

JCH-FC
MAG-B
A 385
C. 1

**FILOGEOGRAFÍA DE *Cratomelus armatus*
(ORTHOPTERA: ANOSTOSTOMATIDAE) Y SU
RELACIÓN CON EL ÚLTIMO MÁXIMO GLACIAL**

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

Fermín Mauricio Alfaro Kong

Octubre, 2015

Director de Tesis:
Dr. Marco Méndez

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

FERMÍN MAURICIO ALFARO KONG

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 26 de junio de 2015.

Director de Tesis:

Dr. Marco Méndez

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. David Véliz

Dr. Elie Poulin

.....
.....
.....



*“La imaginación frecuentemente nos llevará a mundos que jamás fueron. Pero sin ella,
no iremos a ningún lado”*

Carl Sagan



RESUMEN BIOGRÁFICO

Nací en Vallenar el 21 de agosto de 1986, ciudad en la cual realicé mis estudios secundarios. En el año 2006 ingresé a la Universidad de La Serena en donde posteriormente obtuve el título de Ingeniero Agrónomo. Durante mis estudios de pregrado me vinculé activamente con el Laboratorio de Entomología Ecológica del Departamento de Biología de la Universidad de La Serena (LEULS), laboratorio en el cual participé como asistente de investigación en diversos proyectos relacionados al estudio de la ecología, biogeografía y conservación de artrópodos de zonas áridas y semiáridas del norte de Chile. Producto de esta vinculación fui autor y coautor en diversas publicaciones de estas temáticas. En el año 2013 gracias al Programa de Becas de Magister Nacional de CONICYT (Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica) ingresé al programa de Magíster en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, desarrollando mi tesis de posgrado en el Laboratorio de Genética y Evolución (GEVOL).

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer sinceramente al profesor Marco Méndez por permitir la realización de mi tesis en su laboratorio y por su constante apoyo y confianza depositados en mi.

A mis padres Patricia y Fermín y mis hermanas Patricia y Berta por su incondicional apoyo durante mi etapa de formación.

A Álvaro Zuñiga por su valioso apoyo en trabajo de terreno y análisis de datos.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética y Evolución: Álvaro Zuñiga, Luis Pastenes, Pamela Morales, Paola Sáez, Franco Cruz, Moisés Valladares, Camilo Valdivieso, Carolina Gallardo y Hugo Salinas.

A los profesores David Véliz y Elie Poulin por las valiosas sugerencias realizadas a este trabajo de tesis.

A Carlos Muñoz (University of Michigan, USA), Steve Trewick (Massey University, New Zealand), Jaime Pizarro (Universidad de La Serena), Mario Elgueta (Museo Nacional de Historia Natural, Chile), Einer Sepúlveda y Dusan Boric por entregar importantes datos a este trabajo.

Finalmente agradezco a la beca CONICYT-PCHA/Magíster Nacional/2013-22130123.

ÍNDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Muestreo de individuos	9
Extracción, amplificación y secuenciación de DNA	13
Análisis filogenético, diversidad genética y estructura poblacional.....	14
Análisis demográfico.....	16
RESULTADOS	19
Variación y estructura genética.....	19
Análisis demográfico de las poblaciones de <i>C. armatus</i> a lo largo de su distribución actual.....	31
DISCUSIÓN	37
CONCLUSIONES.....	41
BIBLIOGRAFÍA	42

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Localidades de muestreo y número de individuos (N) de <i>C. armatus</i> utilizados en el estudio.	10
Tabla 2. Haplotipos obtenidos a partir del gen mitocondrial COI para <i>C. armatus</i> . Localidades están indicadas en Tabla 1. Colores de localidades (códigos) indican cuencas de origen (ver Figura 1).	20
Tabla 3. Valores de diversidad genética para las cuencas (a partir de localidades) de <i>C. armatus</i> basados en DNA mitocondrial. N: número de secuencias; K: número de haplotipos; H: diversidad haplotípica; Pi: diversidad nucleotídica; Π : número promedio de diferencias entre dos secuencias; DE: desviación estándar.	24
Tabla 4. Valores F_{ST} pareados para las cuencas analizadas en el estudio. *Valores F_{ST} pareados significativos, $p \leq 0,05$. Cuencas (1: Río Bio-Bio; 2: Nahuelbuta; 3: Tolten-Imperial; 4: Tolten-Valdivia; 5: Cuenca costera; 6: Río Bueno; 7: Chiloé; 8: Puelo-Yelcho).	29
Tabla 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) a partir de las localidades de <i>C. armatus</i> . GL: grados de libertad; F_{sc} : entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST} : entre poblaciones; F_{CT} : entre grupos.	30
Tabla 6. Pruebas de neutralidad D de Tajima y F_s de Fu para los principales haplogrupos de <i>C. armatus</i> obtenidos a partir del análisis filogenético y de red de haplotipos. Pi: diversidad nucleotídica; Theta/sitio: theta por sitio.....	33
Tabla 7. Parámetros de la distribución mismatch para los principales haplogrupos de <i>C. armatus</i> obtenidos a partir del análisis filogenético y de red de haplotipos.	34

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Localidades de muestreo de *C. armatus* utilizadas en el estudio. Los números representan la identificación de las localidades (Tabla 1). El área sombreada muestra la extensión de la capa de hielo durante el UMG (Clapperton 1993). 12
- Figura 2. Árbol filogenético de haplotipos obtenido a partir del método de inferencia bayesiana basado en DNA mitocondrial. Números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior. Números frente a las ramas terminales representan las localidades de muestreo. Colores de los números de las localidades de muestreo representan las cuencas de origen como en Tabla 1 y Figura 1. 23
- Figura 3. Red de haplotipos de *C. armatus* obtenida mediante el método median joining y distribución geográfica de los haplotipos. Círculos negros representan haplotipos inferidos por el programa. Números representan los haplotipos como en Tabla 2. El área sombreada muestra la extensión de la capa de hielo durante el UMG (Clapperton 1993). 26
- Figura 4. Análisis espacial bayesiano GENELAND para la distribución de *C. armatus*. A: grupo 1; B: grupo 2; C: grupo 3. Las isoclinas de probabilidad posterior muestran la distribución espacial de los grupos genéticos encontrados. Los puntos negros representan las localidades analizadas. Regiones con mayor probabilidad de inclusión se indican en blanco. 28
- Figura 5. Distribución mismatch observada y esperada bajo un modelo de expansión poblacional para los linajes inferidos por el análisis filogenético y de red de haplotipos. 35
- Figura 6. Skyline Plot Bayesiano (BSP) para los linajes inferidos por el análisis filogenético y de red de haplotipos. La línea negra representa la media. El área sombreada representa el intervalo con 95% de densidad posterior. 36

RESUMEN

Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, y en particular los eventos glaciales, han afectado la diversidad genética y la historia evolutiva de la biota en los hemisferios Norte y Sur. Estos drásticos eventos provocaron la migración y reducción de las poblacionales con la posterior recolonización y expansión tras el retroceso de los glaciares. En el presente estudio se evaluó las consecuencias de las glaciaciones del Pleistoceno sobre la variación, estructura genética y la historia demográfica del grillo rojo *Cratomelus armatus*. Se analizaron secuencias del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I de 187 ejemplares pertenecientes a 39 localidades, abarcando la mayor parte de la distribución de esta especie. Los datos fueron analizados mediante aproximación filogenética, red de haplotipos, análisis de estructura poblacional bayesiana y análisis demográficos. Tanto el análisis filogenético y de red de haplotipos mostraron linajes congruentes a lo largo de la distribución de *C. armatus*. La red de haplotipos mostró haplogrupos diferenciados entre sí por uno a cuatro pasos mutacionales, lo que sugiere una baja divergencia genética entre éstos. El AMOVA entre cuencas mostró una mayor varianza genética dentro de las poblaciones (54,99%) que entre grupos (23,84%), mientras que el análisis espacial bayesiano GENELAND mostró tres grupos genéticos con bajos valores de probabilidad posterior. Se observaron valores altos de diversidad haplotípica, pero bajos valores de diversidad nucleotídica, lo que sugiere que existiría una diferenciación genética reciente con un rápido crecimiento de las

poblaciones. Tanto las pruebas de neutralidad como la distribución de diferencias pareadas sugieren signos de expansión demográfica para todos los haplogrupos analizados. La baja estructura genética encontrada estaría relacionada con aspectos ecológicos de esta especie, tales como su alta vagilidad y amplio rango distribucional.

SUMMARY

Pleistocene climatic oscillations, particularly glacial events have affected the genetic diversity and evolutionary history of biota in the Northern and Southern hemispheres. These dramatic events led to the migration of population reduction with subsequent recolonization and expansion after the retreat of glaciers. The consequences of Pleistocene glaciations on the variation, genetic structure and demographic history of red cricket *Cratomelus armatus* were assessed. Sequences of the mtDNA Cytochrome Oxidase I of 187 individuals and 39 localities along the species range were analyzed. Aligned sequences were analyzed using phylogenetic approach, haplotype network, Bayesian population structure and demographic analysis. The phylogenetic analysis and haplotype network revealed consistent lineages along distribution of *C. armatus*. The haplotype network showed haplogrupos separated by few mutational steps, which suggest a genetic differentiation between them. The AMOVA between watersheds showed that the genetic variance was greater within populations (54,99%) than among groups (23,84%), while the spatial analysis Bayesian GENELAND showed three genetic groups with low values of posterior probability. High values of haplotype diversity but low values of nucleotide diversity were observed, which suggest a recent genetic differentiation with rapid population growth. The neutrality tests and the distribution of pairwise differences suggest signs of demographic expansion for all haplogroups analyzed. The low genetic structure found would be related to ecological

aspects, such as high vagility and large home range of this species.

INTRODUCCIÓN

Los ciclos glaciales del Cuaternario han afectado el rango distribucional de un gran número de especies y sus efectos han sido estudiados desde el punto de vista de la filogeografía con el objetivo de analizar la distribución espacial de linajes genéticos (Avice y col. 1987; Avice 2000; Hewitt 2004a). Bajo este escenario las oscilaciones climáticas del Pleistoceno, y en particular los eventos glaciales, tuvieron importantes consecuencias sobre la diversidad genética y la historia evolutiva de los taxa (Avice 2000; Hewitt 2000, 2004b). Los ciclos glaciales, asociados a la latitud y topografía de las regiones afectadas (Hewitt 2004b), provocaron la migración y reducción de las poblacionales y la posterior recolonización y expansión tras el retroceso de los glaciares (Hewitt 1999, 2000, 2004b). El establecimiento de los glaciares produjo contracciones y fragmentación de las poblaciones en aquellos hábitats libres de hielo, lo que trajo como consecuencia la formación de zonas geográficas aisladas con condiciones ambientales estables; lo provocó que las poblaciones se mantuvieran distribuidas de forma alopátrica y aisladas entre sí (Hewitt 2000, 2004b). Producto de este aislamiento se esperaba encontrar distintos linajes y poblaciones estructuradas (Avice 2000). Los impactos de los ciclos glaciales sobre los patrones distribucionales de la biota han sido bastante estudiados para el Hemisferio Norte, en particular Europa y Norteamérica (Hewitt 1996, 2000, 2004b), sin embargo para el sur de Sudamérica los estudios han

aumentado sólo en los últimos años (Villagrán y Hinojosa 1997; Villagrán y Hinojosa 2005; Beheregaray 2008; Himes y col. 2008; Sérsic y col. 2011; Segovia y col. 2012; Vera-Escalona y col. 2012; Vidal y col. 2012; Marín y col. 2013).

Durante los períodos glaciales en el Hemisferio Sur los vientos provenientes del oeste alcanzaron altas latitudes (45-50°S) y ocasionaron una disminución de las temperaturas estimadas en 6-8°C y un aumento de la humedad; condiciones que permitieron el establecimiento de importantes glaciares en los Andes y el sur de Sudamérica (Hubbard 1997; Heusser y col. 1999; Denton y col. 1999; Clark y col. 2012). En la actualidad existe evidencia glaciológica, geomorfológica, paleohidrológica y edafológica que da cuenta del importante avance de los glaciares en el sur de Chile (Clapperton 1990, 1991; Glasser y col. 2008; Harrison y Glasser 2011; García 2012). El máximo avance de glaciares y depresión de las temperaturas durante el Pleistoceno en el sur de Chile se produjo hace 20.000-18.000 años, etapa que se desarrolló al mismo tiempo que en el Hemisferio Norte (Clapperton 1990, 1991). Dentro de este período de cambio climático el Último Máximo Glacial (UMG, 26.000-13.000 años atrás) constituye la fase de máxima extensión de las capas de hielo, las que abarcaron desde los 56°S hasta los 35°S a lo largo de la Cordillera de los Andes y en torno a los 41°S en áreas bajas y a nivel del mar en América del Sur (Clapperton 1993; McCulloch y col. 2000). Durante este período los glaciares

cubrieron un área continua desde la Patagonia hacia el noroeste y el sur de Isla de Chiloé formando un gran campo de hielo continental (Heusser 2003; Harrison y Glasser 2011; García 2012).

A la fecha, una serie de antecedentes dan cuenta de la importancia de estos eventos glaciales sobre la actual distribución de los bosques del sur de Chile (Villagrán y Hinojosa 1997; Villagrán y Hinojosa 2005). De acuerdo a antecedentes geológicos y glaciológicos se estima que aproximadamente dos tercios de la actual superficie de los bosques al sur de los 43°S y en los Andes de la Región de Los Lagos fue afectada por los glaciares durante el UMG (Holling y Schilling 1981; Denton y col. 1999). Sin embargo, para la zona litoral y áreas con altitudes intermedias como la Cordillera de Nahuelbuta (38°S) y Cordillera Pelada (39°S) se ha registrado una mayor estabilidad del sustrato y la vegetación en función de la ausencia de huellas de actividad periglacial (Veit y Garleff 1995). De acuerdo a Villagrán (1991, 1995), en base del registro polínico se han propuesto distintas áreas de refugios bióticos para los bosques templados lluviosos de Chile centro-sur; entre ellas la depresión intermedia del centro-sur de Chile en la Región de Los Lagos y en el norte de Isla de Chiloé (35-42°S), la costa de la Región de Los Lagos (40-42°S), la Cordillera de la Costa de la Región de Los Lagos (36-40°S) y el litoral y faldeos costeros de Chile Central (35-30°S). De estas áreas, zonas importantes de refugio reconocidas dentro del continente corresponden a la Cordillera de Nahuelbuta

(38°S) y Cordillera Pelada (39°S), así como también áreas intermedias entre montañas bajas (Villagrán, 1985; Villagrán y col. 1996; Victoriano y col. 2008). Considerando los efectos físicos y climáticos del UMG, la existencia de estas áreas de refugio, con condiciones ambientales más favorables, permitió por una parte la sobrevivencia de diversas especies del bosque templado-lluvioso y por otra parte la fragmentación de su distribución, lo que actualmente se expresa en las diferencias genéticas observadas entre poblaciones de especies leñosas con distribuciones restringidas en el sur de Sudamérica (Allnutt y col. 1999; 2001; Premoli y col. 2000).

Los efectos de las glaciaciones sobre la diversidad genética han sido estudiados en diversos taxa; entre ellos los mamíferos (Himes y col. 2008; Marín y col. 2013; Palma y col. 2012; Rodríguez-Serrano y col. 2006; Rodríguez-Serrano 2011; Vianna y col. 2011), reptiles (Vera-Escalona y col. 2012; Vidal y col. 2012), peces (Unmack y col. 2009; Muñoz-Ramírez y col. 2014) y anfibios (Nuñez y col. 2011; Vásquez y col. 2013). Desde el punto de vista de la variabilidad genética y de acuerdo a la teoría neutral desarrollada por Nei (1973) y Nei y col. (1975), se esperaba observar una pérdida de diversidad genética en las nuevas áreas colonizadas tras el retiro de los glaciares y una mayor diversidad en áreas no afectadas por los procesos de glaciación. Para el roedor *Oligoryzomys longicaudatus* Palma y col. (2012) encontraron áreas con alta diversidad haplotípica que sugieren la existencia de zonas de refugios en la

costa y la depresión central de Chile (39-40°S) a partir de las cuales los individuos se dispersaron rápidamente hacia el norte y sur de estas latitudes tras el retroceso de los glaciares. Otros autores encontraron una alta estructuración en poblaciones de *Lontra provocax* a lo largo de su distribución en áreas afectadas y no afectadas por glaciares durante el UMG (Vianna y col. 2011). En términos demográficos algunos autores han observado fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional de ciertas especies bajo el escenario de los eventos glaciares (Marín y col. 2013; Vera-Escalona y col. 2012), mientras que en otros taxa no existen signos de expansión demográfica postglacial (Breitman y col. 2012).

En el presente trabajo se utiliza como modelo de estudio el grillo rojo *Cratomelus armatus* Blanchard (Orthoptera: Anostomatidae). *Cratomelus* Blanchard es un género endémico de Chile y está formado por tres especies; éstas son *C. armatus*, *C. integer* Ander y *C. meritus* Gorochov, las que se distribuyen desde Valparaíso (32°S) a Aysén (45°S). La especie *C. armatus* presenta la mayor distribución que abarca la franja comprendida entre los 34-45°S y ocupa tanto ambientes costeros como precordillera (Alfaro y col. 2015; Elgueta y col. 1999; Eades y col. 2015). Esta especie es abundante en suelos húmedos bajo troncos y material en descomposición y forma parte de la dieta de algunos carnívoros (Sade y col. 2012; Zuñiga y col. 2008). Tomando en consideración los antecedentes de este modelo de estudio, el presente trabajo

estudia las consecuencias de las glaciaciones del Pleistoceno, en particular del UMG, sobre la historia demográfica y la estructura filogeográfica en diferentes poblaciones del grillo rojo *C. armatus* en base al análisis de DNA mitocondrial. Tomando en cuenta que la distribución actual de esta especie abarca áreas afectadas y no afectadas por los glaciares durante el UMG, se analiza la estructura genética y la historia demográfica de las poblaciones bajo el escenario de los eventos glaciales del Pleistoceno.

HIPÓTESIS

Dado que las glaciaciones provocaron la contracción y expansión de las poblaciones luego del retiro de los glaciares con consecuencias sobre la diversidad genética y la historia demográfica de los diferentes taxa, las hipótesis propuestas en el presente trabajo son:

1) Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno provocaron una contracción en las poblaciones de *C. armatus*, lo que se reflejará en áreas de mayor (libres de hielo) y menor diversidad genética (afectadas por el hielo) a lo largo de la distribución de *C. armatus*.

2) La historia demográfica de *C. armatus* fue afectada por las oscilaciones climáticas durante el Pleistoceno, lo que se reflejará en fluctuaciones en el tamaño poblacional efectivo de la especie.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar las consecuencias del Pleistoceno sobre la estructura genética e historia demográfica de las poblaciones de *C. armatus* a lo largo de su distribución actual.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Analizar la variación y estructura genética en poblaciones de *C. armatus* a lo largo de su distribución actual.
- 2) Analizar la historia demográfica en poblaciones de *C. armatus* y su relación con las glaciaciones del Pleistoceno.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo de individuos

Se analizaron 187 individuos de *C. armatus* a partir de 39 localidades tanto en ambientes costeros como de precordillera (Tabla 1). Los muestreos se realizaron a lo largo de la distribución actual conocida para esta especie y que comprende el tramo entre la Provincia Cardenal Caro (O'Higgins, 34°S) y la Provincia de Aysén (Aysén, 45°S) (Figura 1).

Los ejemplares recolectados fueron fijados y conservados en etanol 99% hasta el momento de la extracción de DNA. Cada uno de los ejemplares fueron identificados de acuerdo a los caracteres diagnósticos propuestos por Gorochoy (1999), tales como la forma de los ganchos paraproctales, presencia de procesos en los tergitos abdominales 7 y 8 del macho y la forma de la placa genital del macho.

Tabla 1. Localidades de muestreo y número de individuos (N) de *C. armatus* utilizados en el estudio.

Sitio	Localidad	N	Cuenca	Región	Latitud	Longitud
1	Coihueco 1	1	Río Bio-Bio	Bio-Bio	36°37'40"	71°50'9"
2	Coihueco 2	1	Río Bio-Bio	Bio-Bio	36°38'42,27"	71°48'28,75"
3	Talcahuano	1	Río Bio-Bio	Bio-Bio	36°43'49,37"	73°6'52,31"
4	Coyanco (COY)	3	Río Bio-Bio	Bio-Bio	36°44'46,0"	72°31'12,8"
5	Hualpén (HUA)	3	Río Bio-Bio	Bio-Bio	36°47'47,5"	73°09'14,8"
6	Laguna Pineda (LAG)	12	Río Bio-Bio	Bio-Bio	36°49'40,5"	72°55'34,0"
7	Coronel (COR)	2	Río Bio-Bio	Bio-Bio	37°00'35,08"	73°07'51,42"
8	Parque Nacional Nahuelbuta (NAH)	10	Nahuelbuta	Araucanía	37°48'59,2"	72°56'34,6"
9	Vegas Blancas (VEG)	6	Nahuelbuta	Araucanía	37°49'20,1"	72°44'19,3"
10	Cerro Nielol (NIE)	7	Tolten-Imperial	Araucanía	38°43'37,67"	72°35'31,56"
11	Teodoro Schmidt (TSC)	2	Tolten-Imperial	Araucanía	38°59'58,2"	73°05'26,7"
12	El Álamo (ALA)	3	Tolten-Imperial	Araucanía	39°00'08,3"	72°52'58,6"
13	Vilcún (VIL)	1	Tolten-Valdivia	Araucanía	38°52'1,81"	71°53'47,58"
14	Huerquehue (HUE)	1	Tolten-Valdivia	Araucanía	39°08'19"	71°39'59"
15	Lican Ray (LIC)	4	Tolten-Valdivia	Araucanía	39°29'47,15"	72°09'32"
16	Fundo Santa Olga (FSO)	5	Tolten-Valdivia	Los Ríos	39°44'49,06"	72°40'24,60"
17	Neltume (NEL)	10	Tolten-Valdivia	Los Ríos	39°51'03,8"	71°55'32,1"
18	Reserva Nacional Mocho Choshuenco (MOC)	7	Tolten-Valdivia	Los Ríos	39°54'49,75"	72°8'45,89"
19	Parque Oncol (PON)	1	Cuenca costera	Los Ríos	39°42'30,62"	73°19'53,73"
20	Valdivia (VAL)	5	Cuenca costera	Los Ríos	39°48'49,74"	73°11'36,65"
21	La Unión (LUN)	8	Cuenca costera	Los Ríos	40°10'26,47"	73°28'11,52"
22	Camino Parque Nacional Alerce Costero (CAC)	6	Cuenca costera	Los Ríos	40°12'42,8"	73°23'25,8"
23	San Juan de la Costa (SJC)	7	Cuenca costera	Los Lagos	40°15'41,8"	73°20'22,0"
24	Parque Nacional Puyehue 1 (PUY1)	2	Río Bueno	Los Lagos	40°40'03,1"	72°10'19,4"

Tabla 1 (continuación). Localidades de muestreo y número de individuos (N) de *C. armatus* utilizados en el estudio.

Sitio	Localidad	N	Cuenca	Región	Latitud	Longitud
25	Parque Nacional Puyehue 2 (PUY2)	11	Río Bueno	Los Lagos	40°44'12,88"	72°18'11,05"
26	Puerto Octay (OCT)	6	Río Bueno	Los Lagos	40°55'41,5"	72°52'18,5"
27	Puente Las Cascadas (PLC)	10	Río Bueno	Los Lagos	41°5'5,96"	72°38'4,96"
28	Volcán Osorno (CVO)	5	Río Bueno	Los Lagos	41°10'28,42"	72°30'54,83"
29	Punta Larga (PLA)	4	Río Bueno	Los Lagos	41°11'14,5"	72°58'57,2"
30	Parque Katalapi (KAT)	3	Río Bueno	Los Lagos	41°31'12"	72°45'02"
31	Chiloé 4 (CHI4)	1	Chiloé	Los Lagos	41°52'18,45"	73°49'23,99"
32	Chiloé 2 (CHI2)	1	Chiloé	Los Lagos	42°7'9,08"	73°48'39,89"
33	Chiloé 1 (CHI1)	6	Chiloé	Los Lagos	42°25'1,93"	74°4'42,93"
34	Chiloé 3 (CHI3)	3	Chiloé	Los Lagos	42°38'23,34"	74°6'28,24"
35	Chiloé 5 (CHI5)	9	Chiloé	Los Lagos	42°38'35,40"	74°0'41,40"
36	Yaldad (YAL)	6	Chiloé	Los Lagos	43°5'33,61"	73°43'45,43"
37	Caleta Leptepú (LEP)	4	Puelo-Yelcho	Los Lagos	42°32'40,2"	72°31'19,0"
38	Chaitén (CHA)	4	Puelo-Yelcho	Los Lagos	42°54'47,3"	72°42'34,9"
39	El Amarillo (ELA)	6	Puelo-Yelcho	Los Lagos	42°59'55,34"	72°26'35,00"

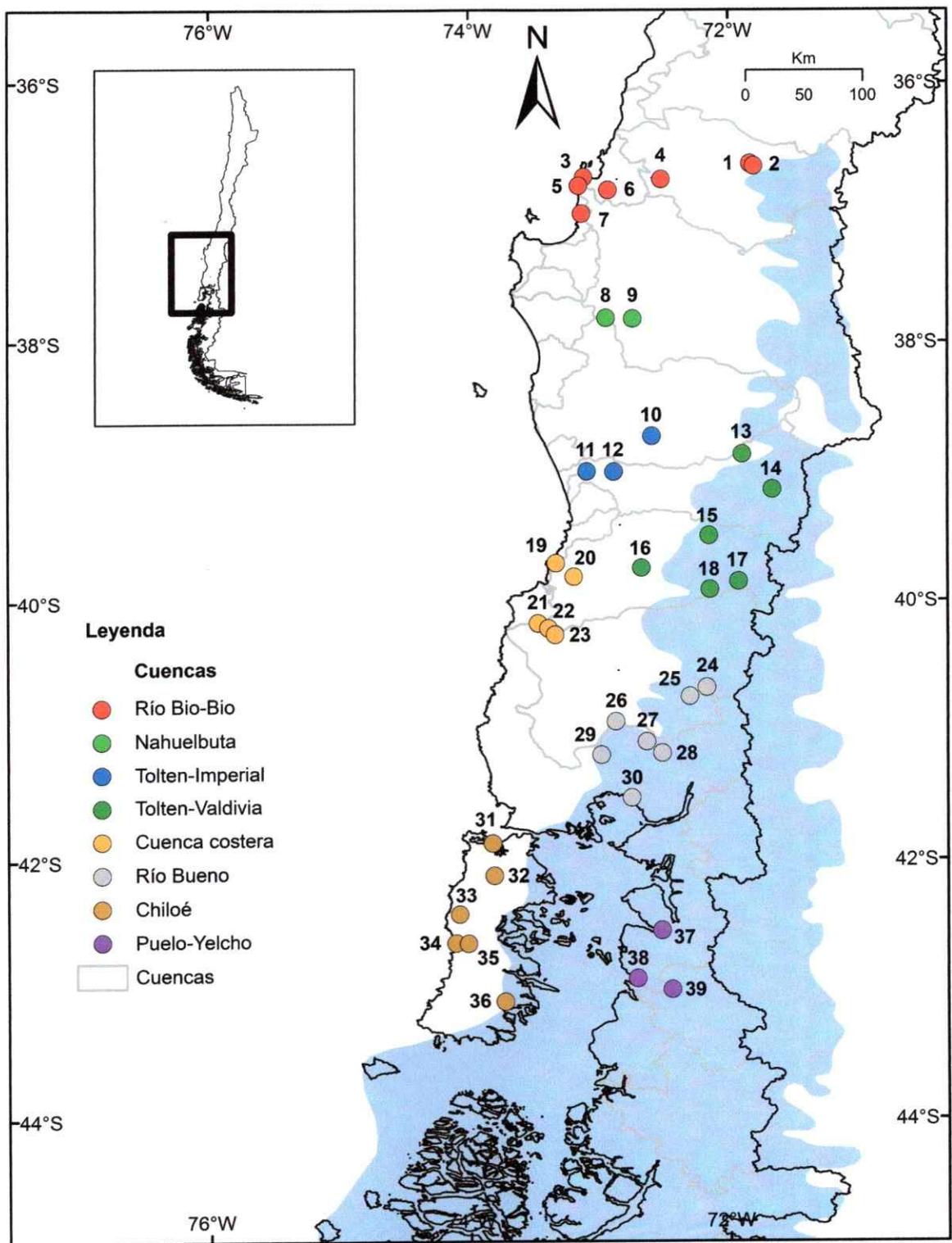


Figura 1. Localidades de muestreo de *C. armatus* utilizadas en el estudio. Los números representan la identificación de las localidades (Tabla 1). El área sombreada muestra la extensión de la capa de hielo durante el UMG (Clapperton 1993).

Extracción, amplificación y secuenciación de DNA

La extracción de DNA se realizó a partir de tejido muscular de la pata metatorácica de los individuos siguiendo lo propuesto por Jowett (1986). Para la extracción se siguió el Método de Sales. Se amplificaron secuencias parciales del gen mitocondrial Citocromo Oxidasa I (COI), utilizando los partidores universales 5' CAACATTTATTTTGATTTTTTGG 3' y 5' TCC AAT GCA CTA ATC TGC CAT ATT A 3' (Simon y col. 1994). La amplificación de DNA se llevó a cabo mediante la técnica PCR (Polymerase Chain Reaction). La mezcla de reacción incluyó 3 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada partidor, 1 U de Taq polimerasa (Invitrogen, Carlsbad, CA) y 50-100 ng de DNA total. El protocolo térmico para la reacción PCR fue: 94°C por 5 minutos, seguido de 36 ciclos de 94°C por 45 segundos, 45°C por 30 segundos y 72°C por 60 segundos, con una extensión final de 72°C por 2 minutos. Los productos PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 2% mediante comparación con DNA ladder de 100 pb (Invitrogen, Carlsbad, CA). Las muestras amplificadas fueron enviadas a Macrogen, Inc. (Seúl, Korea) para su purificación y secuenciación utilizando los mismos partidores descritos arriba. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas mediante el programa BIOEDIT v7.0.5.2 (Hall 1999).



Análisis filogenético, diversidad genética y estructura poblacional

Las relaciones filogenéticas de los haplotipos fueron reconstruidas mediante el método de Inferencia Bayesiana (IB) usando el programa Mr. Bayes v.3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Para obtener el modelo de sustitución nucleotídica más apropiado a los datos basado en el método BIC (Bayesian Information Criterion) se utilizó el programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). Los valores de probabilidad posterior se calcularon a partir de los árboles obtenidos mediante el algoritmo Markov Chain Monte Carlo (MCMC), utilizando los siguientes parámetros: número de generaciones=5.000.000; fracción descartada (burning)=0,25; frecuencia de muestreo=1000 y número de cadenas=4. El modelo utilizado en el análisis fue GTR+G.

La diversidad genética y estructura filogeográfica fue analizada considerando las cuencas delimitadas por ríos en la distribución de la especie. Se definieron 8 grupos; éstos fueron: (1) Coihueco 1 (COI1), Coihueco 2 (COI2), Talcahuano (THN), Coyanco (COY), Hualpén (HUA), Laguna Pineda (LAG) y Coronel (COR); (2) Parque Nacional Nahuelbuta (NAH) y Vegas Blancas (VEG); (3) Cerro Ñielol (ÑIE), Teodoro Schmidt (TSC) y El Álamo (ALA); (4) Vilcún (VIL), Huerquehue (HUE), Lican Ray (LIC), Fundo Santa Olga (FSO), Neltume (NEL) y Reserva Nacional Mocho Choshuenco (MOC); (5) Parque Oncol (PON), Valdivia (VAL), La Unión (LUN), Camino Parque Nacional Alerce Costero (CAC) y San Juan de la Costa (SJC); (6) Parque Nacional Puyehue 1 (PUY1), Parque Nacional Puyehue 2 (PUY2), Puerto Octay (OCT), Puente Las Cascadas (PLC),

Volcán Osorno (CVO), Punta Larga (PLA) y Parque Katalapi (KAT); (7) Chiloé 4 (CHI4), Chiloé 2 (CHI2), Chiloé 1 (CHI1), Chiloé 3 (CHI3), Chiloé 5 (CHI5) y Yaldad (YAL); (8) Caleta Leptepú (LEP), Chaitén (CHA) y El Amarillo (ELA). (Tabla 1).

La diversidad genética se estimó mediante los siguientes índices: 1) número de sitios polimórficos (S) que expresan la variabilidad dentro del análisis genético; 2) número de haplotipos (K) que expresa el número de alelos diferentes; 3) diversidad haplotípica (H_d) expresada como la probabilidad de encontrar dos haplotipos diferentes en la muestra; 4) diversidad nucleotídica (P_i) que expresa el número de diferencias nucleotídicas por sitio entre dos secuencias elegidas aleatoriamente; y 5) número promedio de diferencias entre dos secuencias (Π). Todos los índices se estimaron mediante el programa DnaSP v 5.10.01 (Librado y Rozas 2009).

Para evaluar el número de pasos mutacionales y las diferencias en el número de haplotipos se realizó un análisis network de haplotipos mediante el algoritmo median joining (Bandelt y col. 1999) en el programa PopArt v1.7.1 (Leigh y Bryant 2015).

Para analizar la estructura poblacional se realizó un análisis espacial bayesiano GENELAND v.1.0.7 (Guillot y col. 2005) mediante una extensión del programa R (Ihaka y Gentleman 1996). Este análisis permite localizar discontinuidades genéticas entre las poblaciones a partir de los datos genéticos de los individuos en un contexto espacial, con el fin de establecer el número más probable de

poblaciones (Garrido-Garduño y Vázquez-Domínguez 2013). El número más probable de unidades poblacionales (K) se determinó mediante simulación Monte Carlo de Cadenas de Markov (MCMC), con cinco corridas (1.000.000 de iteraciones en cada corrida) de $K=1$ a 20 y $burnin=10\%$. Para evaluar el grado de estructuración entre las cuencas se calcularon valores de F_{ST} pareados. La significancia estadística de los F_{ST} pareados se basó en 1.000 permutaciones con el programa Arlequín v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer 2010). Adicionalmente para evaluar la existencia de estructura entre las cuencas y los grupos inferidos por GENELAND se realizó un análisis de varianza molecular (AMOVA). La significancia estadística de los índices de fijación F_{SC} (entre poblaciones dentro de grupos), F_{ST} (entre poblaciones) y F_{CT} (entre grupos) se evaluó mediante 1.000 permutaciones mediante el programa Arlequín v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer 2010).

Análisis demográfico

Con la finalidad de analizar si las poblaciones han presentado cambios demográficos recientes se calcularon los índices D de Tajima y F_s de Fu (Tajima 1989; Fu 1997) sensibles a los cambios demográficos. Para evaluar la significancia estadística de estas pruebas se realizaron 1.000 simulaciones mediante el programa Arlequín v3.5.1.3 (Excoffier y Lischer 2010). Se utilizó el programa DnaSP 5.10.01 (Librado y Rozas, 2009), para inferir posibles cambios demográficos recientes a partir de la distribución de las diferencias entre alelos,

en función del tiempo de divergencia de éstos (mismatch). Se determinó la distribución de estas diferencias bajo un modelo de expansión demográfica y se calculó el índice de *Raggedness* (r) (Harpending 1994) y la desviación de la suma de cuadrados (SSD). El índice de *Raggedness* toma valores bajos cuando una población se encuentra en expansión, y valores altos cuando las poblaciones se encuentran estáticas o en cuellos de botella (Harpending y col. 1993; Harpending 1994).

Para estimar la forma del crecimiento poblacional y evaluar una reciente expansión demográfica en las poblaciones de *C. armatus* se realizó un análisis Skyline Plot Bayesiano (BSP) mediante el programa BEAST v1.8.0 (Drummond y col. 2012). Los BSP se realizaron para los principales linajes genéticos encontrados por el análisis filogenético y la red de haplotipos. Todos los análisis consideraron 100 millones de iteraciones con muestras cada 1.000 pasos. Para obtener el modelo de sustitución nucleotídica más apropiado para cada uno de los grupos genéticos se utilizó el programa jModelTest 0.1.1 (Posada 2008). A lo largo del análisis la tasa de mutación media se estableció usando una distribución normal ($0,023 \times 10^{-6} \pm 0,005 \times 10^{-6}$ DE) basándose en valores propuestos por Pratt y col. (2008) para Anostostomatidae. Para seleccionar el modelo de reloj molecular más apropiado se realizó un análisis Bayes factor, utilizando los modelos strict clock, lognormal relaxed clock, exponential relaxed clock y random local clock. Se utilizó el programa Tracer v1.5.0 (Rambaut y Drummond 2009). Los plots demográficos para cada uno de los grupos

genéticos se visualizaron mediante el programa Tracer v1.5.0 (Rambaut y Drummond 2009).

RESULTADOS

Variación y estructura genética

De un total de 187 secuencias se obtuvo un alineamiento de 861 sitios, de los cuales 85 correspondieron a sitios polimórficos. Para el total de secuencias se obtuvieron 72 haplotipos (Tabla 2). El análisis filogenético de haplotipos mostró cuatro clados (Figura 2). El clado 1 dividió tres subclados (I.a, I.b, I.c). El subclado I.a estuvo asociado a haplotipos provenientes de Río Bio-Bio y Nahuelbuta. El subclado I.b estuvo asociado exclusivamente a Nahuelbuta, correspondiente a la distribución cordillerana-costera de *C. armatus.*, mientras que el subclado I.c estuvo asociado a haplotipos provenientes de Tolten-Imperial, Tolten-Valdivia, Chiloé y Puelo-Yelcho (Figura 2). El clado II incluyó haplotipos provenientes de Río Bio-Bio. El clado III incluyó politomias en su interior sin resolver, mientras que sus haplotipos estuvieron asociados a Río Bio-Bio, Tolten-Valdivia, Cuenca Costera, Río Bueno, Chiloé y Puelo-Yelcho. El clado IV incluyó haplotipos asociados a Río Bio-Bio, Tolten-Valdivia, Cuenca costera, Río Bueno, Chiloé y Puelo-Yelcho. Sin embargo, la posición filogenética de algunos haplotipos (1, 10, 11, 12, 14, 16, 40) no fue bien resuelta (Figura 2).

El número de secuencias, número de haplotipos, diversidad haplotípica, diversidad nucleotídica y número promedio de diferencias entre dos secuencias para cada una de las cuencas se entregan en Tabla 3.

Tabla 2. Haplotipos obtenidos a partir del gen mitocondrial COI para *C. armatus*. Localidades están indicadas en Tabla 1. Colores de localidades (códigos) indican cuencas de origen (ver Figura 1).

Haplotipo	Frecuencia	Localidades
1	1	Coihueco: COI1_4
2	1	Coihueco: COI2_2
3	1	Talcahuano: THN1_3
4	1	Coyanco: COY1_1
5	1	Coyanco: COY1_2
6	1	Coyanco: COY1_3
7	4	Hualpén: HUA1_1; HUA1_2; HUA1_4; Laguna Pineda: LAG1_13
8	1	Laguna Pineda: LAG1_1
9	1	Laguna Pineda: LAG1_2
10	1	Laguna Pineda: LAG1_3
11	1	Laguna Pineda: LAG1_4
12	2	Laguna Pineda: LAG1_5; LAG1_12
13	2	Laguna Pineda: LAG1_6; LAG1_11
14	1	Laguna Pineda: LAG1_9
15	1	Laguna Pineda: LAG1_10
16	1	Laguna Pineda: LAG1_14
17	2	Coronel: COR1_1; COR1_3
18	4	PN Nahuelbuta: NAH1_1; NAH1_2; NAH1_3; NAH1_7
19	6	PN Nahuelbuta: NAH1_4; NAH1_5; NAH1_6; NAH1_9; VEG1_1; VEG1_5
20	1	PN Nahuelbuta: NAH1_8
21	1	PN Nahuelbuta: NAH1_10
22	1	Vegas Blancas: VEG1_2
23	2	Vegas Blancas: VEG1_3; VEG1_6
24	1	Vegas Blancas: VEG1_4
25	2	Cerro Nielol: ÑIE1_1; ÑIE1_6
26	1	Cerro Nielol: ÑIE1_2
27	11	Cerro Nielol: ÑIE1_4; Fundo Santa Olga: FSO1_2; Valdivia: VAL1_1; VAL1_4; LUN1_8; PN Puyehue 2: PUY2_3; Puente Las Cascadas: PLC1_5; Camino Volcán Osorno: CVO1_2; Chiloé 5: CHI5_2; CHI5_5; CHI5_6
28	8	Cerro Nielol: ÑIE1_5; ÑIE1_7; Yaldad 1: YAL1_1; YAL1_3; El Amarillo: ELA1_1; ELA1_3; ELA1_4; ELA1_6
29	1	Cerro Nielol: ÑIE1_8

Tabla 2 (continuación). Haplotipos obtenidos a partir del gen mitocondrial COI para *C. armatus*. Localidades están indicadas en Tabla 1. Colores de localidades (códigos) indican cuencas de origen (ver Figura 1).

Haplotipo	Frecuencia	Localidades
30	38	Teodoro Schmidt: TSC1_1; El Álamo: ALA1_2; ALA1_3; ALA1_4; Huerquehue: HUE1_1; Fundo Santa Olga: FSO1_1; FSO1_3; FSO1_5; FSO1_6; RN Mocho Choshueco: MOC1_3; Valdivia: VAL1_3; Camino PN Alerce Costero: CAC1_4; San Juan de la Costa: SJC1_1; SJC1_3; SJC1_4; PN Puyehue 2: PUY2_1; PUY2_7; PUY2_8; PUY2_10; Puerto Octay: OCT1_2; OCT1_4; OCT1_6; Puente Las Cascadas: PLC1_1; PLC1_3; PLC1_6; PLC1_10; Camino Volcán Osorno: CVO1_3; Punta Larga: PLA1_2; Chiloé 1: CHI1_2; CHI1_6
31	1	Teodoro Schmidt: TSC1_2
32	1	Vilcún: VIL1_1
33	10	Lican Ray: LIC1_1; LIC1_2; LIC1_3; Neltume: NEL1_2; NEL1_5; NEL1_7; NEL1_8; NEL1_11; RN Mocho Choshueco: MOC1_2; MOC1_5
34	1	Lican Ray: LIC1_4
35	1	Neltume: NEL1_1
36	1	Neltume: NEL1_3
37	1	Neltume: NEL1_6
38	1	Neltume: NEL1_9
39	1	Neltume: NEL1_10
40	1	RN Mocho Choshueco: MOC1_1
41	1	RN Mocho Choshueco: MOC1_4
42	27	RN Mocho Choshueco: MOC1_6; MOC1_7; Parque Oncol: PON1_1; Valdivia: VAL1_2; La Unión: LUN1_4; Camino PN Alerce Costero: CAC1_5; PN Puyehue 1: PUY1_2; PN Puyehue 2: PUY2_2; PUY2_4; PUY2_6; PUY2_9; Puerto Octay: OCT1_1; OCT1_3; Puente Las Cascadas: PLC1_2; PLC1_4; Camino Volcán Osorno: CVO1_4; CVO1_5; Punta Larga: PLA1_1; Parque Katalapi: KAT1_3; KAT1_4; Chiloé 1: CHI1_3; CHI1_5; Chiloé 3: CHI3_1; Chiloé 4: CHI4_1; Chaitén: CHA1_1; CHA1_3; CHA1_4
43	1	Valdivia: VAL1_5
44	1	La Unión: LUN1_1
45	2	La Unión: LUN1_2; LUN1_3
46	1	La Unión: LUN1_5
47	1	La Unión: LUN1_7
48	1	La Unión: LUN1_10

Tabla 2 (continuación). Haplotipos obtenidos a partir del gen mitocondrial COI para *C. armatus*. Localidades están indicadas en Tabla 1. Colores de localidades (códigos) indican cuencas de origen (ver Figura 1).

Haplotipo	Frecuencia	Localidades
49	1	Camino PN Alerce Costero: CAC1_1
50	2	Camino PN Alerce Costero: CAC1_2; CAC1_6
51	1	Camino PN Alerce Costero: CAC1_3
52	3	San Juan de la Costa: SJC1_5; SJC1_6; SJC1_7
53	5	San Juan de la Costa: SJC1_8; Chiloé 1: CHI1_7; CHI3_2; CHI3_3; Caleta Leptepú: LEP1_3
54	1	PN Puyehue 1: PUY1_1
55	1	PN Puyehue 2: PUY2_5
56	1	PN Puyehue 2: PUY2_11
57	1	Puerto Octay: OCT1_5
58	1	Puente Las Cascadas: PLC1_7
59	1	Puente Las Cascadas: PLC1_8
60	1	Puente Las Cascadas: PLC1_9
61	1	Camino Volcán Osorno: CVO1_1
62	1	Punta Larga: PLA1_3
63	1	Punta Larga: PLA1_5
64	1	Parque Katalapi: KAT1_1
65	1	Chiloé 1: CHI1_4
66	2	Chiloé 5: CHI5_1; CHI5_4
67	1	Chiloé 5: CHI5_3
68	1	Chiloé 5: CHI5_7
69	1	Chiloé 5: CHI5_8
70	1	Chiloé 5: CHI5_9
71	2	Yaldad: YAL1_2; El Amarillo: ELA1_2
72	1	El Amarillo: ELA1_5

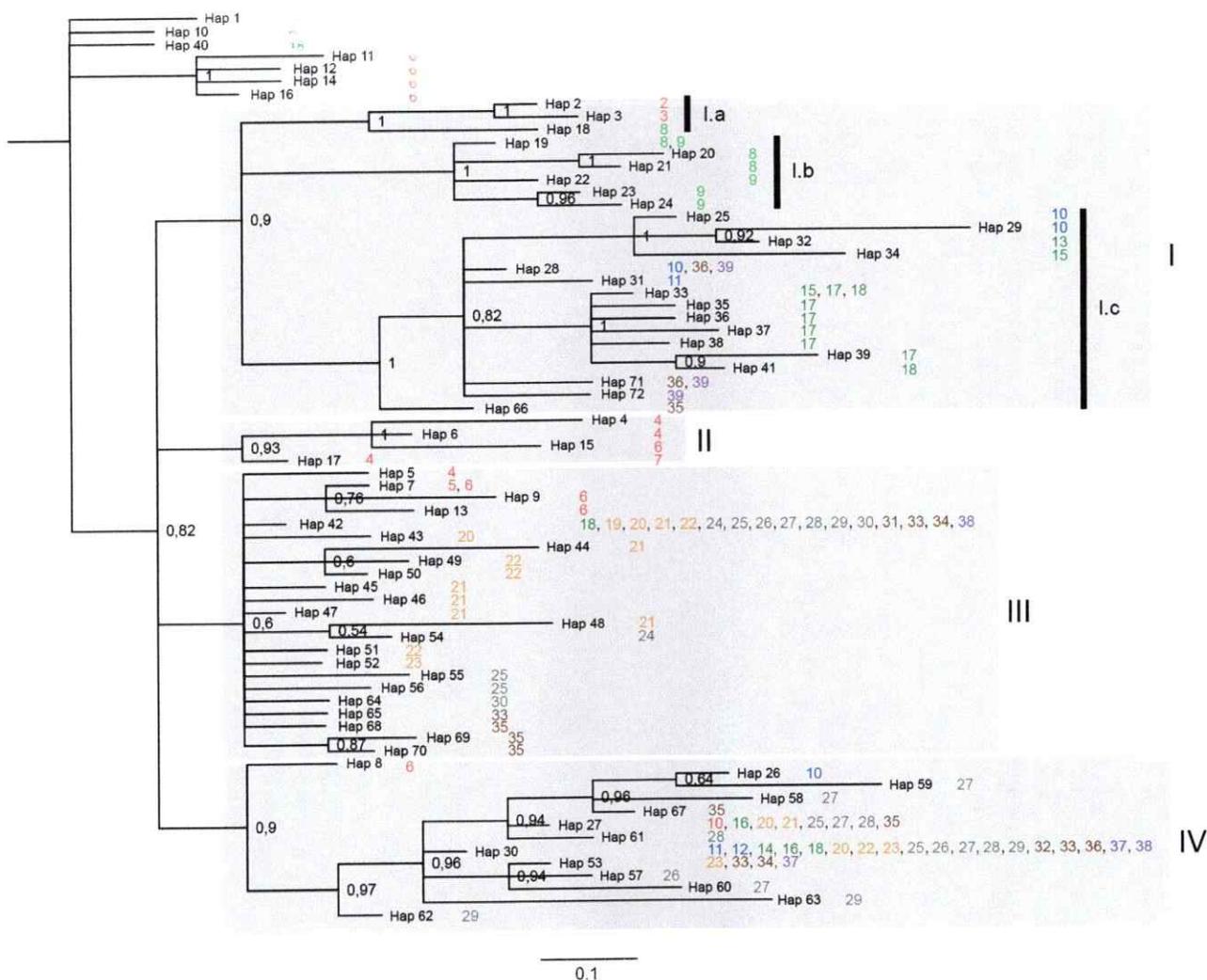


Figura 2. Árbol filogenético de haplotipos obtenido a partir del método de inferencia bayesiana basado en DNA mitocondrial. Números en los nodos representan los valores de probabilidad posterior. Números frente a las ramas terminales representan las localidades de muestreo. Colores de los números de las localidades de muestreo representan las cuencas de origen como en Tabla 1 y Figura 1.

Tabla 3. Valores de diversidad genética para las cuencas (a partir de localidades) de *C. armatus* basados en DNA mitocondrial. N: número de secuencias; K: número de haplotipos; H: diversidad haplotípica; Pi: diversidad nucleotídica; Π : número promedio de diferencias entre dos secuencias; DE: desviación estándar.

Sitio	Cuenca	N	K	H \pm DE	Pi \pm DE	Π \pm DE
1	Río Bio-Bio	23	17	0,964 \pm 0,026	0,00822 \pm 0,00090	6,957 \pm 3,393
2	Nahuelbuta	16	8	0,858 \pm 0,063	0,00589 \pm 0,00112	4,950 \pm 2,542
3	Tolten-Imperial	12	7	0,879 \pm 0,075	0,00996 \pm 0,00144	7,682 \pm 3,853
4	Tolten-Valdivia	28	15	0,862 \pm 0,057	0,00806 \pm 0,00098	6,056 \pm 2,972
5	Cuenca costera	27	14	0,932 \pm 0,026	0,00562 \pm 0,00062	4,060 \pm 2,089
6	Río Bueno	41	14	0,790 \pm 0,046	0,00523 \pm 0,00073	3,778 \pm 1,943
7	Chiloé	26	13	0,914 \pm 0,033	0,00718 \pm 0,00093	5,529 \pm 2,746
8	Puelo-Yelcho	14	6	0,835 \pm 0,062	0,00738 \pm 0,00069	6,253 \pm 3,158



La red de haplotipos mostró haplogrupos concordantes con los linajes recuperados por el análisis filogenético bayesiano (Figura 3). El primer haplogrupo (clado I.a) estuvo asociado a secuencias provenientes de las cuencas Río Bio-Bio y Nahuelbuta y separado del resto de haplotipos por tres pasos mutacionales. El segundo haplogrupo (clado I.b) correspondió a haplotipos provenientes exclusivamente de Nahuelbuta y estuvo separado por cuatro pasos mutacionales. El tercer haplogrupo (clado I.c) estuvo separado por tres pasos mutacionales y agrupó haplotipos provenientes de diferentes cuencas (i.e., Tolten-Valdivia, Tolten-Imperial, Chiloé, Puelo-Yelcho). La topología de este grupo mostró un haplotipo central de mayor frecuencia (haplotipo 33) con varios haplotipos derivados de baja frecuencia y separados por pocos pasos mutacionales; éstos estuvieron asociados exclusivamente a la cuenca Tolten-Valdivia (Figura 3). Los linajes correspondientes a los clados II, III y IV estuvieron separados por pocos pasos mutacionales. La red de haplotipos no mostró una separación clara entre estos grupos (clados II, III y IV en el análisis filogenético). Dentro de la red de haplotipos se ubicaron algunos haplotipos de alta frecuencia y distribuidos en más de una cuenca. Lo anterior se observó por ejemplo para los haplotipos 42 (haplogrupo III); haplotipos 30, 27, 53 (haplogrupo IV) y haplotipos 28, 71 (haplogrupo I.c). Estos haplotipos se distribuyeron mayormente en cuencas bajo los 38°S. A partir del haplotipo 42 se ubicaron varios haplotipos derivados de baja frecuencia (Figura 3).

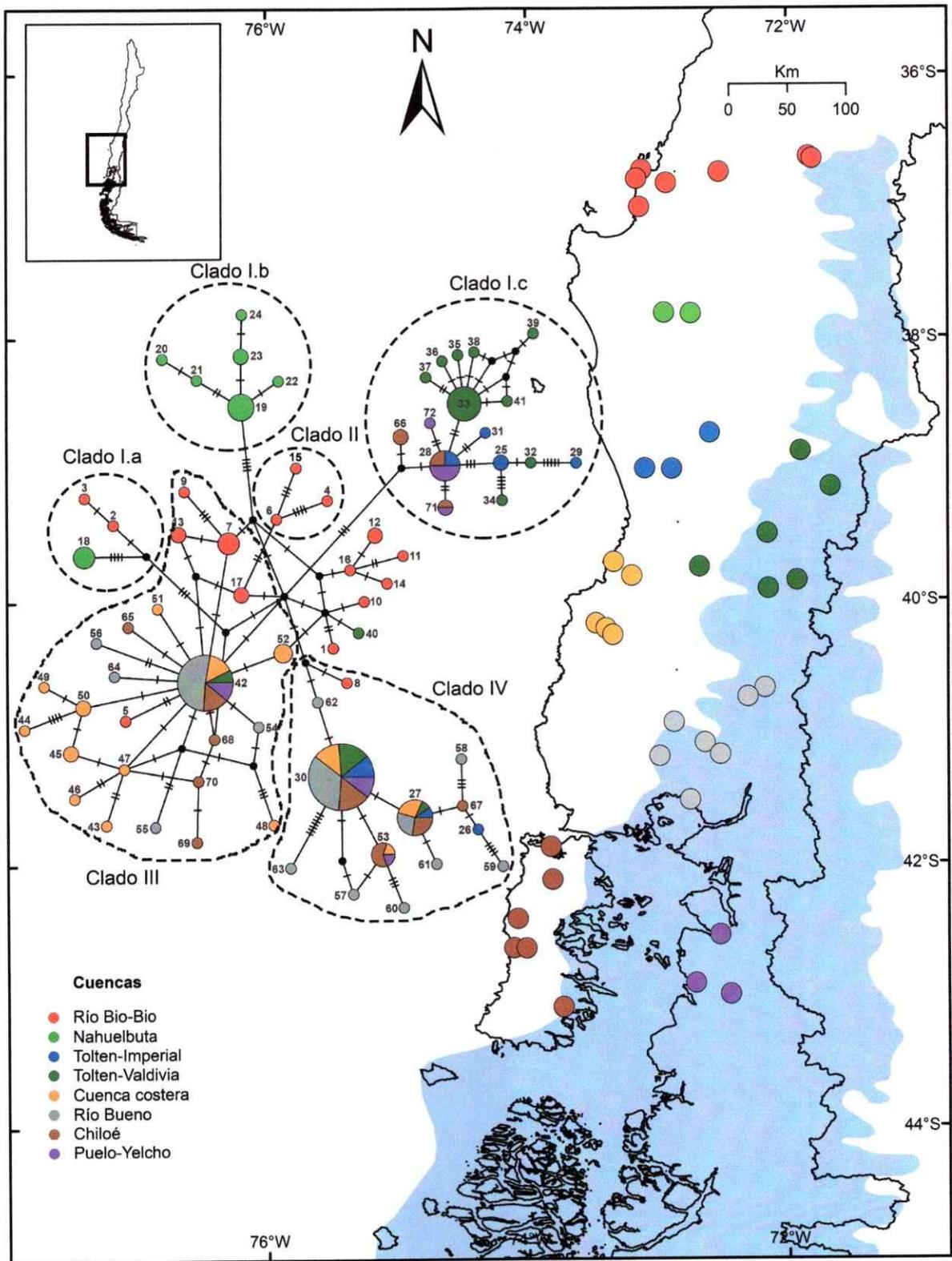


Figura 3. Red de haplotipos de *C. armatus* obtenida mediante el método median joining y distribución geográfica de los haplotipos. Círculos negros representan haplotipos inferidos por el programa. Números representan los haplotipos como en Tabla 2. El área sombreada muestra la extensión de la capa de hielo durante el UMG (Clapperton 1993).

El análisis espacial bayesiano GENELAND mostró tres grupos genéticos para la distribución de *C. armatus*. Aunque con baja probabilidad posterior, estos resultados fueron concordantes en las cinco corridas analizadas (Figura 4). El primer grupo estuvo compuesto exclusivamente por Nahuelbuta (38°S) (Figura 4A), el que fue concordante con lo encontrado por el análisis filogenético y de red de haplotipos. El segundo grupo estuvo formado por las cuencas Tolten-Imperial, Tolten-Valdivia, Cuenca costera, Río Bueno, Chiloé y Puelo-Yelcho, correspondiente a la franja ubicada entre los 39° y 43°S (Figura 4B). El tercer grupo correspondió exclusivamente a la cuenca del Río Bio-Bio (Figura 4C) correspondiente a la distribución extrema norte de *C. armatus*.

La prueba F_{ST} mostró diferentes niveles de diferenciación en las comparaciones pareadas entre las cuencas (Tabla 4). Los mayores valores de F_{ST} se observaron en las comparaciones que incluyeron a las cuencas Nahuelbuta y Tolten-Valdivia (Tabla 4). El AMOVA para los grupos encontrados por el análisis espacial GENELAND mostró que el componente de varianza entre grupos fue mayor ($F_{CT}=0,279$) que el de las localidades agrupadas en cuencas ($F_{CT}=0,238$) (Tabla 5). Ambos criterios de agrupación mostraron altos valores de diferenciación global (F_{ST}) (Tabla 5).

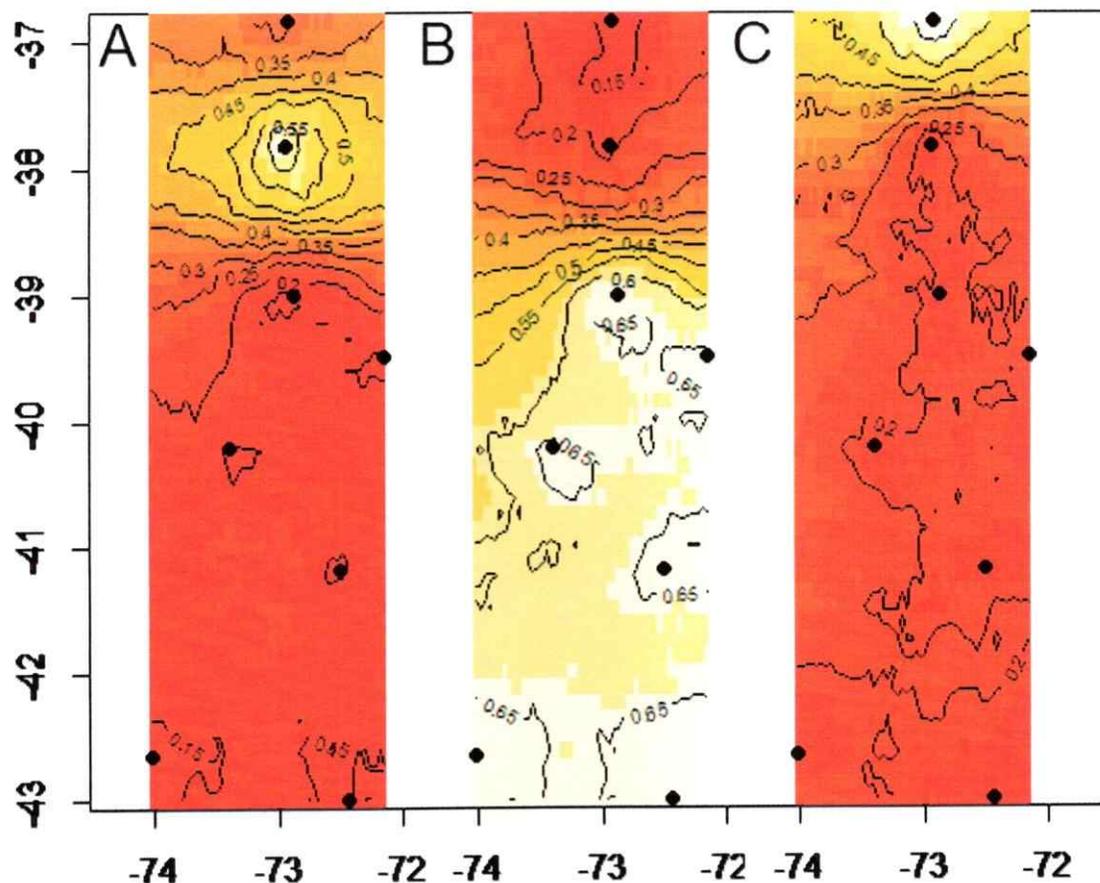


Figura 4. Análisis espacial bayesiano GENELAND para la distribución de *C. armatus*. A: grupo 1; B: grupo 2; C: grupo 3. Las isoclinas de probabilidad posterior muestran la distribución espacial de los grupos genéticos encontrados. Los puntos negros representan las localidades analizadas. Regiones con mayor probabilidad de inclusión se indican en blanco.

Tabla 4. Valores F_{ST} pareados para las cuencas analizadas en el estudio.

*Valores F_{ST} pareados significativos, $p \leq 0,05$. Cuencas (1: Río Bio-Bio; 2: Nahuelbuta; 3: Tolten-Imperial; 4: Tolten-Valdivia; 5: Cuenca costera; 6: Río Bueno; 7: Chiloé; 8: Puelo-Yelcho).

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0,00000							
2	0,37400*	0,00000						
3	0,21990*	0,44178*	0,00000					
4	0,30897*	0,50742*	0,08362	0,00000				
5	0,21234*	0,61208*	0,29493*	0,40930*	0,00000			
6	0,25988*	0,61218*	0,26786*	0,40281*	0,03755	0,00000		
7	0,16386*	0,50553*	0,09061*	0,23994*	0,06787*	0,03481*	0,00000	
8	0,15084*	0,46144*	-0,00130	0,09015	0,22677*	0,21143*	0,04056	0,00000

Tabla 5. Análisis de varianza molecular (AMOVA) a partir de las localidades de *C. armatus*. GL: grados de libertad; F_{sc}: entre poblaciones dentro de grupos; F_{ST}: entre poblaciones; F_{CT}: entre grupos.

Número de grupos	GL	Fuente de variación			Índices de fijación		
		Entre grupos	Entre poblaciones dentro de grupos	Dentro de poblaciones	F _{sc}	F _{ST}	F _{CT}
Entre cuencas (8)	7	23,84***	21,17***	54,99***	0,277***	0,450***	0,238***
Grupos Geneland (3)	2	27,97***	25,59***	46,44***	0,355***	0,535***	0,279***

***p≤0,001

Análisis demográfico de las poblaciones de *C. armatus* a lo largo de su distribución actual.

El criterio para definir los grupos de comparaciones en los análisis demográficos se basó en los clados y haplogrupos recuperados por el análisis filogenético y de red de haplotipos respectivamente. No se analizó el clado II por el bajo número de muestras. Se encontró evidencia de expansión demográfica en todos los haplogrupos analizados mediante la prueba F_s de Fu (Tabla 6). La prueba D de Tajima mostró valores negativos para todos los haplogrupos pero éstos fueron significativos sólo para el haplogrupo III (Tabla 6).

El análisis de diferencias pareadas (mismatch) entre haplotipos, bajo un modelo de expansión, sugiere un bajo número de sustituciones entre ellos, con tendencia a una distribución unimodal y alta frecuencia de bajo número de diferencias en los haplogrupos I.b, III y IV (Figura 5).

Los valores del índice *Raggedness* (r) y las desviaciones de la suma de los cuadrados (SSD) presentaron probabilidades no significativas para todos los haplogrupos analizados, por lo que el modelo de expansión no puede ser rechazado (Tabla 7).

El análisis BSP para los grupos genéticos encontrados por el análisis filogenético y la red de haplotipos utilizó como mejor modelo para los datos el exponential relaxed clock. Este análisis mostró evidencia de un sutil pero persistente crecimiento poblacional en todos los grupos excepto para el

haplogrupo I.b (Figura 6). La no visualización de crecimiento para este haplogrupo en el análisis BSP, contrasta con la evidencia de expansión de las pruebas de neutralidad (prueba F_s de F_u) y distribuciones pareadas. Lo anterior podría tener relación con el bajo número de muestras para este haplogrupo, lo que limita al modelo bayesiano.

Tabla 6. Pruebas de neutralidad D de Tajima y F_s de Fu para los principales haplogrupos de *C. armatus* obtenidos a partir del análisis filogenético y de red de haplotipos. Pi: diversidad nucleotídica; Theta/sitio: theta por sitio.

Haplogrupo	Pi	Theta/sitio	D de Tajima (p valor)	F_s de Fu (p valor)
I.b	0,03059	0,03189	-0,060 (0,467)	-3,642 (0,006**)
I.c	0,06627	0,07270	-1,152 (0,111)	-12,425 (0,001**)
III	0,04940	0,05289	-1,991 (0,006**)	-25,786 (0,001**)
IV	0,06063	0,06597	-1,564 (0,053)	-9,217 (0,001**)

**Significante a $p < 0,01$

Tabla 7. Parámetros de la distribución mismatch para los principales haplogrupos de *C. armatus* obtenidos a partir del análisis filogenético y de red de haplotipos.

Haplogrupo	<i>Raggedness</i> (p valor)	SSD (p valor)
Ib	0,10667 (0,61400)	0,01868 (0,66300)
Ic	0,03319 (0,35400)	0,01229 (0,31700)
III	0,02878 (0,47200)	0,00384 (0,49700)
IV	0,01249 (0,99500)	0,07314 (0,03200)

**Significante a $p < 0,01$



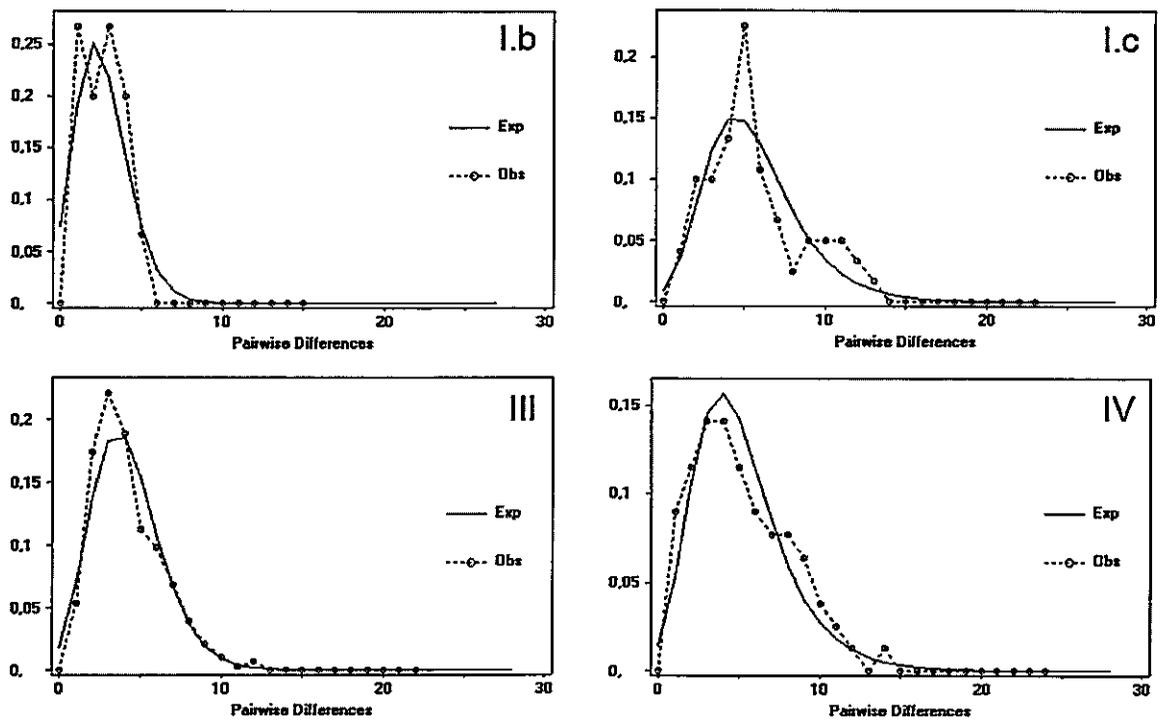


Figura 5. Distribución mismatch observada y esperada bajo un modelo de expansión poblacional para los linajes inferidos por el análisis filogenético y de red de haplotipos.

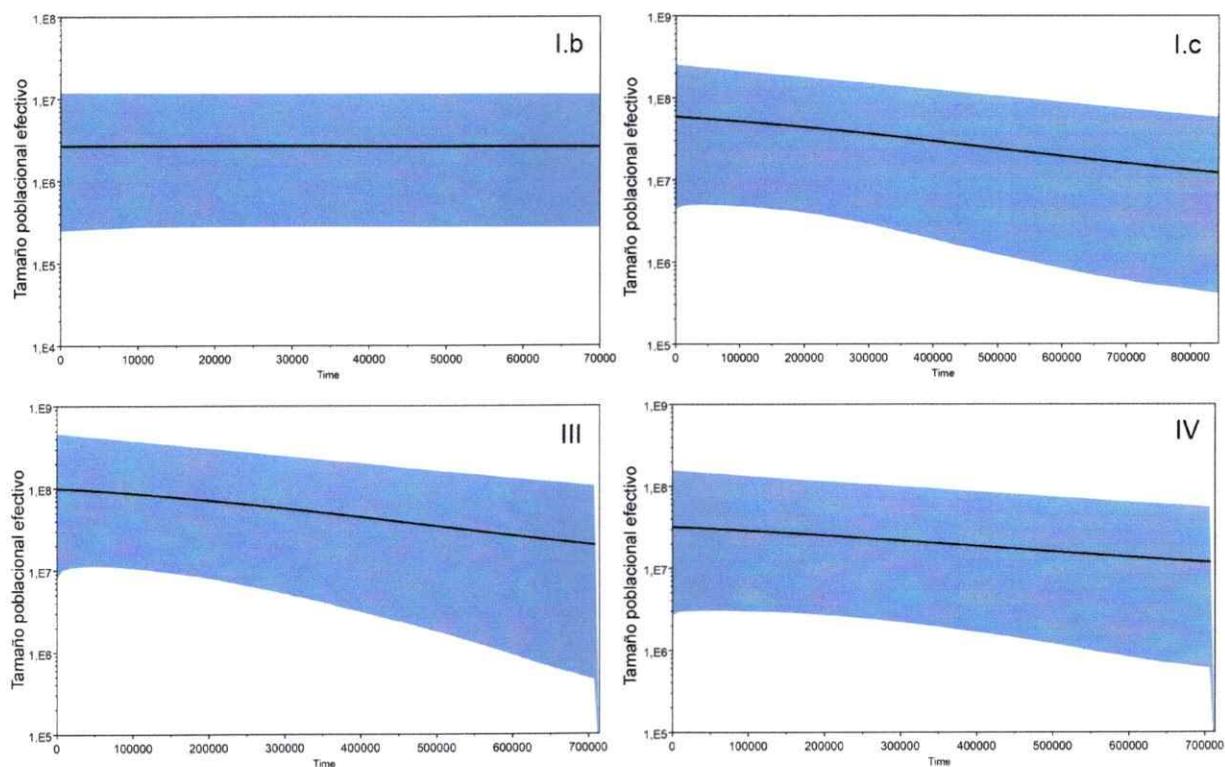


Figura 6. Skyline Plot Bayesiano (BSP) para los linajes inferidos por el análisis filogenético y de red de haplotipos. La línea negra representa la media. El área sombreada representa el intervalo con 95% de densidad posterior.

DISCUSIÓN

El análisis filogenético y de red de haplotipos, a partir de secuencias de citocromo oxidasa I, mostraron linajes congruentes a lo largo de la distribución de *C. armatus*. La red de haplotipos mostró una topología compleja con haplogrupos diferenciados entre sí por pocos pasos mutacionales, lo que sugiere una baja divergencia genética entre éstos. Dentro de la red de haplotipos se ubicaron algunos haplotipos de alta frecuencia y distribuidos en más de una cuenca bajo los 38°S. Estos resultados podrían reflejar la retención de polimorfismos ancestrales o un contacto secundario ocurrido luego de una expansión de las poblaciones de *C. armatus*.

El AMOVA mostró una mayor varianza genética dentro de las poblaciones que entre grupos. El análisis espacial bayesiano GENELAND mostró tres grupos genéticos con bajos valores de probabilidad posterior. Estos resultados sugieren una incipiente y reciente diferenciación entre estas poblaciones, lo que podría estar relacionado a la ausencia de barreras geográficas limitantes para la expansión distribucional de esta especie.

Las pruebas de neutralidad (F_s de Fu y D de Tajima en parte) y de diferencias pareadas mostraron que los diferentes haplogrupos se ajustarían a un modelo de expansión demográfica, con una alta frecuencia de bajo número de diferencias, lo que sugiere grupos con una historia microevolutiva reciente y con signos de una reciente expansión poblacional.

Tanto el análisis filogenético como la red de haplotipos y GENELAND mostraron a la cuenca Nahuelbuta como un grupo genético diferente a las demás cuencas y linajes. Lo anterior fue apoyado por altos valores de F_{ST} observados para esta cuenca en comparación a las restantes.

Diversos autores han propuesto la cordillera de Nahuelbuta (38°S) como un área remanente de antiguos bosques templados lluviosos que sobrevivieron durante las glaciaciones del Pleistoceno, y se mantuvieron aislados en condiciones climáticas más estables (Villagrán, 1985; Villagrán y col. 1996; Vergara y col. 2014). Los resultados mostraron evidencia de expansión demográfica para este grupo genético, sin embargo no se observaron valores altos de diversidad haplotípica y nucleotídica, en comparación a áreas afectadas por las glaciaciones a lo largo de la distribución de *C. armatus*. Estos resultados deben ser tomados con precaución debido al bajo número de muestras para el grupo.

Los valores de diversidad haplotípica y diversidad nucleotídica variaron entre cuencas en pocas unidades de magnitud, registrándose valores más altos en Río Bio-Bio y Cuenca costera, cuencas ubicadas fuera de los límites del área de influencia de los hielos glaciales.

Diversos autores han observado niveles variables en la diversidad genética de poblaciones de vertebrados (e.g., reptiles) que presentan una distribución a lo largo de los 38-43°S, estos autores han sugerido que correspondería a historias evolutivas asociadas a glaciaciones del Pleistoceno tardío (Victoriano y col.

2008; Vidal y col. 2012). Estos autores observaron bajos niveles en la diversidad genética de poblaciones distribuidas al sur de los 38°S en áreas influenciadas por el avance del hielo, lo que reflejaría una expansión reciente desde estas latitudes luego del retiro de los hielos.

Los resultados de este estudio no mostraron niveles de diversidad genética bajos en cuencas como Tolten-Imperial, Río Bueno y Puelo-Yelcho, de acuerdo a lo esperado en área afectadas por las glaciaciones. Todas las cuencas presentaron valores altos de diversidad haplotípica, pero bajos valores de diversidad nucleotídica, lo que sugiere que existiría una diferenciación genética reciente con un rápido crecimiento de las poblaciones, patrón similar documentado para poblaciones del roedor *Oligoryzomys longicaudatus* a lo largo de su distribución en bosques templados del sur de Chile (Palma y col. 2012).

El efecto de las glaciaciones sobre la historia demográfica de las poblaciones ha sido estudiado en diversos taxa. Himes y col. (2008) observaron evidencias de expansión demográfica en poblaciones del monito del monte *Dromiciops gliroides* al sur de los 40°S, mientras que poblaciones al norte de esa latitud mantuvieron una historia demográfica estable. Antecedentes similares han sido documentados por Palma y col. (2012) para *O. longicaudatus*, quienes observaron signos de expansión demográfica en poblaciones distribuidas en los bosques templados alrededor de los 38-41°S. Al respecto Sérsic y col. (2011) han propuesto como importantes zonas de expansión demográfica las áreas

bajas de la cordillera de la Costa del sur de Chile en base a evidencia filogeográfica congruente para vertebrados terrestres y plantas vasculares.

Tanto las pruebas de neutralidad como la distribución de diferencias pareadas sugieren signos de expansión demográfica para todos los haplogrupos analizados. Los análisis BSP mostraron un sutil pero persistente crecimiento excepto en el haplogrupo correspondiente a Parque Nacional Nahuelbuta. Los plot bayesianos mostraron un incipiente crecimiento anterior a la influencia del UMG (26.000-13.000 años atrás), lo que sugiere una historia demográfica mucho más antigua dentro del Pleistoceno. Sin embargo estos resultados deben ser tomados como una primera aproximación, por lo que se deberían evaluar otras tasas de mutación haplotípica para el marcador utilizado en este estudio.

CONCLUSIONES

El análisis filogenético y de red de haplotipos mostraron linajes congruentes a lo largo de la distribución de *C. armatus*. La red de haplotipos mostró una topología compleja con haplogrupos diferenciados entre sí por pocos pasos mutacionales, lo que sugiere una baja divergencia genética entre éstos. El AMOVA mostró una mayor varianza genética dentro de las poblaciones que entre grupos, mientras que el análisis espacial bayesiano GENELAND mostró tres grupos genéticos con bajos valores de probabilidad posterior. Lo anterior podría estar asociado a una reciente diferenciación entre estas poblaciones. Todas las cuencas presentaron valores altos de diversidad haplotípica, pero bajos valores de diversidad nucleotídica, lo que sugiere que existiría una diferenciación genética reciente con un rápido crecimiento de las poblaciones. Tanto las pruebas de neutralidad como la distribución de diferencias pareadas sugieren signos de expansión demográfica para todos los haplogrupos analizados. Sin embargo los análisis BSP mostraron que esta expansión correspondería a una historia mucho más antigua previa al UMG. La baja estructura genética encontrada estaría relacionada con aspectos ecológicos de esta especie, tales como su alta vagilidad y amplio rango distribucional. Estos resultados deben tomarse como una primera aproximación, por lo que es necesario evaluar otros marcadores mitocondriales y nucleares.

BIBLIOGRAFÍA

Alfaro, F.M., Zuñiga-Reinoso, A., Muñoz-Ramírez, C. y Elgueta, M. 2015. New records reveal the actual distribution of *Cratomelus meritus* Gorochov (Orthoptera: Anostostomatidae), a giant red cricket from Chile. *Neotropical Entomology* 44(2): 194-196.

Allnutt, T.R., Newton, A., Lara, A., Premoli, A., Armesto, J., Vergara, R. y Gardner, M.F. 1999. Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce) a threatened South American conifer. *Molecular Ecology* 8: 975-987.

Allnutt, T.R., Curtis, J.R., Gardner, M. y Newton, A.C. 2001. Genetic variation in wild Chilean and cultivated British populations of *Podocarpus salignus* D. Don (Podocarpaceae) *Edinburgh Journal of Botany* 58(3): 459-473.

Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge, Massachusetts. Harvard University Press. 447 p.

Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigle, J.E., Reeb, C.A. y Saunders, N.C. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 489-522.

Bandel, T.H.J., Forster, P. y Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37-48.

Beheregaray, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: the state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754-3774.

Breitman, M.F., Avila, L.J., Sites, J.W. JR y Morando, M. 2012. How lizards survived blizzards: phylogeography of the *Liolaemus lineomaculatus* group (Liolaemidae) reveals multiple breaks and refugia in southern Patagonia and their concordance with other co-distributed taxa. *Molecular Ecology* 21: 6068-6085.

Clapperton, C.M. 1990. Quaternary glaciations in the Southern Hemisphere: an overview. *Quaternary Science Reviews* 9: 299-304.

Clapperton, C.M. 1991. Glacier fluctuations of the last glacial-interglacial cycle in the Andes of South America. *Bamberger Geographische Schriften* 11: 183-207.

Clapperton, C.M. 1993. Quaternary geology and geomorphology of South America. Amsterdam: Elsevier. 779 p.

Clark, P.U., Shakun, J.D., Baker, P.A., Bartlein, P.J., Brewer, S., Brook, E., Carlson, A.E., Cheng, H., Kaufman, D.S., Liug, Z., Marchitto, T.M., Mix, A.C., Morrill, C., Otto-Bliesner, B.L., Pahnke, K., Russell, J.M., Whitlock, C., Adkins, J.F., Blois, J.L., Clark, J., Colman, S.M., Curry, W.B., Flower, B.P., He, F., Johnson, T.C., Lynch-Stieglitz, J., Markgraf, V., Mcmanus, J., Mitrovica, J.X., Moreno, P.I. y Williams, J.W. 2012. Global climate evolution during the last deglaciation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: 1134-1142.

Denton, G.H., Heusser, C.J., Lowell, T.V., Moreno, P.I., Andersen, B.G., Heusser, L.E., Schlüchter, C. y Marchant, D.R. 1999. Interhemispheric linkage of paleoclimate during the last glaciation. *Geografiska Annaler* 81(2): 107-153.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D. y Rambaut, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7 *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.

Eades, D.C., Otte, D., Cigliano, M.M. y Braun, H. 2015. Orthoptera Species File. Version 5.0/5.0. [en línea]<<http://Orthoptera.SpeciesFile.org>> [consulta: 1 octubre 2015]

Elgueta, M., Cammoueight, A. y Carbonnel, C.S. 1999. Catálogo de Orthoptera

(Insecta) de Chile. Publicación Ocasional, Museo Nacional de Historia Natural (Chile) 54: 1-60.

Excoffier, L. y Lischer, H.E. 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.

Fu, Y. 1997. Statistical test of neutrality of mutation against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915-925.

García, J.L. 2012. Late Pleistocene ice fluctuations and glacial geomorphology of the Archipiélago de Chiloé, southern Chile. *Geografiska Annaler: Series A, Physical Geography* 94: 459-479.

Garrido-Garduno, T. y Vazquez-Dominguez, E. 2013. Métodos de análisis genéticos, espaciales y de conectividad en genética del paisaje. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 84(3): 3-25.

Glasser, N.F., Jansson, K.N., Harrison, S. y Kleman, J. 2008. The glacial geomorphology and Pleistocene history of South America between 38°S and 56°S. *Quaternary Science Reviews* 27: 365-390.

Gorochov, A.V. 1999. A new species of *Cratomelus* from Chile (Orthoptera: Anostostomatidae: Cratomelinae). *Zoosystematica Rossica* 8(2): 242.

Guillot, G., Mortier, F. y Estoup, A. 2005. GENELAND: a computer package for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712-715.

Hall, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/ NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 41: 95-98.

Harpending, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* 66(4): 591-600.

Harpending, H.C., Sherry, S.T., Rogers, A.R. y Stoneking, M. 1993. Genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34(4): 483-496.

Harrison, S. y Glasser, N.F. 2011. The Pleistocene Glaciations of Chile. *Developments in Quaternary Science* 15: 739-756.

Heusser, L.E., Heusser, C.J., Kleczkowski, A. y Crowhurst, S. 1999. A 50,000 yr pollen record from Chile of South American millennial-scale climate instability

during the last glaciation. *Quaternary Research* 52: 154-158.

Heusser, C.J. 2003. *Ice age in the Southern Andes: A chronicle of paleoecological events*. Elsevier B.V., Amsterdam. 235 p.

Hewitt, G.M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.

Hewitt, G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87-112.

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

Hewitt, G.M. 2004a. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 359: 183-195.

Hewitt, G.M. 2004b. The structure of biodiversity-insights from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1:4.

Himes, C.M.T., Gallardo, M.H. y Kenagy, G.J. 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.

Holling, J.T. y Schilling, D.H. 1981. Late Wisconsin-Weichselian mountain glaciers and small ice caps. En G.H. Denton y T.J. Hughes (eds), *The last great ice sheets*. pp 179-206. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Hubbard, A.L. 1997. Modelling climate, topography and palaeoglacier fluctuations in the Chilean Andes. *Earth Surface Processes and Landforms* 22: 79-92.

Ihaka, R. y Gentleman, R. 1996. R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics* 5: 299-314.

Jowett, T. 1986. Preparation of nucleic acids. En DB Roberts (ed), *Drosophila: A Practical Approach*. pp 275-286. IRL Press Oxford.

Leigh, J.W. y Bryant, D. 2015. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* 6: 1110-1116.

Librado, P. y Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.

Marín, J.C., Varas, V., Vila, A.R., López, R., Orozco-Terwengel, P. y Corti, P. 2013. Refugia in Patagonian fjords and the eastern Andes during the Last Glacial Maximum revealed by huemul (*Hippocamelus bisulcus*) phylogeographical patterns and genetic diversity. *Journal of Biogeography* 40: 2285-2298.

Mcculloch, R., Bentley, M., Purves, R., Hulton, N., Sugden, D. y Clapperton, C. 2000. Climatic inferences from glacial and paleoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary Science* 15: 409-417.

Muñoz-Ramírez, C.P., Unmack, P.J., Habit, E., Johnson, J. B., Cussac, V.E. y Victoriano, P. 2014. Phylogeography of the ancient catfish family Diplomystidae: Biogeographic, systematic, and conservation implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 73:146-160.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 70: 3321-3323.

Nei, M., Maruyama, T. y Chakraborty, R. 1975. The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29: 1-10.

Nuñez, J.J., Nicole, K., Wood, B., Rabanal, F.E., Fontanella, F.M. y Sites Jr, J. W. 2011. Amphibian phylogeography in the Antipodes: Refugia and postglacial colonization explain mitochondrial haplotype distribution in the Patagonian frog *Eupsophus calcaratus* (Cycloramphidae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 58: 343-352.

Palma, R.E., Boric-Bargetto, D., Torres-Pérez, F., Hernández, C.E. y Yates, T.L. 2012. Glaciation Effects on the Phylogeographic Structure of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in the Southern Andes. *Plos One* 7(3): e32206.

Posada, D. 2008. jModelTest: Phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution* 25: 1253-1256.

Pratt, R.C., Morgan-Richards, M. y Trewick, S.A. 2008. Diversification of New Zealand weta (Orthoptera: Ensifera: Anostostomatidae) and their relationships in Australasia. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363(1508): 3427-3437.

Premoli, A.C., Kitzberger, T. y Veblen, T.T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251-260.

Rambaut, A. y Drummond, A.J. 2009. Tracer v1.5.0. Disponible en: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.

Rodríguez-Serrano, E. 2011. Consecuencias de las glaciaciones pleistocénicas sobre la diversidad genética de *Abrothrix olivaceus* (Waterhouse) (Rodentia: Cricetidae: Sigmodontinae). *Mastozoología Neotropical* 18(2): 319-330.

Rodríguez-Serrano, E., Cancino, R.A. y Palma, R.E. 2006. Molecular phylogeography of *Abrothrix olivaceus* (Rodentia: Sigmodontidae) in Chile. *Journal of Mammalogy* 87(5): 971-980.

Ronquist, F. y Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.

Sade, S., Rau, J.R. y Orellana, J. I. 2012. Dieta del quique (*Galictis cuja* Molina 1782) en un remanente de bosque valdiviano fragmentado del sur de Chile. *Gayana* 76(2): 112-116.

Segovia, R.A., Pérez, M.F. y Hinojosa, L.F. 2012. Genetic evidence for glacial refugia of the temperate tree *Eucryphia cordifolia* (Cunoniaceae) in Southern America. *American Journal of Botany* 99: 121-129.

Sérsic, A.N., Cosacov, A., Cocucci, A.A., Johnson, L., Pozner, R., Avila, L.J., Sites, J.W. y Morando, M. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103(2): 475-494.

Simon, C., Frati, F., Beckenbach, A., Crespi, B., Liu, H. y Flook, P. 1994. Evolution, weighting and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers. *Annals of the Entomological Society of America* 87: 651-701.

Tajima, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.

Unmack, P.J., Bennin, A.P., Habit, E.M., Victoriano, P.F. y Johnson, J.B. 2009. Impact of ocean barriers, topography, and glaciation on the phylogeography of the catfish *Trichomycterus areolatus* (Teleostei: Trichomycteridae) in Chile. *Biological Journal of the Linnean Society* 97: 876-892.

Vásquez, D., Correa, C., Pastenes, L., Palma, R.E. y Méndez, M.A. 2013. Low phylogeographic structure in *Rhinella arunco* (Anura, Bufonidae), an endemic amphibian from the Chilean Mediterranean hotspot. *Zoological Studies* 52: 35.

Veit, H. y Garleff, K. 1995. Evolución del paisaje Cuaternario y los suelos en Chile central-sur. En J.J. Armesto, C. Villagrán y M.T.K. Arroyo (eds), *Ecología de los bosques nativos de Chile*. pp 51-69. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.

Vera-Escalona, I., D'elia, G., Gouin, N., Fontanella, F., Muñoz, C., Sites, J. y Victoriano, P. 2012. Lizards on Ice: Evidence for Multiple Refugia in *Liolaemus pictus* (Liolaemidae) during the Last Glacial Maximum in the Southern Andean Beech Forests. *Plos One* 7(11): 1-17.

Vergara, R., Gitzendanner, M.A., Soltis, D.E. y Soltis, P.S. 2014. Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of *Nothofagus* subgenus *Lophozonia* (Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. *Ecology and Evolution* 4(12): 2450-2471.

Vianna, J.A., Medina-Vogel, G., Chehébar, C., Sielfeld, W., Olavarría, C. y Faugeron, S. 2011. Phylogeography of the Patagonian otter *Lontra provocax*: adaptive divergence to marine habitat or signature of southern glacial refugia?

BMC Evolutionary Biology 11: 53.

Victoriano, P.F., Ortiz, J.C., Benavides, E., Adams, B.J. y Sites, J.W. 2008. Comparative phylogeography of codistributed species of Chilean *Liolaemus* (Squamata: Tropicuridae) from the central-southern Andean range. *Molecular Ecology* 17: 239-2416.

Vidal, M.A., Ortiz, J.C., Marín, J.C., Poulin, E. y Moreno, P.I. 2012. Comparative phylogeography of two co-distributed species of lizards of the genus *Liolaemus* (Squamata: Tropicuridae) from Southern Chile. *Amphibia-Reptilia* 33: 55-67.

Villagrán, C. 1985. Análisis palinológico de los cambios vegetacionales durante el Tardiglacial y Postglacial en Chiloé, Chile. *Revista Chilena de Historia Natural* 58: 57-70.

Villagrán, C. 1991. Historia de los bosques templados del sur de Chile durante el Tardiglacial y Postglacial. *Revista Chilena de Historia Natural* 64: 447-460.

Villagrán, C. 1995. Quaternary History of the Mediterranean Vegetation of Chile. En M.T.K. Arroyo, P.H. Zedler y M.D. Fox (eds), *Ecology and Biogeography of Mediterranean Ecosystems in Chile, California and Australia*. pp 3-20. Springer Verlag, New York.

Villagrán, C. y Hinojosa, L.F. 1997. Historia de los bosques de Sudamérica, II: análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 241-267.

Villagrán, C. y Hinojosa, L.F. 2005. Esquema Biogeográfico de Chile. En J. Llorente y J.J. Morrone (eds), *Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y Tópicos Afines*. pp 551-577. México: Ediciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, Jiménez Editores, México.

Villagrán, C., Moreno, P. I. y Villa, R. 1996. Antecedentes palinológicos acerca de la historia cuaternaria de los bosques chilenos. En J.J. Armesto, C. Villagrán y M.T.K. Arroyo (eds), *Ecología de Los Bosques Nativos de Chile*. pp 51-70. Santiago, Editorial Universitaria.

Zúñiga, A., Muñoz-Pedreros, A. y Fierro, A. 2008. Dieta de *Lycalopex griseus* (Gray, 1837) (Mammalia: Canidae) en la depresión intermedia del sur de Chile. *Gayana* 72(1): 113-116.