

UCH-FC  
MAG-Ebe  
M-117  
K.F  
C.I



**FIGEOGRAFÍA DE WEINMANNIA TRICHOSPERMA  
CAY.: HERENCIA GENÉTICA DE UNA HISTORIA  
GLACIAL EN EL SUR DE SUDAMÉRICA**

**Tesis**

Entregada A La  
Universidad De Chile  
En Cumplimiento Parcial De Los Requisitos  
Para Optar Al Grado De

Magíster en Ciencias con Mención en Ecología Y Biología  
Evolutiva

Facultad De Ciencias

Por

Paz Nicole Montenegro Urbina

Junio, Año 2011

Director de Tesis Dr: Luis Felipe Hinojosa Opazo  
Co-Directora de Tesis Dra: María Fernanda Pérez  
Trautmann

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGÍSTER

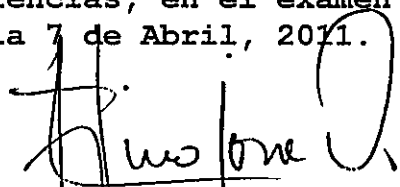
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por la candidata.

Paz Nicole Montenegro Urbina

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología Molecular Celular y Neurociencias, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 7 de Abril, 2011.

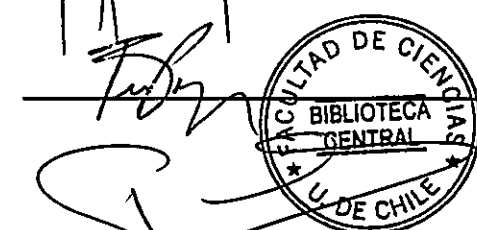
Director de Tesis:

Dr. Luis Felipe Hinojosa O.



Co-Directora de Tesis

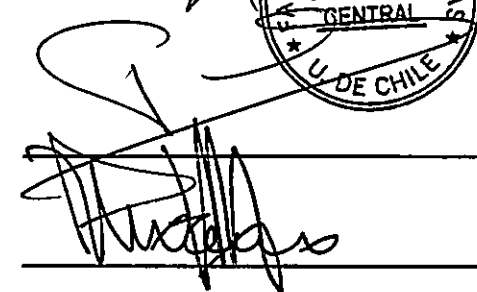
Dra. María Fernanda Pérez T.



FACULTAD DE CIENCIAS  
BIBLIOTECA  
GENERAL  
U. DE CHILE

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Elie Poulin



Dr. Patricio Moreno

## ÍNDICE DE MATERIAS

<b>Lista de Tablas</b>	ii
<b>Lista de Figuras</b>	iv
<b>Lista de Nomenclatura</b>	vi
<b>Resumen</b>	vii
<b>Abstract</b>	ix
<b>Introducción</b>	1
Refugios Glaciales	2
Hipótesis de Refugios Glaciales en Sudamérica	5
- Patrones biogeográficos y registros paleoecológicos	5
- Evidencias genéticas	8
Objetivo de trabajo	15
Hipótesis de trabajo y predicciones	15
Objetivos específicos	16
<b>Materiales y Métodos</b>	17
Colecta de muestras	17
Extracción de DNA	20
Análisis de secuencias	22
Diferenciación genética	23
<b>Resultados</b>	25
Análisis de Secuencias	25
Diferenciación genética	30
<b>Discusión</b>	36
Modelo de expansión	40
<b>Conclusiones</b>	43
<b>Bibliografía</b>	46
<b>Anexo 1</b>	xi



## RESUMEN BIOGRÁFICO



Soy Paz Nicole Montenegro Urbina. Nací el 3 de Abril, 1985 en Coya, VI Región, Chile. Mis estudios básicos y medios los cursé en el colegio Sagrado Corazón de las Hermanas Esclavas del Corazón de Jesús, Rancagua. Pregrado de mi educación superior lo realicé en la Facultad de Ciencias en Universidad de Chile, obteniendo el grado de Licenciado en Ciencias, mención en Biología. Entrego esta tesis para cumplir los requisitos conducentes al grado de Magíster en Ciencias, mención en Ecología y Biología Evolutiva en la Universidad de Chile. Actualmente me encuentro realizando estudios conducentes al grado de Doctor en Ciencias, mención Ecología y Biología Evolutiva en la misma casa de estudios, becada por el programa de formación de capital humano avanzado de CONICYT.

## AGRADECIMIENTOS



A mis padres, Germán y Angélica, por ser mi nido y apoyo incondicional en la vida. A mis hermanos, Ivonne y Uriel, por ser maestros, amigos, consejeros y cómplices. A Ignacio, por ser la luz, melodía y sabor de mis días.

A mis amigos y compañeros(as) de laboratorio, por la ayuda prestada y las sonrisas del día a día.

A mi tutor, Dr. Luis Felipe Hinojosa, por el incondicional apoyo, guía, confianza y paciencia; pero por sobre todo, por abrirme las puertas a la fascinante historia natural de Sudamérica.

A mi cotutora, Dra. María Fernanda Pérez, por sus consejos y sugerencias en la formación académica y por su enorme cariño en el día a día.

A mi comisión, Dr. Poulin y Dr. Moreno, por sus comentarios precisos que hicieron de éste un mejor trabajo.

Al financiamiento otorgado por los proyectos FONDECYT 1060041 y 1090339, ICM P05-002, PFB -23 CONICYT, y financiamiento para becas de cursos y congresos otorgados por AGA y RLB.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1 Sitios de colecta de material vegetal de *Weinmannia trichosperma* y sus georeferencias. PN: Parque Nacional; MN: Monumento Nacional; RN: Reserva Natural; SP: Sitio Prioritario; CI: Centro de Investigación; PP: Parque Privado.

Tabla 2.2. Partidores utilizados para testear la variabilidad genética de *Weinmannia trichosperma*. Los pares de partidores destacados con negrita obtuvieron producto PCR y los con cursiva no.

Tabla 3.1. Ubicación de los sitios polimórficos en el alineamiento de la secuencia de cpDNA en *Weinmannia trichosperma* utilizando los partidores universales trnS-trnG (Shaw et al. 2007). La secuencia modelo corresponde a H1. InDels son representadas con un signo (-).

Tabla 3.2. Frecuencia de los haplotipos encontrados en el rango de distribución de *Weinmannia trichosperma*. En negrita se encuentran el número absoluto de los haplotipos encontrados y abajo, en cursiva, su frecuencia relativa.

Tabla 3.3. Índices de diversidad por localidad y en total: Número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), número de haplotipos (K), y número promedio de diferencias entre pares de secuencias (II).

Tabla 3.4 Índices 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.  $h_S$  y  $v_S$  son la diversidad intrapoblacional promedio y  $h_T$  y  $v_T$  son la diversidad total.

Tabla 3.5. Valores de  $F_{ST}$  por sitio de muestreo bajo la diagonal. Sobre la diagonal se indica con un (+) valores significativos ( $p < 0.05$ ) y con (-) valores no significativos ( $p > 0.05$ ).

Tabla 3.6. Tabla de AMOVA de los grupos encontrados por SAMOVA.

Tabla 3.7. Valores de  $F_{ST}$  entre los grupos obtenidos por SAMOVA. N: Nahuelbuta (T1, T2 y T3), AN: Andes Norte (T4 y T5), S: Sur (T6 a T18). Los valores de  $F_{ST}$  se muestran bajo la diagonal en negrita y los p-valores en cursiva sobre la diagonal. Los valores significativos se indican con (\*).

Tabla 3.8. Valores de índices de neutralidad ( $D$  y  $FS$ ) para las poblaciones de *W. trichosperma* encontradas por SAMOVA.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. Extensión del hielo para el Último Máximo Glacial (UMG) en la Cordillera de los Andes (modificado de Hollin & Schilling, 1981). Línea entera representa el margen del avance del hielo durante el UMG y sombreado representa la presencia de hielo en la actualidad.

Figura 1.2. Ubicación de suelos rojos arcillosos (nitisoles) con datación de inicios del Cuaternario (sombra punteada). Estas localidades se postulan como evidencia geomorfológica que para postular refugios glaciares para el UMG por Veit y Garleff. (Villagrán & Armesto 2005).

Figura 1.3. Modelo de distribución de refugios para Coníferas y los bosques Valdiviano, Nordpatagónico, Subantártico y Tundras durante el UMG (aproximadamente 18.000 años AP), Tardiglacial (aproximadamente 11.000-10.000 años AP), y Holoceno (actual interglacial), según evidencia palinológica y de macrorrestos fósiles (Villagrán. & Armesto 2005).

Figura 1.4. Distribución actual de *Weinmannia trichosperma* en sombreado (modificado de Donoso 2006).

Figura 1.5. Morfología de *Weinmannia trichosperma*. a) Individuo adulto; b) Detalle de morfología foliar; c) Flores en panícula; d) Hojas y frutos y e) Semillas

Figura 2.1 Sitios de colecta de *Weinmannia trichosperma* para este estudio. Círculos azules indican los sitios de colecta, donde las georreferencias específicas se detallan en la Tabla 2.1. Círculos rojos indican la



presencia de *Weinmannia trichosperma* en registros de herbario de la Universidad de Concepción.

Figura 3.1. Distribución geográfica de los haplotipos encontrados para el par de partidores trnS-trnG (Shaw et al., 2007). Los distintos colores representan la identidad de los haplotipos encontrados y la proporción de los colores en el gráfico de torta, las frecuencias.

Figura 3.2. Red de haplotipos para *Weinmannia trichosperma* obtenidos mediante MJ y MP. Colores distintos identifican a los diferentes haplotipos. Las líneas perpendiculares entre haplotipos representan los pasos mutacionales que separan un haplotipo de otro. El haplotipo identificado como ancestral se representa con un cuadrado. Los tamaños de las figuras representan las frecuencias de los haplotipos.

Figura 3.3. Estructuración geográfica de la distribución actual de *Weinmannia trichosperma* según análisis de SAMOVA. El grupo Nahuelbuta está representado en verde, Andes Norte en rojo y Sur en azul.

Figura 3.4. Barrera al flujo génico, identificado por Monmonier (en púrpura). En ambas figuras, el eje X corresponde a longitud y el eje Y a latitud en según las georreferencias de las coordenadas geográficas. En el gráfico(a), los puntos azules representan los sitios de colecta y el polígono de línea roja, el área geográfica analizada. En la figura b) se representa la barrera al flujo génico en un mapa.

Figura 3.5 Paisaje genético relacionado con las distancias geográficas en cpDNA en *W. trichosperma*. Los valores de mayor distancia genética en áreas pequeñas se representan con picos elevados y de color azul, y valores de menor distancia genética en grandes áreas como depresiones de color amarillo.

## LISTA DE NOMENCLATURA

**UMG:** Último Máximo Glacial

**<sup>14</sup>C AP:** Años radiocarbónicos antes del presente

**PCR:** (*Polymerase Chain Reaction*)

Reacción en cadena de Polimerasa

**DNA:** Ácido Desoxirribonucleico

**cpDNA:** Ácido Desoxirribonucleico cloroplastidial

**Indel:** Inserción/delección de base

**UV:** Ultra Violeta (luz)

**m:** metros

**g:** gramos

**μL:** Microlitros

**μM:** Micromolar

**ng:** Nanogramos

**°C:** Grados Celsius

**°S:** Grados Sur (Latitud)

**°W:** Grados Oeste (Longitud)

**MP:** Máxima Parsimonia

**MJ:** Median Joining

**SAMOVA:** (Structure Analysis of Molecular Variance) Análisis de Estructuración de la Varianza Molecular

**rpm:** Revoluciones por minuto

## RESUMEN

Los cambios climáticos y geomorfológicos asociados a los ciclos glaciales e interglaciales que caracterizaron al Cuaternario durante el Pleistoceno Tardío se han propuesto como uno de los principales modeladores del patrón de distribución actual de especies de los Bosques Templados del Sur de Sudamérica. En Chile, y como resultado de los cambios climáticos durante el Último Máximo Glacial, los taxa forestales vasculares habrían contraído sus rangos de distribución en áreas de refugio en la Cordillera de la Costa, y expandido su rango de distribución hacia el sur a medida que los hielos retrocedían y las condiciones climáticas se tornaron más cálidas. Esta hipótesis de proceso de contracción y posterior expansión tendría sustento en evidencias geomorfológicas; patrones biogeográficos; registro fósil y evidencia genética. Este postulado ha sido refutado recientemente por evidencia genética proveniente principalmente de taxa criófilos. A partir de esta evidencia, se ha postulado que los taxa forestales vasculares habrían sobrevivido en pequeños y múltiples refugios glaciales ubicados en ambas laderas de la Cordillera de los Andes, Depresión Intermedia y Cordillera de la Costa, incluyendo áreas que habrían estado bajo la influencia directa del hielo.

En esta tesis se puso a prueba la hipótesis de refugio glacial, utilizando como modelo de estudio filogeográfico *Weinmannia trichosperma*, especie del bosque

Nordpatagónico de amplia distribución con tolerancia a condiciones de baja temperatura. Así, el objetivo principal del trabajo fue la construcción de un modelo de expansión poblacional bajo un escenario postglacial.

La concentración de la diversidad genética en el área de Cordillera de Nahuelbuta y la escasa distancia genética entre haplotipos, sugiere un área de refugio glacial única, centrado en 40° S en Cordillera de la Costa y Depresión Intermedia, siendo la distribución actual producto de una expansión desde esta zona. La presencia de una barrera al flujo génico se explica debido al ascenso de pisos vegetacionales en el norte de la distribución.

La ruta de colonización desde el refugio glacial costero habría avanzado por los Andes y la Depresión Intermedia a medida que los hielos se retiraban, alcanzando los 39°S en los Andes y 41°S en Depresión intermedia en la Región de los Lagos alrededor de los 11000 <sup>14</sup>C AP. Desde esta zona continuó la expansión hacia el sur y a medida que aumentaban las temperaturas, los individuos ascendieron altitudinalmente por las Cordilleras y avanzaron rápidamente a latitudes más altas por la Depresión Intermedia, llegando a la Isla Grande de Chiloé y a su límite sur de distribución actual a los 10000 años <sup>14</sup>C.

## ABSTRACT

Quaternary climatic variation has generated historical expansions and contractions of species ranges, with fragmentation and population bottlenecks. In southern South America, two hypotheses concerning location and isolation of single versus several glacial refugia for temperate forest were proposed. In this study, these hypotheses were refuted using a phylogeographic approach in a North Patagonian rain forest species *Weinmannia trichosperma*. Leaf tissue of 144 individuals in 18 localities were analyzed to test the responses of population to historical north-south shifts of habitat associated with glacial history by performing genetic analyses on sequences of trnS-trnG noncoding region of cpDNA. The concentration of genetic diversity in the area of Nahuelbuta Range and the low genetic distance between haplotypes, suggest a single glacial refugia centered at 40°S in Coastal Range and Central Depression. Modern distribution comes from an expansion process from this area. The presence of a barrier to gene flow is explained due to the altitudinal range shifting upwards in the north of latitudinal distribution. The expansion from the coastal glacial refugia would have moved through the Andes and the Central Depression as the ice sheet retreated, reaching 39°S in the Andes and 41°S in Central Depression in the Lake District around 11000 <sup>14</sup>C. From there continued to expand southward and as temperatures increased, individuals raised altitudinally through the Ranges and advanced rapidly to higher

latitudes by the Central Depression, reaching Isla Grande de Chiloé and the southern limit of current distribution at 10000  $^{14}\text{C}$  years.

## INTRODUCCIÓN

El Cuaternario (2.6 Ma al presente) se caracteriza por repetidos ciclos glaciales e interglaciales en todo el mundo. Durante las glaciaciones, grandes volúmenes de hielo se acumularon en los continentes y las zonas climáticas fueron comprimidas hacia el Ecuador (Hewitt, 2000). Los principales cordones montañosos del mundo acumularon considerables volúmenes de hielo, por lo que se redujo los niveles del mar alrededor de 120m (Rohling et al., 1998). A nivel de la biota continental, el descenso de las temperaturas habría generado descensos de los pisos de vegetación y contracción de rangos distribucionales especialmente en taxa frío intolerantes (Hewitt, 2000).

Masivos cambios climáticos han tenido un profundo efecto en la distribución global de especies y los bosques del sur de Sudamérica no serían la excepción. Durante el Cenozoico Tardío, los Andes del Cono Sur habrían registrado de 18 a 20 ciclos glaciales e interglaciales (Graham, 2009). Los repetidos avances de glaciares por la Cordillera de los Andes en latitudes medias, y subsecuentes cambios climáticos y procesos edáficos asociados, como erosión por actividad glaciofluvial y por soliflucción, han determinado en gran medida los patrones modernos de la distribución vegetal de Chile y Argentina (Villagrán & Hinojosa, 2005).

De particular interés es el Último Máximo Glaciar (UMG), datado entre 29.400 y 14.450 <sup>14</sup>C AP con una extensión glacial que habría cubierto la totalidad de la superficie

continental de Chile al sur de 43°S (Figura 1.1), con depresiones de temperatura estimadas entre 6-8°C (Denton et al., 1999) y aumento de aportes de precipitación debido al cambio de dirección hacia el norte y/o intensificación de los vientos del Oeste (Moreno et al., 1999; Moreno & Leon, 2003). El avance de los glaciares habría ocupado dos tercios de la superficie actual de bosques, reduciendo dramáticamente el hábitat disponible debido directamente a la superficie cubierta de hielo e indirectamente por los efectos periglaciales, como actividad glaciofluvial y solifluxión (Veit & Garleff, 1996).

### *Refugios Glaciales*

Una ineludible consecuencia de los ciclos glaciales-interglaciales son grandes cambios en la abundancia y distribución de organismos vivos, los cuales varían en regiones tropicales, templadas y boreales (Hewitt, 2000). El concepto de refugio y sus derivados, ha sido crucial en el entendimiento de los cambios de distribución y abundancia de organismos, especialmente en respuesta a los cambios climáticos del Cuaternario, donde refugio hace referencia a la persistencia de biota en un espacio geográfico que puede albergar y mantener comunidades cuando las condiciones climáticas generales no son favorables, por lo que refugio glacial es el área con microclimas más cálidos y húmedos que permitirían la sobrevivencia de especies de latitudes medias-altas en épocas glaciales (Bennet & Provan, 2008).

Una pregunta central en biogeografía es la localización de áreas de refugio glacial para taxa frío intolerantes, donde varias aproximaciones han sido utilizadas para tratar de ubicar y describir estas áreas. Los registros paleoecológicos pueden dar datos



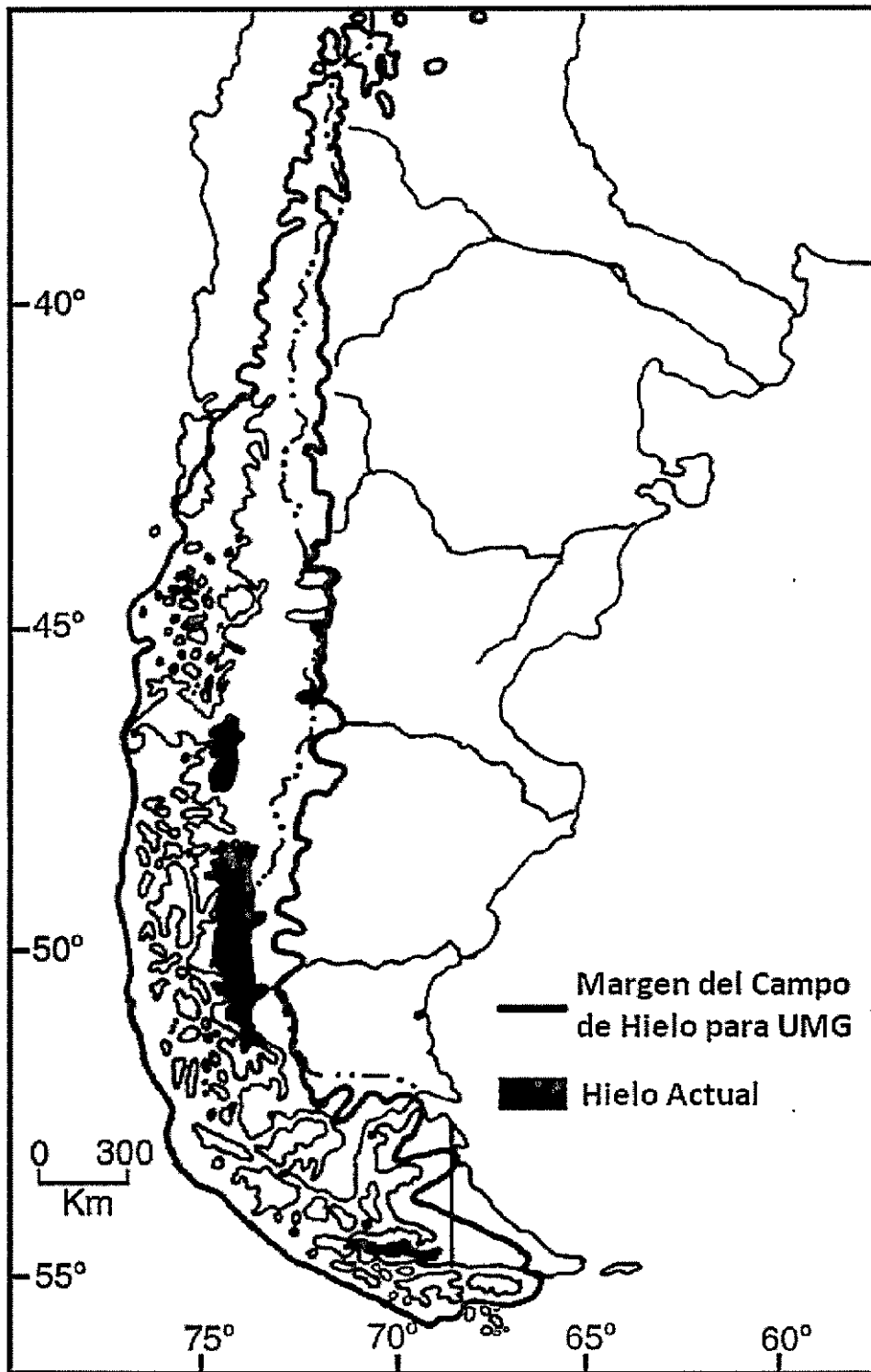


Figura 1.1. Extensión del hielo para el Último Máximo Glacial (UMG) en la Cordillera de los Andes (modificado de Hollin & Schilling, 1981). Línea entera representa el margen del avance del hielo durante el UMG y sombreado representa la presencia de hielo en la actualidad.

precisos del dónde y cuándo se ubicaron las especies en el pasado trabajando con fósiles in situ y con dataciones radiométricas, mientras que los datos genéticos aportan información sobre cambios en tamaños poblacionales en el pasado y posibles áreas de refugio glacial, donde la concentración de mayor diversidad genética en distintos tipos de organismos han sido identificadas como áreas de refugio.

Eventos como fragmentación y expansión de rangos de distribución y drásticas reducciones del tamaño poblacional tienen una gran influencia en los patrones de distribución de la variabilidad genética intraespecífica de DNA no codificante. Los ciclos glaciales-interglaciales afectaron intermitentemente al tamaño poblacional y distribución de especies no criófilas, con disminuciones en épocas frías y subsecuentes expansiones en épocas más cálidas. Esta dinámica favorece la eliminación de alelos con poca frecuencia en épocas de contracción (“cuellos de botella”) y cambios en las frecuencias durante la expansión, debido a un efecto fundador en la vanguardia colonizadora. Usualmente, se relacionan zonas de mayor diversidad genética en la actualidad como ancestrales, las cuales darían origen a poblaciones modernas menos diversas debido a efecto fundador. Estas poblaciones derivadas carecen de alelos presentes en la población original y además poseen frecuencias alélicas distintas, ya que se han originado a partir de una pequeña muestra de individuos que no era representativa de la diversidad genética original (Mayr, 1942).

Las huellas genéticas se interpretan en un contexto histórico, otorgándonos una aproximación alternativa a la palinológica para las reconstrucciones paleoecológicas según análisis de diversidad genética (Avice, 2000). Actualmente, marcadores de DNA cloroplastidial (cpDNA) han sido muy útiles en reconstruir rutas post-glaciales de

colonización en muchos organismos (Taberlet et al, 1998; Hewitt, 2000). Debido a la relativamente baja variabilidad del DNA mitocondrial en plantas (Palmer, 1992), cpDNA ha sido frecuentemente utilizado en estudios ecológicos, ya que es heredado por vía materna en la mayoría de Angiospermas (Rajora and Dancik, 1992; Dumolin et al, 1995) y en raras ocasiones recombina, por lo que se puede seguir la línea materna sin influencia genética del polen.

A continuación, se revisarán los antecedentes paleoecológicos, biogeográficos y genéticos que tratan de localizar el o los sitios de refugio glacial y sus posteriores rutas de colonización para la biota durante el Cuaternario para los bosques templados del sur de Sudamérica.

### *Hipótesis de Refugios Glaciares en Sudamérica*

#### - Patrones biogeográficos y registros paleoecológicos

Los patrones de distribución de especies han sido explicados por los cambios climáticos del Cuaternario, los cuales condicionaron el patrón de riqueza de la biota en Chile, a pesar de tener historias filogenéticas y requerimientos fisiológicos distintos (Samaniego & Marquet, 2009). Dos de estos patrones observados en la flora son (i) notables discontinuidades en la distribución de sus especies, con formaciones aisladas de vegetación en cimas de cerros y en quebradas costeras (Villagrán & Hinojosa, 1997; Villagrán & Armesto 2005) y (ii) concentración de especies vasculares en Cordillera de la Costa entre los ríos Maule y Biobío (36°- 40° S), donde se encuentran entre el 50-70% de la riqueza de especies de flora vascular. Actualmente esta zona corresponde a la

interfase entre el clima mediterráneo y el clima templado (Villagrán & Hinojosa, 1997). La observación de estos patrones, especialmente en la Cordillera de la Costa, fue la primera aproximación a postular esta zona como un área de refugio glacial durante el Cuaternario.

Relativo a datos estratigráficos, Veit y Garleff (1996) describen áreas con posible mantención de sustrato y vegetación que datan de principios del Cuaternario con ausencia de huellas periglaciales (soliflucción y actividad glaciofluvial). Estos suelos rojos arcillosos (nitisoles) se ubican en el extremo noroeste en la Isla Grande de Chiloé, la Cordillera de Nahuelbuta, Pelada y del Sarao en la Costa; y en los faldeos de la Cordillera de los Andes cercanos a la ciudad de Linares (Figura 1.2). Estos lugares serían idóneos para ubicar geográficamente regiones que pudiesen albergar la biota durante los repetidos avances de los hielos durante el Cuaternario. Congruentemente y sobre la base de estudios palinológicos (Villagrán, 1991) realizados principalmente en testigos lacustres de la Depresión Intermedia en las regiones X y XIV de Chile, Villagrán (1991; 2001) propuso tres posibles áreas de refugio del bosque templado, durante la última glaciación: (i) Suelos de Cordilleras de Piuché y Pelada y montañas bajas del suroeste de la Isla de Chiloé. (ii) Suelos de sectores no glaciados de la costa sur de Llanquihue y noroeste de Chiloé (iii) Suelos de Cordillera de Nahuelbuta, Depresión Intermedia y faldeos de los Andes en la región de los Ríos (Figura 1.3).

En resumen, la evidencia palinológica, persistencia de suelos y patrones biogeográficos actuales, permitieron postular a la Cordillera de la Costa como el principal refugio glacial para los bosques templados de Sudamérica (Villagrán, 2001; Villagrán & Armesto, 2005).

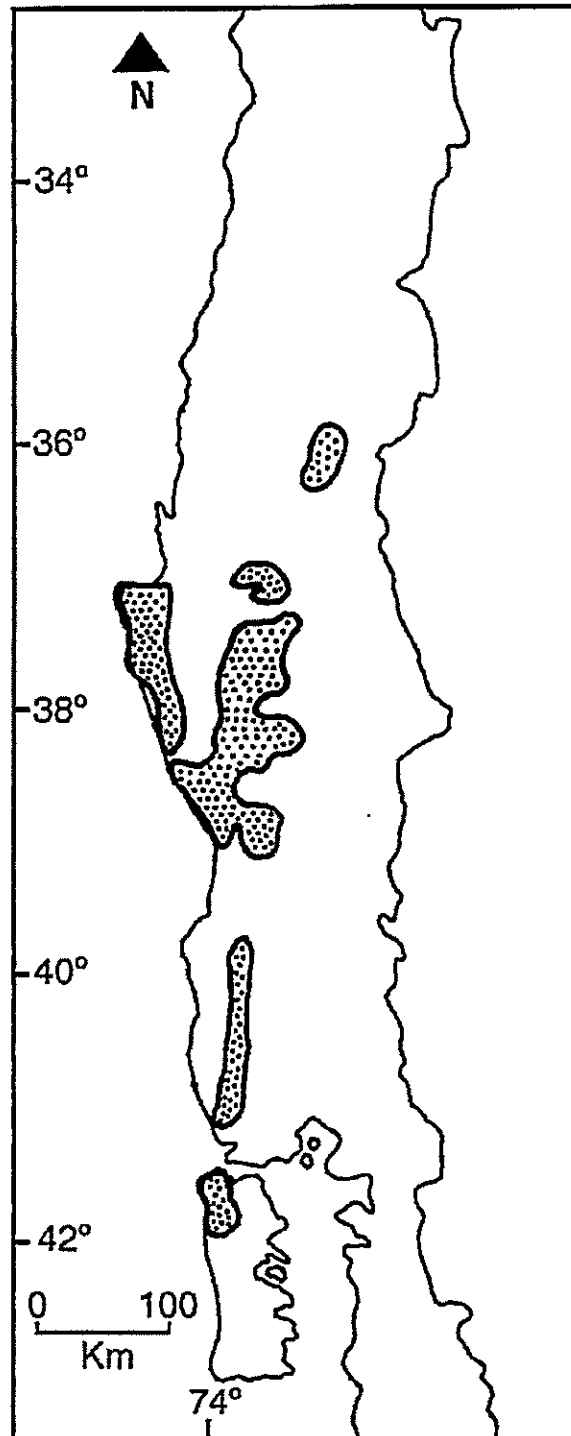


Figura 1.2. Ubicación de suelos rojos arcillosos (nitisoles) con datación de inicios del Cuaternario (sombra punteada). Estas localidades se postulan como evidencia geomorfológica que para postular refugios glaciares para el UMG por Veit y Garleff. (Villagrán & Armesto, 2005).

### Cordillera de la Costa, Chile (38°-48°S)

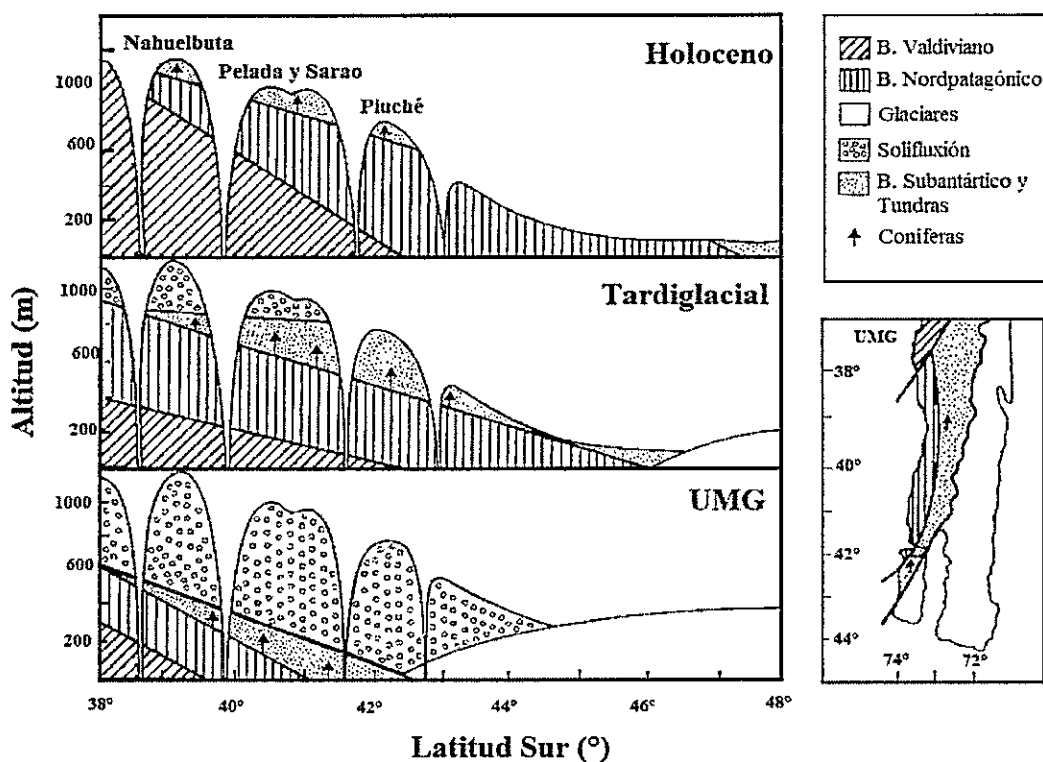


Figura 1.3. Modelo de distribución de refugios para Coníferas y los bosques Valdiviano, Nordpatagónico, Subantártico y Tundras durante el UMG (aproximadamente 18.000 años AP), Tardiglacial (aproximadamente 11.000-10.000 años AP), y Holoceno (actual interglacial), según evidencia palinológica y de macrorrestos fósiles (Villagrán. & Armesto, 2005).

#### - Evidencias Genéticas

Resultados de estudios genéticos realizados en taxa frío tolerantes dominantes en los bosques templados, como *Araucaria araucana*, *Pilgerodendron uviferum*, *Fitzroya cupressoides*, *Podocarpus nubigena*, y en angiospermas del género *Nothofagus* entre otros, han presentado evidencia de que estas especies podrían haber sobrevivido en áreas de influencia glacial. La alta diversidad y distancia genética de individuos, con centros de diversidad separados, cada uno de ellos con haplotipos exclusivos, se ha interpretado como evidencia de pequeños y múltiples refugios glaciales donde pequeñas poblaciones habrían permanecido aisladas por prolongados periodos de tiempo (Premoli, 1997;

Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2001; Bekessy *et al.* 2002; Premoli *et al.*, 2002; Allnutt *et al.*, 2003; Paula & Leonardo, 2006; Ruiz *et al.*, 2007, Souto & Premoli, 2007; Azpilicueta, Marchelli & Gallo, 2009; Mathiasen & Premoli, 2010; Quiroga & Premoli, 2010). Esta evidencia permite postular que la lengua glacial no habría cubierto totalmente el área propuesta para UMG, dejando áreas descubiertas que permitirían el desarrollo de pequeños y múltiples refugios glaciales ubicados en ambas laderas de la Cordillera de los Andes bajo la directa influencia del hielo. Estudios recientes además muestran un quiebre filogeográfico importante al sur de los 42°S en organismos como *N. pumilio* y especies de roedores de la Patagonia (Lessa, D'Elia & Pardinas 2010, Mathiasen & Premoli 2010) y se ha interpretado como una consecuencia del aislamiento entre antiguas poblaciones ubicadas en múltiples áreas bajo la influencia glacial.

Es importante recalcar que los estudios genéticos se han concentrado principalmente en taxa frío tolerantes del bosque templado, principalmente coníferas y especies del género *Nothofagus* que hoy habitan en el límite arbóreo. Hay muy poca información sobre taxa menos tolerantes al frío, restringiéndose a las especies *Aextoxicon punctatum* (Nunez-Avila & Armesto, 2006) y *Eucryphia cordifolia* (Segovia, 2010). En el caso de ambas especies, los resultados sugieren un único refugio glacial costero con posterior expansión del rango de distribución actual. En el caso de *E. cordifolia*, se encuentra alta diversidad en zonas bajas de la Cordillera Pelada, disminuyendo a medida que se asciende en altitud y latitud. La disminución de la diversidad genética hacia los extremos de la distribución es interpretada como consecuencia del efecto fundador debido a la colonización post-glacial. Ambas especies templadas, *A. punctatum* y *E. cordifolia* son especies cuyo límite de distribución no

supera los 42°S, por lo que no es posible observar si existe el quiebre filogeográfico documentado en los taxa frío-tolerantes.

Frente a las hipótesis propuestas entre la evidencia palinológica y genética que sugieren una área de refugio glacial ubicado en la Cordillera de la Costa y pequeños y múltiples refugios bajo la influencia directa del hielo, respectivamente, se propone poner a prueba las hipótesis de refugio glacial utilizando como modelo una especie de tolerancia intermedia, componente del bosque Nordpatagónico y de amplia distribución. Debido a su tolerancia a condiciones de baja temperatura y una gran sensibilidad a los cambios climáticos y ecológicos asociados al aumento de la temperatura y retroceso de los glaciares se elige como modelo de estudio a *Weinmannia trichosperma*.

*Weinmannia trichosperma* (Cunoniaceae) es un árbol endémico de Chile con escasos ejemplares en Argentina. Crece en condiciones de alta humedad y posee una distribución actual desde los 36°S a 47°S (Figura 1.4). En la zona Mediterránea sólo se encuentra en quebradas y sitios húmedos en la Cordillera de la Costa como individuos aislados. En la Cordillera de la Costa se encuentra en ambas vertientes a distintas alturas, a veces en la Depresión Intermedia desde la Cordillera de Nahuelbuta hasta Puerto Montt (37°S – 41°S). En Chiloé abunda desde la costa pacífica hasta la interior en los bosques siempreverdes y también las islas de la península del Taitao hasta Puerto Edén en las islas magallánicas. En la Cordillera de los Andes se encuentra a partir de los 38°S a 600 m sobre el nivel del mar hasta Aysén en tierras bajas alrededor de 47°S (Donoso & Escobar, 2006).



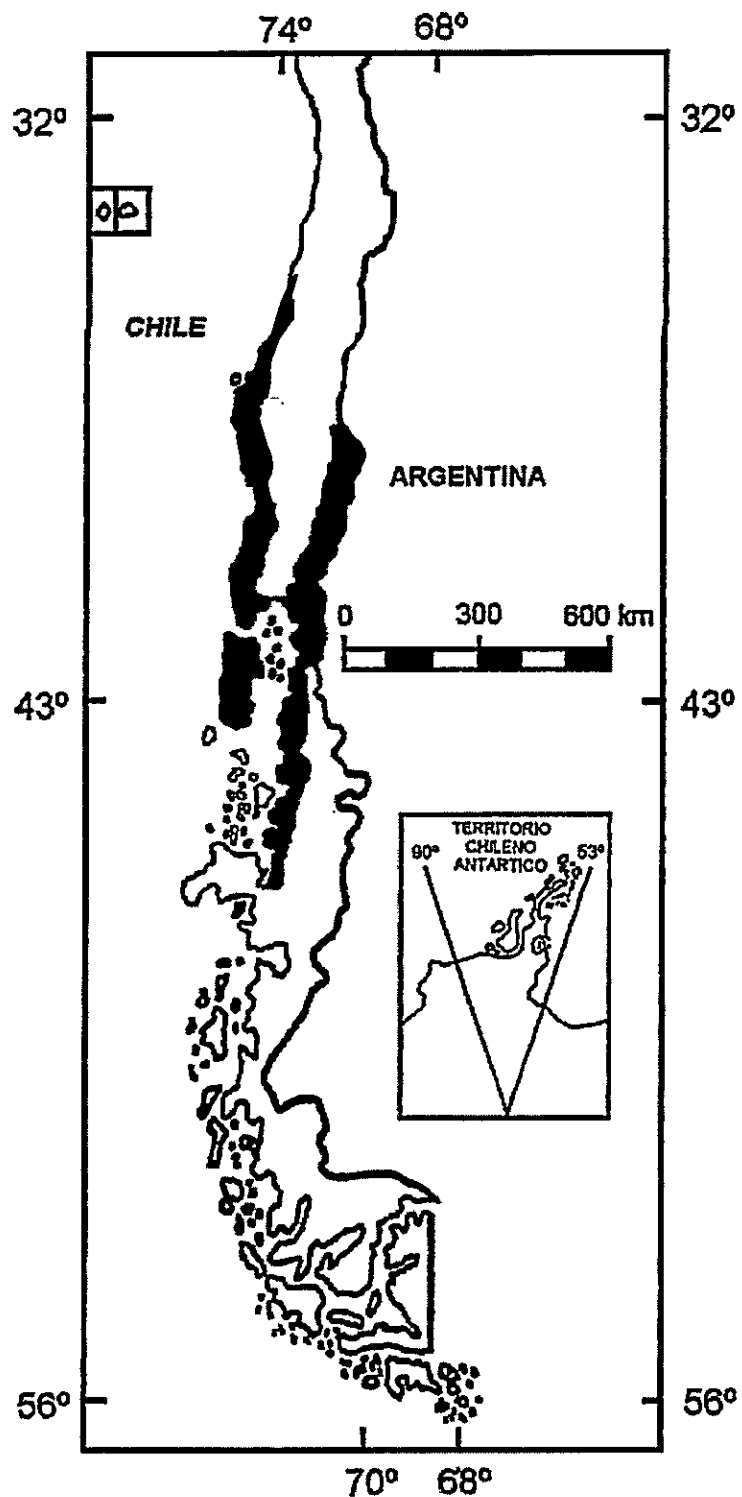


Figura 1.4. Distribución actual de *Weinmannia trichosperma* en sombreado (modificado de Donoso, 2006).

*Weinmannia trichosperma* es un árbol siempreverde, de hasta 30 m de altura y 1 m de diámetro (Figura 1.5a). Tiene hojas compuestas imparipinadas, opuestas, coriáceas, entre cada foliolo y a ambos lados del raquis tienen alitas triangulares que dan a cada par una forma romboidal (Figura 1.5b). Tiene flores hermafroditas pequeñas, blancas, reunidas en panículas polinizadas por insectos (Figura 1.5c), aunque actualmente se ha descrito una importante dispersión a larga distancia de sus granos de polen por viento (Pérez et al., 2009). El fruto es una cápsula coriácea dehiscente de 6-8 x 2 mm (Figura 1.5d). Sus semillas elipsoides, erizadas de pelos blancos bien esparcidos son muy pequeñas (1,2 x 0,8mm; Figura 1.5e), cuya dispersión por anemocoría es probablemente a gran distancia por su pequeño tamaño (Muñoz, 1980; Donoso, 2005).

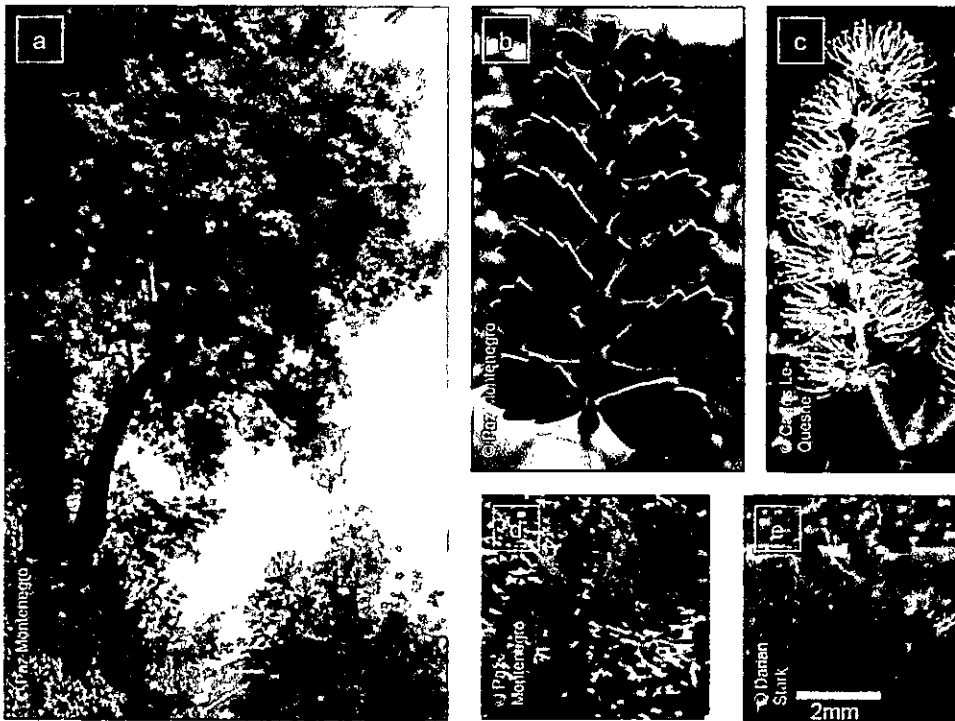


Figura 1.5. Morfología de *Weinmannia trichosperma*. a) Individuo adulto; b) Detalle de morfología foliar; c) Flores en panícula; d) Hojas y frutos y e) Semillas

*Weinmannia trichosperma* se ha utilizado frecuentemente como una especie clave junto con elementos termófilos del bosque Valdiviano *Eucryphia/Caldcluvia* en reconstrucciones paleoclimáticas y paleoecológicas en la región, principalmente en hallazgos de macroflora fósil o por presencia de polen en sedimentos (Villagrán & Armesto, 2005). Villagrán (2001) propuso para el bosque Nordpatagónico un único refugio costero, ubicado entre 38 y 42° S en la costa de Llanquihue y costa oriental de Chiloé (Figura 1.3) basándose principalmente en líneas de isopolen obtenidas a partir de testigos de pantanos y lacustres ubicados en áreas de influencia glaciár durante el UMG (aproximadamente 18.000 años <sup>14</sup>C AP), Tardiglaciár (aproximadamente 14.000-10.000 años <sup>14</sup>C AP), y Holoceno (actual interglaciár) para la Depresi3n Intermedia de la Regi3n de los Lagos. Lamentablemente, los registros polínicos para *Weinmannia trichosperma* en sitios propuestos como refugio glaciár (Cordilleras de Nahuelbuta, Sarao y Pelada), no son los suficientemente antiguos para afirmar la presencia/ausencia de esta especie durante el UMG o anterior a los 12000 años <sup>14</sup>C AP (Villagrán 2001; Heusser 1982). En Rucañacu, ubicado en la orilla occidental del lago Calafquén al pie de los Andes (39° 33'S), existe presencia intermitente de polen a baja frecuencia durante los últimos 9200 años <sup>14</sup>C AP (Holoceno) de *W. trichosperma*, con presencia anterior en baja frecuencia a los 10400 <sup>14</sup>C AP (Heusser 1984). En los registros del Fundo Branau y Llanquihue (Heusser 1999; Heusser 2000) posterior a los 14000 <sup>14</sup>C AP se observa que *W. trichosperma* no se encontraba presente en la Depresi3n Intermedia en la regi3n de los Lagos antes de los 11000 años <sup>14</sup>C AP. La alta resoluci3n que entrega el testigo de Lago Condorito permite afirmar un aumento importante de la frecuencia de granos de polen de *W. trichosperma* alrededor de 11000 <sup>14</sup>C AP, interpretándolo como una

colonización rápida de ambientes perturbados en la Depresión Intermedia durante el Tardiglacial (Moreno, 2000). *W. trichosperma* habría colonizado la Isla Grande de Chiloé y Chiloé Continental, a partir de los 10000 <sup>14</sup>C AP (Heusser 1992; Heusser 1999). En el Archipiélago de Chonos, los registros de Laguna Oprasa y Laguna Fácil (Harbele & Bennet, 2004) se observa un fuerte aumento porcentual de frecuencia (20-25%) de granos de polen entre los 10200 y 6200 años <sup>14</sup>C AP, disminuyendo abruptamente a valores inferiores a 10% y manteniéndose en esa frecuencia durante el tiempo hasta el presente.

La aparente rápida colonización de *W. trichosperma* en su rango de distribución, observada en los testigos polínicos, sugieren una permanencia local al margen glacial más que una colonización desde un área costera. Esta observación es coherente con la hipótesis propuesta por estudios genéticos en taxa criófilos, los cuales presentan patrones de distribución de diversidad genética consistentes con múltiples refugios ubicados bajo la influencia glacial, a diferencia de la hipótesis de refugio glacial costero propuesto por Villagrán para los bosques templados del sur de Sudamérica.

En este trabajo se propone contrastar la evidencia polínica con evidencia filogeográfica en *Weinmannia trichosperma* y determinar el o las área(s) de refugio glacial para esta especie arbórea de tolerancia intermedia.

### ***Objetivo de trabajo***

Considerando un análisis filogeográfico, se propone hacer un estudio de la distribución de la diversidad genética en *Weinmannia trichosperma* y evaluar si esta especie fue capaz de sobrevivir los periodos glaciales en múltiples refugios ubicados directamente bajo la influencia glacial como sugiere la aparentemente rápida colonización que se observa en testigos polínicos, patrón que ha sido documentado genéticamente para coníferas y angiospermas frío tolerantes del bosque templado del sur de Sudamérica.

### ***Hipótesis de trabajo y predicciones***

**Hipótesis:** *Weinmannia trichosperma* sobrevivió a las sucesivas épocas glaciales en múltiples y pequeños refugios ubicados en la Cordillera de la Costa y en áreas directamente bajo la influencia glacial en Cordillera de los Andes y Patagonia.

**Predicción:** Bajo este escenario de refugio glacial para *W. trichosperma*, se espera gran distancia genética entre el o los haplotipos ancestrales, con dos o más centros de diversidad genética y estructuración poblacional.

### ***Objetivos específicos***

Como objetivos específicos del proyecto se busca: (a) caracterizar los patrones de diversidad genética en el rango de distribución actual de *Weinmannia trichosperma* (b) identificar áreas de mayor diversidad genética como refugios, (c) proponer una reconstrucción filogeográfica para el bosque Nordpatagónico utilizando como modelo a *Weinmannia trichosperma*.

## MATERIALES Y METODOS

### *Colecta de Muestras*

Se colectó material vegetal (hojas) de individuos de *Weinmannia trichosperma* dentro de todo su rango de distribución en Chile (Escobar & Donoso, 2006) y en la localidad Argentina de Puerto Blest, a orillas de lago Nahuel Huapi (Tabla 2.1; Figura 2.1) durante el periodo Enero-Febrero 2009 y en Otoño 2010.

En cada localidad se colectaron individuos al azar, con una distancia mínima de 100 metros entre ellos para evitar cercanía genética por reproducción vegetativa. El tejido de cada uno de ellos se almacenó en bolsas herméticas con sílica gel e identificados con fecha de colecta, localidad y georreferencias.

Posteriormente, se trasladó el material colectado al laboratorio y se realizó un recambio de sílica gel hasta secar completamente el material vegetal para ser almacenados a temperatura ambiente antes de comenzar los procedimientos de extracción de DNA.

Tabla 2.1 Sitios de colecta de material vegetal de *Weinmannia trichosperma* y sus georreferencias. PN: Parque Nacional; MN: Monumento Nacional; RN: Reserva Natural; SP: Sitio Prioritario; CI: Centro de Investigación; PP: Parque Privado.

Código	Localidad	Latitud	Longitud	Altura (m.s.n.m)	n
T1	Fundo Escuadrón	36° 56.30' S	73° 05.56' W	300	8
T2	PN Nahuelbuta (W)	37° 48.20' S	73° 01.58' W	1294	7
T3	MN Contulmo	38° 00.94' S	73° 10.67' W	439	7
T4	PN Villarrica	39° 32.22' S	71° 33.39' W	777	7
T5	SP Mocho- Choshuenco	39° 56.16' S	72° 07.55' W	887	11
T6	Cordillera Pelada NW	40° 09.59' S	73° 36.34' W	73	8
T7	Cordillera Pelada NE	40° 12.22' S	73° 24.93' W	761	8
T8	PN Puyehue	40° 44.18' S	72° 18.43' W	469	8
T9	PN Nahuelhuapi (ARGENTINA)	41° 00.40' S	71° 42.36' W	750	8
T10	PN V.P. Rosales	41° 08.94' S	72° 31.00' W	665	8
T11	Los Muermos	41° 21.08' S	73° 49.11' W	101	8
T12	Pichanco	42° 08.87' S	72° 27.84' W	5	8
T13	CI Senda Darwin	41° 53.04' S	73° 39.97' W	24	8
T14	PP Tantauco	43° 01.95' S	73° 47.71' W	134	8
T15	Caleta Gonzalo	42° 49.33' S	72° 45.58' W	40	8
T16	PN Queulat	44° 35.05' S	72° 24.75' W	309	8
T17	PP Parque Aiken	45° 26.33' S	72° 41.52' W	11	8
T18	PP Bahía Exploradores	46° 29.97' S	73° 09.58' W	232	8
Total					144



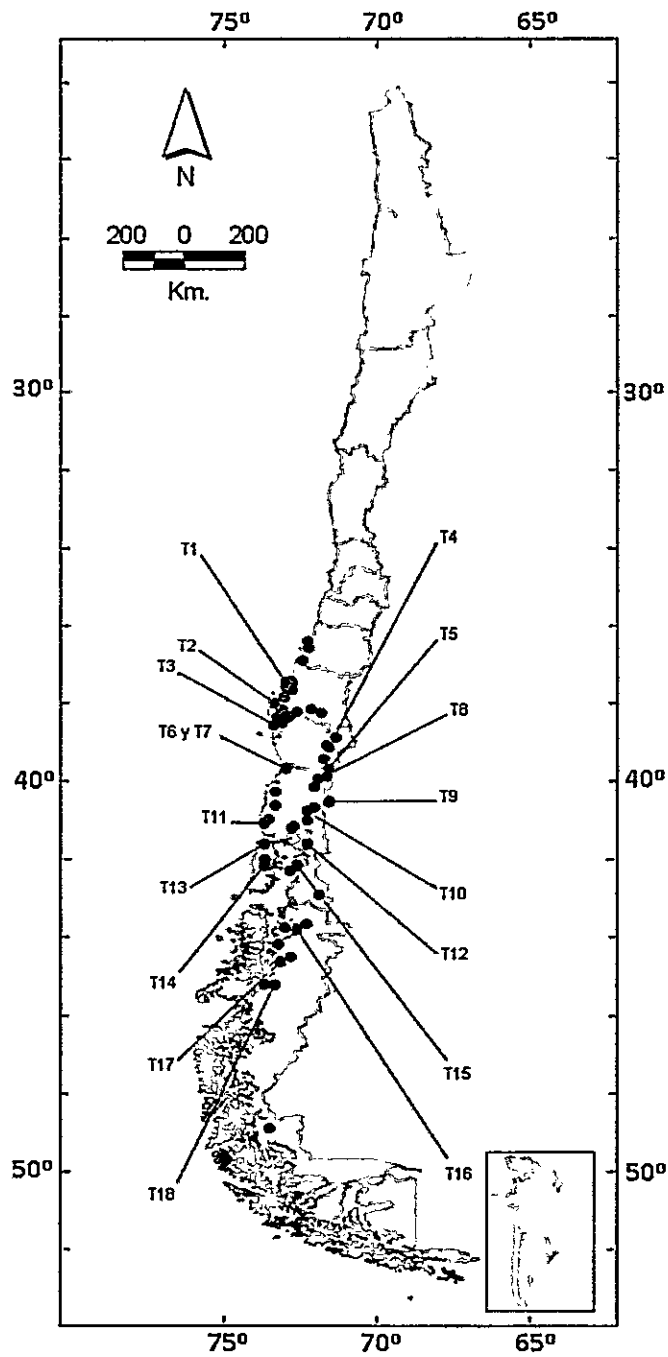


Figura 2.1 Sitios de colecta de *Weinmannia trichosperma* para este estudio. Círculos azules indican los sitios de colecta, donde las georreferencias específicas se detallan en la Tabla 2.1. Círculos rojos indican la presencia de *Weinmannia trichosperma* en registros de herbario de la Universidad de Concepción.

## *Extracción de DNA*

El tejido foliar seco (0.5 g) de cada uno de los individuos fue molido en TissueLyser de Qiagen y el DNA fue extraído utilizando el kit y protocolo de extracción DNeasy Plant Mini Kit de Qiagen (Anexo 1). Las extracciones fueron verificadas en gel de agarosa al 2% bajo luz UV.

Se realizó una prueba de partidores universales de cpDNA (Taberlet et al., 1991; Demesure, Sodzi & Petit, 1995; DumolinLapegue, Pemonge & Petit 1997; Small et al., 1998; Grivet et al., 2001; Tate & Simpson, 2003; Sang et al., 1997; Shaw et al., 2005; Shaw et al., 2007), microsátélites cloroplastidiales (Weising & Gardner, 1999) y secuencias nucleares (Frohlich & Meyerowitz, 1997 y Emshwiller & Doyle, 1999). Se escogió utilizar de entre 20 partidores el par trnS-trnG de cpDNA no codificante (Shaw et al. 2007) por ser el único que presenta variabilidad suficiente en cpDNA (Tabla 2.2).

La reacción de amplificación (PCR) se preparó con 12.5  $\mu$ L de GoTaq® Colorless Master Mix de Promega en un volumen final de 25  $\mu$ L; 0.5  $\mu$ M de concentración final para los partidores trnS y trnG en una reacción de amplificación simétrica, 100 ng de templado de DNA y 25  $\mu$ L de agua ultra pura (Promega). La amplificación fue realizada según el protocolo de Shaw et al. (Shaw et al., 2007), con una denaturación inicial de 80° C y 30 ciclos de denaturación a 95° C por 1 minuto, unión o “annealing” de partidores a 50° C por 1 minuto, seguido por una rampa de 0.38° C/s hasta alcanzar 65° C, y mantener temperatura de extensión de 65° C por 4 minutos; seguido de un paso de extensión final de 5 minutos a 65° C.

Tabla 2.2. Partidores utilizados para testear la variabilidad genética de *Weinmannia trichosperma*. Los pares de partidores destacados con negrita obtuvieron producto PCR y los con cursiva no.

Partidor	Secuencia	Referencia
<b>trnS-trnG</b>	trnS: AACTCGTACAACGGATTAGCAATC trnG: GAATCGAACCCGCATCGTTAG	Shaw et al., 2007
<b>trnQ-rps16</b>	trnQ: GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC rps16: GTTGCTTTYTACCACATCGTTT	Shaw et al., 2007
<b>trnV-ndhC</b>	trnV: GTCTACGGTTCGARTCCGTA ndhC: TATTATTAGAAATGYCCARAAAATATCATATTC	Shaw et al., 2007
<b>trnL-trnF</b>	trnL:CGAAATCGGTAGACGCTACG trnF: ATITGAACTGGTGACACGAG	Taberet et al. 1991
<b>Intrón rpS16</b>	rpS16(f): AAACGATGTGGTARAAAGCAAC rpS16(r):AACATCWATTGCAASGATTCGATA	Shaw et al., 2005
<b>Intrón rpL16</b>	rpL16F71: GCTATGCTTAGTGTGGACTCGTTG rpL16R1516: CCCTTCATTCTCCTCTATGTTG	Small et al. 1998
<b>ccmp4</b>	ccmp4F: AATGCTGAATCGAYGACCTA ccmp4R: CCAAAATATTBGGAGGACTCT	Weising & Gardner, 1999
<b>ccmp6</b>	ccmp6F: CGATGCATATGTAGAAAGCC ccmp6R: CATTACGTGCGACTATCTCC	Weising & Gardner, 1999
<b>ccmp7</b>	ccmp7F: CAACATATACCACTGTCAAG ccmp7R: ACATCATTATTGTATACTCTTTC	Weising & Gardner, 1999
<i>orf184-petA</i>	orf184: TGGCGATCAGAACAYATATGGATAG petA: CATAHYCYTYGTGBGCRAAAAATDGG	Grivet et al. 2001 Heinze 2002
<i>trnC-trnD</i>	trnC: CCAGTTCAAATCTGGGTGTC trnD: GGGATTGTAGTTCAATTGGT	Demesure et al., 1995
<i>trnD-trnT</i>	trnD: ACCAATTGAACTACAATCCC trnT: CTACCACTGAGTTAAAAGGG	Demesure et al., 1995
<i>rpl32(f)-trnL</i>	rpL32(F): CAGTTCCAAAAAACGTACTTC trnL: CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	Shaw et al. 2007
<i>trnS-trnR</i>	trnS: CGCCGCTTTAGTCCACTCA trnR: ATTGCGTCCAATAGGATTTGA	Doyle et al. 1992 DumolinLapegue et al. 1997
<i>pbsA-trnH</i>	pbsA: GTTATGCATGAACGTAATGCTC trnH: CGCGCATGGTGGATTACAATCC	Sang et al., 1997
<i>ndhF-rpl32-R</i>	ndhF: GAAAGGTATKATCCAYGMATATT rpl32-R: CCAATATCCCTTYTTTTCCAA	Tate & Simpson, 2003 Shaw et al. 2007
<i>ncpGS</i>	ncpGS-F: GATGCTCACTACAAGGCTTG ncpGS-R: GGTGTGGCATCCAGCTCC	Emshwiller & Doyle 1999
<b>LEAFY</b>	lfy1: CACCCACGACCITTYATIGTIAICIGARCCIGGIGA lfy2: CCTGCCIACRTARTGICKCATYTTIGGYTT	Frohlich & Meyerowitz 1997
<b>ccmp5</b>	ccmp5F: TGTTCCAATATCTTCTTGTCATTT ccmp5R: AGTTCCATCGGAACAATTAT	Weising & Gardner, 1999
<b>ccmp10</b>	ccmp10F: TTTTTTTTTAGTGAACGTGTCA ccmp10R: TTCGTGDCGTAGTAAATAG	Weising & Gardner, 1999

El producto de amplificación fue verificado en gel de agarosa al 1% preparado con GelRed™ de Biotium, en electroforesis bajo el buffer 1X TAE (0.04M Tris-Acetato, 0.001 M EDTA, pH 8.0) y visualizado bajo luz UV. Purificación y secuenciación de producto de PCR se realizaron en MACROGEN Inc.

### *Análisis de secuencias*

El alineamiento y edición de las secuencias de DNA se realizó con el programa BioEdit© (Hall, 1999). Una vez alineadas y editadas, las secuencias se exportaron al programa DnaSP 5.1 (Librado & Rozas, 2009) para calcular índices de diversidad genética, como Número de sitios Polimórficos (S), Número de haplotipos (K), Diversidad alélica (H), diversidad nucleotídica y número promedio de diferencias entre dos secuencias ( $\Pi$ ). Las inserciones y deleciones fueron codificadas como eventos binarios.

Posteriormente, para identificar relaciones filogenéticas entre los haplotipos de cpDNA, se construyeron dos redes de haplotipos: una red utilizando el algoritmo de Máxima Parsimonia (MP) (Polzin et al., 2003) y otro utilizando "Median Joining Network" (MJ) (Bandelt et al., 1999), apropiado para secuencias con baja tasa de sustitución (Steven M. Woolley, 2008), con el fin de visualizar abundancia y relación de haplotipos ancestrales y derivados en el espacio geográfico. Las redes de haplotipos fueron construidas con los programas TCS1 2.1 (Clement M, Posada D, Crandall KA.,

2000) para Máxima Parsimonia y Network 4.5 (Fluxus Technology Ltd 1999-2009) para Median Joining Network.

### *Diferenciación Genética*

Con el fin de identificar estructuración filogeográfica, se estimaron los coeficientes de diferenciación poblacional  $G_{ST}$  y  $N_{ST}$  (Pons & Petit, 1995, 1996) según el método de Burban et al 1999. Ambos estiman la razón entra la varianza interpoblacional y la varianza total y se diferencian en que  $N_{ST}$  tiene en cuenta la frecuencia y la distancia genética mientras que  $G_{ST}$  sólo la frecuencia. Se determinó si ambos índices son distintos de cero con el programa DnaSP 5.1 y con el objetivo de determinar si estos índices son significativamente distintos entre sí, se realizó una prueba de permutaciones con 1000 repeticiones comparando el valor observado con el obtenido. Estos análisis se realizaron en el programa PermutCpSSR (<http://www.pierroton.inra.fr/genetics/labo/Software/PermutCpSSR/index.html>).

Una vez identificado si existe estructuración filogeográfica, se evaluó la diferenciación genética entre localidades dentro de la distribución con el índice  $F_{ST}$  por localidad y se realizó un análisis de SAMOVA (Structure Analysis of Molecular Variance) para identificar grupos dentro de la distribución. El método SAMOVA está basado en el procedimiento de acoplamiento simulado que apunta a maximizar la proporción de la varianza genética total entre grupos dentro de poblaciones (Dupanloup, Schneider & Excoffier, 2002). También se calculó el estadígrafo  $F_{ST}$  entre los grupos

generados por el programa SAMOVA 1.0 con el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010).

Para visualizar la relación entre la distancia genética y la distancia geográfica, se construyó un paisaje genético, el cual consiste en una superficie tridimensional donde “X” e “Y” corresponden a coordenadas geográficas y “Z” representa la distancia genética. Los puntos fueron generados a través de la triangulación de Delaunay (Watson, 1992; Brouns et al., 2003) a través del programa Alleles in Space (AIS) (Miller, 2005). Se generó una grilla de 50X50 uniformemente espaciadas del área geográfica de colecta, con una ponderación de 1. El programa AIS también permite aplicar el algoritmo de Máxima Diferencia de Monmonier (Monmonier, 1973), el cual ha sido utilizado para identificar barreras al flujo génico a través del paisaje.

Posteriormente se realizó la prueba de Tajima (D; Tajima, 1989) y Fu ( $F_s$ ; Fu, 1997) para identificar eventos demográficos como eventos de cuello de botella, equilibrio y expansión poblacional (Amos & Hoffman, 2010; Doorduyn et al., 2010, Grivet & Petit, 2003, Hundertmark & Van Daele, 2010; McGaughan et al., 2010), calculados en el programa Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Para el test de Tajima se consideró un valor significativo con  $p < 0,05$  y para  $F_s$   $p < 0,02$  ya que simulaciones de  $F_s$  indican que a ese valor de  $p$  los resultados son significativos (Holsinger, 2010).

## RESULTADOS

### *Análisis de Secuencias*

Se alinearon 623 pb del producto PCR de la secuencia no codificante obtenida con los partidores trnS-trnG, de los cuales se encontraron seis mutaciones: cinco Inserción/Delección (InDels) de entre seis a 27 pb y una sustitución (Tabla 3.1). En el análisis se identificaron sólo seis haplotipos, de los cuales uno solo en alta frecuencia (H5) y el resto acumula una frecuencia del 0.14 (Tabla 3.2)

La zona norte de la distribución (sitios T1, T2, T3, T4 y T5) concentra gran parte de la diversidad genética, presentando cinco de los seis haplotipos encontrados. En Cordillera de Nahuelbuta (sitios T1, T2 y T3), podemos encontrar dos haplotipos exclusivos (H2 y H3) y dos compartidos (H1 y H4) con sitios ubicados en el norte de los Andes (sitios T4 y T5). Los sitios de Cordillera de los Andes norte, además de presentar haplotipos compartidos con Nahuelbuta, presenta en baja frecuencia H5. El haplotipo más frecuente, H5, es el único haplotipo que se encuentra en todos los sitios al sur de los 40°S, a excepción de H6 representado por un individuo en el sitio T12 (Figura 3.1).

Los análisis con MJ y MP construyen la misma red de haplotipos situando a H5 como el más ancestral siendo los más cercanos H3 y H6 con un paso mutacional. A partir de H5 se interpola un haplotipo intermedio no existente que daría origen a H1 y H4 en un paso mutacional cada uno. Finalmente H2 derivaría de H4 por una sustitución (Figura 3.2).

Tabla 3.1. Ubicación de los sitios polimórficos en el alineamiento de la secuencia de cpDNA en *Weinmannia trichosperma* utilizando los partidores universales trnS-trnG (Shaw et al. 2007). La secuencia modelo corresponde a H1. InDels son representadas con un signo (-).

Haplotipos	Posición en el alineamiento																				
	201	202	203	204	205	206	207	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241
H1	C	T	C	A	A	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	A	A	T	A	T	T	C	C	A	A	T
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	A	A	T	A	T	T	C	C	A	A	T
H6	.	.	.	.	.	.	.	A	T	C	A	A	T	A	T	T	C	C	A	A	T

Haplotipos	Posición en el alineamiento																				
	242	243	244	245	246	247	248	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	C	A	A	T	A	T	A	A	A	T	T	A	T	A	T	A	T	A	T	A	T
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	C	A	A	T	A	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	C	A	A	T	A	T	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Haplotipos	Posición en el alineamiento																				
	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	320	321	322	323	324	325	326	327
H1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	T	A	A	T	A	A	A	A
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H3	A	A	T	A	A	T	A	T	A	T	A	A	T	-	-	-	-	-	-	-	-
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Haplotipos	Posición en el alineamiento								
	328	329	357	358	359	360	361	362	511
H1	A	A	-	-	-	-	-	-	C
H2	-	-	-	-	-	-	-	-	T
H3	-	-	-	-	-	-	-	-	.
H4	-	-	-	-	-	-	-	-	.
H5	-	-	-	-	-	-	-	-	.
H6	-	-	T	T	T	T	A	T	.



Tabla 3.2. Frecuencia de los haplotipos encontrados en el rango de distribución de *Weinmannia trichosperma*. En negrita se encuentran el número absoluto de los haplotipos encontrados y abajo, en cursiva, su frecuencia relativa.

	H1	H2	H3	H4	H5	H6
T1	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T2	<b>5</b> <i>0,035</i>	<b>2</b> <i>0,014</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T3	<b>2</b> <i>0,014</i>	<b>1</b> <i>0,007</i>	<b>3</b> <i>0,021</i>	<b>1</b> <i>0,007</i>	<b>0</b> <i>0,00</i>	<b>0</b> <i>0,00</i>
T4	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>6</b> <i>0,042</i>	<b>1</b> <i>0,007</i>	<b>0</b> <i>0,000</i>
T5	<b>4</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>6</b> <i>0</i>	<b>1</b> <i>0,007</i>	<b>0</b> <i>0,000</i>
T6	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T7	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T8	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T9	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T10	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T11	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T12	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>7</b> <i>0,049</i>	<b>1</b> <i>0,007</i>
T13	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T14	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T15	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T16	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T17	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
T18	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>0</b> <i>0</i>	<b>8</b> <i>0,056</i>	<b>0</b> <i>0</i>
Total	<b>19/0,132</b>	<b>3/0,021</b>	<b>3/0,021</b>	<b>13/0,090</b>	<b>105/0,729</b>	<b>1/0,007</b>

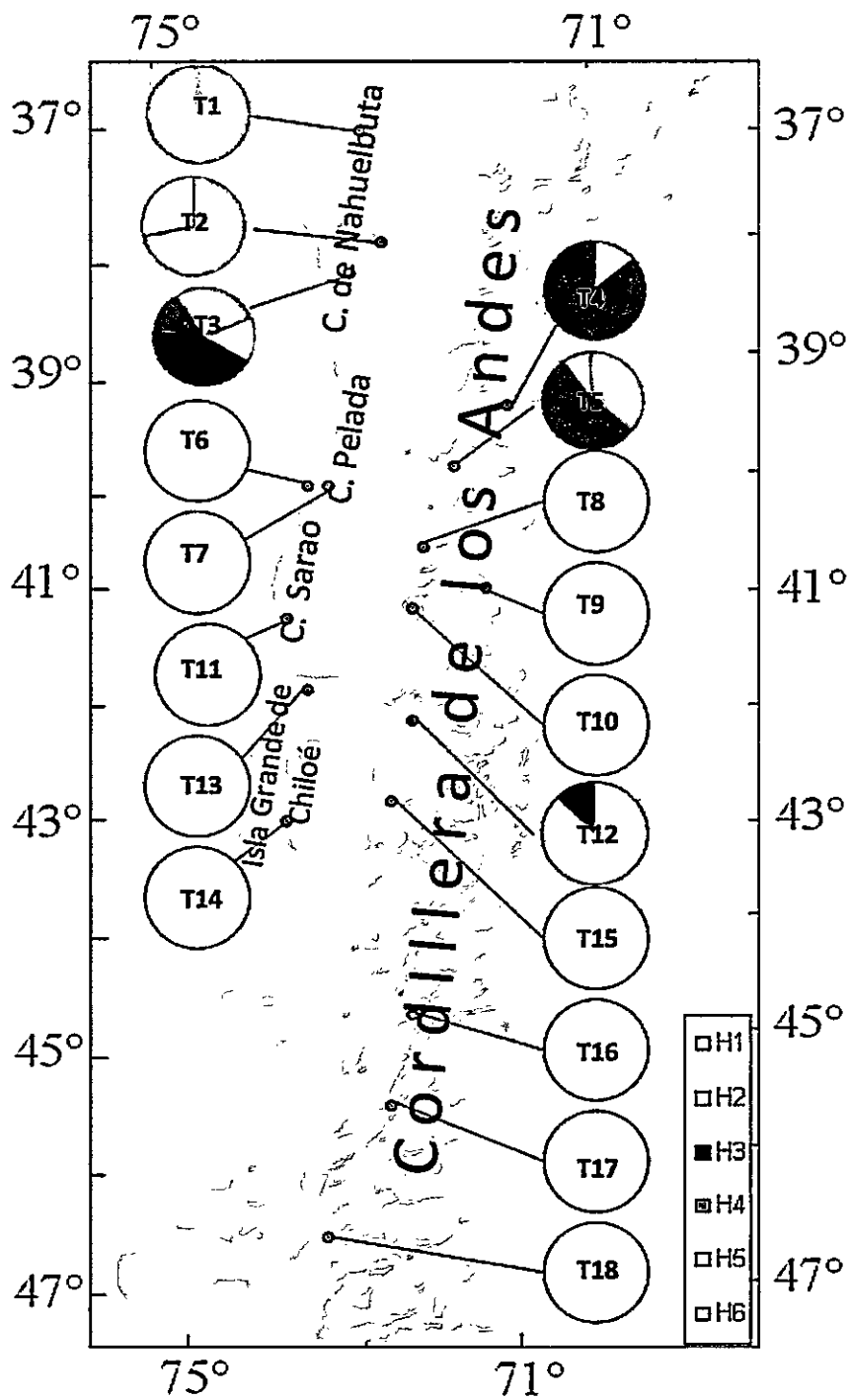


Figura 3.1. Distribución geográfica de los haplotipos encontrados para el par de partidores trnS-trnG (Shaw et al., 2007). Los distintos colores representan la identidad de los haplotipos encontrados y la proporción de los colores en el gráfico de torta, las frecuencias.

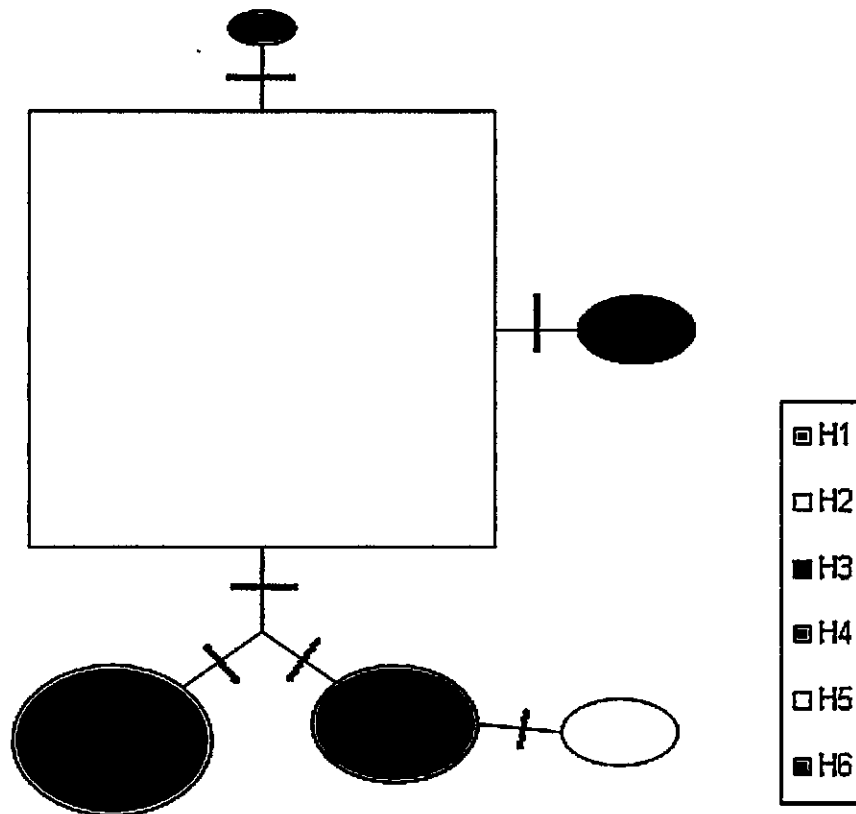


Figura 3.2. Red de haplotipos para *Weinmannia trichosperma* obtenidos mediante MJ y MP. Colores distintos identifican a los diferentes haplotipos. Las líneas perpendiculares entre haplotipos representan los pasos mutacionales que separan un haplotipo de otro. El haplotipo identificado como ancestral se representa con un cuadrado. Los tamaños de las figuras representan las frecuencias de los haplotipos.

A partir de los 144 individuos analizados se obtuvieron índices de diversidad en el rango total y por sitio (Tabla 3.3). La diversidad haplotípica (H) y número promedio de diferencias entre pares de frecuencias (II) son cero en la mayoría de los sitios de colecta, excepto en los sitios al norte de la distribución (sitios T1, T2, T3, T4 y T5) y en el sitio T12.

Tabla 3.3. Índices de diversidad por localidad y en total: Número de sitios polimórficos (S), diversidad haplotípica (H), número de haplotipos (K), y número promedio de diferencias entre pares de secuencias ( $\Pi$ ).

	S	H	K	$\Pi$
T1	0	0	1	0
T2	3	0.48	2	1.43
T3	5	0.81	4	2.38
T4	2	0.29	2	0.57
T5	3	0.62	3	1.24
T6	0	0	1	0
T7	0	0	1	0
T8	0	0	1	0
T9	0	0	1	0
T10	0	0	1	0
T11	0	0	1	0
T12	1	0.25	2	0.25
T13	0	0	1	0
T14	0	0	1	0
T15	0	0	1	0
T16	0	0	1	0
T17	0	0	1	0
T18	0	0	1	0
Total	6	0.45	6	0.90

### *Diferenciación genética*

Los valores de  $G_{ST}$  (0.71,  $p < 0.001$ ) y  $N_{ST}$  (0.65  $p < 0.001$ ) indican que gran parte de la diversidad genética es explicada por variabilidad interpoblacional dentro del rango de distribución (Tabla 3.4) y además, a través de la prueba de permutaciones con 1000 repeticiones, se determinó que ambos valores no resultaron significativamente distintos entre sí ( $p > 0.1$ ).

Tabla 3.4 Índices 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. hS y vS son la diversidad intrapoblacional promedio y hT y vT son la diversidad total.

Sin diferencias entre Haplotipos		Con diferencias entre Haplotipos	
hS	0.136 (0.0593)	vS	0.161 (0.0787)
hT	0.463 (0.1300)	vT	0.462 (0.1370)
Gst	0.707 (0.0721)	Nst	0.650 (0.1050)

Luego de identificada estructuración dentro del rango de distribución, se compararon los  $F_{ST}$  por pares de localidad (Tabla 3.5). En esta matriz se observa un grupo definido donde las localidades no son significativamente distintas entre ellas, las cuales corresponden a los sitios desde T6 a T18. También se observa que T1 no es significativamente distinto de T2, pero sí de T3, T4 y T5. A su vez, T2 no es significativamente distinto de T3 y T5, pero sí de T4 y finalmente, T4 y T5 no son significativamente distintos entre sí.

Tabla 3.5. Valores de  $F_{ST}$  por sitio de muestreo bajo la diagonal. Sobre la diagonal se indica con un (+) valores significativos ( $p < 0.05$ ) y con (-) valores no significativos ( $p > 0.05$ ).

	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T11	T12	T13	T14	T15	T16	T17	T18
T1		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T2	0,17		-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T3	0,40	0,14		-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T4	0,86	0,44	0,25		-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T5	0,45	0,09	0,11	0,11		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
T6	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T7	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T8	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T9	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00		-	-	-	-	-	-	-	-	-
T10	1,00	0,69	0,31	0,83	0,60	0,00	0,00	0,00	0,00		-	-	-	-	-	-	-	-
T11	0,94	0,67	0,31	0,78	0,59	0,00	0,00	0,00	0,00	-0,02		-	-	-	-	-	-	-
T12	1,00	0,67	0,28	0,82	0,58	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		-	-	-	-	-	-
T13	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		-	-	-	-	-
T14	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		-	-	-	-
T15	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		-	-	-
T16	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		-	-
T17	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00		-
T18	1,00	0,71	0,33	0,84	0,62	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	

Se realizó el análisis de SAMOVA para identificar grupos dentro de la distribución, por lo que se construyeron simulaciones de dos a cinco grupos, donde la máxima varianza explicada por separación de grupos se alcanzó al dividir en tres grupos los sitios de muestreo de *Weinmannia trichosperma*: i) Cordillera de Nahuelbuta (sitios T1, T2 y T3); ii) Andes Norte, que agrupa a los individuos al norte de los 40° S en la Cordillera de los Andes (sitios T4 y T5) y iii) Sur, que agrupa a los individuos ubicados desde 40°S hacia el sur (Figura 3.3).

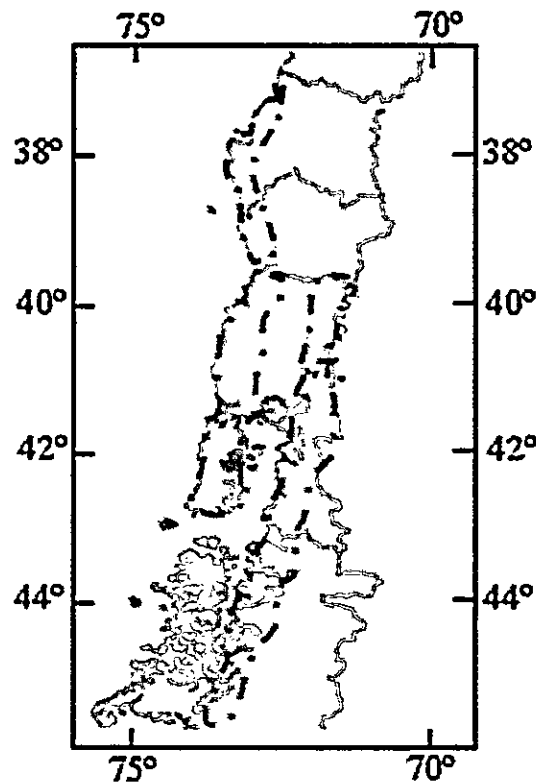


Figura 3.3. Estructuración geográfica de la distribución actual de *Weinmannia trichosperma* según análisis de SAMOVA. El grupo Nahuelbuta está representado en verde, Andes Norte en rojo y Sur en azul.

El Análisis de varianza molecular (AMOVA) para estos grupos arrojó que el 75,51% de la variabilidad genética podía explicarse mediante esta separación (Tabla 3.6)

Tabla 3.6. Tabla de AMOVA de los grupos encontrados por SAMOVA.

	Suma de cuadrados	Componentes de la varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	36.966	0.587	75.51
Entre sitios dentro de grupos	5.298	0.026	3.37
Dentro de los sitios	20.20	0.164	21.12
Total	62.464	0.777	

Los valores de  $F_{ST}$  para el análisis de SAMOVA, indican diferenciación significativa ( $p < 0.05$ ) entre todos los grupos (Tabla 3.7).

Tabla 3.7. Valores de  $F_{ST}$  entre los grupos obtenidos por SAMOVA. N: Nahuelbuta (T1, T2 y T3), AN: Andes Norte (T4 y T5), S: Sur (T6 a T18). Los valores de  $F_{ST}$  se muestran bajo la diagonal en negrita y los p-valores en cursiva sobre la diagonal. Los valores significativos se indican con (\*).

Grupos	N	AN	S
N		<i>0,00 +/- 0,00*</i>	<i>0,00 +/- 0,00*</i>
AN	<b>0,23</b>		<i>0,00 +/- 0,00*</i>
S	<b>0,82</b>	<b>0,88</b>	

Congruentemente con los análisis de  $F_{ST}$  por localidad y SAMOVA, que mostraron diferenciación genética entre los sitios del límite norte de la distribución y sitios de muestreo al sur de los 40°S, el análisis de Monmonier identificó una barrera al flujo génico alrededor de los 40°S (Figura 3.4). Este resultado también puede visualizarse en el paisaje genético (Figura 3.5), pues se observa una clara diferenciación latitudinal, con una muy pronunciada pendiente alrededor de 39° S (y no una suave, esperada en aislamiento por distancia). Se observa también en la zona norte de la distribución picos

más grandes, interpretado como el lugar con concentración de las mayores distancias genéticas en un área geográfica pequeña. Coherentemente, hacia el sur las distancias genéticas disminuyen considerablemente, donde domina casi exclusivamente H5, por lo que las grandes depresiones representan zonas con escasa distancia genética en una gran área geográfica.

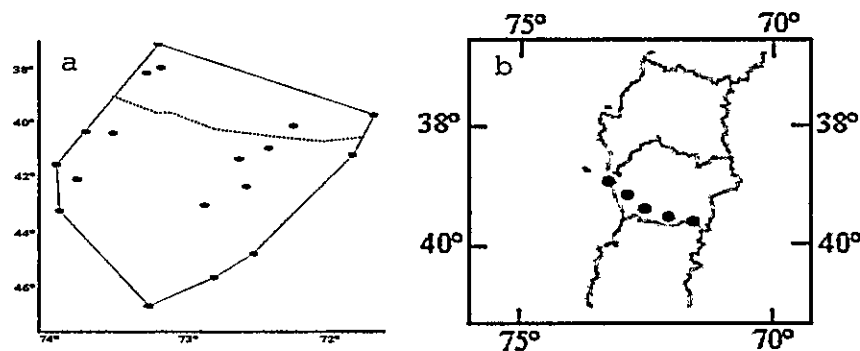


Figura 3.4. Barrera al flujo génico, identificado por Monmonier (en púrpura). En ambas figuras, el eje X corresponde a longitud y el eje Y a latitud en según las georreferencias de las coordenadas geográficas. En el gráfico(a), los puntos azules representan los sitios de colecta y el polígono de línea roja, el área geográfica analizada. En la figura b) se representa la barrera al flujo génico en un mapa.

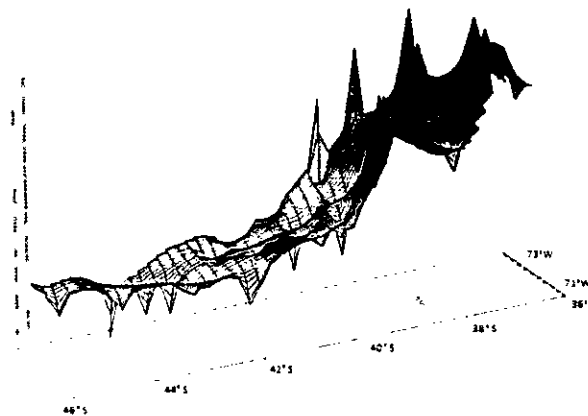


Figura 3.5 Paisaje genético relacionado con las distancias geográficas en cpDNA en *W. trichosperma*. Los valores de mayor distancia genética se representan con picos elevados y de color azul, y valores de menor distancia genética como depresiones de color amarillo.



Se realizaron los test D de Tajima y  $F_S$  en los grupos Nahuelbuta y Andes Norte, donde ninguno de ellos resultó significativo para identificar eventos demográficos (Tabla 3.8). Los test no fueron calculados para el grupo Sur, ya que es prácticamente homogéneo.

Tabla 3.8. Valores de índices de neutralidad (D y  $F_S$ ) para los grupos Nahuelbuta y Andes Norte encontradas por SAMOVA.

Grupos	D	$F_S$
Nahuelbuta	0,37 ( $p > 0,1$ )	1,15 ( $p > 0,1$ )
Andes Norte	0,55 ( $p > 0,1$ )	1,22 ( $p > 0,1$ )

## DISCUSIÓN

Los partidores trnS-trnG, si bien fueron los únicos que arrojaron variabilidad en una secuencia intergénica, mostraron variabilidad muy baja a lo esperado para este segmento (Shaw et al., 2005): seis sitios polimórficos y seis haplotipos. Esta es una fuerte evidencia de repetidas contracciones y expansiones a través del Cuaternario del tamaño poblacional de *Weinmannia trichosperma*, que favoreció la pérdida de alelos poco frecuentes por eliminación directa de individuos debido al avance de los hielos y posterior pérdida por deriva génica.

La distribución y abundancia de los haplotipos (Figura 3.1) plantean un escenario interesante. La totalidad de los haplotipos, a excepción de H6 que fue encontrado en un solo individuo, se localizan concentrados en la distribución norte, especialmente en Cordillera de Nahuelbuta. El haplotipo más frecuente dentro de toda la distribución, H5, tiene una muy baja frecuencia en el límite norte, con una completa ausencia en la Cordillera de Nahuelbuta y dominancia a partir de las 39° S. Los supuestos dentro de un análisis de redes postulan que el haplotipo de mayor frecuencia, el más central dentro de una red, con múltiples conexiones y ampliamente distribuido, es probablemente el ancestral (Freeland, 2005). Bajo estos supuestos, H5 es el haplotipo con mayor probabilidad de ser el más basal, el cual daría origen, o estaría más relacionado al o los haplotipos que dieron origen a la diversidad actual, pero probablemente este no es el

caso de H5, ya que su alta frecuencia es explicada por efecto fundador, más que por efecto de ancestralidad. La red presenta una escasa distancia genética entre haplotipos (Figura 3.2), síntoma que puede ser interpretado como ausencia de aislamiento reproductivo histórico.

Según la distribución actual de la diversidad genética, se identifica una población ancestral refugiada en la zona propuesta por Villagrán (2001) como refugio del bosque Nordpatagónico, (Figura 1.3). Esta población original presentaría por lo menos los haplotipos H1, H3, H4 y H5 en la contracción durante las épocas glaciales.

Al comenzar el retroceso de los hielos, *W. trichosperma* habría colonizado tempranamente la Cordillera de los Andes, por lo menos con los haplotipos H1, H4 y H5, a medida que el deshielo expusiera nuevos suelos disponibles y habría avanzado a pisos medios-altos al sur de Nahuelbuta, con los haplotipos H1, H3 y H4, a medida que las condiciones se fueron volviendo más cálidas en esta zona, como lo sugiere el análisis de  $F_{ST}$  por sitio, y por la baja diferenciación entre el grupo de Nahuelbuta y Andes Norte en el análisis de SAMOVA (Tabla 3.7). Estos grupos a medida que las condiciones se volvieron cada vez más cálidas, se aislaron en pisos vegetacionales altos y en este aislamiento se puede explicar el origen y fijación de H2, exclusivo de Cordillera de Nahuelbuta. Los individuos en las tierras bajas al sur de Cordillera de Nahuelbuta no habrían colonizado directamente hacia el sur al término del Tardiglacial, ya que a medida que aumentaban las temperaturas estos individuos no habrían podido sobrevivir y por lo tanto, no poder avanzar directamente hacia Cordillera Pelada; aunque también podría deberse a que *W. trichosperma* es un taxa pionero y preferentemente fue colonizando siguiendo el descubrimiento de suelos a medida que se retiraban los hielos

en vez de ocupar una zona con suelos persistentes y probablemente ya ocupado con otros taxa, colonizando y ascendiendo por Cordillera Pelada en épocas más cálidas.

El grupo al sur de los 39° S es un grupo muy homogéneo genéticamente, lo cual puede ser explicado por efecto fundador. Los individuos que alcanzaron tempranamente los Andes habrían colonizado el resto de la distribución hacia el sur, fijando por azar el haplotipo H5. Se descarta una colonización desde la ladera este de los Andes, debido a la presencia del haplotipo H3 en Nahuelbuta, el cual deriva de un paso mutacional de H5 y es exclusivo de esta zona, lo cual sugiere fuertemente presencia de H5 en Nahuelbuta, ausente en este estudio debido a falta de muestreo o pérdida de diversidad genética por deriva. De esto se desprende que los individuos de *W. trichosperma* que se encuentra en Argentina pertenecen a una colonización reciente proveniente desde Chile y no a un refugio glacial ubicado en la ladera Este de los Andes. Finalmente, el origen de H6 puede ser descrito de una forma bastante sencilla: según registros palinológicos, el avance del bosque Nordpatagónico hacia el sur luego del término del UMG habría alcanzado sitios bajos de la Región de los Lagos alrededor de los 10 mil años <sup>14</sup>C AP. (Denton et al., 1999). Al colonizar y asentarse en esta región, los individuos de *W. trichosperma*, muy homogéneos genéticamente, generaron y fijaron una nueva mutación exclusiva de esta zona y en muy baja frecuencia.

La actual barrera al flujo génico (Figura 3.4) que se observa en el rango de distribución se podría explicar debido aislamiento en cimas debido al ascenso de los pisos vegetacionales a medida que las condiciones se volvieron más cálidas (Walther, 2005) y diferencias fisiológicas entre ecotipos. Las tierras bajas en la costa al sur de Nahuelbuta además del aislamiento por altura de los pisos vegetacionales en esta

formación, no permiten el intercambio génico entre individuos de Cordillera de Nahuelbuta y Pelada, como tampoco entre individuos de Cordillera de los Andes, por lo que esta barrera sería reflejo de las condiciones climáticas interglaciales actuales. Finalmente, la barrera al flujo génico podría ser fisiológica, donde los individuos que poseen H5 presenten intolerancia a las condiciones de clima templado con invierno húmedo y estación seca prolongada (Csb) en la clasificación de Köpper-Geiger (Peel et al. 2007), caracterizado por sequía y altas temperaturas estivales. Es documentado para *W. trichosperma* que el factor limitante en su distribución es la precipitación (Donoso & Escobar, 2005), por lo que esta barrera podría ser síntoma de ligamiento genético en dos ecotipos distintos que poseen diferentes tolerancias climáticas, principalmente dependientes del nivel de precipitación que se habrían separado latitudinalmente debido a la alta variabilidad climática durante el Pleistoceno.

La evidencia genética obtenida en este trabajo (baja distancia genética de haplotipos, concentración y patrón de distribución de diversidad genéticas), sugiere, tal como propuso Villagrán (Villagrán, 1991; 2001), una zona de refugio glacial ubicada en las zonas bajas aledañas a Cordillera de Nahuelbuta, centro que dio origen a los individuos que fueron colonizando hacia el sur a medida que los hielos se fueron retirando.

A continuación se propone un modelo de expansión para el bosque Nordpatagónico, interpretando los registros polínicos/reconstrucciones climáticas y filogeografía de *Weinmannia trichosperma* como modelo.

### *Modelo de Expansión<sup>1</sup>*

El refugio costero propuesto por Villagrán (Villagrán, 1991; 2001) para el bosque Nordpatagónico durante el UMG es confirmado por las evidencias genéticas y edáficas. Las tierras bajas en la Depresión Intermedia aledañas a Cordillera de Nahuelbuta habría sido el lugar idóneo para localizar el refugio glacial, ya que la escasa distancia genética entre haplotipos y la localización concentrada de la diversidad génica en el norte de la distribución sugiere un único refugio durante el UMG. Su localización geográfica es apoyada por la presencia de nitisoles que datan de principios del Cuaternario (Veit & Garleff, 1996).

Según el patrón de diversidad genética, *Weinmannia trichosperma* comenzó a avanzar hacia el sur a medida que se retiraban los hielos, colonizando rápidamente Cordillera de los Andes y ascendiendo por Cordillera de Nahuelbuta a medida que las condiciones se volvieron cada vez más cálidas. La evidencia polínica indica que el registro más antiguo de presencia de granos de polen después de los 14000 años de *W. trichosperma* es en los Andes en la Región de los Ríos (Rucañacu; Heusser, 1984) y en la Depresión Intermedia en la Región de los Lagos (Moreno, 2004) alrededor de los 11000 <sup>14</sup>C AP, por lo que desde esa zona habría avanzado por los Andes y Depresión Intermedia hacia el sur siguiendo el descubrimiento de los suelos del retroceso glacial. A

---

<sup>1</sup> Para realizar este modelo de expansión, se compararon edades según datación radiocarbónica. Éstas han sido usadas extensamente durante los últimos 50 años y debido a lo antiguo del método, muchos de los estudios no están corregidos y difieren en las dataciones. En estricto rigor, no es apropiado hacer comparaciones de edades radiocarbónicas, pero la inexistencia de correcciones en trabajos antiguos no permiten una comparación en edades calendario.

medida que la temperatura era más cálida, los individuos de la Depresión Intermedia colonizaron hacia la Cordillera de la Costa.

De la baja diversidad genética hacia el sur de los 39° S, se infiere una colonización reciente y de los registros polínicos se infiere una rápida, probablemente cuando las condiciones climáticas actuales se establecieron. Debido a la homogeneidad genética al sur de los 39°S de la distribución, es imposible seguir construyendo la ruta de colonización con esta secuencia no variable de cpDNA. Para continuar con el modelo de expansión, se utilizó la aproximación clásica de análisis de polen en sedimentos lacustres.

Según trabajos polínicos realizados principalmente en la Depresión Intermedia en la región de los Lagos, condiciones de frío y humedad caracterizaron el fin de UMG (16400-14600 años <sup>14</sup>C AP). Al aumentar la temperatura al término del UMG, el bosque Nordpatagónico habría ocupado rápidamente las áreas antes cubiertas por hielo. A medida que aumentaba la temperatura, los vientos del oeste habrían aportado humedad mayor a la actual y estas condiciones habrían caracterizado el Tardiglacial entre 16400-13000 años <sup>14</sup>C AP. Los aportes de humedad del cinturón de vientos del oeste migraron hacia el polo, cambiando a condiciones cálidas y secas en la zona (Moreno, 2000; Moreno & León, 2003). Entre 12200 y 9900 <sup>14</sup>C AP habría bajado la temperatura, por lo que el bosque Nordpatagónico habría retrocedido nuevamente hacia el norte y bajado en altitud, persistiendo en esa zona taxa resistentes al frío. Después de 9900 años <sup>14</sup>C AP, la vegetación cambió a taxa termófilos, indicaría el inicio de la fase cálida y húmeda del Holoceno temprano (9500 años <sup>14</sup>C AP), empujando hacia pisos vegetacionales más altos (Cordillera Pelada; Heusser, 1984) y a mayores latitudes al bosque

Nordpatagónico. La colonización del límite sur se habría alcanzado rápidamente, ya que *W. trichosperma* alcanza el archipiélago de Chonos alrededor de los 10000 años <sup>14</sup>C AP (Haberle & Bennet, 2004). Posteriormente se establecieron las condiciones climáticas actuales (Moreno, 2000) con condiciones más frías que las del Holoceno temprano, lo que permitió, a grandes rasgos, el establecimiento de la distribución actual del bosque Nordpatagónico.



## CONCLUSIONES

Los patrones biogeográficos que se observan en los bosques templados lluviosos del sur de Sudamérica han sido explicados por los cambios climáticos y tectónicos ocurridos en diferentes escalas temporales (Samaniego & Marquet, 2009). Patrones de distribución de los taxa vegetales, como formaciones aisladas en cimas de cerros y concentración de especies en un rango geográfico, han sido explicados como consecuencia de los ciclos glaciales e interglaciales del Cuaternario. Este periodo se caracteriza por repetidos y fuertes cambios climáticos geográficos y edáficos. Una ineludible consecuencia de esta variabilidad son cambios en la distribución y abundancia de organismos según sus tolerancias ecológicas en épocas glaciales e interglaciales (Hewitt 2000).

Relativo al UMG, se ha propuesto para los bosques templados del Sur de Sudamérica dos hipótesis de refugio. Uno de ellos se inspira en evidencia, fósil, principalmente de testigos polínicos, patrones biogeográficos, evidencia genética en taxa valdivianos y geomorfología, la que postula persistencia de biota en una zona continua ubicada en Cordillera de la Costa, fuera de la influencia glacial (Figura 1.3). La otra hipótesis postula la sobrevivencia de biota en pequeños y múltiples refugios ubicados a ambas laderas de la Cordillera de los Andes, Depresión Intermedia y Costa, apoyada principalmente por evidencia genética en taxa forestales frío tolerantes (Premoli, 1997; Marchelli *et al.*, 1998; Premoli *et al.*, 2001; Bekessy *et al.* 2002; Premoli *et al.*, 2002;

Allnutt *et al.*, 2003; (Bekessy *et al.* 2002, Ruiz *et al.* 2007, Souto and Premoli 2007, Azpilicueta *et al.* 2009, Paula and Leonardo 2006); Quiroga & Premoli 2010). Estos resultados muestran una alta diversidad genética, estructuración y barreras al flujo génico en los Andes, Depresión Intermedia y Cordillera de la Costa, los cuales son interpretados como reducción de rangos de distribución y tamaños poblacionales en épocas glaciales, en vez de interpretarlos como expansión durante épocas frías y durante épocas cálidas refugios interglaciales, cuellos de botella y fragmentación de distribución (Bennett and Provan 2008, Stewart *et al.* 2010).

La hipótesis de múltiples refugios glaciales fue puesta a prueba con este estudio filogeográfico en *Weinmannia trichosperma*, especie del bosque Nordpatagónico de amplia distribución con tolerancia a condiciones de baja temperatura. La concentración de la diversidad genética en el área de Cordillera de Nahuelbuta y la escasa distancia genética entre haplotipos, sugiere un refugio glacial único, centrado en 40° S en Cordillera de la Costa y Depresión Intermedia, siendo la distribución actual producto de una expansión desde esta zona. La presencia de una barrera al flujo génico se atribuye a un aislamiento debido al ascenso de pisos vegetacionales en el norte de la distribución y separación de ecotipos con diferencias en tolerancias fisiológicas a las condiciones de altas temperaturas y sequía debido a la alta variabilidad climática entre el UMG y el presente.

Estos resultados rechazan la hipótesis de múltiples refugios y reafirman las observaciones que llevaron a Villagrán (1991; 2001) a postular la hipótesis de refugio glacial costero para los bosques templados lluviosos del Sur de Sudamérica, también apoyada por evidencia genética en taxa termófilos del bosque Valdiviano. La ruta de

colonización desde la zona de refugio glacial habría avanzado por los Andes y la Depresión Intermedia a medida que los hielos se retiraban, alcanzando los 39°S en los faldeos de los Andes (Heusser, 1984) y 41°S en Depresión intermedia en la Región de los Lagos (Moreno, 2004) alrededor de los 11000 <sup>14</sup>C AP. Desde esta zona continuó la expansión hacia el sur y a medida que aumentaban las temperaturas, los individuos ascendieron altitudinalmente por las Cordilleras y avanzaron rápidamente a latitudes más altas por la Depresión Intermedia, llegando a la Isla Grande de Chiloé y a su límite sur de distribución actual a los 10000 años <sup>14</sup>C AP (Haberle & Bennet, 2004).

## BIBLIOGRAFIA

- Abraham, E.M., K. Garleff, H. Liebricht, A.C. Regairaz, F. Schäbitz, F.A. Squeo, H. Stingl, H. Veit & C. Villagrán (2000) Geomorphology and paleoecology of the arid diagonal in Southern South America. *Zeitschrift für Angewandte Geologie: Sonderheft SH 1*: 55-61.
- Abarzúa, A. M., Villagrán, C. and Moreno, P.I. (2004) Deglacial and postglacial climate history in east-central Isla Grande de Chiloe, southern Chile (43° S). *Quaternary Research*, **62(1)**: 49-59.
- 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. and Lara, A. (2003) Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. *Biological Conservation*, **114(2)**: 245-253.
- Amos, W. and J. I. Hoffman (2010) Evidence that two main bottleneck events shaped modern human genetic diversity. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **277(1678)**: 131-137.
- Avise, J. C. (2000) Phylogeography. The History and Formation of Species. *Harvard University Press*, Cambridge, MA.
- Azpilicueta, M. M., P. Marchelli & L. A. Gallo (2009) The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics & Genomes*, **5**, 561-571.
- Bandelt H-J, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*, **16**:37-48
- Bekessy, S.A., Allnutt T.R., Premoli A.C., Lara A., Ennos R.A., Burgman M.A., Cortes M. and Newton A.C. (2002). Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*, **88**: 243-249.
- Bennet K.D. & Provan J.(2008) What do we mean by 'refugia'?. *Quaternary Science Reviews* **27**: 2449-2455.
- Brouns G, De Wulf A, Constaes D (2003) Delaunay triangulation algorithms useful for multibeam echosounding. *Journal of Surveying Engineering*, **129**: 79-84.
- Burban, C., Petit, R.J., Carcreff, E. & Jactel, H. (1999) Rangewide variation of the maritime pine bast scale *matsucoccus feytaudi* duc. (homoptera: Matsucoccidae) in relation to the genetic structure of its host. *Molecular Ecology*, **8**, 1593-1602.
- Cassens I., Van W Waerebeek K., Best P. B., Crespo E. A., Reyes J. and Milinkovitch M. C. (2003) The phylogeography of dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*): a critical examination of network methods and rooting procedures. *Molecular Ecology*, **12**: 1781-1792.

- Clement M, Posada D, Crandall KA. (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, 9(10):1657-1660.
- Demesure B, Sodji N, Petit RJ (1995) A set of Universal primers for amplification of polymorphic noncoding regions of the mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*, 4(1): 129-131.
- Denton, G.H., T.V. Lowell, P.I. Moreno, B.G. Andersen & C. Schlüchter (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(2): 167-229.
- DumolinLapegue, S., M. H. Pemonge & R. J. Petit (1997) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 6, 393-397.
- Donoso C. & Escobar B. (2006) *Weinmannia trichosperma* Cav. Tineo, Teñío Tinel, Palo Santo, Maden Mëdehue, Tarco. Familia Cunoniaceae" En: *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología*. Claudio Donoso Zegers (ed). Marisa Cuneo Ediciones, Chile. pp 576-585.
- Donoso, C. 2005. *Árboles nativos de Chile. Guía de reconocimiento*. Edición 4. Marisa Cuneo Ediciones, Valdivia, Chile. 136p.
- Doorduyn, L. J., K. van den Hof, Vrieling K. and Joshi J. (2010) The lack of genetic bottleneck in invasive Tansy ragwort populations suggests multiple source populations. *Basic and Applied Ecology*, 11(3): 244-250.
- Doyle J.J., Davis J.I., Soreng R.J., Garvin D, Anderson M.J. (1992) Chloroplast DNA inversions and the origin of the glass family (Poaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 89: 7722-7726.
- DumolinLapegue S., Demesure B, Petit RJ (1995) Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theor Appl Genet*, 91: 1253-1256.
- DumolinLapegue, S., M. H. Pemonge, et al. (1997) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology*, 6(4): 393-397.
- Dupanloup, I., Schneider, S., Excoffier, L. (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, 11(12): 2571-81.
- Emshwiller E & Doyle J.J. (1999). Chloroplast-Expressed Glutamine Synthetase (ncpGS): Potential Utility for Phylogenetic Studies with an Example from Oxalis (Oxalidaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 12(3): 310-319.
- Fluxus Technology Ltd (1999-2009) "<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>".
- Freeland J. R. (2005) Networks. In: *Molecular Ecology*. John Wiley & Sons, Chichester. England. pp167-170.
- Frohlich M. & Meyerowitz E.M. (1997) The search for flower homeotic gene homologs in basal angiosperms and gnetales: a potential new source of data on the evolutionary origin of flowers. *Int. J. Plant Sci.*, 158(6): 131-142.
- Fu Y.X. (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics*, 147: 915-925.

- Graham, A. (2009) The Andes: A Geological overview from a biological perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **96**: 371-385.
- 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". *Mol Ecol Notes*, **1**: 345-349.
- Grivet, D. and R. J. Petit (2003) Chloroplast DNA phylogeography of the hornbeam in Europe: Evidence for a bottleneck at the outset of postglacial colonization. *Conservation Genetics*, **4**(1): 47-56.
- Haberle, S.G., Bennett, K.D., 2004. Post-glacial formation and dynamics of northern Patagonian rainforest in the Chonos Archipelago, southern Chile. *Quaternary Science Reviews*, **23**: 2433-2452.
- Heinze B (2002) <http://fbva.forvie.ac.at/200/1892.html>
- Heusser C.J. (1982) Palynology of cushion bogs of the Cordillera Pelada, Province of Valdivia, Chile. *Quaternary Research*, **17**: 71-92.
- Heusser C.J. (1983) Quaternary Pollen Record from Laguna de Tagua Tagua, Chile. *Science*, **219**: 1429-1431.
- Heusser, C.J. (1984). Late-glacial - Holocene climate of the Lake District of Chile. *Quaternary Research*, **22**:77-90.
- Heusser, C.J., Heusser, L.E. & Hauser, A. (1992) Paleoecology of late Quaternary deposits in Chiloé Continental, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural*, **65**: 235-245.
- Heusser, C.J., Heusser, L.E. & Lowell, T.V. (1999) Paleoecology of the southern Chilean Lake District - Isla Grande de Chiloé during middle-late Llanquihue glaciation and deglaciation. *Geografiska Annaler*, **81A**: 231-284.
- Heusser, C.J., Lowell, T.V., Heusser, L.E., Moreira, A. & Moreira, S. (2000) Pollen sequence from the Chilean Lake District during the Llanquihue glaciation in marine oxygen isotope stages 4-2. *Journal of Quaternary Science*, **15**: 115-125.
- Hewitt G (2000). The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**: 907-913.
- Hinojosa, L. F. & C. Villagran (1997) History of the southern South American forests.1. paleobotanical, geological and climatical background on Tertiary of southern South America. *Revista Chilena De Historia Natural*, **70**: 225-239.
- Hollin, J.T. & Schilling, D.H., (1981) Late Wisconsin-Wichselian mountain glaciers and small ice caps. In: Denton JH & TJ Hughes (eds) *The last great ice sheets* 179-206. Wiley, New York, New York.
- Holsinger (2010) Notes of Population Genetics. Course of Population Genetics EEB5348, University of Connecticut. (<http://darwin.eeb.uconn.edu/eeb348/lecturenotes/molevol-tajima.pdf>)
- Hundertmark, K. J. and L. J. Van Daele (2010) Founder effect and bottleneck signatures in an introduced, insular population of elk. *Conservation Genetics*, **11**(1): 139-147.
- Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge University Press, Cambridge, MA.
- Lessa, E. P., G. D'Elia & U. F. J. Pardinas (2010) Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian-Fueguian rodents. *Molecular Ecology*, **19**, 3031-3037.

- Lusk CH., (1999) Long-lived light-demanding emergents in southern temperate forests: the case of *Weinmannia trichosperma* (Cunoniaceae) in southern Chile. *Plant Ecology*, **140**: 111–115.
- 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
- Marchelli P, Gallo LA (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics*, **7**: 591-603.
- Markgraff, V. (1991) Younger Dryas in southern South America? *Boreas*, **20**: 63-69.
- Mathiasen, P. & A. C. Premoli (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**, 371-385.
- Mayr E. (1942) *Systematics and the Origin of Species*. Columbia University Press, New York.
- McGaughran, A., G. Torricelli, et al. (2010) Contrasting phylogeographical patterns for springtails reflect different evolutionary histories between the Antarctic Peninsula and continental Antarctica. *Journal of Biogeography*, **37**(1): 103-119.
- Miller Mark P. (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**: 722-724.
- Monmonier MS (1973) Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis*, **5**: 245-261.
- Moreno, P. I., T. V. Lowell, G. L. Jacobson & G. H. Denton (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.
- Moreno, P. I. (2000) Climate, fire, and vegetation between about 13,000 and 9200 C-14 yr BP in the Chilean lake district. *Quaternary Research*, **54**: 81-89.
- Moreno, P. I. & A. L. Leon (2003) Abrupt vegetation changes during the last glacial to Holocene transition in mid-latitude South America. *Journal of Quaternary Science*, **18**: 787-800.
- Muñoz M., (1980). *Weinmannia trichosperma*. In Muñoz M. ed. *Flora del parque Nacional Puyehue*. Editorial Universitaria. Santiago, Chile. p. 239.
- Palmer J.D., (1992) Mitochondrial DNA in Plant Systematics: Applications and Limitations. In Pamela S. Soltis, Douglas E. Soltis, Jeff J. Doyle ed. *Molecular Systematics of Plants, Vol I*. Chapman & Hall, NY, USA.
- Peel, M. C. and Finlayson, B. L. and McMahon, T. A. (2007) Updated world map of the Köppen–Geiger climate classification. *Hydrol. Earth Syst. Sci.*, **11**: 1633–1644.
- Pérez C.F., Castañeda M.E., Gassmann M.I. & Bianchi M.M. (2009). A statistical study of *Weinmannia trichosperma* pollen trajectories across the Andes. *Advances in Geosciences* **22**, 79-84.
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., deBeaulieu, J.-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R., Fineschi, S., Grivet, D., Lascoux, M., Mohanty, A., Müller-Starck, G., Demesure-Musch, B., Palmé, A., Martín, J.P., Rendell, S., Vendramin, G.G.,

- (2003) Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* **300**, 1563–1565.
- Polzin T, Daneschmand S V (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operations Research Letters*, **31**:12-20.
- Ponce, M., Mehlreter, K. y De La Sota, E.R. (2002) Análisis biogeográfico de la diversidad pteridofítica en Argentina y Chile continental. *Rev. chil. hist. nat. [online]*. **75(4)**: 703-717.
- 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.
- 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. and Veblen, T.T., (2000) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, **27(2)**: 251-260.
- Premoli, A.C., Souto, C.P., Allnut, 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.
- Rajora OP, Dancik BP (1992) Chloroplast DNA inheritance in *Populus*. *Theor Appl Genet* **84**: 280–285.
- Quiroga M.P. & A. Premoli. (2010) Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **285**: 186 - 193.
- Rohling, E. J., M. Fenton, F. J. Jorissen, P. Bertrand, G. Ganssen & J. P. Caulet (1998) Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature*, **394**: 162-165.
- Ruiz, E., F. Gonzalez, C. Torres-Diaz, G. Fuentes, M. Mardones, T. Stuessy, R. Samuel, J. Becerra & M. Silva (2007) Genetic diversity and differentiation within and among Chilean populations of *Araucaria araucana* (Araucariaceae) based on allozyme variability. *Taxon*, **56**: 1221-1228.
- Samaniego, H. & P. A. Marquet (2009) Mammal and butterfly species richness in Chile: taxonomic covariation and history. *Revista Chilena De Historia Natural*, **82**: 135-151.
- Sang T., Crawford D. J. & Stuessy T. F. (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany*, **84**: 1120–1136.
- Segovia, R. (2010). Filogeografía de *Eucryphia cordifolia*: historia glacial y diversidad genética en los bosques templado lluviosos del sur de sudamérica. Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Shaw, J., E. B. Lickey, et al. (2005) The tortoise and the hare II: Relative utility of 21



- noncoding chloroplast DNA sequences. *American Journal of Botany* **92**(1): 142–166.
- Shaw, J., E. B. Lickey, et al. (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**(3): 275-288.
- Small R. L., Ryburn J.A., Cronn R. C., Seelanan T. & Wendel J.F.(1998) The tortoise and the hare: choosing between noncoding plastome and nuclear Adh sequences for phylogenetic reconstruction in a recently diverged plant group. *American Journal of Botany* **85**: 1301–1315.
- Souto, C. P. & A. C. Premoli (2007) Genetic variation in the widespread *Embothrium coccineum* (Proteaceae) endemic to Patagonia: effects of phylogeny and historical events. *Australian Journal of Botany*, **55**: 809-817.
- Steven M. Woolley, D. P., Keith A. Crandall (2008) A Comparison of Phylogenetic Network Methods Usings Computer Simulation. *PLoS ONE*, **3**(4): e1913.
- Stewart, J. R., A. M. Lister, I. Barnes & L. Dalen (2010) Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences*, **277**: 661-671.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*, **17**: 1105–1109.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF (1998) Comparative phylogeography and postglacial colonisation routes in Europe. *Mol Ecol*, **7**: 453–464.
- Tajima F. (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, **123**:558-595.
- Tate J.A.& Simpson B.B. (2003). "Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species". *Systematic Botany*, **28**: 723–737.
- Veit H. & Garleff K. (1996) Evolución del paisaje cuaternario y los suelos en Chile central-sur. En: Armesto JJ, C Villagrán & MTK Arroyo (eds) *Ecología de los bosques nativos de Chile*: 29-50. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Villagrán, C., (1991) History of the Temperate Forest of Southern Chile during The Late-Glacial and Holocene. *Revista Chilena De Historia Natural*, **64**(3): 447-460.
- Villagrán, C., (2001). Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de La Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Revista Chilena Historia Natural*, **74**(4): 793-803.
- Villagrán, C. & Armesto J. J., (2005). Fitogeografía histórica de la Cordillera de la Costa de Chile. En Smith-Ramírez, C., Armesto, J.J., Valdovinos, C. ed. Historia, Biodiversidad y Ecología de los bosques costeros de Chile. Editorial Universitaria, Santiago de Chile. Cap. 5. p. 99-116.
- Villagrán, C. & Hinojosa L.F., (2005) En Llorente Bousquets, J. & Morrone, J.J., ed. Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines. Cap. 33 Ediciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, Jiménez Editores, México. p. 551-577.
- Watson DF (1992) Contouring: a guide to the analysis and display of spatial data. Pergamon Press, New York

Weising K, Gardner RA. (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.

## Anexo 1

### Protocolo de extracción DNaseasy plant mini kit (Qiagen)

1. Agregar aproximadamente 20 mg de tejido seco en microtubo con 1 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  $\mu$ L.
4. Agregar 400  $\mu$ L de Buffer AP1 y 4  $\mu$ L de RNasa A, mezclar con el polvo y poner en vórtex.
5. Incubar a 65°C por 1 hora. Mezclar 2 o 3 veces durante la incubación.
6. Agregar 130  $\mu$ L de buffer AP2, mezclar e incubar por 5 minutos en hielo.
7. Centrifugar por 5 minutos a 14.000 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 450  $\mu$ L). Medir la cantidad de líquido recuperado.
10. Agregar 1.5 X de buffer AP3/E y mezclar con la pipeta.
11. Pipetear 650  $\mu$ L, incluyendo algún precipitado. Y traspasar a una columna de tubo transparente. Centifugar 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 que sobró antes.
13. Cambiar la columna a un tubo nuevo de 2  $\mu$ L y agregar 500  $\mu$ L de buffer AW. Centrifugar por 1 min a 8.000 rpm.
14. Eliminar el fluido y agregar nuevamente 500  $\mu$ L 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)  $\mu$ L de buffer AE directamente sobre la membrana, incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y centrifugar por 1 minuto a 8.000 rpm.