

UCH-FC
B. Ambiental
T172
C. A



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS

**DIVERSIDAD MOLECULAR Y CARACTERIZACIÓN DEL NICHOS
CLIMÁTICO DEL COMPLEJO *Alstroemeria ligtu* PARA
PROPONER UNIDADES DE CONSERVACIÓN**

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

FERNANDA TAPIA CAMÚ

Directora de Seminario de Título: Dra. Alejandra González

Co- Director de Seminario de Título: Dr. Ramiro Bustamante

Agosto de 2012

Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile, que el Seminario de Título, presentado por la Srta. Fernanda Tapia Camú

“Diversidad molecular y caracterización del nicho climático del complejo *Alstroemeria ligtu* para proponer unidades de conservación”

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

Dra. Alejandra González
Director Seminario de Título

Dr. Ramiro Bustamante
Co-Director Seminario de Título

Comisión de Evaluación

Dr. Marco Méndez
Presidente Comisión

Dr. Pablo Guerrero
Evaluador

Alejandra González

Ramiro Bustamante

Marco Méndez

Pablo Guerrero



Santiago de Chile, Agosto de 2012.



Mi amor por la naturaleza fue desde siempre, esperaba con ansias que llegara el verano para irme de campamento con mi grupo scout o de vacaciones con mi familia donde fuera que significara salir de Santiago. Tengo un amor especial por el sur de Chile, simplemente me encanta, mi panorama ideal siempre tendrá relación con la infaltable lluvia sureña, algo rico cocinándose en una cocina a leña y una buena compañía. A esto se ha sumado mi amor por la bicicleta, el que se ha convertido en un complemento perfecto para recorrer y conocer lugares que de otra forma no sería posible.

Siempre pensé estudiar algo relacionado con la biología y las ciencias naturales, una carrera que me mantuviera ligada al mundo de "las plantas y los animales" y que me permitiera seguir de alguna manera en contacto con los paisajes que más me gustan. Después de un par de vueltas llegué a la carrera de Biología Ambiental, donde he aprendido un montón de cosas fascinantes más allá de la biología, lo que ha sido gracias a los profesores de esta facultad y grandes compañeros de curso.



Agradecimientos

Quiero partir agradeciendo a la Ale, mi profesora y guía durante todo este periodo, que finalmente resultó en este trabajo que fue un aprendizaje para ambas. Gracias Ale por todo el apoyo y energía para que esto funcionara y saliera adelante. Agradecer a mi co-tutor, el profesor Ramiro Bustamante, por los aportes y comentarios que realizó al seminario.

Quiero agradecer también a todos los integrantes del laboratorio de Ecología Evolutiva (EcoEvo I, II y III), en especial a la Maureen y Cata por "obligarme" a almorzar todos los días y la compañía entre extracciones de ADN y PCR's infinitos que hubo durante el trabajo del seminario.

Son muchos los que han estado presentes en este trabajo, en especial los amigos de siempre, sobre todo los que preguntaron mas de alguna vez "¿Y cuando entregas la tesis?" o "¿Cuánto te falta?" porque de alguna manera ayudaron a que esto finalmente llegara a término.

Pablo, gracias por estar ahí, por apoyarme, por acompañarme, por querernos, por todo! Te quiero hasta el infinito y mas allá =>

Por último gracias a mi gran familia, en especial a mis papás por apoyarme y quererme siempre e incondicionalmente.

Financiamiento: VID I 09/07-2, CONICYT PBCT/ PSD-66 y Proyecto Fondecyt
Iniciación 11110120

Índice

| | |
|--|-----|
| AGRADECIMIENTOS..... | iii |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS..... | iv |
| ÍNDICE DE FIGURAS..... | v |
| ÍNDICE DE CUADROS..... | v |
| ÍNDICE DE ANEXOS..... | vi |
| RESUMEN..... | vii |
| ABSTRACT..... | ix |
| INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| Objetivos generales y específicos..... | 7 |
| MATERIALES Y MÉTODOS..... | 8 |
| Organismo en estudio..... | 8 |
| Sitio de estudio..... | 9 |
| Obtención de muestras y extracción de ADN..... | 11 |
| Estimación de diversidad genética y estructuración poblacional de <i>A. ligtu</i> | 12 |
| a) Gen cloroplastidial..... | 12 |
| b) Microsatélites..... | 13 |
| Caracterización nicho climático del complejo <i>A. ligtu</i> | 16 |
| RESULTADOS..... | 18 |
| Diversidad molecular gen cloroplastidial..... | 18 |
| Diversidad molecular microsatélites..... | 20 |
| Caracterización del nicho climático..... | 25 |
| DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN..... | 30 |
| BIBLIOGRAFÍA..... | 37 |

Índice de Figuras

| | | |
|-----------|--|----|
| Figura 1 | Organismo de estudio | 9 |
| Figura 2 | Sitio de estudio | 10 |
| Figura 3 | Red de haplotipos | 19 |
| Figura 4 | Resultados estructuración poblacional según STRUCTURE | 24 |
| Figura 5 | Test de Mantel | 25 |
| Figura 6 | Gráfico Análisis de Componentes Principales | 26 |
| Figura 7a | Distribución proyectada para <i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> | 27 |
| Figura 7b | Distribución proyectada para <i>A. ligtu</i> ssp. <i>incarnata</i> | 27 |
| Figura 7c | Distribución proyectada para <i>A. ligtu</i> ssp. <i>ligtu</i> | 28 |

Índice de Cuadros

| | | |
|----------|---|----|
| Cuadro 1 | Características de los partidores utilizados | 13 |
| Cuadro 2 | Valores y criterios del índice Fst | 14 |
| Cuadro 3 | Índices diversidad genética para el gen cloroplastidial | 18 |
| Cuadro 4 | Índices diversidad genética para microsatélites | 20 |
| Cuadro 5 | Grados de diferenciación genética (Fst) | 22 |
| Cuadro 6 | Tasas de migrantes entre poblaciones | 23 |
| Cuadro 7 | Distancias de Mahalanobis | 26 |
| Cuadro 8 | Variables bioclimáticas significativas para la modelación | 29 |

Índice de anexos

| | | |
|---------|--|----|
| Anexo 1 | Protocolo de extracción ADN para <i>A. ligtu</i> | 46 |
| Anexo 2 | Localidades utilizadas para la modelación en Maxent | 47 |
| Anexo 3 | Descripción de las variables bioclimáticas WorldClim | 49 |
| Anexo 4 | Frecuencia alélicas (microsatélites) | 50 |

Resumen

La biología de la conservación tiene como objetivo principal proveer principios y herramientas que permitan preservar la diversidad biológica en todos sus niveles. La identificación taxonómica apropiada de unidades poblacionales para su protección y manejo adecuado es esencial para la conservación de la biodiversidad. La conservación se realiza generalmente a nivel de especie. Sin embargo, también deben ser consideradas unidades taxonómicas inferiores como las subespecies o variedades. La identificación de estas unidades de conservación entregan una idea de los procesos evolutivos y la distribución de la diversidad genética para llevar a cabo planes de conservación eficientes y acordes a cada organismo.

El género *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) comprende alrededor de 60 especies distribuidas en Sudamérica. Particularmente, el complejo *Alstroemeria ligtu* L. está compuesto por tres subespecies que se distribuye en la zona con mayor asentamiento humano en Chile central, entre la V y VIII región. Actualmente está ocurriendo una acelerada degradación del hábitat natural debido a actividades humanas como construcciones residenciales, deforestación y plantaciones, por lo cual numerosas poblaciones han ido desapareciendo. Basado en ciertas diferencias morfológicas, su distribución geográfica discontinua y fragmentación del hábitat la pregunta que emerge es si dentro del complejo *A. ligtu* existen unidades de conservación independientes.

En este trabajo se utilizaron dos aproximaciones (molecular y ecológica) para determinar el número de unidades de conservación presentes en el complejo *A. ligtu*.

La caracterización genética implicó la utilización de dos marcadores moleculares (gen cloroplastidial y microsatélites), para estimar el flujo y diversidad genética existente entre las poblaciones pertenecientes a cada subespecie. Por otra parte, la caracterización ecológica implicó la caracterización de los nichos climáticos y de las distribuciones geográficas potenciales de cada subespecie. La caracterización genética sugiere que las subespecies mantienen aún un flujo genético por lo cual no representarían especies distintas. Sin embargo, este flujo es limitado quedando algunas poblaciones con cierto grado de estructuración genética. Por otra parte, la caracterización ecológica no mostró solapamiento de los nichos climáticos sugiriendo la existencia de barreras ecológicas que mantienen a las subespecies con distribución discontinua.

Esto sugiere la existencia de tres unidades de conservación independientes correspondientes a poblaciones de las subespecies estudiadas. A la luz de estos resultados, las subespecies debieran ser consideradas separadamente en planes de manejo y conservación de recursos.

Abstract

The conservation biology's aim is to provide principles and tools to preserve biological diversity at all levels. Taxonomic identification of appropriate population units for its protection and proper management is essential for the conservation of biodiversity. Conservation is usually performed at the species level. However, it also must be considered lower taxonomic units such as subspecies or varieties. The identification of conservation units give an idea of evolutionary processes and the distribution of genetic diversity to carry out effective conservation plans and consistent with each organism.

The genus *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae) comprises about 60 species distributed in South America. Particularly, the complex *Alstroemeria ligtu* L. consists of three subspecies distributed in the area with the highest settlement in central Chile, between the V and VIII region. Today is going a rapid degradation of natural habitat due to human activities such as residential construction, deforestation and plantations, so many populations are disappearing. Based on certain morphological differences, geographical discontinuous distribution and habitat fragmentation, the question that emerges is if within the complex *A. ligtu* exist independent units of conservation.

In this work we used two approaches (molecular and ecological) to determine the number of conservation units within the complex *A. ligtu*. Genetic characterization involved the use of two molecular markers (microsatellites and gene cloroplastidial) to estimate the flow and genetic diversity among populations of each subspecies. Moreover, the ecological approach involved the climatic characterization of the niche

and potential geographic distributions of each subspecies. Genetic characterization suggests that the subspecies still maintain gene flow so it does not represent distinct species. However, this flow is limited, leaving some populations with some degree of genetic structuring. Moreover, the ecological characterization showed no overlap of climatic niches suggesting the existence of ecological barriers that keep the subspecies with disjunct distribution.

This suggests the existence of three independent conservation units that relate to the subspecies we studied. With these results, the subspecies should be considered separately in management plans and resource management conservation.

Introducción

La biología de la conservación tiene como objetivo principal proveer un conjunto de principios y herramientas que permitan preservar la diversidad biológica en todos sus niveles. A través de los conocimientos que esta disciplina de la biología nos entrega se cumple además con la protección de los procesos que sustentan la diversidad biológica existente, sobre todo porque las perturbaciones causadas por la actividad humana sobre los ecosistemas son enormes (Soulé, 1985; Moritz, 2002; Groom et al., 2006). A nivel mundial muchas especies vegetales se encuentran amenazadas y otras tantas ya extintas, debido principalmente a las consecuencias directas e indirectas de la actividad antrópica sobre el medio ambiente (Rocha & Gasca, 2007).

La biodiversidad existente es el resultado de procesos ecológicos y evolutivos irrepetibles, que abarcan todos los tipos y niveles de organización biológica posibles, es decir, desde algo tan pequeño como los genes hasta unidades complejas como los ecosistemas (CONAMA, 2008). Es así como la configuración actual de la diversidad biológica puede explicarse históricamente mediante el análisis de procesos tales como la diversificación de especies, extinciones y la dinámica de las comunidades y los ecosistemas (Núñez et al., 2003). Cuando la diversidad a cualquier nivel disminuye, se traduce a grandes rasgos, en una merma del potencial que tienen los organismos para adaptarse a futuros cambios ambientales: se limita así su adecuación biológica y quedan más vulnerables a amenazas y/o cambios de su medio ambiente (Lacy, 1987; Hedrick, 2001; Amos & Balmford, 2001). En la Conferencia de Naciones Unidas de Medio Ambiente y Desarrollo celebrada en Río de Janeiro en 1992, se planteó

conservar la biodiversidad en su conjunto. Esto se traduce en entender y conocer aspectos de la distribución y variación de la biodiversidad de una especie que permitan definir estrategias o destinar recursos y esfuerzos en el ámbito de la conservación de manera eficaz.

Para la conservación de especies, una adecuada descripción de la distribución y potencial de los distintos taxos tiene gran importancia, ya que constituyen el fundamento de la identificación de las áreas de simpatria, endemismo y diversidad, así como también de la utilización de hábitat por parte de los mismos (Jayat & Pacheco, 2006). Así, la conservación de especies ha despertado un enorme interés para comprender patrones espaciales de la biodiversidad (Hijmans & Graham, 2006); evaluar el impacto del cambio global sobre la distribución de los organismos (Peterson et al., 2001; Lawler et al., 2009); la detección, evaluación y manejo de especies invasivas (Peterson & Vieglais, 2001), entre otras aplicaciones en el campo de la biología. De esta manera se han implementado metodologías que permiten realizar modelos capaces de predecir la distribución de los taxos y se han transformado en instrumentos valiosos para establecer áreas prioritarias de conservación (Ferrier 2002; Loiselle et al., 2003; Ferrier et al., 2004).

¿Qué conservar? Esta es una de las preguntas más difíciles de contestar. Porque, claramente, no existen los medios económicos ni logísticos que permitan, tanto a las autoridades gubernamentales como organizaciones no gubernamentales (ONG's), conservar todas y cada una de las especies que se encuentran clasificadas dentro de los estados de conservación críticos enlistados por la UICN. Se vuelve fundamental, entonces, encontrar estrategias que proporcionen planes de manejo eficientes y

viables, que permitan conservar las distintas variables que sustentan tanto procesos ecológicos como evolutivos (Moritz, 2002; Rouget et al., 2003).

La identificación taxonómica apropiada de unidades poblacionales para su protección y manejo adecuado es esencial para la conservación de diversidad biológica. La conservación se realiza generalmente a nivel de especie. Sin embargo, se propone que no sólo las unidades de conservación identificadas a nivel de especie sean blancos de conservación, sino también unidades taxonómicas inferiores (Moritz, 1999). Para la identificación y clasificación de especies, los principios y metodologías genéticas están relativamente bien desarrolladas. A pesar de esto la identificación de especies puede ser controversial. Porque, si bien el concepto de especie es básico dentro de la biología, hay un gran número de definiciones para especie dependiendo del enfoque del estudio (Perfectti, 2002). Esto ha significado un problema para las agencias y actores involucrados en los procedimientos de clasificación de especies de acuerdo a su estado de conservación. La identificación y protección de poblaciones locales genéticamente distintas debería ser un mayor foco en conservación, debido a que la conservación de poblaciones distintas ayuda a maximizar el potencial de evolución y minimizar los riesgos de extinción (Hughes et al. 1997; Petit et al., 1998; Luck et al. 2003).

En este contexto, identificar unidades de conservación es un tema controversial y desde un punto de vista metodológico aun no está resuelto. Las unidades de conservación deben darnos una idea de los procesos evolutivos y la distribución de la diversidad genética para llevar a cabo planes de conservación eficientes y acordes a cada organismo.

Existen varias aproximaciones que permiten identificar unidades de conservación. Una de las más conocidas son las llamadas *Unidades Evolutivamente Significativas (UES)*, propuestas por Ryder (1986). Una unidad evolutivamente significativa puede definirse ampliamente como una población o grupo de poblaciones que merecen una gestión independiente o prioritaria de conservación debido a su alta distinción tanto genética como ecológica (Ryder, 1986). Tales unidades nos entregan además de la información sobre los procesos evolutivos, información sobre la distribución de la diversidad genética, lo cual permite llevar a cabo estrategias de conservación más acordes a la situación de cada unidad (Rocha & Gasca, 2007). En este contexto, las UES no necesariamente coinciden con la categoría de especie, ya que puede tratarse de poblaciones con características genéticas particulares muy diferentes del resto o que han estado históricamente aisladas (Soltis & Gitzendanner, 1999). Después de la aparición de las UES, diversos autores han intentado darle sentido proponiendo criterios que permitan identificarlas. Moritz (1994) planteó algunos criterios basados principalmente en análisis moleculares. Además dio a conocer las llamadas "*management units*" o unidades de manejo (UM). Estas son poblaciones demográficamente distintas que deben ser manejadas adecuadamente para asegurar la viabilidad de las UES. La mayoría de las propuestas para identificar unidades de conservación ha sido desde una perspectiva genética. A pesar de que los datos obtenidos de análisis moleculares son importantes de considerar, ya que entregan resultados robustos y confiables, muchas veces otorgan un enfoque limitado. Algunos autores recomiendan la incorporación de datos ecológicos que apoyen el reconocimiento de unidades de conservación independientes (Moritz, 2002; Crandall et al. 2000; Fraser & Bernatchez, 2001).

La conservación del género *Alstroemeria* ("Lirio de los Incas", Bridgen et al., 2002) se encuentra aún en etapas iniciales. Este género exclusivo de Sudamérica, comprende alrededor de 60 especies distribuidas desde Venezuela hasta la Patagonia, encontrándose en altitudes que van desde el nivel del mar hasta los 4500 msnm (Aagesen & Sanso, 2003; Ravenna, 1988). En Chile, entre los 20° y 53° S, podemos encontrar 33 de las especies descritas para el género, distribuyéndose la mayoría de ellas en la zona central del país, entre los 28° y 37° S. En esta zona, se ha descrito que las especies de *Alstroemeria* se encuentran "amenazadas" debido a tres causas fundamentales: (1) transformación del hábitat, (2) sobreexplotación de ecosistemas con prácticas no sustentables como la ganadería y (3) extracción directa de las plantas con fines comerciales (Muñoz & Moreira, 2003). Estas causas podrían estar ligadas directamente a la disminución de las poblaciones naturales de este grupo (Muñoz & Moreira, 2003). Este escenario parece cobrar importancia cuando se analiza el estado de conservación de las especies de *Alstroemeria*, encontrándose un 28,3% de en peligro de extinción y un 37,7% en la categoría vulnerable (Muñoz y Moreira, 2003).

Particularmente, *Alstroemeria ligtu* L. es una de las especies que se distribuye en la zona con mayor asentamiento humano en Chile central, entre la V y VIII región. En dicha área, actualmente está ocurriendo una acelerada degradación del hábitat natural debido a actividades humanas como construcciones residenciales, deforestación y plantaciones, por lo cual numerosas poblaciones han ido desaparecido (González, pers. observ.). Más aún, las poblaciones que aún permanecen son rutinariamente intervenidas, siendo extraídas directamente las flores para su uso ornamental (Baeza et al., 2006) y para hacer "chuño" con fines alimenticios y/o medicinales (Muñoz y Moreira, 2003). De esta manera la especie se considera protegida sólo en parques y

reservas, desconociéndose su verdadero estado de conservación en lugares fuera de las áreas silvestres protegidas.

A. ligtu está conformada por tres subespecies cuya definición se sustenta principalmente en diferencias de rasgos morfológicos (Haig et al., 2006). Las subespecies presentarían además una distribución discontinua: *A. ligtu* ssp. *simsii* (Sprengel) Bayer (V – VII región), *A. ligtu* ssp. *incarnata* Bayer (VII región) y *A. ligtu* L. ssp. *ligtu* (VII – VIII región) (Buitendijk et al., 1997; Muñoz y Moreira, 2003; Zhou et al., 2003). Esta diferenciación espacial podría dificultar el flujo genético entre las subespecies. En consecuencia, en un escenario de cambio climático y/o pérdida del hábitat natural por actividades antrópicas, aumenta el riesgo de extinción de las subespecies.

Basado en ciertas diferencias morfológicas, su distribución geográfica y degradación del hábitat la pregunta que emerge es si dentro del complejo *A. ligtu* existen unidades de conservación independientes. Para responder esta pregunta en esta tesis se utilizaran dos aproximaciones (molecular y ecológica) para determinar el número de unidades de conservación presentes en el complejo *A. ligtu*. Por un lado, el análisis molecular permitirá determinar la diversidad y flujo genético existente entre las subespecies de *A. ligtu*, mientras que la caracterización del nicho climático y los modelos de distribución permitirán determinar si los nichos y las áreas potenciales de distribución son o no compartidas.

Objetivos

1.1. Objetivo General

Determinar si las subespecies del complejo *A. ligtu* constituyen unidades de conservación independientes.

1.2. Objetivos específicos

- Caracterizar la diversidad genética del complejo *A. ligtu* con marcadores moleculares que presentan distinta tasa de evolución (cloroplastidial y nuclear)
- Evaluar la existencia de diferenciación genética y flujo génico entre las poblaciones y subespecies descritas para *A. ligtu*.
- Caracterizar el nicho climático y realizar una modelación predictiva de la distribución geográfica de las subespecies de *A. ligtu*.

Materiales y Métodos

2.1. Organismo en estudio

Alstroemeria ligtu pertenece al género Alstroemeriaceae, uno de los géneros más diversos de la flora vascular de Chile, comprende alrededor de 33 especies. Es endémica de Chile central, que habita entre los 32° 45' S y 34° 24' S, desde la costa hasta las de los Andes (0 - 1800m de altitud). *A. ligtu* es una especie hermafrodita auto-incompatible que presenta una gran variación morfológica y habita en una amplia gama de ambientes a lo largo de su rango de distribución (Baeza et al., 2010). La época de floración se extiende de noviembre a enero, seguido de la estación de fructificación que termina en febrero (Arroyo & Uslar, 1993; Botto-Mahan et al, 2011). *Alstroemeria ligtu* presenta 3 subespecies: *A. ligtu* ssp. *simsii*, *A. ligtu* ssp. *incarnata* y *A. ligtu* ssp. *ligtu*. Las tres subespecies presentan flores zigomorfas 4-6 cm de largo y dispuestas en umbelas con 1 a 5 flores cada uno. Los brotes florales tienen 25-60cm de altura y las flores constan de seis tépalos variables en coloración, de los cuales dos presentan a lo largo líneas de color marrón u otro color oscuro (Navas, 1973; Muñoz y Moreira, 2003). Lo que diferencia a las subespecies a simple vista es la coloración de los tépalos y su distribución. *Alstroemeria ligtu* ssp. *simsii* presenta una coloración roja-anaranjada y tiene una distribución que va desde el Cerro Caquis, en la provincia de San Felipe, hasta Pichilemu en la región de O'Higgins. *Alstroemeria ligtu* ssp. *incarnata* tiene tépalos de color rosado pálido y se encuentra presente en la zona andina de las regiones de O'Higgins y Maule entre los 1.000 y 2.000 msnm. Para *A. ligtu* ssp. *ligtu* podemos encontrar especímenes con tépalos blancos, amarillos, rosados o rojos (Figura 1). Está descrita para la zona que comprende desde Camarico en la ribera

norte del río Claro, en la región del Maule, hasta Cañete en la provincia de Arauco por la costa, el interior y precordillera hasta los 1.300 msnm (Bayer, 1987).

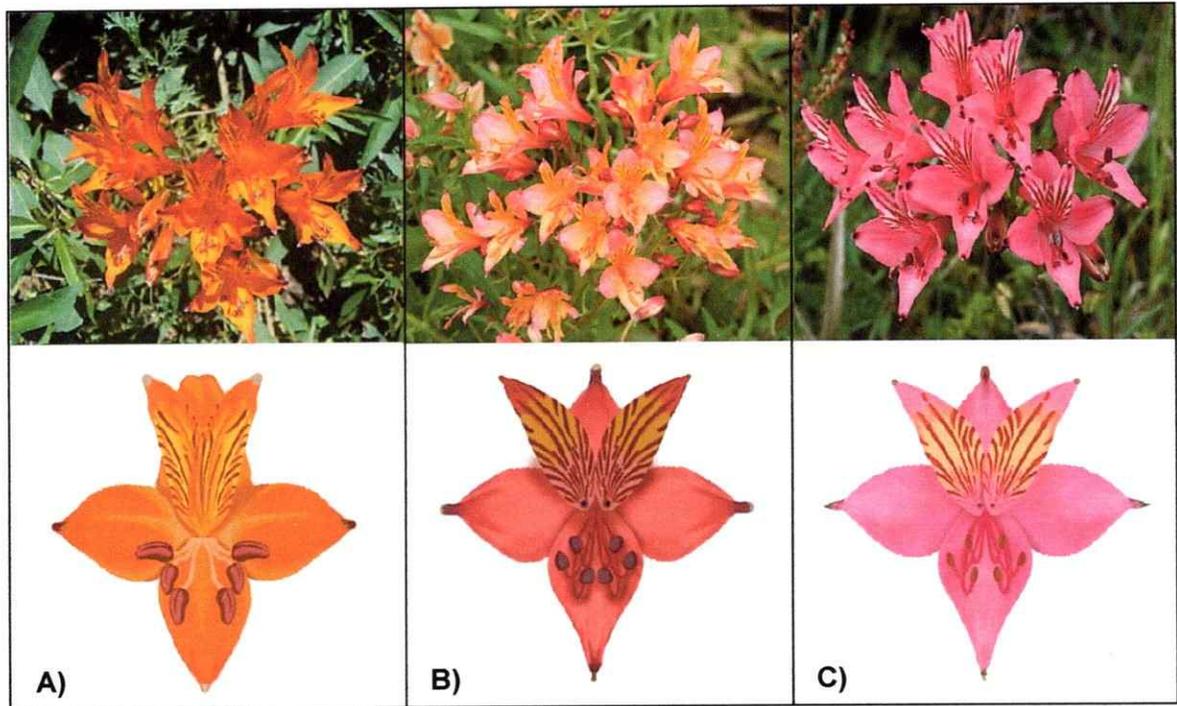


Figura 1. Individuos recolectados en las diferentes localidades. Se aprecian las diferencias a nivel morfológico que presenta el complejo *A. ligtu*. **(A)** *A. ligtu* ssp. *simsii*, **(B)** *A. ligtu* ssp. *incarnata* y **(C)** *A. ligtu* ssp. *ligtu*.

2.2. Sitio de Estudio

Este trabajo se llevó a cabo visitando 10 poblaciones de *A. ligtu* ubicadas en un rango de 600 km; desde la Cuesta Zapata ubicada en la Región Metropolitana hasta La Reserva Nacional Federico Albert en la Región del Maule (Figura 2). Por cada población visitada se obtuvo material foliar de 15 individuos. La temporada de recolección de muestras fue durante el verano, entre octubre de 2009 y febrero de 2010.

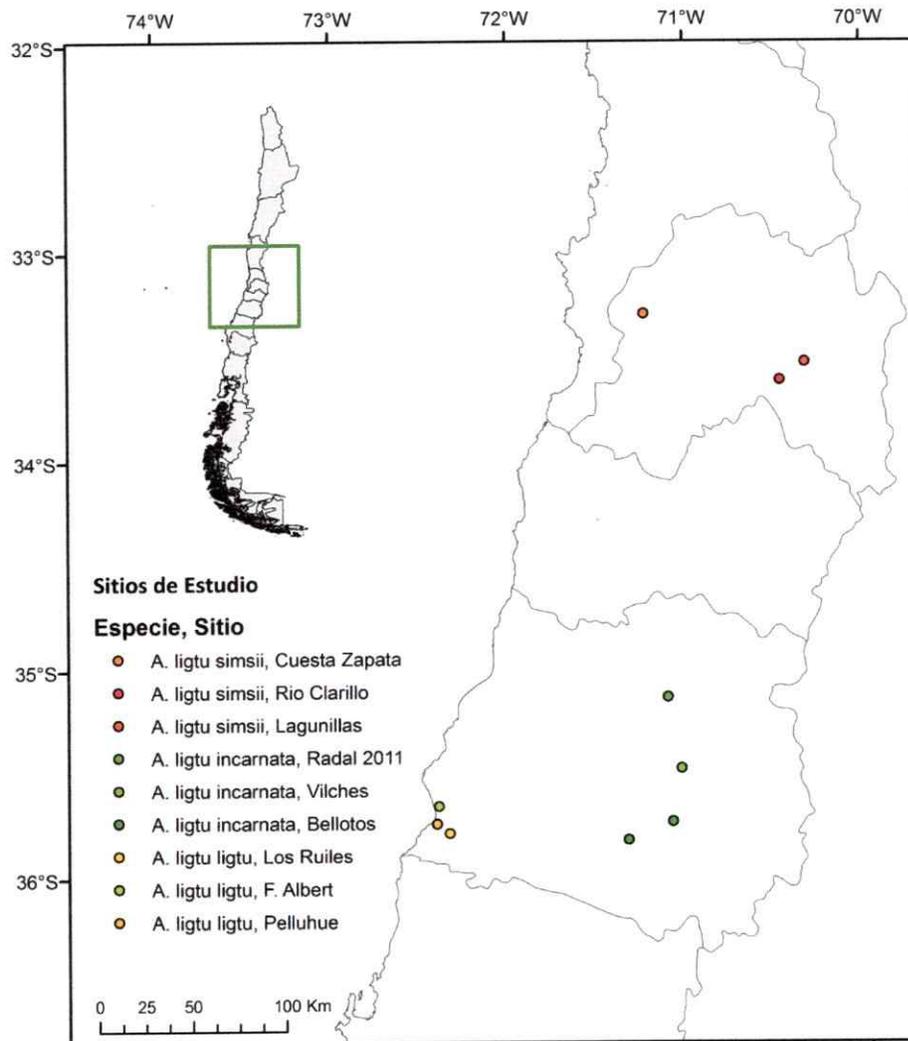


Figura 2. Distribución geográfica de las poblaciones de *A. ligtu* analizadas. Colores rojo: *A. ligtu ssp. simsii*, color verde: *A. ligtu ssp. incarnata* y color amarillo: *A. ligtu ssp. ligtu*. En estas localidades fueron recolectadas las muestras para cada una de las subespecies.

El tipo de clima predominante para esta zona es de tipo mediterráneo, con estaciones marcadas, donde la mayoría de las precipitaciones se concentran en la temporada de invierno, siendo el verano el periodo más seco (di Castri y Hajek, 1976).

2.3. Obtención de muestras y extracción de ADN

Para realizar la extracción de ADN se seleccionaron 5 individuos por cada sitio, quedando un total de 15 muestras por población aprox. Se extrajo material foliar de cada individuo, el cual se conservó en bolsas con sílica gel, georeferenciando cada individuo con GPS (Garmin eTrex Legend H). La extracción de ADN se realizó según protocolo de extracción modificado para *A. ligtu* (Anexo 1). En la etapa posterior a la extracción se determinó la pureza del DNA resultante utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. A partir de estas mediciones se realizaron diluciones de las muestras para obtener una concentración de DNA de 10 y 100 ng/μl.

2.4. Estimación de diversidad genética y estructuración poblacional en *A. ligtu*

Para estimar diversidad genética en el complejo *A. ligtu* se utilizaron dos tipos de marcadores con contrastante tasas de evolución.

a) Gen Cloroplastidial

Se seleccionó una región no codificante del ADN cloroplastidial: *psbA-trnH* (Sang et al. 1997) (Cuadro 1). Según Shaw (2005) este marcador permite identificar diferencias incluso entre especies estrechamente relacionadas. Las muestras de ADN fueron amplificadas mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) en un volumen total de 30 μl, que contiene lo siguiente: 15 μl de GoTag®Colorlees Master Mix, 1.8 μl de cada partidor (10 ng/μl), 1-5 μl de templado de ADN (100 ng/μl), 2.5 MgCl₂, 1.5 μl de BSA y agua libre de nucleasas para completar los 30 μl. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABIPrism 2720 Thermalcycler. El protocolo utilizado para el PCR comienza con un periodo de denaturación a 94°C por 7 min, a continuación 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C (T° de annealing) y 1 min

a 72°C; para finalizar 10 min a 72°C. Los productos amplificados fueron almacenados a 4°C y enviados a Macrogen (Seul , Korea) para su secuenciación.

Las secuencias obtenidas se editaron con el programa MEGA5 (Tamura et al., 2011) usando la opción CLUSTALX. Una vez alineadas se empleó el programa DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009), en el cual se agruparon las secuencias por subespecies y se identificaron sitios polimórficos e índices de diversidad haplotípica y nucleotídica. Finalmente, con ayuda del programa NETWORK (Bandelt et al., 1999), se generó una red de haplotipos.

b) Microsatelites

Los microsatélites de este estudio fueron especialmente diseñados por encargo a la empresa Canadiense ATG Genetic. De los 16 microsatélites que inicialmente estaban disponibles, 5 de ellos fueron seleccionados por ser polimórficos (Cuadro 1). Estos 5 marcadores se mandaron a sintetizar agregándole una cola M13 (CACGACGTTGTAAAACGAC) al partidior forward, sitio donde se adhiere el fluoróforo que permite visualizar los fragmentos.

Las muestras de ADN fueron amplificadas mediante PCR en un volumen total de 15 µl, que contiene lo siguiente: 7.5 µl de GoTaq® Colorlees Master Mix, 0.5 µl de cada partidior (10 ng/µl), 1.2 µl de templado de ADN (10 ng/µl), 0.25 µl de fluoróforo M13 (10 ng/µl), 0.35 µl de BSA y 4.7 µl de agua libre de nucleasas. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador ABIPrism 2720 Thermalcycler. El protocolo utilizado para el PCR comienza con un periodo de denaturación a 95°C por 3 min, a continuación 35

ciclos de 30 seg a 95°C, 30 seg a 54°C (T° de annealing) y 1 min 30 seg a 72°C; para finalizar 5 min a 72°C. Los productos amplificados fueron almacenados a 4°C.

| Locus | Secuencia Partidor (5'-3') | Fragmento esperado (bp) | Temperatura Annealing (°C) |
|--|--|-------------------------|----------------------------|
| Microsatélites | | | |
| Alig1 | F: CCTAAGATAGCCTGCGGGAA R: GATATTGGGTATATGCCTAACC | 269 | 54 |
| Alig13 | F: CCATTTTCTCTGTGTGCACC R: AACTTGACTTAAGCTTCTGGAC | 207 | 54 |
| Alig18 | F: GTGCTATAAAACACCCATACC R: CGATTGCGCAACTTCGAGGA | 220 | 54 |
| Alig19 | F: CCAACATACCATCAGAATCACC R: TTGGGGGGATTCTCCAAGA | 194 | 54 |
| Alig23 | F: AGGGTATTGTTGGTAGCTTAC R: TTGTGAGCACCGGTCGAAAA | 287 | 54 |
| cpDNA | | | |
| psbA (Forward) trnH (Reverse) | GTTATGCATGAACGTAATGCTC CGCGCATGGTGGATTACAAATC | <500 | 58 |

Cuadro 1. Características de los partidores usados en este trabajo

Los fragmentos amplificados correspondientes a los 5 microsatélites fueron analizados en geles de agarosa al 1.5% utilizando GelRed como agente intercalante para la visualización positiva de los productos de PCR. El análisis del fragmento se realizó en el servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica.

Para la exploración de los resultados se utilizó el programa de análisis de fragmentos de DNA GeneMarker (SoftGenetics Inc.), el cual permite la visualización de los fragmentos donde se identifican los alelos amplificados. Posteriormente se construyó una matriz de datos alélicos para llevar a cabo los análisis estadísticos correspondientes. Número, frecuencia y riqueza de alelos se obtuvieron por medio del programa FSTAT (Goudet, 1995) para cada uno de los alelos por locus y por población. Con el programa GENETIX (Belkhir, 1996) se calcularon las heterocigocidades esperadas (HE) y observadas (HO). Para determinar si existen desviaciones en el equilibrio Hardy-Weinberg, se estimó el índice Fis y su significancia estadística con 5000 permutaciones. Además se calculó el índice Fst para cada par de poblaciones, también conocido como índice de fijación, que explica los cambios en la heterocigocidad debido a la subdivisión poblacional y deriva genética, y es el estimador de diferenciación genética existente entre poblaciones. Dependiendo de su valor, Hartl y Clark (1997) establecen criterios para clasificar el grado de diferenciación entre poblaciones (Cuadro 2).

| Valores de Fst | Grado de diferenciación |
|-----------------------|----------------------------------|
| 0.00 - 0.05 | Diferenciación genética pequeña |
| 0.05 - 0.15 | Diferenciación genética moderada |
| 0.15 - 0.25 | Diferenciación genética alta |
| Fst > 0.25 | Diferenciación genética muy alta |

Cuadro 2. Valores de Fst y criterios de significancia para interpretar resultados.
(Tomado de Hartl & Clark, 1997)

Como el índice F_{st} es poco sensible a las altas tasas de mutación presentadas por los marcadores microsatélites, puede subestimarse el grado de diferenciación (Balloux et al, 2000). Por esta razón se calculó con ayuda del programa ARLEQUIN (Excoffier, 2005) el índice R_{st} (Slatkin, 1995) que resulta más adecuado al usar microsatélites.

Las tasas de migración se estimaron utilizando el programa BAYESASS 1.3 (Wilson & Rannala 2003), que aplica un enfoque bayesiano a genotipos multilocus.

Otro de los análisis realizados fue con el programa STRUCTURE (Pritchard et al., 2000), basado en un modelo bayesiano que permite determinar si existe una estructura genética dentro del set de datos alélicos. Agrupa los individuos en un número de clusters genéticamente distintos (K), que no han sido previamente establecidos. El programa se configuró con los parámetros que vienen por defecto y están sugeridos en el manual. La simulación se corrió con 200000 repeticiones y otras 200000 repeticiones en el método Monte Carlo de cadenas de Markov (MCMC), recopilando resultados para $1 < K < 6$.

Por último se realizó un Test de Mantel para ver si existía alguna correlación entre las distancias genéticas estimadas y las distancias geográficas entre cada una de las poblaciones estudiadas. Para esto se utilizó la plataforma web del programa IBDWS (Jensen et al. 2005) donde se ingresó la matriz con los datos de distancias genéticas (R_{st}) y geográficas.

2.5. Caracterización del nicho climático en el complejo *A. ligtu*

La caracterización del nicho climático se basa fundamentalmente en correlacionar los puntos de ocurrencia conocidos para una especie con una serie de variables ambientales (climáticas, biológicas, de altura, etc), en este caso se utilizaron variables climáticas. En este estudio, los datos de ocurrencia se obtuvieron de cada población visitada, a lo que se sumaron los datos de distribución de las distintas subespecies descritas en la bibliografía consultada (Bayer, 1987; Muñoz y Moreira, 2003). En total para *A. ligtu* ssp. *simsii* se recopilaron 12 ocurrencias. Para *A. ligtu* ssp. *incarnata* y *A. ligtu* ssp. *ligtu* se obtuvieron 11 puntos por cada una de las subespecies (Anexo 2).

Para evaluar si existen diferencias significativas entre los nichos climáticos de cada una de las subespecies, fue necesario realizar un análisis de componentes principales (ACP). Para esto se extrajeron los valores bioclimáticos asociados a cada uno de los puntos de ocurrencia originales de las subespecies con ayuda del programa DIVA-GIS (Hijmans, 2005). Para realizar la comparación, se estimó la distancia de Mahalanobis entre las nubes de puntos y se establece la significancia estadística usando una prueba de F.

Los modelos predictivos de la distribución de cada una de las subespecies fueron ejecutados con la ayuda del software MAXENT ver. 3.3.3.k (Phillips et al., 2006). Este programa usa un algoritmo de máxima entropía, logrando resultados robustos en términos de la proyección espacial de la distribución, especialmente cuando se cuenta con pocos datos de presencias. Para estimar los modelos de distribución se realizaron 10 replicas con cada uno de los set de datos de ocurrencia por subespecie. Finalmente

se mapearon las probabilidades de ocurrencia mayores a 0.6 del promedio de 10 modelos replicados (Guerrero et al., 2011).

Para establecer las correlaciones de las ocurrencias con las variables ambientales, se utilizó la información climática obtenida de WORLDCLIM (Hijmans et al. 2005). Esta base de datos corresponde a capas climáticas globales, con una resolución de 1 km². En total son 19 variables bioclimáticas (Anexo 3) que derivan de datos de temperatura y precipitaciones actuales (1950-2000). Además se cuenta con los datos de altura para cada uno de los puntos muestreados. Para la modelación se ocuparon las 19 capas climáticas descritas para WORLDCLIM. Para medir la confiabilidad de los modelos se revisarán los valores de "AUC" (en inglés, *area under the curve*) que entrega el mismo programa MAXENT. La confiabilidad del modelo es mayor cuando este índice, que va de 0 a 1, se acerca a 1.

Resultados

3.1. Diversidad molecular gen cloroplastidial

Se analizó un total de 120 individuos para el gen *psbA-trnH*, cuyo largo de secuencia fue de 395 pares de bases (pb) considerando los gaps como un quinto caracter. De éstos, el 66,8% corresponde a sitios invariables y el 33,2% a sitios polimórficos, los que en este caso corresponden a gaps presentes en la secuencia analizada. El análisis de las secuencias mostró una diversidad haplotípica (HO) total de 0.407, encontrándose 3 haplotipos distintos dentro del complejo *A. ligtu* (Cuadro 3).

| Ssp. | Población | N | Sitios Polimórficos | N° Haplotipos | Diversidad Haplotípica | Promedio Diferencias Nucleotídicas |
|------------------|------------|-----|---------------------|---------------|------------------------|------------------------------------|
| <i>simsii</i> | Zapata | 16 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>simsii</i> | Lagunillas | 15 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>simsii</i> | Clarillo | 14 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>incarnata</i> | Radal | 15 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>incarnata</i> | Vilches | 11 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>incarnata</i> | Bellotos | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>ligtu</i> | Los Ruiles | 15 | 131 | 3 | 0.648 | 68.610 |
| <i>ligtu</i> | Pelluhue | 8 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| <i>ligtu</i> | F. Albert | 13 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| | Total | 120 | 131 | 3 | 0.407 | 48.691 |

Cuadro 3. Índices de diversidad genética (sitios polimórficos, número de haplotipos, diversidad haplotípica) asociados al gen cloroplastidial *psbA-trnH*, obtenidos desde el programa DNAsp.

Con respecto a la red de haplotipos, se observaron dos haplotipos muy frecuentes y diferenciados, siendo uno exclusivo para la subespecie *A. ligtu ssp. ligtu* y el otro compartido para las subespecies restantes. De esta manera el haplotipo 1, exclusivo de la subespecie *A. ligtu ssp. ligtu*, mostró una frecuencia igual a 29 correspondiente al 18,3 %, incluyendo las poblaciones Los Ruiles (N=8), Pelluhue (N=8) y F. Albert (N=13). Contrariamente, el haplotipo 2 fue compartido entre las poblaciones de *A. ligtu ssp. simsii* (N=45), *A. ligtu ssp. incarnata* (N=43) y una pequeña fracción de *A. ligtu ssp. ligtu* (N=4). El haplotipo número 3 es exclusivo de la población de Los Ruiles (N=3). De esta manera, la topología mostró dos grandes haplogrupos. (Figura 3).

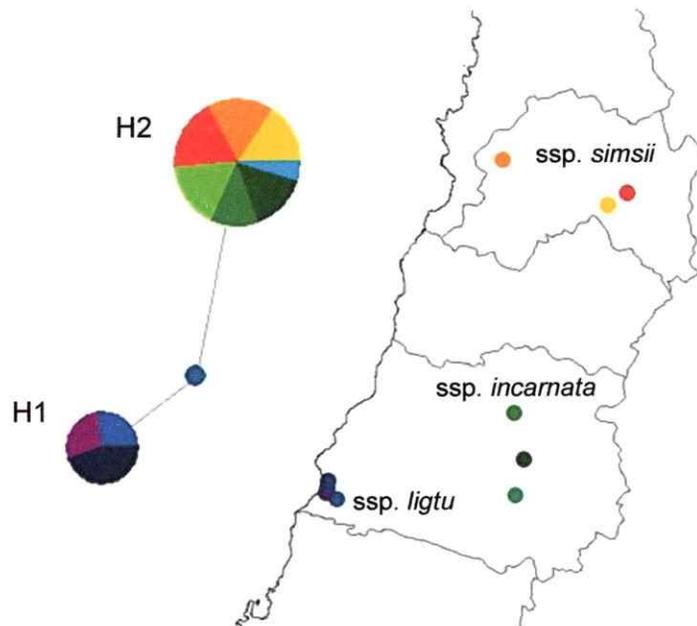


Figura 3. Red de haplotipos obtenida por el programa Network. H1= haplotipo compartido solo entre individuos de la subespecie *A. ligtu ssp. ligtu*. H2= haplotipo compartido entre las 3 subespecies de *A. ligtu*.

3.2. Diversidad molecular Microsatélites

De un total de 87 individuos analizados con 5 microsatélites, se encontró que a nivel de locus, Alig23 mostró la mayor diversidad alélica, mientras que Alig13 presentó el nivel más bajo, 0.951 y 0.485 respectivamente. La heterocigocidad observada por locus y población varió desde 0.143 en la población de F. Albert para el locus Alig13 hasta 1.0 en las poblaciones de Clarillo, Radal y Los Ruiles para el locus Alig23. A nivel global 5 poblaciones presentan excesos de heterocigocidad, salvo Vilches, donde se observó un déficit de heterocigotos (valor no significativo). Las poblaciones de Los Ruiles (*A. ligtu* ssp. *ligtu*) y Vilches (*A. ligtu* ssp. *incarnata*) presentaron índices de mayor y menor heterocigocidad a escala global, 0.808 y 0.561 respectivamente (Cuadro 4). Las frecuencias alélicas se encuentran resumidas en el anexo 4.

| Locus | | <i>A. ligtu simsii</i> | | <i>A. ligtu incarnata</i> | | <i>A. ligtu ligtu</i> | | Total |
|---------|------|------------------------|------------|---------------------------|---------|-----------------------|------------|-------|
| | | Río Clarillo | Lagunillas | Radal | Vilches | F. Albert | Los Ruiles | |
| Alig 1 | N | 15 | 15 | 15 | 13 | 14 | 15 | 87 |
| | A | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | A(r) | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 | 2.0 |
| | HE | 0.420 | 0.444 | 0.491 | 0.426 | 0.408 | 0.391 | |
| | HO | 0.600 | 0.666 | 0.867 | 0.615 | 0.571 | 0.533 | 0.642 |
| | Fis | -0.400* | -0.474* | -0.750* | -0.412* | -0.368* | -0.333* | |
| Alig 13 | N | 14 | 14 | 15 | 13 | 14 | 14 | 84 |
| | A | 6 | 5 | 4 | 3 | 4 | 5 | 8 |
| | A(r) | 5.706 | 4.779 | 3.666 | 2.981 | 3.357 | 4.745 | 4.732 |
| | HE | 0.686 | 0.674 | 0.389 | 0.379 | 0.199 | 0.640 | |
| | HO | 0.714 | 0.714 | 0.467 | 0.231 | 0.143 | 0.643 | 0.485 |
| | Fis | -0.004 | -0.024 | -0.167* | 0.424* | 0.316* | 0.033 | |

| | | | | | | | | |
|---------|------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|-------|
| Alig 18 | N | 15 | 15 | 15 | 13 | 14 | 15 | 87 |
| | A | 5 | 5 | 5 | 4 | 2 | 4 | 8 |
| | A(r) | 4.719 | 4.464 | 4.731 | 3.998 | 2.000 | 2.733 | 6.331 |
| | HE | 0.718 | 0.651 | 0.727 | 0.722 | 0.408 | 0.531 | |
| | HO | 0.933 | 0.733 | 0.667 | 0.769 | 0.571 | 0.933 | 0.768 |
| | Fis | -0.269* | -0.092 | 0.117 | -0.026 | -0.368* | -0.742* | |
| Alig 19 | N | 15 | 15 | 14 | 11 | 13 | 14 | 82 |
| | A | 10 | 6 | 8 | 7 | 5 | 4 | 16 |
| | A(r) | 8.915 | 5.655 | 7.136 | 7.0 | 7.963 | 3.960 | 8.246 |
| | HE | 0.771 | 0.762 | 0.747 | 0.715 | 0.731 | 0.630 | |
| | HO | 0.733 | 0.667 | 0.571 | 0.273 | 0.923 | 0.929 | 0.683 |
| | Fis | 0.083 | 0.159 | 0.270* | 0.647* | -0.226* | -0.444* | |
| Alig 23 | N | 15 | 15 | 15 | 12 | 14 | 15 | 86 |
| | A | 6 | 5 | 5 | 4 | 4 | 5 | 9 |
| | A(r) | 5.462 | 4.453 | 4.731 | 3.913 | 3.960 | 4.171 | 5.919 |
| | HE | 0.720 | 0.640 | 0.738 | 0.608 | 0.702 | 0.693 | |
| | HO | 1.0 | 0.933 | 1.0 | 0.917 | 0.857 | 1.0 | 0.951 |
| | Fis | -0.359* | -0.431* | -0.325* | -0.476* | -0.186 | -0.414* | |
| Total | HO | 0.796 | 0.743 | 0.714 | 0.561 | 0.613 | 0.808 | |
| | Fis | -0.167* | -0.137* | -0.120 | 0.059 | -0.217* | -0.369* | |

Cuadro 4. (N) individuos por población; (A) número de alelos por locus; A(r) riqueza alélica; (HE) Heterocigosidad esperada; (HO) Heterocigosidad observada; (*) valores significativos de Fis; valores destacados presentan desviaciones significativas del Equilibrio Hardy-Weinberg.

Con relación al grado de diferenciación genética el índice F_{st} para cada comparación pareada entre poblaciones varió entre 0.024 para poblaciones correspondientes a la misma subespecie (*A. ligtu* ssp. *simsii*) y 0.164 entre poblaciones de subespecies distintas (*A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. ligtu* ssp. *ligtu*). Los valores de R_{st} variaron entre 0.059 nuevamente para poblaciones de *A. ligtu* ssp. *simsii* y 0.222 entre poblaciones de *A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. ligtu* ssp. *ligtu*. Todos los valores son estadísticamente significativos. De manera general, los F_{st} y R_{st} fueron mayores al comparar las subespecies más extremas geográficamente como *A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. ligtu* ssp. *ligtu* ($F_{st}= 0.08 - 0.16$, $R_{st}= 0.04 - 0.22$). Siendo la subespecie que se distribuye entre ambas *A. ligtu* ssp. *incarnata* la que mostró índices moderados con cada una de ellas (Cuadro 5).

| | <i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> | | <i>A. ligtu</i> ssp. <i>incarnata</i> | | <i>A. ligtu</i> ssp. <i>ligtu</i> | |
|--------------|------------------------------------|------------|---------------------------------------|---------|-----------------------------------|------------|
| | Río Clarillo | Lagunillas | Radal | Vilches | F. Albert | Los Ruiles |
| Río Clarillo | 0 | 0.02397 | 0.09054 | 0.09185 | 0.11181 | 0.08636 |
| Lagunillas | 0.01567 | 0 | 0.10294 | 0.10192 | 0.16357 | 0.11124 |
| Radal | 0.06244 | 0.11995 | 0 | 0.01888 | 0.09254 | 0.05829 |
| Vilches | 0.05856 | 0.11236 | 0.01812 | 0 | 0.11046 | 0.06205 |
| F. Albert | 0.11202 | 0.22288 | 0.08161 | 0.1188 | 0 | 0.10671 |
| Los Ruiles | 0.04277 | 0.12531 | 0.05416 | 0.04839 | 0.13506 | 0 |

Cuadro 5. Estimación grado de diferenciación genética entre las 6 poblaciones estudiadas. Índices F_{st} (sobre la diagonal) y R_{st} (bajo la diagonal). En todos los casos existe $p < 0.05$.

| | Tasas de Migración desde | | | | | |
|--------------|------------------------------------|------------|---------------------------------------|---------|-----------------------------------|------------|
| | <i>A. ligtu</i> ssp. <i>simsii</i> | | <i>A. ligtu</i> ssp. <i>incarnata</i> | | <i>A. ligtu</i> ssp. <i>ligtu</i> | |
| | Rio Clarillo | Lagunillas | Radal | Vilches | F. Albert | Los Ruiles |
| Rio Clarillo | 0.689 | 0.246 | 0.010 | 0.020 | 0.023 | 0.011 |
| Lagunillas | 0.007 | 0.959 | 0.006 | 0.012 | 0.010 | 0.007 |
| Radal | 0.012 | 0.015 | 0.687 | 0.259 | 0.015 | 0.011 |
| Vilches | 0.007 | 0.006 | 0.006 | 0.965 | 0.007 | 0.009 |
| F. Albert | 0.010 | 0.010 | 0.009 | 0.165 | 0.799 | 0.008 |
| Los Ruiles | 0.010 | 0.013 | 0.011 | 0.208 | 0.070 | 0.688 |

Cuadro 6. Estimación de la tasa de migrantes entre las poblaciones de las subespecies de *A. ligtu*.

Los resultados de BAYESASS mostraron bajas tasas de migración entre poblaciones de distintas subespecies (rango 0.006 a 0.015), mientras que entre poblaciones de una misma subespecie las tasas aumentaron (rango 0.259 a 0.959) (Cuadro 6).

La simulación realizada con el programa STRUCTURE reunió a los individuos en 4 grupos distintos (K=4). A simple vista se puede observar una estructuración clara a nivel de subespecies. El color rojo representa a las poblaciones de *A. ligtu* ssp. *simsii*, el color azul está asociado con la subespecie *A. ligtu* ssp. *incarnata*, mientras que el color amarillo se encuentra sobre todo en las poblaciones de *A. ligtu* ssp. *ligtu*. El verde se distribuye a lo largo de las 3 subespecies (Figura 4). Las poblaciones que presentan mayor estructuración son Lagunillas (ssp. *simsii*), Radal (ssp. *incarnata*) y F.

Albert (*ssp. ligtu*). Sin embargo, en todos los casos existen cierta cantidad de migrantes de todas las subespecies manteniendo un grado de flujo genético entre ellas.

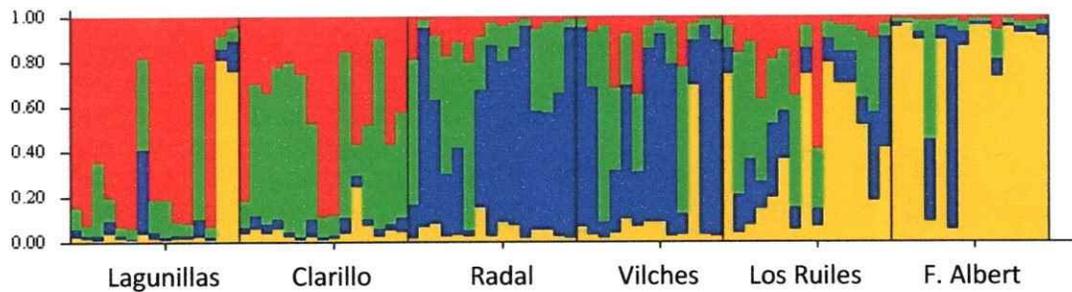


Figura 4. Proporción de veces (Eje Y) en 200.000 repeticiones que los individuos de las distintas poblaciones analizadas (Eje X) fueron asignados a las diferentes poblaciones genéticas definidas por el programa STRUCTURE. Rojo: población genética 1, Azul: población genética 2, Amarillo: población genética 3 y Verde: población genética 4.

Al realizar el Test de Mantel (Figura 5) se ve que existe una correlación positiva ($r=0.716$) entre las distancias geográficas y las distancias genéticas. Se ve que a mayor distancia geográfica existente entre las poblaciones, mayor es la diferenciación genética. Esto respaldaría la idea de un aislamiento por distancia de las subespecies del complejo *A. ligtu*, donde las subespecies más cercanas geográficamente mantienen aún flujo genético. De esta manera *A. ligtu ssp. incarnata* ubicada geográficamente en la mitad de la distribución de *A. ligtu*, mantiene mayor flujo genético con *A. ligtu ssp. simsii* y *A. ligtu ssp. ligtu*. Mientras que estas dos últimas estarían más alejadas geográficamente, disminuyendo la probabilidad de intercambio genético.

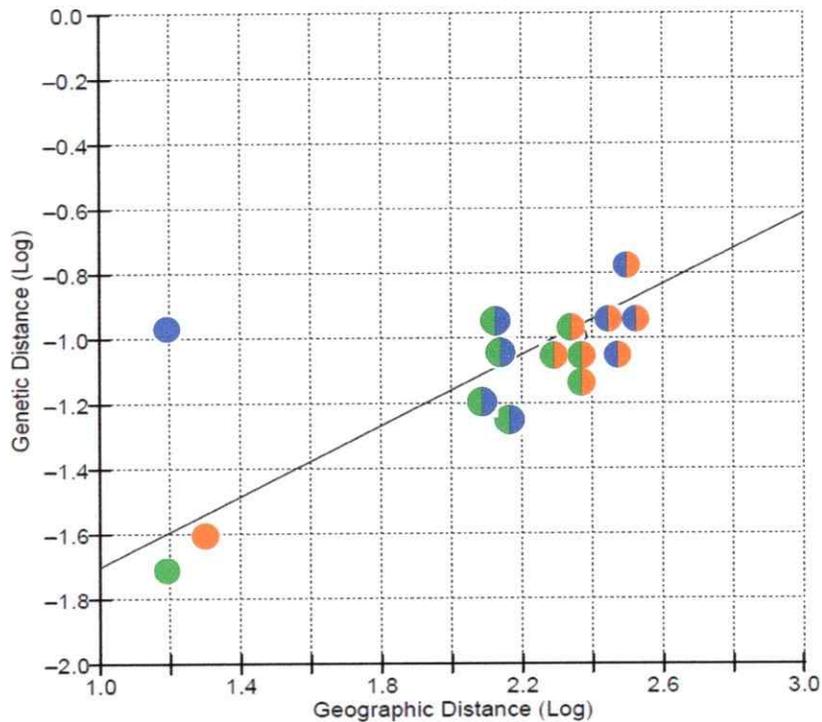


Figura 5. Test de Mantel realizado a partir de las distancias geográficas y genéticas entre las diferentes poblaciones del complejo *A. ligtu*. $r = 0.716$. El color naranja representa las poblaciones de *A. ligtu* ssp. *simsii*; el color azul representa las poblaciones de *A. ligtu* ssp. *incarnata*; el color verde representa las poblaciones de *A. ligtu* ssp. *ligtu*.

3.3. Caracterización del nicho climático

El análisis de componentes principales (ACP) muestra 3 grupos distintos, que corresponden a cada una de las subespecies (Figura 6). Se estimó que el Factor 1 está relacionado con las variables bioclimáticas derivadas de datos de precipitación, mientras que el Factor 2 está asociado a variables relacionadas con la temperatura. Entre ambos factores, 1 y 2, explican el 65% de la varianza. Las distancias de

Mahalanobis obtenidas fueron todas significativas, lo que permite reafirmar las diferencias en cuanto a las variables ambientales que existen entre las 3 regiones modeladas (Cuadro 7).

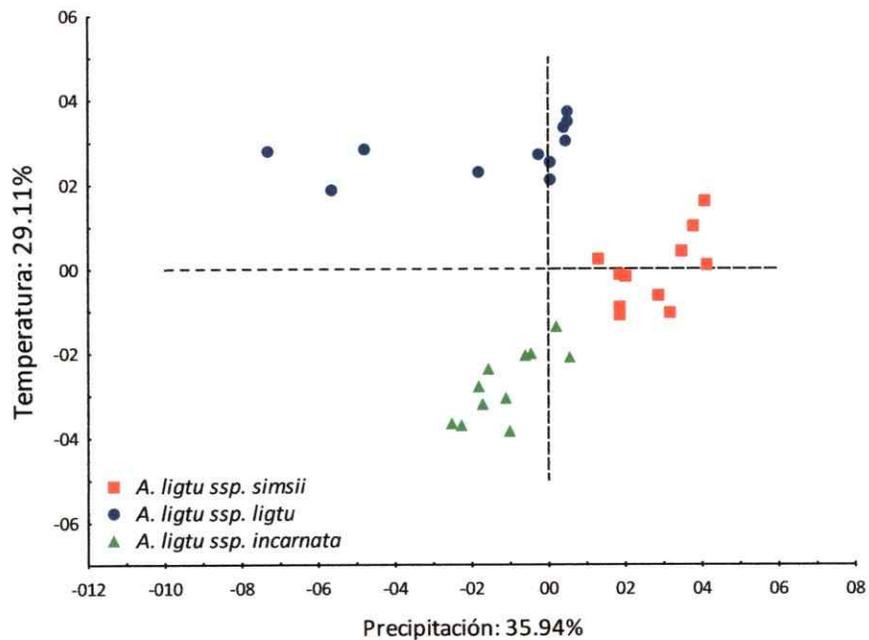
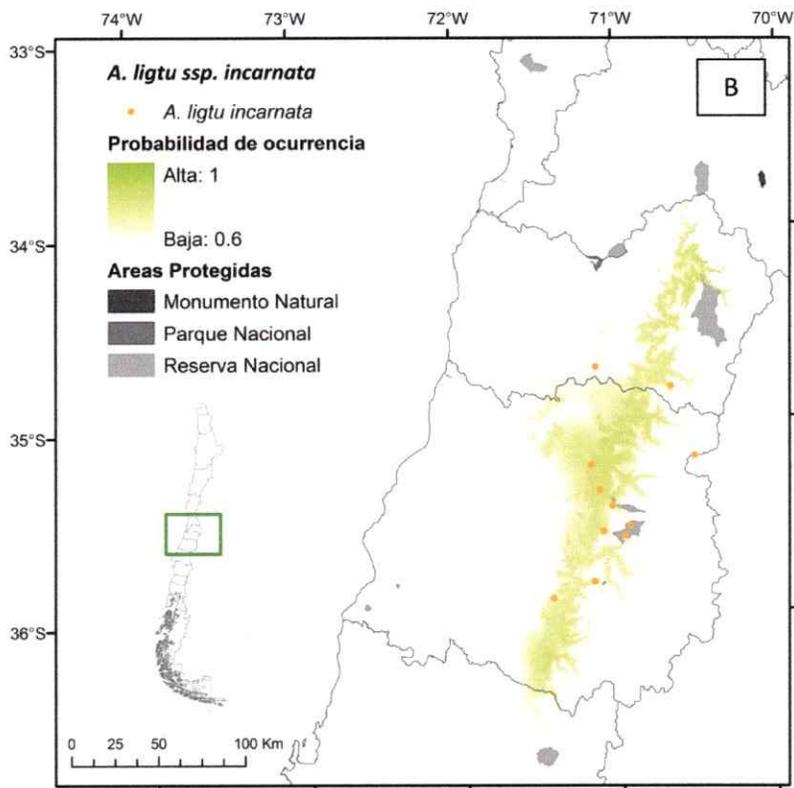
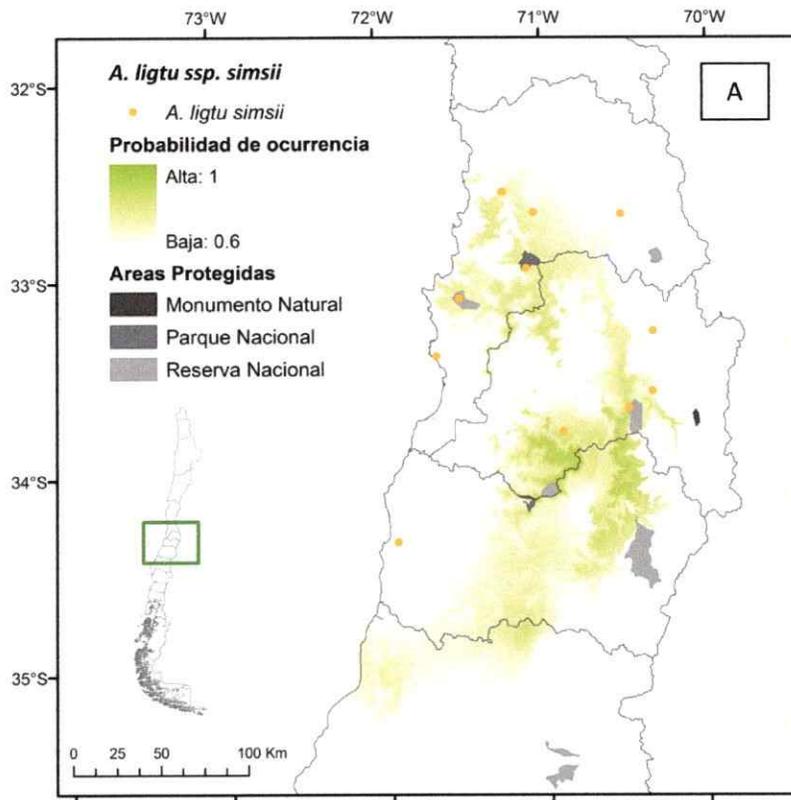


Figura 6. Gráfico Análisis Componentes Principales. Factor 1 y 2 asociados a variables climáticas derivadas principalmente de precipitaciones y temperatura respectivamente.

| Subespecies | <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> |
|--------------------------------|----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | | 124.5703 | 228.2372 |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | p<0.05 | | 43.2485 |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | p<0.05 | p<0.05 | |

Cuadro 7. Distancias de Mahalanobis entre las distintas subespecies (sobre la diagonal) y su significancia estadística (bajo la diagonal).



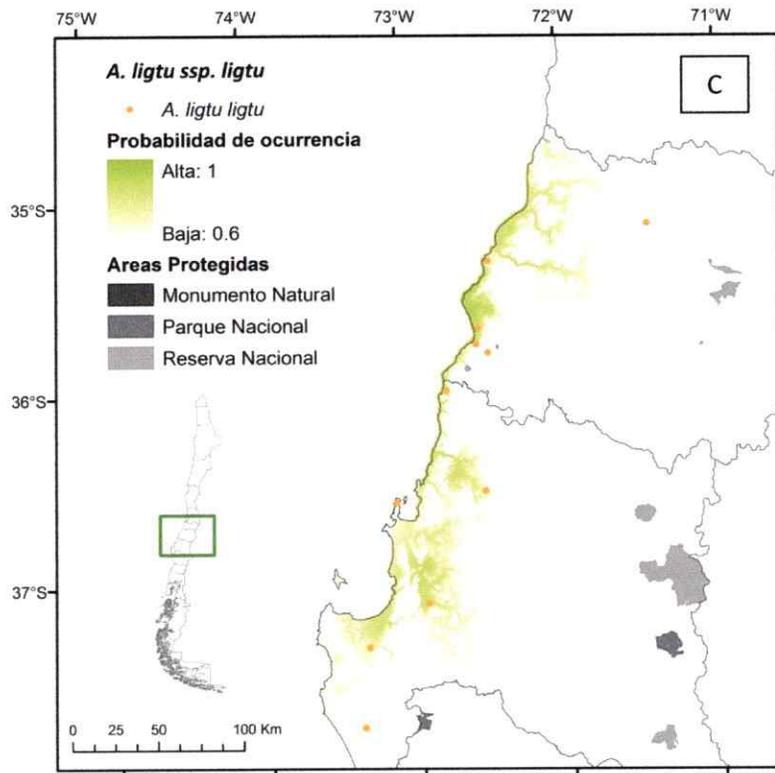


Figura 7. Distribución proyectada para *A. ligtu ssp. simsii* (A), *A. ligtu ssp. incarnata* (B) y *A. ligtu ssp. ligtu* (C) (color verde). Los puntos naranjas representan las ocurrencias de cada una de las subespecies ocupadas para la predicción. Las zonas grises representan las áreas protegidas por SNASPE.

De la modelación realizada en MAXENT se obtuvieron las probabilidades de ocurrencia de acuerdo a las variables bioclimáticas asociadas a los puntos de presencia de las 3 subespecies. Estas predicciones, gracias al programa DIVA-GIS y ArcGis, se llevaron a representaciones gráficas que permiten observar de mejor manera los resultados de las predicciones (Figuras 7a, 7b y 7c). Se observan patrones de distribución distintos para cada una de las subespecies. Por ejemplo, *A. ligtu ssp. ligtu* presenta una distribución netamente costera, entre los 35° y 37° de latitud sur. Mientras que *A. ligtu ssp. incarnata* se observa mayor presencia hacia una zona precordillerana, abarcando

desde los 34°S al 36°S de latitud. En cambio, *A. ligtu ssp. simsii* se encuentra en un rango longitudinal más amplio, ocupando el extremo norte de la distribución del complejo *A. ligtu*, entre los 32° y 34° de latitud sur. Los valores de AUC obtenidos para cada modelo son 0.993, 0.998 y 0.997 para *A. ligtu ssp. simsii*, *A. ligtu ssp. incarnata* y *A. ligtu ssp. ligtu* respectivamente. Estos valores confirman que los modelos tienen buena capacidad de predicción de la distribución para cada una de las subespecies.

Las variables que más aportaron a cada modelo están resumidas en el Cuadro 8. De acuerdo a esto se sugiere que las precipitaciones en el trimestre más cálido podrían ser determinantes para la distribución de las poblaciones de *A. ligtu ssp. simsii* (65.7%) y *A. ligtu ssp. ligtu* (37.4%). Mientras que la variable de precipitaciones en el trimestre más frío es importante para la distribución de *A. ligtu ssp. incarnata* (29%).

| Variables | <i>A. ligtu ligtu</i> | <i>A. ligtu simsii</i> | <i>A. ligtu incarnata</i> |
|----------------------------------|------------------------------|-------------------------------|----------------------------------|
| T° Anual | - | - | 18,1% |
| T° media trimestre húmedo | - | - | 10,7% |
| Pp Mes más seco | - | 3,80% | - |
| Pp por estaciones | 13,0% | 10,3% | - |
| Pp trimestre más cálido | 37,4% | 65,7% | 25,7% |
| Pp trimestre más frío | 20,0% | 14,4% | 29,0% |
| Altura | 19,1% | - | - |

Cuadro 8. Variables bioclimáticas que aportaron significativamente, según el programa MAXENT, a los modelos de distribución de cada una de las subespecies. Los números destacados son las variables que mas aportaron a cada modelo.

Discusión y Conclusión

A la luz de estos resultados se podría concluir que a nivel molecular existe una diversidad genética significativa entre las subespecies del complejo *A. ligtu*, con estructuración genética y aislamiento por distancia entre ellas. De igual manera, ecológicamente las subespecies presentan diferencias en cuanto a su distribución predicha por MAXENT. En consecuencia existiría una ausencia de intercambiabilidad genética y ecológica entre las subespecies por lo que se sugiere la presencia de tres unidades de conservación dentro del complejo *A. ligtu*. Estas estarían representadas por las poblaciones de Lagunillas (ssp. *simsii*), Radal (ssp. *incarnata*) y F. Albert (ssp. *ligtu*).

Diversidad molecular

A nivel cloroplastidial, la diversidad haplotípica y nucleotídica que presentó el gen *psbA-trnH* fue bastante baja (0,4 y 0,01 respectivamente). Lo que puede ser explicado por la baja tasa mutacional que presentan los genes cloroplastidiales, permitiendo resolución que en muchos casos no es suficiente para evaluar los patrones de flujo de genes dentro de una especie, por lo que a un nivel intraespecífico es difícil identificar una diversidad haplotípica y/o nucleotídica significativa (Schaal et. al, 1998). Esta ausencia de diferencias notables entre las subespecies sugiere que para el gen cloroplastidial estudiado, la diferenciación genética a nivel de subespecies es un proceso en estadios iniciales de diversificación.

El mapa de haplotipos nos permitió identificar dos grandes haplo-grupos que coinciden con la distribución geográfica de las subespecies y poblaciones estudiadas. El primer haplogrupo, se conforma por dos subespecies: *A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. ligtu* ssp. *incarnata*. No obstante, una pequeña fracción de *A. ligtu* ssp. *ligtu* (4 individuos de la población de Los Ruiles) se asoció a este haplogrupo. El segundo grupo se conforma por poblaciones que pertenecen a la subespecie *A. ligtu* ssp. *ligtu* y que se distribuyen en poblaciones más costeras dentro de Los Ruiles, siguiendo hacia las localidades costera de Pelluhue, Chanco y F. Albert.

En base a estos resultados podríamos sugerir dos eventos posibles: Primero, un evento de colonización de norte a sur y desde la cordillera a la costa. A este nivel de resolución genética (gen cloroplastidal), las subespecies *A. ligtu* ssp. *simsii* y *A. ligtu* ssp. *incarnata* no se han diferenciado mayormente con un haplotipo fijado y algunos haplotipos derivados de pocos pasos mutacionales. Probablemente este haplogrupo correspondería al estado ancestral que colonizó desde la V región hacia la VII región en la zona cordillerana. Cuando llegó hasta la localidad de Los Ruiles, unas poblaciones mantuvieron su estado ancestral pero otras derivaron, dando origen al segundo haplogrupo hacia la costa, que en su mayoría corresponde a la subespecie *A. ligtu* ssp. *ligtu*. El segundo escenario posible es un evento de re-colonización secundario de la zona sur costera. En este caso, algún evento adverso podría haber causado una muerte masiva de individuos en la zona sur costera, quedando sólo algunos haplotipos ancestrales, los que al repoblar se diversificaron con haplotipos derivados más frecuentes y dieron origen a este nuevo haplogrupo.

Con respecto a este último punto, de acuerdo a observaciones realizadas en terreno durante los últimos tres años, se ha observado una intervención antrópica importante que ha afectado directamente a las poblaciones de *A. ligtu* ssp. *ligtu* (Construcción de caminos, quema de pastizales). Por esta razón no es difícil imaginar que esta zona lleva intervenida por un largo periodo, apoyando la hipótesis de una re-colonización constante en la zona costera por parte de *A. ligtu* ssp. *ligtu*.

A nivel nuclear el análisis genético utilizando microsatélites, nos entregó una mayor resolución de los procesos actuales que están sufriendo las subespecies. Esto permite reconocer las subespecies de *A. ligtu* como entidades independientes, aunque se observa un flujo genético representado por algunos alelos compartidos, que se diferencian en un gradiente geográfico de aislamiento por distancia.

Los índices F_{st} y R_{st} se encuentran en un grado de diferenciación genética moderado, de acuerdo a lo descrito por Hartl & Clark (1997).

Teóricamente, se ha observado en muchos grupos que el intercambio genético puede estar restringido a través del rango de distribución de una especie, ya sea por la amplia distribución geográfica de las poblaciones, por el comportamiento de los polinizadores o debido a los mecanismos de dispersión limitada de semillas. Esto podría explicar lo que encontramos en el complejo *A. ligtu*, donde acontecimientos históricos como la fragmentación del hábitat y los cuellos de botella poblacionales son determinantes en la estructuración genética de las poblaciones. Por lo que la similitud genética observada entre las poblaciones podría deberse a un ancestro común reciente más que a un proceso continuo de intercambio genético (Schaal et. al, 1998).

Caracterización del nicho climático

Los resultados de la modelación que se realizó, muestra a grandes rasgos una diferenciación en cuanto a la distribución predicha para cada una de las subespecies. Existen algunas áreas, sobre todo periféricas de la distribución, que coinciden entre subespecies. Pero al revisar el Análisis de Componentes Principales (ACP) de las variables climáticas asociadas a cada punto de ocurrencia, se ve que existe una clara diferenciación entre los nichos climáticos de las subespecies de *A. ligtu*. Esto sugiere que las variables actuales (últimos 50 años) no se comparten entre las subespecies, por lo que existiría una diferenciación a nivel del nicho climático. Holt (2009) planteó que nuevas condiciones ambientales podrían promover una diferenciación en el nicho ocupado por una especie. A esto podemos agregar que el nicho formaría parte del fenotipo de una especie, por lo que evolucionaría junto con ella (Wiens & Donoghue, 2004).

Estos resultados no coinciden con lo que algunos autores (Peterson et. al, 1999; Wiens & Graham, 2005; Wiens et. al, 2010) plantean con respecto a la conservación del nicho, que supone una retención por parte de las especies de sus requerimientos ecológicos a lo largo del tiempo, sobre todo en especies fuertemente relacionadas. Con respecto a esto hay que tener cuidado al atribuir la variación geográfica a una innovación evolutiva, ya que también podría ser explicada por la plasticidad fenotípica característica de una especie (Peterson & Holt, 2003).

Los modelos que se obtienen con las probabilidades de ocurrencia de una especie es necesario interpretarlos con mucho criterio. Existen algunos factores que podrían contribuir a darle más robustez a los resultados, por ejemplo la posibilidad de contar

con las ausencias de unas especies (identificar espacialmente los sitios donde la especie no se encuentra presente). Esto puede mejorar el resultado final de un modelo, permitiendo una mejor discriminación de las variables descriptoras y por lo tanto un mejor ajuste final del modelo (Guisan & Zimmermann, 2000). El número ideal de registros también es una variable importante a considerar al momento de realizar una modelación. Se ha establecido que sobre 30 (Wisz *et al.*, 2008) o 50 (Kadmon *et al.*, 2003) registros por especie permitirían obtener modelos estadísticamente válidos. Sin embargo, el criterio a seguir es incorporar el mayor número de presencias disponibles, independiente de la calidad de la información, ya que va a depender del objetivo planteado o del programa que se utilizará para la modelación (Pliscoff, 2011). Otro factor importante es la base de datos climáticos que se utiliza. Para el caso de Chile, estas bases de datos climáticos globales han sido evaluadas (por ejemplo *Worldclim*), identificando problemas en los valores de las variables climáticas, especialmente en aquellas zonas del país donde la cobertura de estaciones meteorológicas es menor (por ej. zona norte) (Pliscoff, 2011).

Unidades de conservación

Para identificar unidades de conservación dentro del complejo *A. ligtu*, se combinaron los resultados obtenidos de los análisis moleculares y la modelación del nicho climático. Esto representa un enfoque integrado, usando datos ecológicos y filogenéticos, capaz de proveer las herramientas necesarias para estudiar la historia evolutiva de una especie (Jakob *et al.*, 2007). Basándonos en el enfoque planteado por Crandall (2000), que entrega mayor flexibilidad a la hora de clasificar *Unidades Evolutivamente Significativas* (UES), podemos identificar 3 unidades de conservación prioritarias, cada una representada por una de las subespecies. Se sugiere que las

poblaciones de Lagunillas (ssp. *simsii*), Radal (ssp. *incarnata*) y F. Albert (ssp. *ligtu*) representarían UES independientes.

La clasificación en UES de las subespecies de *A. ligtu* se basa en la diferenciación a nivel genético que existe entre las poblaciones de las subespecies estudiadas, diferencias en cuanto al nicho climático ocupado por cada una y a datos ecológicos recopilados con anterioridad, como las diferencias en el ensamble de polinizadores y morfología de las flores (A. González, datos no publicados).

Una de las desventajas que presentaba esta metodología era demostrar la intercambiabilidad ecológica, que consistía principalmente en “probar” si un individuo lograba adecuarse en una población vecina sin disminuir su fitness. Por las dificultades metodológicas que presentaba esto, la incorporación de la modelación del nicho climático para probar la intercambiabilidad ecológica fue una buena solución, ya que no se manipulan individuos fuera de su hábitat natural.

Basado en lo anterior, la importancia de esta clasificación es identificar unidades de conservación dentro de cada especie, ya que contribuye a la gestión, monitoreo y otros esfuerzos de conservación, facilitando la aplicación de la legislación actual para conservar sus hábitats (Allendorf & Luikart, 2007).

Incorporar el uso de la distribución predicha por los modelos climáticos resulta útil para priorizar especies y áreas de conservación. El desarrollo de modelos más dinámicos que dan cuenta de los movimientos de las especies o del cambio climático, le está dando un nuevo valor al rol de los modelos de distribución dentro de los procesos de

planificación de conservación (Loiselle et al., 2003; Pressey et al., 2005; Elith & Leathwick, 2009; Richardson et al., 2010). En el caso de este trabajo se agregaron las áreas protegidas a nivel nacional para comparlas con las distribuciones predichas por el programa Maxent. Se observó que en la regiones Metropolitana y V, donde está ubicada *A. ligtu* ssp. *simsii*, la cobertura de áreas protegidas es mayor, por lo que esta subespecie estaría más protegida. Mientras que en la zona costera de las regiones del Maule y Bio Bio casi no existen área de protección, que son los lugares con más intervención que hemos observado afectando directamente a *A. ligtu* ssp. *ligtu*.

Aún cuando *A. ligtu* es una especie que no está dentro de la clasificación de especies en peligro, este trabajo sugiere que las subespecies deben ser consideradas para una próxima clasificación, sobre todo las poblaciones que se encuentran en la zona costera de la VI, VII y VIII Región. Por otra parte, este trabajo reafirma la importancia de estudios que combinan distintas técnicas y enfoques sobre un mismo tema, ya que permite tener una visión integral sobre la problemática tratada y encontrar soluciones eficaces. La importancia de esto a nivel de conservación es que permite identificar especies que no estén clasificadas y entregar información concreta de su estado actual, que permitan luego su adecuado manejo. La identificación de unidades de conservación a nivel de subespecies, propone una unidad taxonómica netamente operativa que permite realizar mas fácilmente la clasificación de unidades con fines de conservación. Esto permite distribuir mejor los esfuerzos y recursos que en cualquier entidad dedicada a la conservación son escasos.

Bibliografía

- Aagesen, L. and M. Sanso. 2003. The phylogeny of the Alstroemeriaceae, based on morphology, *rps16* intron, and *rbcL* sequence data. *Systematic Botany* 28(1): 47-69
- Allendorf, F. W., and G. Luikart. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell Publishing, UK.
- Amos, W. and A. Balmford. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity* 87: 257-265
- Baeza, C., O. Schrader, E. Ruiz, y M. Negritto. 2006. Análisis comparativo del cariotipo en poblaciones de *Alstroemeria ligtu subsp. ligtu* y *A. ligtu subsp. simsii* (Alstroemeriaceae) de Chile. *Darwiniana* 44(2): 313-318
- Baeza, C., E. Ruiz and P. Novoa. 2010. The Karyotype of *Alstroemeria diluta* Ehr. Bayer *subsp. Chrysantha* (Alstroemeriaceae). *Chilean J. Agric. Res.* 70(4): 667-669
- Balloux, F. and N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology* 11: 155-165
- Bandelt H., P. Forster, A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48
- Bayer, E. 1987. Die Gattung *Alstroemeria* in Chile. *Mitteilungen der Botanischen Staatssammlung München* 24:1-362
- Belkhir, K., P. Borsa, L. Chikhi, N. Raufaste and F. Bonhomme. 1996-2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations.

Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier. France.

- Bridgen, M.P., E. Olate and F. Schiappacasse. 2002. Flowering geophytes from Chile. *Acta Hort.* 570: 75-80
- Botto-Mahan, C., P. Ramirez, C. G. Ossa, R. Medel, M. Ojeda-Camacho and A. González. 2011. Floral herbivory affects female reproductive success and pollinator visitation in the perennial herb *Alstroemeria ligtu* (Alstroemeriaceae). *International Journal of Plant Sciences* 172(9): 1130-1136
- Buitendijk, J. H., E. J. Boon and M. S. Ramanna. 1997. Nuclear DNA content in twelve species of *Alstroemeria* L. and some of their hybrids. *Annals of Botany* 79: 343-353
- Comisión Nacional del Medio Ambiente (Conama). 2008. Biodiversidad de Chile Patrimonio y Desafíos. Ocho Libros editores. Santiago, Chile.
- Crandall, K. A., O. Bininda-Emonds, G. M. Mace and R. K. Wayne. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15(7): 290-295
- Di Castri, F., y E. R. Hajek. 1975. Bioclimatografía de Chile. Dir. Inv. Universidad Católica (DIUC). Santiago, Chile.
- Elith, J. and J. Leathwick. 2009. Species distribution models: Ecological explanation and prediction across space and time. *Annual Review of Ecology, Evolution and Systematics* 40: 677-697
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50

- Ferrier, S. 2002. Mapping spatial pattern in biodiversity for regional conservation planning: Where to from here? *Syst. Biol.* 51(2): 331-363
- Ferrier, S., G. Powell, K. Richardson, G. Manion, J. Overton, T. Allnutt, S. Cameron, K. Mantle, N. Burgess, D. Faith, J. Lamoreux, G. Kier, R. Hijmans, V. Funk, G. Cassis, B. Fisher, P. Flemons, D. Lees, J. Lovett and R. Van Rompaey. 2004. Mapping more of terrestrial biodiversity for global conservation assessment. *BioScience* 54(12): 1101-1109
- Fraser, D.J., and L. Bernatchez. 2001. Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular Ecology* 10: 2741-2752
- Goudet, J. 1995. FSTAT Version 1.2: a computer program to calculate F-statistics. *J. Heredity* 86: 485-486
- Guerrero, P., M. Arroyo, R. Bustamante, M. Duarte, T. Hagemann and H. Walter. 2011. Phylogenetics and predictive distribution modeling provide insights into the geographic divergence of *Eriosyce* subgen. *Neoporteria* (Cactaceae). *Plant Syst Evol* 297: 113-128
- Guisan, A. and N. Zimmermann. 2000. Predictive habitat distribution models in ecology. *Ecological Modelling* 135: 147-186
- Hart, D. y A. Clark. 1997. Molecular population genetics. 315-392. En: Avise, J. y J. Hamrick (Eds.). *Principles of population genetics*. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Haig, S. M., E. A. Beaver, S.M. Chambers, H. M. Draheim, B. D. Dugger, S. Dunham, E. Elliott-Smith, J. B. Fontaine, D.C. Kesler, B. J. Knaus, I. F. Lopes, P. Loschl, T. D. Mullins and L.M. Sheffield. 2006. Taxonomic Considerations in

Listing Subspecies Under the U.S. Endangered Species Act. *Conservation Biology*, 20(6): 1584-1594

- Hedrick, P. W. 2001. Conservation genetics: where are we now? *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(11): 629-636
- Hijmans, R. J., L. Guarino, A. Jarvis, P. Mathur, C. Bussink, M. Cruz, I. Barrantes and E. Rojas. 2005. DIVA-GIS Version 5.2. Available at: <http://www.mendeley.com/research/divagis-version-52/>
- Hijmans, R. J. and C. H. Graham. 2006. The ability of climate envelope models to predict the effect of climate change on species distributions. *Global Change Biology*, 12: 2272–2281
- Holt, R. 2009. Bringing the Hutchinsonian niche into the 21st century: Ecological and evolutionary perspectives. *PNAS* 106(2): 19659-19665
- Hughes, J. B., G. C. Daily and P. R. Ehrlich. 1997. Population diversity: its extent and extinction. *Science* 278: 689-692
- Jakob, S., A. Ihlow and F. Blattner. 2007. Combined ecological niche modelling and molecular phylogeography revealed the evolutionary history of *Hordeum marinum* (Poaceae) - niche differentiation, loss of genetic diversity, and speciation in Mediterranean Quaternary refugia. *Molecular Ecology* 16: 1713-1727
- Jayat, J. P. y S. Pacheco. 2006. Distribución de *Necromys lactens* y *Phyllotis osilae* (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae) en el noroeste argentino: modelos predictivos basados en el concepto de nicho ecológico. *Mastozoología Tropical* 13(1): 69-88
- Jensen, J.L., A. J. Bohonak and S. T. Kelley. 2005. Isolation by distance, web service. *BMC Genetics* 6: 13. v.3.23

- Kadmon, R., O. Farber and A. Danin. 2003. A systematic analysis of factors affecting the performance of climatic envelope models. *Ecological Applications* 13:853–867
- Kalin-Arroyo M. and P. Uslar. 1993. Breeding systems in a temperate mediterranean-type climate montane sclerophyllous forest in central Chile. *Botanical Journal of the Linnean Society* 111: 83–102
- Lacy, R. C. 1987. Loss of genetic diversity from managed populations: interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. *Conservation Biology* 1(2): 143-158
- Lawer, J. J., S. Shafer, D. White, P. Kareiva, E. Maurer, A. Blaustein and P. Bartlein. 2009. Projected climate-induced faunal change in the Western Hemisphere. *Ecology* 90(3): 588-597
- Librado, P. and J. Rozas. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452
- Loiselle, B., C. Howell, C. Graham, J. Goerck, T. Brooks, K. Smith and P. Williams. 2003. Avoiding Pitfalls of using species-distribution models in conservation planning. *Conservation Biology* 17(6): 1-10
- Luck, G. W., G. C. Daily and P. R. Ehrlich. 2003. Population diversity and ecosystem services. *Trends in Ecology and Evolution* 18(7): 331-336
- Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9(10): 373- 375
- Moritz, C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas* 130: 217-228
- Moritz, C. 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. *Syst. Biol.* 51(2): 238-254

- Muñoz, M. & A. Moreira. 2003. Alstroemerias de Chile. Diversidad, distribución y conservación. Taller La Era. Santiago, Chile.
- Naciones Unidas. 1992. Convenio sobre la diversidad biológica
- Navas, L. 1973. Flora de la cuenca de Santiago de Chile. Editorial Andrés Bello. Santiago, Chile
- Nuñez, I., E. González-Gaudio y A. Barahona. 2003. La biodiversidad: Historia y contexto de un concepto. INCI 28(7): 387-393
- Perfectti, F. 2002. Especiación: modos y mecanismos. En M. Soler, editor. Evolución: La base de la Biología. Proyecto Sur de Ediciones S. L., Granada, España.
- Peterson, A., J. Soberón and V. Sánchez-Cordero. 1999. Conservatism of ecological niches in evolutionary time. *Science* 285:1265-1267
- Peterson, A.T., V. Sánchez-Cordero, J. Soberón, J. Bartley, R. Buddemeier and A. Navarro-Sigüenza. 2001. Effects of global climate change on geographic distributions of Mexican Cracidae. *Ecological Modelling* 144: 21-30
- Peterson A. T. and D. A. Vieglais. 2001. Predicting species invasions using ecological niche modeling: New approaches from Bioinformatics attack a pressing problem. *Bioscience* 51(5): 363-371
- Peterson, A. and R. Holt. 2003. Niche differentiation in Mexican birds: using point occurrences to detect ecological innovation. *Ecological Letters* 6: 774-782
- Petit, R. J., A. El Mousadik, and O. Pons. 1998. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. *Conservation Biology* 12: 844–855

- Phillips, S. J., R. P. Anderson and R. E. Schapire. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259
- Pliscoff, P. y T. Fuentes-Castillo. 2011. Modelación de la distribución de especies y ecosistemas en el tiempo y en el espacio: una revisión de las nuevas herramientas y enfoques disponibles. *Revista de Geografía Norte Grande* 48: 61-79
- Pressey, R., M. Cabeza, M. Watts, R. Cowling and K. Wilson. 2005. Conservation planning in a changing world. *Trends in Ecology and Evolution* 22(11): 583-592
- Pritchard, J. K., M. Stephens and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959
- Ravenna, P. 1988. New or noteworthy species of *Alstroemeria* (Alstroemeriaceae). *Phytologia* 64: 281-288
- Richardson, D. and R. Whittaker. 2010. Conservation biogeography – foundations, concepts and challenges. *Diversity and Distributions* 16: 313-320
- Rocha, M. y J. Gasca. 2008. Ecología molecular de la conservación. Páginas 251-272 en L.E. Eguiarte, V. Souza y X. Aguirre, editores. *Ecología Molecular*. Progreso. Mexico, D.F.
- Rouget, M., R. Cowling, R. Pressey and D. Richardson. 2003. Identifying spatial components of ecological and evolutionary processes for regional conservation planning in the Cape Floristic Region, South Africa. *Diversity and Distributions* 9: 191-210
- Ryder, O. A. 1986. Species conservation and systematics: the dilemma of subspecies. *Trend in Ecology and Evolution* 1: 9-10

- Sang, T., D. Crawford and T. Stuessy. 1997. Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84(9): 1120-1136
- Schaal, B., D. Hayworth, K. Olsen, J. Rauscher and W. Smith. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7:465-474
- Shaw, J., E. B. Lickey, J. T. Beck, S. B. Farmer, W. Liu, J. Miller, K. C. Siripun, C. T. Winder, E. E. Schilling and R. L. Small. 2005. The Tortoise and the hare II: Relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142-166
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 139, 457-462
- Soltis, P. S. and M. A. Gitzendanner. 1999. Molecular systematic and the conservation of rare species. *Conservation Biology* 13(3): 471-483
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei and S. Kumar. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739
- Wiens, J. and M. Donoghue. 2004. Historical biogeography, ecology and species richness. *Trends in Ecology and Evolution* 19(12):639-644
- Wiens, J. and C. Graham. 2005. Niche conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 36: 519- 539
- Wiens, J., D. Ackerly, A. Allen, B. Anacker, L. Buckley, H. Cornell, E. Damschen, J. Davies, J. Grytnes, S. Harrison, B. Hawkins, R. Holt, C. McCain

- and P. Stephens. 2010. Niche Conservatism as an emerging principle in ecology and conservation biology. *Ecology Letters* 13: 1310-1324
- Wilson, G. A. and B. Rannala. 2003. Bayesian inference of recent migration rates using multilocus genotypes. *Genetics* 163: 1177-1191
 - Wisz, M., R. Hijmans, J. Li, A. Peterson, C. Graham, A. Guisan and NCEAS Predicting Species Distributions Working Group. 2008. Effects of sample size on the performance of species distribution models. *Diversity and Distributions* 14: 763-773
 - Zhou, S., M. J. De Jeu, R. G. VISSER and A. G. KUIPERS. 2003. Characterisation of distant *Astrogmeria* hybrids: application of highly repetitive DNA sequences from *A. ligtu* ssp. *ligtu*. *Annals of Applied Biology*, 142: 277–283

Anexos

Anexo 1- Protocolo Extracción para *A. ligtu*

- 1.- Moler 3 min en la moledora junto con PVP en polvo (la punta de un punta azul) hasta hacer un polvo fino.
- 2.- Añadir 0.8 ml de la solución TVBG(*) a los polvos, vortex 30 seg.
- 3.- Incubar a 65° C por 1 hr. Agitar de vez en cuando
- 4.- Deje enfriar 15 min. y añada un volumen similar de cloroformo (□ 0.7 ml), cierre bien el tubo y mezcle vigorosamente, usando vortex preferentemente (velocidad media), por 2 min. hasta alcanzar una emulsión lechosa. Dejar que se separen las fases (\pm 3 min) y volver a repetir esto 4 veces.
- 5.- Centrifugar los tubos a máxima velocidad (13000 rpm) por 20 min.(o mas), y luego remover cuidadosamente la fase sobrenadante sin tocar la interfase ni las paredes del tubo (700 ul aprox). Colocar el sobrenadante en un nuevo tubo de 2 ml. y volver a extraer con 1 vol. de cloroformo, emulsionando con ayuda de un vortex por 3 veces (paso 4) y centrifugando nuevamente por aproximadamente 15 min. Debe formarse una interfase blanquecina. Remover el sobrenadante a un nuevo tubo de 1.5 ml (Si el pellet sale muy oscuro o con un precipitado oscuro, repetir el paso 4 las veces que sea necesario)
- 6.- Añadir 1/10 de volumen (50ul aprox) de Acetato de Amonio 7.5 M y 1 volumen (500 ul aprox) de isopropanol. Mezclar vigorosamente y dejar reposar por 5 min. Luego centrifugar a máx. velocidad por 2 a 5 min.
- 7.- Debería observarse el pellet, el sobrenadante se elimina o se extrae con pipeta en caso que el pellet este suelto. Llenar (1 ml aprox) el tubo con etanol al 95% y botarlo

nuevamente, invertir el tubo sobre papel absorbente y luego dejar secar. El pellet podría verse oscuro.

8.- Luego de 30 min. aprox. disolver el pellet en 40 ul de agua. El volumen de agua depende del tamaño del pellet que se obtuvo. Pueden ser de 20 a 50 ul aprox.

(*) Solución TVBG: 25 ml DH₂O; 10 ml 1m TRIS-HCL pH 7.5 ; 28 ml 5M NaCl ; 20 ml 10% CTAB ; 4 ml 500 mM EDTA pH 8.0 ; 3 ml 10 % SDS o (Tween 20)

Anexo 2 – Localidades usadas como ocurrencias en la modelación con MAXENT

| Especie | Lugar | Coordenadas geográficas de presencias | |
|-----------------------------|--------------------|--|--------------|
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Camarico | 35° 12' 54'' | 71° 26' 10'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Constitución | 35° 23' 21'' | 72° 27' 39'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Federico Albert | 35° 43' 78'' | 72° 32' 24'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Pelluhue | 35° 49' 23'' | 72° 33' 15'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Los Ruiles | 35° 52' 12'' | 72° 28' 53'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Cobquecura | 36° 3' 30'' | 72° 45' 29'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Chillan | 36° 35' 40'' | 72° 31' 42'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Talcahuano | 36° 38' 28'' | 73° 6' 36'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Sta. Juana | 37° 10' 30'' | 72° 55' 45'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Sn. José de Colico | 37° 23' 36'' | 73° 19' 49'' |
| <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | Cañete | 37° 48' 45'' | 73° 22' 56'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Cuesta El Melón | 32° 36' 34'' | 71° 14' 7'' |

| | | | |
|--------------------------------|---------------------|--------------|--------------|
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Cerro Caquis | 32° 43' 0'' | 71° 2' 60'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Cerro Las Vizcachas | 32° 43' 56'' | 70° 31' 7'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Cerro La Campana | 33° 0' 7'' | 71° 6' 0'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Lago Peñuelas | 33° 9' 4'' | 71° 30' 40'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Yerba Loca | 33° 20' 5'' | 70° 19' 50'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Quebrada Córdova | 33° 26' 27'' | 71° 39' 35'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Lagunillas | 33° 38' 28'' | 70° 20' 10'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Rio Clarillo | 33° 43' 33'' | 70° 28' 54'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Laguna de Aculeo | 33° 50' 19'' | 70° 53' 18'' |
| <i>A. ligtu ssp. simsii</i> | Pichilemu | 34° 23' 0'' | 71° 55' 28'' |
| <i>A. Ligtu ssp. simsii</i> | Cuesta Zapata | 33° 23' 41'' | 71° 15' 22'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Laguna El Teno | 34° 44' 12'' | 71° 7' 54'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Huemul Alto | 34° 50' 30'' | 70° 39' 43'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Paso Vergara | 35° 12' 5'' | 70° 31' 16'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Radal (2011) | 35° 14' 41'' | 71° 10' 17'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Radal | 35° 22' 36'' | 71° 6' 60'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Radal | 35° 26' 93'' | 71° 2' 27'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Altos de Lircay | 35° 33' 41'' | 70° 55' 58'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Altos de Lircay | 35° 36' 49'' | 70° 57' 57'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Vilches | 35° 35' 23'' | 71° 5' 56'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Bellotos del Melao | 35° 50' 50'' | 71° 9' 44'' |
| <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | Bellotos del Melao | 35° 55' 45'' | 71° 24' 94'' |

Anexo 3 - WorldClim

Identificación de las 19 variables bioclimáticas obtenidas de WorldClim, ocupadas en la modelación del nicho climático.

BIO1 = Annual Mean Temperature

BIO2 = Mean Diurnal Range (Mean of monthly (max temp - min temp))

BIO3 = Isothermality (P2/P7) (* 100)

BIO4 = Temperature Seasonality (standard deviation *100)

BIO5 = Max Temperature of Warmest Month

BIO6 = Min Temperature of Coldest Month

BIO7 = Temperature Annual Range (P5-P6)

BIO8 = Mean Temperature of Wettest Quarter

BIO9 = Mean Temperature of Driest Quarter

BIO10 = Mean Temperature of Warmest Quarter

BIO11 = Mean Temperature of Coldest Quarter

BIO12 = Annual Precipitation

BIO13 = Precipitation of Wettest Month

BIO14 = Precipitation of Driest Month

BIO15 = Precipitation Seasonality (Coefficient of Variation)

BIO16 = Precipitation of Wettest Quarter

BIO17 = Precipitation of Driest Quarter

BIO18 = Precipitation of Warmest Quarter

BIO19 = Precipitation of Coldest Quarter

Anexo 4 – Frecuencias alélicas por cada uno de los locus y poblaciones de *A.*

ligtu

| Locus | Alelo | <i>A. Ligtu ssp. simsii</i> | | <i>A. ligtu ssp. incarnata</i> | | <i>A. ligtu ssp. ligtu</i> | |
|---------|-------|-----------------------------|------------|--------------------------------|---------|----------------------------|------------|
| | | Clarillo | Lagunillas | Radal | Vilches | F. Albert | Los Ruiles |
| Alig 1 | 230 | 0.7 | 0.667 | 0.557 | 0.692 | 0.714 | 0.733 |
| | 270 | 0.3 | 0.333 | 0.433 | 0.308 | 0.286 | 0.267 |
| Alig 13 | 241 | 0.179 | 0.179 | 0.133 | 0.077 | 0.036 | 0.214 |
| | 245 | 0 | 0 | 0.033 | 0 | 0 | 0 |
| | 247 | 0.5 | 0.5 | 0.767 | 0.77 | 0.892 | 0.536 |
| | 250 | 0.071 | 0.107 | 0 | 0.154 | 0 | 0.071 |
| | 253 | 0.071 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 255 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.036 | 0 |
| | 257 | 0.143 | 0.036 | 0.067 | 0 | 0.036 | 0.143 |
| | 262 | 0.036 | 0.179 | 0 | 0 | 0 | 0.036 |
| Alig 18 | 164 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.286 | 0 |
| | 176 | 0 | 0.033 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 180 | 0.267 | 0.333 | 0.033 | 0 | 0 | 0.033 |
| | 183 | 0.033 | 0 | 0.2 | 0.269 | 0 | 0.5 |
| | 187 | 0.4 | 0.133 | 0.4 | 0.269 | 0.714 | 0.467 |
| | 190 | 0.2 | 0.467 | 0 | 0 | | 0 |
| | 193 | 0 | 0 | 0.233 | 0.115 | 0 | 0 |
| | 197 | 0.1 | 0.033 | 0.133 | 0.346 | 0 | 0 |
| Alig 19 | 202 | 0 | 0.067 | 0 | 0.046 | 0 | 0 |
| | 212 | 0.067 | 0.2 | 0.036 | 0 | 0 | 0 |
| | 215 | 0.033 | 0.267 | 0.429 | 0.41 | 0.27 | 0.536 |
| | 218 | 0.1 | 0 | 0.036 | 0.091 | 0.077 | 0 |
| | 224 | 0.433 | 0.333 | 0 | 0.046 | 0.192 | 0.179 |
| | 228 | 0 | 0 | 0 | 0.046 | 0 | 0 |
| | 230 | 0.1 | 0.1 | 0.179 | 0.046 | 0 | 0 |
| | 235 | 0.067 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

| | | | | | | | |
|----------------|-----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 239 | 0 | 0 | 0.036 | 0 | 0 | 0 |
| | 241 | 0.033 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 244 | 0 | 0 | 0.143 | 0.318 | 0.077 | 0 |
| | 247 | 0.033 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 249 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.385 | 0.214 |
| | 250 | 0.067 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 252 | 0 | 0 | 0.036 | 0 | 0 | 0 |
| | 254 | 0.067 | 0.033 | 0.107 | 0 | 0 | 0.071 |
| Alig 23 | 239 | 0 | 0 | 0 | 0.083 | 0 | 0 |
| | 242 | 0.433 | 0.4 | 0.233 | 0.458 | 0.357 | 0.433 |
| | 264 | 0.133 | 0.033 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 268 | 0.233 | 0.433 | 0.367 | 0.417 | 0.321 | 0.3 |
| | 273 | 0.033 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 277 | 0.033 | 0.033 | 0.133 | 0.042 | 0 | 0.1 |
| | 287 | 0.133 | 0.1 | 0.033 | 0 | 0 | 0.133 |
| | 292 | 0 | 0 | 0.233 | 0 | 0.071 | 0.033 |
| | 297 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0.25 | 0 |