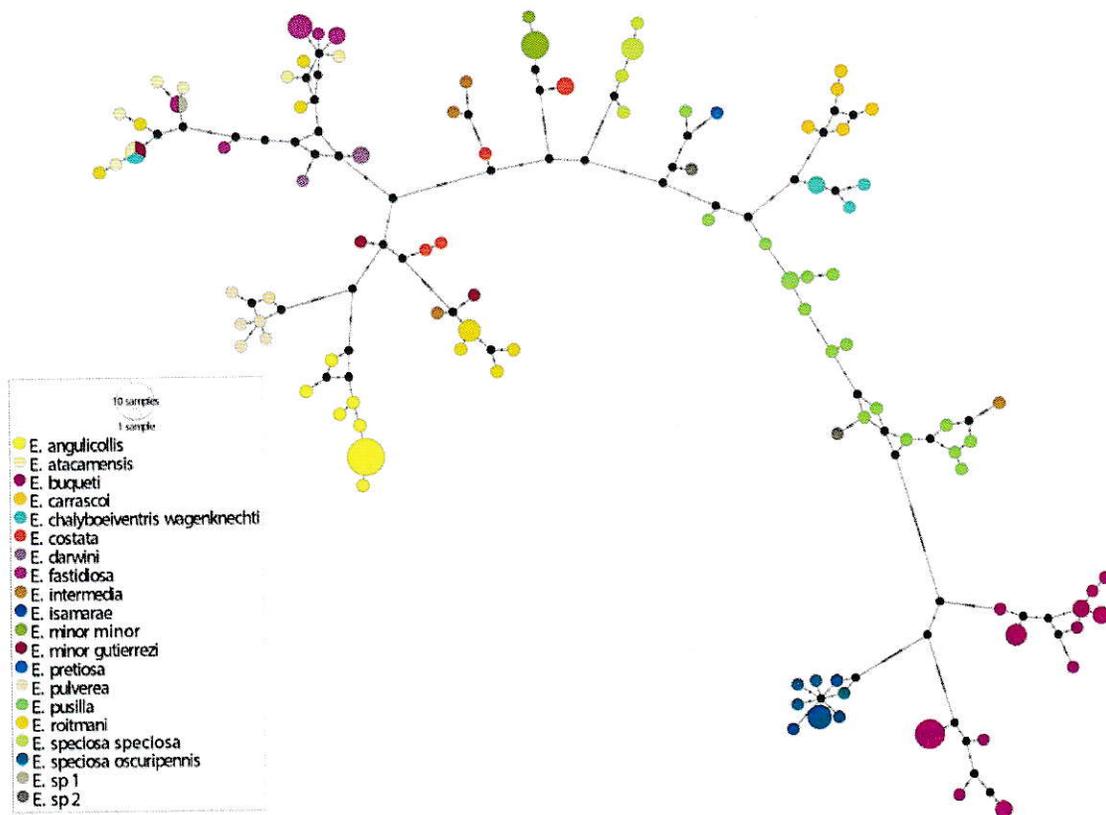


**Redes de Haplotipos:** La red de haplotipos construidas a partir de COI para el género *Ectinogonia* presentan una topología extendida de la cual se desprenden diversos haplogrupos. Primero se desprenden tres haplogrupos bien delimitados por varias mutaciones, que convergen en dos haplotipos perdidos y contienen al “grupo sur”. *E. buqueti* compone dos de estos haplogrupos, uno que contiene los ejemplares de la provincia del Ñuble y otro a los ejemplares de Chile central. El tercer haplogrupo reúne a *E. isamarae* con *E. speciosa oscuripennis*, las cuales no comparten haplotipos y la topología del haplogrupo recuerda la forma estrellada en torno a un haplotipo perdido (Fig. 7).

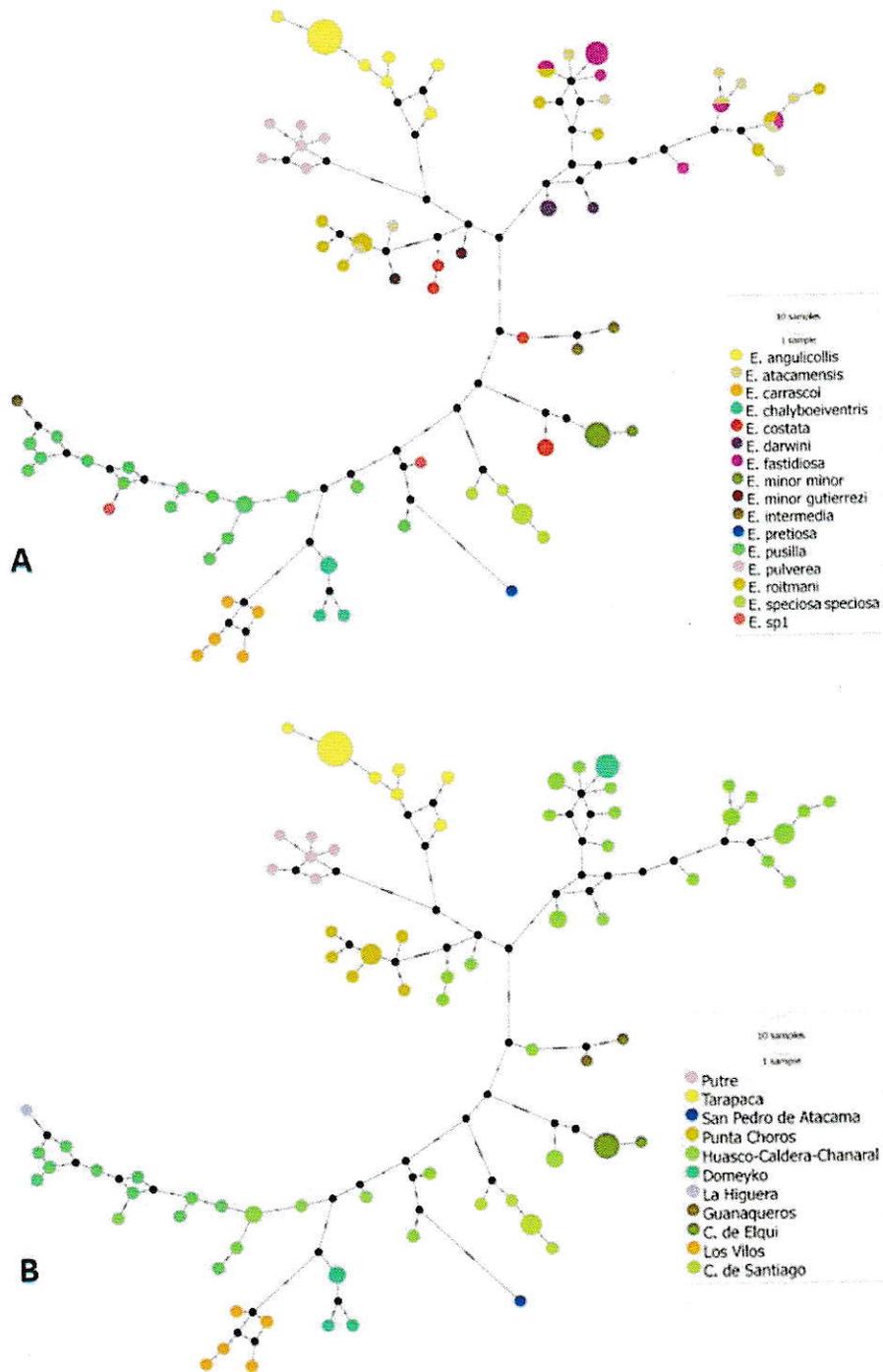
Por otra parte el “grupo norte” en la red de haplotipos presenta una topología extendida en torno a un eje central, el cual está constituido por diversas especies nominales (*E. atacamensis*, *E. costata*, *E. darwini*, *E. fastidiosa*, *E. minor guiterrezi*, *E. intermedia*, *E. pusilla* y *E. roitmani*) que se muestrearon en diversos puntos costeros entre las localidades de Huasco, Caldera y Chañaral (Fig. 8A). En contraste, los haplogrupos que se desprenden de este eje central agrupan individuos de especies nominales *E. angulicollis*, *E. pulverea*, *E. minor minor*, *E. speciosa speciosa*, *E. pretiosa*, *E. carrascoi* y *E. chalyboeiventris* (Fig. 8B).

Adicionalmente, al identificar los haplotipos según la localidad de procedencia, los haplogrupos descritos se corresponden con su ubicación geográfica (*E. angulicollis*-Tarapacá, *E. buqueti*-Ñuble, *E. buqueti*-Chile central, *E. carrascoi*-Los Vilos, *E. chalyboeiventris wagenknechti*-Domeyko, *E. isamarae*-*E. speciosa oscuripennis*-Altos de Cantillana-Andes Sur, *E. minor minor*-Cordillera del Elqui, *E. pretiosa*-San Pedro de

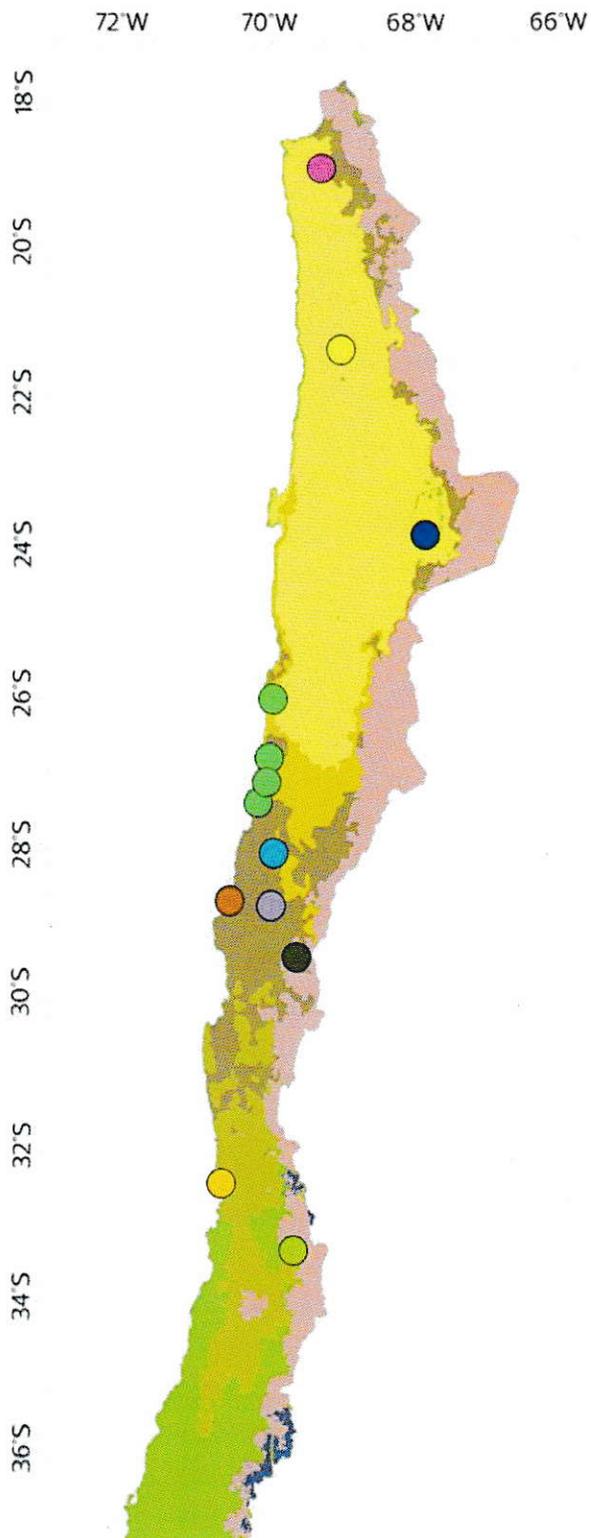
Atacama, *E. pulverea*-Putre y *E. speciosa speciosa*-Cordillera de Santiago) (Fig. 7, 8A y 8B). Adicionalmente se recupera un octavo haplogrupo para el “grupo norte”, “Punta Choros”, que agrupa ejemplares de las especies *E. atacamensis*, *E. minor gutierrezi* y *E. roitmani* (Fig. 8B). Todos los haplogrupos que se diferencian están en la periferia del eje central, tanto en un sentido topológico de la red de haplotipos, como del origen geográfico de las muestras (Fig. 8 y 9).



**Figura 7.** Red de haplotipos del género *Ectinogonia* en base al gen COI.



**Figura 8.** Redes de haplotipos del género *Ectinogonia*, para el grupo norte, en base a COI, etiquetado según especie nominal (A) y origen geográficos de los haplotipos (B).



**Figura 9.** Mapa con zonas geográficas de procedencia de los ejemplares del grupo norte (En circunferencias). (Rosado) Putre, (Amarillo) Atacama, (Azul) San Pedro de Atacama, (Cian) Domeyko, (Café) Punta Choros, (Lila) La Higuera, (Verde Oliva) Cordillera del Elqui, (Naranja) Los Vilos y (Verde) Cordillera de Santiago. En circunferencias verde claro sitios costeros entre Huasco, Caldera y Chañaral. Formaciones Vegetacionales; Altoandina (rosado), Desierto (amarillo), Semidesierto (amarillo oscuro), Matorral estepario (café), Matorral (café claro) y Bosque (verde).

## Discusión

**Implicancias sistemáticas:** Comparando la taxonomía tradicional del grupo (Moore 1994, Moore & Vidal 2015) con la hipótesis filogenética que se propone en este trabajo, se puede observar numerosas discrepancias. Dentro de la filogenia se identifican cuatro clados principales, dos clados (A y B) formados por la separación de la especie nominal *E. buqueti*. Esta separación tiene sentido geográfico y evolutivo, ya que el clado más cercano al grupo externo, clado A, del Ñuble, se restringen solo al área del Ñuble, Región del Biobío, mientras que el otro clado, *E. buqueti* de Chile central, como su nombre indica es de distribución más septentrional y amplia, ya que se ha registrado en las regiones de Coquimbo, Metropolitana, O'Higgins y Maule. Además, los ejemplares de ambos clados presentan diferencias morfológicas, lo que junto a la evidencia molecular sugieren que estos clados corresponderían a especies distintas (Anguita et al. obs. pers.). En este caso, los individuos del clado A, corresponderían a una nueva especie. Mientras que los individuos del clado B, corresponderían a la especie nominal, ya que este clado posee individuos provenientes de la localidad tipo de *E. buqueti*.

Por otra parte, el clado C estaría conformado por las especie *E. isamarae* de Altos de Cantillana y *E. speciosa oscuripennis* de la Cordillera de los Andes Sur, Regiones del Maule y Biobío. Ambas especies nominales se encuentran entremezcladas en el mismo clado y en el mismo haplogrupo (Fig. 5 y 7). Esto resulta interesante, ya que ambas especies nominales se encuentran en ambientes de altura separados por la depresión intermedia, pero comparten características morfológicas como las esculturas elitral y pronotal. Estas evidencias sugieren que *E. isamarae* y *E. speciosa oscuripennis*

pertenecería a una misma unidad evolutiva y especie. Sin embargo, la ausencia de secuencias compartidos entre ambos taxa también podría reflejar la existencia de dos unidades evolutivas que están recién separándose y los marcadores utilizados no son capaces de dar cuenta de este proceso, aun cuando COI es uno de los genes mitocondriales con tasa mutacional más rápida (Papodopolou et al. 2010). Otro tipo de evidencias, como citogenética, morfométricas y de otros marcadores moleculares más variables serán necesaria para sustentar esta hipótesis. Por otra parte, acerca de las subespecies *E. speciosa speciosa* y *E. speciosa oscuripennis*, al separarse en dos clados distintos altamente divergentes, podrían ser elevadas a la categoría de especie. Ambas subespecies fueron descritas según la morfología asumiendo que están emparentadas (Moore 1994), por lo tanto sus semejanzas morfológicas podrían ser producto de convergencia evolutiva, ya que *E. speciosa speciosa* también habita ambientes altoandinos.

Adicionalmente, el clado D está conformado por todas las especies de distribución norte de *Ectinogonia*. Sin embargo, la mayoría de las especies nominales son unidades parafiléticas y aparecen algunos subclados dentro de este grupo. Bajo este complejo escenario, es difícil tomar decisiones taxonómicas. Sin embargo, considerando la filogeografía, se vuelven a observar coincidencias entre haplogrupos y especies nominales, siendo posible identificar unidades discretas dentro del clado “norte” (Fig. 7 y 8). Las más evidentes son los casos de las *Ectinogonia* de Putre (*E. pulverea*), Tarapacá (*E. angulicollis*), San Pedro de Atacama (*E. pretiosa*), Domeyko (*E. chalyboeiventris*), La Higuera (*E. intermedia*), Cordillera del Elqui (*E. minor minor*), Los Vilos (*E. carrascoi*) y Cordillera de Santiago (*E. speciosa speciosa*). En contraste, las *Ectinogonia* de Punta

Choros (subclado **z**), las cuales conforman también un único haplogrupo, corresponden a 3 especies nominales descritas a partir de diferencias morfológicas, evidenciando lo variable que es este grupo morfológicamente. Las secuencias de estas 3 especies conforman un grupo monofilético con alto soporte (Fig. 5) que coincide con un área geográfica. La presencia de un haplotipo compartido entre dos de estas especies nominales (ie. *E. roitmani* y *E. atacamensis*) (Fig. 8) también pondría en duda la validez de dichos taxa, por lo que es necesario revisar la descripción morfológica de estas especies y plantear una nueva taxonomía explorando otros caracteres diagnóstico.

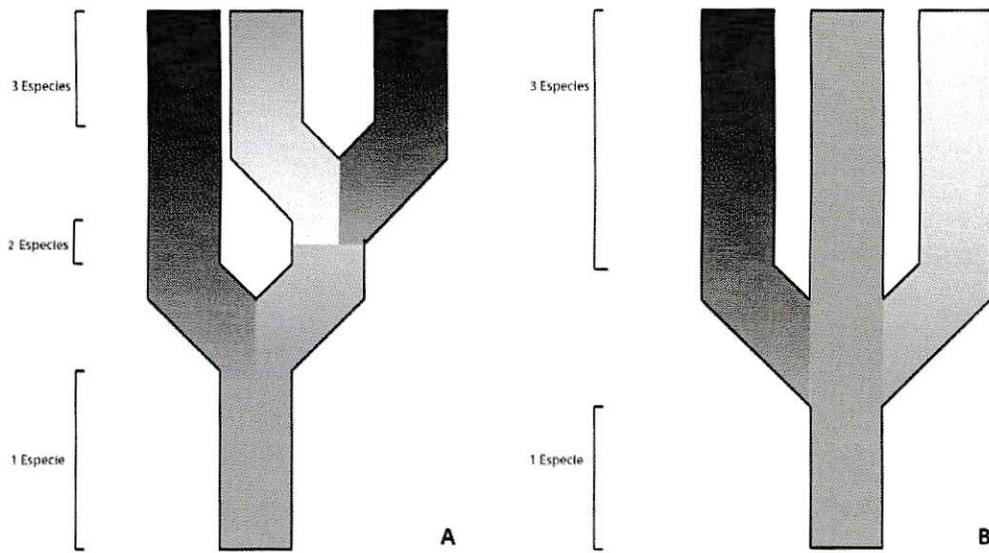
Por último quedan todas aquellas *Ectinogonia* de zonas litorales desde Huasco a Chañaral, las cuales se encuentran repartidas en la parte interna y/o externa del clado D y en la red de haplotipo están conformando un eje central. Es dentro de estas zonas litorales que la información genética discrepa más con la taxonomía del grupo (Fig. 5), ya que en la parte terminal del clado D se agrupan cuatro especies nominales (*E. atacamensis*, *E. darwini*, *E. fastidiosa*, y *E. roitmani*) de las cuales *E. atacamensis*, *E. fastidiosa*, y *E. roitmani* comparten la misma secuencia, haciendo necesario revisar la validez de estas especies nominales. Adicionalmente, especímenes de las especies *E. atacamensis* y *E. roitmani* aparecen en el subclado **z**, podrían dar cuenta de convergencia evolutiva al habitar ambientes similares (Davalos et al. 2012) o que aún no se han expresado diferencias morfológicas después del corte de flujo genético entre estos grupos hermanos. Por otra parte, las *E. pusilla* que fueron muestreadas desde Caldera hasta Huasco y se ubican en la zona interna del clado D, estarían emparentadas o serían los remanentes del grupo que dio origen a las *E. chalyboeiventris*, *E. carrascoi* y el resto del clado D, ya que en las

relaciones más internas de estos subclados hay linajes de *E. pusilla* que conforman parte de estos, gracias a su distribución parafilética dentro del clado D. Además, en el caso de las *Ectinogonia* litorales, no todos los linajes de esta procedencia están agrupados en el subclado extremo dentro del clado D y son grupos hermanos de otros subclados. Estos casos serían; el linaje de *E. costata* que es grupo hermano del subclado **z**, el otro linaje de *E. costata* que es grupo hermano de las *E. minor minor*, el linaje de *E. minor gutierrezii* que es grupo hermano del subclado **z** y subclado extremo y por último el linaje de *Ectinogonia sp.* que es grupo hermano de los subclados **s**, **v**, **w**, **z** y subclado extremo. En la red de haplotipos los linajes hermanos señalados, se encuentran asociados a los subclados, entre estos y el eje central de la red de haplotipos (Fig. 8A). A luz de estos patrones y asumiendo que estos linajes de *Ectinogonia* litorales son un grupo natural, los subclados **s**, **v**, **w** y **z** habrían divergido de *Ectinogonia* litorales.

Por lo tanto, sería necesario revisar en detalle la validez taxonómica de dichas especies nominales explorando nuevos caracteres diagnósticos.

En este contexto, considerando el concepto de especie filogenética, grupo definido de organismos donde todos los individuos comparten un mismo carácter derivado no presente en sus ancestros o afines (Henning 1966, Ridley 1989, Cracraf 1989), *Ectinogonia* estaría compuesto por 4 especies. Pero dentro del clado norte, las unidades que se mencionaron están aisladas tanto geográfica como genéticamente a pesar de que no cumplan con la monofilia recíproca, sean parafiléticas y no se correspondan con un modelo dicotómico. Por ejemplo, el caso del linaje de *E. costata* del Litoral de Atacama que está en el mismo subclado de *Ectinogonia* de las Cordilleras del Elqui y Santiago, la filogenia los agrupa

(Fig. 5) aunque *E. costa* es un linaje que claramente diverge de las *Ectinogonia* de cordilleras (Fig. 8A y 8B), indicando la separación del grupo cordillerano desde el haplotipo costero más cercano genéticamente. Lo mismo ocurre con las *E. chalyboeiventris* y *E. carrascoi*, que la filogenia las agrupa con algunos linajes de *E. pusilla*, también del Litoral de Atacama. Las herramientas filogenéticas funcionan bien cuando ha sucedido cladogénesis, donde se separan los dos grupos desde una población ancestral de la cual no quedan ejemplares (Fig. 10A). Pero la evidencia sugiere que el modo de especiación en este grupo no es dicotómico y todavía persistiría la población original, de la cual las unidades identificadas se desprenden y separan, especiándose en peripatría (Fig. 10B) (Losos & Glor 2003). La persistencia del grupo ancestral generaría discordancias entre la filogenia y la sistemática ya que el modelo dicotómico no considera la persistencia de la población original, confundiendo las relaciones de ancestro descendiente (Höranld 2006).



**Figura 10.** Diagramas de modelos de especiación contrastados. A: Cladogenesis dicotómica en la que desaparece la especie antecesora (modificado de De Queiroz 2007). B: Cladogenesis radiativa en la que continúa la especie antecesoral.

**Escenarios evolutivo:** La separación entre *Achardella* y *Ectinogonia* habría ocurrido hace 5.07 Ma y es coincidente con el último episodio de levantamiento de los Andes, conocido como “Fase Diaguita” (~5.3-3.6 Ma) (Garziona et al. 2006, Combina & Nullo 2011). Posteriormente, la divergencia de los tres clados del grupo sur la cual habría ocurrido durante el Plioceno (5.33-2.58 Ma), se contextualiza en una época de continuos cambios en la topología y el clima, el cual habría modificado el paisaje presionando demográficamente a las *Ectinogonia* y generando divergencias tempranas. El levantamiento de los Andes habría generado una topografía intrincada, con muchos valles y la aparición de ríos que lo convierten en un paisaje accidentado que restringe el flujo génico entre las poblaciones. Es por esto que algunos ríos y valles del centro-sur de Chile han sido descritos como barreras bio-filogeográficas, lo que ha provocado especiaciones

o estructuras poblacionales (Fuentes & Jaksic 1979, Sallaberry-Pincheira et al. 2011). Aparentemente, la evidencia da cuenta de una historia antigua y estable en las especies de *Ectinogonia* del sur durante este periodo, separando sus distintos clados en zonas geográficas definidas. Sin embargo, en el clado C, las dos especies nominales, con distribución disyunta actualmente, estaría evidenciando que en el pasado, probablemente durante las fases glaciales, ambas entidades estuvieron unida, compartiendo un rango geográfico que permitía el flujo génico. Por lo tanto, la evidencia sugiere que durante el Pleistoceno, las oscilaciones climáticas y los pulsos de cambio en el paisaje no habrían tenido un efecto notable en los eventos de especiación de las *Ectinogonia* del sur. Adicionalmente, a fines del Plioceno las *Ectinogonia* del grupo norte se habrían separado de las del sur, lo que coincide con el establecimiento de las condiciones áridas en el sector septentrional del territorio (Dunai et al. 2005).

Por otra parte, todas las divergencias del clado “norte” ocurrieron dentro del Pleistoceno, época que se caracteriza con un clima frío y cambiante (Petit et al. 1999, Pinot et al. 1999, Zachos et al. 2001, Kaplan et al. 2008, Rojas et al. 2009). La diversidad dentro de este grupo y los tiempos en los que esta diversidad se originó, sugieren que los cambios en el paisaje originados por las OCP con los pulsos pluviales y expansión del desierto, habrían sido determinante en el proceso de diversificación de las *Ectinogonia* en la zona Norte. Esto se debe a que la cladogénesis del grupo norte se habría originado hace 2.12 Ma (Fig. 6), el cual dió origen en repetidas oportunidades a las unidades diferenciadas que son más jóvenes (0.75-0.25Ma). Adicionalmente, dentro del grupo norte, se reúne una gran diversidad, tanto a nivel genético como morfológico, que podría deberse al efecto

reiterativo de las OCP. Durante las transiciones glacial-interglacial, los límites Sur y Este del desierto de Atacama se habrían contraído (Latorre et al. 2002, Maldonado et al. 2005, Moreno et al. 2007) por lo que el desierto era en parte reemplazado por vegetación de puna y matorral estepario (Villagran 2001, Moreno et al. 2007, Gayo et al. 2012, Diaz et al. 2012), mientras que durante los episodios interglaciales y máximos glaciales el desierto se extendería hasta una posición similar a la actual. Por lo tanto, la extensión y contracción de la “capa desértica” provocaría que las especies de *Ectinogonia* de la costa, se refugiaran en quebradas periféricas de altura o islas de vegetación xérica costeras, durante los periodos de máxima expansión del desierto, actuando como “refugios desérticos” (Mujica et al. 2014). Sin embargo, una vez que el desierto se retrae, podrían ocurrir dos escenarios no excluyentes entre sí: 1) algunas “especies” desde diferentes puntos, recolonizan las zonas antes desérticas, entremezclándose, lo que provoca una alta diversidad genética y morfológica, debido a las diferencias acumuladas entre “islas”. Esto podría estar visible en aquellas entidades que actualmente habitan en las zonas costera, como *E. pusilla*, *E. intermedia*, *E. costata*, *E. darwini*, *E. fastidiosa*, *E. roitmani*, *E. minor gutierrezii*, *E. atacamensis*. Mientras que el otro escenario 2), algunas especies podrían quedar separadas en aislados periféricos, lo que conllevaría a la diferenciación genética y eventual especiación de estas poblaciones, como lo que ocurriría con las especies nominales *E. angulicollis*, *E. pulverea*, *E. pretiosa*, *E. minor minor*, *E. speciosa speciosa*, *E. carrascoi*, *E. chalyboeiventris* y *E. intermedia*. Justamente, estas unidades se han diferenciado y se ubican en zonas discretas y periféricas como las del extremo norte (Putre, Tarapacá y San Pedro de Atacama), altas cordillera (Cordillera de Elqui y de Santiago) y en menor medida

las de la depresión intermedia (Domeyko y La Higuera) y el litoral (Punta Choros y Los Vilos).

### **Conclusiones**

**Sistemática:** Como se ha sugerido en repetidas ocasiones en este trabajo, es necesario revisar en detalle la sistemática del género *Ectinogonia* debido a las discrepancias que hay con la taxonomía. Sin embargo, la evidencia de este trabajo sugiere que la diversidad de *Ectinogonia* ha sido sobreestimada, aun cuando el escenario sistemático es complejo. Según la evidencia aquí recopilada, *E. buqueti* estaría compuesta por dos especies distintas, mientras que *E. isamarae* y *E. speciosa oscuripennis* serían la misma especies. Entre las *Ectinogonia* del norte se han identificado especies nominales que son unidades evolutivas independientes (*E. carrascoi*, *E. chalyboeiventris*, *E. speciosa speciosa*, *E. minor minor*, *E. pretiosa*, *E. angulicollis* y *E. pulverea*). También se recalca la importancia de revisar la validez de las especies nominales contenidas en las *Ectinogonia* litorales, ya que la morfología y geografía no dan cuenta de la estructura genética de estos grupos y por lo tanto, no concordarían con la propuesta taxonómica.

En términos prácticos este trabajo sugiere; mantener las especies *E. buqueti*, *E. isamarae*, *E. intermedia*, *E. carrascoi*, *E. chalyboeiventris*, *E. speciosa*, *E. minor*, *E. pretiosa*, *E. pulverea* y *E. angulicollis*; describir como especie nueva la *E. buqueti* del Ñuble; finalmente, considerando la evidencia molecular presentada, es necesario revisar la validez de las especies *E. pusilla*, *E. costata*, *E. minor gutierrezii*, *E. atacamensis*, *E. roitmani*, *E. darwini* y *E. fastidiosa*.

**Escenario sugerido:** En función de la evidencia expuesta en este trabajo la hipótesis propuesta se cumple parcialmente, ya que se propone la separación entre *Ectinogonia* y *Achardella* por un evento de vicarianza debido al alzamiento andino. Posteriormente durante el Plioceno se habrían originado los cuatro clados de *Ectinogonia* (3.8-2.94Ma) debido a los cambios en la topología y de la vegetación producto de un constante cambio climático. Estos procesos dan cuenta de la historia temprana del género. Sin embargo, es durante el Pleistoceno que se habría originado toda la diversidad de *Ectinogonia* del norte debido a numerosos eventos de divergencia durante las OCP que habrían causado repetidos cambios en el paisaje durante los pulsos pluviales, contrayendo y expandiendo el rango de distribución de las *Ectinogonia* ancestrales del litoral. Durante estas sucesivas expansiones y contracciones del rango de distribución se originaron simultáneamente nuevas unidades evolutivas que habitaban en la periferia de la población original, las que habrían especiado por peripatría generando la mayoría de las especies descritas para el sector norte y centro del país. Los reiterados avances y retrocesos del desierto ligado a los ciclos glaciales, parecen haber incidido sobre la diversificación de este grupo en ambientes áridos y semiáridos, siendo uno de los principales motores en su conspicua especiación.

Finalmente, este trabajo es un aporte explícito para el entendimiento de los patrones de especiación y diversificación en taxa de ambientes áridos y semiáridos, donde existe poco conocimiento de cómo podría haber acontecido la diversificación de un grupo altamente diverso. En el caso de *Ectinogonia* fue clave las sucesiones de la vegetación desértica generadas por los constantes cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno, que

originó un grupo morfológica y genéticamente muy diverso que continua diferenciandose hoy en día.

## **Bibliografía**

- Bandelt, H., Forster, P., & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1), 37–48.
- Barraclough, T. G., & Vogler, A. P. (2002). Recent diversification rates in North American tiger beetles estimated from a dated mtDNA phylogenetic tree. *Molecular Biology and Evolution*, 19(10), 1706-1716.
- Bellamy, C. L. (2006). The Systematic Position of Certain South American Buprestid Genera (Coleoptera: Buprestidae). *The Coleopterists Bulletin*, 60(2), 192-196.
- Bennett, K. D., & Provan, J. (2008). What do we mean by ‘refugia’?. *Quaternary Science Reviews*, 27(27), 2449-2455.
- Clapperton, C. M. (1994). The quaternary glaciation of Chile: a review. *Revista Chilena de Historia Natural*, 67(4), 369-383.
- COBOS, A. 1954a. Revisión de las *Ectinogonia* Spinola sensu strictus Coleoptera, Buprestidae. *Revista Chilena de Entomología*. 3(1953):41-68..
- Cobos, A. (1972). Notas sobre Buprestidos neotropicales, XVIII. *Entomologische Arbeiten aus dem Museum G. Frey*, 23, 331-353.
- Cognato, A. I., & Vogler, A. P. (2001). Exploring data interaction and nucleotide alignment in a multiple gene analysis of *Ips* (Coleoptera: Scolytinae). *Systematic Biology*, 50(6), 758-780.
- Combina, A. M., & Nullo, F. (2011). Ciclos tectónicos, volcánicos y sedimentarios del Cenozoico del sur de Mendoza-Argentina (35-37 S y 69 30'W). *Andean geology*, 38(1), 198-218.
- Cracraft, J. (1989). Species as entities of biological theory. In *What the philosophy of biology is* (pp. 31-52). Springer Netherlands.

- Darriba D., Taboada GL., Doallo R. & Posada D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8), 772.
- Dávalos, L. M., Cirranello, A. L., Geisler, J. H., & Simmons, N. B. (2012). Understanding phylogenetic incongruence: lessons from phyllostomid bats. *Biological Reviews*, 87(4), 991-1024.
- Denton, G. H., Lowell, T. V., Heusser, C. J., Schlüchter, C., Andersen, B. G., Heusser, L. E., ... & Marchant, D. R. (1999). Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of llanquihuedrift in the area of the southern lake district, seno reloncaví, and isla grande de chiloé, chile. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography*, 81(2), 167-229.
- De Queiroz, K. (2007). Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), 879-886.
- Díaz, F. P., Latorre, C., Maldonado, A., Quade, J., & Betancourt, J. L. (2012). Rodent middens reveal episodic, long-distance plant colonizations across the hyperarid Atacama Desert over the last 34,000 years. *Journal of biogeography*, 39(3), 510-525.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D & Rambaut A (2012) Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology And Evolution* 29: 1969-1973
- Dunai, T. J., López, G. A. G., & Juez-Larré, J. (2005). Oligocene–Miocene age of aridity in the Atacama Desert revealed by exposure dating of erosion-sensitive landforms. *Geology*, 33(4), 321-324.
- Farrell, B. D. (2001). Evolutionary Assembly of the Milkweed Fauna: Cytochrome Oxidase I and the Age of Tetraopes Beetles. *Molecular phylogenetics and evolution*, 18(3), 467-478.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

- Filatov D.A. (2002). ProSeq: A software for preparation and evolutionary analysis of DNA sequence data sets. *Molecular Ecology Notes* 2, 621-624.
- Fuentes, E.R., Jaksic, F.M. (1979). Lizards and rodents: and explanation of their relative species diversity in Chile. (Lagartijas y roedores: una explicación para si diversidad relativa en Chile). *Arch. Biol. Med. Exper*, 72, 179-190.
- Garziona, C. N., Molnar, P., Libarkin, J. C., & MacFadden, B. J. (2006). Rapid late Miocene rise of the Bolivian Altiplano: Evidence for removal of mantle lithosphere. *Earth and Planetary Science Letters*, 241(3), 543-556.
- Gayo, E. M., Latorre, C., Jordan, T. E., Nester, P. L., Estay, S. A., Ojeda, K. F., & Santoro, C. M. (2012). Late Quaternary hydrological and ecological changes in the hyperarid core of the northern Atacama Desert (~ 21 S). *Earth-Science Reviews*, 113(3), 120-140.
- Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98
- Hennig, W. 1966. *Phylogenetic systematics*. University of Illinois Press, Urbana.
- Hewitt, G. (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, 405(6789), 907-913.
- Hinojosa, L. F., & Villagrán, C. (1997). Historia de los bosques del sur de Sudamérica, I: antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural*, 70(2), 225-240.
- Hinojosa, L. F. (2005). Cambios climáticos y vegetacionales inferidos a partir de paleofloras cenozoicas del sur de Sudamérica. *Revista geológica de Chile*, 32(1), 95-115.
- Heusser, C. J. (1990). Late-glacial and Holocene vegetation and climate of subantarctic South America. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 65(1-4), 9-15.
- Holderegger, R., & Thiel-Egenter, C. (2009). A discussion of different types of glacial refugia used in mountain biogeography and phylogeography. *Journal of Biogeography*, 36(3), 476-480.

- Holyński, R. (1999). Taxonomical, zoogeographical and phylogenetical relations among Indo-Pacific Psiloptera DEJ., Dicercomorpha DEYR., and related genera (Coleoptera: Buprestidae).
- Hörandl, E. (2006). Paraphyletic versus monophyletic taxa-evolutionary versus cladistic classifications. *Taxon*, 55(3), 564-570.
- Huelsenbeck, J. & F. Ronquist. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. *Bioinformatics*. 17:754-755
- Jowett T. 1986. Preparation of nucleic acids. In: Roberts DB, ed. *Drosophila: a practical approach*. Oxford: IRL Press, 275–286.
- Kajtoch, Ł., Kubisz, D., Gutowski, J. M., & Babik, W. (2014). Evolutionary units of *Coraebus elatus* (Coleoptera: Buprestidae) in central and eastern Europe—implications for origin and conservation. *Insect conservation and diversity*, 7(1), 41-54.
- Kaplan, M. R., Moreno, P. I., & Rojas, M. (2008). Glacial dynamics in southernmost South America during Marine Isotope Stage 5e to the Younger Dryas chron: a brief review with a focus on cosmogenic nuclide measurements. *Journal of Quaternary Science*, 23(6-7), 649-658.
- KERREMANS, C. (1903). Genera Insectorum, publies par P. Wytsman. *Briissel, Fasc*, 12, 1-338.
- Knowles, L. L. (2000). Tests of Pleistocene speciation in montane grasshoppers (genus *Melanoplus*) from the sky islands of western North America. *Evolution*, 54(4), 1337-1348.
- Knowles, L. L. (2001). Did the Pleistocene glaciations promote divergence? Tests of explicit refugial models in montane grasshoppers. *Molecular Ecology*, 10(3), 691-701.
- Latorre, C., Betancourt, J. L., Rylander, K. A., & Quade, J. (2002). Vegetation invasions into absolute desert: A 45; th000 yr rodent midden record from the Calama–Salar de Atacama basins, northern Chile (lat 22°–24° S). *Geological Society of America Bulletin*, 114(3), 349-366.

- Losos, J. B., & Glor, R. E. (2003). Phylogenetic comparative methods and the geography of speciation. *Trends in Ecology & Evolution*, 18(5), 220-227.
- Maldonado, A., Betancourt, J. L., Latorre, C., & Villagran, C. (2005). Pollen analyses from a 50 000-yr rodent midden series in the southern Atacama Desert (25° 30' S). *Journal of Quaternary Science*, 20(5), 493-507.
- Mathiasen, P., & Premoli, A. C. (2010). Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology*, 19(2), 371-385.
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010, November). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In *Gateway Computing Environments Workshop (GCE), 2010* (pp. 1-8). Ieee.
- Moore, T. O. M. A. S. (1994). Revision del genero *Ectinogonia* Spinola para Chile (Coleoptera, Buprestidae). *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción (Chile)*, 65, 153-166.
- Moore, T., & Vidal, P. (2015) Los Bupréstidos de Chile. EDICIONES UNIVERSIDAD CATOLICA DE CHILE. Santiago. Chile
- MORENO, G. V., MALDONADO, A., RODRIGO VILLA-MARTÍNEZ, J. J., ARMESTO, C. V., & PINO, M. (2007). 12 Late Quaternary environments and palaeoclimate.
- Mujica, M. I., Latorre, C., Maldonado, A., González-Silvestre, L., Pinto, R., Pol-Holz, R., & Santoro, C. M. (2015). Late Quaternary climate change, relict populations and present-day refugia in the northern Atacama Desert: a case study from Quebrada La Higuera (18° S). *Journal of Biogeography*, 42(1), 76-88.
- Olave, E. (1935). Revisión de los Bupréstidos chilenos. *Rev. Chilena Hist. Nat.*, 39, 349-376.

Ossa, C. (2013). ESTRUCTURACION GENÉTICA, ESPECIALIZACIÓN Y AJUSTES RECÍPROCOS ASOCIADOS EN EL HOLOPARASITO *TRISTERIX APHYLLUS*. Tesis Doctoral, Chile, Universidad de Chile.

Ossa, P. G., Pérez, F., & Armesto, J. J. (2013). Phylogeography of two closely related species of *Nolana* from the coastal Atacama Desert of Chile: post-glacial population expansions in response to climate fluctuations. *Journal of Biogeography*, 40(11), 2191-2203.

Papadopoulou, A., Anastasiou, I., & Vogler, A. P. (2010). Revisiting the insect mitochondrial molecular clock: the mid-Aegean trench calibration. *Molecular Biology and Evolution*, 27(7), 1659-1672.

Petit, J. R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N. I., Barnola, J. M., Basile, I., ... & Delmotte, M. (1999). Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, 399(6735), 429-436.

Pinot, S., Ramstein, G., Harrison, S. P., Prentice, I. C., Guiot, J., Stute, M., & Joussaume, S. (1999). Tropical paleoclimates at the Last Glacial Maximum: comparison of Paleoclimate Modeling Intercomparison Project (PMIP) simulations and paleodata. *Climate Dynamics*, 15(11), 857-874.

Premoli, A. C., Souto, C. P., Rovere, A. E., Allnut, T. R., & Newton, A. C. (2002). Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. *Diversity and Distributions*, 8(2), 57-66.

Premoli, A. C., Mathiasen, P., & Kitzberger, T. (2010). Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54 S) glacial refugia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 298(3), 247-256.

Quiroga, M. P., & Premoli, A. C. (2010). Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 285(3), 186-193.

Rambaut, A. (2014). FigTree 1.4. 2 software. Institute of Evolutionary Biology, Univ. Edinburgh.

- Rannala, B., & Yang, Z. (1996). Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of molecular evolution*, 43(3), 304-311.
- Ridley, M. (1989). The cladistic solution to the species problem. *Biology and Philosophy*, 4(1), 1-16.
- Rojas, M., Moreno, P., Kageyama, M., Crucifix, M., Hewitt, C., Abe-Ouchi, A., ... & Hope, P. (2009). The Southern Westerlies during the last glacial maximum in PMIP2 simulations. *Climate Dynamics*, 32(4), 525-548.
- Rull, V. (2009). Microrefugia. *Journal of Biogeography*, 36(3), 481-484.
- Sallaberry-Pincheira, N., Garin, C. F., González-Acuña, D., Sallaberry, M. A., & Vianna, J. A. (2011). Genetic divergence of Chilean long-tailed snake (*Philodryas chamissonis*) across latitudes: conservation threats for different lineages. *Diversity and Distributions*, 17(1), 152-162.
- Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H., & Flook, P. (1994). Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the entomological Society of America*, 87(6), 651-701.
- Solier (1849) *Historia física y política de Chile*. Gay tomo IV, p 500.
- Stewart, J. R., Lister, A. M., Barnes, I., & Dalén, L. (2010). Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 277(1682), 661-671.
- Swofford, D. 2002. PAUP. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts
- Thompson J.D., D.G. Higgins & T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.

- Turchetto-Zolet, A. C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., & Palma-Silva, C. (2013). Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22(5), 1193-1213.
- Villagrán, C., & Arroyo, M. T. K. (1983). Efectos de la desertización en la distribución de la flora andina de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, 56, 137-157.
- Villagran, C. (1990). Glacial climates and their effects on the history of the vegetation of Chile: a synthesis based on palynological evidence from Isla de Chiloé. *Review of Palaeobotany and Palynology*, 65(1-4), 17-24.
- Villagran, C. (2001). Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista chilena de historia natural*, 74(4), 793-803.
- Vuilleumier, B. S. (1971). Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science*, 173(3999), 771-780.
- Zachos, J., Pagani, M., Sloan, L., Thomas, E., & Billups, K. (2001). Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to present. *Science*, 292(5517), 686-693.
- Zuñiga-Reinoso, A. (2016). *LA DIVERSIFICACIÓN DEL GÉNERO CALLYNTRA (COLEOPTERA: TENEBRIONIDAE) DURANTE LAS OSCILACIONES CLIMÁTICAS DEL PLEISTOCENO EN CHILE CENTRAL*. Tesis Doctoral, Chile, Universidad de Chile.