

UCH-FC
MAG-EBE
8454
C.1

**FILOGEOGRAFÍA DE *EUCRYPHIA CORDIFOLIA*:
HISTORIA GLACIAL Y DIVERSIDAD GENÉTICA
EN LOS BOSQUES TEMPLADO LLUVIOSOS DEL
SUR DE SUDAMÉRICA**

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

Ricardo Andrés Segovia Cortés

Enero, 2010

Director de Tesis:
Dr. Luis Felipe Hinojosa Opazo

Co-Director de Tesis:
Dra. María Fernanda Pérez

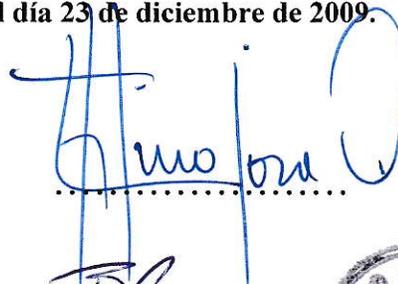
FACULTAD DE CIENCIAS
UNIVERSIDAD DE CHILE
INFORME DE APROBACION
TESIS DE MAGÍSTER

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magíster presentada por el candidato

Ricardo Andrés Segovia Cortés

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Ecología y Biología Evolutiva, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 23 de diciembre de 2009.

Director de Tesis:
Dr. Luis Felipe Hinojosa



Co-Director de Tesis
Dra. María Fernanda Pérez



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Elie Poulin

Dr. Patricio I. Moreno



***... Bajo los volcanes, junto a los ventisqueros, entre los grandes lagos, el
fragante, el silencioso, el enmarañado bosque chileno...***

Pablo Neruda
El bosque chileno
De Confieso que he vivido. Memorias (1974)

AGRADECIMIENTOS



A mi madre, Rosana Cortés Gajardo; a mi padre, Ricardo Segovia Quevedo y a mis hermanos, Diego y Pablo, por haberme formado y enseñado a vivir.

A mi compañera, Lucía Castillo, por ser todos mis sueños y toda la belleza en mi vida.

A mi tutor, Dr. Luis Felipe Hinojosa, por guiarme en estos, mis primeros pasos en la ciencia. Además, por hacerme sentir un respaldo mucho mayor al meramente formal.

A mi cotutora, Dra. Fernanda Pérez, por la dedicación y la claridad aportada a mi trabajo.

A mi comisión de tesis, Dr. Elie Poulin y Dr. Patricio Moreno, por sus siempre asertivos comentarios.

Al Instituto de Ecología y Biodiversidad (IEB) y a CONICYT por el respaldo económico de investigación y manutención.

ÍNDICE DE MATERIAS



Lista de Tablas	<i>vi</i>
Lista de Figuras	<i>vii</i>
Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
Modelo de estudio	9
Materiales y Métodos	14
Muestreo	14
Extracción, amplificación y secuenciación de ADN	15
Análisis de datos	16
Resultados	19
Diversidad genética y relación entre haplotipos	22
Distribución espacial de la diferenciación genética	24
Paisaje genético	25
Discusión	29
Conclusiones	37
Direcciones futuras	39
Bibliografía	41
Anexo 1	<i>viii</i>
Anexo 2	<i>x</i>
Anexo 3	<i>xi</i>

LISTA DE TABLAS

Tabla 1 Nombre del sitio, ubicación y tamaño de la muestra para todas las localidades de *Eucryphia cordifolia* estudiadas. En la columna de nombre de localidad se indica entre paréntesis la región administrativa a la que pertenece cada sitio.

Tabla 2 Distribución de sitios polimórficos en fragmentos de trnV-ndhC de *Eucryphia cordifolia*. La posición del nucleótido en el alineamiento es mostrada arriba. Las deleciones están indicadas por el signo (-).

Tabla 3 Índices de diversidad estándar calculados para cada localidad y para el total de las localidades muestreadas. Además, se incluye la unidad geográfica a la que pertenece cada grupo.

Tabla 4 Parámetros de diversidad y diferenciación genética, tomando en cuenta sólo frecuencias (hS , hT , Gst) y diferencias entre haplotipos (vS , vT , Nst). Entre paréntesis se indica error estándar.

Tabla 5 Análisis de Varianza Molecular de los grupos propuestos por SAMOVA para 22 localidades de *Eucryphia cordifolia*. Todos los valores de F son significativos, $P < 0.05$ (1023 permutaciones aleatorias de secuencias entre poblaciones)

Tabla 6 Parámetros de diversidad para 5 grupos de *Eucryphia cordifolia* con relación geográfica. Número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π), número de diferencias promedio entre pares de secuencias (Π).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Se muestra el rango de distribución geográfica de *Eucryphia cordifolia* en Chile con el área achurada. La línea punteada muestra la extensión estimada de los glaciares durante el Último Máximo Glacial, de acuerdo a Holling & Schilling (1981).

Figure 2 Características morfológicas de *Eucryphia cordifolia*. a) árbol adulto b) flor c) fruto inmaduro d) fruto maduro e) semilla.

Figura 3 Distribución geográfica y frecuencias de haplotipos de ADNcp de *Eucryphia cordifolia*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos analizados en cada población; el color representa a cada haplotipo.

Figura 4 Reconstrucción filogenética, con criterio de parsimonia, de la relación entre haplotipos de trnV-ndhC (ADNcp) en *Eucryphia cordifolia*. Cada círculo representa a un haplotipo. Las líneas representan un paso mutacional. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. El número entre paréntesis indica el número de individuos por haplotipo.

Figure 5 Paisaje genético de *Eucryphia cordifolia*. El paisaje está estandarizado con una grilla de 50X50 celdas, a través del rango geográfico que abarca todas las localidades colectadas. Los picos y depresiones de la superficie indican la magnitud de la distancia genética.

Figura 6. Gráfico de F_{st} pareados contra distancia geográfica (Kilómetros). El coeficiente de correlación de Mantel (Z) y el coeficiente de correlación son no significativos ($p > 0.05$).

RESUMEN

Las características estructurales y el patrón de distribución actual de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica se encuentran vinculados a las contracciones de área durante las glaciaciones del Pleistoceno. El área de permanencia poblacional durante las glaciaciones Cuaternarias es conocida como “Refugio Glacial”. La ubicación y cualidades de los refugios glaciales es una pregunta abierta para la biogeografía cuaternaria de Sudamérica. En este trabajo, mediante una aproximación filogeográfica, se ponen a prueba dos escenarios que dan cuenta de la contracción y expansión de especies durante el Cuaternario: hipótesis de múltiples refugios vs. refugio único. Para ello se estudiaron 150 individuos de 22 localidades que cubren el rango de distribución completa en Chile de *Eucryphia cordifolia*, componente termófilo de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica.

El análisis genético permitió identificar 9 haplotipos. Los resultados muestran ausencia de estructuración filogeográfica y un patrón de concentración de haplotipos en latitudes centrales del rango de *E. cordifolia*, localizados en zonas aledañas a la costa. Se sugiere que Cordillera Pelada corresponde a la zona de refugio glacial para las poblaciones de *E. cordifolia*. Además, la disminución de haplotipos y distancias genéticas hacia los extremos de su rango confirma los desplazamientos de los límites actuales de su rango. Dadas las características de la tolerancia ecológica de *E. cordifolia*, se sugiere que sufrió contracciones en sentido sur-norte durante la última glaciación, y contracciones en sentido norte-sur, probablemente, a inicios del Holoceno.

ABSTRACT

Structural features and current distribution pattern of Temperate Rainforest of southern South America are linked to area contractions during Pleistocene glaciations. The population permanence area during Quaternary glaciations is known as "Glacial Refuge". The location and features of glacial refuges is an open question in the Quaternary biogeography of South America. In this work, through a phylogeographic approach, two settings are tested, giving account of the contraction and expansion of species during Quaternary: multiple refuges v/s single refuge hypothesis. 150 individuals of 22 locations were studied, covering the complete distribution range in Chile for *Eucryphia cordifolia*, thermophilous component of the Temperate Rainforest of southern South America.

The genetic analysis identified 9 haplotypes. The results show absence of phylogeographic structuring and a haplotype concentration pattern in central latitudes for the range of *E. cordifolia*, localized in coastal areas. It is suggested that Cordillera Pelada is the glacial refuge area for *E. cordifolia*. Besides, the decrease of haplotypes and genetic distances to the edges of the range confirms the displacements of the current range limits. Due to the features of ecological tolerance of *E. cordifolia*, it is suggested that it suffered south-north contractions during last glacial phase, and probably north-south contractions during Early Holocene.

INTRODUCCIÓN

La actual distribución geográfica, demografía y estructura genética de las especies de plantas y animales puede considerarse como un legado de los ciclos glaciales/interglaciales ocurridos durante el Cuaternario (últimos 2.6 millones de años, ICS, 2009) (Hewitt, 1996; Avise *et al.*, 1998). El efecto de estos ciclos glaciales sobre los rangos de distribución de las especies varía con la latitud y la topografía. En general, durante las fases frías las latitudes altas fueron cubiertas por glaciares o *permafrost*, y las especies asociadas a zonas templadas y tropicales se desplazaron hacia latitudes ecuatoriales (Hewitt, 2004). A su vez, el incremento de la aridez en zonas ecuatoriales produjo una reducción de los rangos de distribución de los bosques tropicales y expansión de los desiertos (Hewitt, 2004). Además, existe evidencia de descensos del límite arbóreo en montañas de zonas tropicales y subtropicales entre 1000-1700 m (Rind & Peteet, 1985; Flenley, 1998). Los procesos de enfriamiento fueron acompañados por: incrementos en el volumen de hielo; disminución en el nivel del mar (por ejemplo, durante la etapa isotópica marina 2 se habría registrado un descenso de 120 m con respecto al presente (Rohling *et al.*, 1998)); descenso en las temperaturas superficiales del mar (Otto-Bliesner *et al.*, 2006) y disminución en el dióxido de carbono atmosférico (Raynaud *et al.*, 1993; Petit *et al.*, 1999). En Sudamérica es importante también la influencia de los vientos del oeste y sus anomalías de intensidad y posición latitudinal asociadas a las

glaciaciones. Durante los periodos glaciales la intensificación de los vientos del oeste habría contribuido a incrementar las precipitaciones en latitudes medias de Sudamérica (Moreno *et al.*, 1999).

Las latitudes medias de Sudamérica constituyen una región clave para abordar preguntas acerca del cambio climático en el hemisferio sur (Moreno, 2002). Esta región es particularmente sensible a la influencia de los vientos del oeste, y es una de las pocas masas de tierra que mantienen campos de hielo, glaciares de alta montaña y comunidades de bosque lluvioso, en un gradiente tanto latitudinal como altitudinal, dentro de la zona de influencia del cinturón de los vientos del sur (Moreno, 2002). En la vertiente oeste de la Cordillera de Los Andes, entre 40°S y 43°S aproximadamente, el Último Máximo Glacial (UMG) o Etapa Isotópica Marina 2 (MIS 2) está fechado entre 28.000 y 16.000 años calendario AP (Denton *et al.*, 1999; Kaplan *et al.*, 2008). Este periodo está caracterizado por condiciones frías y húmedas: las temperaturas medias de verano fueron entre 6 y 8° C más bajas que la media moderna (Heusser *et al.*, 1999) y las precipitaciones aproximadamente el doble que en la actualidad (Moreno, 1997; Moreno *et al.*, 1999; Moreno & León, 2003). Durante este periodo, las laderas orientales y occidentales de la Cordillera de Los Andes, grandes áreas de la Depresión Intermedia y la mitad sur de la Isla grande de Chiloé fueron cubiertas por lóbulos glaciales piedemonte (Mercer, 1976; Heusser & Flint, 1977) (Fig. 1). Además, la solifluxión y la actividad glaciofluvial extendieron la influencia de los glaciares hacia el norte, hasta aproximadamente los 40° S (Veit, 1994; Veit & Garleff, 1995).

En el cono sur de Sudamérica la influencia glacial tuvo impactos importantes sobre la biota asociada (Villagrán & Hinojosa, 1997). En la actualidad, en esta zona

se distribuyen los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica (Armesto *et al.*, 1995). Esta región se caracteriza, en general, por presentar temperaturas moderadas, debido a la influencia oceánica, y por presentar precipitaciones de invierno y verano, proporcionadas por los frentes de lluvias originados en el cinturón de vientos del oeste (Armesto *et al.*, 1995). La topografía es dominada por dos cordones montañosos: La Cordillera de la Costa y la Cordillera de Los Andes. Estos cordones ejercen un efecto de biombo climático que concentra las precipitaciones en sus vertientes occidentales. En la actualidad el clima en el ámbito del Bosque Templado-Lluvioso se caracteriza por un fuerte gradiente climático norte-sur, considerando: temperatura, con una disminución de la media anual que va desde 12°C a los 36°S hasta 5°C a los 55°S; precipitaciones, con un incremento gradual desde 1.500 mm a los 39°S hasta más de 4.500 mm a los 47°S.; y estacionalidad en las lluvias dentro de todo el rango de los bosques templados, pero más pronunciada en zonas costeras (zona estacional entre 36-42°S, y no-estacional entre 42-55°S) (Armesto *et al.*, 1995). La misma magnitud de cambios en temperatura y precipitaciones se observa en el gradiente topográfico (altitudinalmente o entre cordilleras y valles). Este gradiente conduce a una zonación de las comunidades de bosque tanto en una dimensión latitudinal como altitudinal, donde se reconocen tres tipos de comunidades forestales siempreverdes: Bosque Valdiviano, Bosque Nordpatagónico y Bosque Subantártico (Schmithüsen, 1956).

Las características estructurales y el patrón de distribución de los bosques del sur de Sudamérica se encuentran estrechamente vinculados a las contracciones y expansiones que experimentó el área forestal durante las repetidas glaciaciones del Pleistoceno (Villagrán & Hinojosa, 1997). Se estima que dos tercios del área forestal

actual del sur de Sudamérica fueron cubiertos por glaciares durante UMG. Su efecto produjo una severa reducción en el rango de distribución y abundancia de la biota de esta región, concentrando y limitando su distribución hacia afuera de la zona afectada por glaciares (Villagrán & Hinojosa, 1997). A partir de los 14.700 ¹⁴C (Denton *et al.*, 1999) tras el colapso de los hielos durante la deglaciación, habría comenzado la expansión de las especies forestales (Villagrán & Hinojosa, 1997). A aquellas áreas donde se habría concentrado la biota, producto de estos procesos de reducción en distribución y abundancias asociados a periodos glaciales, y desde donde se habría iniciado su posterior re-expansión durante los interglaciales, se les conoce como “Refugios Glaciales”. Debido a la ausencia de evidencia empírica directa en el sur de Sudamérica, el número y ubicación de estos refugios glaciales aún genera discusión e incertezas. Elucubraciones en torno a este problema se han basado principalmente en resultados de estudios fitogeográficos, palinológicos y genéticos.

La evidencia fitogeográfica, sobre la base del patrón de concentración de especies forestales, sugiere como posible ubicación de la zona de refugio glacial las partes medias y bajas de la Cordillera de la Costa entre 36° S y 40° S (Villagrán & Hinojosa, 1997; Villagrán *et al.*, 1998; Villagrán & Hinojosa, 2005). Esta hipótesis se sostiene en la concentración, de entre un 66 y 77%, de las especies leñosas de los bosques de Chile y en la restricción de varios taxa monotípicos y endémicos a esta región (Villagrán & Hinojosa, 1997; Villagrán *et al.*, 1998). No obstante, también se ha discutido este patrón de concentración como el efecto combinado entre procesos históricos y características ecológicas relacionadas a productividad (Samaniego & Marquet, 2009). La covariación taxonómica de gran escala sobre este patrón de concentración, observado tanto en especies forestales (árboles, arbustos y

enredaderas), como en mamíferos y mariposas, sostiene la preponderancia de los procesos históricos por sobre los ecológicos (Villagrán & Hinojosa, 1997; Samaniego & Marquet, 2009).

Los modelos fitogeográficos propuestos por Villagrán (1991, 2001), sobre la base de evidencia palinológica, postulan la permanencia de taxa en la Cordillera de la Costa y zonas litorales, entre el norte de la Isla Grande de Chiloé y la Cordillera de Nahuelbuta durante las glaciaciones. Esta hipótesis se basa principalmente en la ausencia de polen asignable a componentes claves de estos bosques en depósitos de Isla Grande de Chiloé, Depresión Intermedia y Cordillera de Los Andes durante las fases frías.

Finalmente, la evidencia genética reciente contrasta con la hipótesis de refugio costero único. Se ha postulado que, además de la zona de refugio costero, habrían permanecido pequeñas áreas libres de hielo dentro de los límites propuestos para los glaciares durante los periodos glaciales (Fig. 1). Se sugiere que estas áreas albergaron a las especies forestales y que desde estas múltiples localidades, microclimáticamente favorables, comenzaron su expansión (Markgraf *et al.*, 1995; Marchelli *et al.*, 1998). Los patrones de distribución geográfica de la diferenciación genética de las coníferas *Fitzroya cupressoides* (Allnutt *et al.*, 1999; Premoli *et al.*, 2000; Premoli *et al.*, 2003); *Pilgerodendron uveriferum* (Premoli *et al.*, 2001; Premoli *et al.*, 2002; Allnutt *et al.*, 2003); *Araucaria araucana* (Bekessy *et al.*, 2002) y las angiospermas *Nothofagus nitida* (Premoli, 1997) y *Nothofagus alpina* (Marchelli *et al.*, 1998) son compatibles con esta hipótesis. Por ejemplo, con datos de isoenzimas se ha propuesto que las poblaciones modernas de *Fitzroya cupressoides* son derivadas desde refugios glaciales localizados principalmente en áreas costeras

del centro-sur de Chile (Premoli *et al.*, 2000), tal como lo ha sugerido Villagrán (1991); pero también desde áreas bajas del Valle Central (Premoli *et al.*, 2003), y algunas áreas ubicadas en la ladera Este de la Cordillera de Los Andes, cerca de los 42°S (Premoli *et al.*, 2000). También se ha propuesto, sobre la base de evidencia genética, la existencia de refugios glaciales localizados hacia el extremo austral del rango de distribución de algunas especies, por ejemplo para *Nothofagus pumilio* en Tierra del Fuego en 54° S (Premoli, 2004), y para *P. uveriferum* en Puerto Aysén en 45° S (Premoli *et al.*, 2002). Es importante destacar que estas especies son frío-tolerantes y pertenecen al componente Nordpatagónico y Subantártico (Villagrán, 1985). Por otro lado, estudios genéticos (RAPDs) en *Aextoxicon punctatum*, una especie termófila del Bosque Valdiviano, muestran un patrón coherente con la idea de refugio único, sugiriendo una expansión poblacional desde zonas costeras hacia el Valle Central y Cordillera de Los Andes, y desde el norte hacia el sur (Núñez-Ávila & Armesto, 2006).

La evidente contradicción entre ambas hipótesis de refugios glaciales hace necesario ampliar nuestro conocimiento acerca de la historia biogeográfica de los taxa de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica. Dilucidar las respuestas migratorias de las especies forestales, particularmente de aquellas que componen el elemento más termófilo de la asociación, será clave para comprender las respuestas de la biota a los procesos glaciales ocurridos durante el Cuaternario, en particular durante y después del Último Máximo Glacial (UMG, centrado aproximadamente en 21.000 años calendario AP).

Considerando los antecedentes expuestos, el objetivo principal de este trabajo es caracterizar la distribución geográfica de la variabilidad de ADNcp en *Eucryphia*

cordifolia (Cunoniaceae), un árbol endémico del Bosque Templado-Lluvioso del sur de Sudamérica y perteneciente al componente Valdiviano. Es la especie más termófila de estos bosques y es usada como un taxa indicador de condiciones cálidas en estudios palinológicos de la Región de Los Lagos (Villagrán, 1988b; Heusser *et al.*, 1999; Moreno & León, 2003; Abarzua *et al.*, 2004; Moreno, 2004). Se contrastan dos escenarios históricos posibles: el primero propone aislamiento en múltiples áreas, incluyendo áreas costeras y algunas áreas libres de hielo dentro de la región cubierta por glaciares, según lo propuesto para el UMG (hipótesis de múltiples refugios); mientras el segundo propone que la colonización postglacial tendría su origen en un único sector localizado en áreas costeras entre 36° S y 40° S (hipótesis de refugio único). Se predice que si las poblaciones actuales son derivadas desde múltiples fuentes, se encontrará estructuración filogeográfica y patrones tanto de alta divergencia genética como de aislamiento y acumulación independiente de nuevas variantes. En forma alternativa, se espera falta de estructuración filogeográfica y una disminución de la diversidad genética intrapoblacional vinculada al incremento de la distancia desde la posible fuente de expansión postglacial de las poblaciones actuales.

Modelo de estudio

Eucryphia cordifolia Cav (Cunoniaceae) es un árbol siempreverde, endémico de los Bosques Templado Lluviosos de Chile y Argentina. En Chile está distribuido en ambas cadenas montañosas, entre 37° S y 43°20' S aproximadamente (Fig. 1)

(Rodríguez *et al.*, 1983; Rodríguez *et al.*, 2005), y en Argentina se distribuye entre 40° S y 42° S aproximadamente, restringido a pequeñas poblaciones en las provincias de Chubut, Neuquén y Río Negro (Dress, 1956; Sánchez, 1988). Su rango de elevación va desde el nivel del mar hasta los 700 m.s.n.m. Se desarrolla principalmente en un clima oceánico-lluvioso (1.400 a 4.000 mm/año), con condiciones de temperatura media anuales moderadas (11°C promedio) (Donoso, 2006). Su límite norte de distribución estaría determinado por su dificultad para adaptarse a los cambios estacionales en las precipitaciones. No extiende su rango hacia el sur y no alcanza altitudes superiores, probablemente, debido al incremento de las precipitaciones y disminución de la temperatura (Donoso, 2006).

Las flores de *Eucryphia cordifolia* son hermafroditas, blancas, vistosas (Fig. 2b), solitarias, con 4 pétalos y muchos estambres blancos (Donoso, 2006). *Eucryphia cordifolia* tiene un sistema reproductivo autoincompatible y posee uno de los más ricos ensamblajes de polinizadores de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica, compuesto principalmente por insectos (Smith-Ramírez *et al.*, 2005). El fruto es una cápsula leñosa y oblonga de 1.5 cm de largo por 1 cm de diámetro, que se abre en varios compartimientos cuando madura (Fig. 2d). Las semillas son livianas, pequeñas (4-5 mm de largo y 2 mm de ancho) y están provistas de un ala membranosa, lo cual sugiere dispersión anemócora (Fig. 2e) (Rodríguez *et al.*, 1983; Donoso, 2006). Aunque no hay estudios cuantitativos sobre la vagilidad de *E. cordifolia*, se ha propuesto que especies con semillas morfológicamente similares se ubican entre aquellas con alta capacidad de dispersión (Augsburger, 1986). Respecto de su dinámica regenerativa, *E. cordifolia* presenta tolerancia intermedia a la sombra y regeneración esporádica e intermitente, respondiendo a la apertura de claros de

tamaño suficiente y condiciones de luz adecuadas para su crecimiento (Veblen *et al.*, 1979). Además, *E. cordifolia* es una especie de presencia temprana en las fases sucesionales después de destrucción de hábitats por fenómenos catastróficos (Veblen & Ashton, 1978).

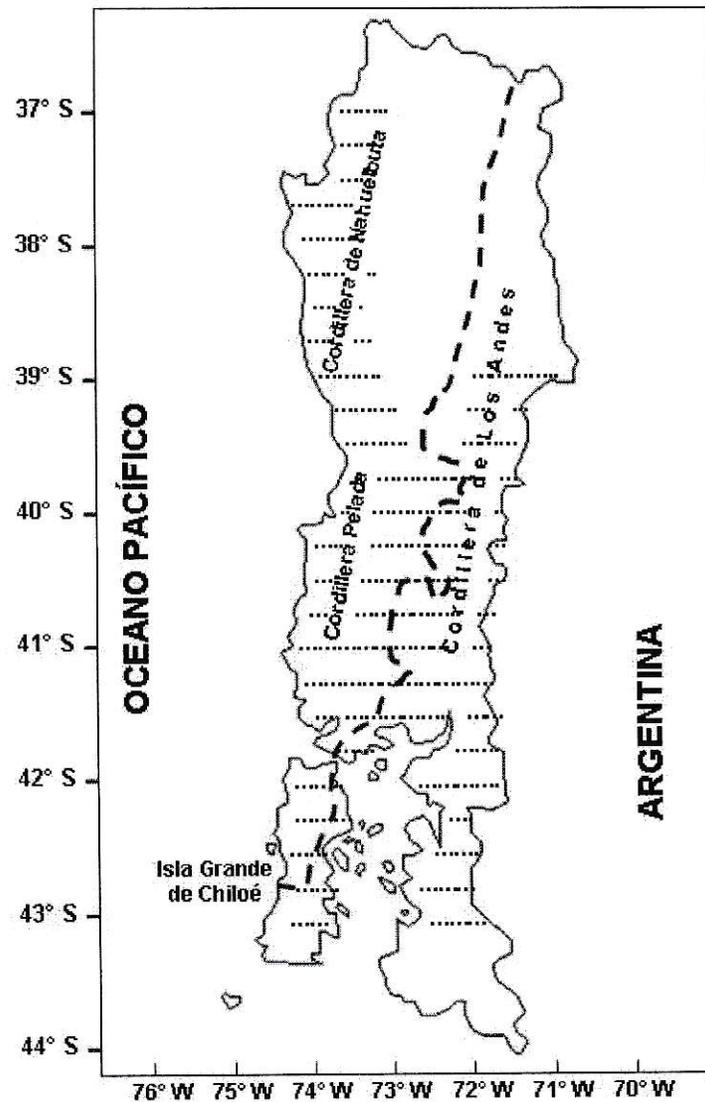


Figura 1. Se muestra el rango de distribución geográfica de *Eucryphia cordifolia* en Chile con el área achurada. La línea punteada muestra la extensión estimada de los glaciares durante el Último Máximo Glacial, de acuerdo a Holling & Schilling (1981).

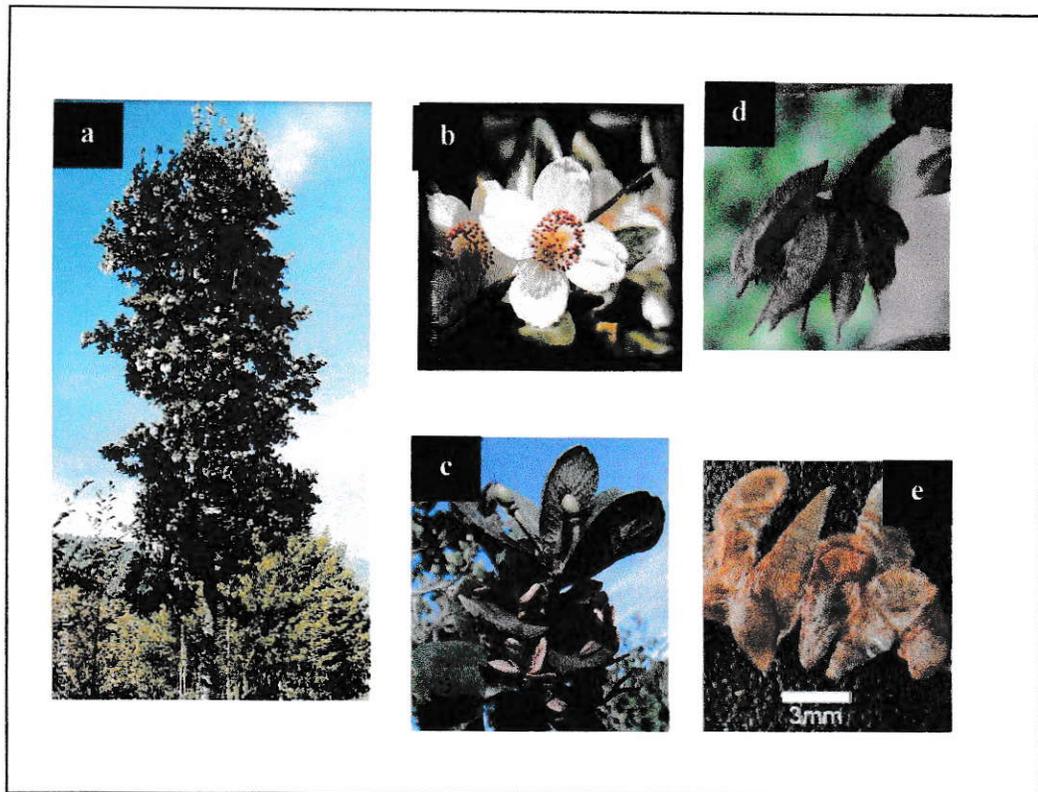


Figura 2. Características morfológicas de *Eucryphia cordifolia*. a) árbol adulto b) flor c) fruto inmaduro d) fruto maduro e) semilla.

Mediante información proveniente de datos palinológicos, se ha alcanzado un importante conocimiento acerca de la dinámica histórica de distribución de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica durante los últimos 20.000 años. De estos antecedentes se desprenden algunos hitos importantes de las respuestas distribucionales de *Eucryphia cordifolia* y las especies más termófilas de estos bosques. De este modo, Villagrán (1991, 2001) sugiere que las poblaciones de *E. cordifolia* habrían restringido su distribución a áreas de mediana y baja altitud de la Cordillera de la Costa, entre los 36°-40° S, durante las glaciaciones. Después del UMG, tras el colapso y retroceso de los glaciares entre 17.000 y 10.000 años

calendario AP, comenzó la expansión de las especies más resistentes al frío, seguidas probablemente por las primeras vanguardias de especies arbóreas intolerantes al frío del componente Norpatagónico y Valdiviano, entre ellos *E. cordifolia* (Villagrán, 1991; Moreno, 2004). Los mayores niveles de abundancia del componente más termófilo del Bosque Valdiviano ocurren posteriormente, entre 10.000-7.000 años calendario AP, en Patagonia Norte (Moreno, 2004). La dominancia del componente polínico *Eucryphia/Caldcluvia* ha sido interpretada como una respuesta al establecimiento de condiciones cálidas, al decrecimiento de la media anual de precipitaciones y, probablemente, a un incremento en la estacionalidad de las lluvias (Heusser, 1966, 1984; Villagrán, 1985; Villagrán, 1988b; Abarzua *et al.*, 2004; Moreno, 2004). A partir de los 6900 años calendario AP, los registros polínicos muestran una tendencia al retroceso del componente *Eucryphia/Caldcluvia* y su reemplazo por especies resistentes al frío en Patagonia Noroeste (40° S–43° S)(Moreno, 2004). Este desplazamiento, probablemente, fue desencadenado por condiciones con tendencia al enfriamiento e incremento en las precipitaciones, marcándose así el fin abrupto de las condiciones óptimas para *E. cordifolia* en esta zona (Heusser, 1966; Villagrán, 1988b; Abarzua *et al.*, 2004; Moreno, 2004). Finalmente, se habría establecido un patrón de distribución semejante al actual en *E. cordifolia* hace aproximadamente 3000 años, cuando se instauraron condiciones climáticas similares a las modernas en Patagonia Noroeste (Moreno, 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se colectó tejido foliar de *Eucryphia cordifolia* a lo largo de todo su rango de distribución (tabla 1). Se estudiaron 150 individuos de 22 localidades en un rango latitudinal entre 36° 47,310' S y 42° 52,630' S, y un rango altitudinal de 0 a 705 m.s.n.m (Tabla 1). En cada localidad se obtuvieron hojas de al menos 6 individuos, separados entre ellos por 50 metros, para minimizar la probabilidad de colectar individuos idénticos genéticamente o estrechamente relacionados. Las hojas fueron tomadas y almacenadas en Silica Gel hasta su procesamiento en el laboratorio.

Código	Localidad	Latitud	Longitud	Altitud (m.s.n.m.)	n
U1	Hualpén (VIII)	36° 47,310'	73° 09,498'	0	6
U2	Escuadrón (VIII)	36° 56,138'	73° 05,334'	450	6
U3	Llico (VIII)	37° 13,445'	73° 34,989'	300	10
U4	Contulmo (VIII)	38° 00,581'	73° 11,111'	373	9
U5	Huife (IX)	39° 13,465'	71° 39,245'	498	6
U6	Cordillera Pelada Poniente 4 (XIV)	39° 58,657'	73° 38,958'	700	6
U7	Los Ulmos (XIV)	40° 02,056'	72° 59,272'	150	10
U8	Cordillera Pelada Poniente 3 (XIV)	40° 05,341'	73° 33,936'	300	6
U9	Cordillera Pelada Poniente 2 (XIV)	40° 09,445'	73° 36,599'	212	7
U10	Cordillera Pelada Poniente 1 (XIV)	40° 10,016'	73° 32,686'	705	6
U11	Cordillera Pelada Oriente (XIV)	40° 15,757'	73° 19,871'	354	6
U12	Huaquecura (XIV)	40° 11,288'	71° 55,979'	300	8
U13	Petrohué (X)	41° 07,592'	72° 24,711'	272	6
U14	Valle Los Ulmos (X)	41° 17,410'	72° 34,677'	533	7
U15	Cayetue (X)	41° 19,165'	72° 16,346'	313	6
U16	Camino a Ralun (X)	41° 19,863'	72° 24,824'	184	6
U17	Puelo (X)	41° 42,051'	72° 24,362'	73	6
U18	Puelche (X)	41° 44,060'	72° 38,068'	7	7
U19	Puerto Montt (X)	41° 46,841'	73° 26,833'	13	6
U20	Senda Darwin (X)	41° 52,848'	73° 49,805'	24	8
U21	Quemchi (X)	42° 08,740'	73° 42,070'	147	6
U22	Detico (X)	42° 52,630'	73° 34,096'	36	6
Total					150

Tabla 1 Nombre del sitio, ubicación y tamaño de la muestra para todas las localidades de *Eucryphia cordifolia* estudiadas. En la columna de nombre de localidad se indica entre paréntesis la región administrativa a la que pertenece cada sitio.

Extracción, amplificación y secuenciación de ADN

El tejido foliar obtenido en terreno fue secado y pulverizado con molino (Tissue Lyser, QIAGEN). El ADN fue aislado siguiendo el protocolo propuesto para el kit de extracción DNAeasy Plant Mini Kit de QIAGEN (anexo 1) y purificado por precipitación con etanol (anexo 2). Se realizó una evaluación de polimorfismo de ADN de cloroplastos (ADNcp), con 6 individuos obtenidos en 3 poblaciones que cubren el rango de distribución completo de *Eucryphia cordifolia*. Se evaluó ADNcp por su modo de heredabilidad clonal y porque, dada la heredabilidad maternal de cloroplastos en angiospermas, se esperaba encontrar niveles de estructuración geográfica más altos que con marcadores nucleares (Petit *et al.*, 1993; Ennos, 1994). Se probaron los siguientes partidores trnT-trnF (Taberlet *et al.*, 1991), trnD-trnT, trnC-trnD (Demesure *et al.*, 1995), trnG-trnS (Wakasugi *et al.*, 1994), orf184-petA, trnS-trnR (Grivet *et al.*, 2001), trnV-ndhC, trnQ-rps16, ndhF-rpl32R, trnL-rpl32F (Shaw *et al.*, 2007). También, se testearon los partidores de microsatélites de cloroplastos ccmp4, ccmp5, ccmp6, ccmp7 y ccmp10 (Weising & Gardner, 1999). Finalmente, se seleccionó el fragmento trnV-ndhC porque presentó la mayor variabilidad. En consecuencia, se extendió la amplificación a los 150 individuos muestreados. La amplificación del material genético fue realizada mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en una mezcla de volumen total de 25 mL, compuesta por 4.65 mL dH₂O, 0.1 mM de mezcla de dNTP, 0.5 U/ml Taq polimerasa, 2.5 mM 10X Taq Buffer, 0.1 pm de cada partidor, 0.35 mL BSA y 7 mL de templado de ADN. El programa de amplificación incluyó un paso inicial de

denaturación de 4 min a 94 ° C, seguido por 30 ciclos [45 segundos de denaturación a 94 ° C, 45 s de alineamiento a 50 ° C y 3 minutos de extensión a 72°C], con un paso final de extensión de 72 ° C por 10 minutos. Después, 6 µL de producto de PCR marcado con Bromuro de Etidio fue chequeado en un gel de agarosa y TAE al 2%. Los 19µL restantes fueron purificados y secuenciados en el centro de secuenciación Macrogen Inc.

Análisis de datos

Diversidad genética y relación entre haplotipos

Las secuencias fueron editadas y alineadas usando Bioedit 7.0.9 (Hall, 1999) y el ajuste se concluyó por inspección visual. Para obtener una descripción general de los datos se calcularon los parámetros de diversidad estándar: número de haplotipos (K); número de sitios polimórficos (S); diversidad haplotípica (H); diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias entre pares de secuencias (Π) utilizando el programa DNASp v.5 (Librado & Rozas, 2009). Se usó criterio de parsimonia para inferir las relaciones entre los haplotipos (Posada & Crandall, 2001) y se construyó la red resultante con el programa TCS 1.21 (Clement *et al.*, 2000).

Distribución espacial de la diferenciación genética

Se evaluó la diferenciación genética entre poblaciones mediante comparaciones pareadas, usando los estadígrafos F_{st} (Wright, 1951) (Anexo 3). Se puso a prueba la significancia de asociación entre distancia genética (F_{st}) y distancia geográfica (kilómetros) mediante test de Mantel (Mantel, 1967) implementado en el programa GENETIX (Belkhir *et al.*, 2002). La significancia estadística fue testeada usando 1000 permutaciones aleatorias.

La estructura geográfica fue evaluada mediante un Análisis Espacial de Varianza Molecular (SAMOVA) (Dupanloup *et al.*, 2002). SAMOVA es un método que simula diferentes particiones de las poblaciones en grupos y retiene la partición con mayor valor de F_{CT} (proporción de la variación genética entre grupos). Se probaron particiones de entre 2 a 10 grupos. SAMOVA evalúa la diferenciación genética mediante Análisis de Varianza Molecular (AMOVA; (Excoffier *et al.*, 1992)). AMOVA descompone la variabilidad molecular entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones.

La estructuración filogeográfica fue puesta a prueba utilizando los coeficientes G_{ST} y N_{ST} (Pons & Petit, 1995, 1996). Ambos estiman la relación entre la diversidad genética intrapoblacional promedio y la diversidad genética total, pero mientras que G_{ST} sólo hace uso de frecuencias de haplotipos, N_{ST} toma en cuenta además las diferencias entre los haplotipos. Los índices de diferenciación (G_{ST} y N_{ST}) fueron comparados con un test de 1000 permutaciones aleatorias de N_{ST} para probar si eran significativamente distintos. La distribución de valores de N_{ST} , obtenida por permutaciones, fue comparada con su valor observado. Generalmente, si N_{ST} resulta

significativamente mayor que G_{ST} se considera como un indicador de estructura filogeográfica de los haplotipos, dado que sería más probable encontrar haplotipos genéticamente más cercanos dentro de una población que entre poblaciones distintas. Este análisis fue realizado siguiendo el método desarrollado por Burban *et al.*(1999), usando el programa PERMUT (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/>).

Paisaje genético

Con el fin de evaluar el patrón de distribución geográfica de la distancia genética se construyó una superficie de paisaje genético (Miller, 2005; Miller *et al.*, 2006). Este método aplica la red de conectividad por triangulación de Delaunay a los sitios de muestreo y asigna una distancia genética al punto medio de cada par de sitios. Las distancias genéticas sobre la superficie del paisaje son luego interpoladas a través de todo el rango geográfico muestreado. Este método es cualitativo, pero provee una útil representación gráfica de las distancias genéticas sobre el área de muestreo. El paisaje genético fue generado con una grilla de 50x50 celdas uniformemente espaciadas. Se interpolaron valores de distancias genéticas residuales con un rango de valores para el parámetro de ponderación de la distancia (α) 0.1 y 3.0. Este análisis fue realizado en el programa *Alleles in Space* (Miller, 2005).

RESULTADOS

El largo de alineamiento de las secuencias del intrón trnV-ndhC en *Eucryphia cordifolia* fue de 418 bp. Las secuencias presentaron 7 mutaciones, cinco sustituciones y dos inserciones/delecciones (Tabla 2). A partir del análisis de 150 individuos se identificaron 9 haplotipos, H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8 y H9 (Tabla 2).

	4	4	4	5	5	5	5	4	5	6	3	3	3	3	3	3	3	3	3
<i>Haplotipo</i>	7	8	9	0	1	2	4	6	1	4	2	3	4	5	6	7	8	0	
H1	-	-	-	-	-	-	A	T	T	C	G	A	A	T	T	T	A	G	
H2	-	-	-	-	-	-	.	.	C	
H3	-	-	-	-	-	-	.	.	C	A	
H4	-	-	-	-	-	-	C	.	C	
H5	-	-	-	-	-	-	C	.	C	
H6	-	-	-	-	-	-	.	.	C	
H7	T	G	G	A	A	T	.	.	C	A	
H8	-	-	-	-	-	-	.	.	.	T	
H9	-	-	-	-	-	-	.	G	C	

Tabla 2 Distribución de sitios polimórficos en fragmentos de trnV-ndhC de *Eucryphia cordifolia*. La posición del nucleótido en el alineamiento es mostrada arriba. Las delecciones están indicadas por el signo (-).

En la figura 3 se muestra la distribución geográfica de los 9 haplotipos encontrados. Los haplotipos H1 y H2 están presentes en 21 de las 22 localidades investigadas y cubren todo el rango de distribución de *Eucryphia cordifolia* (Fig. 3). Ocho de las localidades analizadas están compuestas únicamente por el haplotipo H1 o por los haplotipos H1 y H2. Aquellas localidades con bajo número de haplotipos

están localizadas preferentemente en los extremos del rango latitudinal de *E. cordifolia*: en Cordillera de Nahuelbuta e Isla Grande de Chiloé (Fig. 3, Tabla 6). Los siete haplotipos restantes se consideran raros (H3, H4, H5, H6, H7, H8 y H9) debido a que están presentes sólo en el 18.2% de los individuos muestreados. Cinco de los haplotipos raros (H3, H5, H6, H7 y H8) están presentes en la Cordillera de la Costa cerca del centro del rango latitudinal de *E. cordifolia* (40°S), en la región correspondiente a Cordillera Pelada (Tabla 6, Fig. 1, Fig. 3). Dos de estos haplotipos, H7 y H8, están restringidos a la ladera poniente de la Cordillera Pelada, mientras que los otros tres, H3, H5, H6, están presentes también en otras regiones. Sólo dos haplotipos raros (H4 y H9) no se encuentran representados en el área costera, ambos están representados por un único individuo y se encuentran en la Cordillera de los Andes (Fig. 3).

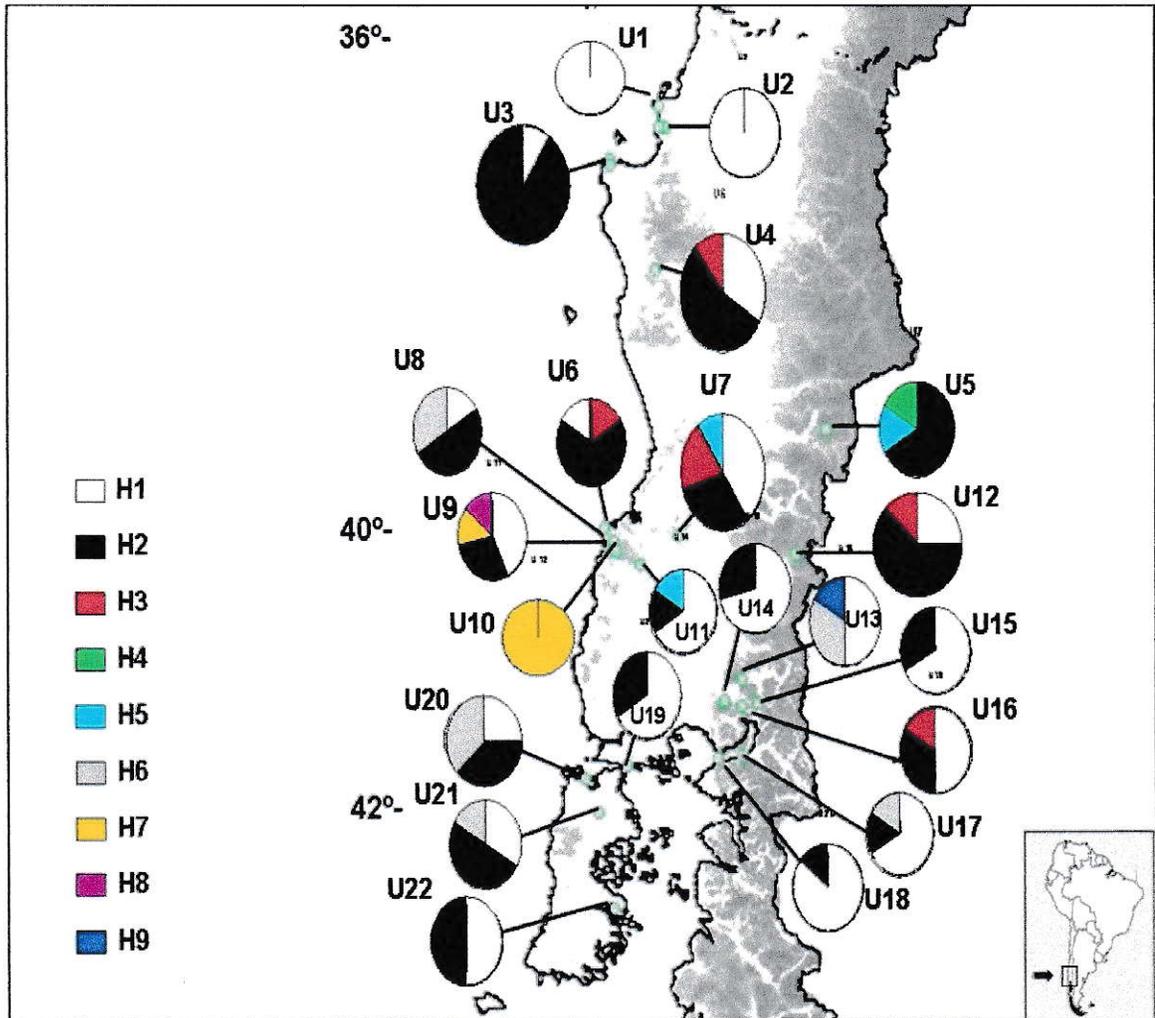


Figura 3. Distribución geográfica y frecuencias de haplotipos de ADNcp de *Eucryphia cordifolia*. El tamaño de los círculos es proporcional al número de individuos analizados en cada población; el color representa a cada haplotipo.

Diversidad genética y relación entre haplotipos

A partir de los 150 individuos estudiados se obtuvieron los siguientes índices de diversidad: diversidad haplotípica (H)=0.663; diversidad nucleotídica (π) = 0.00320; y número promedio de diferencias entre dos secuencias (Π) = 1.301 (Tabla 3). El número de haplotipos por población varía entre 1 y 4, y la diversidad haplotípica va de 0 a 0.80952 (Tabla 3).

Código	Localidad	Grupo	n	S	K	H	Π	π
U1	Hualpen (VIII)	Cordillera de Nahuelbuta	6	0	1	0,00000	0,00000	0,00000
U2	Escuadrón (VIII)	Cordillera de Nahuelbuta	6	0	1	0,00000	0,00000	0,00000
U3	Llico (VIII)	Cordillera de Nahuelbuta	10	2	2	0,20000	0,40000	0,00098
U4	Contulmo (VIII)	Cordillera de Nahuelbuta	9	3	3	0,63889	1,27778	0,00314
U5	Huife (IX)	Cordillera de Los Andes	6	2	3	0,60000	0,86667	0,00213
U6	Cordillera Pelada W 4 (XIV)	Cordillera Pelada	6	3	3	0,60000	1,20000	0,00295
U7	Los Ulmos (XIV)	Valle Central	10	4	4	0,77778	1,55556	0,00382
U8	Cordillera Pelada W 3 (XIV)	Cordillera Pelada	6	2	3	0,73333	0,93333	0,00229
U9	Cordillera Pelada W 2 (XIV)	Cordillera Pelada	7	5	4	0,80952	1,90476	0,00468
U10	Cordillera Pelada W 1 (XIV)	Cordillera Pelada	6	0	1	0,00000	0,00000	0,00000
U11	Cordillera Pelada E (XIV)	Cordillera Pelada	6	3	3	0,60000	1,20000	0,00295
U12	Huaquecura (XIV)	Cordillera de Los Andes	8	3	3	0,60714	1,21429	0,00298
U13	Petrohue (X)	Cordillera de Los Andes	6	3	3	0,73333	1,26667	0,00311
U14	Valle Los Ulmos (X)	Cordillera de Los Andes	7	2	2	0,47619	0,95238	0,00234
U15	Cayetue (X)	Cordillera de Los Andes	6	2	2	0,53333	1,06667	0,00262
U16	Camino a Ralun (X)	Cordillera de Los Andes	6	3	3	0,73333	1,46667	0,00360
U17	Puelo (X)	Cordillera de Los Andes	6	2	3	0,60000	0,86667	0,00213
U18	Puelche (X)	Cordillera de Los Andes	7	2	2	0,28571	0,57143	0,00140
U19	Puerto Montt (X)	Valle Central	6	2	2	0,53333	1,06667	0,00262
U20	Senda Darwin (X)	Isla Grande de Chiloé	8	2	3	0,75000	0,96429	0,00237
U21	Quemchi (X)	Isla Grande de Chiloé	6	2	3	0,73333	1,13333	0,00278
U22	Detico (X)	Isla Grande de Chiloé	6	2	2	0,60000	1,20000	0,00295
			150	7	9	0,66255	1,30121	0,0032

Tabla 3 Índices de diversidad estándar calculados para cada localidad y para el total de las localidades muestreadas. Además, se incluye la unidad geográfica a la que pertenece cada grupo.

La red de haplotipos (Fig. 4) sugiere que los haplotipos frecuentes y ampliamente distribuidos (H1 y H2), además del haplotipo H3, son derivados del haplotipo H6. Dado el alto número de conexiones observadas en el haplotipo H6 se sugiere que éste correspondería al haplotipo ancestral. El origen de los haplotipos H4 y H5, estrechamente relacionados entre ellos, no se puede resolver, y permanece la duda si divergen desde H2 ó H6. Los haplotipos más derivados H7, H8 y H9 se relacionan con H3, H1 y H2, respectivamente (Fig. 4).

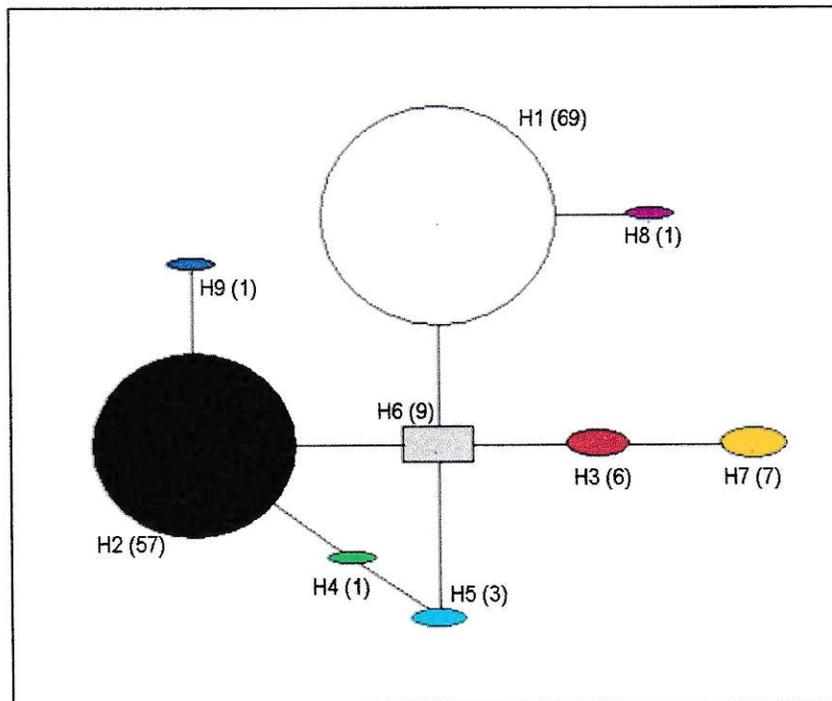


Figura 4. Reconstrucción filogenética, con criterio de parsimonia, de la relación entre haplotipos de *trnV-ndhC* (ADNcp) en *Eucryphia cordifolia*. Cada círculo representa a un haplotipo. Las líneas representan un paso mutacional. El tamaño de los círculos es proporcional a la frecuencia de cada haplotipo. El número entre paréntesis indica el número de individuos por haplotipo.

Distribución espacial de la diferenciación genética

La evaluación de los F_{st} de pares (anexo 3) indica diferencias entre sitios de muestreo relativamente bajas. La excepción a estos valores bajos está dada por la relación entre U3 y las otras dos localidades de la Cordillera de Nahuelbuta, U1 y U2 (Fig. 3), que tienen valores significativamente altos (0.889, $p < 0.05$, anexo 3). Por su parte, la localidad U10 presenta diferencias altas con todas las demás localidades de *Eucryphia cordifolia* muestreadas (anexo 3). La asociación entre distancia genética entre pares de poblaciones y la distancia geográfica no muestra una correlación significativa ($Z = 23632.976$, $p = 7.6$, Fig. 6).

Los valores de G_{st} (0.214) y N_{st} (0.274) son menores a 30%, indicando que la mayor parte de la diversidad genética estaría dada por la diversidad intrapoblacional (Tabla 4). Aún así, el test de permutaciones muestra que el valor de N_{st} es significativamente mayor que el valor de G_{st} ($p = 0.042$), indicando que existe estructuración filogeográfica de los haplotipos, es decir, es más probable encontrar haplotipos genéticamente más cercanos entre poblaciones que dentro de una población.

Sin diferencias entre haplotipos		Con diferencias entre haplotipos	
h_S	0.525 (0.0552)	v_S	0.486 (0.0539)
h_T	0.668 (0.0400)	v_T	0.669 (0.0748)
G_{st}	0.214 (0.0932)	N_{st}	0.274 (0.1293)

Tabla 4 Parámetros de diversidad y diferenciación genética, tomando en cuenta sólo frecuencias (h_S , h_T , G_{st}) y diferencias entre haplotipos (v_S , v_T , N_{st}). Entre paréntesis se indica error estándar.

Considerando los resultados que apuntan a la estructuración filogeográfica de haplotipos, se evaluó la existencia de algún patrón de diferenciación espacial mediante análisis de SAMOVA. Sin embargo, no fue posible maximizar la varianza genética entre grupos geográficamente coherentes, probablemente, porque el análisis de SAMOVA tiende a separar poblaciones con baja diversidad genética cercanas a los límites del rango de distribución de *Eucryphia cordifolia*. Por ejemplo, al intentar agrupar las poblaciones en dos grupos, el análisis separa los dos sitios del extremo norte de Nahuelbuta (U1 y U2, Fig. 3) del resto de las localidades. Ambos sitios separados tienen fijado el haplotipo H1, el cual está presente también en todo el rango de distribución de la especie. Asimismo, cuando se intentó la evaluación con tres grupos, SAMOVA separa nuevamente en un grupo a los sitios de la Cordillera de Nahuelbuta y en otro grupo a un sólo sitio, ubicado en extremo sur del rango, también dominado por el haplotipo H1, pero con H2 en baja proporción. Los Análisis de Varianza Molecular (AMOVA), para cada agrupación propuesta, muestran que siempre la varianza es explicada principalmente por diferencias dentro de las poblaciones (Tabla 5).

Paisaje genético

En la figura 5 se muestra la superficie de interpolación del paisaje genético, los picos y depresiones reflejan la magnitud de las distancias genéticas entre las poblaciones estudiadas. El área con mayores distancias genéticas se ubica en la Cordillera Pelada (40° S). Esta región corresponde, aproximadamente, al centro latitudinal de distribución de *Eucryphia cordifolia*. Por su parte, las distancias genéticas decrecen consistentemente hacia los extremos sur y norte del rango. La

perturbación de los parámetros del modelo y el tamaño de las celdas no afectaron el patrón general, sólo influyeron en la suavización de la red. La ubicación de los picos de distancia genética concuerda con la zona de concentración de haplotipos raros, ubicados preferentemente en Cordillera Pelada. La diversidad genética total de esta zona es particularmente alta ($K= 7$; $\pi = 1.79$) en comparación con la diversidad genética de otras regiones geográficas de mayor área, como Cordillera de los Andes, Valle Central e Isla Grande de Chiloé (Tabla 6).

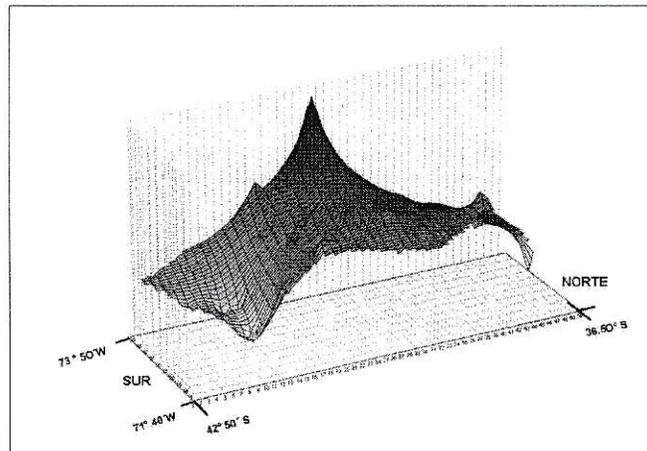


Figura 5. Paisaje genético de *Eucryphia cordifolia*. El paisaje está estandarizado con una grilla de 50X50 celdas, a través del rango geográfico que abarca todas las localidades colectadas. Los picos y depresiones de la superficie indican la magnitud de la distancia genética.

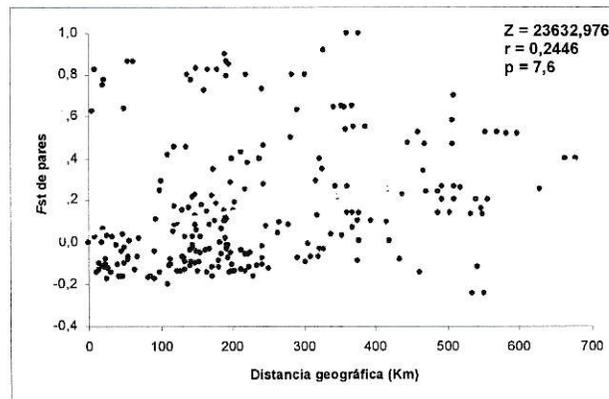


Figura 6. Gráfico de F_{st} pareados contra distancia geográfica (Kilómetros). El coeficiente de correlación de Mantel (Z) y el coeficiente de correlación son no significativos ($p > 0.05$).

Grupos	Componente de la	varianza		% de la variación	
		Poblaciones entre grupos	Genotipos entre poblaciones y entre grupos	Entre grupos	Entre poblaciones dentro de grupos
2	(U1, U2); (Restantes)	FCT : 0.24966	FST : 0.41424	24.97	16.46
3	(U1, U2); (U3) (Restantes)	FCT : 0.20082	FST : 0.37082	20.08	17.00
4	(U7); (U12); (U24); (Restantes)	FCT : 0.42166	FST : 0.49804	42.17	7.64
5	(U7); (U12); (U14); (U15); (Restantes)	FCT : 0.35997	FST : 0.44399	36.00	8.40
6	(U5); (U11); (U12); (U24); (U6, U7, U8, U9, U10, U13, U22, U23); (Restantes)	FCT : 0.35653	FST : 0.33759	35.65	-1.89
7	(U1, U2); (U5); (U14); (U20); (U7); (U12); (Restantes)	FCT : 0.40445	FST : 0.39687	40.45	-0.76
8	(U1, U2); (U13); (U10); (U7); (U6, U8); (U12); (U5); (Restantes)	FCT : 0.38052	FST : 0.35172	38.05	-2.88
9	(U1, U2); (U9); (U7); (U15); (U12); (U22, U23); (U6, U10); (Restantes)	FCT : 0.36105	FST : 0.30174	36.10	-5.93
10	(U1, U2); (U5); (U7); (U9); (U12); (U20); (U22); (U23); (U6; U8, U10, U13); (Restantes)	FCT : 0.37231	FST : 0.30240	37.23	-6.99

Tabla 5 Análisis de Varianza Molecular de los grupos propuestos por SAMOVA para 22 localidades de *Eucryphia cordifolia*. Todos los valores de F son significativos, $P < 0.05$ (1023 permutaciones aleatorias de secuencias entre poblaciones)

Grupos	n	S	K	H	Π	Π
Cordillera de Nahuelbuta	31	3	3	0,54624	1,09247	0,00268
Cordillera Pelada	31	6	7	0,77849	1,78925	0,00440
Valle Central	16	4	4	0,67500	1,35000	0,00332
Cordillera de Los Andes	52	5	7	0,62971	1,17119	0,00288
Chiloé	20	2	3	0,66842	1,00000	0,00246

Tabla 6 Parámetros de diversidad para 5 grupos de *Eucryphia cordifolia* con relación geográfica. Número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π), número de diferencias promedio entre pares de secuencias (Π).

DISCUSIÓN

La distribución geográfica de la variabilidad genética, caracterizada por concentración de haplotipos y presencia del haplotipo ancestral en áreas aledañas a la Cordillera de la Costa, junto a la carencia de estructura filogeográfica, sugieren que la especie termófila de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica, *Eucryphia cordifolia*, presenta un patrón consistente con las predicciones de la hipótesis de un único refugio glacial.

De acuerdo a los resultados, no existe evidencia de estructuración filogeográfica entre las poblaciones estudiadas. Aunque la evaluación de diferencias entre G_{ST} y N_{ST} sugiere la existencia de algún tipo de estructuración filogeográfica, sus valores no superan el 30 %. La diferencia entre G_{ST} y N_{ST} podría ser explicada por diferenciación entre las localidades de la Cordillera Pelada. Para evaluar esa hipótesis, se repitió el test de permutaciones, quitando la población más divergente de la zona, ubicada en el límite altitudinal de la Cordillera Pelada, y que tiene fijado el haplotipo H7. En este caso, se pierden las diferencias significativas y los valores de los coeficientes disminuyen ($G_{ST} = 0.134$ y $N_{ST} = 0.139$). Las poblaciones de Cordillera Pelada se encuentran muy cercanas geográficamente y muy diferenciadas genéticamente (Fig. 3). Este patrón de distribución podría estar dando cuenta de que la fuerza evolutiva predominante es la deriva génica, por sobre los efectos del flujo génico sobre el ordenamiento de las frecuencias de haplotipos entre las poblaciones. Por su parte, el test SAMOVA no es capaz de generar particiones con grupos

geográficamente coherentes. Asimismo, los análisis de AMOVA para todos los escenarios propuestos por SAMOVA muestran que en ningún caso es posible maximizar la varianza con la formación de grupos (Tabla 5). Probablemente, el reconocimiento de grupos geográficamente coherentes se dificulta por la existencia de haplotipos frecuentes y ampliamente distribuidos, y por la concentración de haplotipos raros en el centro del rango de distribución de *Eucryphia cordifolia*. De este modo, la falta de estructuración filogeográfica sugiere que el patrón actual de distribución de *Eucryphia cordifolia* responde a un evento de expansión con origen sólo en una fuente. Además, la amplia distribución de H1 y H2 es concordante con la existencia de un único evento de expansión propuesto.

El patrón de pérdida de haplotipos hacia los extremos sur y norte (Fig 3, Tabla 6) estaría reforzando la idea de desplazamiento reciente de los límites latitudinales del rango distribucional en *E. cordifolia*. El análisis de relación entre haplotipos sugiere al haplotipo H6 como ancestral y no a alguno de los haplotipos más frecuentes (Fig. 4). La baja frecuencia del haplotipo ancestral podría ser explicada por una disminución de su frecuencia asociada a efectos del “cuello de botella” genético durante contracciones de rango en el pasado. Eventos de disminución drástica de los tamaños poblacionales y sus subsiguientes procesos de “cuello de botella” generan pérdida de diversidad genética, por eliminación de haplotipos poco frecuentes, y alteración de las frecuencias de los haplotipos que permanecen. De esta forma, la baja frecuencia del haplotipo ancestral H6 en una probable zona de contracción podría ser explicada mediante deriva génica.

Las distancias genéticas presentan un patrón con un pico en zonas costeras cercanas al centro del rango (Cordillera Pelada) y con una disminución hacia el este

(Valle Central y Cordillera de Los Andes) y los extremos latitudinales del rango de distribución de *Eucryphia cordifolia* (Cordillera de Nahuelbuta e Isla Grande de Chiloé) (Fig. 5). La disminución de las distancias genéticas hacia los extremos es consistente con la ausencia de haplotipos raros en estas dos regiones (Fig. 3). El pico de distancia genética ubicado en zonas costeras, aproximadamente a los 40°S (Cordillera Pelada), coincide con la concentración de haplotipos en esta zona. Además, la ubicación del pico de distancia genética sugiere interrupciones al flujo entre ambas laderas de Cordillera Pelada, que a esta latitud alcanza alturas superiores a los 1000 m.s.n.m., debido a que ambas laderas poseen haplotipos que no son compartidos entre ellas (Fig. 3).

De esta forma, el patrón de distribución genética con concentración de haplotipos raros y el pico de distancias genéticas en Cordillera Pelada podría ser considerado un legado de persistencia de poblaciones de *Eucryphia cordifolia* durante las glaciaciones del Pleistoceno en esta zona. Por su parte, la disminución consistente de haplotipos hacia los extremos del rango de distribución latitudinal de *Eucryphia cordifolia* podría ser evidencia de desplazamientos de sus límites distribucionales en el pasado, tanto hacia el norte como hacia el sur. Estos desplazamientos en ambos sentidos habrían producido una contracción del rango de distribución de *E. cordifolia*, probablemente, limitándola a la región de Cordillera Pelada. Además, la correlación no significativa entre distancias genéticas y geográficas ($Z = 23632.976$, $r = 0.2446$, $p = 7.6$, Fig. 6) podría ser explicada por un evento de colonización en más de una dirección, de modo que los haplotipos más frecuentes en la fuente de colonización alcanzaron los nuevos extremos de su rango, dejando poblaciones similares genéticamente muy distanciadas geográficamente. De

esta forma, el patrón de distribución de la variabilidad genética (Fig. 3, Fig. 5, Tabla 1, Tabla 6) permite sugerir que *E. cordifolia* se ajusta a lo propuesto por la hipótesis de único refugio ubicado en zonas aledañas a la costa, propuesta para especies termófilas (Villagrán & Hinojosa, 1997). Sin embargo, los modelos históricos sostienen que sólo el desplazamiento del límite sur de distribución hacia el norte es atribuible al efecto de la última glaciación (Villagrán, 1991; Villagrán & Hinojosa, 1997; Villagrán, 2001).

La distribución del haplotipo H5 en la ladera oriente de la Cordillera de la Costa, en el Valle Central y en la Cordillera de Los Andes cerca del límite norte de distribución de *Eucryphia cordifolia* (Fig. 3), junto con su estrecha relación con el haplotipo H4 (Fig 4), distribuido exclusivamente en la Cordillera de Los Andes, sugiere un establecimiento temprano de poblaciones de *E. cordifolia* al término de la última glaciación en el Valle Central, cerca del límite norte de su rango actual. El modelo histórico propuesto por Villagrán (2001) sugiere un establecimiento temprano del componente termófilo en esta zona, probablemente durante el Tardiglacial (entre 17000 y 11000 años AP). La temprana colonización del Valle Central por el componente termófilo y el establecimiento de poblaciones de *E. cordifolia* habrían permitido un proceso independiente de acumulación de variabilidad genética en esta región (Fijación de alelos H4 y H5, ver Fig. 3).

La distribución del haplotipo H6 podría ser la huella genética de una ruta de colonización hacia el sur (Fig 3). La distribución y condición ancestral del haplotipo H6 sugiere que la recolonización habría comenzado desde zonas costeras cercanas a los 40°S, probablemente en la ladera oeste de Cordillera Pelada. Villagrán (1991, 2001) propone que, tras el retroceso de los glaciares, las especies más resistentes al

frío habrían sido las primeras en ocupar las áreas liberadas, siendo seguidas posteriormente por el componente termófilo. Los registros de polen muestran que *Eucryphia cordifolia* persistió con gran abundancia en Patagonia Norte entre 10.000 y 8.000 años calendario AP (Moreno, 2004), en respuesta a un incremento abrupto de la temperatura y una disminución de las precipitaciones (Villagrán, 2001; Moreno, 2004). La ruta de colonización hacia el sur del componente termófilo habría alcanzado temprano (aproximadamente 14000 años calendario AP) la costa este de la Isla Grande de Chiloé y el extremo sur del Valle Central (Villagrán, 2001). La baja diversidad genética y ausencia de haplotipos nuevos a través de esta ruta de expansión podría estar dando cuenta de una colonización compuesta por poblaciones pequeñas; así, las poblaciones de *Eucryphia cordifolia* habrían alcanzado el extremo sur con tamaños poblacionales muy bajos y probablemente restringidas a zonas cercanas a la costa. Esto es concordante con la aparición temprana de polen, en bajas proporciones, de *Eucryphia cordifolia*, en los registros de la Isla Grande de Chiloé. Posteriormente, durante el Holoceno, los tamaños poblacionales aumentaron y se establecieron las condiciones de dominancia del componente termófilo del Bosque Valdiviano (Villagrán, 1988b; Abarzua *et al.*, 2004). La presencia del haplotipo H6 en el sureste del Valle Central sugiere un desplazamiento de las poblaciones de *E. cordifolia* hacia el norte a través de éste. Probablemente, este desplazamiento hacia el norte ocurrió entre 8000 y 3000 años calendario AP, cuando se registra una tendencia al enfriamiento y aumento de las precipitaciones en la Región de Los Lagos (Moreno, 2004).

Mediante modelos polínicos y fitogeográficos se ha sugerido que el componente termófilo colonizó la ladera Oeste de la Cordillera de Los Andes hace

aproximadamente 3000 años calendario AP, ubicándose preferentemente en el sector andino norte de la Región de Los Lagos (Villagrán & Hinojosa, 1997; Villagrán, 2001). Durante este periodo se comenzaron a establecer las condiciones de clima y vegetación modernas (Villagrán, 2001; Moreno, 2004). El ascenso altitudinal de las poblaciones de *Eucryphia cordifolia* en la Región de Los Lagos tendría su origen en aquellas poblaciones establecidas en el Valle Central a la misma latitud. La presencia de los haplotipos H3 y H6, asociados en esta región, podría estar evidenciando una zona de confluencia entre la ruta que alcanzó temprano el Valle Central (cuya huella sería evidenciada por la distribución de H3) y la ruta que alcanzó el sur del Valle Central siguiendo zonas aledañas a la costa y luego colonizó en dirección noreste el Valle Central (Villagrán, 1991) (cuya huella sería evidenciada por la distribución de H6).

La presencia restringida del haplotipo H9 en el sureste del Valle Central no concuerda con el modelo de pérdida de haplotipos raros hacia los bordes norte, sur y este del rango de distribución de *Eucryphia cordifolia*. El haplotipo H9 está débilmente representado (sólo un individuo lo posee), por lo que no es posible hacer una discusión concluyente respecto de su situación y de la información que podría estar proporcionando.

El patrón de pérdida de variabilidad genética hacia el norte en *Eucryphia cordifolia* podría dar cuenta de alteraciones recientes en su límite septentrional de distribución. Posibles desplazamientos en el límite norte de las especies de los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica han sido menos discutidos que las dinámicas de los límites en el sur. De manera concordante, el patrón de pérdida de diversidad hacia latitudes septentrionales del cono sur de Sudamérica, se repite en

niveles de organización superior, por ejemplo en el decaimiento en riqueza de especies forestales (Villagrán & Hinojosa, 1997; Villagrán *et al.*, 1998), y de mamíferos y de mariposas (Samaniego & Marquet, 2009). Se sugiere que este patrón puede ser explicado, en parte, por efectos históricos, asociados a procesos de desertificación iniciados durante el Período Terciario e incrementados durante el Pleistoceno en el centro-norte del cono sur de Sudamérica (Arroyo *et al.*, 1988; Villagrán & Hinojosa, 1997; Samaniego & Marquet, 2009). Durante los periodos glaciales, específicamente durante el UMG, la evidencia fósil indica condiciones frías y húmedas en Chile central (entre 32 ° S y 37 ° S) (Heusser, 1983; Lamy *et al.*, 1999), debido a la intensificación y desplazamiento hacia el norte de los vientos del oeste (Villagrán, 1988a; Caviedes, 1990; Heusser, 1990; Villagrán, 1990). Aparentemente, estas condiciones no serían restrictivas para la presencia de *E. cordifolia*, pero no existe evidencia fósil que permita confirmar o descartar su presencia en esta región durante el UMG. Por otro lado, el rango de distribución de *Eucryphia cordifolia* en la actualidad no alcanza latitudes menores debido a las sequías de verano, que en Chile Central son principalmente influenciadas por el Anticiclón Subtropical del Pacífico Sur (Aceituno, 1988). Entre 11700 y 8000 años calendario AP se registra el periodo más seco del último interglacial en el área de distribución de *E. cordifolia*, debido a la vigorización y desplazamiento hacia el sur del Anticiclón Subtropical del Pacífico Sur, además de un desplazamiento en la misma dirección de los vientos del oeste (Heusser, 1990; Villagrán & Varela, 1990; Villa-Martínez & Villagrán, 1997; Jenny *et al.*, 2002). Las condiciones de sequía habrían sido más drásticas hacia el norte del rango de distribución de *E. cordifolia*, en consecuencia, se sugiere que durante este periodo se habría producido una

migración de su límite norte hacia el sur. La baja diversidad de haplotipos presentes en las poblaciones de la Cordillera de Nahuelbuta sugiere que esta área habría sido recolonizada recientemente, probablemente, cuando las condiciones modernas del clima se establecieron, aproximadamente hace 3000 años calendario AP (Villagrán, 2001; Moreno, 2004). La distribución del haplotipo H3 y su relación de parentesco con H7 sugiere que la colonización hacia el norte tendría su origen en zonas costeras cercanas a los 40 ° S (Cordillera Pelada), aunque no se puede descartar un aporte a esta ruta de poblaciones establecidas en el extremo norte de su rango, en el Valle Central. Este resultado es concordante con el modelo propuesto por Villagrán (1995), que sobre la base de evidencia fitogeográfica y palinológica, sugiere una contracción hacia el sur del Componente Valdiviano durante el Holoceno Medio y Tardío (aproximadamente entre 10000 y 6000 años calendario AP).

CONCLUSIONES

Los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica experimentaron una reducción en sus rangos de distribución y abundancia durante las glaciaciones del Pleistoceno (Villagrán & Hinojosa, 1997). Las áreas de permanencia de taxa durante las fases frías reciben el nombre de “Refugio Glacial” (Bennett & Provan, 2008). A través de una aproximación filogeográfica, y utilizando como modelo de estudio la especie termófila de los Bosques Templado Lluviosos, *Eucryphia cordifolia*, se contrastaron dos escenarios de posibles refugios glaciales: el primero, apoyado principalmente por evidencia genética, propone aislamiento en múltiples refugios glaciales, incluyendo áreas costeras y algunas áreas libres de hielo dentro de la zona con presencia de glaciares durante la última glaciación. El segundo escenario, apoyado principalmente por evidencia fitogeográfica y palinológica, propone que la colonización postglacial tendría su origen en un refugio único, localizado en áreas costeras entre 36° S y 40° S.

La presencia de haplotipos distribuidos a través de todo el rango de distribución de *E. cordifolia* en Chile, sumado a la evidencia de ausencia de estructuración filogeográfica, permiten sugerir que el evento de expansión poblacional tendría su origen en un refugio único y no en múltiples refugios. La concentración de haplotipos raros y la mayor diversidad genética apuntan a que la zona de Cordillera Pelada (40° S, aproximadamente) corresponde al área de refugio glacial. Estos

resultados son congruentes con la hipótesis de refugio glacial costero para los Bosques Templado Lluviosos del sur de Sudamérica propuesto por Villagrán (1991). Sin embargo, este hallazgo se contrapone con la mayoría de la evidencia filogeográfica obtenida con otras especies forestales del cono sur, las que sustentan la hipótesis de múltiples refugios (Premoli, 1997; Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2001; Premoli *et al.*, 2002; Allnutt *et al.*, 2003).

A diferencia de la evidencia previa, en este trabajo se evaluó una especie con poca tolerancia a bajas temperaturas y sequías estacionales. Trabajos previos se han centrado en especies con un amplio rango distribucional, que alcanzan latitudes con menores temperaturas y mayores montos de precipitaciones (Premoli, 1997; Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2001; Premoli *et al.*, 2002; Allnutt *et al.*, 2003). Probablemente, las diferencias en tolerancia ecológica se correspondan con respuestas diferenciales de estas especies a los periodos glaciales.

DIRECCIONES FUTURAS

El contraste del patrón encontrado en *Eucryphia cordifolia* con otras especies forestales de los Bosques Templado Lluviosos de Sudamérica puede aportar evidencia independiente para refutar hipótesis de Refugio Glacial. Así por ejemplo, *Caldcluvia paniculata*, especie que presenta una dinámica distribucional similar a *E. cordifolia* según la evidencia polínica, presenta características ecológicas sutilmente distintas, relacionadas principalmente a requerimientos hídricos mayores. Alcanza su límite norte en latitudes similares a *E. cordifolia*, pero con abundancias menores, y en zonas donde la disponibilidad de agua es mayor y más regular. Asimismo, su límite sur se extiende a latitudes más altas (Donoso, 2006). Si la respuesta diferencial de los taxa forestales está mediada por sus tolerancias ecológicas, entonces en *C. paniculata* se espera encontrar un patrón similar al de *E. cordifolia*; pero, probablemente, el empobrecimiento genético hacia el norte de su rango de distribución sea más acentuado y sus poblaciones con mayor diversidad haplotípica se encuentren localizadas levemente hacia el sur de las de *E. cordifolia*.

Otra especie interesante de evaluar es *Weinmania trichosperma*, perteneciente al componente Nordpatagónico. En los registros polínicos, *W. trichosperma* presenta dinámicas similares a *E. cordifolia* en cuanto a dirección, pero generalmente con respuestas más rápidas a los cambios climáticos, probablemente, debido a que es una especie de colonización primaria en áreas perturbadas (Donoso,

2006). De acuerdo a las características ecológicas de *W. trichosperma*, se espera encontrar un patrón de distribución de la variabilidad genética similar, con empobrecimiento hacia los extremos latitudinales y con sus máximos de diversidad ubicados también en zonas costeras, asociados al centro del rango de distribución actual. Probablemente, a diferencia de *E. cordifolia*, la localización de sus picos de concentración de haplotipos se encuentre dentro de un rango latitudinal más amplio, debido a su tolerancia mayor a cambios de temperaturas y sus características de colonizador temprano en zonas perturbadas.

La evaluación de especies asociadas a otros componentes de los Bosques Templados Lluviosos, como el Nordpatagónico y Subantártico, o de los Bosques Deciduos y Esclerófilos ubicados al norte de los bosques lluviosos (Schmithüsen, 1956), es de gran importancia para intentar comprender cómo ha sido la relación histórica entre estos componentes, y las características de la conformación de las comunidades actuales. La integración de herramientas moleculares con estudios paleoecológicos, tanto polínicos como de macrorrestos, resultan fundamentales para ampliar y mejorar nuestra comprensión de la historia de las unidades vegetacionales del sur de Sudamérica.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarzua, A.M., Villagran, C. & Moreno, P.I. (2004) Deglacial and postglacial climate history in east-central isla grande de chiloé, southern chile (43 degrees s). *Quaternary Research*, **62**, 49-59
- Aceituno, P. (1988) On the functioning of the southern oscillation in the south american sector. Part i. Surface climate. *Monthly Weather Review*, **116**, 505-524
- Allnutt, T.R., Newton, A.C., Lara, A., Premoli, A., Armesto, J.J., Vergara, R. & Gardner, M. (1999) Genetic variation in *fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened south american conifer. *Molecular Ecology*, **8**, 975-987
- Allnutt, T.R., Newton, A.C., Premoli, A. & Lara, A. (2003) Genetic variation in the threatened south american conifer *pilgerodendron uviferum* (cupressaceae), detected using rapid markers. *Biological Conservation*, **114**, 245-253
- Armesto, J.J., León-Lobos, P. & Kalin-Arroyo, M.T. (1995) Los bosques templados del sur de chile y argentina: Una isla biogeográfica. in *Ecología de los Bosques Nativos de Chile*, J. J. Armesto, C. Villagran, M. K. Arroyo, Eds. (Editorial Universitaria, Universidad de Chile, Santiago, Chile, 1995), **Capítulo 1**, 23-28
- Arroyo, M.T.K., Squeo, F.A., Armesto, J.J. & Villagrán, C. (1988) Effect of aridity on plant diversity in the northern chilean andes: Results of a natural experiment. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **75**, 55-78
- Augspurger, C.K. (1986) Morphology and dispersal potential of wind-dispersed diaspores of neotropical trees. *American Journal of Botany*, **73**, 353-363
- Avise, J.C., Walker, D. & Johns, G.C. (1998) Speciation durations and pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **265**, 1707-1712
- Bekessy, S.A., Allnutt, T.R., Premoli, A.C., Lara, A., Ennos, R.A., Burgman, M.A., Cortes, M. & Newton, A.C. (2002) Genetic variation in the vulnerable and endemic monkey puzzle tree, detected using rapid markers. *Heredity*, **88**, 243-249
- Belkhir, K., Borsa, P., Chikhi, L., Raufaste, N. & Bonhomme, F. (2002) Genetix 4.04, logiciel sous windows tm pour la génétique des populations. Laboratoire génome, populations, interactions, cnrs umr 5000, université de montpellier ii, montpellier, france.
- Bennett, K.D. & Provan, J. (2008) What do we mean by 'refugia'? *Quaternary Science Reviews*, **27**, 2449-2455
- Burban, C., Petit, R.J., Carcreff, E. & Jactel, H. (1999) Rangewide variation of the maritime pine bark scale *matsucoccus feytaudi* duc. (homoptera : Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology*, **8**, 1593-1602
- Caviedes, C. (1990) Rainfall variation, snowline depression and vegetational shifts in chile during the pleistocene *Climate Change*, **16**, 94-114

- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. (2000) Tcs: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1659
- Demesure, B., Sodzi, N. & Petit, R.J. (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, **4**, 129-131
- Denton, G.H., Lowell, T.V., Heusser, C.J., Schluchter, C., Andersen, B.G., Heusser, L.E., Moreno, P.I. & Marchant, D.R. (1999) Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of llanquihue drift in the area of the southern lake district, seno reloncavi, and isla grande de chiloe, chile. *Geografiska Annaler Series a-Physical Geography*, **81A**, 167-229
- Donoso, C. (2006) *Eucryphia cordifolia* cav. *Las especies arbóreas de los bosques templados de chile y argentina*. *Autoecología* (ed. by C. Donoso Zegers), pp. 246-255.
- Dress, W.J. (1956) A review of the genus eucryphia. *Baileya*, **4**
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571-2581
- Ennos, R.A. (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M. (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491
- Flenley, J.R. (1998) Tropical forests under the climates of the last 30,000 years. In, pp. 177-197
- Grivet, D., Heinze, B., Vendramin, G.G. & Petit, R.J. (2001) Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes*, **1**, 345-349
- Hall, T.A. (1999) Bioedit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/nt. *Nucleic Acids Symposium Series*, **41**, 95-98
- Heusser, C. & Flint, R. (1977) Quaternary glaciations and environments of northern isla chiloé, chile. *Geology*, **5**, 305-308
- Heusser, C.J. (1966) Late-pleistocene pollen diagrams from the province of llanquihue, southern chile. *Proceedings of the American Philosophical Society*, **110**, 269-305
- Heusser, C.J. (1983) Quaternary pollen record from laguna de tagua tagua, chile. *Science*, **219**, 1429-1432
- Heusser, C.J. (1984) Late-glacial-holocene climate of the lake district of chile. *Quaternary Research*, **22**, 77-90
- Heusser, C.J. (1990) Ice-age vegetation and climate of subtropical chile. *Palaeogeography Palaeoclimatology Palaeoecology*, **80**, 107-127
- Heusser, C.J., Heusser, L.E. & Lowell, T.V. (1999) Paleocology of the southern chilean lake district-isla grande de chiloe during middle-late llanquihue glaciation and deglaciation. *Geografiska Annaler Series a-Physical Geography*, **81A**, 231-284
- Hewitt, G.M. (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276

- Hewitt, G.M. (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the quaternary. In, pp. 183-195
- Holling, J.T. & Schilling, D.H. (1981) Late wisconsin-wichselian mountain glaciers and small ice caps. *The last great ice sheets* (ed. by J.H. Denton and T.J. Hughes), pp. 179-206. Wiley, New York, New York.
- Jenny, B., Valero-Garces, B.L., Villa-Martinez, R., Urrutia, R., Geyh, M. & Veit, H. (2002) Early to mid-holocene aridity in central chile and the southern westerlies: The laguna aculeo record (34 degrees s). *Quaternary Research*, **58**, 160-170
- 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**, 649-658
- Lamy, F., Hebbeln, D. & Wefer, G. (1999) High resolution marine record of climatic change in mid-latitude chile during the last 28,000 years based on terrigenous sediment parameters. *Quaternary Research*, **51**, 83-93
- Librado, P. & Rozas, J. (2009) Dnasp v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, **25**, 1451-1452
- Mantel, N. (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209-220
- Marchelli, P., Gallo, L., Scholz, F. & Ziegenhagen, B. (1998) Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across argentinean southern beech *nothofagus nervosa* (phil.) dim. Et mil. Distribution area. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 642-646
- Markgraf, V., Mcglone, M. & Hope, G. (1995) Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems - a southern perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, **10**, 143-147
- Mercer, J.H. (1976) Glacial history of southernmost south america. *Quaternary Research*, **6**, 125-166
- Miller, M.P. (2005) Alleles in space (ais): Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**, 722-724
- Miller, M.P., Haig, S.M. & Wagner, R.S. (2006) Phylogeography and spatial genetic structure of the southern torrent salamander: Implications for conservation and management. *Journal of Heredity*, **97**, 561-570
- Moreno, P.I. (1997) Vegetation and climate near lago llanquihue in the chilean lake district between 20200 and 9500 c-14 yr bp. *Journal of Quaternary Science*, **12**, 485-500
- Moreno, P.I. (2002) Western patagonia: A key area for understanding quaternary paleoclimate at southern mid-latitudes *The Patagonian Icefields: A Unique Natural Laboratory for environmental and Climate Changes Studies* (eds. Cassasa, G., Sepúlveda, F., Sinclair, R.), 43-54
- Moreno, P.I. (2004) Millennial-scale climate variability in northwest patagonia over the last 15000 yr. *Journal of Quaternary Science*, **19**, 35-47
- Moreno, P.I. & León, A.L. (2003) Abrupt vegetation changes during the last glacial to holocene transition in mid-latitude south america. *Journal of Quaternary Science*, **18**, 787-800

- Moreno, P.I., Lowell, T.V., Jacobson, G.L. & Denton, G.H. (1999) Abrupt vegetation and climate changes during the last glacial maximum and last termination in the Chilean lake district: A case study from Canal de la Puntilla (41 degrees S). *Geografiska Annaler Series A-Physical Geography*, **81A**, 285-311
- Núñez-Ávila, M.C. & Armesto, J.J. (2006) Relict islands of the temperate rainforest tree *Aextoxicon punctatum* (Aextoxicaceae) in semi-arid Chile: Genetic diversity and biogeographic history. *Australian Journal of Botany*, **54**, 733-743
- Otto-Bliesner, B.L., Brady, E.C., Clauzet, G., Tomas, R., Levis, S. & Kothavala, Z. (2006) Last glacial maximum and Holocene climate in CCSM3. *Journal of Climate*, **19**, 2526-2544
- Petit, J.R., Jouzel, J., Raynaud, D., Barkov, N.I., Barnola, J.M., Basile, I., Bender, M., Chappellaz, J., Davis, M., Delaygue, G., Delmotte, M., Kotlyakov, V.M., Legrand, M., Lipenkov, V.Y., Lorius, C., Pepin, L., Ritz, C., Saltzman, E. & Stievenard, M. (1999) Climate and atmospheric history of the past 420,000 years from the Vostok ice core, Antarctica. *Nature*, **399**, 429-436
- Petit, R., Kremer, A. & Wagner, D.B. (1993) Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity*, **71**, 630-641
- Pons, O. & Petit, R.J. (1995) Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity .1. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics*, **90**, 462-470
- Pons, O. & Petit, R.J. (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics*, **144**, 1237-1245
- Posada, D. & Crandall, K.A. (2001) Intraspecific gene genealogies: Trees grafting into networks. *Trends in Ecology & Evolution*, **16**, 37-45
- Premoli, A. (2004) Variación en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Lenga). *Variación intraespecífica en las especies de los bosques templados de Chile y Argentina* (ed. by C. Donoso, A. Premoli, L. Gallo and R. Ipinza).
- Premoli, A.C. (1997) Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography*, **24**, 883-892
- Premoli, A.C., Kitzberger, T. & Veblen, T.T. (2000) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, **27**, 251-260
- Premoli, A.C., Souto, C.P., Allnutt, T.R. & Newton, A.C. (2001) Effects of population disjunction on isozyme variation in the widespread *Pilgerodendron uviferum*. *Heredity*, **87**, 337-343
- 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**, 57-66
- Premoli, A.C., Vergara, R., Souto, C.P., Lara, A. & Newton, A.C. (2003) Lowland valleys shelter the ancient conifer *Fitzroya cupressoides* in the central depression of southern Chile. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, **33**, 623-631
- Raynaud, D., Jouzel, J., Barnola, J.M., Chappellaz, J., Delmas, R.J. & Lorius, C. (1993) The ice record of greenhouse gases. *Science*, **259**, 926-934

- Rind, D. & Peteet, D. (1985) Terrestrial conditions at the last glacial maximum and climap sea-surface temperature estimates: Are they consistent? *Quaternary Research*, **24**, 1-22
- Rodríguez, R., Matthei, O. & Quezada, M. (1983) *Eucryphia cordifolia* cav. *Flora arbórea de chile* (ed. by R. Rodríguez, O. Matthei and M. Quezada).
- Rodríguez, R., Ruíz, E. & Elissetche, J.P. (2005) Familia eucryphiaceae. *Árboles en chile* (ed. by U.D. Concepción).
- Rohling, E.J., Fenton, M., Jorissen, F.J., Bertrand, P., Ganssen, G. & Caulet, J.P. (1998) Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature*, **394**, 162-165
- Samaniego, H. & Marquet, P.A. (2009) Mammal and butterfly species richness in chile: Taxonomic covariation and history. *Revista Chilena De Historia Natural*, **82**, 135-151
- Sánchez, M.I. (1988) Eucryphiaceae. *Fl. Patagónica, colecc. Ci. Inst. Nac. Tecnol. Agropecu.* (ed. by M.N. Correa), pp. 154-155.
- Schmithüsen, J. (1956) Die räumliche ordnung der chilenischen vegetation. *Bonner Geographische Abhandlungengen*, **17**, 1-86
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare iii. *American Journal of Botany*, **94**, 275-288
- Smith-Ramírez, C., Martínez, P., Nunez, M., Gonzalez, C. & Armesto, J.J. (2005) Diversity, flower visitation frequency and generalism of pollinators in temperate rain forests of chiloe island, chile. *Botanical Journal of the Linnean Society*, **147**, 399-416
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G. & Bouvet, J. (1991) Universal primers for amplification of 3 noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*, **17**, 1105-1109
- Veblen, T.T. & Ashton, D.H. (1978) Catastrophic influences on the vegetation of the valdivian andes, chile. *Vegetatio*, **36**, 149-167
- Veblen, T.T., Veblen, A. & Schlegel, F. (1979) Understorey patterns in mixed evergreen-deciduous forest in chile. *Journal of Ecology*, **67**, 809-823
- Veit, H. (1994) Estratigrafía y suelos en el centro-sur de chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **67**, 395-403
- Veit, H. & Garleff, K. (1995) Evolución del paisaje cuaternario y los suelos en chile central-sur. *Ecología de los bosques nativos de chile* (ed. by J. Armesto, C. Villagrán and M. Kalin), pp. 29-48. Editorial Universitaria, Santiago.
- Villa-Martínez, R. & Villagrán, C. (1997) Vegetational history of the swamp forests of the central chilean coast during the mid- and late holocene. *Revista Chilena De Historia Natural*, **70**, 391-401
- Villagrán, C. (1985) Análisis palinológico de los cambios vegetacionales durante el tardiglacial y postglacial en chiloé, chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **58**, 57-69
- Villagrán, C. (1988a) Expansion of magellanic moorland during the late pleistocene - palynological evidence from northern isla de chiloe, chile. *Quaternary Research*, **30**, 304-314

- Villagrán, C. (1988b) Late quaternary vegetation of southern isla grande-de-chiloe, chile. *Quaternary Research*, **29**, 294-306
- Villagrán, C. (1990) Glacial climates and their effects on the history of the vegetation of chile - a synthesis based on palynological evidence from isla-de-chiloe. *Review of Palaeobotany and Palynology*, **65**, 17-24
- Villagrán, C. (1991) History of the temperate forests of southern chile during the late-glacial and holocene. *Revista Chilena de Historia Natural*, **64**, 447-460
- Villagrán, C. (1995) Quaternary history of the mediterranean vegetation of chile. *Ecology and biogeography of mediterranean ecosystem in chile, california and australia* (ed. by M. Kalin, P. Zedler and M. Fox), pp. 3-20. Springer Verlag, New York.
- Villagrán, C. (2001) A model for the history of vegetation of the coastal range of central-southern chile: Darwin's glacial hypothesis. *Revista Chilena de Historia Natural*, **74**, 793-803
- Villagrán, C. & Hinojosa, L.F. (1997) History of the forests of southern south america .2. Phytogeographical analysis. *Revista Chilena De Historia Natural*, **70**, 241-267
- Villagrán, C. & Hinojosa, L.F. (2005) Esquema biogeográfico de chile. *Regionalización biogeográfica en iberoamérica y tópicos afines: Primeras jornadas biogeográficas de la red iberoamericana de biogeografía y entomología sistemática* (ed. by J. Llorente and J.J. Morrone), pp. 551-557. Las Prensas de Ciencias, UNAM, Mexico, D.F.
- Villagrán, C., Le-Quesne, C., Aravena, J.C., Jimenez, H.E. & Hinojosa, L.F. (1998) El rol de los cambios de clima del cuaternario en la distribución actual de la vegetación de chile central-sur *Bamberger Geographische Schriften* **15**, 227-242
- Villagrán, C. & Varela, J. (1990) Palynological evidence for increased aridity on the central chilean coast during the holocene. *Quaternary Research*, **34**, 198-207
- Wakasugi, T., Tsudzuki, J., Ito, S., Nakashima, K., Tsudzuki, T. & Sugiura, M. (1994) Loss of all ndh genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *pinus-thunbergii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 9794-9798
- Weising, K. & Gardner, R.C. (1999) A set of conserved pcr primers for the analysis of simple sequence repeat polymorphisms in chloroplast genomes of dicotyledonous angiosperms. *Genome*, **42**, 9-19
- Wright, S. (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354

Anexo 1

Protocolo de extracción DNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen)

- 1.- Agregar aproximadamente 20 mg de tejido seco en un microtubo con un rodamiento.
- 2.- Poner en la moledera por 5 minutos, hasta convertir en polvo todo el tejido.
- 3.- Traspasar el polvo a un tubo de 1.7 uL.
- 4.- Calentar Buffer AP1 y agregar 400 uL y 4 uL de RNasa A, mezclar con el polvo y poner en vortex.
- 5.- Incubar a 55°C por 45 minutos. Mezclar 2 o 3 veces durante la incubación.
- 6.- Agregar 130 uL de buffer AP2, mezclar e incubar por 5 minutos en hielo.
- 7.- Centrifugar por 5 minutos a 13.200 rpm.
- 8.- Traspasar el sobrenadante a la columna ubicada en el “tubo lila”. Centrifugar por 2 minutos a 14.000 rpm.
- 9.- Transferir a un nuevo tubo sin dañar el pellet (aprox 350 uL). Medir la cantidad de líquido recuperado.
- 10.- Agregar 1.5 X de buffer AP3/E y mezclar con la pipeta.
- 11.- Pipetear 650 uL, incluyendo algún precipitado y traspasar a una columna de tubo transparente. Centrifugar durante 1 minuto a 8.000 rpm. Botar el tubo con el líquido y cambiar la columna de tubo.
12. Repetir el paso 11 con el líquido sobrante.
- 13.- Cambiar la columna a un tubo nuevo de 2 mL y agregar 500 uL de buffer AW. Centrifugar por 1 min a 8.000 rpm. Desechar el tubo.

14.- Eliminar el fluido y agregar nuevamente 500 uL a la columna, centrifugar por 2 minutos a 14.000 rpm hasta secar la membrana.

15.- Transferir la columna a un nuevo tubo de 1.7. Agregar 100 (50) uL de buffer AE directamente sobre la membrana, incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm.

16.- Repetir el paso 15.

Anexo 2

Purificación con Etanol

- 1.- Agregar 500 uL de Etanol 100% y dejar durante toda la noche a -20°C.
- 2.- Centrifugar por 20 minutos a 14000 rpm a -20°C.
- 3.- Eliminar el etanol cuidando de no perder el pellet.
- 4.- Agregar 500 uL de Etanol 70% y centrifugar por 20 minutos a 14000 rpm a -20°C.
- 5.- Eliminar el Etanol cuidando de no perder el pellet.
- 6.- Preocuparse de que no quede nada de Etanol, evaporar en incubadora.
- 7.- Agregar 100 uL de Agua destilada. Dejar 1 hora en incubadora a 45°C o toda la noche a T° ambiente.

Anexo 3. *Fst* de pares Los valores de *Fst* pareados se encuentran bajo la diagonal de ceros. Estos índices están basados en frecuencias de haplotipos de ADN cloroplastidial entre poblaciones de *Eucryphia cordifolia*. Los tamaños muestrales son de al menos 6 individuos por población (ver Tabla 1). La significancia obtenida por permutaciones de los *Fst* se reportan en la matriz sobre la diagonal de ceros. El signo + indica $p < 0.5$ y el signo - indica $p > 0.5$.

Localidad	U1	U2	U3	U4	U5	U6	U7	U8	U9	U10	U11	U12	U13	U14	U15	U16	U17	U18	U19	U20	U21	U22
U1	0	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-
U2	0.000	0	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
U3	0.889	0.889	0	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
U4	0.521	0.521	0.101	0	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U5	0.800	0.800	0.050	0.136	0	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
U6	0.640	0.640	-0.043	-0.115	0.021	0	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U7	0.352	0.352	0.291	-0.045	0.243	0.016	0	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U8	0.650	0.650	0.091	-0.106	0.100	-0.129	-0.009	0	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U9	0.167	0.167	0.305	-0.023	0.299	0.069	-0.081	0.039	0	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U10	1.000	1.000	0.933	0.770	0.863	0.775	0.701	0.825	0.649	0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
U11	0.100	0.100	0.489	0.096	0.419	0.229	-0.033	0.165	-0.087	0.800	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U12	0.595	0.595	0.022	-0.121	0.075	-0.159	-0.007	-0.120	0.030	0.779	0.172	0	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
U13	0.240	0.240	0.419	0.032	0.381	0.146	-0.058	0.057	-0.092	0.776	-0.110	0.098	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U14	0.167	0.167	0.496	0.076	0.462	0.221	0.003	0.175	-0.094	0.841	-0.130	0.157	-0.084	0	-	-	-	-	-	-	-	-
U15	0.200	0.200	0.421	0.011	0.400	0.150	-0.035	0.100	-0.114	0.822	-0.133	0.088	-0.105	-0.178	0	-	-	-	-	-	-	-
U16	0.267	0.267	0.282	-0.090	0.276	0.000	-0.133	-0.029	-0.142	0.725	-0.091	-0.038	-0.118	-0.104	-0.140	0	-	-	-	-	-	-
U17	0.133	0.133	0.548	0.109	0.497	0.256	-0.009	0.190	-0.098	0.847	-0.163	0.194	-0.129	-0.158	-0.160	-0.105	0	-	-	-	-	-
U18	0.000	0.000	0.691	0.272	0.627	0.419	0.134	0.392	-0.011	0.905	-0.094	0.359	0.010	-0.098	-0.075	0.027	-0.119	0	-	+	-	-
U19	0.200	0.200	0.421	0.011	0.400	0.150	-0.035	0.100	-0.114	0.822	-0.133	0.088	-0.105	-0.178	-0.200	-0.140	-0.160	-0.075	0	-	-	-
U20	0.571	0.571	0.242	-0.076	0.215	-0.039	-0.050	-0.139	-0.017	0.816	0.072	-0.056	-0.030	0.090	0.025	-0.080	0.085	0.295	0.025	0	-	-
U21	0.514	0.514	0.115	-0.142	0.143	-0.105	-0.061	-0.163	-0.046	0.800	0.045	-0.127	-0.029	0.027	-0.042	-0.114	0.053	0.238	-0.042	-0.144	0	-
U22	0.400	0.400	0.200	-0.115	0.225	-0.029	-0.060	-0.067	-0.087	0.800	-0.029	-0.073	-0.057	-0.076	-0.133	-0.143	-0.033	0.114	-0.133	-0.082	-0.167	0