

UCH-FC
B. Ambiental
B745
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE FACULTAD DE CIENCIAS ESCUELA DE PREGRADO

**“EVIDENCIAS GENÉTICAS DE LA HISTORIA GLACIAL DE
LAURELIOPSIS PHILIPPIANA”**

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

MAURICIO BOSSHARD TRAJANO DE LUCENA

Dr. Felipe Hinojosa
Director de Seminario de Título:

Dra. Fernanda Pérez
Co-Directora de Seminario de Título

Octubre de 2011
Santiago - Chile



INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, que el Seminario de Título presentado por el candidato:

MAURICIO BOSSHARD TRAJANO DE LUCENA

“EVIDENCIAS GENÉTICAS DE LA HISTORIA GLACIAL DE LAURELIOPSIS PHILIPPIANA”

Ha sido aprobado por la Comisión evaluadora y revisora, como requisito parcial, para optar al título profesional de Biólogo con Mención en Medio Ambiente.

Dr. Felipe Hinojosa Opazo
Director Seminario de Título

Handwritten signature of Felipe Hinojosa Opazo in blue ink, written over a horizontal line.

Dra. Fernanda Pérez Trautmann
Co-Directora del Seminario

Handwritten signature of Fernanda Pérez Trautmann in blue ink, written over a horizontal line.

Comisión de Evaluación

Dr. Elie Poulin
Presidente Comisión

Handwritten signature of Elie Poulin in blue ink, written over a horizontal line.

Dr. Ramiro Bustamante Araya
Evaluador

Handwritten signature of Ramiro Bustamante Araya in blue ink, written over a horizontal line.



Santiago de Chile, abril 2011



Nací en Brasil, soy brasileño y suizo, pero desde hace más de 16 años vivo en Chile, país en que realicé mis estudios de educación media y superiores. La razón por la que estudié biología ambiental es porque siempre me ha interesado la naturaleza, desde niño. Actualmente estoy cursando el programa de magíster en la Facultad de Ciencias. Tengo intenciones de seguir con un doctorado después, dado que mi deseo es ser investigador en ecología.



A mis profesores

A mi familia



Agradecimientos:

A mis tutores, Dr. Felipe Hinojosa y Dra. Fernanda Pérez. A mis revisores, Dr. Elie Poulin y Dr. Ramiro Bustamante. A mis compañeros de laboratorio y a todos aquellos que me han aconsejado y ayudado durante la realización de esta tesis.

Instituto de Ecología y Biodiversidad IEB
IMEB P05-002, PFB-23

Proyecto FONDECYT N° 1090339

ÍNDICE

Índice de tablas	vi
Índice de figuras	vii
Índice de apéndices	viii
Resumen	ix
Abstract	x
Introducción	1
Objetivo	6
Especie de estudio	7
Hipótesis	9
Materiales y métodos	11
Muestreo	11
Extracción de ADN y técnicas moleculares	11
Análisis de datos	12
Resultados	14
Discusión y Conclusiones	19
Bibliografía	26
Apéndices	32



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Sitios palinológicos	9
Tabla 2. Localidades con coordenadas, número de individuos, frecuencias haplotípicas e índices de diversidad	17

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Extención de los hielos durante el UMG	3
Figura 2. Red de haplotipos	14
Figura 3. Mapa de distribución de los haplotipos	16
Figura 4. Modelo de la expansión postglacial de <i>L. philippiana</i>	22

ÍNDICE DE APENDICES

Apéndice 1: Fst de a pares de poblaciones	32
Apéndice 2: Resultados completos SAMOVA	33

RESUMEN

Los ciclos glaciales del cuaternario han causado contracciones y expansiones del rango de las especies. En Chile se ha propuesto, a partir de evidencia fitogeográfica y palinológica, que las especies de los bosques templados se habrían contraído hacia el norte persistido en la Cordillera de la Costa y en la Depresión Intermedia durante las fases climáticas frías. Algunos estudios genéticos recientes han propuesto persistencia en los Andes y a altas latitudes para las especies más tolerantes al frío. En este trabajo se estudió el patrón genético de una especie arbórea de los bosques del sur de Sudamérica, *Laureliopsis philippiana*, con el marcador cloroplastidial trnL-trnF. Se logró identificar tres haplotipos, uno de ellos distribuido al norte de los 40°S y otro al sur. El tercero es de baja frecuencia y también se encuentra al sur de los 40°S. Se propone que la especie persistió en el área de la Cordillera de la Costa en el norte de su rango de distribución actual. Los Andes y la parte sur fueron colonizados recientemente. Dentro del refugio existe una fuerte diferenciación en dos grupos (Cordillera Pelada y Nahuelbuta) que persistieron de forma independiente durante la glaciación. La evidencia genética muestra que las poblaciones andinas son productos de la inmigración de haplotipos desde ambas fuentes generándose una zona de sutura.

ABSTRACT

Quaternary glacial cycles caused contractions and expansions of species' range. It has been proposed, from phytogeographical and palynological evidence, that species of Chilean temperate forests contracted northwards, persisting in the Coastal Mountain Range and Intermediate Depression during cold climatic phases. Some recent genetic studies propose persistence in the Andes and at high latitudes of more cold tolerant species. In this study the genetic pattern of an arboreal species belonging to southern-southamerican forests, *Laureliopsis philippiana*, was investigated with chloroplastial marker trnL-trnF. Three haplotypes were found, one of them distributed north of 40°S and another south of 40°S. The third haplotype has low frequency and is also distributed south of 40°S. We propose that the study species persisted in the Coastal Mountain Range in the northern part of its current distribution range. The Andes and southern range were colonized recently. Within the refuge there are two strongly differentiated groups (Pelada Range and Nahuelbuta Range) that persisted independently during the glaciation. Genetic evidence shows Andean populations to be the result of immigration from both sources that generated a suture zone.

INTRODUCCIÓN

Actualmente nos encontramos en un período interglacial de condiciones climáticas 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). Dentro de estos ciclos hay oscilaciones climáticas que ocurren a una escala milenial (e.g. McManus y col. 1999, Heusser y col. 1999a). Estos cambios climáticos han afectado a la biota, causando 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. Muchas especies se extinguieron en gran parte de su rango de distribución durante las fases frías. Estas especies habrían persistido en áreas climáticamente más favorables llamadas refugios glaciales (e.g. Holderegger & Thiel-Egenter 2009). El concepto de refugio ha sido expandido para referirse al área ocupada por una especie durante una contracción de su rango desde la que expande en condiciones más favorables, lo que implica que especies frío tolerantes no tendrían refugios glaciales, sino que refugios interglaciales (Stewart y col. 2010). Además el concepto de microrefugios o refugios crípticos, que serían poblaciones restringidas a microclimas favorables y demasiado pequeñas para ser detectadas con métodos palinológicos, ha generado cierta discusión respecto a la manera de inferirlos. (Stewart & Lister 2001, Gómez & Lunt 2007, Rull 2009, Stewart y col. 2010).

El Último Máximo Glacial (UMG), hacia el final de la última glaciación, está datado entre 29,385 y 14,805 ^{14}C yr (Denton y col. 1999b). En Isla Grande de Chiloé una

reconstrucción de paleotemperatura a partir de proporciones de distintos taxa en un registro palinológico indica temperaturas de hasta 8°C menores que en la actualidad (Heusser y col. 1999b). Los vientos del oeste (westerlies) se habrían desplazado hacia el norte, por sobre los 41°S durante el UMG, causando mayores precipitaciones (Moreno y col. 1999). A través de modelos numérico se ha postulado un aumento de entre 0.2 y 1 milímetros por mes (mm/mo) mayores que en la actualidad para gran parte de Chile (Kaplan y col. 2008). 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), lo que tiene consecuencias biogeográficas dada la formación de puentes de tierra. En Chile se habría formado un puente de tierra entre Isla Grande de Chiloé y el continente (Moreno y col. 1994). La extensión máxima de los glaciares se puede reconstruir a partir de evidencias geológicas, como por ejemplo las morrenas depositadas por los glaciares. Una reconstrucción de la extensión de los hielos de la última glaciación (Hollin & Schilling 1981) se muestra en la figura 1, en la que se ve que aproximadamente dos tercios de la superficie actual de los bosques del sur de sudamérica fueron devastados por los glaciares (Villagrán & Hinojosa 1997).

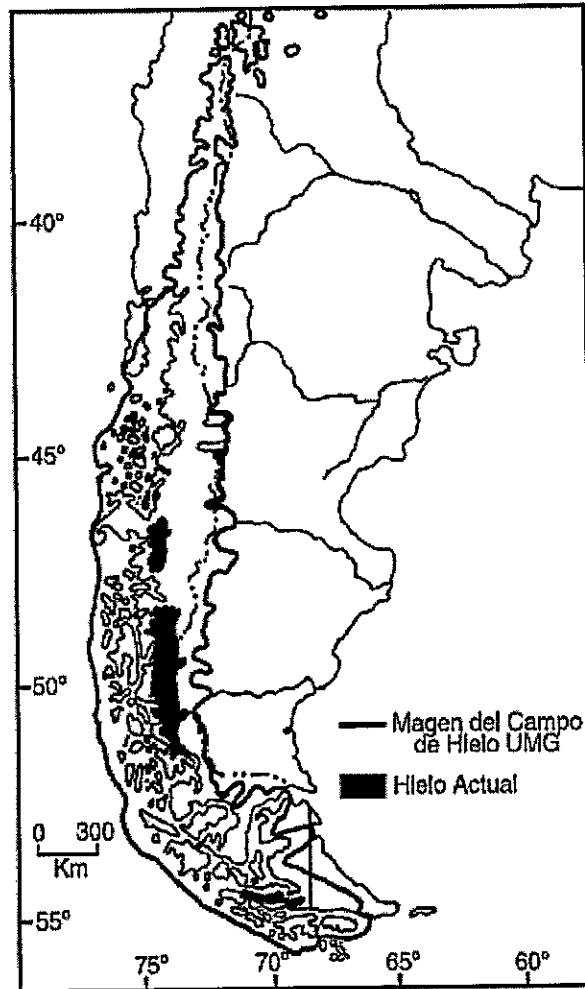


Figura 1. Límite de la extensión de los hielos durante la última glaciación. Tomada de Hollin & Schilling (1981).

Las respuestas de la vegetación a las condiciones glaciales se pueden estudiar a través de evidencias palinológicas, fitogeográficas y genéticas. La palinología reconstruye la vegetación a través del tiempo estudiando los microfósiles (polen y esporas) depositados y preservados en sedimentos. Para el caso de Chile se ha sugerido, a partir de la evidencia del registro palinológico, que las especies de los bosques

templados del sur de Sudamérica habrían sobrevivido 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).

Por otro lado, 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).

Las evidencias genéticas pueden ayudar a dilucidar el pasado de las especies dado que el patrón genético intraespecífico refleja su historia poblacional. En una rápida expansión postglacial no todos los propágulos se dispersarán exitosamente, por lo que las nuevas poblaciones serán fundadas por un subconjunto de los individuos de la población fuente. Una serie de estos “efectos fundadores” son equivalentes a una serie de cuellos de botella poblacionales, con su consecuencia de pérdida de diversidad genética, lo que se ha propuesto a partir de estudios de simulación (Ibrahim y col. 1996) y empíricos (Taberlet y col. 1998, Hewitt 2000). Por otro lado, dos poblaciones que han estado separadas por un período de tiempo considerable estarán diferenciadas debido a la acumulación de mutaciones (Avice y col. 1987, Taberlet y col. 1998). La mayoría de estas mutaciones son neutras frente a la selección natural por encontrarse en regiones no codificantes del genoma, por lo que la diferenciación no necesariamente se debe a

factores ambientales sino que puede deberse sólo al aislamiento. Cuando las rutas de colonización provenientes de dos poblaciones fuente se encuentran forman zonas de sutura, las que presentan mayor diversidad debido a la mezcla de linajes distintos, pero no debieran tener haplotipos (alelos) únicos (Petit y col. 2003, Hewitt 2004). Estas zonas de sutura pueden ser estables en el tiempo (Hewitt 2001).

Se han hecho estudios genéticos en varias especies de los bosques templados del sur de Sudamérica, con distintos resultados. En *Aextoxicon punctatum*, una especie del bosque valdiviano, marcadores RAPD muestran que las poblaciones más diversas se encuentran al norte de los 40° S, por lo que se pueden interpretar como refugiales (Núñez-Ávila & Armesto 2006). Otro estudio en una especie termófila, *Eucryphia cordifolia*, utilizó ADN cloroplastidial (cpDNA) y encontró alta diversidad en la Cordillera de la Costa, lo que se interpretó como evidencia de un único refugio costero (Segovia 2010). En *Weinmannia trichosperma* se postula persistencia de la especie en el norte de su distribución actual durante el UMG a partir de un marcador de cpDNA (Montenegro 2011). Por otro lado, para algunas especies, especialmente frío tolerantes, se ha sugerido que poblaciones persistieron en la Cordillera de los Andes y a altas latitudes (> 42°S), en áreas que se habrían encontrado dentro del límite glacial según la reconstrucción de Hollin & Schilling (1981).

Marchelli & Gallo (2006) sugieren múltiples refugios glaciales en *Nothofagus alpina* en la costa y en los Andes a partir de cpDNA, por encontrar haplotipos únicos en los Andes. En la conífera *Fitzroya cupressoides* se sugiere persistencia en los Andes a partir de isoenzimas (Premoli y col. 2000). Usando marcadores de isoenzimas en

Pilgerodendron uviferum, otra conífera, se sugiere persistencia de la especie hasta a los 45° S, en el área que habría estado cubierta de hielo en el UMG, dada la alta diversidad de esas poblaciones (Premoli y col. 2002). En *Embothrium coccineum* se han sugerido refugios en ambas vertientes de los Andes e incluso uno al sur de los 44°, utilizando isoenzimas (Souto & Premoli 2007). Un estudio reciente en *Nothofagus pumilio* encontró un quiebre genético importante a los 42° S en cpDNA, lo que contrasta con los resultados obtenidos con isoenzimas (Mathiasen & Premoli 2010). En *Dromiciops gliroides*, mamífero del orden Microbiotheria endémico de Chile y Argentina, se encontró un patrón filogeográfico consistente en varios grupos diferenciados genéticamente, dispuestos en sentido latitudinal y signos de expansión desde la costa hacia los Andes (Himes y col. 2008). Este pequeño mamífero está fuertemente asociado a bosques templados, por lo que su historia puede dar indicios de la historia del bosque. A partir de estos ejemplos se puede apreciar que las especies tienen una gran diversidad de respuestas frente a los cambios climáticos producidos por los ciclos glaciales. La mayoría de los estudios hasta la fecha se han hecho sobre especies frío tolerantes, por lo que faltan más estudios en especies más termófilas.

Objetivo

El objetivo de este estudio es estudiar el patrón genético actual de *Laureliopsis philippiana* a partir de secuencias de cpDNA, para hacer inferencias sobre su biogeografía histórica. Específicamente se busca responder dónde se localizan el o los

refugios glaciales desde los cuales la especie recolonizó su hábitat actual. Esto mejorará nuestra comprensión sobre las dinámicas de las especies de los bosques del sur de Sudamérica frente a los cambios climáticos pasados, especialmente de las especies menos frío tolerantes.

Especie de Estudio

Laureliopsis philippiana (tepa) es un árbol que 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. Es más tolerante al frío que especies netamente valdivianas como por ejemplo *Euryphia cordifolia*, pero menos que especies subantárticas como *Nothofagus pumilio* y *Nothofagus antarctica*. 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). Las flores pueden ser hermafroditas o masculinas. La filogenia molecular indica que *Laurelia novae-zelandiae* es la especie hermana (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 es importante cuando se abren claros en el bosque y no hay competencia con *Chusquea quila* (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).

El registro palinológico de *L. philippiana* no es muy abundante y en baja frecuencia (<10%). No se puede distinguir entre el grano de *Laurelia sempervirens* y *L. philippiana*. En la tabla 1 se muestran los siete sitios palinológicos desde la última glaciación hasta el presente en los que se ha registrado *Laurelia/Laureliopsis*.

Sitio	Latitud	Longitud	Edad (14C yr B. P.)	Fuente Bibliográfica
Lago Puyehue	-40.67	-72.47	13410* +- 100	Vargas-Ramírez y col. 2008
Los Mallines	-40.77	-72.28	3500* +-100	Vargas-Ramírez y col. 2008
Alerce	-41.39	-72.88	13073 +- 92	Heusser y col. 1999
Fundo Santa Elena	-41.50	-73.10	13870 +- 95	Heusser y col. 1999
La Campana	-41.63	-73.19	11672 +- 71	Heusser y col. 1999
Mayol	-42.64	-73.76	12505 +- 77	Heusser y col. 1999
Laguna Tahui	-42.83	-73.50	13500*	Abarzúa y col. 2004

Tabla 1. Sitios palinológicos con coordenadas, edad a la que aparece *Laurelia/Laureliopsis* (en años de carbono 14) y fuente bibliográfica. Los asteriscos indican las edades que corresponden a la base de la secuencia.

Aunque no se pueda distinguir entre el polen de *Laurelia* y *Laureliopsis*, a lo menos las presencias más tempranas en los registros polínicos probablemente correspondan a *L. philippiana* y no a *L. sempervirens*, porque la primera es mucho más frío tolerante que la segunda. La expansión de *L. philippiana* ocurre antes que la de *Eucryphia/Caldcluvia* y *Weinmannia trichosperma*, elementos que también pertenecen a los bosques valdivianos y nordpatagónicos. Por otro lado su aparición es posterior a la de elementos frío tolerantes como coníferas, *Embothrium* y *Drimys* y coincide con una baja de la proporción de *Nothofagus* tipo *dombeyi*. Todos los estos registros se encuentran en la región de los lagos y la primera presencia de *L. philippiana* en todos ellos está datado para el tardiglacial, lo que es un indicio de la expansión posterior al UMG en la parte centro-sur del rango de distribución de la especie.

Hipótesis

En concordancia con la evidencia palinológica y el patrón fitogeográfico, se predice que *L. philippiana* persistió en la parte norte de su rango de distribución actual, a lo largo de la costa en la zona que no habría estado glaciada, zona en la que se cree sobrevivieron los bosques valdivianos y nordpatagónicos. Se espera obtener señales genéticas de expansión desde la costa en el norte del rango de distribución de la especie hacia el resto de su rango actual. En esta área se podría encontrar mayor diversidad genética. No se espera encontrar haplotipos únicos en la Cordillera de los Andes, ni a altas latitudes (>42°S) que sugieran persistencia de la especie en refugios crípticos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo

Se muestrearon 20 poblaciones naturales de *L. philippiana* a lo largo de su rango de distribución geográfica en Chile (tabla 2, sección resultados). En cada población se tomaron muestras de hojas de 10 individuos separados por 50 metros en lo posible para evitar tomar un individuo dos veces debido a la reproducción vegetativa. Las muestras se secaron y conservaron en sílica gel.

Extracción de ADN y técnicas moleculares

Se molieron 20-50 mg de tejido utilizando un tissue lyzer (Quiagen). Se extrajo ADN utilizando un kit de extracción DNEasy Plant Mini Kit (Quiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Se utilizaron secuencias de cpDNA como marcador molecular. Este tipo de marcador es de herencia materna, es decir, es transmitido a través de la semilla, en la mayoría de las angiospermas. Para encontrar un segmento que muestre niveles de variabilidad adecuados se realizó una prueba de partidores con 2 individuos de cada una de tres poblaciones distintas geográficamente separadas. Para esto se amplificaron 6 segmentos de ADN de regiones no codificantes (intrones y espaciadores intergénicos) utilizando partidores universales (Taberlet y col. 1991, Grivet y col. 2001, Shaw y col.

2007). Se verificó la existencia de un producto único de amplificación por electroforesis, en geles de agarosa, teñidos con GelRed (Biotium) y visualizados con luz UV en un transiluminador. Las muestras se mandaron a secuenciar a un centro de secuenciación (Macrogen, Korea). Se alinearon las secuencias obtenidas en el programa Bioedit 7.0.5.3, y se evaluó el nivel de polimorfismo entre las secuencias. Se eligió el segmento trnL-trnF que contiene un intrón y un espaciador intergénico, dado que era el único segmento que presentó polimorfismos. Se utilizaron los partidores “c” y “f” de Taberlet y col. (1991) para la amplificación. Además se incluyeron algunos individuos de la única especie de la misma familia (atherospermataceae) que existe en Chile, la que además es muy similar para excluir la posibilidad que la captura de cloroplasto por hibridización o la confusión de las especies en terreno interfieran con los resultados. Una vez elegido el marcador se secuenciaron todos los individuos utilizando el partidador “f”.

Análisis de datos

Para evaluar las relaciones entre los haplotipos, se construyó una red de haplotipos utilizando el método Median Joining (Bandelt y col. 1999) en Network 4.6 (fluxus-engineering.com). Esta red muestra todos los haplotipos con sus frecuencias y con los pasos mutacionales que los conectan.

Se describieron los datos con parámetros de diversidad estándar: número de sitios polimórficos (S), número de haplotipos (K), diversidad haplotípica (H), diversidad nucleotídica (π) y número promedio de diferencias entre secuencias (II). Se calcularon

índices de diferenciación (F_{st}) para todos los pares de poblaciones evaluando su significancia estadística con permutaciones. Estos análisis se realizaron en Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer 2010).

Para encontrar el agrupamiento de poblaciones, con sentido geográfico, que maximice la varianza entre grupos se realizó un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) (Dupanloup y col. 2002). El SAMOVA realiza varios AMOVA (Análisis de varianza molecular, Excoffier y col. 1992) con distintas configuraciones de las poblaciones en grupos para distintos números de grupos, particionando la varianza en varianza total, varianza entre poblaciones pertenecientes al mismo grupo y varianza entre grupos distintos. El SAMOVA utiliza un algoritmo de búsqueda para encontrar grupos geográficamente homogéneos que estén máximamente diferenciados. Este análisis se implementó en SAMOVA 1.0, utilizando 100 condiciones iniciales con 2-6 grupos. También se utilizó el Algoritmo de máxima diferencia de Monmonier (Monmonier 1973) el que traza una línea entre el par de poblaciones adyacentes más diferenciado y la extiende hacia ambos lado siempre por la vía de mayor diferenciación. Este algoritmo se implementó en Alleles in Space 1.0 (Miller 2005). Simulaciones muestran que ambos métodos tienen buen desempeño para detectar estructuración entre poblaciones, especialmente si es fuerte (Dupaloup y col. 2002).

RESULTADOS

El alineamiento de las secuencias de la región trnL-trnF tuvo un largo de 703 posiciones con dos sitios polimórficos: una transición y una inserción-delección, ubicados aproximadamente 580 y 680 pares de bases desde el comienzo de la secuencia, respectivamente. Ambos sitios se encuentran en el intrón trnL. Esto da tres haplotipos separados por una base. Para *Laurelia sempervirens* se encontró un solo haplotipo separado por 23 sitios polimórficos del haplotipo H2 detectado en *Laureliopsis philippiana*. No se encontró en ningún individuo de *L. philippiana*, por lo que se descarta la posibilidad de captura de cloroplasto o error de muestreo. La red de haplotipos se muestra en la figura 2.

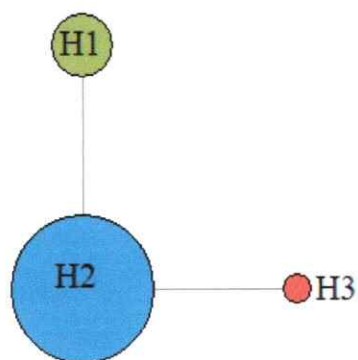


Figura 2. Red de haplotipos. H1 y H3 están separados por una mutación de H2. Los tamaños de los círculos indica el número de individuos en los que se encontró el haplotipo. El haplotipo de *L. sempervirens* se encuentra a 23 pasos mutacionales de H2.

Se encontró baja diversidad intrapoblacional, la mayoría de las poblaciones están fijadas para un sólo haplotipo (tabla 2, figura 3), y solo 5 poblaciones tienen más de un haplotipo. El haplotipo H1 se distribuye casi exclusivamente al norte de los 40°S (figura 3). Está fijado en Contulmo y Nahuelbuta y aparece en Caunahue y Puyehue. Al sur de los 40°S casi todas las poblaciones están fijadas para el haplotipo H2. El haplotipo H3 es de muy baja frecuencia y distribución disyunta, aparece sólo en Manao, Hornopirén y Queulat.

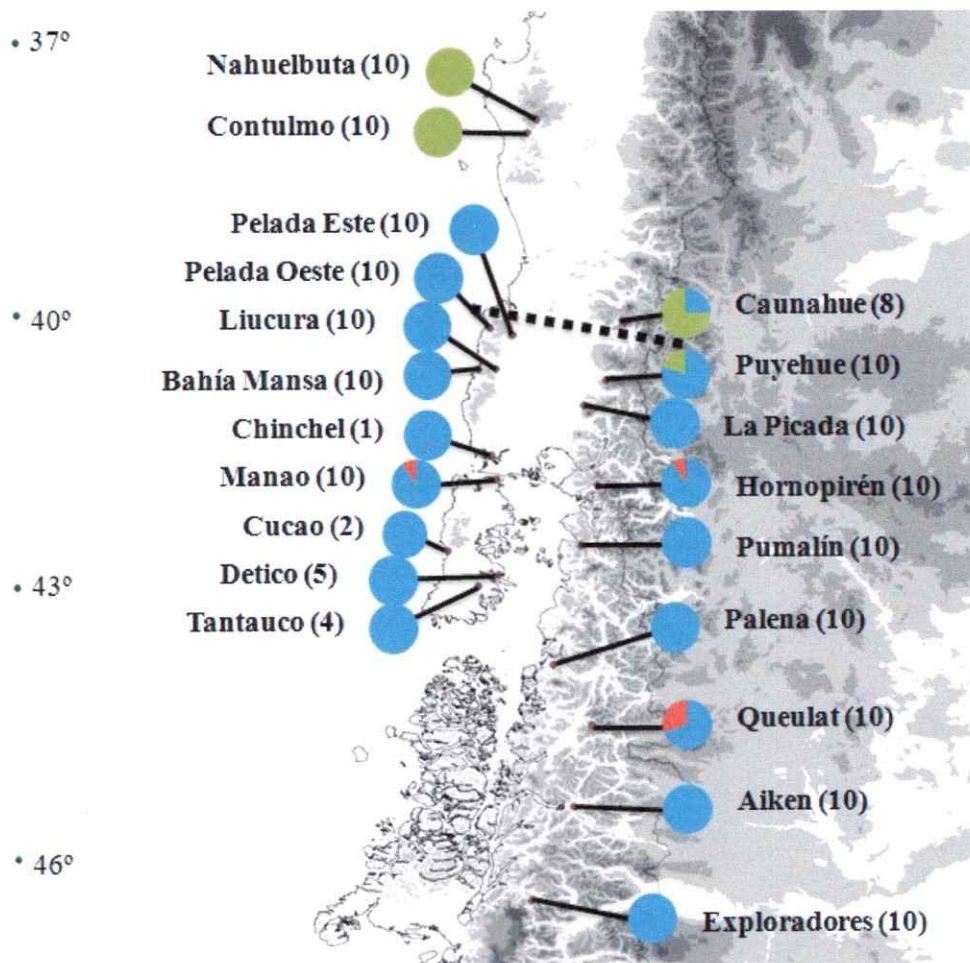


Figura 3. Mapa de distribución de los haplotipos en las poblaciones de *L. philippiana*. Colores igual que en la fig. 2. Entre paréntesis se indica el número de individuos muestreados en cada población. La línea punteada indica el quiebre genético apoyado por SAMOVA y Algoritmo de Máxima Diferencia de Monmonier.

	Localidad	Longitud	Latitud	n	H1	H2	H3	S	K	H	π	Π
1	Nahuelbuta	-73.08	-37.86	10	10	0	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
2	Contulmo	-73.18	-38.01	10	10	0	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
3	Caunahue	-72.10	-40.09	8	6	2	0	1	2	0.4286	0.000611	0.428571
4	Pelada Oeste	-73.61	-40.16	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
5	Pelada Este	-73.36	-40.24	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
6	Liucura	-73.55	-40.61	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
7	Bahía Mansa	-73.75	-40.62	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
8	Puyehue	-72.30	-40.74	10	2	8	0	1	2	0.3556	0.000506	0.355556
9	La Picada	-72.56	-41.01	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
10	Chinche	-73.61	-41.56	1	0	1	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
11	Manao	-73.56	-41.84	10	0	9	1	1	2	0.2000	0.000284	0.200000
12	Hornopirén	-72.41	-41.90	10	0	9	1	1	2	0.2000	0.000284	0.200000
13	Pumalín	-72.59	-42.57	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
14	Qucao	-74.11	-42.62	2	0	2	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
15	Detico	-73.53	-42.89	5	0	5	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
16	Tantauco	-73.76	-43.01	4	0	4	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
17	Palena	-72.92	-43.88	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
18	Queulat	-72.48	-44.55	10	0	7	3	1	2	0.4667	0.000664	0.466667
19	Aiken	-72.69	-45.44	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
20	Exploradores	-73.17	-46.48	10	0	10	0	0	1	0.0000	0.000000	0.000000
	Promedio							0.25	1.25	0.0825	0.000117	0.082540
	Total			170	28	137	5	2	3	0.3245	0.000475	0.334215

Tabla 2. Coordenadas, 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).

El índice de diferenciación poblacional (F_{ST}) calculado por SAMOVA es de 0.89982 y es altamente significativo ($p < 0.00001$). El SAMOVA separó las poblaciones Contulmo, Nahuelbuta y Caunahue del resto de las poblaciones con $k=2$. Esta partición es geográficamente coherente dado que separa poblaciones al norte y al sur de los $40^{\circ}S$ aproximadamente. 88.84% de la variación se debe a diferencias entre los grupos, con el índice de fijación entre grupos (F_{CT}) altamente significativo ($p < 0.00001$). La varianza entre grupos es sólo un 0.11% mayor para $k=3$ y a mayores valores de k disminuye, por lo que se considera que con $k=2$ se obtiene la mejor ordenación de las poblaciones. El Algoritmo de Máxima diferencia de Monmonier separa las mismas tres poblaciones del resto.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Laureliopsis philippiana presenta bajos niveles de variabilidad en el genoma cloroplastidial comparada con otras especies arbóreas templadas de Sudamérica. En la especie criófila *Nothofagus pumilio* se encontraron 2, 6 y 11 haplotipos en distintos segmentos del cloroplasto (Mathiasen & Premoli 2010). En otra especie criófila, *Embothrium coccineum*, se encontraron 9 y 11 haplotipos en distintos segmentos (Vidal-Russel y col. 2011). Algunas posibles explicaciones serían: (i) las fuertes contracciones de rango esperadas para las especies templadas durante los estadios glaciales y expansión reciente conduciendo a una diversidad menor que la de equilibrio, debido a un efecto cuello de botella (Nei y col. 1975), (ii) por la reproducción vegetativa que disminuye el tamaño poblacional efectivo. Sin embargo en otras especies termófilas que se han estudiado, como *Eucryphia cordifolia* se encontraron 9 haplotipos (Segovia 2010) y en *Weinmannia trichosperma* se encontraron 6 (Montenegro, 2011) comparados con los tres haplotipos en *L. philippiana* con el mismo tipo de marcador (cpDNA). Interesantemente, en *Atherosperma moschatum*, especie que se distribuye en los bosques templados del sureste de Australia y que también pertenece a las atherospermatáceas, también se encontraron bajísimos niveles de diversidad: sólo 8 sitios polimórficos y 6 haplotipos en un alineamiento de más de tres mil pares de bases (Worth y col. 2011).

A pesar de la baja variabilidad y divergencia poco profunda entre haplotipos existe una fuerte estructuración poblacional. Las localidades de Contulmo y Nahuelbuta (y en menor medida Caunahue) están fuertemente diferenciadas de la mayoría de las

demás localidades (tabla 3, fig. 3). El SAMOVA indica un quiebre genético fuerte (88.84% de la varianza es por diferencias entre los grupos) y altamente significativo ($p < 0.00001$) entre estas tres localidades y las demás. El algoritmo de Monmonier también encuentra este quiebre (fig. 3). Para explicar esto es necesario suponer por lo menos un refugio glacial al norte y otro al sur de los 40°S en el área de la Cordillera de la Costa, dado que la diferenciación es demasiado marcada para deberse a deriva reciente, especialmente considerando el largo tiempo generacional de la especie.

En los faldeos de los Andes hay dos localidades, Caunahue y Puyehue, que tienen los haplotipos H1 y H2 y una mayor diversidad respecto a las demás localidades. Surge la pregunta de si se trata de una zona de refugio o de una zona de sutura, ya que para ambas se esperaría una mayor diversidad. Probablemente se trata de una zona de sutura y no de una zona de refugio, porque: (i) no se encuentran haplotipos únicos en la zona de sutura, (ii) la colonización desde una zona refugial implica pérdida de diversidad, pero no necesariamente diferenciación entre distintas zonas colonizadas y (iii) las evidencias independientes tanto palinológicas (Villagrán 2001) como fitogeográficas (Villagrán & Hinojosa 1997) sugieren persistencia de los bosques en la costa y además estas posibles áreas de sutura se habrían encontrado dentro del límite glacial (Hollin & Schilling 1981, fig. 1). Todas estas consideraciones indican que es poco parsimonioso interpretar esta zona como una zona de refugio.

La distribución del haplotipo H3 es difícil de explicar. Este haplotipo es de baja frecuencia (5 de 170 individuos) y aparece de forma disyunta en Manao, Hornopirén y Queulat, localidades que no están adyacentes unas a las otras (Fig. 3). Tomando en

cuenta que en dos de las tres poblaciones en que se encontró corresponde sólo a un individuo, es probable que tenga una distribución más amplia de lo observado, pero a muy bajas frecuencias y que lo observado se deba a la estocasticidad del muestreo o a la pérdida del haplotipo en algunas localidades por deriva génica, la que actúa de manera más fuerte sobre haplotipos de baja frecuencia. Si su origen correspondiera a un tercer refugio críptico (por ejemplo a la latitud de Queulat o en la vertiente este de los Andes a la latitud de Hornopirén) entonces esperaríamos una distribución más localizada y zonas de sutura con los otros haplotipos e incluso que el frente de colonización de este refugio bloqueara el de algún refugio más al norte (al igual que el haplotipo H2 bloquea el avance de H1), por lo que no se esperaría encontrar el haplotipo H2 en el extremo sur del rango de distribución de la tepa. Es improbable la posibilidad que provenga de un refugio críptico en la vertiente este de los Andes o en la parte más austral del rango de *L. philippiana*. H3 es más cercano a H2 que a H1 (fig. 2) por lo que se propone que durante el UMG se encontraba en el refugio al sur de los 40°S junto a H2, pero a baja frecuencia y ambos haplotipos se expandieron en conjunto. En la figura 4 se muestra un modelo de expansión postglacial para *L. philippiana*.

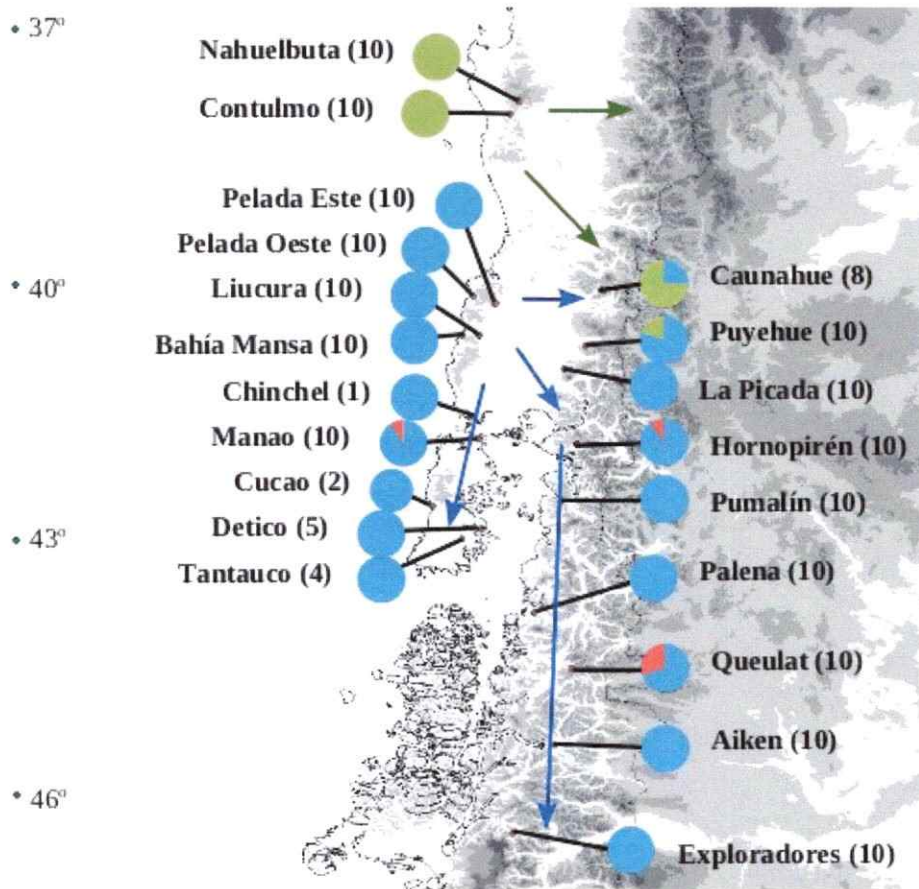


Figura 4. Modelo de la expansión postglacial de *L. philippiana*. Distribución de los haplotipos igual que en la figura 3. Las flechas indican la dirección general que se propone para la expansión postglacial de *L. philippiana*.

Es interesante notar que el quiebre genético a los 40°S aproximadamente también se da en la otra especie nordpatagónica estudiada *Weinmannia trichosperma* (Montenegro 2011). Esta especie tiene ciertas similitudes a *L. philippiana*, sus rangos de distribución coinciden en gran parte y ambas especies son entomófilas y anemócoras. En el monito del monte, *Dromiciops gliroides*, también se encontró un quiebre genético a

los 40°S aproximadamente (Himes y col. 2008). Este pequeño mamífero está fuertemente asociado a los bosques. Esta concordancia filogeográfica es notable dado el bajo número de estudios de este tipo que se han hecho en Chile, y apunta a una historia común. Hay que notar que *L. philippiana* y *W. trichosperma* presentan una posible zona de sutura en los Andes mientras que en *D. gliroides* los haplogrupos están separados a lo largo de todo su rango longitudinal. En la especie criófila *Nothofagus pumilio* también se describe un quiebre genético a los 40°S. En la especie valdiviana *E. cordifolia* no se presenta este quiebre genético (Segovia 2010), ni en *Aextoxicon punctatum* (Núñez-Ávila & Armesto 2006). Por otra parte se da un quiebre genético más al sur para algunas especies criófilas: a los 43°S para *Podocarpus nubigena* (Quiroga & Premoli 2010), a los 42°30'S para *Nothofagus antarctica* (Pastorino y col. 2009) y a los 42°S para *Nothofagus pumilio*. Para esta última especie el quiebre a los 42°S es mucho más importante que el a los 40°S y ocurre también en las demás especies del subgénero *Nothofagus* (Acosta & Premoli 2010, Mathiasen & Premoli 2010). Este quiebre genético se ha interpretado como una consecuencia de eventos pre-cuaternarios (Quiroga & Premoli 2010, Mathiasen & Premoli 2010). *L. philippiana* y *W. trichosperma* no presentan este segundo quiebre ubicado entre los 42 y 43°S.

A partir de estos datos se propone que *L. philippiana* persistió a lo largo de la parte no glaciada de la Cordillera de la Costa, confirmando esta región como un área de refugio para la flora de bosque durante el UMG (Villagrán 2001) y desde la cual se habría expandido hacia los Andes y sur de los 40°S a medida que las condiciones climáticas se hicieron favorables. Dentro del área de refugio en la Cordillera de la Costa,

nuestros resultados señalarían dos fuentes de expansión poblacional para la tepa en las cordilleras de Nahuelbuta ($\approx 37^{\circ}30'S$) y Pelada ($\approx 40^{\circ}15'S$). Los Andes habrían sido colonizados desde estas fuentes generando una zona de sutura, mientras que el sur del rango actual habría sido colonizado sólo por poblaciones provenientes del refugio al sur de los $40^{\circ}S$. Esta hipótesis es consistente con los pocos registros palinológicos en los que aparece *L. philippiana*, que muestran la primera presencia en la depresión intermedia de la Región de los Lagos ($\approx 41^{\circ}30'S$) entre 13.8 y 11.6 ^{14}C kyr y en Isla Grande de Chiloé ($\approx 42^{\circ}45'S$) entre 13.5 y 12.5 ^{14}C kyr (tabla 1). No se encontró ninguna evidencia clara de que hubieran existido refugios crípticos a latitudes más altas. Nada en el patrón encontrado indica persistencia de *L. philippiana* en la vertiente este de los Andes, aunque sin un muestreo de las poblaciones argentinas no se puede descartar la posibilidad por completo.

Un resultado importante es la distinción entre las poblaciones de Nahuelbuta y Cordillera Pelada. Esta área entre ambas cordilleras ($\approx 36^{\circ}-40^{\circ}S$) ha sido destacada como la región de mayor diversidad en plantas y posible refugio costero en la Cordillera de la Costa (Villagrán & Hinojosa 1997; Villagrán 2001). Los datos aquí presentados confirmarían su calidad de refugio, pero además evidenciarían que dentro de esta zona sería posible distinguir a ambas Cordilleras como lugares de persistencia de las especies. La diferenciación entre ambas cordilleras podría estar dada por alguna restricción al flujo génico. Esto es un tema a estudiar, donde el estudio detallado del área entre ambas cordilleras será fundamental para comprender la historia biogeográfica al interior del refugio costero.

Los resultados de un estudio como este podrían ser expandibles a otros sujetos de estudio, como *Weinmannia trichosperma* (Montenegro 2011) y *Dromiciops gliroides* (Himes y col. 2008), en los cuales se han encontrados patrones similares en el área de refugio de la Cordillera de la Costa y Depresión Intermedia. Finalmente, no se encontraron evidencias genéticas de refugios a altas latitudes ($>42^{\circ}\text{S}$) como se ha propuesto, por ejemplo, para *Embothrium coccineum* (Souto & Premoli 2007, Vidal-Russel y col. 2011), *Nothofagus pumilio* (Mathiasen y col. 2010) y *Pilgerodendron uviferum* (Premoli y col. 2002) ni haplotipos únicos que implicarían refugios andinos, como los sugeridos, por ejemplo, en *Nothofagus alpina* (Marchelli & Gallo 2006).

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. *Mol. Biol. Evol.* 16(1):37–48
- Denton GH, Lowell TV, Heusser CJ, Moreno PI, Andersen BG, Heusser LE, y col. 1999a Interhemispheric linkage of paleoclimate during the last glaciation. *Geografiska Annaler* 81: 107–153.
- Denton GH, Lowell TV, Heusser CJ, Schluchter C, Andersen BG, Heusser LE, Moreno PI & Marchant DR 1999b Geomorphology, stratigraphy, and radiocarbon chronology of llanquihue drift in the area of the southern lake district, seno reloncavi, and isla grande de chiloe, chile. *Geografiska Annaler Series a-Physical Geography*, **81A**: 167-229
- Donoso C, 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 (ed. by C. Donoso Zegers), pp 302-313
- Dupanloup I, Schneider S & Excoffier L 2002 A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology* 11: 2571-2581
- 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.
- Gómez A & Lunt DH 2007 Refugia within refugia: Patterns of phylogeographic concordance in the Iberian Peninsula. En: Weiss S & Ferrand N (eds.) *Phylogeography of southern European refugia*. Springer, The Netherlands. pp 155-188.

- 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
- Heusser L, Heusser C, Kleczkowski A, Crowhurst S 1999a 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 CJ, Heusser, LE & Lowell TV 1999b Paleocology of the southern Chilean lake district-isla grande de Chiloe during middle-late Illanquihue 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 from molecular phylogeography. *Frontiers in Zoology* 1:4 doi:10.1186/1742-9994-1-4
- 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.
- 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
- 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. *J. Quaternary Sci.* 23: 649–658
- 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.

McManus JF, Oppo DW, Cullen JL 1999 A 0.5-million-year record of millennial-scale climate variability in the north atlantic. *Science* 283: 971-975.

Miller MP 2005 Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.

Monmonier MS 1973 Maximum-difference barriers: an alternative numerical regionalization method. *Geographical Analysis* 5: 245-261.

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

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

- 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, Aguinagalde 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
- Renner SS, Foreman DB, Murray DM 2000 Timing Transantarctic Disjunctions in the Atherospermataceae (Laurales): Evidence from Coding and Noncoding Chloroplast Sequences. *Syst. Biol.* 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
- 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). *N.Z. J Bot.* 7: 214-40
- Segovia R 2010 Filogeografía de *Eucryphia cordifolia*: historia glacial y diversidad genética en los bosques templado lluviosos del sur de sudamérica. Tesis de Magister, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile.
- Sepúlveda CA & Troncoso AA 2004 Hallazgo de *Laureliopsis philippiana* (Looser) Schodde (Atherospermataceae) en el área costera de la Region 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

Stewart JR, Lister AM, Barnes I & Dalén L 2010 Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proc. R. Soc. 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

Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF 1998 Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453–464.

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

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

Villagrán 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

Worth JRP, Marthick JR, Jordan GJ, Vaillancourt RE 2011 Low but structured chloroplast diversity in *Atherosperma moschatum* (Atherospermataceae) suggests bottlenecks in response to the Pleistocene glacials. *Annals of Botany* doi:10.1093/aob/mcr220

APÉNDICE 1

1	0.991	0.189	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
2	0.000	-	0.180	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
3	0.181	0.181	-	0.009*	0.000**	0.009*	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**	0.000**
4	1.000	1.000	0.743	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
5	1.000	1.000	0.743	0.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
6	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
7	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	0.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
8	0.778	0.778	0.401	0.111	0.111	0.111	0.111	-	0.514	0.991	0.523	0.450	0.514	0.991	0.613	0.613	0.523	0.108	0.459
9	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.225	0.991
10	1.000	1.000	0.429	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.778	0.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
11	0.909	0.909	0.642	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.000	-1.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.596	0.991
12	0.909	0.909	0.642	0.000	0.000	0.000	0.000	0.074	0.000	-1.000	-0.111	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991	0.514	0.991
13	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.189	0.991
14	1.000	1.000	0.543	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.212	0.000	0.000	-0.324	-0.324	0.000	-	0.991	0.991	0.991	0.991	0.991
15	1.000	1.000	0.628	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.026	0.000	0.000	-0.121	-0.121	0.000	0.000	-	0.991	0.991	0.423	0.991
16	1.000	1.000	0.628	0.000	0.000	0.000	0.000	-0.026	0.000	0.000	-0.121	-0.121	0.000	0.000	0.000	-	0.991	0.495	0.991
17	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	-	0.135	0.991
18	0.821	0.821	0.572	0.222	0.222	0.222	0.222	0.178	0.222	-0.556	0.020	0.020	0.222	-0.084	0.076	0.076	0.222	-	0.198
19	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	-
20	1.000	1.000	0.743	0.000	0.000	0.000	0.000	0.111	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.222	0.000

Tabla S1. Bajo la diagonal; FSI de a pares de poblaciones. Sobre la diagonal; valores de p. Los valores significativos están marcados con un asterisco. Los valores significativos después de la corrección de Bonferroni están marcados con dos asteriscos. Los números indican las poblaciones como en la tabla 2.

APÉNDICE 2

K	%	Grupos
2	88.84	(1,2,3);(restantes)
3	88.95	(1,2);(3);(restantes)
4	88.54	(1);(2);(3);(restantes)
5	88.09	(1);(2);(3);(10);(restantes)
6	87.31	(1);(2);(3);(10);(14);(restantes)

Tabla S2. Resultados del SAMOVA. Se muestran número de grupos (K), porcentaje de la varianza debido a diferencias entre los grupos y la configuración de las poblaciones