

UCH-FC
B. Ambiental
Y 126
C. 1



UNIVERSIDAD DE CHILE - FACULTAD DE CIENCIAS - ESCUELA DE PREGRADO

**DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE TRES
POBLACIONES CONTRASTANTES DE *Aphrastura spinicauda***

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.

DIEGO IGNACIO YÁÑEZ ROJAS

Director de Seminario de Título: Dr. Elie Poulin
Co-Director de Seminario de Título: Dr. Rodrigo Vásquez

Septiembre, 2013



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:

DIEGO IGNACIO YAÑEZ ROJAS

DIVERSIDAD Y ESTRUCTURA GENÉTICA DE TRES POBLACIONES CONTRASTANTES DE *Aphrastura spinicauda*

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. Elie Poulin
Director Seminario de Título

Dr. Rodrigo Vásquez Salfate
Co-Director Seminario de Título

Comisión Revisora y Evaluadora

Dr. Michel Sallaberry Ayerza
Presidente Comisión

Dr. David Véliz Baeza
Evaluador

BIOGRAFÍA



Mi nombre es Diego. Nací un 9 de febrero de 1987 en Providencia, Santiago. Segundo hijo de una familia de 6 integrantes, desde pequeño me sentí profundamente maravillado por todo lo natural, salvaje. Amigo de los animales, me sorprende que haya tomado tanto tiempo en comprender que mi camino siempre fue uno solo. La biología ambiental me brindó la oportunidad perfecta de combinar mi pasión por el medio ambiente con mi fuerte deseo de poder lograr un cambio, por más mínimo que este sea.

DEDICATORIA

Dedicado en especial a mi familia. A mis padres por su paciencia, apoyo e interés en pos de mi desarrollo profesional, esto es tan suyo como mío. A mis hermanos por su infinita compañía y amistad. A mis amigos en general, me siento un afortunado. Al Chule por sentarse a mi lado y apoyarse en mis pies mientras escribía.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Chile, por la formación más allá de lo profesional otorgada durante esta importante parte de mi vida. Agradezco en particular al IEB y al Laboratorio de Ecología Molecular por su apoyo durante el desarrollo de esta tesis (FONDECYT 3110059, ICM-P05-002, PFB-23-CONICYT).

ÍNDICE DE CONTENIDOS

	Página
BIOGRAFÍA.....	ii
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
ÍNDICE DE CONTENIDOS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
ÍNDICE DE TABLAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. HIPÓTESIS.....	7
3. OBJETIVOS.....	8
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	9
4.1 Sitios de estudio.....	9
4.2 Captura de individuos.....	9
4.3 Marcadores Moleculares utilizados: microsatélites.....	11
4.4 Amplificación de fragmentos.....	13
4.5 Análisis de datos.....	15
5. RESULTADOS.....	17
5.1 Diversidad de microsatélites.....	17
5.2 Estructuración.....	20
5.3 Eventos Demográficos.....	23
5.4 Tamaño efectivo.....	23
6. DISCUSIÓN.....	25
7. CONCLUSIONES.....	31
8. BIBLIOGRAFÍA.....	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. <i>Aphrastura spinicauda</i>	2
Figura 2. Obtención de muestra de sangre.....	11
Figura 3. Evaluación partidor locus 3.....	12
Figura 4. Ejemplo perfil de microsatélites.....	15
Figura 5. Visualización AFC3D poblaciones de estudio.....	20
Figura 6. Análisis STRUCTURE para las poblaciones de estudio.....	21
Figura 7. Ln (P) de los asignamientos de clusters.....	22
Figura 8. ΔK de los asignamientos de clusters.....	22

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Partidores microsatélites.....	13
Tabla 2. Índices de diversidad por locus.....	18
Tabla 3. Diversidad genética y N° promedio de alelos.....	19
Tabla 4. Alelos compartidos.....	19
Tabla 5. Rarefacción promedio de alelos.....	19
Tabla 6. Valores de <i>F_{st}</i> por pares.....	20
Tabla 7. Exceso y déficit de heterocigotos.....	23
Tabla 8. Tamaño efectivo.....	24

RESUMEN

Especies que poseen un amplio rango de distribución permiten realizar estudios comparativos entre áreas contrastantes y evaluar los principales factores que inciden sobre las poblaciones a nivel local. En este estudio, mediante la utilización de microsátélites, presentamos una caracterización genética de tres poblaciones contrastantes de un passeriforme especialista de bosques, el Rayadito (*Aphrastura spinicauda*). Las poblaciones estudiadas corresponden al (i) Parque Nacional Fray Jorge (30° S), bosque relictivo y fragmentado que representa el límite norte de distribución de la especie, (ii) cerro Manquehue (33° S), bosque esclerófilo colindante a la ciudad de Santiago, e (iii) isla Navarino (55° S), que presenta un bosque continuo y prístino, en el límite sur de distribución de la especie. Estas tres poblaciones presentan contrastes a nivel ecológico, geográfico, geológico, y de intervención humana. Desarrollamos 9 microsátélites especie-específicos. Se observaron diferencias importantes en cuanto a la diversidad genética de las tres poblaciones, así como niveles altamente significativos de estructuración entre ellas, y en particular, para la población del bosque relictivo de Fray Jorge. En cuanto a la inferencia de eventos demográficos, no se detectaron señales sobre la presencia de un cuello de botella en las poblaciones de Fray Jorge y Manquehue. Sin embargo, se observa un proceso de expansión (reciente o actual) en la población de isla Navarino. Los resultados muestran como el aislamiento, la fragmentación y la intervención humana, entre otros factores, afectan la diversidad genética de la especie.

ABSTRACT

Species with a broad distribution range give us the opportunity to perform studies comparing different areas and to assess the factors influencing different populations at a local scale. In this study, using microsatellites as a molecular marker, we present a genetic characterization of three contrasting populations of a forest specialist passeriform, the Thorn-tailed Rayadito (*Aphrastura spinicauda*). The populations selected for this study are (i) Fray Jorge National Park (30°S), a relict fragmented forest that represents the northern limit of distribution of the specie, (ii) cerro Manquehue (33°S), a sclerophyllous forest adjacent to the city of Santiago and (iii) Navarino Island (55°S), a continuous pristine forest, representing the southern distribution limit of the specie. These three populations show different contrasts at an ecological, geographical, geological and human intervention levels. Nine species-specific microsatellites were developed and tested. Significant differences were observed when analyzing genetic diversity in the populations as well as highly significant levels of genetic structure between them, especially for Fray Jorge National Park population. Regarding the demographic events, no signals were detected, thus it was not possible to conclude that a bottleneck event was happening or happened in Fray Jorge National Park and Manquehue populations. However, a process of expansion (recent or present) was observed in Navarino Island. These results show how isolation, fragmentation and human intervention, among other factors, affect genetic diversity in this species.

1. INTRODUCCIÓN

Especies que poseen un amplio rango de distribución permiten realizar estudios comparativos entre áreas contrastantes y evaluar los principales factores que inciden sobre las poblaciones a nivel local. En este estudio, mediante la optimización y caracterización de 9 microsátélites especie-específico, presentamos una caracterización genética de tres poblaciones contrastantes de un passeriforme especialista de bosques, el Rayadito (*Aphrastura spinicauda*), ave endémica de los bosques patagónicos de Chile y Argentina.

El Rayadito (Figura 1), furnáride insectívoro presente en Chile y Argentina, posee un amplio rango de distribución que en nuestro país va desde la IV hasta la XII región. Arbóreo, se encuentra presente en variedad de bosques, desde *Araucaria* y *Nothofagus* hasta matorral xérico y relictos boscosos en las zonas agrícolas (Jaramillo, 2003). Principalmente insectívoro, ocasionalmente pueden ingerir frutas y semillas (Remsen, 2003). Recolectan su alimento entre el follaje, ramas y musgos, tanto del sotobosque como del dosel vegetal (Vuilleumier, 1967) y construyen sus nidos en cavidades, lo que permite atraerlos mediante el uso de cajas nido, facilitando su estudio y captura (Moreno y col., 2005). Son residentes permanentes (i.e., no presentan migración) y se ven imposibilitados de dispersar en ambientes abiertos (Cornelius y col., 2000). No presenta dimorfismo sexual, y el cuidado parental, desde la construcción del nido hasta la alimentación de los pichones es realizado por ambos padres (Moreno y col., 2007). Características de este tipo se han visto en concordancia con una monogamia social en muchas especies (Skutch, 1996). En cuanto a su estado de conservación, este es

considerado de preocupación menor al no acercarse a los umbrales de vulnerabilidad tanto para su rango de distribución, tendencia de la población y tamaño poblacional (Birdlife international, 2012).



Figura 1. *Aphrastura spinicauda* (Rayadito)

Su facilidad de captura, así como su amplio rango de distribución, han hecho del Rayadito una especie modelo para distintos tipos de estudio. Es así como en los últimos años han sido realizados distintos trabajos sobre, entre otras cosas, su biología reproductiva y conducta (Ippi y col., 2011, van Dongen y col, 2009; Moreno y col, 2007; Moreno y col., 2005). Las características de la especie descritas anteriormente nos dan la oportunidad, por ejemplo, de observar que tan estable son los perfiles de comportamiento de la especie o como varía su biología reproductiva bajo distintos escenarios ecológicos. Sin embargo, todavía queda mucho por conocer sobre el Rayadito y nuevos estudios se encuentran en desarrollo buscando profundizar más sobre su conducta y reproducción. Interrogantes como cuál es su capacidad de dispersión, si existe una dispersión sesgada por sexo y estudios de paternidad le han abierto el paso a

los microsatélites como una herramienta nueva para abordar estas preguntas. Más aún, el trabajo con microsatélites nos permite incluir nuevas variantes como por ejemplo, conocer los distintos eventos demográficos que han afectado a la especie, si existe o no estructuración en las poblaciones, entre otras. En base a esta necesidad, surge la oportunidad de desarrollar y optimizar marcadores microsatélites especie-específicos para *Aphrastura spinicauda*.

Los microsatélites o SSRs (simple sequence repeats) son motivos repetidos en tándem de 1 a 6 bases encontrados en todos los genomas procariotas y eucariotas estudiados a la fecha. Se encuentran presentes tanto en regiones codificantes como no codificantes y normalmente se caracterizan por poseer un alto grado de polimorfismo (Zane y col, 2002). Las secuencias que rodean estos locus de microsatélites son denominadas "flanking regions". Estas se encuentran generalmente conservadas entre individuos de una misma especie (e incluso en algunos casos en especies distintas) lo que permite amplificar estas regiones y definir loci. En cuanto a los tipos de microsatélites, repeticiones de dinucleótidos, trinucleótidos y tetranucleótidos son las opciones más comunes para estudios genéticos, siendo los primeros los más encontrados en los distintos estudios para distintas especies (Li y col, 2002). Estos marcadores tienen la particularidad de ser generalmente neutros y de presentar una segregación mendeliana. Con respecto a su aplicación, estos marcadores moleculares se utilizan en diferentes áreas tales como en estudios forenses, conservación y manejo de recursos biológicos (Jarne & Lagoda 1996).

Históricamente la obtención y optimización de microsatélites han sido la principal dificultad para trabajar con estos marcadores, y normalmente era necesario un

laboratorio molecular bien equipado y un gasto considerable de tiempo y dinero. Sin embargo, al fin de los años 90 y durante la primera década del siglo presente, los avances de la tecnología, la disminución de los costos operacionales y la masificación de los laboratorios de biología molecular, permitieron un incremento substancial del número de estudios usando estos marcadores (Zane y col, 2002; Glenn & Schable, 2005; Nolte y col, 2005). A partir de estos, se generaron amplias bases de datos donde están disponibles las secuencias de partidores de loci microsatélites para un número creciente de especies. Sin embargo, en ecología, es muy frecuente trabajar con especies que no han sido estudiadas, por lo menos en relación a su diversidad genética. En estos casos es necesario aislar nuevos partidores, tarea que es realizada por diversas empresas que poseen laboratorios especializados para este servicio completo, otorgando como resultado el conjunto de partidores e incluso una evaluación de estos con individuos de prueba. Esto facilita la tarea y otorga una mayor facilidad al momento de buscar la optimización de los microsatélites con el fin de obtener el mayor polimorfismo posible. En el caso de nuestro estudio, los partidores que fueron probados y optimizados han sido desarrollados de esta manera. Últimamente, con la implementación de las técnicas de secuenciación masiva (Next Generation Sequencing), la identificación y caracterización de microsatélites en especies no modelo se ha vuelto más factible (Schoebel y col, 2013). De esta manera, la pirosecuenciación 454 de Roche® se ha convertido en la más usada para el desarrollo de microsatélites (Gardner y col, 2011; Guichoux y col, 2011; Zalapa y col, 2012).

En paralelo, las mejoras en la tecnología han alcanzado también el ámbito computacional, permitiendo el uso de métodos estadísticos intensivos tales como el

método de máxima verosimilitud, la teoría Bayesiana y simulaciones de cadena del tipo Monte Carlo Markov (Selkoe & Toonen, 2006). Esto se ha visto reflejado en el dramático crecimiento de las áreas de genética de poblaciones y filogeografía durante las últimas dos décadas (Hickerson y col, 2010).

Con el fin de validar y llevar a prueba nuestros partidores microsatélites desarrollados, 3 sitios contrastantes con distintas características fueron seleccionados para este estudio. En el Parque Nacional Fray Jorge (en adelante PNFJ) se encuentra el límite de distribución norte de esta especie. Esta población se encuentra en el bosque relicto valdiviano, el más boreal de Chile y considerablemente aislados de las otras poblaciones de esta especie. El microclima presente, producto de la condensación de neblina en las cimas de las Alturas del Talinay, ha logrado mantener este sistema vegetacional higrófilo, a diferencia de lo sucedido en la matriz de matorrales áridos que la rodea (Villagrán y col, 2004). La población del cerro Manquehue por otro lado, es un claro ejemplo de una población situada en una zona urbana, donde la destrucción y fragmentación del bosque es habitual. Es importante tener en consideración que gran parte de la zona donde se encuentra situada hoy la ciudad de Santiago correspondía al hábitat del Rayadito y que producto de la urbanización este se ha ido confinando a áreas más pequeñas. El desarrollo de la agricultura y la expansión de la ciudad ha ocurrido de manera abrupta, tanto así que la superficie de la ciudad de Santiago se ha cuadruplicado en los últimos 50 años (Ferrando, 2008). Finalmente, la población de isla Navarino, se encuentra en una zona más prístina y con abundancia de hábitat reproductivos (bosque continuo) y alimentos (insectos). Sin embargo esta no es la única característica importante que presenta esta área. Cabe considerar que durante la última glaciación esta

zona se encontraba cubierta con hielo, por lo que la población que habitaba el área debió sobrevivir en posibles paleorefugios en la zona como los postulados por Premoli y colaboradores (2010) o bien, en ambientes más cálidos en el norte. De esta manera, nuestro estudio incluye tres poblaciones con características particulares que nos permiten comparar el efecto de distintos factores en la diversidad genética de *Aphrastura spinicauda*. Dentro de estas características encontramos los contrastes que estas presentan a nivel ecológico, geográfico, geológico y de intervención humana.

2. HIPÓTESIS

- i) Las características de los sitios de estudio de *Aphrastura spinicauda* se ven reflejados en la diversidad genética de estos, siendo Navarino la población que presenta una mayor diversidad debido a la abundancia de sitios de nidificación.
- ii) El aislamiento geográfico de la población del PNFJ produce un mayor distanciamiento genético entre ésta y las otras dos poblaciones.

3. OBJETIVOS

Objetivos Generales

- i) Validar y optimizar 9 microsatélites especie-específicos para *Aphrastura spinicauda*
- ii) Realizar una caracterización genética de tres poblaciones contrastantes de *Aphrastura spinicauda*

Objetivos específicos

- i) Extraer el ADN total de muestras provenientes de los especímenes de *Aphrastura spinicauda* proveniente del PNFJ, cerro Manquehue e Isla Navarino
- ii) Optimizar el proceso de amplificación y seleccionar partidores que presenten una mayor reproducibilidad y polimorfismo.
- iii) Genotipificar los individuos de las poblaciones
- iv) Estimar índices moleculares de diversidad para las tres poblaciones
- v) Determinar la estructuración y evaluar la diferenciación genética tanto a nivel global como entre poblaciones
- vi) Estimar los tamaños efectivos para cada población y evaluar la existencia de señal de cambios demográficos en cada una de ellas.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Sitios de estudio

En este estudio se analizaron tres poblaciones del Rayadito (Passeriforme: Furnariidae: *Aphrastura spinicauda*) ubicadas en el PNFJ (IV región de Coquimbo, 30°40' S, 71°30' O), cerro Manquehue (Santiago de Chile, 33°26' S, 70°39' O), e isla Navarino (Patagonia, Chile; 54°56' S, 67°38' O). Los muestreos se realizaron entre los meses de Octubre y Enero (meses en que ocurre la temporada reproductiva normalmente) de los años 2010 y 2011. Las áreas de estudio presentan distintos tipos de clima, desde un clima mediterráneo árido del PNFJ (precipitaciones anuales: 113mm, temperaturas medias anuales: 13,7 °C), pasando por el clima mediterráneo semiárido de Santiago (precipitaciones anuales promedios: 337.8mm y temperatura media anual: 14.6°C) hasta el clima sub-antártico de isla Navarino (precipitaciones anuales: 450 mm y nieve, temperaturas medias anuales: 6 °C y (Di Castri & Hajek, 1976). Entre estos tres sitios fueron instaladas 396 cajas nido, las cuales se distribuyeron de la siguiente manera: 170 en PNFJ, 94 en Manquehue y 172 en isla Navarino. Las cajas nidos fueron monitoreadas a partir de la formación del nido, cada 1 o 2 días, durante la temporada reproductiva.

4.2 Captura de individuos

La captura de adultos se realizó desde cajas nido que contuviesen pichones con una edad promedio el día de la captura del adulto de 11.5 ± 0.5 días. Los individuos fueron capturados mediante la utilización de trampas ubicadas en las cajas nido. Estas se instalan en su interior y constan de una pequeña lámina de aluminio sostenida por un

alambre oculto, el cual cede al momento en que el ave entra al nido a alimentar los pichones, permitiendo que la lámina caiga y bloquee la salida. Debido al corto período de tiempo durante el cual los adultos son separados de sus crías (30 minutos en promedio), solo efectos a corto plazo pueden observarse en los pichones (reducciones de cuidado parental y peso de los pichones), siendo improbables efectos a largo plazo en la sobrevivencia de los pichones (van Dongen y col., 2009). Una vez capturado el individuo blanco, una red se ubica en la parte superior de la caja nido, la cual se procede a abrir permitiendo así que el individuo intente escapar y quede atrapado. Para la obtención de la sangre, se realiza una micropunción en la vena braquial (McGuill & Rowan, 1989) (Figura 2) y una vez que la sangre comienza a brotar, se procede a ubicar un capilar sobre esta hasta obtener un volumen de aproximadamente 10 μ l. Posteriormente la herida se limpia y se mantiene al individuo con calor durante 5 minutos previo a su liberación.

Se obtuvo un total de 176 muestras de sangre correspondientes a las poblaciones de PNFJ (n = 68), Manquehue (n = 44) e Isla Navarino (n = 64) durante los años 2010 y 2011. Las muestras se almacenaron en tarjetas FTA (Whatman ®) para sus posteriores análisis.



Figura 2. Toma de muestra de sangre para un individuo adulto de *Aphrastura spinicauda*.

4.3 Marcadores moleculares utilizados: microsatélites

Extracción de DNA

Para la extracción de DNA, se realizan cortes a las muestras de sangre en las tarjetas FTA de aproximadamente $0,3\text{cm}^2$ para su posterior digestión con Proteinasa K. Una vez completada, se realiza la extracción total de DNA celular utilizando el kit de extracción de QIAGEN (QIAamp®). Luego se determinó la pureza y concentración del DNA obtenido utilizando el espectrofotómetro Thermo Scientific NanoDrop™ 1000. A partir de los valores obtenidos, se realizaron diluciones de las muestras para obtener una concentración final de DNA de trabajo de $10\text{ ng}/\mu\text{L}$ aproximadamente. Finalmente, las muestras fueron conservadas a una temperatura de 4°C .

El aislamiento y caracterización de marcadores microsatélites fue realizado a partir de la construcción de librerías genómicas enriquecidas por la empresa ATGgenetics (www.atggenetics.com), obteniendo 15 candidatos para la realización del estudio. La evaluación de cada par de partidores fue realizada mediante la utilización de 8 muestras de prueba y un control negativo (Figura 3). De los 15 candidatos entregados por la empresa, 9 fueron seleccionados para utilizar durante el estudio, adoptando como criterios de selección su reproducibilidad y la presencia de un mayor polimorfismo. Posteriormente, las 9 secuencias de los partidores forward fueron enviadas a marcar con fluoróforo en su extremo 5' (Tabla 1) a la empresa Applied Biosystems Inc. (www.appliedbiosystems.com).

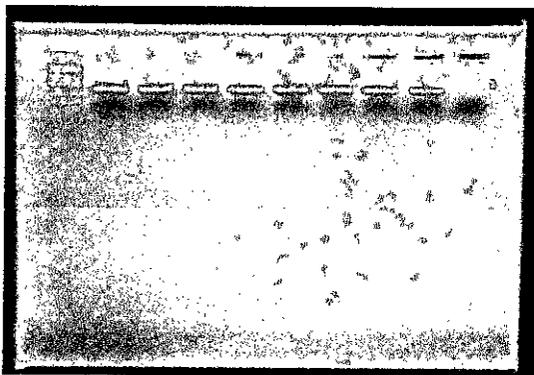


Figura 3. Evaluación partidior locus 3. El orden de carga corresponde al siguiente: carril 1, ladder 100pb. Carril 2 a 9 individuos PNFJ, carril 10 control negativo. Se puede observar con claridad la banda de aproximadamente 330pb correspondiente a el rango de tamaño para ese par de partidores en específico.

Tabla 1. Partidores microsátélites utilizados en el presente estudio. Se indica además el fluoróforo utilizado, la temperatura de alineamiento (Ta °C) y el rango de tamaño (pb) de los alelos encontrados.

Locus	Secuencia del primer (fluoróforo)(5'-3')	Motivo	Ta (°C)	Rango de tamaño (pb) observado en este estudio
1	F: (NED) TTTCCAGTTGTATCTCTCAGCA R: GAAGAATGGGATCTAAGAAGTC	(AC) ₁₉	55	143-203
25-10	F: (VIC) GGAGTTATACCAGTTATAAAGG R: TGCTGTTGICTGGCTAGCA	(CA) ₈ A(AC) ₂₀	55	143-201
25-5	F: (NED) TGGGTTTCAGTATCCTGGAAGA R: GAGTTGCTCTTCTCTCCCTCA	(TG) ₁₆	55	177-211
25-1	F: (PET) GGAGGGTATTTGGCAAGGTT R: AGGATGGCTTGCTAGCTGTG	(CA) ₁₈	55	177-211
25-8	F: (PET) AAGAAGCTCACCCGCTACCT R: TGTTGTCGTGCCTGAAGAAG	(CA) ₉	55	220-234
3	F: (6FAM) GCAAACCTGACCATACACATTTG R: GAATGTGTAAAACCCAGACAGA	(AC) ₃ G(CA) ₁₀	55	320-344
25-14	F: (6FAM) TTTCTGCTGCTGGAAAGGTT R: GTTCATCCAGGGAGAGTCCA	(GATA) ₁₃	55	179-225
18	F: (VIC) GGAAGCCATCTTAGGCTGTG R: GGAAGCCATCTTAGGCTGTG	(GT) ₉	55	214-222
7	F: (6FAM) GCTGGGCTTGCATATCTTC R: TCTTGTTTTGAAGGGAAGTGGA	(GT) ₁₃	55	217-251

4.3 Amplificación de fragmentos

Se realizaron reacciones de PCR con los 9 pares de partidores seleccionados para comprobar la reproducibilidad de los resultados obtenidos por Craig Newton ATGgenetics bajo las mismas condiciones, utilizando los termocicladores PxE Thermal Cycler, iCycler Thermal Cycler y Px2 Thermal Cycler. Para esto se utilizaron 8 muestras

de DNA obtenidas en la población PNFJ y un control negativo con el fin de detectar una posible contaminación de la reacción. Cada reacción de PCR se llevó a un volumen final de 12 μ L, la cual contenía 1,2 μ L de PCR Buffer 10X (50 mM KCL, 10mM tris-HCl, pH 8), 1,2 μ L de MgCl₂ 50mM, 0,6 μ L de ambos partidores a una concentración de 10ng/ μ L cada uno, 0,96 μ L de dNTP's, 0,2 μ L Taq Platinum (Invitrogen), 6,24 μ L de H₂O₂ y 1 μ L de DNA genómico a una concentración de 10ng/ μ L. El protocolo utilizado para la reacción de PCR fue el siguiente: Un primer ciclo de denaturación de 3 minutos a 95C, 35 ciclos de tres etapas, 95C por 30 segundos, 55C por 30 segundos y 72C por 1 min y 30 segundos y para finalizar un ciclo único de 72C por 5 minutos. Los productos de amplificación fueron analizados al correrlos por 20 min a 100V en geles de agarosa 2% teñidos con bromuro de etidio.

Para el análisis del total de las muestras, se utiliza el mismo protocolo descrito anteriormente para la reacción de PCR y el posterior análisis del gel. Los productos de PCR fueron enviados para su genotipificación a Illinois Biotech (<http://www.biotech.uiuc.edu>) y los datos obtenidos fueron analizados mediante la utilización de GeneMarker 2.2.0 Demo (Softgenetics LLCR), con el fin de visualizar los peaks correspondientes a cada alelo (Figura 4). En los casos en que la visualización no fue clara o que los genotipos encontrados correspondan a genotipos raros para lo esperado según el equilibrio de Hardy-Weinberg, se realizó replicados de estos con el fin de confirmar o descartar los genotipos obtenidos.

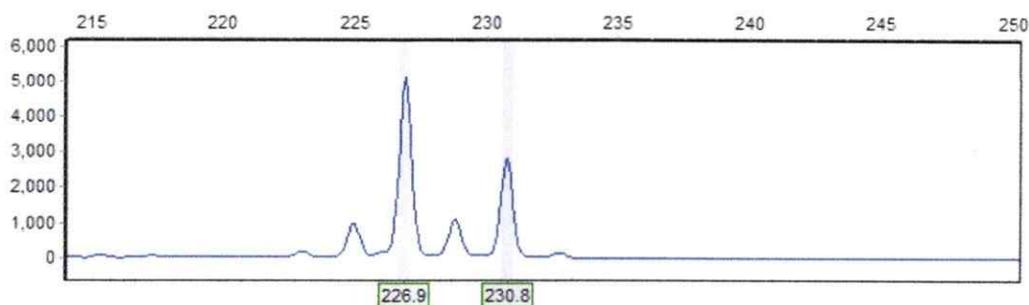


Figura 4. Ejemplo de perfil de microsatélites analizados en Genemarker.

Para detectar la presencia de alelos nulos, stutters y corregir alelos con grandes peaks se utilizó Microchecker v.2.2.3 (Van Oosterhout y col., 2004).

Análisis de datos

El número de alelos, la heterocigocidad esperada y observada para cada locus y la riqueza alélica fueron calculados por sitio de estudio mediante la utilización de ARLEQUIN v. 3.1 (Excoffier 2006). Una rarefacción fue realizada utilizando PAST 1.75 (Hammer y col., 2001) para comprobar que las diferencia obtenida en los datos de las distintas poblaciones se debe efectivamente a la naturaleza de los datos y no a un problema de muestreo. Esto debido a que la cantidad de individuos analizados por población es distinta en el PNFJ, el cerro Manquehue e isla Navarino. El programa Genetix (Belkhir y col., 1996-2004) fue utilizado para calcular valores de F_{st} global y por pares, además realizó un análisis factorial de correspondencia (AFC3D) para lograr una visualización de la estructuración de las poblaciones. Se utilizó un número de permutaciones correspondiente a 10000 para estimar su significancia. STRUCTURE v 2.3.2 (Pritchard y col., 2000, 2007) se utilizó para identificar las unidades panmícticas

Rayadito sin una información a priori sobre la ubicación de los individuos analizados y para realizar una asignación de individuos e identificación de posibles migrantes entre las poblaciones. Este programa, mediante el uso de probabilidades, asigna individuos particulares a poblaciones en sus genotipos multi-locus. Se realizaron 10 corridas diferentes quemando (burn-in) las primeras 100.000, para luego continuar con 300.000 iteraciones MCMC. Esto se realizó bajo el modelo de mezcla (admixture model) y tomando en cuenta frecuencias alélicas correlacionadas entre grupos. Además, se analizaron de 1 a 5 posibles grupos o clusters mediante la utilización de la herramienta STRUCTURE HARVESTER y se escogió el valor de K en base al valor del logaritmo de la verosimilitud de los datos observados ($\ln P(D)$) como una función de K. Además, el valor de ΔK se calculó en base a la tasa de cambio del logaritmo de la verosimilitud de los datos entre los valores sucesivos de K para obtener el valor más probable (Evanno y col., 2005). Mediante la utilización de GeneClass 2.0 (Piry y col., 2004) se calculó el porcentaje de asignaciones erróneas para cada población. Para detectar señal de cuello de botella en los 3 sitios se utilizó Bottleneck 1.2.02 (Piry y col., 1999). Para los análisis, se seleccionó el modelo de dos fases (TPM), considerado como el más apropiado para marcadores de tipo microsatélites (Di Rienzo y col., 1994). Para este modelo, se consideró un 95% de “single-step mutations” y un 5% de “multiple-step mutations”, con una varianza entre pasos múltiples de 12, como recomienda el autor del programa (Piry y col., 1999). La estimación del tamaño efectivo para las poblaciones fue realizado mediante la utilización de LAMARC 2.1.5 (Kuhner, 2006).

5. RESULTADOS

5.1 Diversidad de Microsatélites

Cada locus fue genotipificado para los 176 individuos a excepción del locus 6, el cual presentó problemas en algunos individuos, debido a la compleja forma del perfil del microsatélite, siendo finalmente excluidos 18 individuos en PNFJ, 8 en Manquehue y 9 en Navarino. Los análisis con Microchecker muestran que algunos loci podrían estar en presencia de alelos nulos o stuttering, siendo el locus 1 el único que presenta la posibilidad de encontrar un alelo nulo en las 3 poblaciones. Entre 3 y 15 alelos se encontraron en los 9 loci analizados. De estos, 2 en particular presentaron desviaciones significativas del equilibrio de Hardy Weinberg para las 3 poblaciones (Tabla 2).

Tabla 2. Índices de diversidad por locus para cada población.

	Locus								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
PNFJ (2n = 136)									
2n	136	136	136	136	136	100	136	136	136
Nº Alelos	7	9	9	7	4	8	9	4	5
Ho	0,353	0,721	0,721	0,824	0,691	0,68	0,676	0,544	0,265
He	0,605	0,728	0,74	0,78	0,67	0,78	0,819	0,5	0,264
P	0,000	0,703	0,294	0,406	0,737	0,004	0,026	0,421	0,143
Manquehue (2n = 90)									
2n	90	90	90	90	90	74	90	90	90
Nº Alelos	5	13	12	4	5	12	8	3	12
Ho	0,333	0,711	0,844	0,267	0,644	0,865	0,711	0,333	0,622
He	0,723	0,824	0,876	0,297	0,672	0,891	0,828	0,311	0,861
P	0,000	0,049	0,43	0,17	0,126	0,016	0,053	1	0,000
Navarino (2n = 126)									
2n	126	126	126	126	126	108	126	126	126
Nº Alelos	10	14	15	7	4	11	13	5	15
Ho	0,397	0,857	0,857	0,635	0,587	0,741	0,651	0,429	0,841
He	0,732	0,819	0,889	0,706	0,672	0,853	0,819	0,438	0,817
P	0,000	0,505	0,036	0,037	0,000	0,004	0,000	0,16	0,217

En cuanto a la diversidad genética, PNFJ presentó la menor con un valor de 0,638 y Navarino la mayor con un valor de 0,737. Manquehue se ubicó entre las dos poblaciones mencionadas con una diversidad genética correspondiente a 0,674. La misma tendencia se vio en el promedio de alelos por población, donde encontramos el mayor promedio en Isla Navarino, seguido por Manquehue y encontrando el menor en el PNFJ (Tabla 3).

Tabla 3. Diversidad genética (h) y N° promedio de alelos para las tres poblaciones

Población	N	N° promedio alelos	h (\pm SD)
PNFJ	68	6,89	0,638 \pm 0,344
Manquehue	45	8,22	0,674 \pm 0,363
Navarino	63	10,44	0,737 \pm 0,392

Además, se observaron los alelos compartidos entre poblaciones, donde los sitios de estudio de Manquehue y Navarino presentaron el mayor número, seguidos por PNFJ y Navarino, siendo PNFJ y Manquehue las poblaciones que presentaron un menor número de estos (Tabla 4).

Tabla 4. Alelos compartidos entre los 3 sitios de estudio para un total general de 110 alelos.

Poblaciones	Alelos Compartidos
PNFJ - Manquehue	6
PNFJ - Navarino	12
Manquehue - Navarino	22

Una rarefacción individual se realizó en PAST, para comprobar que las diferencias obtenidas en los datos no tenían relación con la diferencia en los tamaños de muestreo de las distintas poblaciones. Los resultados muestran que, aún con un tamaño muestral idéntico para cada una de las poblaciones, las diferencias entre estas se mantienen (Tabla 5).

Tabla 5. Promedio de alelos observado y el esperado según la rarefacción para poblaciones con un mismo tamaño muestral.

Promedio Alelos	PNFJ	Manquehue	Navarino
Esperado (error estd.)	6,49(0,48)	8,22(0)	9,41(0,59)
Observado	6,89	8,22	10,44

5.2 Estructuración

Tras realizar la visualización de la estructuración de las poblaciones mediante el procedimiento AFC3D presente en Genetix, se observa claramente como los datos nos muestran tres poblaciones distintas, con una mayor cercanía entre las poblaciones de Manquehue y Navarino (Figura 5). Además, las poblaciones muestran un grado de diferenciación altamente significativo a nivel global a partir de los 9 loci utilizados ($F_{st} = 0,108$, $P < 0,001$). En cuanto a la estructuración por pares, se observa una mayor diferenciación entre PNFJ y las poblaciones de Manquehue e isla Navarino que de las dos últimas entre sí. En todos los casos los valores son altamente significativos (Tabla 6).

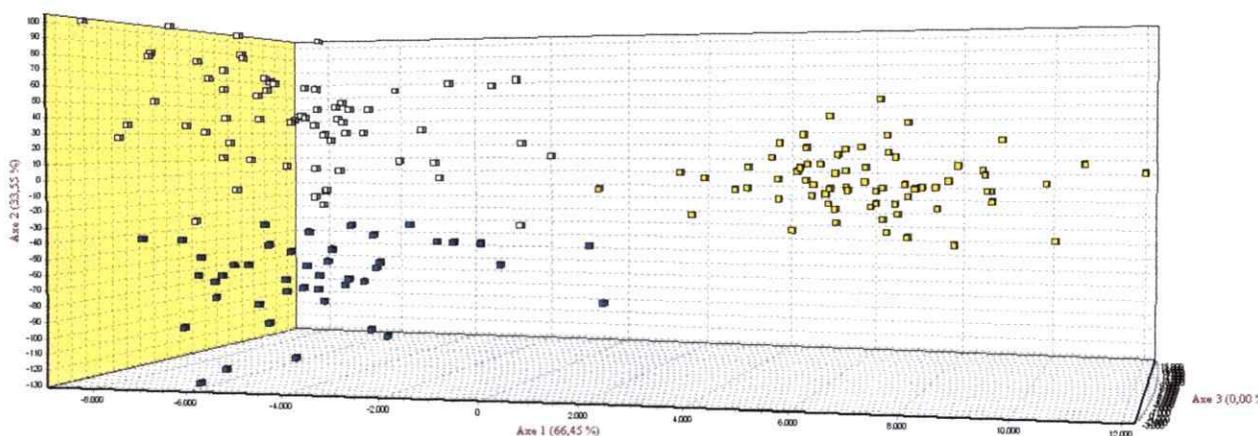


Figura 5. Visualización mediante AFC3D de las tres poblaciones del estudio. La población amarilla corresponde a PNFJ, la blanca a isla Navarino y la azul a cerro Manquehue.

Tabla 6. Valores de F_{st} por pares. ** $P < 0,001$

F_{st}	Manquehue	Navarino
PNFJ	0,145**	0,125**
Manquehue	-	0,042**

Identificación de poblaciones mediante Structure

Tres poblaciones fueron claramente identificadas, donde PNFJ aparece nuevamente aislada de las dos poblaciones restantes, observándose una casi nula presencia de genotipos de individuos de las otras poblaciones asociados a esta (Figura 6).

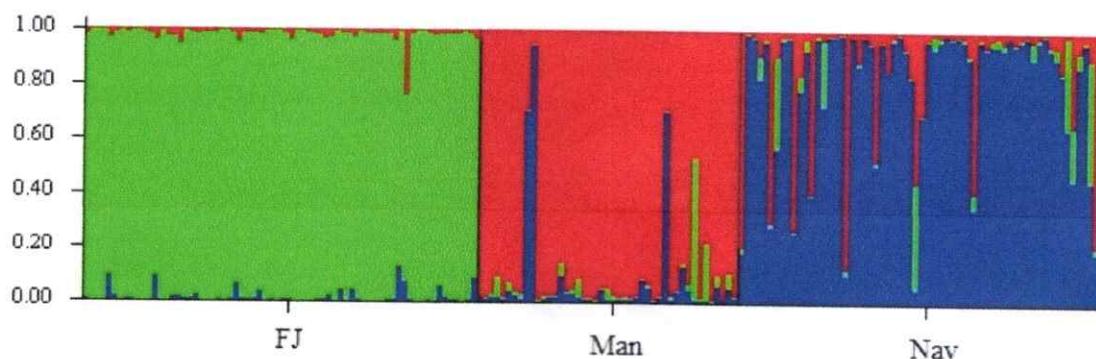


Figura 6. Análisis de Structure para las 3 poblaciones. Cada línea vertical representa un individuo. Los individuos están agrupados de acuerdo a su localización de origen. Los cluster genéticos están codificados con 3 colores distintos y la fracción de color para cada individuo representa la probabilidad de asignación al cluster de ese color.

Con el fin de confirmar que los valores obtenidos para el número de grupos o clusters fue el adecuado, se realizaron dos análisis utilizando la herramienta de Structure Harvester. Como resultado se obtiene que el valor más bajo de $\ln(P)$ fue de 3 clusters. Sin embargo, existen valores bastante cercanos para la posibilidad de 4 y 5 clusters (Figura 7). Debido a esto, los valores obtenidos para ΔK nos sirven para confirmar el número de grupos genéticos, al observar que el mejor valor de ΔK se presenta para 3 clusters (Figura 8).

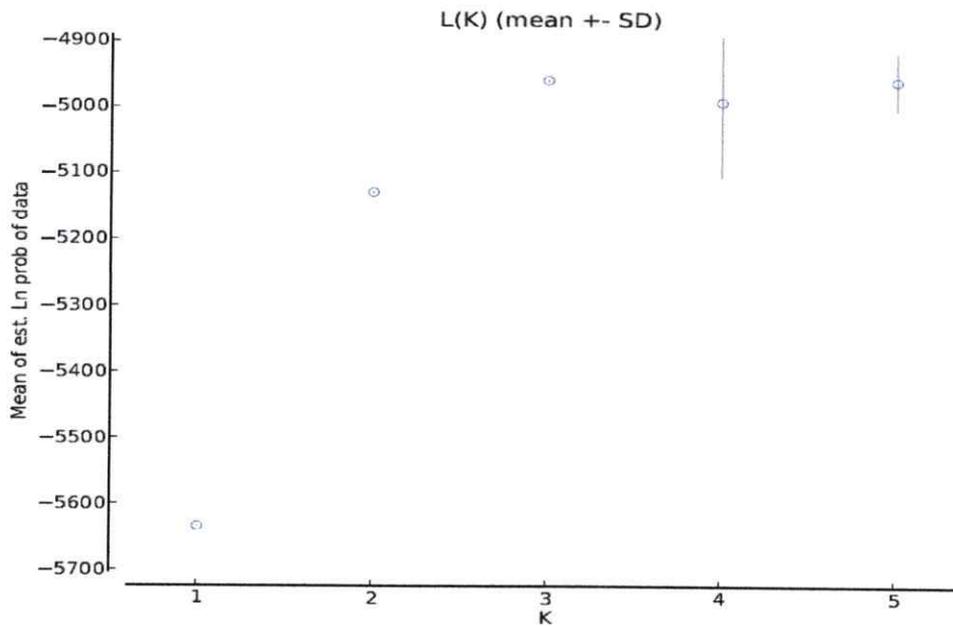


Figura 7. Ln (P) de los asignamientos de clusters en el programa Structure Harvester para *Aphrastura spinicauda*.

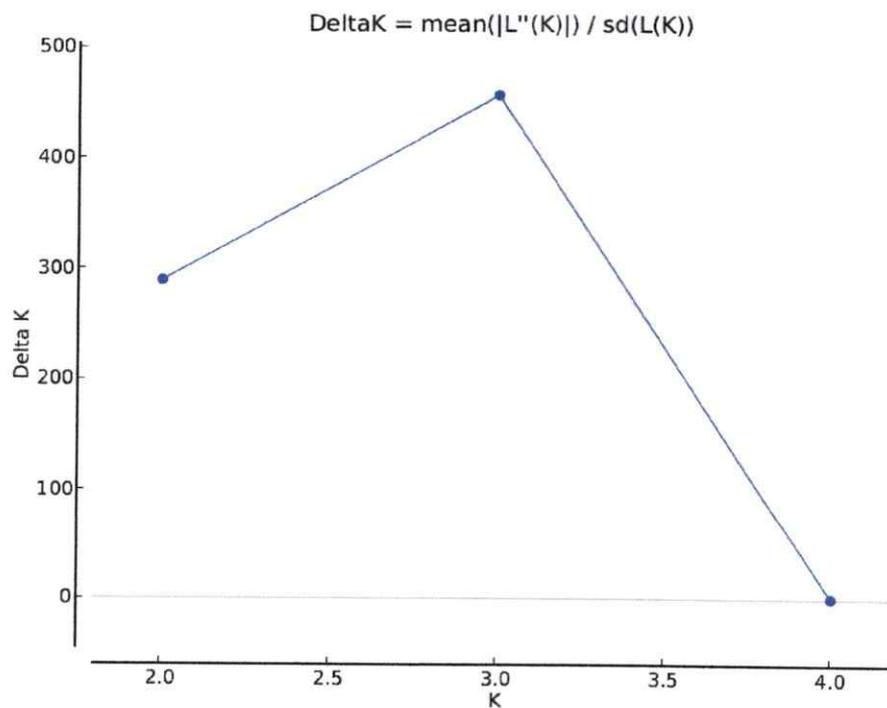


Figura 8. ΔK de los asignamientos de clusters en el programa Structure Harvester para *Aphrastura spinicauda*.

5.3 Eventos demográficos

Utilizando Bottleneck para el análisis de los datos, obtenemos que tanto los resultados para las poblaciones de PNFJ como Manquehue no muestran una tendencia clara frente a posibles eventos demográficos ($P > 0,05$). Por otro lado, en el caso de isla Navarino, se puede observar una marcada tendencia hacia un déficit de heterocigotos ($P < 0,005$, Tabla 7). Este déficit de heterocigotos en comparación al esperado en equilibrio deriva-mutación nos muestra que la población en isla Navarino se encuentra, o ha pasado recientemente, por un período de expansión.

Tabla 7. Exceso y déficit de heterocigotos con su respectiva significancia para las tres poblaciones de *Aphrastura spinicauda*.

	PNFJ	Manquehue	Navarino
Loci exceso Heterocigotos	3	5	2
Loci déficit Heterocigotos	6	4	7
P (Wilcoxon Test)	0,102	0,367	0,014

5.4 Tamaño efectivo

Mediante la utilización de LAMARC, se obtuvo el tamaño efectivo correspondiente a cada población a través de un valor de theta calculado. Los resultados nos muestran valores muy pequeños para los tamaños poblacionales esperados (rango de 17-29) pero que muestran la tendencia esperada. Así, la población del PNFJ presenta el valor más bajo, seguida por la población del Cerro Manquehue y siendo la mayor la de Isla Navarino (Tabla 8). Cabe destacar que existe una mayor diferencia entre los tamaños efectivos de las poblaciones de Manquehue y PNFJ que entre las poblaciones de Navarino y Manquehue.

Tabla 8. Valores de Theta y tamaño efectivo para las 3 poblaciones

Población	Theta	Ne
PNFJ	0,03429	17
Manquehue	0,054738	27
Navarino	0,059134	29

6. DISCUSIÓN

Microsatélites

El desarrollo y optimización de microsatélites cuenta de distintas etapas y muchas pruebas son necesarias antes de poder determinar su funcionalidad para diversos estudios requeridos. Comprobar que los fragmentos obtenidos en la reacción son los esperados, que todos los alelos se están amplificando (y que por lo tanto no existe la presencia de alelos nulos) y evaluar el equilibrio esperado bajo el modelo de Hardy-Weingber, entre otros, son factores claves a considerar (Selkoe & Toonen, 2006).

En relación a esto, los análisis realizados en MicroChecker mostraron que en el caso del locus 1 existe la presencia de un alelo nulo. Esto puede ocurrir producto de cambios en las secuencias de nucleótidos de las “flanking regions”, la preferencia en el momento de la amplificación de alelos más cortos (debido a la calidad o cantidad del templado) o de “slippage” durante la reacción de PCR (Chapuis & Estoup, 2006). Un 90% de los artículos reportando loci de microsatélites con alelos nulos incluyen estos loci sus análisis sin ninguna corrección estadística (Dakin & Avise 2004). Sin embargo, se ha observado que los alelos nulos pueden afectar en las estimaciones de la estructuración (Paetkau & Strobeck, 1995). En el caso particular de nuestro estudio, se mantuvo el locus 1 para los análisis al comprobar que los resultados de diversidad y estructuración obtenidos no presentaban cambios relevantes y las tendencias se mantenían. Sin embargo, es importante para estudios futuros que cuenten con más sitios de estudio y/o individuos tomar en consideración esta variante.

En cuanto al Locus 7, los perfiles que presenta hacen difícil su utilización en



futuros estudios. Las distintas formas que este marcador presenta, generan una imposibilidad de distinguir entre homocigotos y heterocigotos para algunos casos. Para este estudio en particular, se eliminaron los genotipos conflictivos. Sin embargo, la misma consideración que en el caso del locus 1 es necesario tomar para futuros trabajos con un mayor número de individuos y/o sitios de estudio. El incluir estos datos en los análisis podría desvirtuar los resultados, ya que se están eliminando solo individuos homocigotos en las poblaciones.

Caracterización genética

En cuanto a la caracterización genética de las tres poblaciones, los resultados nos muestran que no estamos en presencia de una gran población panmíctica si no de tres poblaciones diferentes. Esto era de esperar tomando en cuenta el carácter de residente permanente de la especie y su baja capacidad de dispersión en ambientes abiertos (Cornelius y col, 2000), sumando a esto la distancia que separa a los tres sitios de estudio. Sin embargo, al momento de analizar la diferenciación por pares se observa que la población del PNFJ presenta un mayor distanciamiento genético con la población de cerro Manquehue que esta última con la población de isla Navarino. Esto a su vez se ve respaldado al observar los alelos compartidos entre poblaciones, donde se observa como estas 2 últimas son las que presentan el mayor número de alelos compartidos. Considerando que la distancia en línea recta de Santiago a PNFJ es de aproximadamente 320 kilómetros y entre Santiago y Pto. Williams es de aproximadamente 2400 kilómetros, deben haber otros factores involucrados para explicar este patrón de

diferenciación además del aislamiento por distancia propuesto por Wright (1942), donde la distancia es el único factor determinante de la diferenciación genética.

En el caso de la población del PNFJ es de suma importancia el comprender el contexto en que se encuentra. El bosque relictivo, rodeado de una matriz de matorrales áridos (Villagrán y col, 2004) presenta un clima hostil que actúa como una barrera natural para el Rayadito. Esto surge como consecuencia de distintos eventos tectónicos y climáticos ocurridos durante el Terciario y Cuaternario. La segregación de los espectros florísticos característicos de los bosques subtropicales habría ocurrido producto del calentamiento climático del Mioceno, donde las paleofloras mixtas de Chile central perdieron gran parte del elemento austral-antártico frío y se enriquecieron con aportes de linajes Neotropicales durante un período de continuidad con las floras del subtrópico Sudamericano (pre-levantamiento final de los Andes). Luego a finales del Terciario, una conjugación de distintos eventos daría origen al desarrollo de la "Diagonal Árida" que entre otras consecuencias generaría la fragmentación y contracción del margen norte de los bosques subtropicales de la costa Pacífica, debido al aumento de la aridez en el Desierto de Atacama. En paralelo, el levantamiento tectónico de las Alturas del Talinay durante el Pleistoceno temprano a medio proporcionó un refugio para la persistencia de los remanentes del bosque Subtropical. Durante los repetidos períodos glaciares del Pleistoceno, las condiciones más húmedas existentes permitieron la subsistencia y continuidad de la comunidad boscosa relictiva a lo largo de la costa de Chile centro-norte. Por el contrario, durante los períodos interglaciares se presentó un marcado incremento de la aridez acentuando las discontinuidades de la comunidad costera (Villagrán y col, 2004).

El resultado de todos estos distintos eventos lo observamos hoy a lo largo de la costa de Chile centro-norte en islas biogeográficas con poblaciones locales aisladas y restringidas a manchas remanentes de bosques (en el caso de PNFJ está no supera las 300 ha). Esto a su vez se ve reflejado en la ausencia de flujo genético entre poblaciones, apoyado por el 100% de asignamientos positivos en la población del PNFJ, lo que nos sugiere una migración reducida o nula (Waser & Strobeck, 1998) entre esta y cerro Manquehue. De esta manera, el tamaño poblacional reducido y la ausencia de flujo genético con otras poblaciones podrían explicar los valores más bajos de diversidad genética observados en PNFJ.

Una posibilidad para explicar la menor diferenciación genética existente entre Manquehue y Navarino a pesar de la distancia geográfica sería el modelo de "Stepping stone" propuesto por Kimura y Weiss (1964). Bajo este modelo, la menor diferenciación entre las poblaciones de Manquehue y Navarino se debería a la presencia de un bosque más continuo existente entre ambos sitios de estudio. Los estudios necesarios para confirmar que este modelo es el que rige entre estas poblaciones no eran parte de esta tesis, sin embargo sería interesante a futuro indagar más en este aspecto.

Al momento de analizar los resultados de la inferencia demográfica, llama la atención la situación de las poblaciones del PNFJ y cerro Manquehue. En el caso del PNFJ, a pesar del proceso histórico de fragmentación y el aislamiento geográfico del bosque, no se detectó la señal de un cuello de botella. Este resultado sugiere que la población se encontraría estable y en equilibrio, a pesar de los factores mencionados anteriormente. Esto podría explicarse considerando que los procesos de fragmentación y aislamiento del bosque relicto están asociados a los distintos procesos descritos en el

Pleistoceno. Este lapso de tiempo, sumado al alta tasa mutacional de los marcadores microsátélites, podría haber permitido a la población recuperar un equilibrio mutación-deriva, explicando así la ausencia de una huella genética de estos eventos demográficos pasados. En contraste con lo que sucede en el PNFJ, los cambios que han afectado a la población de cerro Manquehue tienen un origen antropogénico y han ocurrido en un período de tiempo más corto. Sin embargo, la pérdida de su hábitat en los últimos años como consecuencia de la expansión de la ciudad también nos hacía pensar en los efectos que esto pudiese traer sobre la población. A pesar de esto, no fue posible detectar alguna señal de cuello de botella. Esto podría deberse a una posible conectividad existente entre el bosque del cerro Manquehue y la pre-cordillera, la cual brindaría otra posibilidad de hábitat a la especie permitiendo así que esta no se viese afectada de gran manera por la pérdida de hábitat como resultado de la expansión territorial de la ciudad de Santiago. De esta manera, el tamaño efectivo de la población no se vería afectado, ya que cerro Manquehue no sería una población por sí sola si no parte de una población más grande. En el caso de isla Navarino, los análisis muestran que la diversidad observada es menor que la esperada al equilibrio mutación-deriva, lo que puede ser interpretado como la señal de una expansión poblacional actual o reciente, probablemente iniciada durante el Holoceno. Esto se puede comprender tomando en consideración que esta zona se encontraba cubierta de hielo durante el último máximo glacial (un bloque de aproximadamente 500.000km^3 abarcaba entre los 38° y los 55°S) (Hulton y col, 2002) y que con el comienzo de su deglaciación entre 17500-17150 años atrás empezó una etapa de reaparición de hábitats adecuados que llevó a la recolonización de la zona.

Perspectivas e investigaciones futuras

Bastante falta todavía por conocer del Rayadito, y la utilización de microsátélites abre las puertas a distintas áreas que aún no han sido abordadas. Estudios de dispersión y paternidad son sólo algunas de las posibilidades que permite contar con un conjunto de partidores adecuado. Es importante por lo tanto, tomar en consideración las complicaciones que presentan dos de los nueve loci presentados en esta tesis. Para investigaciones futuras sería conveniente una optimización y prueba de partidores adicionales con el fin de complementar a estos. Otro factor a tomar en cuenta es que en este estudio se realizó una caracterización genética de tres poblaciones separadas por una gran distancia como un punto de partida. Producto de esto, nuevas interrogantes han surgido y futuros estudios podrán enfocarse en resolverlas. De esta manera, por ejemplo, podría analizarse la situación que existe entre las poblaciones de Manquehue y Navarino, evaluando si efectivamente la presencia más continua de un bosque permite el flujo genético siguiendo el modelo de Kimura y Weiss (1964). Otra interrogante que surge a partir de esta tesis tiene relación con lo que sucede en la población de Cerro Manquehue, sobre todo si esta población forma o no parte de una población más grande, por lo que es de gran importancia la realización de estudios al respecto. Investigaciones futuras serán de gran utilidad para comprender la situación de esta población, con análisis utilizando otro tipo de marcador molecular. Esto nos da la posibilidad de ver distintos tiempos evolutivos y complementar la información entregada por los microsátélites.

7. CONCLUSIONES

- i. Los microsatélites especie-específicos optimizados durante esta tesis poseen el potencial para delinear poblaciones.
- ii. Los contrastes a nivel ecológico, geográfico, geológico, y de intervención humana que presentan las 3 poblaciones se ven reflejadas en su caracterización genética.
- iii. El aislamiento geográfico de la población del PNFJ es el principal factor del distanciamiento genético entre ésta y las otras poblaciones, por sobre la distancia geográfica que las separa.

8. BIBLIOGRAFÍA

Belkir, K., Borsa, P., Chikri, L., Goudet, J., Bonhomme, F. (2000). GENETIX version 4.02. Logiciel sous WindowsMT pour la Génétique des Populations. Laboratoire Génome et Populations, CNRS UPR 9060, Université de Montpellier II, Montpellier, France.

BirdLife International (2013) Species factsheet: *Aphrastura spinicauda*. Downloaded from <http://www.birdlife.org> on 09/09/2013.

Chapuis, M-P., Estoup, A. (2007). Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population Differentiation. *Molecular Biology and Evolution*, 24: 621-631.

Cornelius, C., Cofre, H., Marquet, P. A. (2000). Effects of habitat fragmentation on bird species in a relict temperate forest in semiarid Chile. *Conservation Biology*, 14: 534-543.

Dakin, E.E., Avise, J.C. (2004). Microsatellite null alleles in parentage analysis. *Heredity*, 93: 504-509.

Dent, A.E., vonHoldt, B.M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4: 359-361.

Di Castri, F., Hajek, E. (1976). *Bioclimatología de Chile*. Universidad Católica de Chile, Santiago Chile, 214pp.

Di Rienzo, A., Peterson, A.C., Garza, J.C., Valdes, A.M., Slatkin, M., Freimer, N.B. (1994). Mutation processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 91: 3166-3170.

Excoffier, L. (2006). ARLEQUIN v3.1: an integrated software package for population genetics data analysis. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>.

Evanno, G., Reganut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.

Ferrando F. (2008). Santiago de Chile: antecedentes demográficos, expansión urbana y conflictos. *Revista de Urbanismo, Norteamérica*. N°18.

Gardner, M.G., Fitch, A.J., Bertozzi, T., Lowe, A.J. (2011). Rise of the machines - recommendations for ecologists when using next generation sequencing for microsatellite development. *Molecular Ecology Resources*, 11: 1093-1101.

Glenn, T.C., Schable, N.A. (2005). Isolating microsatellite DNA loci. *Methods in Enzymology*, 395: 202-222.

Guichoux, E., Lagache, L., Wagner, S., Chaumeil, P., Leger, P., Lepais, O., Lepoittevin, C., Malausa, T., Revardel, E., Salin, F., Petit, R.J. (2011). Current trends in microsatellite genotyping. *Molecular Ecology. Resources*, 11: 591-611.

Hammer, Ø., Harper, D.A.T., Ryan, P.D. (2001). PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Paleontological Electronica* 4 (1): 9pp.

Hickerson, M.J., Carstens, B.C., Cavernder-Bares, J., Crandall, K.A., Graham, C.H., Johnson, J.B., Rissler, L. Victoriano, P.F., Yoder, A.D. (2010). Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avice*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 54: 291-301.

Hulton, N.R.J., Purves, R.S., McCulloch, R.D., Sugden, D.E., Bentley, M.J. (2002). The Last Glacial Maximum and deglaciation in southern South America. *Quaternary Science Reviews*, 21: 233-241.

Ippi, S., Vásquez, R.A., van Dongen, W.F.D., Wouter, I. Lazzoni. 2011. Geographical variation in the vocalizations of the suboscine Thorn-tailed Rayadito *Aphrastura spinicauda*. *Ibis* 153: 789-805.

Jaramillo, A., Burke, P., Beadle, D. (2003). *Aves de Chile*. London: Christopher Helm.

- Jarne, P., Lagoda, P. (1996). Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology & Evolution*, 11: 424–429.
- Kimura, M., Weiss, G.H. (1964). The stepping stone model of population structure and the decrease of genetic correlation with distance. *Genetics*, 49: 561–576.
- Kuhner, M.K. (2006). LAMARC 2.0: Maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinformatics*, 22: 768–770.
- Li, Y.C., Korol, A.B., Fahima, T., Beiles, A., Nevo, E. (2002). Microsatellites: genomic distribution, putative functions, and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, 11: 2453–2465
- McGill, M.W., and Rowan, A.N. (1989) Biological Effects of Blood Loss: Implications for Sampling Volumes and Techniques. *ILAR News*, 31 No 4: 5 – 18.
- Moreno, J., Merino, S., Vásquez, R.A., Armesto, J. (2005). Breeding Biology of the Thorn-tailed Rayadito (Furnariidae) in south-temperate rainforest of Chile. *Condor*, 107: 69-77.
- Moreno, J., Merino, S., Lobato, E., Rodríguez-Gironés, M., Vásquez, R.A. (2007). Sexual dimorphism and parental roles in the Thorn-tailed Rayadito (Furnariidae). *Condor*, 109: 312-320.
- Nolte, A.W., Stemshorn, K.C., Tautz, D. (2005). Direct cloning of microsatellite loci from *Cottus gobio* through a simplified enrichment procedure. *Molecular Ecology Notes*, 5: 628-636.
- Paetkau, D., Strobeck, C. (1995). The molecular basis and evolutionary history of a microsatellite null allele in bears. *Molecular Ecology*, 4: 519–520.
- Piry, S., Luikart, G., Cornuet, J.M. (1999) BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90:502–503.

Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L., Estoup, A. (2004) GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. *Journal of Heredity*, 95:536-539.

Premoli, A.C., Mathiasen, P., Kitzberger, T. (2010). Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: Genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54°S) glacial refugia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 298: 247–256.

Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155:945-959.

Pritchard, J.K., Wen, X., Falush, D. (2007). Documentation for structure software: version 2.2. Available from <http://pritch.bsd.uchicago.edu/software>.

Remsen, J.V. (2003). Family Furnariidae (Ovenbirds). In: del Hoyo, J., Elliott, A., Christie, D.A. (ed.), *Handbook of the birds of the world*. Vol. 8. Lynx Edicions, Barcelona, Spain.

Schoebel, C.N., Brodbeck, S., Buehler, D., Cornejo, C., Gajurel, J., Hartikainen, H., Keller, D., Leyss, M., Ricanová, S., Segelbacher, C., Werth, S., Csencsics, D. (2013). Lessons learned from microsatellite development for nonmodel organisms using 454 pyrosequencing. *Journal of Evolutionary Biology*, 26: 600-611.

Selkoe, K., Toonen, R. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters*, 9: 615–629.

Skutch, A.F. (1996). *Antbirds and ovenbirds*. University of Texas Press, Austin, TX.

Van Dongen, W., Lazzoni, I., Vásquez, R.A. (2009). Behavioral experiments in a wild passerine cause short-term reductions in parental provisioning and nestling mass. *Revista Chilena de Historia Natural*, 82: 223-231.

- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P. (2004). Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 4:535-538.
- Villagrán, C., Armesto, J.J., Hinojosa, L.F, Cuvertino, J., Pérez, C., Medina, C. (2004) El enigmático origen del bosque relicto de Fray Jorge. *Historia Natural del Parque Nacional Fray Jorge*. Capítulo 1. Squeo, F., Gutiérrez, J., Hernández, I. (Eds.) Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Vuilleumier, F. (1967). Mixed species flocks in Patagonian forests, with remarks on interspecies flock formation. *Condor*, 69:400-404.
- Waser, P. M., Strobeck, C. (1998). Genetic signatures of interpopulation dispersal. *Trends in Ecology and Evolution*, 13: 43-44.
- Wright, S. (1943) Isolation by Distance. *Genetics*, 28: 114-138.
- Zalapa, J.E., Cuevas, H., Zhu, H., Steffan, S., Senalik, D., Zeldin, E., McCown, B., Harbut, R., Simon, P. (2012). Using next-generation sequencing approaches to isolate simple sequence repeat (microsatellite) loci in the plant sciences. *American Journal of Botany*, 99: 193-208.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 11: 1 - 16.