

UCH-FC
MAG-B
T 768
C. 1

HISTORIA POBLACIONAL DE *LAURELIOPSIS*
PHILIPPIANA INFERIDA A PARTIR DE
MICROSATÉLITES

Tesis

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

Magíster en Ciencias Biológicas

Facultad De Ciencias

Por

Mauricio Bosshard Trajano de Lucena

Octubre, 2016

Director de Tesis Dr:

Felipe Hinojosa

Co-Directora de Tesis Dra:

Fernanda Pérez



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

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

MAURICIO BOSSHARD TRAJANO DE LUCENA

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 13 de Junio 2016.

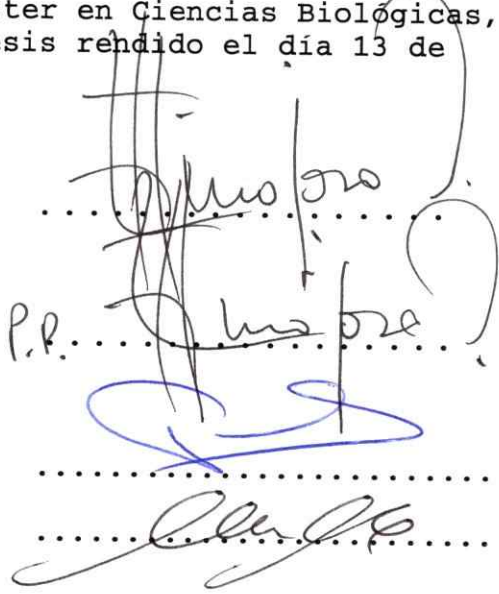
Director de Tesis:
Dr. Felipe Hinojosa

Co-Directora de Tesis
Dra. Fernanda Pérez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Elie Poulin

Dra. Alejandra González


.....
P.P.
.....
.....

Dedicado a la paciencia de mis tutores

Agradecimientos:

A mis tutores, Dr. Felipe Hinojosa y Dra. Fernanda Pérez. A mis revisores, Dr. Elie Poulin y Dra. Alejandra González.
A mi familia. A Lilian Necker. A Jörg y Marie Therese Häberli.
A Gioconda Peralta y Ricardo Segovia.
A mis amigos y compañeros del lab.

Instituto de Ecología y Biodiversidad IEB
IMEB P05-002, PFB-23
Proyecto FONDECYT No 1090339

ÍNDICE DE MATERIAS

Lista de tablas	iv
Lista de figuras	v
Lista de abreviaciones y nomenclatura	vi
Resumen	vii
Abstract	viii
Introducción	1
Materiales y Métodos	14
Resultados	19
Discusión	32
Bibliografía	41
Apéndice 1	47
Apéndice 2	48
Apéndice 3	49

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Sitios palinológicos	10
Tabla 2. Localidades de muestreo	14
Tabla 3. Loci utilizados	16
Tabla 4. Índices de diversidad por localidad	20
Tabla 5. Índices de diversidad por locus	20
Tabla 6. Divergencia de frecuencias alélicas entre grupos	25

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Límite de la extensión de los hielos durante la última glaciación	3
Figura 2. Morfología de <i>L. philippiana</i>	8
Figura 3. Mapa de los sitios palinológicos	10
Figura 4. Mapa con frecuencias de haplotipos cloroplastidiales	12
Figura 5. Logaritmo natural de la verosimilitud en función de K	22
Figura 6. Mapa con promedios de pertenencia a cada grupo por localidad	23
Figura 7. Probabilidad de pertenencia a cada grupo por individuo para 2 y 3 grupos supuestos	24
Figura 8. Árbol Neighbor Joining de grupos STRUCTURE	25
Figura 9. Riqueza alélica en función de la latitud sur	26
Figura 10. Rango alélico en función de la latitud sur	27
Figura 11. Heterocigocidad esperada en función de la latitud sur	28
Figura 12. Gráfico de dispersión entre distancias genéticas con cpDNA y distancias geográfica entre pares de poblaciones.	29
Figura 13. Gráfico de dispersión entre distancias genéticas con microsatélites y distancias geográfica entre pares de poblaciones.	30
Figura 14. Gráfico de dispersión entre distancias genéticas con microsatélites y distancias genéticas con cpDNA entre pares de poblaciones	31
Figura 15. Puente de tierra en Canal de Chacao	36
Figura 16. Mapa de altitud	37
Figura 17. Mapa de precipitaciones anuales	38

LISTA DE ABREVIACIONES Y NOMENCLATURA

DNA: ácido desoxirribonucleico

cpDNA: DNA cloroplastidial

°S: grados de latitud sur

°C: grados Celcius

UMG: último máximo glacial

mm/m: milímetros por mes

m: metros

km: kilómetros

m.s.n.m.: metros sobre el nivel del mar

T°: temperatura

PCR: reacción en cadena de la polimerasa

equilibrio HW: equilibrio Hardy-Weinberg

K: número de grupos supuestos en STRUCTURE

N: número de alelos

Ho: heterocigocidad observada

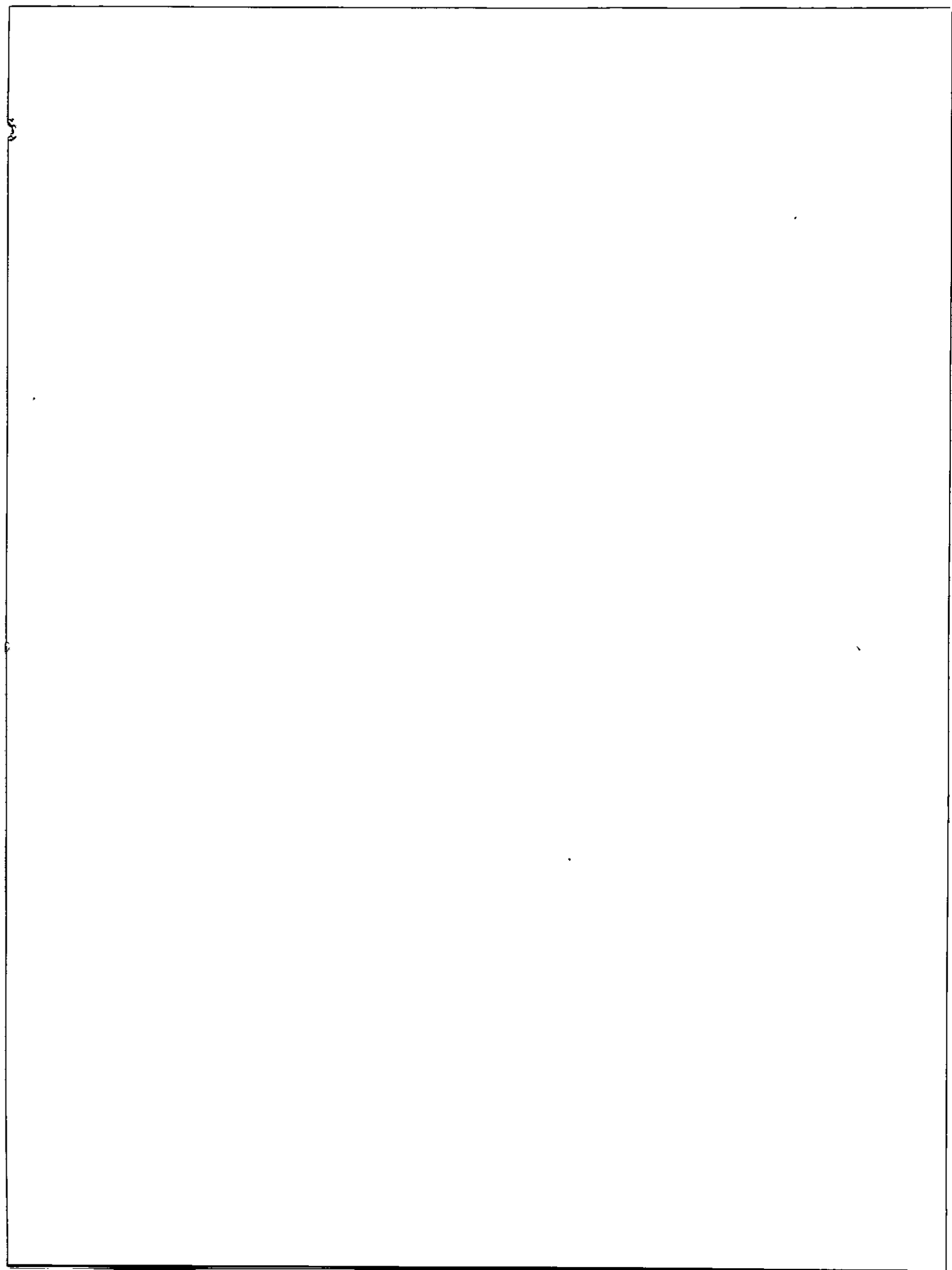
He: heterocigocidad esperada

RESUMEN

Las fluctuaciones climáticas del cuaternario afectaron los rangos de distribución de las especies. Esta historia se puede estudiar a través del patrón genético intraespecífico actual. En este trabajo se estudió el árbol siempreverde de los bosques templados del cono sur de Sudamérica *Laureliopsis philippiana*. Se desarrollaron microsatélites para esta especie para complementar un estudio con un marcador cloroplastidial que ya había sido realizado. Se encontraron mayores niveles de diversidad con este marcador más variable. Se detectó el mismo quiebre genético que con cpDNA, pero se resolvió la estructura genética de forma más fina, encontrando un quiebre adicional menos marcado. Se describe un patrón de disminución de la diversidad hacia mayores latitudes.

ABSTRACT

Quaternary climatic fluctuations affected species' distribution ranges. This history can be studied from current intraspecific genetic patterns. In this study *Laureliopsis philippiana*, an evergreen tree from southern Southamerica's temperate forests, was studied. Microsatellites were developed for this species to complement a previous study with a plastid marker. Higher levels of diversity were found for this more variable marker. The same genetic break that had already been detected with cpDNA was found, but the genetic structure was resolved to finer resolution and a second, less pronounced break was detected. A pattern of loss of diversity towards higher latitudes was described.



INTRODUCCIÓN

Actualmente nos encontramos en un período interglacial, es decir, un período de condiciones climáticas relativamente cálidas. Sin embargo la Tierra estuvo glaciada el 80% del tiempo durante el Pleistoceno (Rull 2009). Desde hace 0.9 millones de años las glaciaciones han seguido ciclos de 100 mil años (kyr) y se han hecho cada vez más severas (Hewitt 2000). El desplazamiento de las bandas climáticas producto del descenso de las temperaturas globales y la expansión de mantos de hielo continentales causó contracciones y expansiones de los rangos de distribución de las especies (Webb & Bartlein 1992, Hewitt 2000, 2004), lo que está bien documentado en el registro fósil, especialmente palinológico. El área donde persiste una especie durante su máxima contracción de rango se le ha denominado “refugio” (e.g. Holderegger & Thiel Egener 2009, Stewart y col. 2010). Las especies adaptadas a climas templados se contraen hacia refugios glaciales a menores latitudes y altitudes durante las glaciaciones, mientras que las especies frío tolerantes se contraen hacia refugios interglaciales a mayores latitudes y menores altitudes durante los interglaciales (Stewart y col., 2010). Además de estos refugios, bien documentados en el registro fósil, existen los llamados refugios crípticos (Stewart & Lister, 2001) que serían áreas microclimáticamente favorables, en general pequeñas, donde habrían persistido algunas especies en latitudes en que no se esperarían condiciones adecuadas para la persistencia de una población.

Los bosques templados del sur de Sudamérica se desarrollan principalmente en Chile, desde los 38°S, bajo las abundantes precipitaciones causadas por la influencia de los vientos del oeste y el efecto orográfico de la Cordillera de los Andes. Se trata de bosques siempreverdes caracterizados por su altos niveles de endemismo, su aislamiento y su origen mixto, con elementos neotropicales y australasianos (Villagrán & Hinojosa 1997). Estos bosques fueron severamente afectados por los ciclos glaciales, debido a los cambios en el clima y la reducción areal de aproximadamente dos tercios de su superficie actual, debido al avance de los glaciares (Villagrán & Hinojosa 1997). Se han estimado temperaturas de entre 6° y 8°C menores que en la actualidad para el Último Máximo Glacial (UMG, 29,400 a 14,550 años radiocarbónicos AP) en latitudes medias del hemisferio sur (40°35'-42°25'S, Denton y col. 1999). Los vientos del oeste (westerlies) se habrían desplazado hacia el norte, por sobre los 41°S durante el UMG, causando mayores precipitaciones en la Región de los Lagos (Moreno y col. 1999). A través de modelos numérico se ha postulado un aumento de entre 0.2 y 1 milímetros por mes (mm/m) mayores que en la actualidad para gran parte de Chile durante los meses más lluviosos (Kaplan y col. 2008, Rojas y col. 2009). En la región de los lagos el límite de las nieves se habría ubicado 1000 m por debajo de su ubicación actual (Denton y col. 1999). Por la acumulación de hielos en los continentes el nivel del mar habría descendido en 120 metros (Rohling y col. 1998), por lo que se habría formado un puente de tierra entre Isla Grande de Chiloé y el continente (Moreno y col. 1994). Una reconstrucción de la extensión de los hielos (Hollin & Schilling 1981), a partir de evidencia geológica como morrenas glaciales, se puede ver en la figura 1.

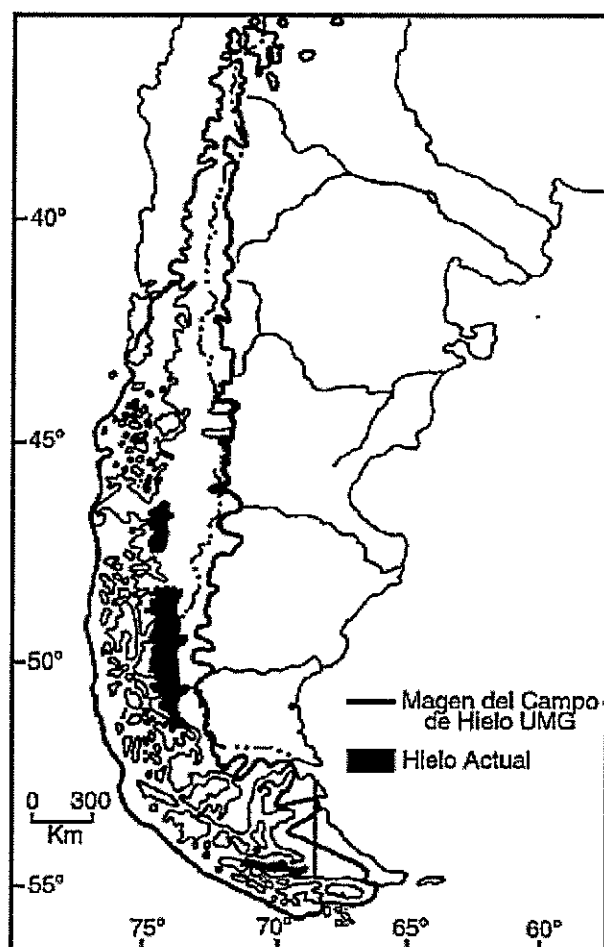


Figura 1. Límite de la extensión de los hielos durante la última glaciación. Tomada de Hollin & Schilling (1981).

Las respuestas de la vegetación a las condiciones glaciales se pueden estudiar a través de evidencias fósiles, fitogeográficas y genéticas. Para el caso de Chile se ha sugerido a partir de evidencia palinológica que las especies de los bosques templados del sur de Sudamérica habrían sobrevivido al UMG contrayéndose hacia el norte, hacia refugios ubicados en áreas no glaciadas entre los 36 y 42°S. Los elementos más termófilos habrían ocupado los escalones medios y bajos de la Cordillera de la Costa, mientras que los elementos más frío-tolerantes habrían ocupado la depresión

intermedia (Villagrán 1991, 2001, Markgraf y col. 1995, Villagrán & Armesto 2005).

Entre 50 y 70% de las especies de la flora de bosques se concentra entre los 36° y 40° S., incluyendo especies de estrecho rango distribucional, especialmente en la Cordillera de la Costa. Este patrón fitogeográfico ha sido interpretado como consecuencia del rol de refugio de esta zona durante las glaciaciones del Pleistoceno (Villagrán & Hinojosa 1997, Villagrán 2001). Un patrón similar de concentración de riqueza de especies entre los 33 y 43°S también se ha encontrado en mamíferos y mariposas, atribuido a factores tanto ecológicos como históricos (Samaniego & Marquet 2009).

El patrón genético intraespecífico puede ayudar a dilucidar la historia poblacional de las especies (Hewitt 2000). Durante la colonización de un hábitat no ocupado por la especie, se producen “efectos fundadores” que reducen la diversidad genética de la población (Ibrahim y col 1996, Bialozyt y col. 2006, Bernatchez & Wilson 1998), efecto que persiste por cientos o miles de generaciones. Por otro lado, el aislamiento produce diferenciación poblacional (Avice y col. 1987).

Para los bosques del sur de Sudamérica, en especies termófilas el patrón general es de mayor diversidad en las poblaciones costeras y de menores latitudes (Núñez-Ávila & Armesto 2006, Montenegro 2011, Segovia y col. 2012). Cabe destacar que esto es un patrón general y que, sin embargo, cambios climáticos asociados al Holoceno también pueden incidir en los patrones de distribución de la diversidad en plantas.

Por ejemplo, en *Eurcryphia* las poblaciones de mayor diversidad genética en el cloroplasto han sido las de la parte media de su rango latitudinal con disminución hacia sus extremos sur y norte. De acuerdo a Segovia y col. (2012) el patrón de disminución de la diversidad hacia el norte se explica por una contracción (y sucesivo cuello de botella genético) producto de condiciones más áridas en el Holoceno medio y tardío. Por otro lado para especies más frío tolerantes se ha propuesto persistencia de poblaciones en la Cordillera de los Andes o a altas latitudes, dentro de lo que habrían sido los límites de los hielos para, por ejemplo, *Nothofagus alpina*, *Fitzroya cupressoides*, *Pilgerodendron uviferum* y *Embothrium coccineum* (Marchelli & Gallo 2006, Premoli y col. 2000, Premoli y col. 2002, Souto & Premoli 2007). Cabe destacar entonces que las respuestas de las especies de flora al clima pueden ser variadas, las especies más termófilas contayendose más durante las fases frías, mientras que las especies más criófilas persisten en un área mucho más grande, incluso pudiendo expandir su rango por poder migrar a menores altitudes. Se puede incluso decir que las especies frío tolerantes no tuvieron refugios glaciales, sino que actualmente se encuentran en una situación de refugio, muchas veces confinadas a latitudes altas y las cumbres de las montañas (Stewart y col. 2010). La mayoría de los estudios en especies termófilas han sido sólo con marcadores cloroplastidiales, por lo que puede ser interesante hacer más estudios con otros tipos de marcadores.

En plantas los distintos genomas (nuclear, cloroplastidial y mitocondrial) tienen modos de herencia distintos. En angiospermas el genoma cloroplastidial y mitocondrial en general es de herencia materna (por semilla) y el genoma nuclear es

de herencia biparental (semilla y polen). El grado de estructuración encontrado en las poblaciones de una especie varía con el modo de herencia del marcador usado. Al comparar marcadores de herencia materna y biparental en plantas, se encuentra que el grado de estructuración en ambos marcadores es independiente (Petit y col. 2005). Esto se debe a posibles diferencias en la vagilidad (capacidad de dispersión) del grano de polen y de la semilla (Schaal 1998). Además hay que considerar que existe una diferencia entre el tamaño poblacional efectivo de los distintos genomas. El genoma nuclear tiene un tamaño poblacional efectivo del doble que el genoma haploide de un organelo si la especie es diploide y la diferencia es incluso mayor para una especie multiploide. La deriva génica es más fuerte sobre una población más pequeña, lo que tiene por consecuencia que se registren mayores niveles de diferenciación poblacional en los genomas haploides de los organelos (Hare 2001, Schaal 1998, Birky y col. 1989).

A pesar del patrón general propuesto por Petit y col. (2005), se ha descrito estructuración concordante entre marcadores de distintos genomas. Por ejemplo, Ikeda y col. (2008) encontraron que en la hierba alpina *Cardamine nipponica* un marcador cloroplastidial y varios nucleares mostraron el mismo patrón filogeográfico general, aunque la resolución de los marcadores nucleares fue mayor, por lo que se detectó una estructura genética más fina con estos.

Laureliopsis philippiana (tepa, figura 2) es un árbol de la familia de las Atherospermataceae, la que es de distribución austral-antártica. Se asocia al bosque valdiviano y nordpatagónico (Veblen & Schlegel 1982), por lo que puede

considerarse una especie intermedia en términos de tolerancia al frío comparada con otras especies del bosque templado. Se trata de una especie arbórea de hoja perenne que alcanza más de 1 m de diámetro del tronco y más de 30 m de altura (Donoso y col. 2006). Es una especie andromonoica donde las flores hermafroditas y masculinas se encuentran en la misma inflorescencia. La filogenia molecular indica que su especie hermana es *Laurelia novae-zelandiae* (Renner y col. 2000). *L. novae-zelandiae* está descrita como entomofílica (Sampson, 1969) y las flores de *L. philippiana* también presentan características de este síndrome de polinización, por lo que es razonable pensar que esta especie también es entomofílica. Las semillas son de aproximadamente 1 cm de largo, alargadas, livianas (del orden de miligramos) y muy pilosas, por lo que serían dispersados por viento y posiblemente a grandes distancias. Su distribución geográfica es principalmente en Chile, entre los 37° 30' S y los 47° 30' S con algunas poblaciones en Argentina (Donoso y col. 2006) y una población aislada a los 35° 29' S en la costa, aproximadamente a 240 km del límite norte de su distribución principal (Sepúlveda y Troncoso 2004). Es una especie adaptada a la humedad, hacia su límite de distribución norte se encuentra en quebradas y cerca de cursos de agua. El límite sur y altitudinal estaría determinado por bajas temperaturas. Es una de las especies dominantes en algunos tipos de bosque (ej. bosques de Coigüe-Raulí-Tepa en los Andes, Donoso y col. 2006). Se ha descrito reproducción vegetativa por brotes desde las raíces, la que puede ser más importante que la regeneración por semilla cuando se abren claros en el bosque (Muñoz & González 2009). La especie más cercana a *L. philippiana* que habita en Chile es *Laurelia sempervirens*. Esta especie se distribuye entre los 34°40'S hasta los 41°30'S. En el rango latitudinal en que existen las dos especies *L. sempervirens* se

encuentra a menor altitud, aunque ambas especies se traslapan en fajas altitudinales estrechas (Donoso y col. 2006).

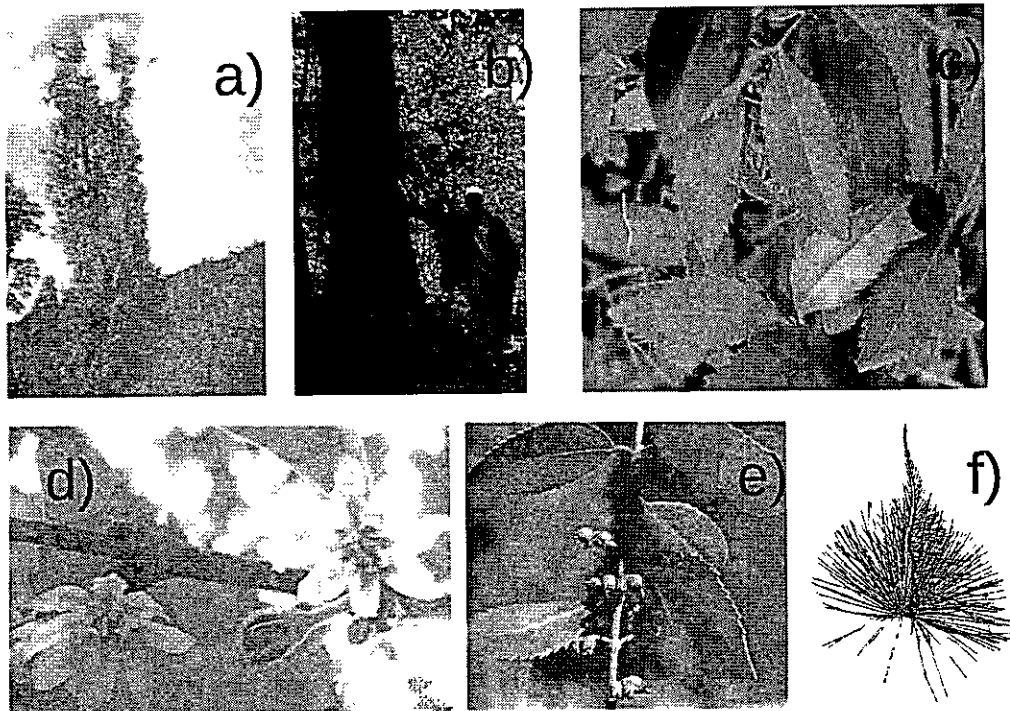


Figura 2. Morfología de *L. philippiana*. a) árbol, b) tronco, c) hojas, d) flores, e) frutos, f) semilla. d) y e) tomadas de Donoso y col. 2006, f) tomada de Martínez-Laborde 1983.

El registro palinológico de *L. philippiana* no es muy abundante y en los sitios en que aparece lo hace a baja frecuencia (<10% del polen total). No se puede distinguir entre el grano de *Laurelia sempervirens* y *L. philippiana*. En la tabla 1 y figura 3 se muestran los sitios palinológicos en los que se ha registrado *Laurelia/Laureliopsis*.

Aunque no se pueda distinguir entre el polen de *Laurelia* y *Laureliopsis*, es probable que las presencias más tempranas en los registros polínicos correspondan a *L. philippiana* y no a *L. sempervirens*, porque la primera es mucho más frío tolerante que la segunda. Las especies polínicas que frecuentemente acompañan a

Laurelia/Laureliopsis son *Nothofagus* tipo *dombeyi*, *Drymis*, *Lomatia*, *Myrtaceae*, *Fitzroya/Pilgerodendron*, *Embothrium* e *Hydrangea serratifolia* (ver Heusser 1984, Heusser 1976, Vargas-Ramirez y col. 2008, Moreno y col. 1999, Heusser y col. 1999, Heusser 1966, Abarzúa y col. 2004, Villagrán 1988). Otras especies incluyen *Weinmannia trichosperma* (Heusser 1984, Abarzúa y col. 2004, Villagrán 1988) , *Eucryphia/Caldcluvia* (Vargas-Ramirez y col. 2008, Heusser 1966, Abarzúa y col. 2004, Villagrán 1988), *Nothofagus* tipo *obliqua* (Heusser 1984, Vargas-Ramirez y col. 2008, Heusser y col. 1999), *Saxegothea conspicua* (Heusser 1966, Abarzúa y col. 2004, Villagrán 1988) y *Aextoxicon punctatum* (Heusser 1984, Vargas-Ramirez y col. 2008, Abarzúa y col. 2004). La primera aparición de *Laurelia/Laureliopsis* en la mayoría de los sitios corresponde al tardiglacial (~ 14000-7000 años calendario antes del presente), excepto en Río Ignao donde *Laurelia/Laureliopsis* aparece y desaparece durante un interstadío temprano de la última glaciación (Heusser 1976). Estos datos son consistentes con una recolonización de estas partes de su hábitat por *L. philippiana* durante el tardiglacial. Sin embargo, hay que tener en cuenta las limitaciones del registro polínico para este caso en particular: i) los sitios palinológicos están asociados a lagos y lagunas, por lo que se encuentran concentrados en la Región de Los Lagos (figura 3) y ii) dado que *L. philippiana* es polinizada por insectos y, por lo tanto, produce relativamente poco pólen el cual además es de baja vagilidad (en comparación a una especie polinizada por viento), la presencia de polen indica presencia de la especie cerca del sitio, pero la ausencia no indica necesariamente una ausencia de la especie.

Sitio	Latitud	Longitud	m.s.n.m.	Edad (14C yr B. P.)	Fuente Bibliográfica
Rucañancu	-39.55	-72.30	290	10000-10400	Heusser 1984
Río Ignao	-40.30	-72.62	200	>56000	Heusser 1976
Lago Puyehue	-40.67	-72.47	185	13410*	Vargas-Ramirez y col. 2008
Los Mallines	-40.77	-72.28	730	3500*	Vargas-Ramirez y col. 2008
Canal la Puntilla	-40.95	-72.91	120	19000	Moreno et al. 1999
Alerce	-41.39	-72.88	130	13073	Heusser y col. 1999
Calbuco	-41.46	-73.00	100	9000-10000	Heusser 1966
Fundo Santa Elena	-41.50	-73.10	110	13870	Heusser y col. 1999
La Campana	-41.63	-73.19	100	11672	Heusser y col. 1999
Mayol	-42.64	-73.76	75	12505	Heusser y col. 1999
Laguna Tahui	-42.83	-73.50	70	13500*	Abarzúa y col. 2004
Laguna Soledad	-43.17	-73.88	250	8130-10160	Villagrán 1988

Tabla 1. Sitios palinológicos con coordenadas, edad a la que aparece *Laurelia/Laureliopsis* en años radiocarbónicos y fuente bibliográfica. Los asteriscos indican las edades que corresponden a la base de la secuencia sedimentaria publicada por los autores.

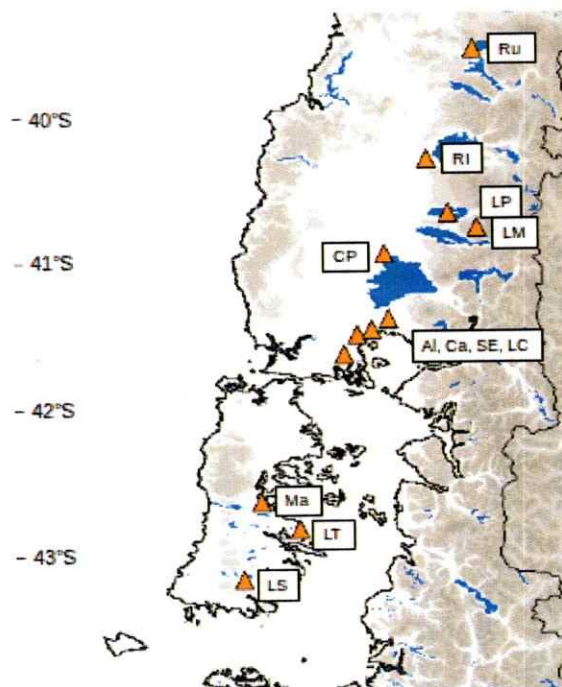


Figura 3. Mapa de los sitios palinológicos con ocurrencia de *Laurelia/Laureliopsis*. Los sitios de norte a sur son Ru: Rucañancu, RI: Río Ignao, LP: Lago Puyehue, LM: Los Mallines, CP: Canal la Puntilla, Al: Alerce, Ca: Calbuco, SE: Fundo Santa Elena, LC: La Campana, Ma: Mayol, LT: Laguna Tahui, LS: Laguna Soledad.

En un trabajo previo se utilizaron secuencias de la región trnL-trnF del genoma cloroplastidial (Taberlet y col. 1991) para investigar la historia poblacional de *L. philippiana* (Bosshard 2011 y datos no publicados, apéndices 2 y 3). Se encontró

poca diversidad con sólo dos haplotipos dominantes (y un tercero de muy baja frecuencia), los que son muy cercanos entre ellos, pero una fuertísima estructuración poblacional, con un quiebre que explica más de un 87% de la varianza genética. Las poblaciones de la parte norte en la Cordillera de la Costa (Cordillera de Nahuelbuta) están completamente diferenciadas de las poblaciones más al sur de los 40°S con la excepción de unas pocas poblaciones en los Andes en las que hay un gradiente de frecuencias desde un haplotipo al otro. Se interpretó este patrón como evidencia de que la recolonización de *Laureliopsis* ocurrió desde por lo menos dos refugios localizados en la Cordillera de la Costa, uno en Nahuelbuta y otro más al sur posiblemente en Cordillera Pelada. Los frentes de colonización de esos dos refugios se habían encontrado y formado una zona de sutura en la Cordillera de los Andes, lo que explicaría el gradiente entre un haplotipo y el otro, mientras que el sur de su rango actual habría sido colonizado por el refugio sur. Sin embargo, dado los bajos niveles de diferenciación entre las dos zonas queda la pregunta de si existe más estructuración poblacional que no fue detectada por los bajos niveles de variabilidad del marcador utilizado. Las frecuencias de los haplotipos se ven graficadas sobre un mapa en la figura 4.

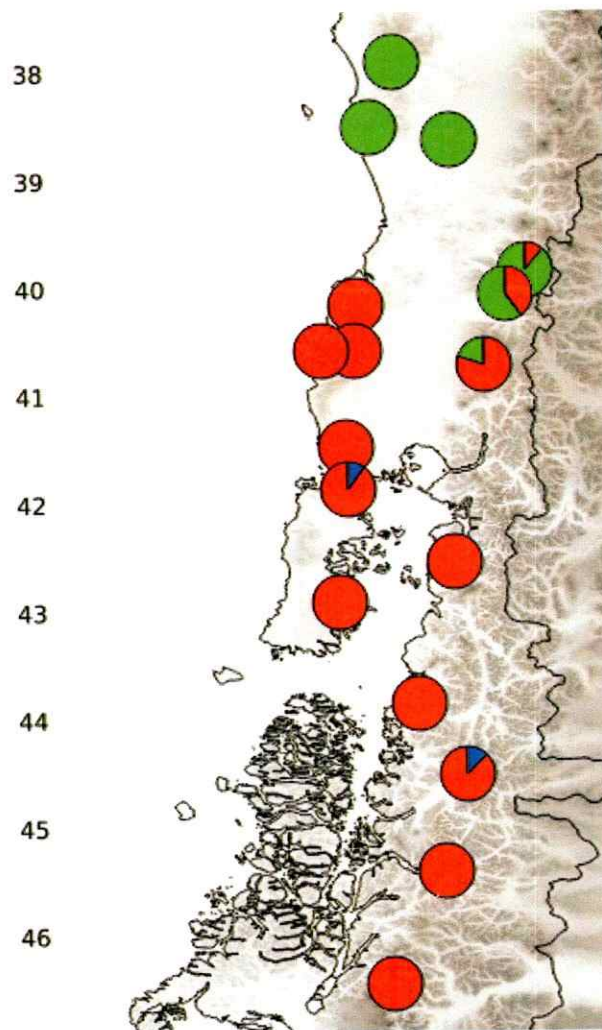


Figura 4. Frecuencias de haplotipos cloroplastidiales en distintas localidades de muestreo a lo largo del rango de *L. philippiana* (Bosshard 2011 y datos no publicados).

Objetivo General

Estudiar la historia poblacional de *L. philippiana* y sus respuestas ante las perturbaciones climáticas del Pleistoceno.

Objetivo Específico

Desarrollar y utilizar marcadores microsatelitales para *L. philippiana*, para complementar los datos cloroplastidiales utilizados anteriormente y poder resolver

con mayor precisión la estructuración genética de la especie.

Hipótesis & Predicciones

La especie *L. philippiana* habría sobrevivido las glaciaciones en zonas costera al norte de la línea de los hielos, entre los 37.5 y 42° S, fuera de la influencia glacial, en grupos aislados de Nahuelbuta y Pelada y posiblemente también en el nor-oeste de Isla Grande de Chiloé. Se espera que la diversidad genética disminuya hacia el sur y que haya diferenciación genética entre Nahuelbuta y Pelada; y entre las poblaciones de Pelada y Chiloé.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se utilizaron muestras de material foliar de 17 localidades (tabla 2) donde *Laureliopsis philippiana* ocurre naturalmente, cubriendo su rango de distribución latitudinal en Chile. En cada localidad se tomaron muestras de hojas de individuos separados por lo menos 50 metros entre ellos (con el fin de evitar muestrear el mismo individuo dos veces dado que la reproducción vegetativa está descrita para la especie (Donoso y col 2006). Las muestras fueron secadas y conservadas en sílica gel.

Localidad	Individuos	Latitud Sur	Longitud Oeste
Nahuelbuta	14	37.94	73.13
Las Ñochas	10	38.54	73.34
Rucamanque	10	38.66	72.61
Pto. Fuy	10	39.88	71.91
Caunahue	8	40.09	72.10
Puyehue	10	40.74	72.30
Pelada	16	40.20	73.49
Liucura	10	40.61	73.55
Bahía Mansa	10	40.62	73.75
Lolcura	10	41.56	73.58
Manao	8	41.84	73.56
Chiloé Sur	12	42.95	73.65
Pumalín	9	42.57	72.59
Palena	10	43.88	72.92
Queulat	10	44.55	72.48
Aikén	10	45.44	72.69
Exploradores	8	46.48	73.17

Tabla 2. Número de individuos muestreados y coordenadas geográficas por localidad.

Extracción de DNA

Material foliar fue molido utilizando un Tissue Lyser (Quiagen). Con el tejido molido

se hicieron extracciones de DNA, con el kit de extracción DNEasy Plant Mini Kit (Quiagen). Se controló la calidad de las extracciones con un espectrofotómetro Nanodrop.

Desarrollo de marcadores microsatelitales

Se utilizó una muestra de DNA con un alto grado de pureza de un sólo individuo para el desarrollo de microsatélites, la cual fue obtenida con un protocolo CTAB modificado (Doyle y Doyle, 1987). La integridad de las hebras fue chequeada por electroforesis en gel. Se entregó la muestra a OMICS Solutions (Santiago, Chile) para una secuenciación masiva en un sistema Roche GS Junior 454, que arrojó 58833 lecturas. Se utilizó QDD 2.1 (Megléczy y col. 2010) para buscar microsatélites en las secuencias y diseñar partidores para amplificarlos. De los 871 microsatélites detectados se hizo una selección de veinte, tomando como principal criterio el número de repeticiones dado que los microsatélites más largos tienden a ser más variables. Por cada par de partidores a uno se le agregó la cola M13 (5' CAÇGACGTTGTAAAACGAC 3') en el extremo 5'. A la reacción de PCR se agregó como tercer partidador la cola M13 marcada con fluorescencia para el subsiguiente análisis de fragmentos. La determinación del largo de los fragmentos se realizó en el servicio de secuenciación de la Pontificia Universidad Católica de Chile (Santiago, Chile). Se seleccionaron cuatro pares de partidores que arrojan peaks legibles y cuyos microsatélites mostraron polimorfismo (tabla 3).

Locus	Motivo	Tamaño	Partidor izquierdo	Partidor derecho	T° an. iz.	T° an. der.
1	AG	219	GCACATAACTCTAAGTTAACCTGCCT	CCTGACTTGCACCTCACTCTC	60.447	60.041
2	AG	235	TGCCCTGTTACACATGATGC	CAAGTGGTCGGAGGAGAACA	60.549	61.246
3	AG	261	GCCAATGTTGATTGCTCCTC	CGATCTACCATGGCCTTGAA	60.613	60.992
4	AAG	270	TGCACTCGAAATGAAATCCA	CAATAGCATTCTCGTCCCG	60.197	60.597

Tabla 3. Loci utilizados. Se indica motivo del repetido, tamaño de referencia (sin cola M13), secuencias y temperatura de anillamiento de los partidores. La cola M13 se agregó el partidor izquierdo en todos los casos.

Alelos nulos y equilibrio Hardy-Weinberg

Se puso a prueba si los marcadores microsatelitales presentan errores de genotipificación (por ejemplo, por alelos nulos) utilizando Micro-Checker (van Oosterhout y col. 2004). Se determinó si las poblaciones se desvían del equilibrio de Hardy-Weinberg en Genepop 4.3 (Rousset 2008). De las 68 combinaciones población-marcador sólo 2 (Rucamanque-locus1 y Pumalín-locus3) presentaron exceso de homocigotos. Dado el número de combinaciones se considera que esto no es inesperado y simplemente forma parte del ruido estadístico más que un problema sistemático. De forma similar sólo 2 combinaciones (Nahuelbuta-locus4 y Pumalín-locus3) se desviaron del equilibrio Hardy-Weinberg, según el análisis de Genepop. No hay problemas sistemáticos de alelos nulos o desviaciones del equilibrio HW en los marcadores seleccionados.

Análisis de Datos

Se determinaron los tamaños de los fragmentos amplificados en el programa Peak Scanner 1.0 (Applied Biosystems).

Se calcularon índices de diversidad: número de alelos, heterocigocidad observada, heterocigocidad esperada bajo equilibrio de Hardy-Weinberg y rango alélico

utilizando Arlequin 3.5 (Excoffier and Lischer 2010).

Se utilizó el algoritmo de inferencia bayesiana implementado en STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard y col. 2000) para encontrar la forma de la que mejor se agrupan los individuos de *L. philippina*. Se utilizaron cuatro sets de parámetros: con frecuencias alélicas independientes o correlacionadas (Falush y col. 2003a) y con o sin usar la información geográfica para fijar las distribuciones previas (opción LOCPRIOR, Hubisz y col. 2009). Para todos se utilizó el modelo de mezcla (admixture). Se corrieron 100000 iteraciones del algoritmo, con un período de “burn in” de 20000 iteraciones descartadas. Se evaluaron valores de K (número de grupos) de 1 a 10, con 30 réplicas cada uno, tomando como mejor modelo de cada set de parámetros, el donde la curva de los logaritmos de la verosimilitud se aplana. Con la divergencia de frecuencia alélica (distancia neta, D, entregada por STRUCTURE) entre grupos se construyó un árbol Neighbor Joining entre los grupos (e.g. Falush y col. 2003b) utilizando el paquete APE (Paradis y col. 2004) para R. Para graficar se utilizó Distruct 1.1 (Rosenberg 2004).

Se hicieron regresiones lineales de diversidad genética (número de alelos, rango alélico y heterocigocidad esperada) en función de la latitud, longitud y altura de los sitios de muestreo, lo que se hizo en R 3.0.2 (R Core Team 2013). Dado que lo que interesa es el patrón general para la especie, más que el de cada locus individual, se utilizó el promedio entre los loci. Para corregir por el efecto de tamaños de muestras desiguales se utilizó una estrategia de remuestreo (e.g. Leberg 2002). Se calculó la diversidad para 100000 muestras de ocho alelos y se tomó el promedio. Lo anterior

se realizó en un script escrito ad hoc para este análisis (apéndice 1) en el programa R versión 3.0.2 (R Core Team 2013).

Se realizó un test de Mantel para determinar la correlación entre las distancias geográficas y genéticas (índices de diferenciación) entre pares de poblaciones. Para esto se usó el paquete ade4 (Dray & Dufour 2007) en el programa R. También se determinó la correlación a través de un test de Mantel entre índices de diferenciación calculados a partir de secuencias de cpDNA (Bosshard 2011 y datos no publicados, apéndices 2 y 3) y los marcadores microsatelitales y entre distancias con cpDNA y distancias geográficas. Como índice de diferenciación se utilizaron F_{st} calculados en Arlequin. Para obtener las distancias geográficas se utilizó Geographic Distance Matrix Generator 1.2.3 (Ersts 2006). Se utilizaron 10000 permutaciones para el test de Mantel.



RESULTADOS

En la muestra total de 175 individuos de 17 localidades (tabla 4), los cuatro loci con los que se obtuvieron peaks utilizables fueron polimórficos, mostrando entre 17, 12, 18 y 12 alelos (tabla 5). La riqueza promedio entre localidades osciló entre 5.41 y 7.53 (tabla 5), mientras que la riqueza promedio entre loci por localidades osciló entre 5.25 y 7.25 (tabla 4). El rango alélico de los loci osciló entre 12 y 26 repeticiones, con promedios por locus de los sitios de muestreo entre 7.47 y 17.06 (tabla 5) y promedios por sitio entre los loci entre 8.50 y 13.75 (tabla 4). Los valores de heterocigocidad observada y esperada bajo Hardy-Weinberg no muestran grandes discrepancias. La heterocigocidad observada y esperada promedio de los loci osciló de 0.66 a 0.86 y de 0.73 a 0.83, respectivamente (tabla 5). La heterocigocidad observada y esperada total de los loci osciló de 0.67 a 0.85 y de 0.80 a 0.90, respectivamente (tabla 5). La heterocigocidad observada para las localidades de muestreo estuvo entre 0.65 y 0.82 (tabla 4), mientras que la esperada estuvo entre 0.65 y 0.86 (tabla 4).

	Código	N	Riqueza	Rango	Ho	He
Nahuelbuta	1	25.25	6.75	13.75	0.75	0.77
Las Ñochas	2	19.50	7.25	11.00	0.76	0.79
Rucamanque	3	19.50	6.25	10.25	0.74	0.81
Pto. Fuy	4	15.75	6.25	11.50	0.82	0.84
Caunahue	5	14.50	6.50	10.75	0.81	0.84
Puyehue	6	19.50	6.25	11.75	0.71	0.74
Pelada	7	27.50	7.00	11.75	0.77	0.81
Liucura	8	19.00	6.50	12.50	0.79	0.82
Bahía Mansa	9	19.00	5.75	8.75	0.74	0.70
Lolcura	10	19.50	7.25	8.50	0.79	0.86
Manao	11	16.00	6.25	11.25	0.81	0.82
Chiloé Sur	12	22.00	6.50	11.25	0.82	0.78
Pumalín	13	16.50	5.50	9.25	0.65	0.77
Palena	14	18.75	5.25	9.75	0.75	0.80
Queulat	15	18.00	6.50	10.75	0.68	0.72
Aikén	16	19.50	5.75	10.25	0.82	0.81
Exploradores	17	15.50	5.25	11.00	0.71	0.65
Promedio		19.13	6.28	10.82	0.76	0.79
Desviación estándar		3.36	0.62	1.32	0.05	0.05
Total		325.25	14.75	20.50	0.76	0.84

Tabla 4. Código localidad, número de alelos utilizados, promediados entre loci (N), riqueza alélica, rango alélico (en número de repeticiones), heterocigocidad observada (Ho) y heterocigocidad esperada (He) por localidad, promediado entre loci.

Locus	Riqueza		Rango		Ho promedio	Ho total	He promedio	He total
	promedio	Riqueza total	promedio	Rango total				
1	7.53	17	17.06	26	0.80	0.81	0.83	0.90
2	5.41	12	7.47	23	0.73	0.72	0.73	0.81
3	5.82	18	10.41	21	0.66	0.67	0.76	0.80
4	6.35	12	8.35	12	0.86	0.85	0.82	0.85

Tabla 5. Riqueza alélica, rango alélico (en número de repeticiones), heterocigocidad observada (Ho) y heterocigocidad esperada (He) promedio entre localidades y total, por locus.

Respecto de la búsqueda de estructuración con el algoritmo STRUCTURE, el set de parámetros que arroja un modelo más fuerte es el con frecuencias alélica correlacionadas entre poblaciones y con el parámetro LOCPRIOR. La curva de logaritmo de verosimilitud en función de grupos supuestos (K) se aplana al llegar a K=3, mientras que los demás modelos tienen un peak en K=2 o K=3 (figura 5). Para visualizar la distribución geográfica de los grupos inferidos se graficaron las

proporciones de pertenencia a cada grupo de los individuos de cada localidad sobre el mapa (figura 6). Los tres grupos inferidos son geográficamente coherentes, uno (mostrado en verde, "grupo Nahuelbuta") se concentra en la costa al norte en la Cordillera de Nahuelbuta y alrededores, otro (mostrado en rojo, "grupo Pelada") en la Cordillera Pelada, también en la costa. El tercero (mostrado en azul, "grupo Chiloé") se encuentra en la parte sur del rango, desde Chiloé hasta el extremo sur de la distribución de la especie. Algunas localidades muestran una mezcla entre los grupos, por ejemplo en la Cordillera de los Andes al norte de los 42°, donde hay un gradiente de norte a sur donde se observa una transición gradual entre el grupo Nahuelbuta (verde en la figura 6) y el grupo Pelada (rojo en la figura 6). Cabe destacar que cuando el algoritmo es corrido suponiendo dos grupos se encuentra el quiebre genético entre Nahuelbuta y Pelada, por lo que se deduce que la señal estadística es más fuerte para éste que para el quiebre entre Pelada y Chiloé (figura 7). Esto se observa también en el árbol Neighbor Joining (figura 8) donde el grupo Nahuelbuta es el que más se distancia de los otros, con una distancia desde el nodo central de aproximadamente el doble que los otros dos (tabla 6).

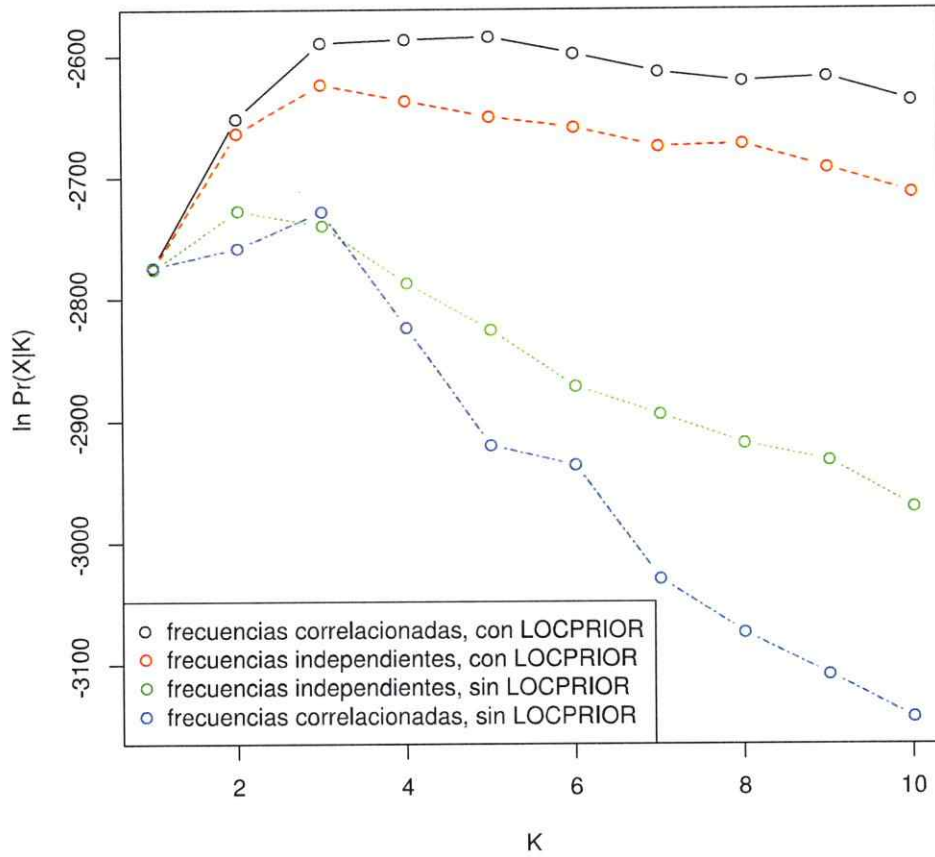


Figura 5. Logaritmo natural de la verosimilitud dado un número de grupos supuestos K en función de K . Se tomó la mejor corrida de 10 para cada valor de K , para cada set de parámetros.

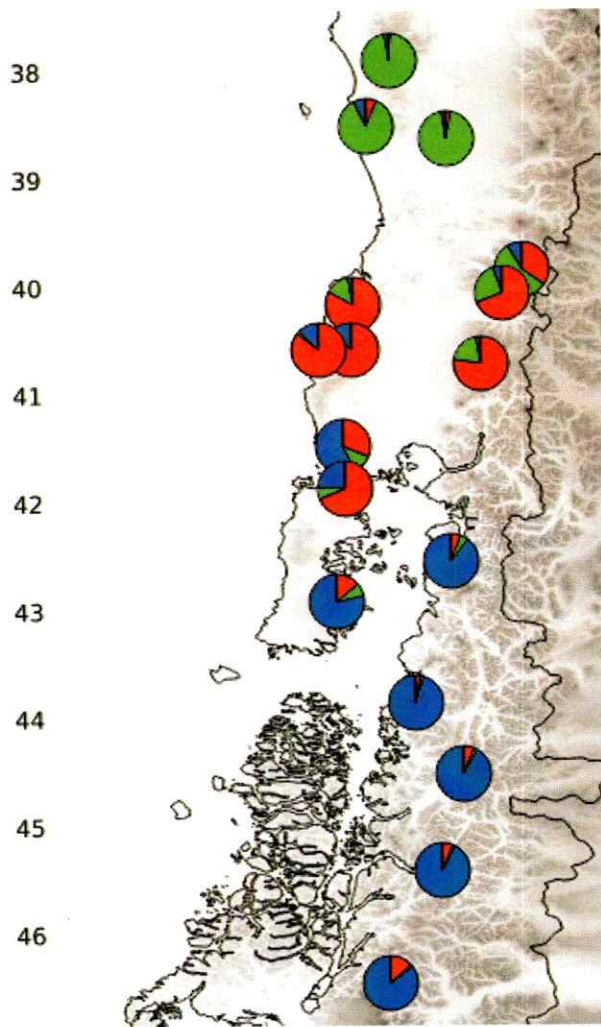


Figura 6. Promedio de proporciones de pertenencia a cada grupo de los individuos de cada localidad, para el mejor modelo.

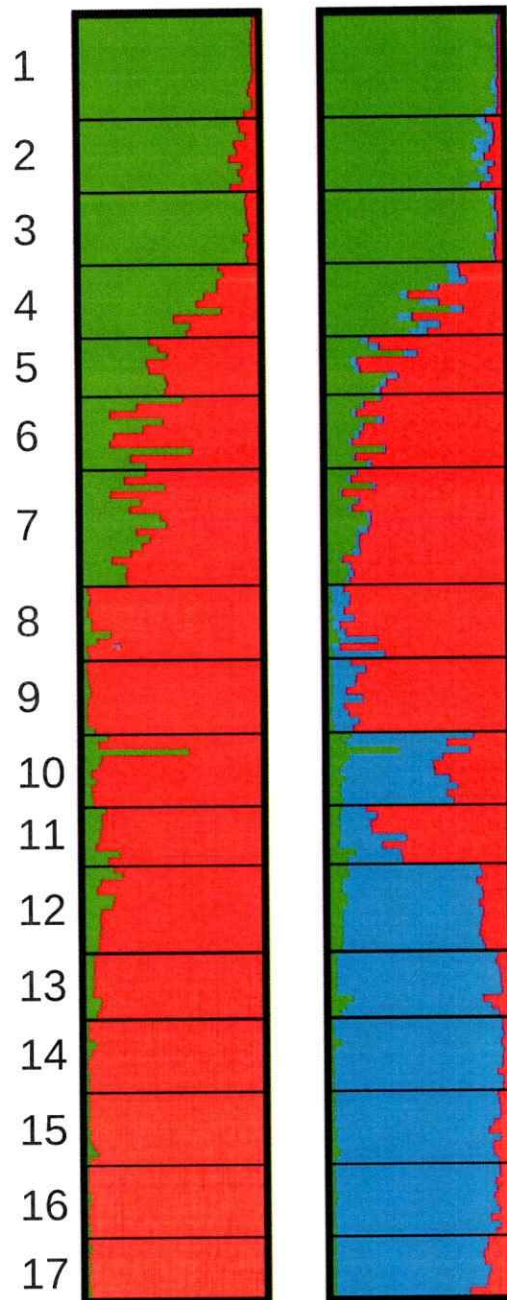


Figura 7. Probabilidad de pertenencia a cada grupo por individuo para 2 y 3 grupos supuestos (para frecuencias correlacionadas y LOCPRIOR). Los números indican las localidades de muestreo como en la tabla 5. Los colores corresponden a los de la figura 6.

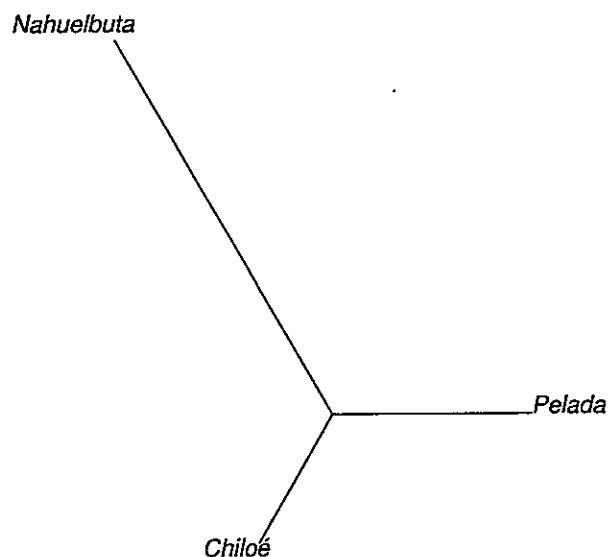


Figura 8. Árbol Neighbor Joining de grupos STRUCTURE a partir de la distancia neta. Se observa que el grupo Nahuelbuta se encuentra mucho más alejado de de los otros dos ($D \approx 0.066$) que estos entre si ($D = 0.0378$).

	Nahuelbuta	Pelada
Pelada	0.0633	-
Chiloé	0.0690	0.0378

Tabla 6. Divergencia de frecuencias alélicas entre grupos (distancia neta).

Las regresiones entre diversidad y latitud fueron significativa para riqueza alélica (pendiente=-0.06263, intercepto=6.59362, $R^2=0.25$, $p=0.039$, figura 9), marginalmente significativa para rango alélico (pendiente=-0.2332,

intercepto=17.5682, $R^2=0.22$, $p=0.055$, figura 10) y no significativa para la heterocigocidad esperada (pendiente=-0.008542, intercepto=1.00396, $R^2=0.21$, $p=0.065$, figura 11), a pesar de lo anterior es posible apreciar una tendencia negativa similar a las anteriores. Ninguna regresión entre algún índice de diversidad y la longitud (p entre 0.76 y 0.97) o la altitud (p entre 0.20 y 0.50) fue significativa.

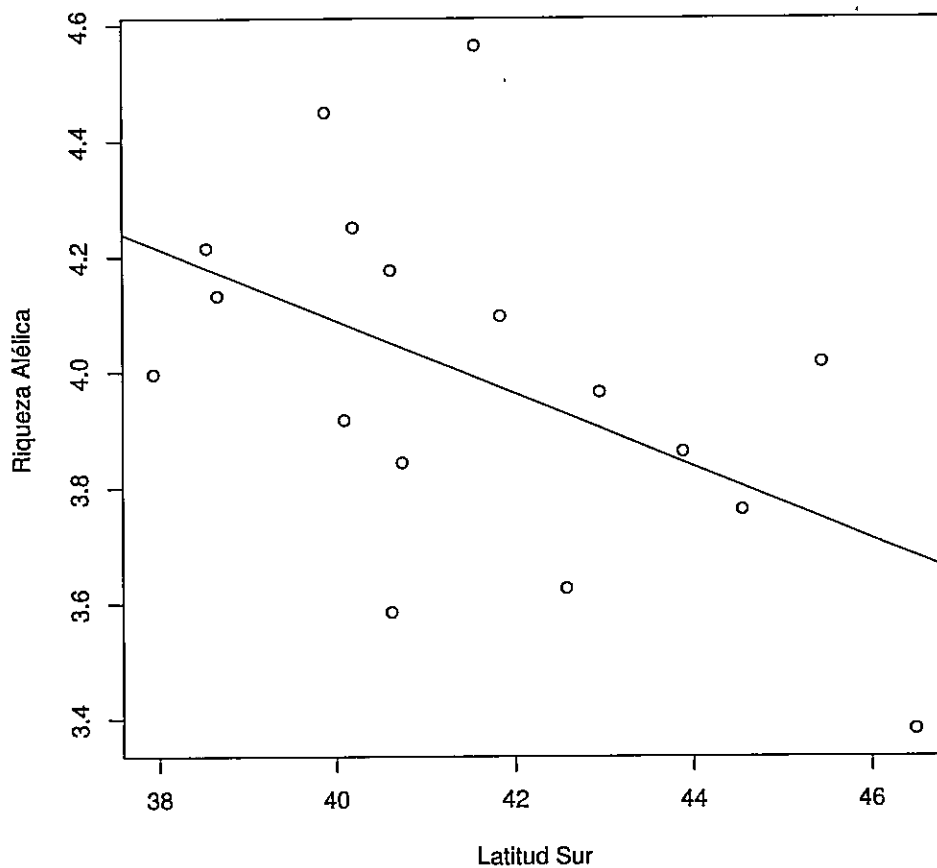


Figura 9. Riqueza alélica (remuestreada) en función de la latitud sur. Pendiente=-0.06263, intercepto=6.59362, $R^2=0.25$, $p=0.039$

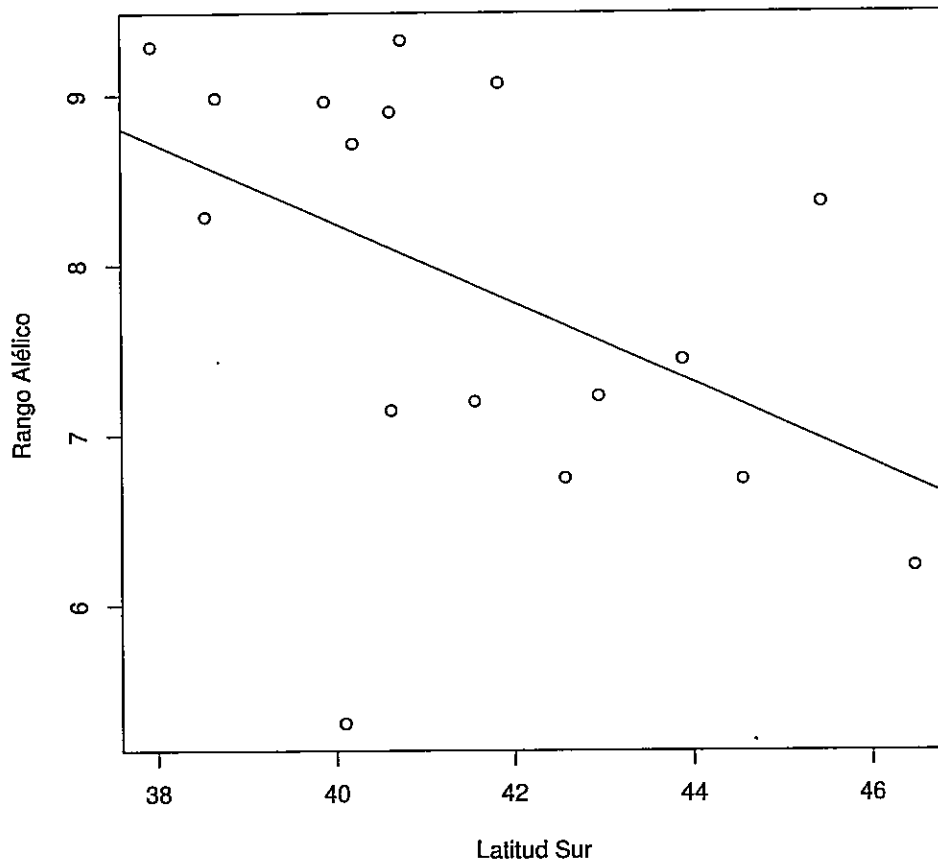


Figura 10. Rango alélico (remuestreado) en función de la latitud sur. Pendiente=-0.2332, intercepto=17.5682, $R^2=0.22$, $p=0.055$

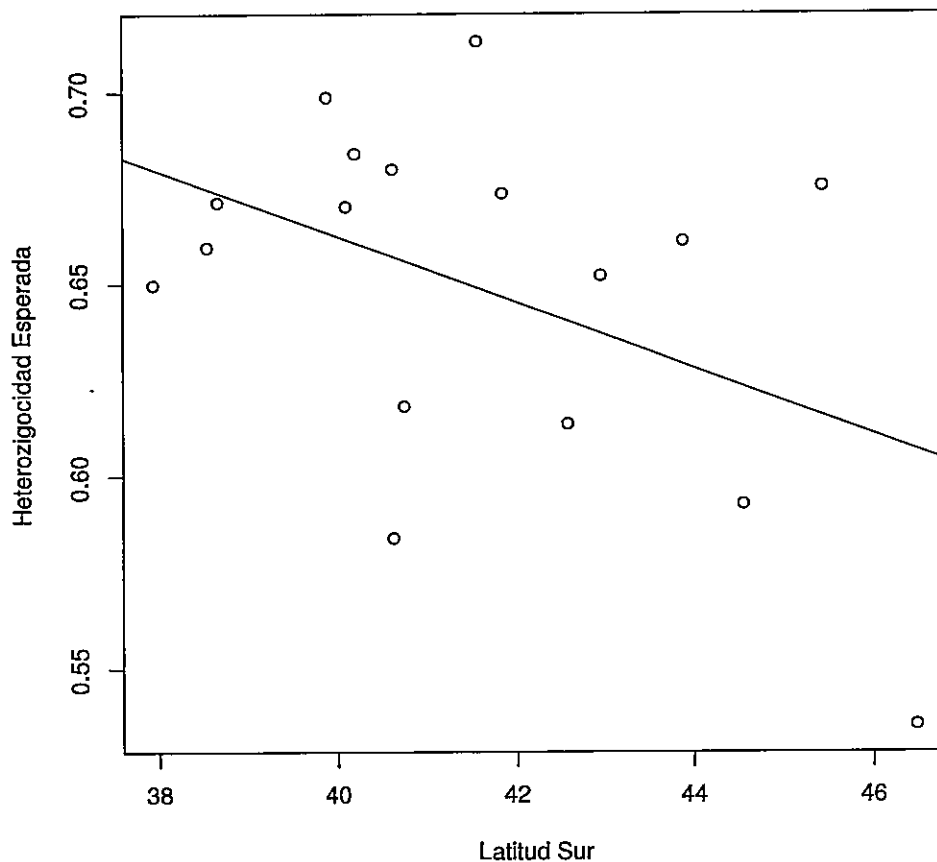


Figura 11. Heterocigocidad esperada (remuestreada) en función de la latitud sur. Pendiente=-0.008542, intercepto=1.00396, $R^2=0.21$, $p=0.065$

Para el conjunto de pares de poblaciones, se encontraron correlaciones significativas entre la distancia genética con cpDNA y la distancia geográfica ($Z=0.40$, $p=0.005$, figura 12), la distancia genética con microsatélites y la distancia geográfica ($Z=0.42$, $p=0.002$, figura 13) y entre las distancias genéticas con cp DNA y microsatélites ($Z=0.42$, $p=0.003$, figura 14).

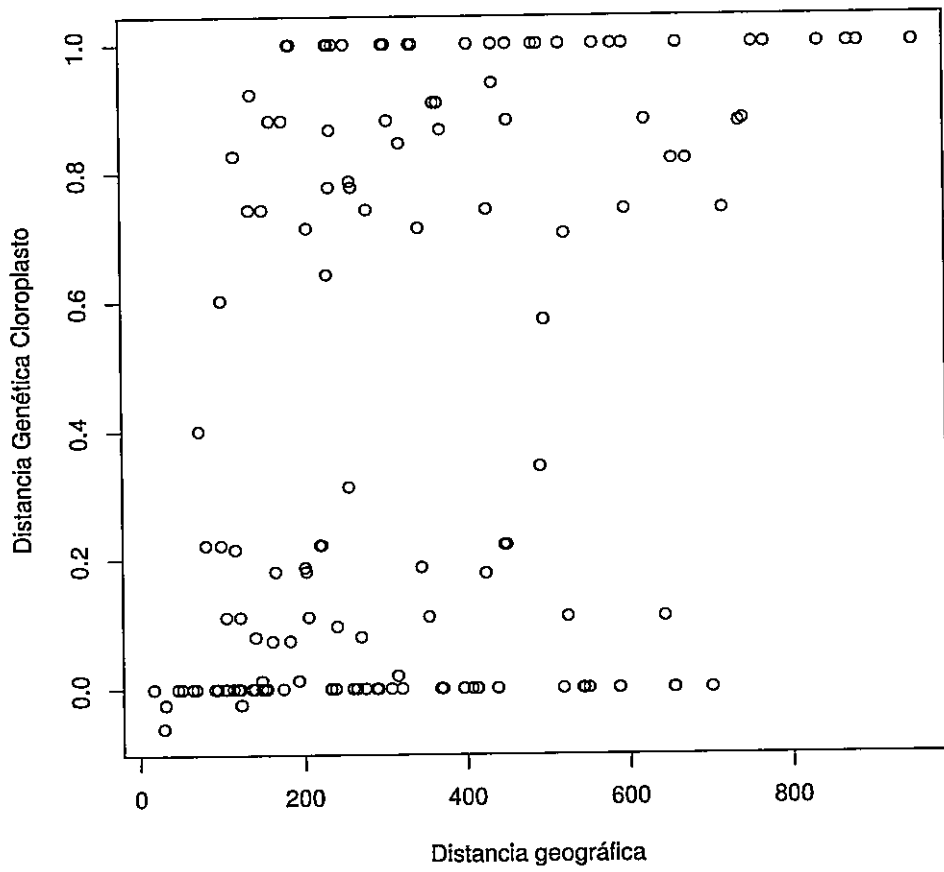


Figura 12. Gráfico de dispersión entre distancias genéticas con cpDNA y distancias geográfica entre pares de poblaciones.

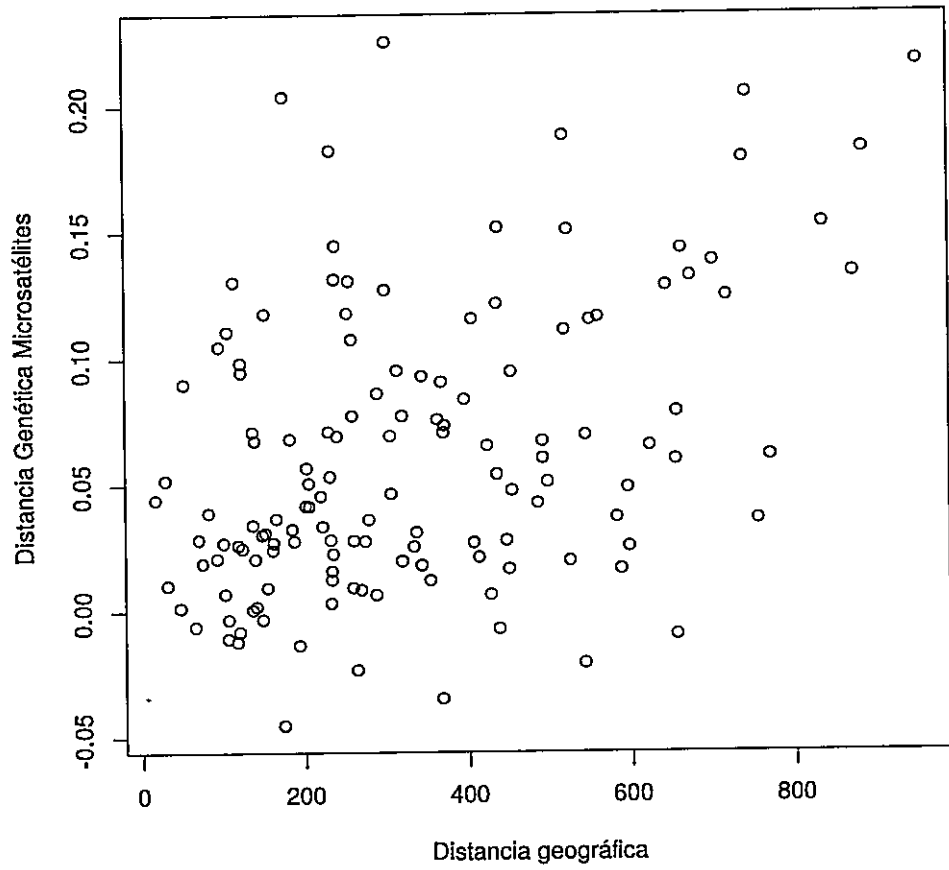


Figura 13. Gráfico de dispersión entre distancias genéticas con microsatélites y distancias geográfica entre pares de poblaciones.

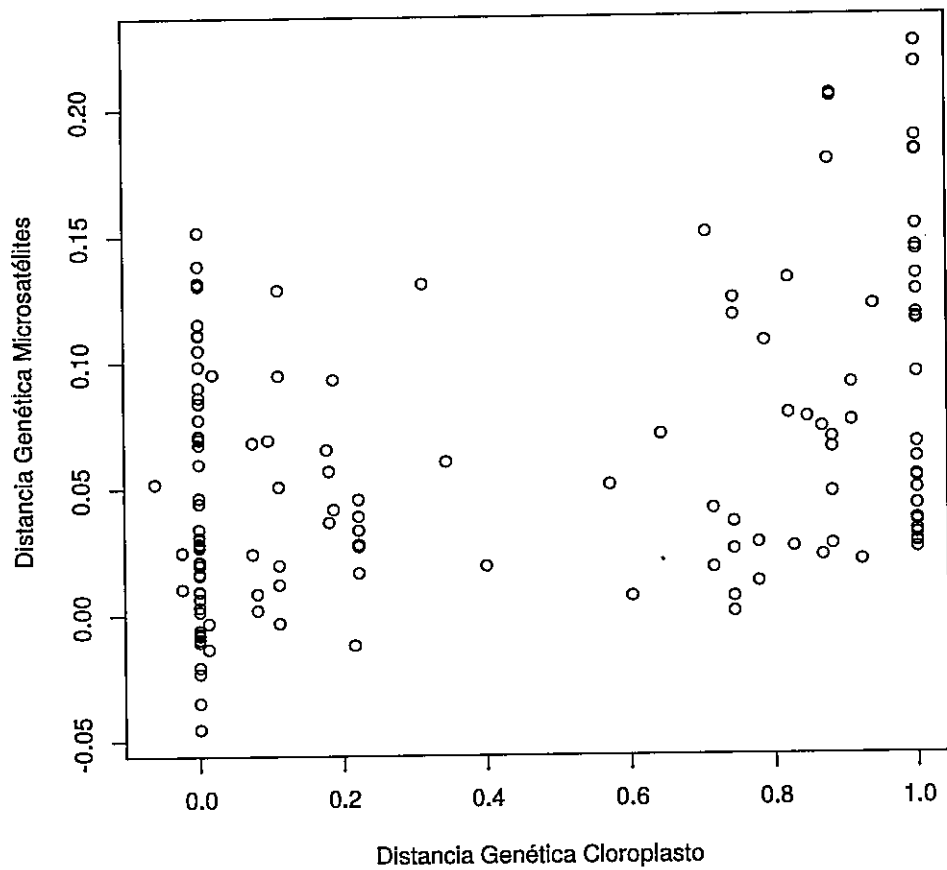


Figura 14. Gráfico de dispersión entre distancias genéticas con microsatélites y distancias genéticas con cpDNA entre pares de poblaciones.

DISCUSION

En este trabajo se estudió la historia poblacional de *Laureliopsis philippiana* utilizando marcadores microsatelitales. Esto con el fin de profundizar un trabajo previo en que se había utilizado un marcador de secuencia cloroplastidial. En los cuatro marcadores utilizados se encontraron 17, 12, 18 y 12 alelos (tabla 5), en contraste con el marcador cloroplastidial en el que se habían encontrado sólo tres haplotipos (alelos), uno de los cuales era de bajísima frecuencia ocurriendo sólo en cinco de 208 individuos. Estos mayores niveles de diversidad eran esperados dadas las tasas mutacionales más altas de los microsátélites y nos ofrecen una resolución más fina de los patrones genéticos espaciales.

Los resultados anteriores mostraron un fuerte estructuración poblacional con un quiebre genético muy marcado aproximadamente a los 40°S. Esta separación entre las poblaciones de las cordilleras de Nahuelbuta y Pelada, también es detectado con los microsátélites. Este quiebre genético es el que STRUCTURE encuentra primero (es decir, si uno fija el número de grupos en dos) y es el más fuerte (figura 7, figura 8, tabla 6), sin embargo, la mejor estructuración que se encuentre es con tres grupos (figura 7), con un segundo quiebre aproximadamente a los 41°S, que separa el área desde Chiloé hacia el sur de los dos grupos más norteños. Este segundo quiebre genético no está presente de forma clara en los datos de cloroplasto, lo que se podría

atribuir a la menor tasa de mutación del marcador. Cabe destacar que el haplotipo de baja frecuencia (en azul en la figura 4) sólo se encuentra en el área que con los microsatélites es asignada al grupo Chiloé (azul en la figura 6). Se abre entonces la interpretación de que el mismo quiebre genético que se observa en los microsatélites está en proceso de formarse en el genoma cloroplastidial y estamos viendo una diferenciación incompleta.

Como se ha notado anteriormente (Bosshard 2011), los datos de cloroplasto muestran lo que se ha interpretado como una zona de sutura (o contacto secundario). En la Cordillera de los Andes a la latitud del quiebre genético entre los grupos Nahuelbuta y Pelada se observa una transición continua de un haplotipo al otro. Esta misma transición entre los grupos genéticos también se observa con los microsatélites. El que ambos marcadores muestren este patrón suma evidencia a la interpretación de que esta zona consiste de una zona de sutura de dos grupos anteriormente diferenciados.

Se observa una disminución de la diversidad genética a mayores latitudes. En términos teóricos esperábamos menor diversidad en poblaciones más pequeñas o que hayan sufrido un cuello de botella poblacional y no hayan vuelto al equilibrio (Ibrahim y col. 1996, Nichols & Hewitt 1994, Bialozyt y col. 2006). Entonces podemos suponer que *L. philippiana* recolonizó el sur de su rango recientemente o que las poblaciones más australes históricamente hayan tenido tamaños poblacionales más pequeños. En contraste, en el cloroplasto no se observa disminución de diversidad a lo largo del gradiente latitudinal, aunque esto se puede

explicar por el hecho que el marcador cloroplastidial no tiene niveles de diversidad suficientes como para que se puedan observar este tipo de patrones.

En los datos de cloroplasto se había encontrado un quiebre genético muy marcado a los $\sim 40^{\circ}\text{S}$. Además de la congruencia entre los distintos marcadores en términos de volver a encontrar este mismo quiebre, hay una correlación positiva y significativa entre distancias con cpDNA y microsatélites por pares de localidades (coeficiente de correlación 0.40). El que los marcadores tengan tasas y procesos mutacionales distintos puede haber influido en esta relación, quizás si se hubiera podido trabajar con un marcador de secuencia nuclear, más comparable al de cpDNA, se hubiera encontrado una correlación más fuerte.

La diferenciación puede, en parte, deberse a un simple aislamiento por distancia (como se ve en las correlaciones de distancia genética y geográfica y en las figuras 12 y 13), aunque tentativamente podemos sugerir posibles barreras geográficas: i) el Canal de Chacao y ii) una zona de peores condiciones climáticas para la especie entre las cordilleras de Nahuelbuta y Pelada. El Canal de Chacao actualmente separa Isla Grande de Chiloé del continente en un trecho de 25 km, con un ancho aproximado de 2.5 km y profundidades menores a 80 m (Vidal y col. 2012). Durante los estadios glaciales se forma un puente de tierra entre Isla Grande y el continente (figura 15). En el último ciclo glacial esto habría permitido el intercambio biológico entre los 26000 y 7000 años antes del presente (Vidal y col. 2012). La cordillera de la costa tiene una depresión en su altitud a los 39°S aproximadamente (figura 16) entre las partes de ella que se conocen como las cordilleras de Nahuelbuta y Pelada. En esta

zona se producen menores precipitaciones orográficas (figura 17), por lo que se trata de un área relativamente seca, además de las mayores temperaturas propias de menores elevaciones. Hay modelos que predicen mayores precipitaciones durante los estadios glaciales para la zona (Kaplan y col 2008, Rojas y col. 2009), pero incluso si estas barreras son sólo intermitentes, podemos hipotetizar que pueden frenar el flujo génico entre estos sitios y contribuir a la diferenciación poblacional.

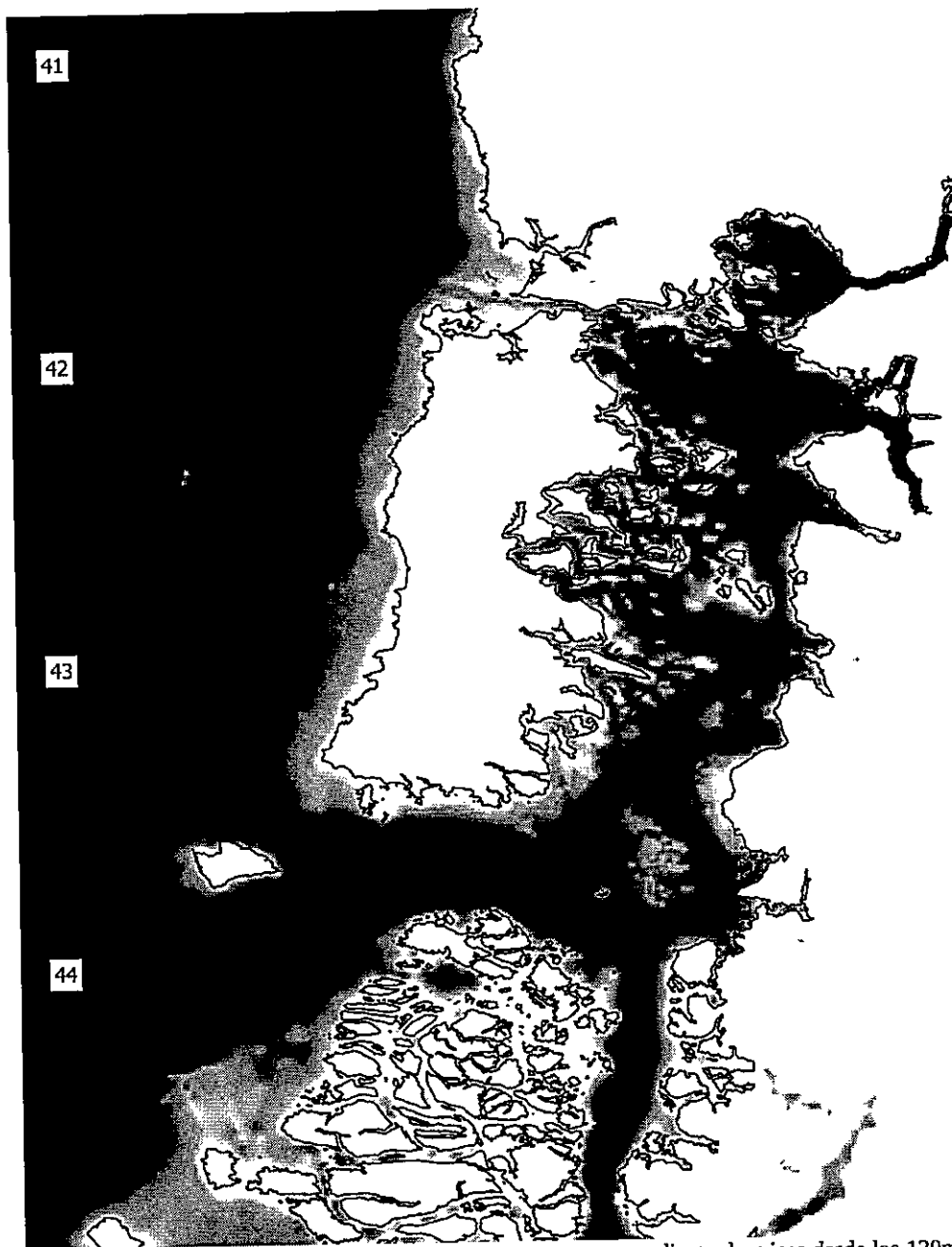


Figura 15. Puente de tierra en Canal de Chacao. Se muestra un gradiente de grises desde los 120m de profundidad actual del mar que corresponde al nivel del mar durante el UMG (en negro) hasta lo que actualmente es tierra firme (en blanco). Las líneas negras son el contorno de la costa actual. Datos obtenidos de GEBCO.

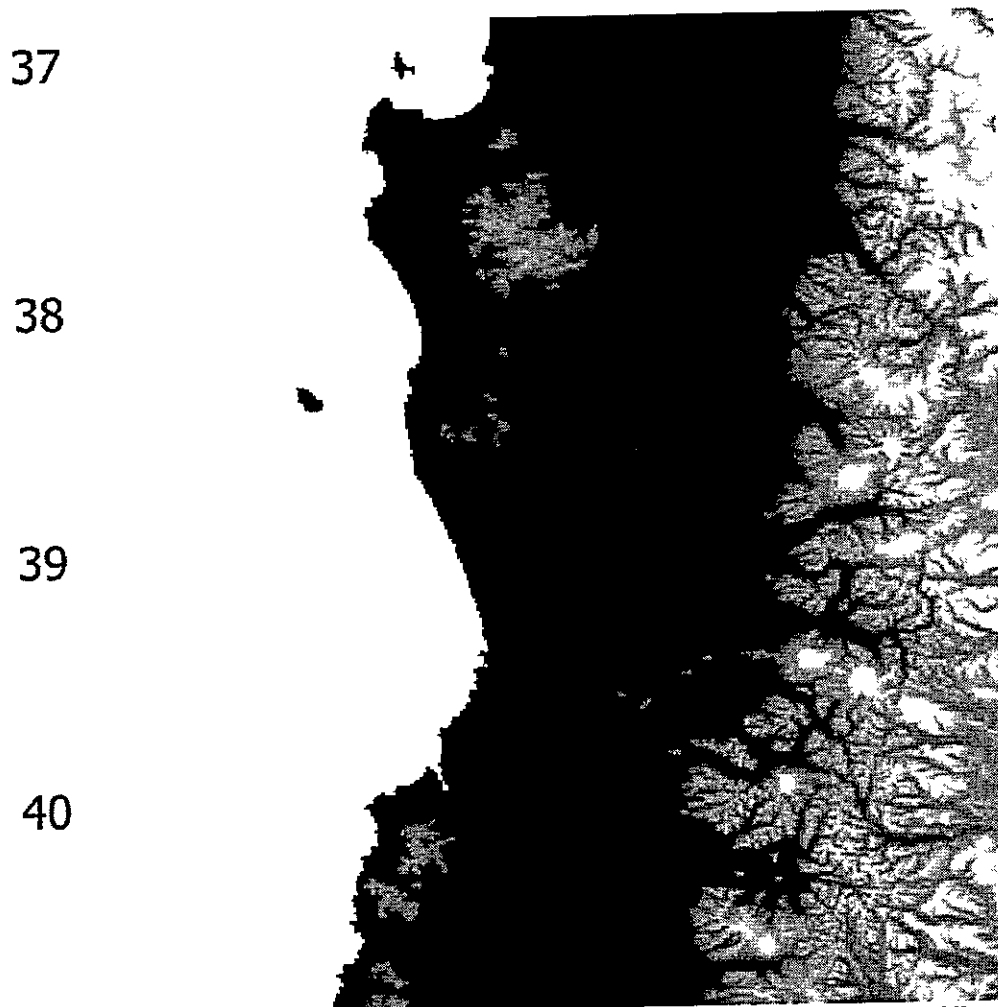


Figura 16. Mapa de altitud en que se aprecia la Cordillera de los Andes, incluyendo las cordilleras Nahuelbuta y Pelada, y la zona de menor altura entre ellas, aproximadamente a los 39°S. La escala de grises va de los 0 (en negro) hasta los 1800 (en blanco) m.s.n.m.

38

39

40

41

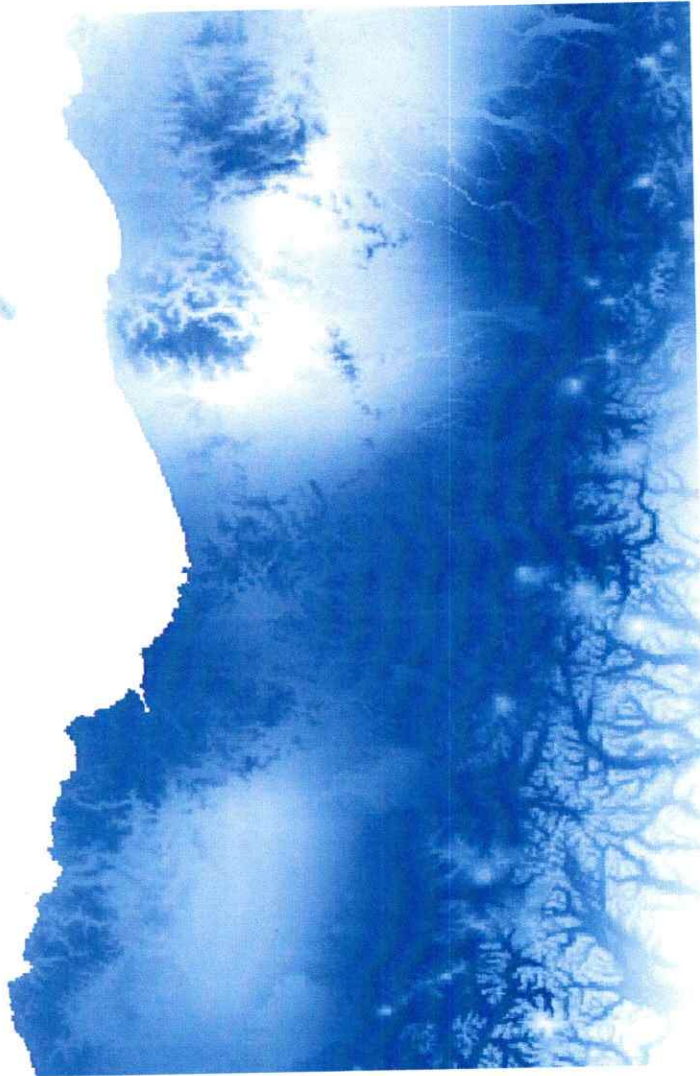


Figura 17. Mapa de precipitaciones anuales. Los azules más intensos indican mayores precipitaciones. La escala va de 1000 a 2700 mm/m.

Se había predicho concordancia entre marcadores de distinto modo de herencia dadas las características de dispersión del polen y las semillas (por insectos y viento, respectivamente). Como ya fue mencionado arriba, esta concordancia (en forma de un quiebre genético común y una correlación positiva entre índices de diferenciación) se encontró. A modo de comparación, en *Cardamine nipponica*, una especie herbácea con polen dispersado por insectos y semillas por gravedad, también

se encontró un patrón similar entre marcadores de distinto modo de herencia (Ikeda y col. 2008). En contraste, en coníferas pináceas (polen y semillas dispersados por viento; mitocondria de herencia paterna) se han encontrado marcadas diferencias entre el genoma mitocondrial y el cloroplastidial (e.g. Gamache y col. 2003, Liepelt y col. 2002). Esto sugiere que en especies con estas características de dispersión marcadores del genoma nuclear pueden trazar la historia de colonización por semilla al igual que los marcadores que trazan el linaje materno.

Es notable que el quiebre genético de los 40°S (quiebre Nahuelbuta-Pelada) también se da en *Weinmannia trichosperma* (Montenegro 2011) y *Dromiciops gliroides* (Himes y col. 2008). *W. trichosperma* es una especie arbórea que también pertenece al bosque nordpatgónico y tiene ciertas similitudes con *L. philippiana*: sus rangos de distribución actuales coinciden en gran medida y comparten algunos rasgos relevantes como su polinización entomofílica y dispersión anemócora. *D. gliroides* es un pequeño mamífero arborícola fuertemente asociado a los bosques. Cabe destacar que mientras *L. philippiana* y *W. trichosperma* presentan una zona de sutura en los Andes, en *D. gliroides* los haplogupos están separados a lo largo del rango longitudinal. Por otro lado, un quiebre genético a los 42-43°S aparece en las especies criófilas *Podocarpus nubigena*, *Nothofagus antarctica* y *Nothofagus pumilio* (Quiroga & Premoli 2010, Pastorino y col. 2009, Mathiasen & Premoli 2010). *N. pumilio* también presenta un quiebre a los 40°S, pero es mucho más débil que el quiebre sur. Esta concordancia filogeográfica posiblemente apunta a una historia común.

En conclusión, tal como se había predicho, se encontró el mismo quiebre genético que se había encontrado con los datos cloroplastidiales (quiebre Nahuelbuta-Pelada), además de una correlación entre los índices de diferenciación. Tal como se había supuesto era posible, además de lo anterior se pudo describir la estructuración genética de forma más fina, descubriendo un segundo quiebre genético menos pronunciado (quiebre Pelada-Chiloé). La clara estructuración poblacional de *L. philippiana*, la que se evidencia en marcadores con distintos modos de herencia, presenta similitudes notables con la de otras especies que comparten su hábitat. Esto hace probable que esta estructuración sea la consecuencia de una historia de aislamiento y diferenciación de las poblaciones en común entre estas especies. Además, el patrón de reducción de diversidad hacia mayores latitudes sugiere un efecto histórico, posiblemente ligado a los ciclos glaciales del pleistoceno, como puede ser un evento de extinción/recolonización o una disminución de los tamaños poblacionales dependiente de la latitud.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta MC & Premoli AC 2010 Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 235–242
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA & Saunders NC 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489–522
- Bandelt H, Forster P & Röhl A 1999 Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16(1): 37–48
- Bernatchez L & Wilson CC 1998 Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology* 7: 431–452
- Bialozyt R, Ziegenhagen B & Petit RJ 2006 Contrasting effects of long distance seed dispersal on genetic diversity during range expansion. *Journal of Evolutionary Biology* 19: 12–20
- Birky jr CW, Fuerst P & Maruyama T 1989 Organelle gene diversity under migration, mutation, and drift: equilibrium expectations, approach to equilibrium, effects of heteroplasmic cells, and comparison to nuclear genes. *Genetics* 103: 513–527
- Bosshard M 2011 Evidencias genéticas de la historia glacial de *Laureliopsis philippiana*. Tesis, Universidad de Chile, Santiago, Chile
- Denton GH, Lowell TV, Heusser CJ, Moreno PI, Andersen BG, Heusser LE y col. 1999 Interhemispheric linkage of paleoclimate during the last glaciation. *Geografiska Annaler* 81: 107–153
- Donoso C, Alarcón D, Donoso P, Escobar B & Zúñiga A 2006 *Laurelia* (= *Laureliopsis*) *philippiana* Looser. En: Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología (editado por C. Donoso Zegers), pp 302–313
- Dray S & Dufour AB 2007 The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software* 22(4): 1–20

Ersts PJ 2006 Geographic Distance Matrix Generator (version 1.2.3). American Museum of Natural History, Center for Biodiversity and Conservation. http://biodiversityinformatics.amnh.org/open_source/gdmg/, accesado enero 2016

Excoffier L, Smouse PE & Quattro JM 1992 Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes - application to human mitochondrial-DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491

Excoffier L & Lischer HEL 2010 Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567

Falush D, Stephens M & Pritchard JK 2003a Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587

Falush D, Wirth T, Linz B, Pritchard JK, Stephens M y col 2003b Traces of human migrations in *Helicobacter pylori* populations. *Science* 299:1582-1585

Grivet D, Heinze B, Vendramin GG & Petit RJ 2001 Genome walking with consensus primers: Application to the large single copy region of chloroplast DNA. *Molecular Ecology Notes* 1: 345-349

Hare MP 2001 Prospects for Nuclear Gene Phylogeography. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(12): 700-706

Heusser CJ, Heusser, LE & Lowell TV 1999 Paleoecology of the southern chilean lake district-isla grande de chiloe during middle-late llanquihue glaciation and deglaciation. *Geografiska Annaler Series a-Physical Geography* 81A: 231-284

Hewitt GM 2000 The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913

Hewitt GM 2001 Speciation, hybrid zones and phylogeography—or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549

Hewitt GM 2004 The structure of biodiversity – insights form molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1(4)

Himes CMT, Gallardo MH & Kenagy GJ 2008 Historical biogeography and post-glacial recolonization of South American temperate rain forest by the relictual marsupial *Dromiciops gliroides*. *Journal of Biogeography* 35: 1415-1424

Holderegger R & Thiel-Egenter C 2009 A discussion of different types of glacial refugia used in mountain biogeography and phylogeography. *Journal of Biogeography* 36: 476-480

Hollin JT & Schilling DH 1981 Late Wisconsin-Wichselian mountain glaciers and small ice caps. En: Denton JH & TJ Hughes (eds) *The last great ice sheets* 179-206.

Wiley, New York, New York.

Hubisz M, Falush D, Stephens M & Pritchard J 2009 Inferring weak population structure with the assistance of sample group information. *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1322–1332

Ibrahim KM, Nichols RA & Hewitt GM 1996 Spatial patterns of genetic variation generated by different forms of dispersal during range expansion. *Heredity* 77: 282–291

Ikeda HI, Senni K, Fujii N, Setoguchi H 2008 Consistent geographic structure among multiple nuclear sequences and cpDNA polymorphisms of *Cardamine nipponica* Franch. et Savat. (Brassicaceae). *Molecular Ecology* 17: 3178–3188

Kaplan MR, Moreno PI & Rojas M 2008 Glacial dynamics in southernmost South America during Marine Isotope Stage 5e to the Younger Dryas chron: a brief review with a focus on cosmogenic nuclide measurements. *Journal of Quaternary Science* 23: 649–658

Leberg PL 2002 Estimating allelic richness: Effects of sample size and bottlenecks. *Molecular Ecology* 11: 2445–2449

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

Marchelli P & Gallo L 2006 Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics* 7:591–603

Markgraf V 1995 Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems—a southern perspective. *TRENDS in Ecology and Evolution* 10: 143–147.

Mathiasen P & Premoli AC 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.

Meglécz E, Costedoat C, Dubut V, Gilles A, Malausa T, Pech N & Martin JF 2010 QDD: a user-friendly program to select microsatellite markers and design primers from large sequencing projects. *Bioinformatics* 26(3): 403–404

Montenegro P 2011 Filogeografía de *Weinmannia trichosperma* en su rango de distribución actual. Tesis de Magíster, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.

Moreno PI, Villagrán C, Marquet PA & Marshall LG 1994 Quaternary paleobiogeography of northern and central Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 67: 487–502.

- Moreno PI, Lowell TV, Jacobson GL & Denton GH 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
- Muñoz AA & González ME 2009 Patrones de regeneración arbórea en claros a una década de la floración y muerte masiva de *Chusquea quila* (Poaceae) en un remanente de bosque antiguo del valle central en el centro-sur de Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 185-198
- Nei M, Maruyama T & Chakraborty R 1975 The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10
- Nichols RA & Hewitt GM 1994 The genetic consequences of long distance dispersal during colonization. *Heredity* 72: 312-317
- Núñez-Ávila MC & Armesto JJ 2006 Relict islands of the temperate rainforest tree *Aextoxicon punctatum* (Aextoxicaceae) in semi-arid Chile: Genetic diversity and biogeographic history. *Australian Journal of Botany* 54: 733-743
- Paradis E, Claude J & Strimmer K 2004 APE: analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289-290
- Pastorino MJ, Marchelli P, Milleron M, Soliani C & Gallo LA 2009 The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus antarctica*. *Genetica* 136: 79-88
- Petit RJ, Duminil J, Fineschi S, Hampe S, Salvini D & Vendramin GG 2005 Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 14: 689-701
- Petit RJ, Aguinalde I, deBeaulieu JL, 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 JP, Rendell S & Vendramin GG 2003 Glacial refugia: Hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563-1565.
- Premoli AC, Kitzberger T & Veblen TT 2000 Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251-260
- Premoli AC, Souto CP, Rovere AE, Allnut TR & Newton AC 2002 Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Pilgerodendron uviferum* (d. Don) Florin. *Diversity and Distributions* 8: 57-66.
- Quiroga MP & Premoli AC 2010 Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 285: 186-193

- R Core Team 2013 R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Renner SS, Foreman DB & Murray DM 2000 Timing transantarctic disjunctions in the atherospermataceae (laurales): Evidence from coding and noncoding chloroplast sequences. *Systematic Biology* 49(3): 579–591
- Rohling EJ, Fenton M, Jorissen FJ, Bertrand P, Ganssen G & Caulet JP 1998 Magnitudes of sea-level lowstands of the past 500,000 years. *Nature* 394: 162–165
- Rojas M, Moreno PI, Kageyama M, Crucifix M, Hewitt C, Abe-Ouchi A, Ohgaito R, Brady E & Hope P 2008 The Southern Westerlies during the Last Glacial Maximum in PMIP2 simulations. *Climate Dynamics* 32: 525–548
- Rosenberg NA 2004 Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes* 4: 137–138
- Rousset F 2008 Genepop'007: a complete reimplemention of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8: 103–106
- Rull V 2009 Microrefugia. *Journal of Biogeography* 36: 481–484
- Sampson FB 1969 Studies on the Monimiaceae II. Floral morphology of *Laurelia novae-zelandiae* A. Cunn. (subfamily Atherospermoideae). *New Zealand Journal of Botany* 7: 214–40
- Segovia RA, Pérez MF & Hinojosa LF 2012 Genetic evidence for glacial refugia of the temperate tree *Eucryphia cordifolia* (Cunoniaceae) in southern South America. *American Journal of Botany* 99(1): 121–129
- Sepúlveda CA & Troncoso AA 2004 Hallazgo de *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) en el área costera de la Región del Maule, Chile central. *Gayana Bot.* 61(1): 42–44
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE & Small RL 2007 Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The tortoise and the hare iii. *American Journal of Botany* 94: 275–288
- Souto CP & Premoli AC 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
- Stewart JR & Lister AM 2001 Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *TRENDS in Ecology & Evolution* 16(11): 608–613
- Stewart JR, Lister AM, Barnes I & Dalén L 2010 Refugia revisited: individualistic

responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B* 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 Molecular Biology* 17: 1105-1109

Veblen TT & Schlegel FM 1982 *Reseña Ecológica de los bosques del sur de Chile*. *Bosque* (4) 2: 73 - 115

Vidal MA, Moreno PI & Poulin E 2012 Genetic diversity and insular colonization of *Liolaemus pictus* (Squamata, Liolaeminae) in north-western Patagonia. *Austral Ecology* 37: 67-77

Vidal-Russell R, Souto CP & Premoli AC 2011 Multiple Pleistocene refugia in the widespread Patagonian tree *Embothrium coccineum* (Proteaceae). *Australian Journal of Botany* 59(4): 299-314

Villagrán C 1991 History of the temperate forests of southern Chile during the late-glacial and holocene. *Revista Chilena de Historia Natural* 64: 447-460

Villagrán C 2001 A model for the history of vegetation of the coastal range of central-southern Chile: Darwin's glacial hypothesis. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 793-803

Villagrán C & Hinojosa LF 1997 History of the forests of southern South America 2. Phytogeographical analysis. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 241-267

Villagran C & Armesto JJ 2005 *Fitogeografía histórica de la Cordillera de la Costa de Chile* En: *Biodiversidad y ecología de los bosques de la Cordillera de la Costa de Chile* Smith C, Armesto JJ & Valdovinos C (eds.) pp. 99-116. Editorial Universitaria, Santiago.

Webb T & Bartlein PJ 1992 Global changes during the last 3 million years: Climatic Controls and Biotic Responses. *Annual Reviews of Ecology and Systematics* 23: 141-173

APÉNDICE 1

Script R para obtener índices de diversidad a partir de poblaciones remuestreadas.

```
allelic.richness <- function(x,motif)length(unique(x))
allelic.range <- function(x,motif)(range(x)[2]-range(x)[1])/motif
He <- function(x,motif){
  props <- vector("numeric",0)
  for (i in unique(x))props<-cbind(props,sum(x==i)/length(x))
  1-sum(props^2)
}

resample.ms.div <- function(x, popsizes, ploidy, motifs, iterations=10000, fn=allelic.richness, popnames=NULL,
  min.size=8, resampling.size=min.size, miss="?"){
  loci<-ncol(x)
  pops<-length(popsizes)
  alleles<-list()
  for (i in 1:loci)alleles[[i]]<-list()
  for (pop in 1:pops){
    for (locus in 1:loci){
      tmp<-sum(popsizes[0:(pop-1)])*ploidy
      tmp2<-as.vector(x[(tmp+1):(tmp+popsizes[pop]*ploidy),locus])
      alleles[[locus]][[pop]]<-as.numeric(tmp2[tmp2!=miss])
    }
  }

  final.table <- matrix(nrow=pops, ncol=loci)
  for (locus in 1:loci){
    for (pop in 1:pops){
      res <- vector("numeric",iterations)
      tmp <- alleles[[locus]][[pop]]
      if(length(tmp)<min.size*ploidy)final.table[pop,locus]<- NA
      else{
        for (it in 1:iterations)res[it] <- fn(sample(tmp, resampling.size, T), motifs[locus])
        final.table[pop,locus] <- mean(res)
      }
      cat(paste("Locus ",locus," Pop ",pop,"n"))
    }
  }

  means <-matrix(nrow=pops)
  for (pop in 1:pops)means[pop]<-mean(final.table[pop,],na.rm=T)
  if(!is.null(popnames))rownames(final.table)<-popnames
  cbind(final.table,means)
}
```

APÉNDICE 2

Localidad	n	H1	H2	H3	S	K	H	π	Π
1 Nahuelbuta*	20	20	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
2 Las Ñochas	10	10	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
3 Rucamanque	10	10	0	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
4 Puerto Fuy	9	8	1	0	1	2	0.2222	0.0003	0.2222
5 Caunahue	10	6	4	0	1	2	0.5333	0.0008	0.5333
6 Puyehue	10	2	8	0	1	2	0.3556	0.0005	0.3556
7 Pelada Oeste	20	0	20	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
8 Liucura	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
9 Bahía Mansa	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
10 Lolcura	8	0	8	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
11 Manao	10	0	9	1	1	2	0.2000	0.0003	0.2000
12 Chiloé Sur	9	0	9	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
13 Pumalín	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
14 Palena	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
15 Queulat	10	0	7	3	1	2	0.4667	0.0007	0.4667
16 Aiken	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
17 Exploradores	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.0000	0.0000
Promedio					0	1	0.1046	0.0001	0.1046
Total	186	56	126	4	2	3	0.2335	0.0007	0.4670

Número de individuos muestreados (n), frecuencias de los haplotipos (H1, H2, H3), número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias entre secuencias (Π) para datos cloroplastidiales, por población.

APÉNDICE 3

1	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
2	0	0	0	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
3	0.0284	0.02084	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
4	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
5	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
6	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
7	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
8	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
9	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
10	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
11	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
12	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
13	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
14	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
15	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
16	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837
17	0.06661	0.01235	0.01235	0.09921	0.20535	0.21559	0.00685	0.02074	0.02706	0.02974	0.02611	0.00326	0.00326	0.00445	-0.01217	0.00145	0.00442	-0.01072	0.10882	0.03482	0.00324	0.00315	0.03482	0.0277	-0.02078	0.06998	0.13837

Fst de a pares entre localidades de muestreo. Bajo la diagonal se muestran los datos para cloroplasto, sobre la diagonal para microsatélites. Los resultados significativos ($p < 0.05$) en negrita. Los sitios están numerados como en la tabla 2.