



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL
COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO
BARILOCHE

“El fuego como agente de
selección rápida en la invasión
de la conífera exótica *Pinus
radiata*: un análisis ecológico-
molecular”

Trabajo de Tesis para optar al Título
de Doctor en Biología

Tesista: Ramiro R. Ripa

Directora: Andrea C. Premoli

Co-directora: Estela Raffaele

Año: 2021

Resumen

En la actualidad, las invasiones de leñosas exóticas son una preocupación mundial debido a su impacto sobre la biodiversidad y los servicios ecosistémicos. Tal es el caso de las plantaciones de coníferas exóticas, que si bien contribuyen, significativamente, a las economías de muchos países, su práctica extensiva acarrea altos costos asociados e impactan sobre la composición y funcionamiento de los ecosistemas naturales. Las coníferas han sido cultivadas en muchas partes del mundo, tanto fuera como dentro de su rango geográfico, y en muchos casos han escapado de las plantaciones originales invadiendo los ecosistemas adyacentes. Dentro de las coníferas, el género *Pinus* está citado entre los taxones forestales más invasores, siendo *Pinus radiata* una especie altamente invasiva y también una de las especies forestales más ampliamente plantadas en todo el mundo. Las invasiones de coníferas exóticas están siendo cuestionadas por sus diversos impactos negativos sobre los suelos, pérdida de biodiversidad y cambios en el régimen de disturbios (e.g. fuego). Si bien el fuego ha sido y es un disturbio natural recurrente en Patagonia, los cambios en los usos de la tierra y la introducción de especies de coníferas exóticas más inflamables pueden llevar a cambios en el régimen, aumentando la frecuencia e intensidad de incendios. En este contexto, las especies exóticas que presentan adaptaciones particulares al fuego como la serotinia y germinación estimulada por calor gozan de una clara ventaja en relación con el resto de las especies nativas en condiciones post-fuego.

Considerando al fuego como un agente de selección, el objetivo principal de este trabajo es evaluar el rol del fuego en la invasibilidad de *Pinus radiata* favoreciendo el reclutamiento post-fuego como el aumento del grado de serotinia y la germinación y afectando las características genéticas y genómicas adaptativas. El estudio se realizó en la Reserva Forestal de Usos Múltiples Lago Epuyén, Provincia de Chubut utilizando las siguientes metodologías: i) se estimó y comparó el grado de serotinia y el tamaño del banco de semillas aéreo entre individuos de plantaciones no quemadas e individuos adultos reclutados luego de incendios; ii) se analizó experimentalmente los efectos de tratamientos asociados a fuego (ceniza y golpes térmicos) sobre la germinación, vigor y supervivencia temprana de semillas provenientes de individuos de plantaciones no quemadas e individuos adultos reclutados luego de incendios; y iii) se estudiaron los efectos genéticos neutrales de eventos fundadores y deriva genética y procesos selectivos mediados por fuego durante la introducción y establecimiento en el área invadida mediante marcadores genómicos de siguiente generación.

Los resultados obtenidos indican que: i) el fuego actúa como un agente de selección sobre un carácter relacionado a la aptitud reproductiva de *Pinus radiata* frente a incendios, incrementando en sólo una generación los niveles de serotinia; ii) se obtuvo un incremento en la respuesta germinativa y la supervivencia de las plántulas frente a condiciones asociadas a incendios; iii) los individuos de plantaciones no quemadas difieren genéticamente de aquellos reclutados luego de incendios en una magnitud mayor a la esperada por deriva génica, encontrando además pruebas de selección debido a una mayor divergencia en rasgos morfológicos cuantitativos (e.g. serotinia y altura de los individuos) que en marcadores moleculares neutros, y debido a la presencia de múltiples loci bajo selección al realizar estudios genómicos de asociación; y iv) los individuos del rango exótico (Puerto Patriada) presentan diferencias respecto del rango nativo de la especie en cuanto a su diversidad genética posiblemente debido a los eventos fundadores, deriva genética y procesos selectivos actuantes durante el proceso de invasión. Estos resultados apoyan en general la afirmación de que las plantas exóticas pueden sufrir un proceso de selección rápida, y que la evolución adaptativa puede ser uno de los diversos mecanismos clave que permiten a las especies exóticas convertirse en invasoras. El posible proceso selectivo, mediado por fuego, que promueve estos cambios podría tener base genómica y estar afectando distintas características y funciones biológicas. Podemos concluir entonces, que el fuego puede actuar como una fuerza selectiva sobre *P. radiata* en solo una generación, favoreciendo caracteres en la descendencia post-fuego para una mayor adaptación y promoviendo la invasión de esta especie. Estos resultados pueden dar lugar a una mayor comprensión de la relación entre la arquitectura genética y los factores ecológico-evolutivos que confieren el éxito de la invasión.

Abstract

Currently, invasions of exotic trees are a global concern because of their impact on biodiversity. This is the case of exotic conifer plantations, which while contributing significantly to the economies of many countries, their extensive practice carries high associated costs to ecosystem composition and functioning. Conifers have been widely cultivated both outside and within their natural geographic range, and in many cases have escaped from the original plantations and invaded adjacent habitats. Within conifers, the genus *Pinus* is cited among the most invasive taxa, with *Pinus radiata* being a highly invasive species and also one of the most widely planted tree species worldwide. Exotic conifer invasions are being questioned for their many negative impacts such as soil erosion, loss of biodiversity, and increased fire intensity and frequency. Although fire has been and is a recurrent disturbance in Patagonia, changes in land use and the introduction of more flammable exotic conifer species may lead to changes in the fire regime, increasing its frequency and intensity. In this context, exotic species that have particular adaptations to fire as serotiny and heat-stimulated germination have a clear advantage over the native species in post-fire conditions.

Considering fire as a selection agent, the main objective of this work is to evaluate its role in the invasiveness of *Pinus radiata*. This would occur favoring characters related to post-fire recruitment such as serotiny and promoting germination and establishment. In addition, we evaluate how fire affects the genetic and genomic characteristics of adaptive value of plantations and post-fire invasions within the exotic and native ranges. For this, different molecular markers were used in order to understand the effects of neutral and selective forces affecting the invasion. The study was conducted in the Multiple Uses Forestry Reserve of Lake Epuyén, Chubut Province applying the following methodologies: i) the degree of serotiny and size of the aerial seed bank was estimated and compared between individuals from unburned plantations and adult individuals recruited after fires; ii) the effects of treatments associated with fire (ash and thermal shocks) on the germination, vigor and early survival of seeds from unburned plantations and adult individuals recruited after fires were analyzed experimentally; and iii) the genetic effects of neutral forces as founding events and genetic drift and selective processes mediated by fire during the introduction and establishment in the invaded area using genomic markers were studied.

The results showed that: i) fire acts as a selection agent on a trait related to the reproductive aptitude of *Pinus radiata* against fire, increasing in only one generation the

serotiny levels; ii) increase in the germinative response and the tolerance of the seedlings against conditions associated with fire; iii) individuals from unburned plantations differ genetically from those recruited after fires to a greater extent than expected due to genetic drift, and there is also evidence of selection due to the greater divergence in quantitative morphological traits (e. g. serotinia and tree height) than in neutral molecular markers, and due to the presence of multiple loci under selection when carrying out genomic association studies; and iv) individuals of the exotic range (Puerto Patriada) present differences from the native range of the species in terms of genetic diversity possibly due to the founding events, genetic drift and selective processes acting during the invasion process. These results generally support the argument that exotic plants can undergo a process of rapid selection, and that adaptive evolution may be one of several key mechanisms that allow these species to become invasive. The possible fire-mediated selective process that promotes these changes may be genomic-based and may be affecting different biological characteristics and functions. We can conclude then, that fire can act as a selective force on *P. radiata* in just one generation, favoring traits in the post-fire offspring a greater adaptation and promoting the invasion of this species. These results may lead to a better understanding of the relationship between genetic architecture and the ecological-evolutionary factors that confer the success of the invasion.

Índice

1.1 Invasiones biológicas, generalidades	1
1.2 Proceso de invasión.....	3
1.3 Evolución en especies invasoras	5
1.4 Marcadores Moleculares	8
1.5 El rol del fuego en la invasión de especies pirófilas	8
1.6 <i>Pinus radiata</i> como modelo de estudio	12
1.7 Objetivos.....	14
1.5.1 Objetivos específicos.....	15
1.8 Hipótesis y predicciones.....	15
1.9 Sitio de estudio.....	16
1.10 Estructura de la tesis.....	20
Capítulo 2 Grado de serotinia en la invasión post-fuego de <i>Pinus radiata</i>	22
2.1 Introducción.....	22
2.2 Materiales y Métodos	25
2.2.1 Diseño de muestreo	25
2.2.2 Análisis de datos.....	29
2.3 Resultados.....	30
2.4 Discusión	35
Capítulo 3 Germinación y vigor temprano asociados a incendios en <i>Pinus radiata</i>	40
3.1 Introducción.....	40
3.2 Materiales y Métodos	43
3.2.1 Diseño experimental.....	43
3.2.2 Análisis de datos.....	46
3.3 Resultados.....	46
3.3.1 Germinación.....	46
3.3.2 Supervivencia y vigor temprano	48
3.4 Discusión	51
Capítulo 4 Variación genética neutral y fenotípica de <i>Pinus radiata</i>	55
4.1 Introducción.....	55
4.2 Materiales y Métodos	57
4.2.1 Diseño muestral.....	57
4.2.2 Análisis isoenzimático y estimación de divergencia fenotípica.....	58
4.3 Resultados.....	60
4.4 Discusión	64
Capítulo 5 Variación genética adaptativa de <i>Pinus radiata</i>	68
5.1 Introducción.....	68
5.2 Materiales y Métodos	73
5.2.1 Diseño Muestral	73
5.2.1 Extracción de ADN, armado de librerías y secuenciación	74
5.2.3 Filtrado de secuencias, genotipado y análisis de SNPs	75
5.2.4 Diversidad genética y estructura poblacional	75
5.2.6 Marcadores adaptativos	76
5.3 Resultados.....	77
5.4 Discusión	84
Capítulo 6 Discusión general y Conclusiones.....	88
Conclusiones y consideraciones finales.....	93
Bibliografía.....	94
Agradecimientos.....	119

Apéndices	120
Apéndice 1: Material suplementario Capítulo 2.....	121
Apéndice 2: Material suplementario Capítulo 3.....	125
Apéndice 3: Material suplementario Capítulo 5.....	130
Trabajo de Respaldo	134

Índice de tablas

Tabla 1.1. Ejemplos de aspectos ecológicamente negativos de las invasiones de coníferas exóticas.....	2
Tabla 1.2. Estimación de las plantaciones de pino radiata por país, en base a datos extraídos de Mead (2013).....	13
Tabla 2.1. Media y desvío estándar (SD) de los componentes del banco de semillas aéreo para rodales de plantación (P) e invasión post-fuego 1987 (I) de <i>P. radiata</i> . Las variables estudiadas son: número de semillas viables por cono, viabilidad (proporción de semillas viables por cono), número de conos serótinicos por árbol, número de semillas por árbol y número de árboles por hectárea. Solo las semillas viables fueron usadas para la estimación del tamaño de banco aéreo. Las comparaciones entre P e I se realizaron aplicando Test de Kruskal Wallis (KW).	31
Tabla 2.2. Media, desvío estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max) de la edad y características morfométricas en rodales de plantación (P) e invasión post-fuego (I) de <i>P. radiata</i> . Las variables estudiadas son: edad, altura, diámetro a la altura del pecho (DAP), área de copa y diámetro de copa. Las comparaciones entre P e I se realizaron aplicando Test de Kruskal Wallis (KW).	31
Tabla 2.3. Media, desvío estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max) de la densidad de árboles, apertura de canopy y radiación solar en rodales de plantación (P) e invasión post-fuego (I) de <i>P. radiata</i> . Las comparaciones entre P e I se realizaron aplicando Test de Kruskal Wallis (KW).	31
Tabla 2.4. Tamaño del banco de semillas aéreo para diferentes especies de pinos en sus rangos nativo y exótico. Los datos de invasión post-fuego en el área de estudio se indica con un asterisco; el resto de la información reportada para rango exótico corresponde a plantaciones.	37
Tabla 4.1. Diversidad genética para la plantación no quemada y tres cohortes de invasión post-fuego (Invasiones 1987, 2012 y 2015) de <i>Pinus radiata</i> estimada mediante el número medio de alelos por locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e), heterocigosis observada (H_o) y esperada bajo la condición de equilibrio Hardy Weinberg (H_E). Las comparaciones entre las diferentes cohortes se realizaron aplicando Test de Friedman.....	61
Tabla 4.2. Comparaciones de a pares de la divergencia genética (F_{ST}) para la plantación no quemada y tres cohortes de invasión post-fuego (Invasiones 1987, 2012 y 2015) de <i>Pinus radiata</i> analizadas en este capítulo. Se señala con un asterisco aquellos F_{ST} significativamente diferentes de cero teniendo en cuenta los intervalos de confianza (IC) calculados mediante remuestreo.	63
Tabla 4.3. Divergencia genética (F_{ST}) y divergencia fenotípica (PST) para cinco caracteres morfológicos cuantitativos entre individuos de <i>Pinus radiata</i> de plantación no quemada y de invasión reclutada luego del incendio de 1987. Se informan los intervalos de confianza (IC) superior e inferior calculados por bootstrap.	64
Tabla 4.4. Diversidad genética intra-poblacional (HS) media para <i>Pinus radiata</i> en cuatro cohortes del sitio de estudio (Argentina), siete poblaciones exóticas de Australia y Nueva Zelanda (Oceanía) y las cinco poblaciones nativas en Estados Unidos y México (Rango Nativo). En los tres casos el marcador molecular utilizado fueron isoenzimas.	64
Tabla S2.1. Descripción en cuanto a la altitud, pendiente y exposición de los rodales de invasión (I) y plantación (P) muestreados. La exposición se expresa en grados de orientación de brújula, donde 0 y 360° indican el Norte, 90° el Este, 180° el Sur y 270° el Oeste; la altitud se expresa en msn y la pendiente en porcentaje.	121

Tabla S2.2: Estadísticas descriptivas y comparativas por rodal (R) de las características morfométricas, de <i>P. radiata</i> para rodales de plantación (P) y de invasión post-fuego (I). Variables comparadas: edad (años), diámetro a la altura del pecho (cm), altura (m), área de la copa (m ²) y diámetro de la copa (m).....	123
Tabla S2.3. Modelo lineal generalizado del efecto del tipo de rodal (Plantación [P] e Invasión [I]) de <i>Pinus radiata</i> , densidad, edad, DAP y radiación solar sobre el grado de serotinia. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$	124
Tabla S3.1. Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de <i>Pinus radiata</i> y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico) sobre el porcentaje de germinación. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, .: $p < 0.1$	125
Tabla S3.2. Modelos de riesgo proporcional de Cox del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de <i>Pinus radiata</i> y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de shock térmico) sobre la tasa de germinación. Los parámetros para plantación y tratamiento control no son representados en el resumen ya que el modelo los incorpora como ordenada al origen.	125
Tabla S3.3. Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de <i>P. radiata</i> y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de shock térmico) sobre la longitud de la radícula. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$	125
Tabla S3.4. Comparaciones por pares para el modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla de <i>Pinus radiata</i> (Plantación e Invasión) y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de shock térmico) sobre la longitud de la radícula. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, .: $p < 0.1$	126
Tabla S3.5. Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla de <i>Pinus radiata</i> (Plantación e Invasión) y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de shock térmico) sobre la presencia de cotiledones al final del experimento. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, .: $p < 0.1$	126
Tabla S3.6. Comparaciones por pares para el modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla de <i>Pinus radiata</i> (Plantación e Invasión) y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico) sobre la presencia de cotiledones al final del experimento. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, .: $p < 0.1$	127
Tabla S3.7. Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de <i>Pinus radiata</i> y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico) sobre la supervivencia de las plántulas a los 30 días del trasplante. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable	

independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$ 128

Tabla S3.8. Comparaciones por pares para el modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de *Pinus radiata* y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico) sobre la supervivencia de las plántulas a los 30 días del trasplante. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$ 128

Tabla S 5.1. Resultados de la asociación de los loci bajo selección con las bases de datos de datos GenBank y con las bases de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI). Para cada loci (L) se indica: en que comparación (C) resultado indicado como bajo selección (rangos [R] o cohortes [Co]), el gen o familia de genes con los que demostró mayor similitud así como una descripción de la función de dicho gen y las principales especies a las que correspondían las secuencias reportadas para dicho gen y con las que demostró similitud nuestra secuencia. Las celdas en color verde indican que se encontró similitud para ese loci con un gen cuya función esta descripta; las celdas de color amarillo que se encontró similitud con secuencias de ARNm lo que no indica que puede ser una secuencia expresada pero sin producto proteico reportado; y por ultimo las celdas de color rojo indican que no se encontraron secuencias similares en bases de datos. 130

Índice de figuras

- Figura 1.1.** Fase de retraso y sus posibles causas genéticas, en el recuadro se muestran posibles patrones hipotéticos de variación genética en un solo locus entre el establecimiento inicial (A) y el inicio de la expansión acelerada (B). Entre las posibles causas genéticas encontramos: (C) aumento de la variación genética tras la inmigración de nuevos genotipos, (D) selección y (E) mutación adaptativa de novo (Modificado de Bock et al. 2015). 7
- Figura 1.2.** Diagrama conceptual del ciclo de fuego invasión realizado en base a D'Antonio y Vitousek 1992 y Mandle et al. 2011. 10
- Figura 1.3.** (A) Ubicación de las poblaciones nativas de *Pinus radiata* en la costa pacífica de Norteamérica (azul) y sitios de presencia reportados para esta especie en su rango exótico (rojo). (B) Las tres poblaciones nativas continentales se encuentran en la costa de Estados Unidos (Año Nuevo, Monterey y Cambria) y las dos poblaciones insulares en México (Islas Guadalupe y Cedros). 12
- Figura 1.4.** Mapa de la zona de estudio, correspondiente al sitio piloto “Bosque Andino Patagónico” ubicado al norte de la provincia de Chubut. 17
- Figura 1.5.** Mapa de la zona de estudio donde se muestran el área afectada por los incendios de 1987, 2012 y 2015; realizado en base a información proporcionada por el centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP) y el departamento de Parques y Reservas de la Subsecretaria de Bosques de Chubut. 19
- Figura 2.1.** Conteo y clasificación de conos para *Pinus radiata*. (A) Se tomaron múltiples fotografías laterales del perfil del árbol con un teleobjetivo de 300 mm. Estas imágenes se unieron en una panorámica de alta calidad (B) que permitió el recuento y clasificación de los conos mediante el software ImageJ. Los conos se clasificaron como no serótimos (C), serótimos (D) e inmaduros (E). 26
- Figura 2.2.** (A) La flecha roja indica la incisión del cono de *P. radiata* donde se insertó el termopar tipo K. Luego de insertar el termopar, la incisión se cubrió con una pasta de aserrín para que la perforación no afectará el aislamiento térmico del cono. (B) Cono abierto y semillas liberadas después del golpe de calor. 27
- Figura 2.3.** Ejemplos de las temperaturas internas alcanzadas por los conos de *Pinus radiata* durante su calentamiento dentro de la estufa para estimular su apertura. En el panel superior se observa la temperatura alcanzada por la estufa de laboratorio (curva en color rojo) durante la exposición de los conos a altas temperaturas para propiciar su apertura. En el panel inferior se presentan a modo demostrativo las curvas de temperatura alcanzada en el interior de tres conos (representados en distintos colores) durante el calentamiento. 28
- Figura 2.4.** Número de semillas viables por metro cuadrado para *Pinus radiata* en plantación e invasión post-fuego. Los gráficos de caja indican la mediana (línea horizontal oscura), la media (círculo blanco), el primer y tercer cuartil (caja) y el rango (línea vertical) excluyendo valores atípicos (círculos negros). 31
- Figura 2.5.** Análisis de componentes principales de rodales de plantación (triángulos) e invasión (círculos) de *Pinus radiata*. El análisis se realizó en base a 5 variables: densidad, edad, DAP, radiación solar y grado de serotinia. El valor medio de cada elipsoide está representado por un triángulo o círculo de mayor tamaño para plantación e invasión respectivamente. Las flechas indican la dirección de los efectos de cada variable. 33
- Figura 2.6.** Grado de serotinia (eje y) de rodales de plantación e invasión de *Pinus radiata* en función de (A) densidad (miles de árboles/ha), (B) edad (años), (C) DAP (cm) y radiación solar (mol/m^2). La invasión es representada como curvas de regresión punteadas y la plantación como líneas de regresión continuas. Los valores observados (gris) y estimados

(negro) se representan como triángulos para invasión y círculos para plantación respectivamente.	34
Figura 2.7. Distribuciones de frecuencias para el grado de serotinia (eje X) de rodales de plantación e invasión de <i>Pinus radiata</i> en base a datos observados y modelados. En el eje Y izquierdo se representa la densidad de probabilidad estimada para el grado de serotinia para plantación (gris oscuro) e invasión (gris claro). En el eje Y derecho se representan el número de árboles observados para plantación (línea completa) e invasión (línea punteada). El test de Anderson Darling arrojó diferencias significativas ($P < 0,001$) para las distribuciones de frecuencias entre plantación e invasión tanto para los datos observados como modelados. ..	35
Figura 3.1. (A) Semillas de <i>Pinus radiata</i> germinadas, con diferentes largos de radícula al momento del monitoreo, se indica la escala en la esquina superior izquierda, esta escala corresponde a 2 mm en las dos imágenes superiores de la columna y 5mm en la imagen inferior. (B) Proceso de liberación de los cotiledones en plántulas de <i>Pinus radiata</i> , secuencia temporal de arriba abajo, se indica la escala correspondiente a 5 mm en la esquina superior izquierda de las dos imágenes superiores de la columna.	45
Figura 3.2. Porcentaje de germinación para semillas provenientes de rodales de plantación e invasión de <i>Pinus radiata</i> en función de los tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C). Los gráficos de caja indican la mediana (línea horizontal oscura), la media (círculo), el primer y tercer cuartil (caja) y el rango excluyendo valores atípicos (línea vertical).	47
Figura 3.3. Tasa de germinación para semillas provenientes de rodales de plantación e invasión de <i>Pinus radiata</i> en función del tiempo para (A) tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C) representados por separado para el origen de las semillas (plantación e invasión) y (B) orígenes de las semillas representados por separado para los tratamientos asociados a fuego.....	48
Figura 3.4. Longitud de la radícula, al momento del trasplante, de las plántulas provenientes de semillas de rodales de plantación e invasión de <i>Pinus radiata</i> , que fueron sometidas a los tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C). Los gráficos de caja indican la mediana (línea horizontal oscura), la media (círculo), el primer y tercer cuartil (caja) y el rango excluyendo valores atípicos (línea vertical).	49
Figura 3.5. Porcentaje de plántulas con cotiledones al momento del trasplante de las plántulas provenientes de semillas de rodales de plantación e invasión de <i>Pinus radiata</i> , que fueron sometidas a los tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C). Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas entre invasión y plantación.	50
Figura 3.6. Número de plántulas vivas a los 30 días del trasplante provenientes de semillas de rodales de plantación e invasión de <i>Pinus radiata</i> , que fueron sometidas a los tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C). Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas entre invasión y plantación.	51
Figura 3.7. Imagen del sitio de estudio donde puede observarse la alta densidad de individuos de <i>Pinus radiata</i> reclutados luego del incendio de 2015.	54
Figura 4.1. Escenarios representativos de las 4 cohortes de <i>Pinus radiata</i> (plantación e invasiones posteriores a los incendios de 1987, 2012 y 2015) muestreadas en este capítulo. Tanto las plantaciones como la invasión 1987 están compuestas por individuos adultos, mientras que las invasiones 2012 y 2015 están compuestas por plántulas.	58
Figura 4.2. (A) Esquema general del proceso de análisis de isoenzimas mediante electroforesis horizontal sobre geles de almidón que incluye: (I) colecta de las muestras, (II)	

extracción de homogenatos proteicos, (III) electroforesis horizontal y (IV) análisis de fenotipos electroforéticos. (B) Ejemplo de fenotipos electroforéticos para <i>Pinus radiata</i> , obtenidos para la enzima peroxidasa anódica. Se pueden observar dos alelos para este sitio, el alelo A en violeta y el alelo B en azul. Se pueden observar individuos homocigotas (solo presentan el alelo A o B) o heterocigotas (presentan ambos alelos).	59
Figura 4.3. Cambios (Media \pm SE) en el índice de fijación (F_{IS}) para las 4 cohortes de <i>Pinus radiata</i> analizadas (plantación no quemada e invasiones post-incendios de 1987, 2012 y 2015). Se señalan mediante letras los grupos con diferencias estadísticas significativas, comparados de manera pareada por locus utilizando la prueba de Friedman y usando como test a <i>posteriori</i> la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon.....	62
Figura 4.4. Media (\pm SE) de la diversidad genética intra-poblacional (H_s) para las 4 cohortes de <i>Pinus radiata</i> analizadas (plantación no quemada e invasiones post-incendios de 1987, 2012 y 2015).....	63
Figura 5.1. Tamaño poblacional en función del tiempo para una población exótica hipotética que sufre dos cuellos de botella; el primero durante el proceso de introducción en el nuevo rango y el segundo frente a un disturbio como el fuego. Luego de los cuellos de botella se espera una disminución de la diversidad genética y un incremento de la endogamia.....	69
Figura 5.2. Esquema gráfico para tres individuos hipotéticos con diferencias en Polimorfismos de Nucleótido Único. Se señalan en gris lo sitios polimórficos, i.e. aquellos sitios donde existen diferencias entre individuos. Puede observarse que dos de los individuos presentan la variante alélica A y el otro individuo difieren en los sitios de SNP y presenta la variante alélica B.	72
Figura 5.3. Escenarios representativos de las distintas situaciones muestreadas e incluidas en los dos tipos de comparaciones realizadas en este capítulo para <i>Pinus radiata</i> , agrupando a los individuos diferencialmente en: i) gris claro: por rango (nativo y exótico) y ii) gris oscuro: por cohortes (post-fuego o libre de incendios).....	74
Figura 5.4. Índices de diversidad genética para loci totales, entre (A) rangos [nativo y exótico] y (B) entre cohortes sin fuego [SF] y reclutadas post-fuego fuego [CF] de <i>Pinus radiata</i> . Comparaciones de la varianza en el número de alelos privados (AP), heterocigosis esperada (HE) y diversidad nucleotídica ($P_i = P$). Las letras representan significancia estadística en análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples por pares mediante test de T pareado por locus.....	78
Figura 5.5. Índices de diversidad genética para loci adaptativos (naranja) y neutrales (azul), entre rangos (A) y entre cohortes sin fuego [SF] y reclutadas post-fuego fuego [CF] (B) de <i>Pinus radiata</i> . Comparaciones de la varianza en el número de alelos privados (AP), heterocigosis esperada (HE) y diversidad nucleotídica ($P_i = P$). Las letras representan significancia estadística en análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples por pares mediante test de T pareado por locus. Las letras coloreadas representan diferencias dentro de cada tipo de locus, mientras que las diferencias entre loci adaptativos y neutrales para ese rango o cohorte se representan con asteriscos (***).....	80
Figura 5.6. Índice de fijación (F_{IS}) para loci totales (negro) adaptativos (naranja) y neutrales (azul), entre rangos (A) y entre cohortes sin fuego [SF] y reclutadas post-fuego fuego [CF] (B) de <i>Pinus radiata</i> . Las letras representan significancia estadística en análisis de la varianza (ANOVA) y comparaciones por pares múltiples por pares mediante test de T pareado por locus. Las letras coloreadas representan diferencias dentro de cada tipo de locus, mientras que las diferencias entre loci adaptativos y neutrales para ese rango o cohorte se representan con asteriscos (***).....	81

Figura 5.7. Distancias F_{ST} para loci totales (negro), adaptativos (naranja) y neutrales (azul), entre rangos (A) y entre cohortes (B) de <i>Pinus radiata</i> . Las barras indican intervalos de confianza del 95% calculados por bootstrap con mil repeticiones.....	82
Figura 5.8. Diagrama de cuerdas representando la relación entre los loci bajo selección y los principales procesos biológicos con los que podrían estar relacionados, para la comparación entre (A) rangos nativo y exótico y (B) entre cohortes con y sin fuego de <i>Pinus radiata</i> . A la izquierda se señalan los números identificadores de cada loci y a la derecha los procesos biológicos con los que se relacionan.....	84
Figura 6.1. (A) Modelo de distribución potencial para <i>Pinus radiata</i> realizado en base a datos de ocurrencias reportados en bases de datos públicas (GBIF 2014). Se muestra la probabilidad de ocurrencia de la especie en una gama creciente de color verde, donde verdes oscuros indican mayor probabilidad de ocurrencia y por tanto una mayor aptitud ambiental. El modelo fue realizado mediante el algoritmo <i>Random Forest</i> a partir de datos de ocurrencia publicados en GBIF. (B) Mapa de la ubicación de las plantaciones de <i>Pinus radiata</i> en Patagonia, realizado en base a información proporcionada por el centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP).	88
Figura S2.1: Disposición de los rodales de Invasión (círculos rojos) y Plantación no quemada (círculos azules) muestreados dentro de la Reserva Forestal Lago Epuyén.....	121

Capítulo 1

Introducción general

1.1 Invasiones biológicas, generalidades

Las invasiones biológicas tienen lugar cuando los organismos son transportados a nuevas áreas, generalmente distantes de su lugar de origen, por lo que son consideradas especies exóticas. En estas áreas invadidas, sus descendientes proliferan, se dispersan y persisten (Mack et al., 2000). Ya que una especie exótica es aquella que no estaría presente en un área si no hubiera sido transportada (intencional o accidentalmente) por las personas, la actividad humana es considerada un factor clave en la difusión de especies fuera de su rango de distribución nativo (Pyšek y Richardson, 2008). Actividades relacionadas con la horticultura y forestación con especies exóticas y su escape a ambientes naturales han favorecido históricamente las invasiones (Potgieter et al., 2020). Sin embargo, no todas las especies que arriban a un sitio del cual no son nativas se convertirán en invasoras y por lo tanto ha habido numerosos estudios analizando las características de las especies que efectivamente invaden un sitio y las características de estos últimos que los convierten en vulnerables de ser invadidos (Drake et al., 1989). La invasión es facilitada por factores como el comercio y los viajes intercontinentales, la dispersión a lo largo de las redes de transporte regionales (e.g. carreteras, cursos de agua, ferrocarriles) y la capacidad de la especie exótica para la colonización local y el rápido aumento poblacional (Hulme, 2009; Pyšek y Richardson, 2008). Si bien los seres humanos siempre han transportado e introducido especies en nuevos ambientes, la mayoría de las especies exóticas han sido introducidas luego de que el transporte marítimo comenzó a hacerse masivo (Aguin-Pombo, 2012). El ritmo al que las especies superan las barreras naturales e invaden nuevos hábitats ha aumentado drásticamente como consecuencia de la globalización (Hulme, 2009). Las invasiones biológicas son consideradas como uno de los grandes impulsores del cambio global, interactuando y retroalimentándose con otros factores como los cambios en el uso de la tierra o en el régimen de disturbios (Franklin, Serra-Diaz, Syphard, y Regan, 2016).

Los impactos que producen las especies invasoras, tanto ecológicos como económicos, han suscitado preocupación a nivel mundial debido a sus altos costos asociados (Pimentel, 2014). En el caso de las invasiones de plantas, existe numerosa bibliografía que reconoce impactos negativos que actúan a distintos niveles: (i) sobre especies y comunidades [e.g. cambios en la composición y abundancia] (Hejda, Pyšek, y Jarošík, 2009; Vilà et al.,

35 2011); (ii) produciendo cambios en los regímenes de disturbios (Brooks et al., 2004; Mack y
 36 D'Antonio, 1998); (iii) cambios en los ciclos biogeoquímicos [e.g. cambios en los ciclos de
 37 nutrientes] (Ehrenfeld, 2003; Vilà et al., 2011); (iv) afectando diversos servicios
 38 ecosistémicos (Franzese, Raffaele, Blackhall, Rodriguez, y Soto, 2020; Pejchar y Mooney,
 39 2009; van Wilgen, Reyers, Le Maitre, Richardson, y Schonegevel, 2008; Vaz et al., 2017;
 40 Vilà et al., 2010; Vilà y Hulme, 2017); y (v) causando impactos económicos significativos,
 41 ya sea por pérdidas económicas directas (e.g. degradación de tierras) o relacionadas al control
 42 de la invasión y restauración de áreas invadidas (Bond y van Wilgen, 2012; Buhle, Margolis,
 43 y Ruesink, 2005; van Wilgen et al., 2012; van Wilgen, Richardson, Maitre, Marais, y
 44 Magadlela, 2001; Vilà y Pujadas, 2001).

45 Distintas especies de coníferas que han sido cultivadas en muchas partes del mundo
 46 tanto fuera como dentro de su rango geográfico han escapado de las plantaciones originales
 47 invadiendo los ecosistemas adyacentes (Richardson y Higgins, 2000). Las plantaciones de
 48 coníferas exóticas han sido ampliamente implementadas en diversas regiones del Hemisferio
 49 Sur con diversos propósitos como la producción de madera, leña y el control de la erosión del
 50 suelo en zonas muy degradadas (Richardson y Rundel, 1998). Sin embargo, existen
 51 evidencias que muestran una amplia variedad de aspectos ecológicamente negativos de las
 52 coníferas exóticas sobre diversos factores relacionados al suelo, agua y la biodiversidad del
 53 ecosistema invadido (Tabla 1.1).

54

55 **Tabla 1.1.** Ejemplos de aspectos ecológicamente negativos de las invasiones de coníferas exóticas.

<i>Aspecto</i>	<i>Efectos reportados</i>	<i>Referencias</i>
<i>Biodiversidad</i>	Disminución en la diversidad y abundancia de invertebrados	(Corley et al., 2018; Pawson, McCarthy, Ledgard, y Didham, 2010)
	Disminución en la riqueza, abundancia y cobertura de plantas	(Davis, Callaway, et al., 2019; Franzese, Urrutia, García, Taylor, y Pauchard, 2017)
	Homogenización de la estructura y disminución en la riqueza, abundancia y diversidad de especies	(García et al., 2018; Paritsis y Aizen, 2008; Simberloff et al., 2010)
<i>Suelo y agua</i>	Aumento en la erosión y disminución en la fertilidad	(Hamilton, 1965; Michelsen, Lisanewick, Friis, y Holst, 1996)
	Cambios en la composición e incrementos en la inflamabilidad de la hojarasca	(Franzese, Raffaele, Blackhall, Rodriguez, y Soto, 2019)

	Reducción en la tasa de descomposición	(Araujo y Austin, 2020)
	Reducción en el suministro de agua	(Bonnesoeur et al., 2019; Simberloff et al., 2010)
	Incremento en la evapotranspiración	(Milkovic, Paruelo, y Noretto, 2019)
<i>Ciclado de nutrientes</i>	Cambios en el ciclo del carbono (secuestro y cambios en el sitio de reserva)	(Araujo y Austin, 2020)
<i>Régimen de disturbios</i>	Incremento en el riesgo de incendios: incrementos en la cantidad y continuidad del combustible y/o incrementos en la inflamabilidad	(Blackhall y Raffaele, 2019; Cobar-Carranza, García, Pauchard, y Peña, 2014; Franzese, Ripa, Blackhall, Pissolito, y Raffaele, 2018; Paritsis et al., 2018; Raffaele, Nuñez, Eneström, y Blackhall, 2016; Raffaele, Núñez, y Relva, 2015)

56

57 **1.2 Proceso de invasión**

58 Se han sugerido cuatro grandes etapas durante el proceso de invasión en el paisaje
59 (Theoharides y Dukes, 2007):

- 60 1) transporte e introducción,
- 61 2) colonización,
- 62 3) establecimiento y
- 63 4) dispersión (i.e. escape).

64 La primera etapa implica el transporte de la especie desde su rango de origen hacia una nueva
65 región mediada por el ser humano. El origen geográfico y distintas características de las
66 especies exóticas como la resistencia al frío o a las enfermedades, tratarse de una especie de
67 uso ornamental como por ejemplo tener flores vistosas y/o con valor productivo, como por
68 ejemplo las especies forestales, incrementan las posibilidades de que una especie sea
69 transportada (Theoharides y Dukes, 2007). Durante la colonización (segunda etapa),
70 dependiendo la supervivencia inicial de diversos factores como las condiciones ambientales y
71 las interacciones bióticas novedosas, muchas especies exóticas nunca llegan a colonizar la
72 nueva área (Byun, de Blois, y Brisson, 2015; Callaway, 2000; Pearson, Hierro, Chiuffo, y
73 Villarreal, 2014). Un factor importante en la etapa de colonización es la presión de
74 propágulos; donde, por propágulos se entiende un grupo de individuos que llegan a un lugar y
75 pueden promover su colonización, siendo entonces la presión de propágulos una combinación
76 del número de individuos en cualquier evento de introducción y el número de eventos de
77 introducción (Simberloff, 2009). El aumento del número de individuos por evento de

78 introducción aumenta la probabilidad de establecimiento principalmente mediante la
79 disminución de los efectos de la estocasticidad demográfica, mientras que el número de
80 eventos de introducción actúa principalmente mediante la disminución de los efectos de la
81 estocasticidad ambiental (Eschtruth y Battles, 2009; Lockwood, Cassey, y Blackburn, 2005;
82 Simberloff, 2009). La tercera etapa de establecimiento se refiere al desarrollo de poblaciones
83 autosuficientes y en expansión (Theoharides y Dukes, 2007). Ya que los filtros bióticos
84 toman gran importancia durante esta etapa, aquellas características que mejoran el
85 rendimiento competitivo, reducen el solapamiento de nicho entre la especie exótica y las
86 nativas o aumentan la resistencia a enemigos pueden ser importantes (Dietz y Edwards, 2006;
87 Lloret et al., 2005; Theoharides y Dukes, 2007). Entre el establecimiento y la dispersión
88 generalmente se produce una fase de retraso (del inglés *lag phase*), durante la cual la especie
89 se adapta a la nueva comunidad (Aikio, Duncan, y Hulme, 2010). La duración de esta fase
90 puede depender de la falta de variación genética, que impide una adaptación rápida a las
91 nuevas condiciones, o al tiempo necesario para que la población alcance un tamaño umbral
92 que le permita propagarse (Aikio et al., 2010; Crooks, Soulé, y Sandlund, 1999; Theoharides
93 y Dukes, 2007). El tiempo de retraso también puede reflejar la falta de un hábitat local
94 adecuado y condiciones ambientales perjudiciales (Crooks et al., 1999). La evolución rápida
95 a veces puede favorecer nuevos genotipos capaces de sobrevivir en climas diferentes al de
96 origen o de competir con mayor éxito con las especies nativas disminuyendo así esta fase de
97 retraso (Lee, 2002). La dispersión o cuarta etapa se produce a escala de la metacomunidad
98 (Leibold et al., 2004) regional: es decir una región que contiene grupos de poblaciones
99 conectadas mediante dispersión a larga distancia (Theoharides y Dukes, 2007). Mientras que
100 el transporte se produce a escala interregional, esta etapa se refiere a la dispersión dentro de
101 una región durante períodos de tiempo significativamente más largos (Theoharides y Dukes,
102 2007).

103 En cada una de estas etapas los eventos estocásticos median las interacciones entre la
104 especie invasora y la comunidad receptora. Los eventos estocásticos que median la invasión
105 incluyen eventos extremos (e.g. inundaciones, sequías e incendios), enriquecimiento de
106 nutrientes, niveles alterados de herbivoría, acceso a nuevos vectores de transporte (e.g.
107 automóviles, animales y ríos) y disturbios (Catford, Morris, Vesk, Gippel, y Downes, 2014;
108 Eschtruth y Battles, 2009; Pyšek y Richardson, 2008; Radosevich, Stubbs, y Ghera, 2003;
109 Schooler, Cook, Prichard, y Yeates, 2010). Si bien estos eventos estocásticos muchas veces
110 son fundamentales para el resultado de la invasión, a menudo son poco frecuentes y erráticos

111 tanto en el tiempo como en el espacio (Pyšek y Richardson, 2008). Estos factores
112 estocásticos y la naturaleza extrínseca del ecosistema receptor, en conjunto con las
113 características intrínsecas de la especie exótica son igualmente importantes para determinar el
114 éxito y la expansión de las especies invasoras (Radosevich et al., 2003; Thuiller, Richardson,
115 Rouget, Procheş, y Wilson, 2006). Determinados rasgos funcionales de la biología intrínseca
116 de la especie invasora como los relacionados con aspectos fisiológicos, la asignación de
117 biomasa, la tasa de crecimiento, el tamaño y la aptitud, es muy probable que promuevan la
118 capacidad de invasión (Van Kleunen, Weber, y Fischer, 2010). Por lo tanto, el estudio de
119 algunos de estos caracteres (como por ejemplo la tasa fotosintética, producción de semillas o
120 la tasa de crecimiento) es crucial para explicar y predecir el éxito de las invasiones.

121

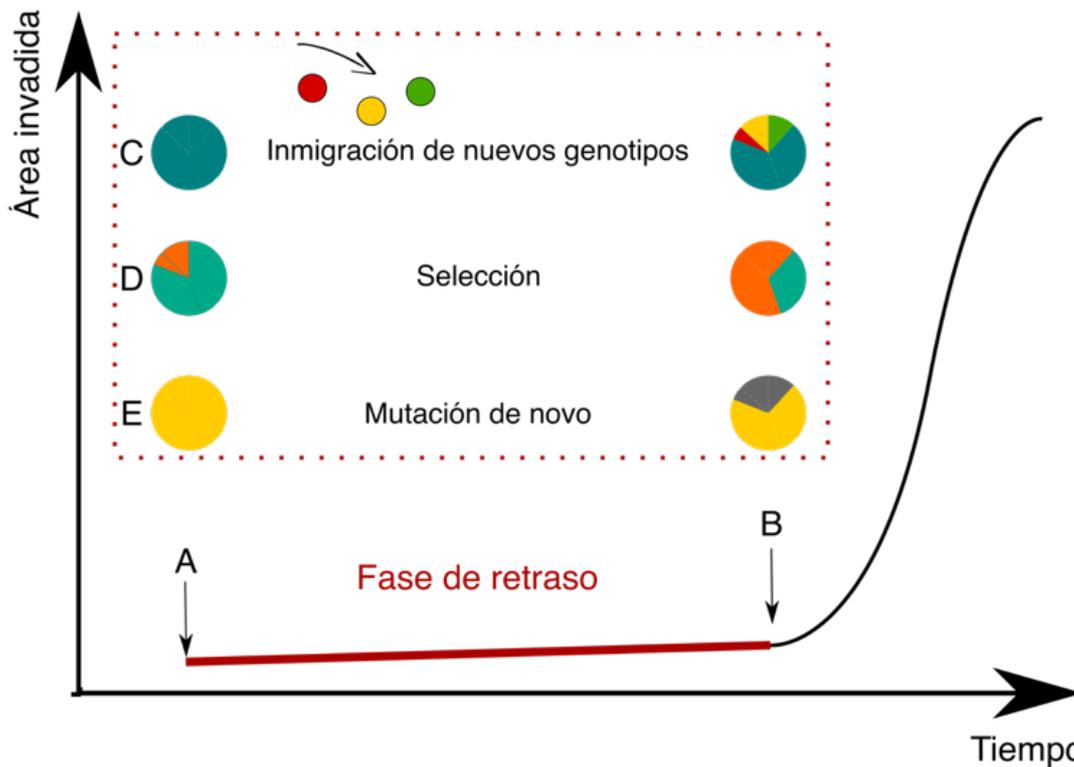
122 **1.3 Evolución en especies invasoras**

123 Una invasión es exitosa cuando la especie exótica presenta una ventaja competitiva que le
124 permite propagarse rápidamente y conquistar nuevas áreas dentro de un ecosistema receptor
125 (Valéry, Fritz, Lefeuvre, y Simberloff, 2008). La evolución contemporánea (i.e. cambios
126 fenotípicos de base genética [hereditarios] en curso o recientes, Hairston, Ellner, Geber,
127 Yoshida, y Fox, 2005) de las poblaciones exóticas puede ocurrir tanto como una respuesta
128 adaptativa a la selección natural como a través de cambios estocásticos neutrales resultantes
129 de la historia de la introducción (eventos fundadores) y la deriva genética (Barrett, Colautti,
130 Dlugosch, y Rieseberg, 2016). Se considera que la evolución es producto de la selección
131 natural cuando afecta la aptitud diferencial de los individuos, por ejemplo aumentando la
132 supervivencia, la reproducción, o las tasas de crecimiento de determinados genotipos que
133 estarán más representados en las generaciones siguientes en una población dada (Barrett
134 et al., 2016). Por lo tanto, la identificación de las causas y las consecuencias de la evolución
135 adaptativa en las poblaciones naturales es informativa para comprender la viabilidad a largo
136 plazo de las poblaciones que experimentan entornos novedosos (Barrett et al., 2016). Incluso
137 si el entorno climático es similar al del área de distribución nativa, una especie exótica sigue
138 enfrentándose a nuevos filtros ambientales y bióticos (e.g. diferentes comunidades
139 microbianas, herbívoros o depredadores), distintos regímenes competitivos, o nuevas
140 especies de presa (Richardson et al., 2000). La evolución adaptativa de los rasgos que
141 aumentan la supervivencia y la reproducción en estos nuevos ambientes facilitará el
142 establecimiento y la proliferación de individuos a nuevas áreas (García-Ramos y Rodríguez,

143 2002). Entonces, la evolución adaptativa, es decir mediada por la selección natural, puede
144 ser un factor crucial que afecte al establecimiento y la propagación de las especies invasoras.

145 Sin embargo, la mayoría de los estudios que examinan las invasiones biológicas desde
146 un punto de vista evolutivo, consideran la plasticidad fenotípica como la principal
147 explicación para el éxito de la invasión (Claridge y Franklin, 2002; Martina y von Ende,
148 2012; Pyšek y Richardson, 2008; Willis, Memmott, y Forrester, 2000). Otra probable
149 explicación a la expansión y/o escape de las especies exóticas en su rango introducido podría
150 ser que las mismas se enfrentan a un entorno más favorable del que proceden debido a la
151 ausencia de sus competidores nativos o de herbívoros y patógenos especializados (Keane y
152 Crawley, 2002). Si bien la plasticidad fenotípica y las condiciones más favorables en el rango
153 exótico son explicaciones posibles a la expansión del rango de las especies exóticas,
154 recientemente han surgido un gran número de trabajos reconociendo la importancia de la
155 adaptación rápida con base genética como proceso facilitador de la invasión (Colautti y
156 Barrett, 2013; Lavergne, Muenke, y Molofsky, 2010; Prentis, Wilson, Dormontt, Richardson,
157 y Lowe, 2008; Sultan, Horgan-Kobelski, Nichols, Riggs, y Waples, 2013; Whitney y Gabler,
158 2008). Es decir, que, el éxito de la invasión de muchas especies podría depender de su
159 capacidad para responder rápidamente a nuevos regímenes de selección más que a una amplia
160 tolerancia fisiológica y/o de aclimatación asociada a una mayor plasticidad (Lee, 2002).

161 Como se mencionó en la sección anterior, se ha observado que la tasa de propagación
162 de una especie invasora se acelera después de un periodo de retraso (Aikio et al., 2010).
163 Desde un punto de vista genético, podemos considerar a esta fase de retraso como el tiempo
164 necesario para (entre otros): i) la evolución a partir de una variación genética permanente o
165 de nuevas mutaciones que dan lugar a una mayor capacidad de adaptación local o de
166 dispersión; y/o ii) la introducción en el rango exótico de genotipos más adecuados o con
167 ciertas combinaciones de genes que favorecen su adecuación y propagación (Kolbe et al.,
168 2004) (Figura 1.1). Sin embargo, en algunos casos, el ambiente puede no ser tan diferente
169 respecto del área de distribución nativa, y la plasticidad puede ser suficiente para que el
170 invasor se extienda rápidamente. En este caso la adaptación se podría producir de todas
171 maneras, pero no sería necesaria para superar un obstáculo significativo para su
172 establecimiento y propagación.



174

175

176

177

178

179

180

181

182

183

184

185

186

187

188

189

190

191

192

193

Figura 1.1. Fase de retraso y sus posibles causas genéticas, en el recuadro se muestran posibles patrones hipotéticos de variación genética en un solo locus entre el establecimiento inicial (A) y el inicio de la expansión acelerada (B). Entre las posibles causas genéticas encontramos: (C) aumento de la variación genética tras la inmigración de nuevos genotipos, (D) selección y (E) mutación adaptativa de novo (Modificado de Bock et al. 2015).

Los procesos evolutivos que actúan durante las etapas iniciales de una invasión pueden también relacionarse con efectos estocásticos como por ejemplo es de esperar un empobrecimiento genético debido a cuellos de botella demográficos y genéticos (i.e. deriva génica) por el número reducido de propágulos que pueden iniciar la invasión y también debido al aislamiento (i.e. reducido flujo génico) reproductivo respecto de las poblaciones nativas (Dlugosch y Parker, 2008; Puillandre et al., 2008). Ambos efectos aleatorios, la deriva génica y el reducido flujo génico tienden a reducir la diversidad genética de las poblaciones que puede impactar negativamente sobre el éxito de la invasión. Sin embargo, la capacidad de algunas especies exóticas para establecerse, invadir y así aumentar su área de distribución, independientemente de la esperada reducida diversidad genética y las consecuencias negativas que esta conlleva, se denomina la paradoja genética de las invasiones (Allendorf y Lundquist, 2003; Estoup et al., 2016). Un ejemplo de esto es la hierba invasora *Solanum rostratum* en China que, a pesar de haber tenido múltiples

194 introducciones, muestra niveles más bajos de diversidad genética que sus poblaciones
195 nativas en México, pese a lo cual se convirtió en una exitosa invasora en este país (Zhao,
196 Solís-Montero, Lou, y Vallejo-Marín, 2013).

197

198 **1.4 Marcadores Moleculares**

199 El estudio de la contribución relativa de la selección natural y de los procesos evolutivos no
200 adaptativos (procesos neutrales) es fundamental para comprender la divergencia fenotípica y
201 adaptativa de las especies invasoras (Chun, Le Corre, y Bretagnolle, 2011). En general, las
202 respuestas genéticas de las plantas se estudian mediante el uso de marcadores genéticos
203 neutrales como las isoenzimas (formas moleculares múltiples de las enzimas pero que
204 catalizan la misma reacción, por lo que tienen el mismo valor adaptativo) y los microsatélites
205 (secuencias cortas repetitivas de ADN no codificante que no son parte de ningún gen). Sin
206 embargo, actualmente existe la tendencia a utilizar técnicas moleculares de secuenciación de
207 siguiente generación (en inglés Next Generation Sequencing) que permiten analizar genomas
208 completos y además permiten distinguir señales neutrales (debido a efectos de la deriva
209 genética y el aislamiento) de las adaptativas (mediadas por selección natural). Las isoenzimas
210 son un marcador neutral co-dominante, y son enzimas que catalizan una reacción particular
211 en el ciclo metabólico de las plantas (Murphy, 1996). Aquellas enzimas que difieren en su
212 movilidad electroforética como resultado de diferencias alélicas en un gen particular, son
213 llamadas aloenzimas. En general, para este tipo de estudios, se toma una muestra de un
214 conjunto de poblaciones y se estima tanto la diversidad dentro de las poblaciones como el
215 grado de diferenciación genética entre distintas poblaciones con el índice F_{ST} de Wright
216 (Wright, 1951).

217

218 **1.5 El rol del fuego en la invasión de especies pirófilas**

219 Una parte importante de la Tierra está sujeta a incendios periódicos, siendo el fuego el
220 disturbio terrestre más común luego de las actividades humanas urbanas y agrícolas, es
221 además considerado como un fenómeno ecológico altamente influyente sobre la dinámica de
222 los ecosistemas (Bond y van Wilgen, 2012; Keeley, Bond, Bradstock, Pausas, y Rundel,
223 2011). Muchos ecosistemas, en particular los de pradera, sabana y bosques de coníferas, han
224 evolucionado con el fuego como factor esencial para la renovación del hábitat; con plantas
225 para las cuales este disturbio es esencial para su reproducción, germinación y establecimiento
226 (Bond y van Wilgen, 2012; Lamont y He, 2017). Un claro ejemplo de esto son los

227 ecosistemas de tipo mediterráneo, que se caracterizan por su marcada estacionalidad
228 climática, con precipitaciones en el invierno y sequías junto con altas temperaturas en el
229 verano, lo que da lugar a un alto crecimiento vegetal que se vuelve altamente inflamable
230 durante la estación seca de verano (Keeley, Bond, et al., 2011). A su vez, los disturbios como
231 el fuego pueden facilitar la invasión de especies en estos sistemas, creando “nuevos
232 ambientes” con características microambientales que, en muchos casos, facilitan el
233 establecimiento de especies exóticas (Boscutti, Sigura, De Simone, y Marini, 2018; Jauni,
234 Gripenberg, y Ramula, 2015).

235 En general se considera que existe una relación directa entre el régimen de incendios
236 y la estructura y composición vegetal, pudiendo las diferencias espaciales y temporales en la
237 composición de especies alterar el comportamiento del fuego (Bradstock, Tozer, y Keith,
238 1997; Schwilk y Caprio, 2011). Esta relación tiene importantes implicancias para el éxito en
239 la invasión de algunas especies sobre todo si la misma está asociada a este disturbio. Existen
240 numerosos estudios sobre la relación entre algunas herbáceas invasoras y el fuego, donde casi
241 siempre estas especies exóticas además aumentan la frecuencia e intensidad de los incendios
242 (D’Antonio y Vitousek, 1992; Miller, Friedel, Adam, y Chewings, 2010; Taylor, Brummer,
243 Rew, Lavin, y Maxwell, 2014; Whisenant, 1990). En el caso de invasoras leñosas, pueden
244 modificar diversos aspectos del régimen de incendios, incluyendo la frecuencia, intensidad y
245 extensión de los mismos (Mandle, Bufford, Schmidt, y Daehler, 2011). En determinadas
246 especies leñosas que actúan incrementando el régimen e intensidad de incendios, podríamos
247 esperar un ciclo fuego-invasión similar al reportado para especies herbáceas (Figura 1.2,
248 D’Antonio y Vitousek 1992). Especies con una mayor inflamabilidad intrínseca, que
249 promuevan la acumulación de material combustible seco (Agee, 1996; Cobar-Carranza et al.,
250 2014; Paritsis et al., 2018) y que además presenten una propagación estimulada por fuego
251 (Franzese y Raffaele, 2017) contribuirían a generar a una retroalimentación positiva de este
252 ciclo de fuego-invasión, aumentando el área de invasión y la frecuencia de incendios.



253 **Figura 1.2.** Diagrama conceptual del ciclo de fuego invasión realizado en base a D'Antonio y
 254 Vitousek 1992 y Mandle et al. 2011.
 255

256

257 Muchas plantas presentan una serie de rasgos o características que les permiten
 258 persistir (i.e. sobrevivir y reproducirse) frente a los incendios (Lamont y He, 2017; Pausas,
 259 2012). Así, de las características de persistencia al fuego se pueden considerar como
 260 adaptativas a aquellas características asociadas a incendios recurrentes (Keeley, Pausas,
 261 Rundel, Bond, y Bradstock, 2011; Lamont y He, 2017). Los principales rasgos de
 262 persistencia son los relacionados con: la supervivencia de los individuos (e.g. rebrote y
 263 presencia de corteza gruesa) y con el reclutamiento post-fuego por semilla (e.g. serotinia y
 264 germinación estimulada por calor) (Pausas, 2012).

265 Dentro de las características que aumentan la probabilidad de que los árboles maduros
 266 sobrevivan al fuego encontramos: corteza gruesa, largas acículas, yemas gruesas y presencia
 267 de auto-poda (Pausas, 2012). Un rasgo que también favorece la persistencia no sólo de las
 268 poblaciones, sino también de los individuos, es el rebrote, ya que una parte de la planta no
 269 muere frente al disturbio (Bond & Midgley, 2003; Keeley, Bond, et al., 2011). El rebrote
 270 puede ocurrir desde yemas protegidas por la corteza, a partir de yemas dispuestas en la base
 271 del tallo o enterradas en el suelo (en raíces, rizomas u otras estructuras subterráneas como
 272 bulbos o tubérculos) (Pausas, 2012).

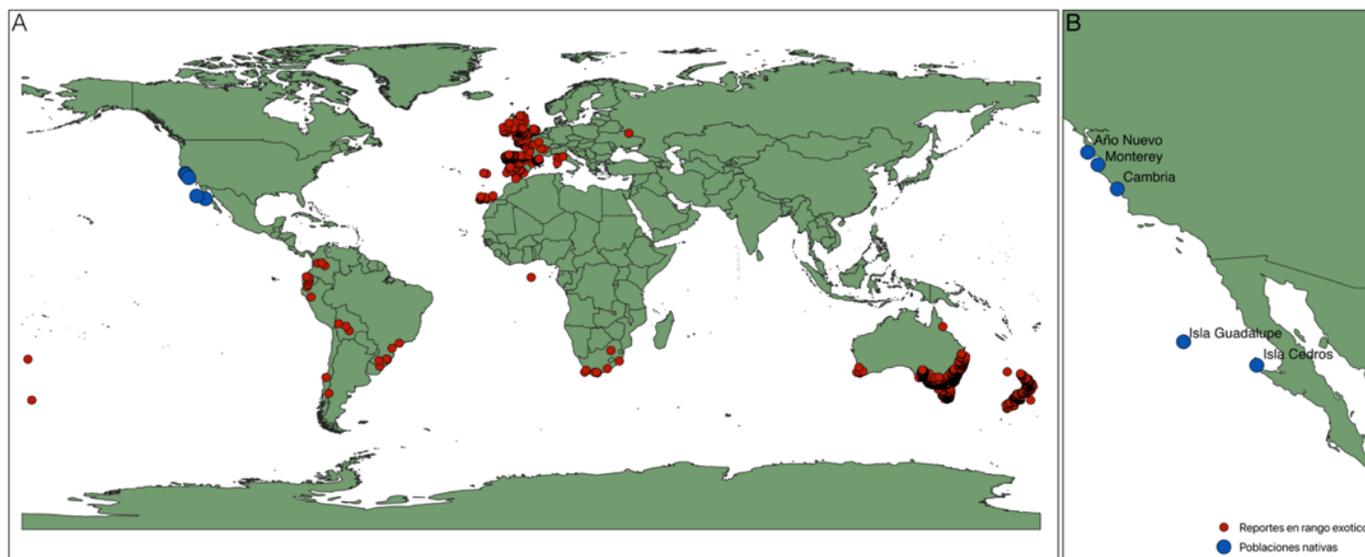
273 La regeneración por vía sexual de las comunidades vegetales recientemente
274 afectadas por el fuego puede deberse al banco de semillas (en suelo o copa) o a semillas
275 transportadas desde fuentes cercanas (Pausas, 2012). La serotinia [permanencia de los conos
276 cerrados sobre la planta por uno o más años después de la maduración de las semillas
277 (Lamont y Enright, 2000)] es un carácter clave en la regeneración post-fuego, ya que las
278 especies que la presentan forman bancos aéreos con semillas que son liberadas de forma
279 masiva después de la ocurrencia de un incendio (Lamont y Enright, 2000; Lamont, Le Maitre,
280 Cowling, y Enright, 1991). De esta manera las especies serótinas maximizan la disponibilidad
281 de semillas cuando las condiciones para el establecimiento son las más favorables (Lamont y
282 Enright, 2000; Pausas, 2012; Thanos, 2004). Además, el fuego puede estimular el
283 reclutamiento mediante varios procesos: i) el calor rompe la latencia de las semillas; ii) el
284 humo estimula la germinación y/o el crecimiento de las plántulas; iii) el calor estimula la
285 liberación de las semillas en especies que presentan serotinia (Goubitz, Werger, y Ne'eman,
286 2003; Lamont, He, y Yan, 2019; Pausas, 2012).

287 Las especies exóticas que presentan adaptaciones al fuego (e.g. serotinia, corteza
288 gruesa, auto poda, etc.) gozan de una clara ventaja en relación con el resto de las especies de
289 la comunidad en condiciones post-fuego. Muchas de las especies de pinos introducidas en
290 Sudamérica habitan en ambientes propensos al fuego en sus áreas de distribución nativas, y al
291 menos cinco de ellas son serótinas: *Pinus contorta*, *Pinus radiata*, *Pinus pinaster*, *Pinus*
292 *halepensis* y *Pinus serotina* (Pausas, 2012; Schwilk y Ackerly, 2001; Simberloff et al., 2010).
293 En el caso de las especies leñosas nativas de Patagonia una de las adaptaciones al fuego (y a
294 otros tipos de disturbio como tala y ramoneo) más importantes que presentan, es la estrategia
295 de regeneración mediante rebrotes. En las especies leñosas este tipo de regeneración permite
296 la recolonización de matorrales y bosques de *Austrocedrus* y *Nothofagus* post-fuego
297 temprano casi en exclusividad durante los primeros 10 años luego del incendio (Cavallero,
298 López, Raffaele, y Aizen, 2015). Existe abundante evidencia que muestra que el fuego ejerce
299 una presión de selección sobre múltiples caracteres fenotípicos en *Pinus* spp. Así, incendios
300 devastadores seleccionarían atributos como la corteza delgada, ausencia de auto-poda,
301 madurez temprana y la presencia de conos seróticos (Bond y van Wilgen, 2012; Keeley,
302 1986).

303

304 1.6 *Pinus radiata* como modelo de estudio

305 Dentro de las coníferas, el género *Pinus* está citado entre los taxones forestales más
306 agresivos con al menos 21 especies invasoras (Richardson y Rejmánek, 2004). Este género,
307 originario del Hemisferio Norte, ha sido introducido en el Hemisferio Sur causando serias
308 perturbaciones en países como Australia, Nueva Zelanda, Sudáfrica, Argentina, Chile y
309 Brasil (Richardson y Higgins, 2000). Una especie altamente invasiva de este género es *Pinus*
310 *radiata* (Rejmanek y Richardson, 1996), que también es una de las especies forestales más
311 ampliamente plantadas en todo el mundo (Figura 1.3 A, Mead 2013). Es nativa de la costa del
312 Pacífico de América del Norte, donde se encuentra actualmente en sólo cinco poblaciones en
313 su rango nativo: tres poblaciones continentales en la costa de California y dos poblaciones
314 insulares en México (Figura 1.3 B, Rogers 2004). Los registros fósiles indican una amplia
315 distribución histórica, pero debido a su restringida distribución actual está clasificada como
316 En Peligro (EN, del inglés *endangered*) e incluida en la Lista Roja de la UICN (Farjon,
317 2013). En su rango de origen, las poblaciones de *P. radiata* están sometidas a fuegos de baja,
318 moderada y alta severidad con diferentes intervalos de tiempo entre incendios (Stephens,
319 Piirto, y Caramagno, 2004). *P. radiata* ha sido clasificado como una especie con persistencia
320 al fuego principalmente debido a su banco de semillas almacenado en el dosel (i.e. serotinia)
321 que se libera después de incendios de alta severidad (Fonda, 2001).



323 **Figura 1.3.** (A) Ubicación de las poblaciones nativas de *Pinus radiata* en la costa pacífica de
324 Norteamérica (azul) y sitios de presencia reportados para esta especie en su rango exótico (rojo). (B)
325 Las tres poblaciones nativas continentales se encuentran en la costa de Estados Unidos (Año Nuevo,
326 Monterey y Cambria) y las dos poblaciones insulares en México (Islas Guadalupe y Cedros).

327

328 Mientras que las poblaciones nativas están en riesgo de extinción, el área implantada
 329 de esta especie en muchos países supera la del área de origen (Mead, 2013). En 2013 se
 330 registraron más de cuatro millones de hectáreas de plantaciones de *P. radiata* en todo el
 331 mundo, con las plantaciones más grandes en Chile, Nueva Zelanda y Australia y, en menor
 332 medida, en países como Argentina, España y Sudáfrica (Tabla 1.2, Mead 2013).

333

334 **Tabla 1.2.** Estimación de las plantaciones de pino radiata por país, en base a datos extraídos de Mead
 335 (2013).

País	Área estimada (ha)
Argentina	5500
Sudáfrica	57000
España	287000
Australia	773000
Chile	1478000
Nueva Zelanda	1545000

336

337 La historia de introducción y dispersión de *P. radiata* a lo largo del mundo se remonta
 338 a mediados del siglo XIX. En Australia, especímenes de *P. radiata* de origen desconocido
 339 fueron introducidos en los jardines botánicos de Victoria y Australia del Sur alrededor de
 340 1860 (Richardson y Rundel, 1998). La introducción temprana de *P. radiata* en Australia fue
 341 principalmente con fines ornamentales y para la restauración de sitios de minería de oro, no
 342 para plantaciones con fines forestales. Las primeras plantaciones forestales tuvieron lugar en
 343 la década de 1870 (Moran, Bell, y Eldridge, 1988; Wu et al., 2007) y desde entonces se han
 344 plantado a gran escala y actualmente están invadiendo muchas áreas en este país (Williams y
 345 Wardle, 2007). En Nueva Zelanda, se importaron al menos 25 kg de semillas de *P. radiata* de
 346 California y se distribuyeron por todo el país entre 1870 y 1879 (Wu et al., 2007). Una vez
 347 que se reconoció el potencial forestal de la especie, se sembró de manera extensiva para
 348 cinturones de protección y parcelas forestales, particularmente en Canterbury (Mead, 2013).
 349 Hoy en día Nueva Zelanda es el país con la mayor área implantada de *P. radiata* en el
 350 mundo. En Chile, *P. radiata* fue introducido a principios del siglo XX para el control de la
 351 erosión del suelo, aunque las principales plantaciones no comenzaron hasta alrededor de 1935
 352 (Mead, 2013). Tras la implementación de subsidios gubernamentales a propietarios privados,
 353 se produjo un gran aumento de nuevas plantaciones de *P. radiata* desde 1974 (Mead, 2013) y
 354 actualmente es la base de la silvicultura industrial en Chile (Toro y Gessel, 1999). En

355 Argentina, las forestaciones de *P. radiata* se localizan en las cadenas montañosas de la zona
356 centro-oriental y, en menor medida, en la Patagonia norte. Las primeras plantaciones
357 comerciales en la Patagonia se produjeron alrededor de la década de 1970 (Raffaele et al.,
358 2016).

359 Dada la urbanización de las áreas que rodean los rodales nativos de *P. radiata*, la
360 supresión de incendios se ha convertido en una práctica de manejo que está influyendo en la
361 regeneración natural de la especie (O'Brien, O'Hara, Erbilgin, y Wood, 2007). Por el
362 contrario, las frecuencias de incendios, en general, han aumentado en el área de distribución
363 exótica. Por ejemplo, en algunas regiones de Patagonia como el sitio de estudio (sección 1.9)
364 se produjo un drástico aumento en la frecuencia de los incendios, que pasó de 100-300 años
365 de intervalos sin fuego durante el siglo pasado (Goldammer, Cwielong, Rodriguez, y
366 Goergen, 1996) a intervalos entre 10-20 años en la actualidad (Manfredi et al., 1999; Raffaele
367 et al., 2018), debido principalmente a causas antrópicas (e.g. cambios en el uso de la tierra)
368 (Raffaele et al., 2018; Veblen, Kitzberger, Raffaele, y Lorenz, 2003). Otro ejemplo es
369 Australia, donde la frecuencia de incendios también ha aumentado considerablemente como
370 resultado de las igniciones antrópicas y los cambios en las prácticas de manejo tras la llegada
371 de los europeos (Cary y Banks, 2000). Por lo tanto, mientras que la frecuencia de los
372 incendios ha disminuido debido a la exclusión de los mismos en el área de origen de *P.*
373 *radiata*, en las áreas de introducción de esta especie la frecuencia de los incendios ha
374 aumentado drásticamente en los últimos años favoreciendo la invasión. Las características
375 pirófilas de *P. radiata*, en conjunto con su gran capacidad de invasión en ecosistemas
376 propensos al fuego, convierten a los sitios del norte de Patagonia donde esta especie ha
377 escapado de plantaciones forestales (invadiendo luego de incendios) en un excelente sistema
378 de estudio para poner a prueba hipótesis ecológico-evolutivas que favorecen su rápida
379 invasión.

380

381 **1.7 Objetivos**

382 El objetivo principal de esta tesis es evaluar el rol del fuego en la invasibilidad de *Pinus*
383 *radiata* mediante la selección rápida de genotipos con un mayor grado de adaptación a este
384 disturbio. Se estudiaron como posibles caracteres adaptativos, es decir de base genética, a
385 aquellos relacionados con el reclutamiento post-fuego como el grado de serotinia y los
386 factores favorables a la germinación y establecimiento de las semillas, como la temperatura y
387 presencia de ceniza. Se analizó las características genéticas de plantaciones y posteriores

388 invasiones post-fuego del rango exótico como también individuos del rango nativo
389 utilizando distintos marcadores moleculares con el fin de desentrañar los efectos de fuerzas
390 neutrales y selectivas afectando la invasión. El estudio se realizó en la Reserva Forestal de
391 Usos Múltiples Lago Epuyén, Provincia de Chubut.

392

393 1.5.1 Objetivos específicos

- 394 1. Estimar el grado de serotinia y tamaño del banco de semillas aéreo en sitios con
395 plantaciones no quemadas y sitios invadidos post-fuego
- 396 2. Evaluar experimentalmente mediante ensayos de germinación la respuesta germinativa,
397 de semillas provenientes de plantaciones no quemadas e invasión post-fuego, bajo
398 distintas temperaturas y sustratos.
- 399 3. Analizar la estructura y diversidad genética de *Pinus radiata*, utilizando marcadores
400 neutrales de isoenzimas en plantaciones y después de la invasión post-incendio en la
401 Reserva Forestal Lago Epuyén y comparar los niveles y distribución de la diversidad
402 genética en su rango nativo y en dos áreas no nativas (Argentina y Oceanía).
- 403 4. Estudiar utilizando marcadores genómicos el posible proceso de selección rápida
404 mediado por fuego mediante marcadores de carácter adaptativo comparando plantación e
405 invasión del rango exótico con el rango nativo.

406

407 **1.8 Hipótesis y predicciones**

408 El presente trabajo busca poner a prueba las siguientes hipótesis:

- 409 1. El fuego actúa como una fuerza selectiva que favorece en la descendencia post-fuego
410 de *Pinus radiata* una mayor adaptación a este disturbio, como el aumento en el grado
411 de serotinia y en la germinación bajo condiciones post-fuego. Estas adaptaciones
412 contribuyen a la producción de ciclos fuego-invasión-fuego con retroalimentación
413 positiva.
- 414 2. Las poblaciones exóticas e invasoras en ecosistemas propensos a incendios difieren
415 genéticamente respecto de las poblaciones nativas, producto de efectos fundadores,
416 deriva genética y procesos selectivos mediados por fuego durante la introducción y
417 propagación en el área invadida.

418 Para poner a prueba estas hipótesis se plantearon las siguientes predicciones:

419 Hipótesis 1:

- 420 a. La frecuencia de árboles con niveles de serotinia medios y altos aumenta en los lugares

421 con invasión post-fuego respecto de las plantaciones no quemadas.
422 b. Las semillas provenientes de conos serótinicos provenientes de invasión post-fuego
423 presentan un mayor porcentaje de germinación y vigor temprano que aquellas
424 provenientes de plantaciones no quemadas.

425 Hipótesis 2:

426 c. La diversidad genética será relativamente baja en las poblaciones dentro del rango
427 exótico respecto del nativo.

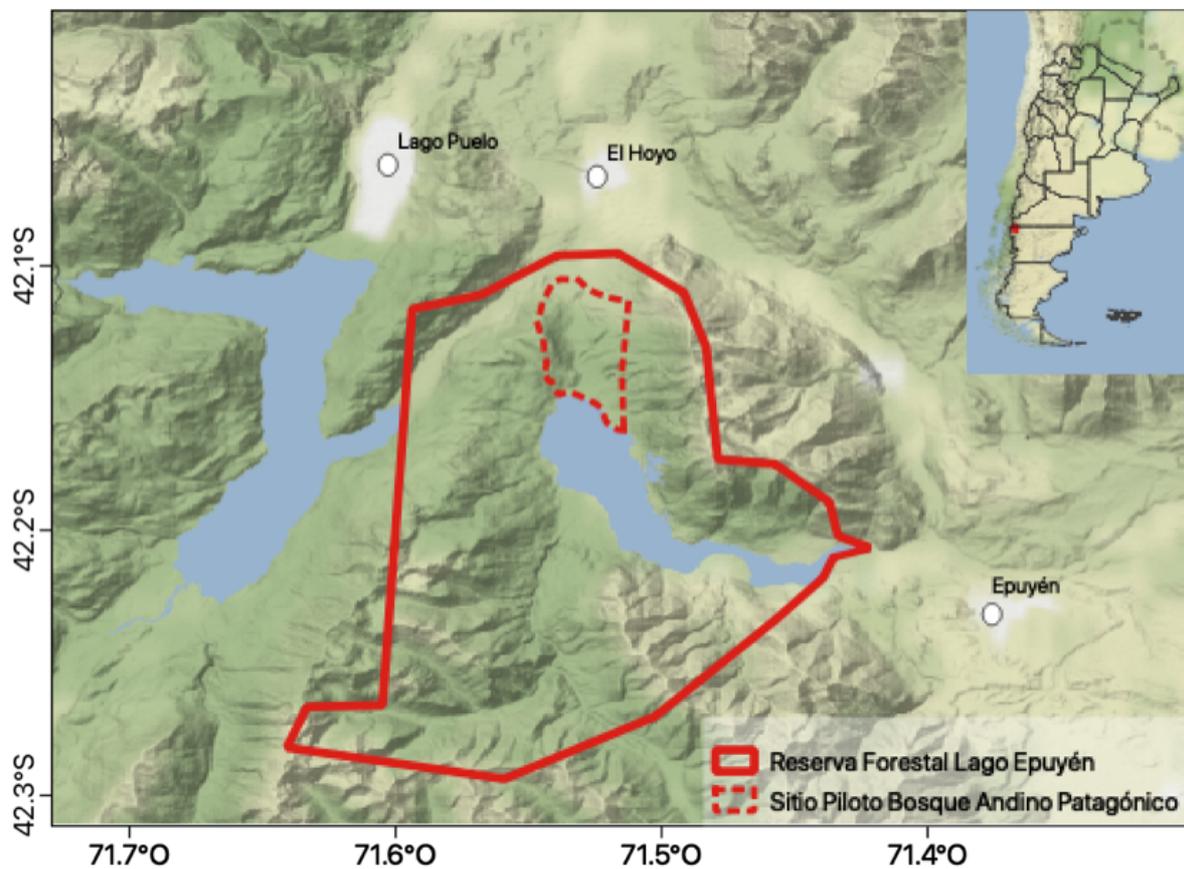
428 d. La diversidad genética disminuye en sucesivas generaciones reclutadas post-fuego;
429 presentando además, estas cohortes reclutadas post-fuego, variantes alélicas particulares
430 indicadoras del aumento en el grado de adaptación a este disturbio.

431

432 **1.9 Sitio de estudio**

433 La presente tesis se llevó a cabo en el paraje de Puerto Patriada, zona perteneciente a la
434 Reserva Forestal Lago Epuyén (42°17'-42°05' S y 71°24'-71°37' O), donde actualmente se
435 encuentra el sitio piloto "Bosque Andino Patagónico", perteneciente al Observatorio
436 Nacional de la Degradación de Tierras y Desertificación
437 (<http://www.desertificacion.gob.ar/sitiospiloto/?sp=2234>, Figura 1.4). La Reserva Forestal
438 Lago Epuyén cuenta con una superficie aproximada de 20000 has, y fue creada en 1964
439 como una reserva provincial de utilidad económica. Está ubicada dentro del Departamento
440 Cushamen en la jurisdicción de los municipios de Epuyén y El Hoyo (Figura 1.4). Es vecina
441 del Parque Nacional Lago Puelo en su sector oeste, y al Parque Provincial Río Turbio por el
442 sur. La Reserva Lago Epuyén está incluida dentro de las Provincias biogeográficas
443 Altoandina, Patagónica y Subantártica. La provincia biogeográfica Altoandina está
444 representada por la flora y fauna de las altas cumbres, con una dominancia de gramíneas
445 xerófilas y dicotiledóneas rastreras o en cojín (Cabrera, 1976). La provincia biogeográfica
446 Patagónica se ve representada en la reserva por escasas ingresiones de la estepa patagónica
447 con arbustos bajos, compactos, y dispersos con abundante suelo desnudo encontrando
448 principalmente gramíneas bajas y duras como el coirón (e.g. *Pappostipa speciosa*) (Cabrera,
449 1976). La provincia biogeográfica Subantártica, que abarca la mayor parte de la Reserva, se
450 caracteriza por presentar bosques templados y fríos, tanto caducifolios como perennifolios, en
451 especial de coníferas y de hayas australes del género *Nothofagus* (Cabrera, 1976), siendo las
452 especies dominantes en la reserva: el ciprés de la cordillera (*Austrocedrus chilensis*), el
453 coihue (*Nothofagus dombeyi*), la lenga (*Nothofagus pumilio*), el ñire (*Nothofagus antartica*);

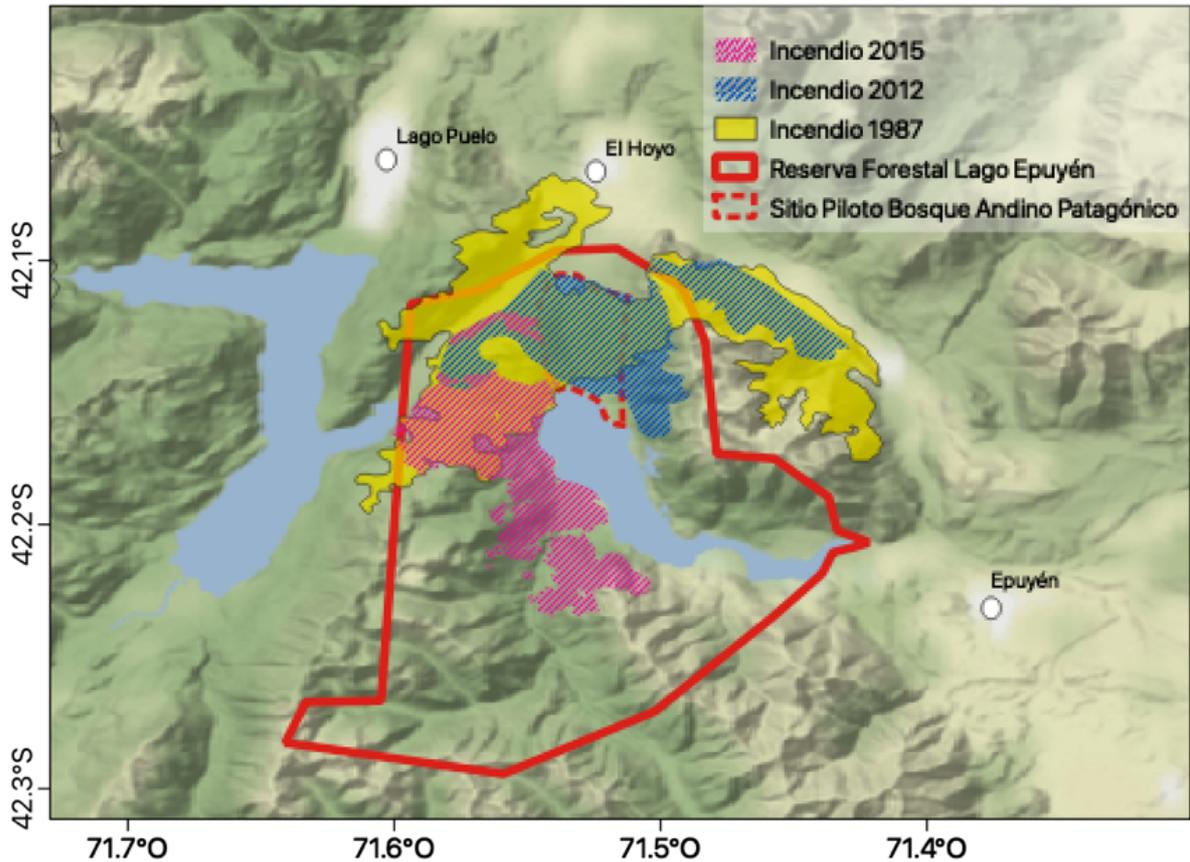
454 palo piche (*Fabiana imbricata*), espino negro (*Colletia espinosissima*), baccaris (*Baccaris*
455 *sp.*), retamo (*Diostea juncea*), radal (*Lomatia hirsuta*), berberis (*Berberis serrato dentata*),
456 parrilla (*Rives magellanicum*) y notro (*Embothrium coccineum*) (Manfredi et al., 1999).



457 **Figura 1.4.** Mapa de la zona de estudio, correspondiente al sitio piloto “Bosque Andino Patagónico”
458 ubicado al norte de la provincia de Chubut.
459

460
461 A mediados del siglo XX el Gobierno Provincial del Chubut, comenzó a estimular el
462 aprovechamiento forestal en toda la provincia a través del otorgamiento de créditos y
463 concesiones, promocionando de esta manera la generación de fuentes de empleo y
464 favoreciendo el desarrollo local. En la zona del Lago Epuyén, se estableció un Cuartel
465 Forestal con dichos fines (1949). Debido a la escasa regeneración natural, entre 1955 y 1958
466 se forestan 33,5 ha con *Pinus contorta*, *Pinus ponderosa*, *Pseudotsuga menziesii* y *Pinus*
467 *nigra*. Luego del incendio ocurrido en 1960 (que afecta 1000 ha de bosque ubicadas dentro y
468 fuera del cuartel) se pone en marcha un plan de reforestación con especies exóticas a largo
469 plazo, realizando plantaciones con diversas coníferas exóticas como *P. contorta*, *P. radiata*,
470 *P. ponderosa* y *P. menziesii* (Manfredi et al., 1999).

471 El fuego ha sido un disturbio recurrente en Patagonia y existen estudios que han
472 demostrado una reducción en la frecuencia de incendios desde principios de siglo, debido a la
473 política de supresión de fuegos realizada por Parques Nacionales (Blackhall, 2012;
474 Kitzberger y Veblen, 1999; Mermoz, Kitzberger, y Veblen, 2005; Veblen et al., 2011; Veblen
475 y Kitzberger, 2002). Las consecuencias de esta supresión convirtieron a muchos matorrales y
476 estepas en bosques densos, produciendo un aumento en la acumulación de combustible, que
477 ahora favorece fuegos más intensos en áreas que anteriormente tenían incendios leves y de
478 superficie (Veblen y Lorenz, 1988). Probablemente, debido a que las coníferas son especies
479 muy inflamables, el manejo inadecuado de plantaciones de exóticas podría también
480 incrementar la intensidad de los incendios (Dimitrakopoulos 2001, Veblen et al. 2011,
481 Raffaele et al 2015, Paritsis et al 2017, Blackhall y Raffaele 2019). Particularmente, la
482 historia de la cuenca del Lago Epuyén ha estado marcada por la ocurrencia de grandes
483 incendios forestales en el área. Análisis de horizontes de carbón vegetal datados a través de
484 ¹⁴C nos indica una frecuencia de incendios promedio de 100 años entre el año 863 y 1889,
485 salvo una etapa de 300 años que coincide con un período muy frío denominado pequeña edad
486 glaciaria (Goldammer et al., 1996). Los incendios registrados en los últimos 100 años
487 ocurrieron en 1902, 1909, 1917, 1924, 1944, 1960, 1963, 1979, 1987, 1998, 2012 y 2015
488 (Goldammer et al., 1996; Manfredi et al., 1999). Si comparamos con la frecuencia de
489 incendios previa a los ocurridos en el último siglo (Goldammer et al., 1996) se puede
490 observar el drástico aumento en la frecuencia de incendios en los últimos años (Figura 1.5).
491 La frecuencia de incendios que en el pasado era entre 100 a 300 años, en la actualidad es de
492 10 a 20 años, debido principalmente a origen antrópico (Manfredi et al., 1999).



493
 494 **Figura 1.5.** Mapa de la zona de estudio donde se muestran el área afectada por los incendios de 1987,
 495 2012 y 2015; realizado en base a información proporcionada por el centro de Investigación y
 496 Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP) y el departamento de Parques y Reservas de la
 497 Subsecretaría de Bosques de Chubut.

498
 499 Debido a los múltiples incendios sucedidos en los años 1944, 1960 y 1963
 500 (considerados de gran severidad ya que, se estima que generaron una mortalidad superior al
 501 80% de los individuos) la masa forestal disponible para el aprovechamiento mermó a gran
 502 escala. Como consecuencia, se decidió crear (en 1964) un área de Reserva tendiente a
 503 proteger el área boscosa remanente no incendiada, y a recuperar la zona a través de planes de
 504 forestación y manejo racional de los recursos y erradicación del ganado (Manfredi et al.,
 505 1999). En conjunto, los incendios y los planes de forestación pueden ser considerados como
 506 los procesos más relevantes para comprender el tipo y estado de vegetación actual de la
 507 Reserva. Actualmente el área se encuentra predominantemente dominada por rodales de
 508 invasión mono-específicos de *Pinus radiata* reclutados luego de los incendios de 1987, 2012
 509 y 2015, algunos sitios con individuos de plantaciones no quemadas y, aunque poco
 510 frecuentes, algunos parches aislados de bosque nativo.

511

512 **1.10 Estructura de la tesis**

513 En la presente Tesis de Doctorado se realizó un análisis de la invasión de *Pinus radiata*,
514 haciendo foco en aspectos evolutivos, genético-poblacionales y ecológicos que pudieran
515 asociarse con su potencial invasor. Los antecedentes, objetivos y diseños experimentales
516 empleados tendientes a corroborar las hipótesis planteadas en esta Tesis, se abordan en 6
517 capítulos con la siguiente estructura:

- 518 • **Capítulo 1:** Corresponde al presente capítulo que, a modo de introducción general,
519 describe el marco teórico de la Biología de las Invasiones, sus impactos, importancia
520 de las invasiones de coníferas, el rol del fuego sobre las invasiones y la importancia
521 de los enfoques evolutivos en el estudio de los procesos de invasión. Se detallan
522 también, los conocimientos sobre la especie y el sitio de estudio y se explicitan los
523 objetivos e hipótesis.
- 524 • **Capítulo 2:** Este capítulo abarca los análisis relacionados al banco de semillas aéreo y
525 la serotinia. Se enmarca en la hipótesis de que el fuego actúa como una fuerza
526 selectiva que favorece en la descendencia post-fuego una mayor adaptación a este
527 disturbio, puesta a prueba mediante la predicción de que la frecuencia de árboles con
528 niveles de serotinia medios y altos aumenta en los lugares con invasión post-fuego
529 respecto de las plantaciones no quemadas.
- 530 • **Capítulo 3:** En este capítulo y mediante un enfoque experimental se analizaron los
531 efectos de tratamientos asociados a fuego (ceniza y shocks térmicos) sobre la
532 germinación, vigor y supervivencia temprana de *P. radiata*. Enmarcado también en la
533 hipótesis de que el fuego actúa como una fuerza selectiva que favorece en la
534 descendencia post-fuego una mayor adaptación a este disturbio la predicción central
535 de este capítulo es que las semillas provenientes de conos serótinicos provenientes de
536 invasión post-fuego presentan un mayor porcentaje de germinación y vigor temprano
537 que aquellas provenientes de plantaciones no quemadas.
- 538 • **Capítulo 4:** Aborda la hipótesis de que las poblaciones exóticas en ecosistemas
539 propensos a incendios difieren genéticamente respecto de las poblaciones nativas,
540 producto de fuerzas neutrales como efectos fundadores debido a la deriva genética y
541 el aislamiento durante la introducción y establecimiento en el área invadida. Se
542 realizó usando isoenzimas como marcador genético y tiene un abordaje local, se
543 centra en analizar si *P. radiata* se comporta como una paradoja genética de las

544 invasiones y en corroborar el proceso selectivo sobre características morfológicas
545 mediante comparaciones de divergencia genotípica y fenotípica.

- 546 • **Capítulo 5:** Utilizando técnicas genómicas de secuenciación se centró en
547 comparaciones entre el rango nativo y el exótico, y entre cohortes con y sin fuego;
548 con la finalidad de estudiar las señales genéticas de fuerzas evolutivas neutrales y
549 adaptativas relacionadas con procesos selectivos mediados por fuego.
- 550 • **Capítulo 6:** Se realizó un resumen de las conclusiones más relevantes obtenidas a lo
551 largo de toda la Tesis, discutiéndolas en un contexto global y haciendo hincapié en la
552 interpretación de los procesos evolutivos rápidos que podrían estar promoviendo la
553 invasión de *P. radiata*.

554

555

Capítulo 2

556

Grado de serotinia en la invasión post-fuego de *Pinus radiata*

557

558

2.1 Introducción

559

560

561

562

563

564

565

566

567

568

569

570

571

572

573

574

575

Las especies longevas como los árboles tienen una serie de características que les permiten colonizar un área luego de disturbios como el fuego. Pueden persistir por propagación vegetativa como el rebrote a partir de yemas de tallo o raíz y/o establecerse por semilla luego de incendios (Keeley, 1998; Lamont et al., 2019; Pausas y Bradstock, 2007). El rebrote permite la colonización rápida mientras que las semillas deben producirse y dispersarse al sitio luego del disturbio. Además, en muchas especies leñosas la buena producción de semillas es esporádica, conocida como semillazón o masting en inglés y tiene lugar a intervalos variables (Koenig y Knops, 2005). Por lo tanto, la propagación por vía sexual, es decir por semilla, y la colonización post-disturbio puede no ser instantánea luego de un incendio. Sin embargo, las especies leñosas con adaptaciones al fuego como la serotinia, i.e. con semillas almacenadas en conos seróticos que permanecen cerrados en ausencia de un estímulo externo como el fuego, pueden colonizar rápidamente después de incendios debido a la liberación masiva de semillas luego de este disturbio (Lamont y Enright, 2000). Además de la apertura frente a eventos de fuego, los conos seróticos pueden abrirse frente a cambios repentinos en las condiciones ambientales, como episodios de clima extremadamente caluroso y seco (Espelta, Arnan, y Rodrigo, 2011; Nathan, Safriel, Noy-Meir, y Schiller, 1999)

576

577

578

579

580

581

582

583

584

585

586

587

La invasión de diversas plantas exóticas se ha relacionado a la producción (Ferrerías y Galetto, 2010), almacenamiento (Gioria, Pyšek, y Moravcová, 2012) y dispersión de semillas (Bass, Crossman, Lawrie, y Lethbridge, 2006). Respecto al almacenamiento y liberación de las semillas se han reconocido dos síndromes principales (Lamont et al., 1991; Lamont, Pausas, He, Witkowski, y Hanley, 2020): en el primero, la semilla se libera al finalizar la maduración y puede o no presentar un banco de semillas almacenadas en el suelo (Fenner y Thompson, 2005). En el segundo la liberación de semillas maduras se retrasa, lo que resulta en la formación de un banco de semillas aéreo (Fenner y Thompson, 2005; Lamont y Enright, 2000; Lamont et al., 1991, 2020). En las especies con almacenamiento de semillas en el dosel las semillas germinan en el primer período favorable luego de la liberación mediada por fuego (Lamont et al., 1991). Hasta el momento se han reportado alrededor de 1200 especies serótinas (Lamont y Enright, 2000) que retienen las semillas por un periodo de tiempo que

588 puede abarcar entre 5 a 70 años. La mayoría de las especies serótinas son nativas de
589 regiones templadas propensas al fuego en Australia, Sudáfrica, América del Norte y el
590 Mediterráneo (Lamont y Enright, 2000; Lamont et al., 1991).

591 La serotinia, y por lo tanto la generación de un banco de semillas aéreo, confiere una
592 ventaja adaptativa ya que permite acumular semillas hasta que las condiciones sean las más
593 adecuadas para el establecimiento de las plántulas (Lamont y Enright, 2000). Al mismo
594 tiempo existen factores como los patógenos, senescencia o la predación pre-dispersión que
595 actúan reduciendo el número de semillas almacenado (Benkman y Siepielski, 2004; Günster,
596 1994; Lamont et al., 1991). En ausencia de predadores en la etapa pre-dispersiva, si la
597 liberación puede retrasarse hasta que el efecto combinado de estos factores negativos sea
598 mínimo, y bajo las condiciones optimas de liberación la enorme cantidad de semillas
599 almacenadas representara una ventaja adaptativa (Lamont et al., 1991). Además, dado que
600 esta acumulación de semillas es producto de muchos años de reproducción sexual, el pool de
601 propágulos liberados en un dado momento podría presentar una alta diversidad genética
602 (Lamont y Enright, 2000); lo que proporcionaría una mayor capacidad de adaptación frente a
603 condiciones de reclutamiento cambiantes. La serotinia entonces, concede distintas ventajas
604 como (i) maximizar la disponibilidad de semillas y el establecimiento luego de incendios bajo
605 una competencia mínima, cuando las condiciones son más favorables para el reclutamiento
606 (Lamont y Enright, 2000); y/o (ii) aseguraría además el establecimiento de plántulas
607 mediante la saciedad de los predadores (en etapa post-dispersiva) por la liberación
608 sincronizada y masiva de semillas (Lamont et al., 1991).

609 El grado de serotinia puede variar ampliamente entre individuos, poblaciones y
610 especies como resultado de varios factores. El más importante de estos factores suele estar
611 asociado a las diferencias en la frecuencia e intensidad de los incendios en un hábitat
612 determinado (Castellanos, González-Martínez, y Pausas, 2015; Feduck et al., 2015; Gauthier,
613 Bergeron, y Simon, 1996; Radeloff, Mladenoff, Guries, y Boyce, 2004). En ambientes
614 propensos al fuego, la ocurrencia de incendios debería favorecer la reproducción y
615 propagación de individuos altamente seróticos, ya que se favorecerá la liberación masiva y
616 sincrónica de propágulos producidos por conos seróticos (Goubitz, Nathan, Roitemberg,
617 Shmida, y Ne'eman, 2004; Lotan, 1976). Sin embargo, la serotinia posee costos asociados a
618 su mantenimiento como por ejemplo la liberación de semillas que se produce durante los
619 años secos y calurosos que pueden agotar el banco de semillas aéreas y reducir el potencial
620 de regeneración post-incendio (Martín-Sanz et al., 2016). No obstante, las especies serótinas

621 exóticas pueden experimentar una clara ventaja en las comunidades propensas al fuego que
622 carecen de especies nativas con este rasgo (Franzese y Raffaele, 2017; Raffaele et al., 2016).
623 Además, a largo plazo incendios sucesivos, producidos por ciclos de retroalimentación fuego-
624 invasión (donde los incendios promueven la invasión de una especie que a su vez presenta
625 características [como una alta inflamabilidad] que promueven un aumento en la frecuencia de
626 incendios, Capítulo 1, sección 1.2), podrían aumentar la frecuencia de los individuos
627 altamente adaptados a este disturbio. Por lo tanto, los ambientes propensos al fuego serían
628 altamente susceptibles a la invasión de especies serótinas (Davis, Maxwell, y Caplat, 2019;
629 Franzese y Raffaele, 2017).

630 Los procesos de selección rápida han sido propuestos como un importante mecanismo
631 que contribuye al éxito de las invasiones (Lavergne y Molofsky, 2007; Maron et al., 2004),
632 ya que es común que durante la introducción en un nuevo ambiente las especies puedan
633 enfrentarse a nuevos regímenes selectivos. Los cambios fenotípicos en los rasgos,
634 promovidos durante estos procesos selectivos, pueden afectar la aptitud de los individuos, la
635 viabilidad de las poblaciones y el proceso de expansión en el área invadida (Suarez y Tsutsui,
636 2008). Se han descrito numerosos casos en plantas herbáceas invasoras donde este tipo de
637 cambios fenotípicos pueden ser considerados importantes factores promotores de la invasión;
638 entre los que podemos encontrar un mayor desarrollo (Buckley, Briese, y Rees, 2003; Leger y
639 Rice, 2003), la velocidad de crecimiento (Blair y Wolfe, 2004), caracteres relacionados a la
640 producción de defensas (Rogers y Siemann, 2004) y la tasa de reproducción (Brown y Eckert,
641 2005). Estas respuestas adaptativas pueden desempeñar un papel importante en la promoción
642 de la invasión cuando se producen en caracteres relacionados a la aptitud reproductiva de la
643 especie, como es el caso de la serotinia.

644 El objetivo del presente capítulo es el estudio del rol potencial del fuego generando
645 divergencia (ya sea producto de variabilidad fenotípica y/o fuerzas selectivas) sobre los
646 niveles de serotinia y promoviendo la invasión de *Pinus radiata*. Para esto, se caracterizó y
647 comparó el grado de serotinia y la abundancia del banco de semillas aéreo en plantaciones no
648 quemadas y en áreas invadidas post-fuego. La hipótesis analizada es que el fuego actúa como
649 un mecanismo de divergencia, pudiendo incrementar el grado de serotinia. Se esperaba que
650 los pinos seróticos reclutados después del incendio presentaran un mayor grado de serotinia y
651 abundancia de semillas en la fracción serótica del banco de semillas aéreo que las
652 plantaciones no quemadas. Puerto Patriada (ver Sitio de Estudio) es un excelente sitio de
653 estudio, ya que es un sistema donde puede observarse que actualmente esta ocurriendo el

654 ciclo de fuego-invasión mencionado previamente; encontrando en el sitio tanto individuos
655 de plantación no quemados como diversas cohortes reclutadas post fuego producto de
656 diferentes incendios en los años 1987, 2012 y 2015.

657

658 **2.2 Materiales y Métodos**

659

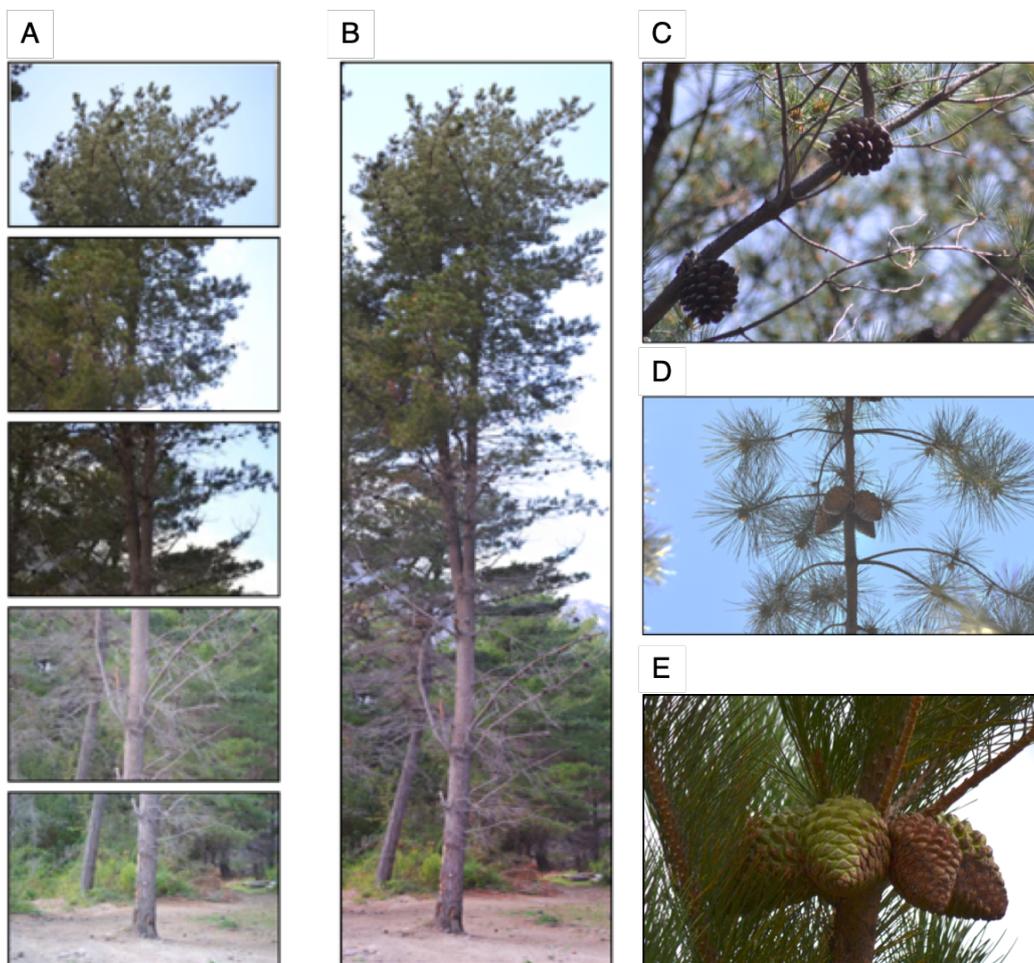
660 2.2.1 Diseño de muestreo

661 En la primavera y verano de 2017 se seleccionaron en el sitio de estudio 5 rodales de
662 plantaciones no quemadas y sitios de invasión post-fuego, respectivamente (Figura S2.1 y
663 Tabla S2.1). Los rodales invadidos post-fuego procedían de plantaciones maduras quemadas
664 en 1987 y estaban conformados por individuos de aproximadamente 30 años de edad al
665 momento de la toma de muestras. En ciertos casos, los individuos de plantación y de invasión
666 post-fuego se encontraban cercanos espacialmente, de modo que se determinó la edad de
667 todos los individuos muestreados por dendrocronología para asignar cada individuo
668 muestreado a un tipo de rodal. Los individuos se clasificaron como invasión post-fuego si su
669 edad era igual o dos años menor que el evento de incendio que es el período promedio de
670 tiempo necesario para el establecimiento del fuego para las diferentes especies de pino
671 serótinus (Calvo, Hernández, Valbuena, y Taboada, 2016; Thanos, Daskalaku, y
672 Nikolaidou, 1996). Caso contrario, se clasificaron como pertenecientes a plantación. Si bien
673 las plantaciones en el lugar de estudio se realizaron en diferentes años, los individuos
674 muestreados en cada rodal fueron relativamente homogéneos en cuanto a edad y tamaño
675 (Tabla S2.2). Además, los árboles de las plantaciones eran en promedio 5 años mayores que
676 los de la invasión (Tabla 2.1), lo cual minimiza los posibles efectos de la edad de los árboles
677 en la producción de conos y el grado de serotinia.

678 El grado de serotinia (definido como el porcentaje de conos serótinus respecto al total
679 producidos por un individuo) y la abundancia del banco de semillas aéreo se estimaron
680 mediante: (1) el número de conos serótinus por árbol, (2) el número de semillas viables por
681 cono y (3) el número de árboles por hectárea.

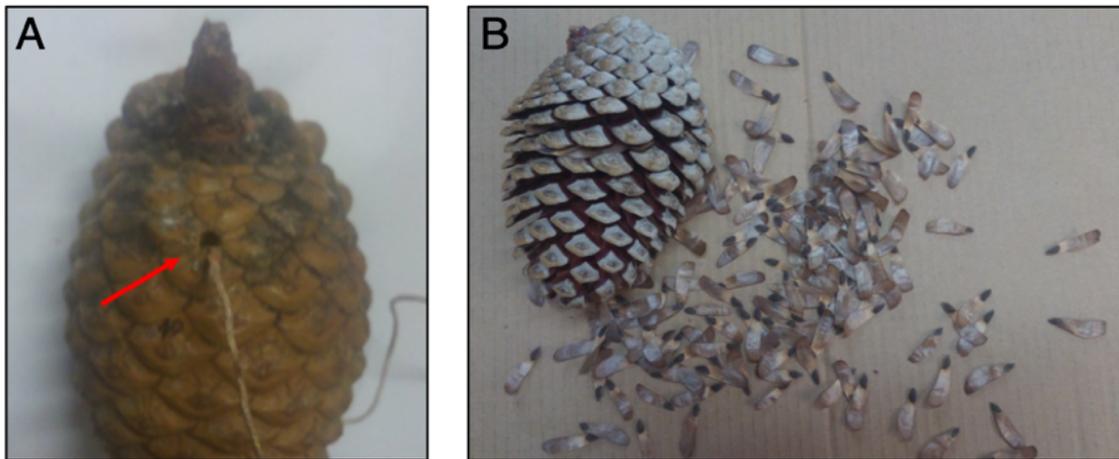
682 (1) Para estimar el porcentaje de serotinia se muestrearon diez árboles elegidos al azar
683 en cinco réplicas de cada tipo de rodal, con un total de 100 árboles muestreados (i.e. 10
684 árboles x 5 rodales [réplicas] x 2 tipos de rodal [plantación e invasión post-fuego]). El
685 porcentaje de serotinia de cada individuo se determinó fotográficamente. Para esto se
686 tomaron fotografías laterales del perfil de los árboles con una cámara equipada con un

687 teleobjetivo (Figura 2.1 A). Estas imágenes fueron ensambladas en una panorámica de alta
688 calidad que permitió contar y clasificar los conos utilizando el software ImageJ (Schneider,
689 Rasband, y Eliceiri, 2012) (Figura 2.1 B). Los conos se clasificaron como no seróticos
690 (parcial o totalmente abiertos, Figura 2.1 C), seróticos (cerrados a la madurez, Figura 2.1 D)
691 e inmaduros siendo los mismos de color verde o marrón intenso, mientras que los conos
692 seróticos maduros se consideraron a aquellos de color gris o marrón claro (Goubitz et al.,
693 2004). Los conos inmaduros no se consideraron para el cálculo del porcentaje de serotinia, ya
694 que no podían clasificarse *a priori* como seróticos o no seróticos. Consideramos que este
695 método es adecuado para *P. radiata* ya que los conos no seróticos permanecen firmemente
696 adheridos al árbol aún después de abrirse, y la causa principal de la apertura de los conos
697 seróticos es el fuego (McDonald y Laacke, 1990; Stephens et al., 2004).



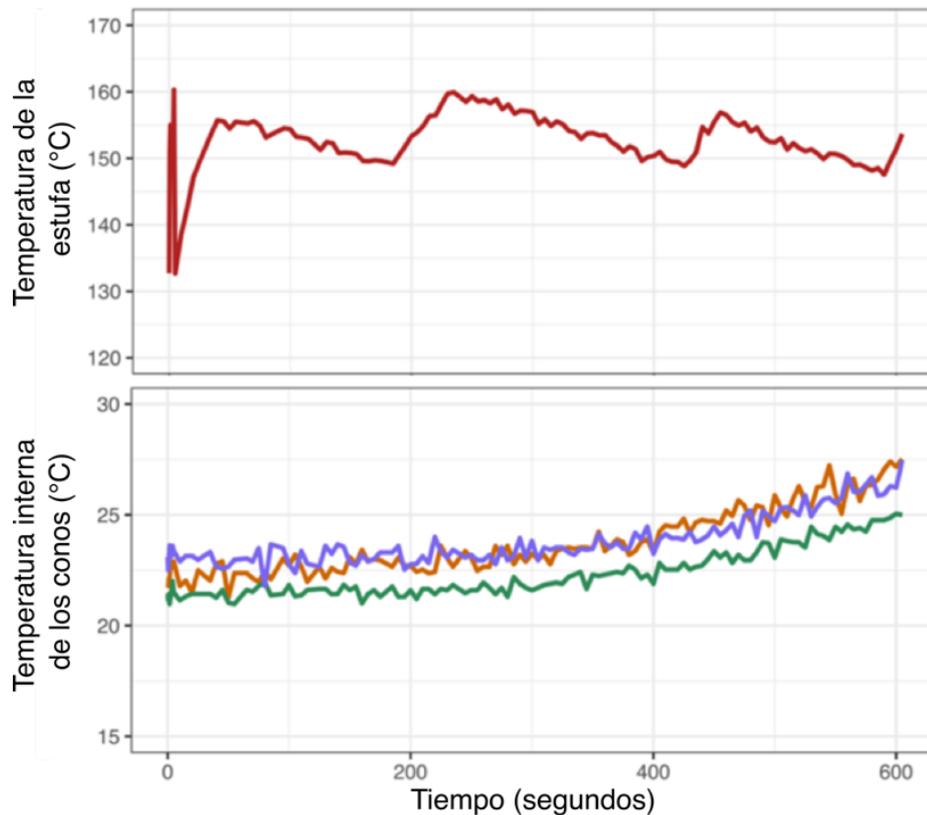
698 **Figura 2.1.** Conteo y clasificación de conos para *Pinus radiata*. (A) Se tomaron múltiples fotografías
699 laterales del perfil del árbol con un teleobjetivo de 300 mm. Estas imágenes se unieron en una
700 panorámica de alta calidad (B) que permitió el recuento y clasificación de los conos mediante el
701 software ImageJ. Los conos se clasificaron como no seróticos (C), seróticos (D) e inmaduros (E).
702
703

704 (2) El número de semillas viables por cono se estimó a partir de una muestra de 10
705 árboles seleccionados al azar que fueron tumbados y de los que se recolectaron 10 conos
706 seróticos maduros en distintas posiciones seleccionadas al azar de la copa sin sesgo de color
707 o tamaño. Esto resultó en un total de 100 conos para cada tipo de rodal. Una vez en el
708 laboratorio, los conos se expusieron a 150 °C durante 10 minutos en un horno de calor seco
709 para promover su apertura y la liberación de las semillas. Se verificó que estas condiciones
710 no producían daño térmico a las semillas, midiendo la temperatura interna de conos
711 seleccionados al azar con un termopar tipo K colocada en su interior (a través de una incisión
712 mínima en el cono) durante la exposición al calor (Figuras 2.2). Observándose que mientras
713 la temperatura de la estufa alcanzaba los 150 °C la temperatura interna se mantenía alrededor
714 de 25 °C. La viabilidad de las semillas se determinó por el método de presión (Zuluaga,
715 Acciaresi, y Chidichimo, 2004) y se contó el número de semillas viables por cono.



716 **Figura 2.2.** (A) La flecha roja indica la incisión del cono de *P. radiata* donde se insertó el termopar
717 tipo K. Luego de insertar el termopar, la incisión se cubrió con una pasta de aserrín para que la
718 perforación no afectará el aislamiento térmico del cono. (B) Cono abierto y semillas liberadas después
719 del golpe de calor.
720

721



722 **Figura 2.3.** Ejemplos de las temperaturas internas alcanzadas por los conos de *Pinus radiata* durante
 723 su calentamiento dentro de la estufa para estimular su apertura. En el panel superior se observa la
 724 temperatura alcanzada por la estufa de laboratorio (curva en color rojo) durante la exposición de los
 725 conos a altas temperaturas para propiciar su apertura. En el panel inferior se presentan a modo
 726 demostrativo las curvas de temperatura alcanzada en el interior de tres conos (representados en
 727 distintos colores) durante el calentamiento.
 728

729

730 (3) El número de árboles por hectárea (densidad) se registró en 10 parcelas de 10x10
 731 m cada una en cada tipo de rodal (i.e. plantación e invasión 1987). La densidad del banco de
 732 semillas, se calculó como el producto del número medio de semillas viables por cono, el
 733 número medio de conos por árbol y la densidad de árboles por metro cuadrado. Esta variable
 734 se expresa como el número de semillas viables por metro cuadrado (i.e. densidad de semillas
 735 por unidad de área), lo que permite contar con una variable estandarizada facilitando el
 736 realizar comparaciones entre diferentes estudios referidos al tema.

737

738 Los sitios de plantación e invasión fueron caracterizados según las características
 739 morfológicas de los individuos y sus copas (altura y diámetro) y ambientales (apertura del
 740 dosel y radiación solar). La altura de cada árbol se midió con un hipsómetro Haglof Vertex
 IV (AB-HAGLÖF-SWEDEN, 2007), y usando esto como referencia se midió el área y el

741 diámetro de la copa en las fotografías (ver arriba). El diámetro a la altura del pecho (DAP)
742 se midió con una cinta diamétrica a 1,4 m del suelo. El porcentaje de apertura del dosel y la
743 radiación solar total (Stenberg, Linder, Smolander, y Flower-Ellis, 1994) se estimaron
744 mediante fotografías hemisféricas con un lente ojo de pez acoplado a una tableta Sony Xperia
745 Z1 (Sahin, 2016) y se analizaron con el software GAP Light Analyzer (Frazer, Canham, y
746 Lertzman, 1999).

747

748 2.2.2 Análisis de datos

749 Las variables relacionadas con: (i) el tamaño del banco de semillas aéreo (densidad de
750 semillas por m², número de semillas por cono y conos seróticos por árbol), (ii) las
751 características del rodal (árboles por hectárea y radiación solar) y con (iii) el tamaño del árbol
752 (altura, DAP, diámetro de la copa y área de la copa) se compararon entre plantación e
753 invasión post-fuego mediante el test de Kruskal-Wallis luego de haber comprobado la no
754 normalidad de los datos mediante el test de Lilliefors.

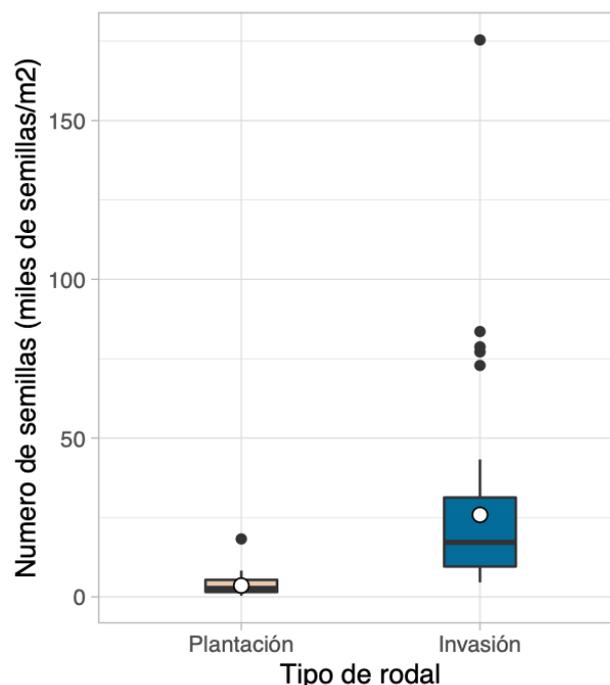
755 Se realizó una primera aproximación multivariada con la finalidad de, mediante una
756 reducción de la dimensionalidad, analizar la relación existente entre las distintas variables
757 involucradas (Rencher, 2003), que en nuestro casos son aquellas involucradas en la
758 caracterización de los rodales de invasión y plantación. De esta forma buscábamos analizar si
759 todos los individuos de un tipo de rodal se agrupaban y separaban del resto, es decir si estas
760 categorías muestran grupos homogéneos de individuos a pesar de que dichos individuos
761 provinieran de distintos sitios. Se realizó un análisis de componentes principales (siglas en
762 inglés PCA) para analizar los dos tipos de rodal (plantación e invasión post-fuego) según el
763 nivel de serotinia, la edad del árbol, variables morfométricas (altura, DAP, diámetro y área de
764 la copa), la radiación solar y la densidad del rodal. Previamente se verificó la colinealidad
765 mediante coeficientes de correlación entre las variables y se retuvieron aquellas con una
766 correlación <0,7 (Dormann et al., 2013). Las variables retenidas fueron: densidad, edad,
767 porcentaje de serotinia, DAP y radiación solar. Según el criterio de Kaiser-Guttman, se
768 retuvieron aquellos componentes principales con auto valores >1. La relación entre el nivel
769 de serotinia y el resto de las variables incluidas en el PCA también se analizaron mediante
770 modelos lineares generalizados (siglas en inglés GLMs) con una distribución binomial. El
771 modelo incluyó la serotinia (0 = cono serótico, 1 = cono no serótico) como variable respuesta
772 y todas las demás variables fueron incluidas en el PCA como variables explicativas. Se
773 compararon las distribuciones de frecuencia de los niveles estimados de serotinia entre las

774 plantaciones y los rodales invadidos después del incendio, utilizando el test de Anderson-
775 Darling (Scholz y Stephens, 1987), tanto para los datos modelados (en función de las
776 variables incluidas en el PCA) como para los observados. Todos los modelos, pruebas y
777 gráficos reportados se realizaron en el lenguaje para análisis estadísticos R (RCoreTeam,
778 2018).

779

780 **2.3 Resultados**

781 La densidad de semillas del banco aéreo fue un orden de magnitud mayor en los rodales de
782 invasión post-fuego [I] que en los rodales de plantación [P] (I: $25847,5 \pm 28938$ semillas /
783 m^2 ; P: $3574,4 \pm 3129$ semillas / m^2 ; media \pm SD; Figura 2.4; KW $p < 0,001$). Los mayores
784 valores para el tamaño del banco aéreo en los rodales de invasión estuvieron dados
785 principalmente por el número de semillas por cono y el número de árboles por hectárea, ya
786 que el número de conos serótinicos por árbol fue mayor en el caso de los rodales de plantación
787 (Tabla 2.1). No se encontraron diferencias significativas en la proporción de semillas viables
788 por cono entre plantación e invasión post-fuego (Tabla 2.1). Los rodales de plantación
789 presentaron valores significativamente más altos en las variables de tamaño (altura, diámetro
790 de copa, área de copa y DAP; Tabla 2.2), y valores más bajos para la densidad de individuos
791 por hectárea y radiación solar (Tabla 2.3). La apertura de canopy fue similar entre ambos
792 tipos de rodales (Tabla 2.3).



793

794 **Figura 2.4.** Número de semillas viables por metro cuadrado para *Pinus radiata* en plantación e
 795 invasión post-fuego. Los gráficos de caja indican la mediana (línea horizontal oscura), la media
 796 (círculo blanco), el primer y tercer cuartil (caja) y el rango (línea vertical) excluyendo valores atípicos
 797 (círculos negros).

798

799 **Tabla 2.1.** Media y desvío estándar (SD) de los componentes del banco de semillas aéreo para
 800 rodales de plantación (P) e invasión post-fuego 1987 (I) de *P. radiata*. Las variables estudiadas son:
 801 número de semillas viables por cono, viabilidad (proporción de semillas viables por cono), número de
 802 conos serótinos por árbol, número de semillas por árbol y número de árboles por hectárea. Solo las
 803 semillas viables fueron usadas para la estimación del tamaño de banco aéreo. Las comparaciones entre
 804 P e I se realizaron aplicando Test de Kruskal Wallis (KW).

Tipo de rodal	Semillas/cono		Viabilidad		Conos/árbol		Semillas/árbol		Arboles/ha	
	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
Media	127	153	0,895	0,914	63,8	34,1	32278	18853	1082	13765
SD	40,9	35,2	0,132	0,111	52,7	38,3	26703	21154	185	757
Min	28	72	0,177	0,419	7	6	3544	3317	900	12133
Max	262	210	0,993	1	309	231	156428	127715	1500	14533
Test de KW	p < 0,001		p = 0,361		p < 0,001		p < 0,001		p < 0,001	

805

806 **Tabla 2.2.** Media, desvío estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max) de la edad y características
 807 morfométricas en rodales de plantación (P) e invasión post-fuego (I) de *P. radiata*. Las variables
 808 estudiadas son: edad, altura, diámetro a la altura del pecho (DAP), área de copa y diámetro de copa.
 809 Las comparaciones entre P e I se realizaron aplicando Test de Kruskal Wallis (KW).

Tipo de rodal	Edad		Altura (m)		DAP (cm)		Área de Copa (m ²)		Diámetro de copa (m)	
	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
Media	33,9	28,1	35,4	29,7	59,3	37,8	145	63,4	11,7	7,02
SD	5,02	0,712	6,89	4,47	13,7	8,36	88,8	38,4	4,03	2,23
Min	25	26	23,1	18,7	36,2	20,8	36,8	15,3	5,42	3,43
Max	43	30	49,7	38,3	90	62	383	259	22,8	13,8
Test de KW	p < 0,001		p < 0,001		p < 0,001		p < 0,001		p < 0,001	

810

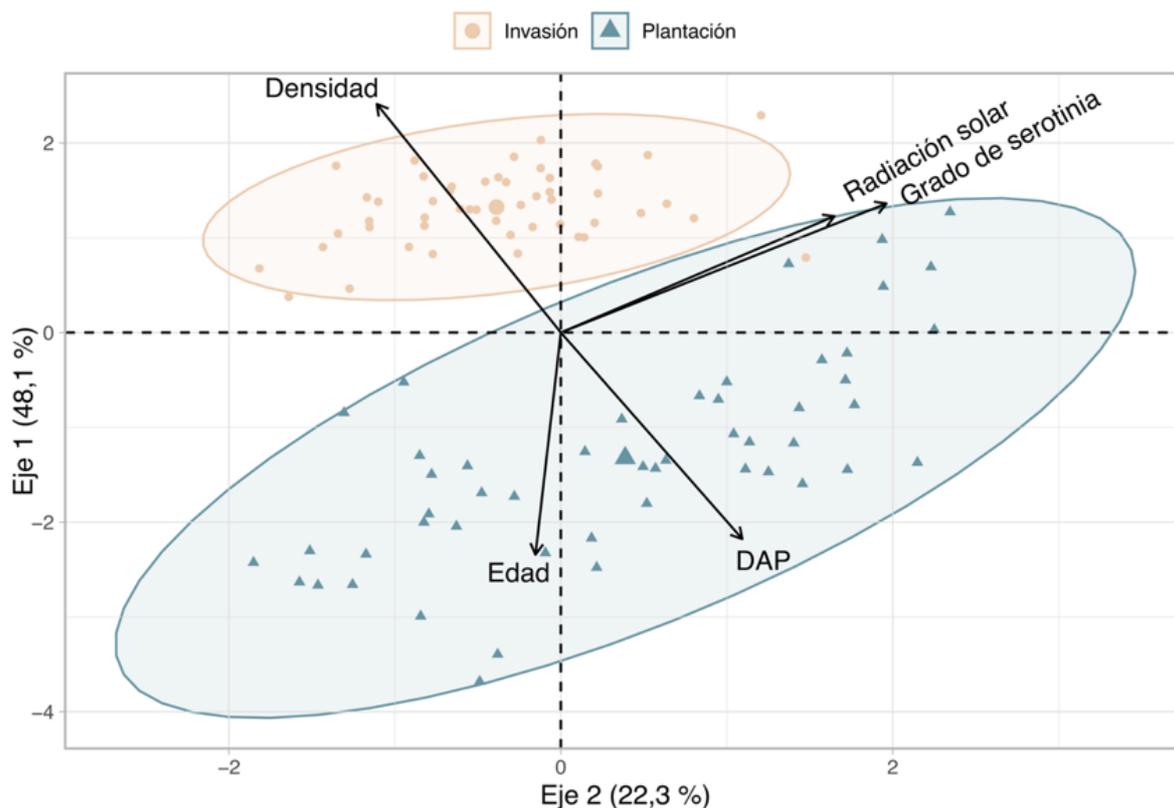
811 **Tabla 2.3.** Media, desvío estándar (SD), mínimo (Min) y máximo (Max) de la densidad de árboles,
 812 apertura de canopy y radiación solar en rodales de plantación (P) e invasión post-fuego (I) de *P.*
 813 *radiata*. Las comparaciones entre P e I se realizaron aplicando Test de Kruskal Wallis (KW).

Densidad (arboles/ha)	Apertura de canopy (%)	Radiación solar (mol/m ²)
-----------------------	------------------------	---------------------------------------

Tipo de rodal	P	I	P	I	P	I
Media	1082	13765	36,3	35,9	16,3	17,3
SD	185	757	8,08	3,72	3,73	1,47
Min	900	12133	28,9	33	12,5	16,3
Max	1500	14533	48,2	43,5	20,9	20,6
Test de KW	p < 0,001		p = 0,063		p < 0,05	

814

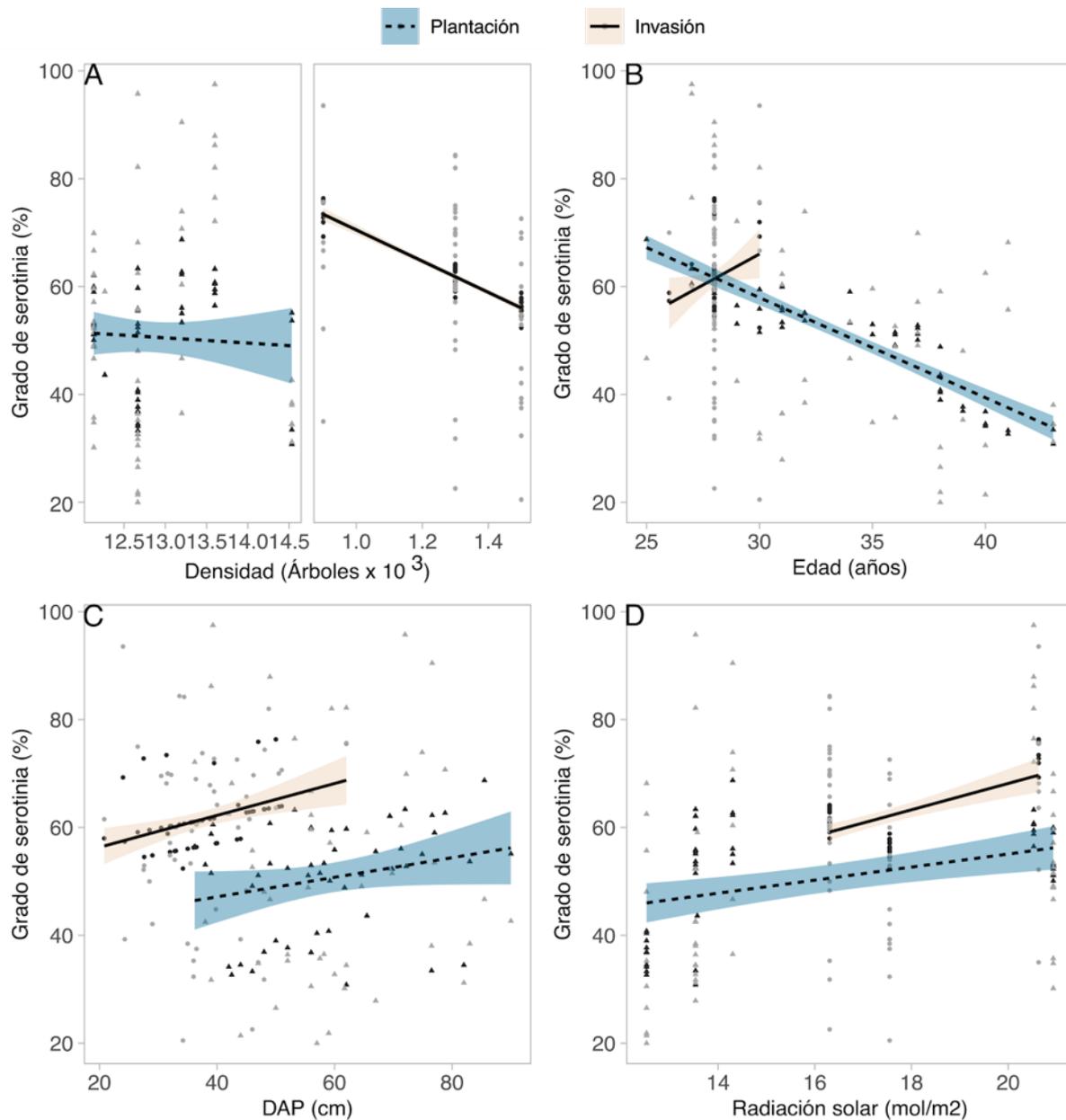
815 El análisis de los componentes principales (PCA) reveló que las diferencias entre los
816 dos grupos de árboles (plantación e invasión post-fuego) están relacionadas principalmente
817 con las condiciones de crecimiento diferenciales dadas por el reclutamiento posterior al
818 fuego, tales como la densidad de árboles o el crecimiento (Figura 2.5). De acuerdo con los
819 criterios de selección, se conservaron los dos primeros ejes, que explican el 70,4 % de la
820 varianza. El eje 1 explica el 48,06% de la variación de los datos y esta positivamente
821 correlacionado con la densidad de árboles (carga de factores estandarizados: 0,84) y
822 negativamente correlacionado con la edad y el DAP (cargas de factores estandarizados: -0,82
823 y -0,77 respectivamente). Se observa que los individuos de rodales invadidos post-fuego se
824 encuentran desplazados en este eje hacia valores correspondientes a mayor densidad y
825 menores valores de edad y DAP en relación con los individuos de las plantaciones. El eje 2
826 explica el 22,34% de la variación de los datos y representa valores crecientes para radiación
827 solar y el nivel de serotinia (cargas de factores estandarizados: 0,58 y 0,69 respectivamente).
828 En este eje, aunque no se observa una separación clara, el valor medio para la invasión post-
829 fuego está ligeramente desplazado hacia valores más bajos en el nivel de serotinia y radiación
830 solar respecto al valor medio para plantación.



831
 832 **Figura 2.5.** Análisis de componentes principales de rodales de plantación (triángulos) e invasión
 833 (círculos) de *Pinus radiata*. El análisis se realizó en base a 5 variables: densidad, edad, DAP,
 834 radiación solar y grado de serotinia. El valor medio de cada elipsoide está representado por un
 835 triángulo o círculo de mayor tamaño para plantación en invasión respectivamente. Las flechas indican
 836 la dirección de los efectos de cada variable.

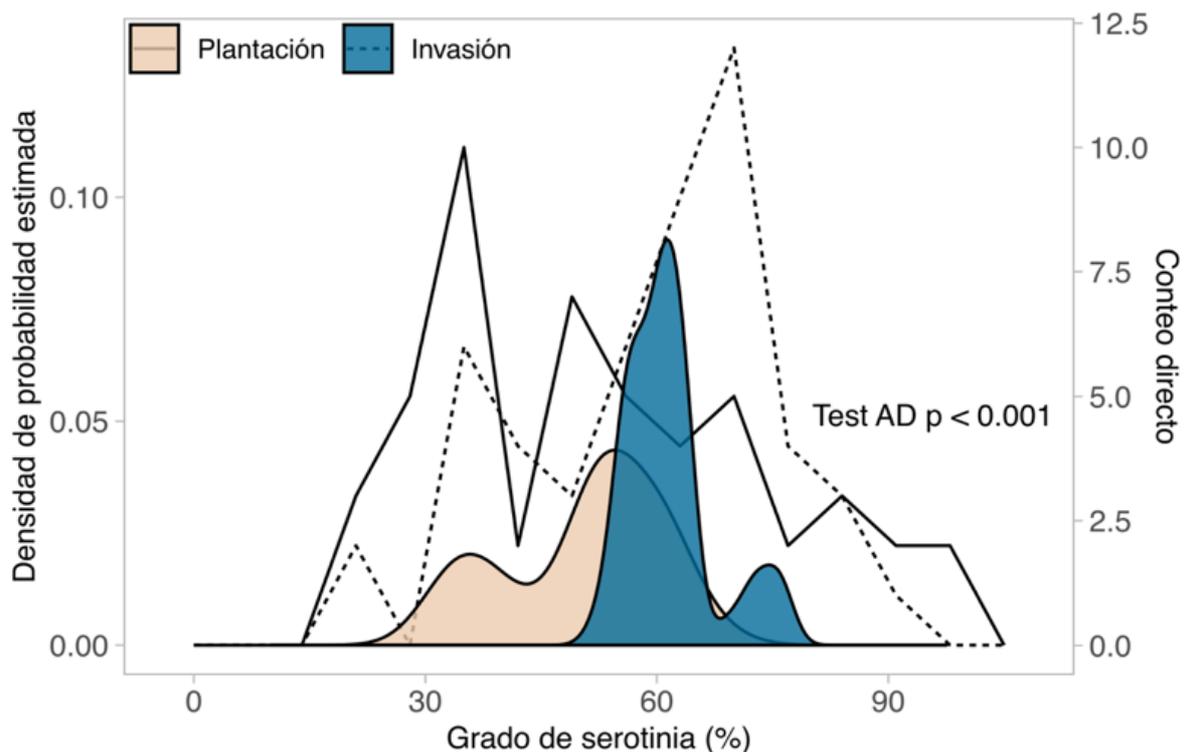
837
 838 Los efectos modelados aplicando GLM de las variables incluidas en el PCA (edad,
 839 DAP, densidad y radiación solar) sobre el grado de serotinia fueron estadísticamente
 840 significativos (Tabla S2.3). Los dos tipos de rodales presentaron el mismo patrón para el
 841 grado de serotinia en función de la densidad de árboles, DAP y radiación solar, pero la curva
 842 estimada para rodales de invasión post-fuego siempre muestra valores más altos (Figura 2.6).
 843 El nivel de serotinia estimado en función de la edad muestra patrones opuestos, aumentando
 844 en el caso de rodales de invasión post-fuego y disminuyendo para plantación (Figura 2.6). El
 845 porcentaje de serotinia estimado fue mayor en la invasión post-fuego ($61,6 \pm 5,7$ %, media \pm
 846 SD) que en las plantaciones ($50,6 \pm 10,1$ %, $p < 0,001$), presentando además ambos tipos de
 847 rodal diferentes distribuciones de frecuencias del porcentaje de serotinia (test de Anderson
 848 Darling $p < 0,001$; Figura 2.7). Al analizar las curvas de probabilidad de los datos estimados,
 849 la invasión post-fuego mostró un pico pronunciado de probabilidad de un 62% de serotina y

850 un pico menos pronunciado alrededor del 75%; mientras que para la plantación se
 851 observaron dos picos menos pronunciados alrededor del 35 y el 55% de serotinia. En los datos
 852 observados, los rodales de invasión post-fuego presentaron un intervalo modal alrededor del
 853 60% de serotinia, mientras que para la plantación el intervalo modal fue alrededor del 30%
 854 (Figura 2.7).



855 **Figura 2.6.** Grado de serotinia (eje y) de rodales de plantación e invasión de *Pinus radiata* en función
 856 de (A) densidad (miles de árboles/ha), (B) edad (años), (C) DAP (cm) y radiación solar (mol/m²). La
 857 invasión es representada como curvas de regresión punteadas y la plantación como líneas de regresión
 858 continuas. Los valores observados (gris) y estimados (negro) se representan como triángulos para
 859 invasión y círculos para plantación respectivamente.

861



862
 863 **Figura 2.7.** Distribuciones de frecuencias para el grado de serotinia (eje X) de rodales de pantación e
 864 invasión de *Pinus radiata* en base a datos observados y modelados. En el eje Y izquierdo se
 865 representa la densidad de probabilidad estimada para el grado de serotinia para plantación (gris
 866 oscuro) e invasión (gris claro). En el eje Y derecho se representan el número de árboles observados
 867 para plantación (línea completa) e invasión (línea punteada). El test de Anderson Darling arrojó
 868 diferencias significativas ($P < 0,001$) para las distribuciones de frecuencias entre plantación e invasión
 869 tanto para los datos observados como modelados.

870

871 2.4 Discusión

872 Los árboles de invasión post-fuego mostraron mayores niveles de serotinia en comparación a
 873 los de plantaciones. Para una especie adaptada al fuego como *Pinus radiata*, esto sugiere que
 874 la plasticidad fenotípica y/o procesos de selección mediados por fuego promoverían la
 875 divergencia en rasgos de persistencia a este disturbio. Dado que los individuos de invasión en
 876 promedio son solamente 5 años menor que los de plantación se podría decir que este proceso
 877 de divergencia está teniendo lugar rápidamente, incluso en el lapso de una generación. El
 878 efecto del fuego sobre el grado de serotinia ha sido estudiado previamente para diferentes
 879 especies de *Pinus* en sus áreas de distribución nativas, pero en periodos de tiempo mucho
 880 mayores a los estudiados en esta tesis y analizando distintas poblaciones que diferían en
 881 cuanto a la frecuencia de incendios. En estos estudios, se observó que el nivel de serotinia era

882 más alto en las áreas afectadas por incendios de copa frecuentes (Goubitz et al., 2004;
883 Hernández-Serrano, Verdú, González-Martínez, y Pausas, 2013; Linhart, 1978; Radeloff
884 et al., 2004). Por ejemplo, en el caso de *P. halepensis* en Israel, se encontraron niveles de
885 serotinia más altos en rodales quemados que en los no quemados (Goubitz et al., 2004). Este
886 efecto positivo del fuego sobre la serotinia podría asegurar un incremento en la invasión de *P.*
887 *radiata*, ya que es probable que esta población en crecimiento sea capaz de superar los
888 efectos negativos que sufren los individuos que crecen en condiciones de hacinamiento y
889 evitar los efectos del empobrecimiento genético gracias a la acumulación de diversidad
890 genética en el banco.

891 La historia de incendios de un sitio puede influir en las frecuencias locales del grado
892 de serotinia como se midió en diferentes especies del género *Pinus* (Givnish, 1981; Muir y
893 Lotan, 1985; Pastor, 2016). Sin embargo, estos estudios se llevaron a cabo dentro del área de
894 distribución nativa de estas especies donde la asociación de las poblaciones con sus
895 respectivas frecuencias de fuego es de larga data; mientras que la introducción de *Pinus*
896 *radiata* en nuestra área de estudio ocurrió hace unos 60 años. Sin embargo, los incendios
897 recurrentes en la Reserva Epuyén (área de estudio) han dado como resultado rodales
898 mayormente mono-específicos dominados por esta especie. Las invasiones post-fuego en este
899 lugar comenzaron después de un incendio en 1987, volviendo a invadir el área luego de
900 incendios ocurridos en el 2012 (individuos donde se observó presencia de conos en el 2017,
901 i.e. cuando los individuos tenían ~ 5 años de edad) y en el 2015. Esta tendencia hacia rodales
902 mono-específicos de *P. radiata* también ha sido registrada luego de incendios en Australia
903 (Williams y Wardle, 2009) y Chile (observación personal). Este patrón también coincide con
904 el encontrado para *Pinus contorta*, otra especie serótina, que se ha expandido en áreas
905 quemadas de sus rangos nativo (Lotan, 1976) y exótico (Cóbar-Carranza, García, Pauchard, y
906 Peña, 2014; Davis et al., 2019; Raffaele et al., 2016; Taylor et al., 2017).

907 En la zona de estudio de Puerto Patriada los rodales post-fuego se caracterizaron por
908 un gran tamaño del banco de semillas aéreo, una alta densidad de individuos y un bajo
909 desarrollo tanto de los árboles como sus copas (Tabla 2.2). El tamaño del banco de semillas
910 aéreo en la invasión post-fuego no sólo fue mayor en comparación con las plantaciones no
911 quemadas, sino también con otras especies de pinos seróticos ya sea en sus rangos nativos o
912 exóticos (Tabla 2.4). El gran tamaño del banco aéreo de semillas de los rodales de invasión
913 post-fuego implica una mayor capacidad de reclutamiento en las áreas adyacentes luego de
914 incendios y esta invasión potencial además representa mayores tasas de acumulación de

915 combustible y aumento de la inflamabilidad respecto a las comunidades nativas circundantes
 916 (Cóbar-Carranza et al., 2014; Franzese et al., 2019; Paritsis et al., 2018). Esto no sólo es
 917 debido a las características intrínsecas de la especie sino también a que estas altas densidades
 918 de árboles promueven el auto-raleo y la acumulación de material combustible seco, lo que
 919 aumentaría no sólo el riesgo de incendio sino también el nivel de conectividad para que el
 920 fuego se propague (Agee, 1996; Cóbar-Carranza et al., 2014; Franzese et al., 2018; Noss,
 921 Franklin, Baker, Schoennagel, y Moyle, 2006; Paritsis et al., 2018; Radeloff et al., 2004).
 922 Frente a este escenario, la capacidad de *P. radiata* para invadir áreas adyacentes se vería
 923 incrementada y por lo tanto contribuiría a una retroalimentación positiva del ciclo de fuego-
 924 invasión, en el cual no solo aumentaría el área de invasión sino también la frecuencia de
 925 incendios.

926

927 **Tabla 2.4.** Tamaño del banco de semillas aéreo para diferentes especies de pinos en sus
 928 rangos nativo y exótico. Los datos de invasión post-fuego en el área de estudio se indica con
 929 un asterisco; el resto de la información reportada para rango exótico corresponde a
 930 plantaciones.

Especie	Edad	Localización	Rango	Semillas/m ²	Referencia
<i>P. radiata</i>	30	Chubut, Argentina	Exótico*	25847	Este estudio
<i>P. radiata</i>	40	Chubut, Argentina	Exótico	3574	Este estudio
<i>P. radiata</i>	15	Longford, Australia	Exótico	9,8	Eldridge (1966)
<i>P. radiata</i>	15	Stockdale, Australia	Exótico	2,7	Eldridge (1966)
<i>P. halepensis</i>	15	Mira, España	Nativo	17,5	Tapias et al. (2001)
<i>P. halepensis</i>	15	Lujar, España	Nativo	100	Tapias et al. (2001)
<i>P. halepensis</i>	16	Ayora, España	Nativo	3,5	Tapias et al. (2001)
<i>P. halepensis</i>	70	Israel	Nativo	355	Goubitz et al. (2004)
<i>P. pinaster</i>	16	Ayora, España	Nativo	1,2	Tapias et al. (2001)

931

932 Los resultados mostraron una tendencia decreciente del grado de serotinia en función
 933 de la densidad de árboles en cada tipo de rodal; pero el grado de serotinia en los rodales de
 934 invasión post-fuego comienza a disminuir a densidades más altas que en la plantación. Estos
 935 resultados sugieren que la retroalimentación positiva en el ciclo de fuego-invasión se refleja
 936 en muchos individuos que proveen conos seróticos y por lo tanto liberación de semillas
 937 después del fuego, aunque a nivel individual el crecimiento y el número de conos es menor

938 en las áreas invadidas que en la plantación. Esto puede deberse al hecho que, aunque los
939 incendios frecuentes seleccionarían fenotipos más serótinicos, las condiciones durante el
940 reclutamiento post-fuego (tales como la alta densidad) no son óptimas para el desarrollo de
941 los árboles (Goubitz et al., 2004). En este estudio, un año después del incendio del 2012, se
942 registraron cerca de medio millón de plántulas de pino por hectárea, pudiendo entonces esta
943 densidad extremadamente alta producir autoraleo y afectar el desarrollo de los individuos y la
944 producción de conos. La relación positiva entre el aumento de serotinia y la radiación solar
945 (Figura 2.6) puede deberse a que esta variable también está correlacionada con la tasa de
946 fotosíntesis y la producción de biomasa (Dewar, 1996; Righi et al., 2007). En general los
947 índices utilizados para medir los niveles de serotinia no tienen en cuenta el tamaño, la edad y
948 el estado de crecimiento de las plantas (Lamont, 2020). En nuestro caso estas condiciones sí
949 fueron consideradas e incluso pudimos observar que poseen un claro efecto sobre el grado de
950 serotinia (Tabla S2.3, Figura 2.6).

951 Los granívoros naturales disminuyen la disponibilidad de propágulos durante las
952 etapas pre o post-dispersivas y en su área de distribución nativa, varias especies de aves (e.g.
953 arrendajo de los matorrales, arrendajo estelar y cuervo común), pequeños mamíferos (e.g.
954 ratón ciervo y ardillas) e insectos (e.g. escarabajo de la piña de pino monterrey) dependen
955 para su subsistencia de las semillas de *P. radiata* (McDonald y Laacke, 1990; Schaefer,
956 1962). Sin embargo, no se han reportado estos reguladores del tamaño del banco de semillas
957 de *Pinus radiata* en una etapa pre-dispersiva en el rango exótico. La hipótesis de resistencia
958 biótica (Elton, 2000), propone que el consumo preferencial de plantas exóticas por parte de
959 los herbívoros generalistas nativos puede proporcionar resistencia biótica a las invasiones de
960 plantas (Parker y Hay, 2005). Bajo esta hipótesis, la depredación de semillas disminuye el
961 establecimiento y la dispersión de especies de plantas exóticas (Orrock, Levey, Danielson, y
962 Damschen, 2006). Si bien no se han registrado granívoros en una etapa de pre-dispersión, un
963 experimento de campo en Patagonia donde se ofrecieron semillas de *P. radiata* depositadas
964 en el suelo mostró una depredación cercana al 85% de las semillas después de 15 días de
965 exposición (Moyano, Chiuffo, Nuñez, y Rodríguez-Cabal, 2019), lo cual sugiere que este
966 puede ser un factor limitante para la invasión de esta especie en el norte de la Patagonia
967 (Nuñez, Simberloff, y Relva, 2008). Sin embargo, los resultados de esta tesis predicen que la
968 depredación post-dispersión no tendría efectos reguladores importantes durante el
969 establecimiento post-fuego temprano ya que la liberación masiva de semillas luego del
970 incendio podría saciar a los depredadores, asegurando un alto reclutamiento (Lamont et al.,

971 1991). Además, los altos niveles de serotinia podrían proteger las semillas de los granívoros
972 en la etapa de pre-dispersión (Lamont y Enright, 2000), siendo entonces una ventaja
973 competitiva no solo frente a incendios, sino también para la granivoria. Por otra parte, no se
974 registraron evidencias de depredación de semillas o daño de conos durante los muestreos de
975 campo, ni de daño de las semillas en la etapa pre-dispersiva para esta especie en Patagonia, lo
976 que implicaría la falta de una barrera biótica significativa para la invasión de *Pinus radiata* en
977 esta región.
978

979

Capítulo 3

980

Germinación y vigor temprano asociados a incendios en *Pinus radiata*

981

982

3.1 Introducción

983

984

985

986

987

988

989

990

991

992

993

994

995

996

997

998

999

Los incendios son disturbios naturales que impactan significativamente sobre los ecosistemas produciendo cambios rápidos en la vegetación (Kitzberger, Raffaele, Heinemann, y Mazzarino, 2005; Pausas, 2012), suelos (Alauzis, Mazzarino, Raffaele, y Roselli, 2004), ciclos biogeoquímicos, microclimas y otras características ecológicas (Brown y Smith, 2000; Paritsis, Raffaele, y Veblen, 2006); y genéticas (Premoli y Kitzberger, 2005). En muchas especies de plantas, el reclutamiento de las plántulas está restringido a hábitats creados por tales perturbaciones (Bond y van Wilgen, 2012; Keeley y Fotheringham, 2000). Durante su evolución, las plantas han desarrollado diversas adaptaciones a los diversos factores generados por y / o asociados con fuego (Keeley, Pausas, et al., 2011). Para muchos taxones, la respuesta al fuego ha dado forma al crecimiento y desarrollo de las plantas y ha sido derivado en la evolución de estructuras análogas y formas de vida en grupos taxonómicos dispares (Bond y van Wilgen, 2012; Keeley y Fotheringham, 2000; Keeley, Pausas, et al., 2011). El fuego por lo tanto puede considerarse como una importante fuerza selectiva ambiental que genera señales tanto físicas como químicas, afectando diversos aspectos del crecimiento y desarrollo de las plantas, a nivel de floración, dispersión y germinación de semillas, establecimiento de plántulas, producción de biomasa y mortalidad (Keeley, Pausas, et al., 2011).

1000

1001

1002

1003

1004

1005

1006

1007

1008

1009

1010

1011

Los efectos del fuego relacionados con señales como luz, temperatura, óxidos de nitrógeno y humo sobre la germinación de semillas han sido bien documentados (Bond y van Wilgen, 2012). El fuego influye directamente sobre las semillas de las especies adaptadas a este disturbio al inducir la germinación mediante la escarificación física, el choque térmico y/o la estimulación química por el humo (Bond y van Wilgen, 2012; Franzese y Ghermandi, 2011; Franzese y Ghermandi, 2012; Gonzalez y Ghermandi, 2012; Ooi, Denham, Santana, y Auld, 2014; Van Staden, Jager, Light, y Burger, 2004; Van Staden, Brown, Jäger, y Johnson, 2000). Adicionalmente, las semillas y plántulas pueden experimentar efectos indirectos del fuego, como el aumento de la incidencia de la luz en la superficie del suelo, la liberación de la competencia y un aumento en la disponibilidad de nutrientes (Keeley y Fotheringham, 2000; Tyler, 1995). En especies adaptadas al fuego, el choque térmico puede actuar estimulando la germinación al cambiar la estructura celular de la capa superficial

1012 impermeable de algunas semillas y volverla permeables, lo que permite el ingreso de agua al
1013 interior de la semilla (Bond y van Wilgen, 2012). Mientras que la ceniza actúa mediante la
1014 estimulación por sus altos contenidos de nutrientes como nitrógeno, fosforo, potasio y
1015 oligosacáridos derivados de la combustión de la hemicelulosa (Bond y van Wilgen, 2012).
1016 Estos efectos del fuego sobre la germinación y el reclutamiento de plántulas pueden impactar
1017 significativamente en la invasión de especies exóticas, especialmente en aquellas que
1018 dependen del establecimiento por semillas para la colonización post-fuego.

1019 Los efectos de diversos factores asociados a fuego ha sido ampliamente estudiado
1020 para diversas especies herbáceas invasoras como *Rumex acetosella* [germinación estimulada
1021 por humo (Franzese y Ghermandi, 2011)], *Potentilla recta* [mayor reclutamiento en sitios
1022 quemados (Lesica y Martin, 2003)] y *Bromus tectorum* [efecto positivo del humo y la ceniza
1023 sobre el tiempo y el porcentaje de germinación (Naghypour, Bashari, Khajeddin, Tahmasebi,
1024 y Irvani, 2016)]. Y, aunque en menor medida, también se ha observado un importante rol del
1025 fuego como promotor de la germinación en especies invasoras arbóreas como *Acacia*
1026 *melanoxylon* [aumento de la germinación con temperaturas de shock térmico moderadas
1027 (Arán, García-Duro, Reyes, y Casal, 2013)], *Eucalyptus globulus* [escarificación y apertura
1028 de las cápsulas que contienen las semillas (Silva, dos Santos, Sérgio, y Gomes, 2016)], *Pinus*
1029 *pinaster* [la germinación es promovida por shocks térmicos de corta duración (Herrero, San
1030 Martin, y Bravo, 2007)] y *Paulownia tomentosa* [germinación promovida por humo y
1031 compuestos nitrogenados presentes en las cenizas (Todorović et al., 2010)].

1032 Los ecosistemas que presentan altas frecuencias de fuego son particularmente
1033 vulnerables a la invasión de especies de plantas exóticas adaptadas a este disturbio (Guthrie,
1034 Crandall, y Knight, 2016; MacDougall, McCann, Gellner, y Turkington, 2013; Murphy y
1035 Romanuk, 2014; Raffaele et al., 2016), especialmente las especies serótinas (i.e. especies con
1036 almacenamiento prolongado de las semillas en el dosel, que son liberadas luego de un
1037 estímulo externo como el fuego). Franzese y Raffaele (2017) muestran que las especies de
1038 pinos seróticos alcanzan densidades de invasión mucho mayores en ambientes incendiados
1039 que en aquellos no quemados, así como también alcanzan mayores densidades que las
1040 especies no serótinas. Estas mayores densidades de invasión que primariamente están
1041 relacionadas a la gran presión de propágulos por la liberación masiva de semillas en
1042 condiciones de mínima competencia (Lamont et al., 1991), también pueden estar relacionadas
1043 a que la germinación y el crecimiento temprano de estas especies serótinas se benefician de
1044 las condiciones ambientales post-fuego (Herrero et al., 2007). El proceso de invasión podría

1045 verse favorecido aún más en el caso de que estas características adaptativas frente a
1046 incendios pasen por un proceso selectivo rápido (como el descrito en el capítulo 2 para el
1047 grado de serotinia), incrementándose en la descendencia post-fuego la frecuencia de
1048 individuos con un mayor grado de adaptación (Lee, 2002; Prentis et al., 2008).

1049 *Pinus radiata* es una especie que depende de las semillas para su establecimiento, que
1050 es intolerante a la sombra y requiere de hábitats abiertos para su regeneración (Higgins y
1051 Richardson, 1998) . La germinación es epigea y relativamente rápida sin estratificación (Roy,
1052 1966). Una vez germinadas, las plántulas presentan un verticilo de cinco a nueve cotiledones
1053 que posteriormente son reemplazados por acículas primarias (Roy, 1966). Las acículas
1054 secundarias (haces de acículas) se forman cuando la plántula tiene unos meses de edad y
1055 después de los 3 años la plántula sólo produce agujas secundarias (Roy, 1966). El sistema de
1056 raíces de las plántulas consiste en una raíz primaria delgada y pivotante (Roy, 1966). La cama
1057 de semillas necesaria para la regeneración natural de *P. radiata* es muy variable, siendo el
1058 óptimo un suelo mineral húmedo libre de vegetación (Roy, 1966). Sin embargo, dentro de su
1059 rango nativo es común encontrar plántulas en sitios con varios centímetros de acículas de
1060 pino sobre el suelo mineral. Las plántulas se desarrollan mejor a plena luz del sol. Un
1061 ejemplo de esto es lo encontrado por Bustamante y Simonetti (2005) en un estudio para el
1062 bosque Maulino (Chile central), donde si bien hay dispersión de semillas de *P. radiata* hacia
1063 el interior del bosque, estas solo se establecen en los bordes. Bustamante y Simonetti
1064 encuentran porcentajes de germinación de entre el 5 y 50% con los mayores valores en los
1065 sitios de bordes. A su vez en Australia se ha observado que el fuego da lugar a un elevado
1066 reclutamiento de plántulas de *P. radiata* estimulando la invasión de esta especie (Williams y
1067 Wardle, 2005). Entonces, las condiciones óptimas para la regeneración se producen por el
1068 fuego; se abre el máximo número de conos seróticos maximizando la disponibilidad de
1069 semillas que se encuentran con una cama de semillas descubierta, libre de competencia y rica
1070 en nutrientes (Roy, 1966; Williams y Wardle, 2005).

1071 El objetivo del presente capítulo es el estudio del rol potencial del fuego como agente
1072 selectivo sobre la germinación de *Pinus radiata*. Para esto se evaluó experimentalmente la
1073 respuesta germinativa, el vigor temprano y la supervivencia, de semillas provenientes de
1074 plantaciones no quemadas e invasión post-fuego, a distintas condiciones de germinación
1075 relacionadas a incendios. Los tratamientos consistieron en someter a las semillas a shocks
1076 térmicos a 90° y 120° C por 5 min y analizar los efectos de la ceniza sobre la germinación,
1077 bajo condiciones controladas en cámara de crecimiento y posteriormente en invernadero. La

1078 hipótesis analizada plantea que el fuego actúa como un mecanismo de selección rápida
1079 mejorando la respuesta germinativa frente a condiciones ambientales asociadas a incendios
1080 como las altas temperaturas y la presencia de ceniza. Se esperaba que los pinos serótinicos
1081 reclutados después del incendio presentaran un mayor porcentaje de germinación, vigor y
1082 supervivencia que las semillas provenientes de las plantaciones no quemadas frente a los
1083 tratamientos recién mencionados (altas temperaturas y ceniza).

1084

1085 **3.2 Materiales y Métodos**

1086

1087 3.2.1 Diseño experimental

1088 Las semillas utilizadas se obtuvieron de conos serótinicos provenientes de plantaciones no
1089 quemadas e invasión post-fuego de 30 años durante la primavera y verano de 2017. Para cada
1090 tipo de rodal se cortaron 10 árboles seleccionados al azar y se recolectaron 10 conos serótinicos
1091 maduros por árbol, en distintas posiciones seleccionadas al azar dentro de la copa sin sesgo
1092 de color o tamaño. Esto resultó en un total de 100 conos para cada tipo de situación:
1093 plantación e invasión.

1094 Para promover la liberación de las semillas los conos fueron sometidos a 150°C
1095 durante 10 minutos en una estufa de calor seco. Se verificó que estas condiciones no
1096 producían efecto sobre la temperatura interna de los conos midiendo la misma en 50 conos
1097 seleccionados al azar con un termopar tipo K colocada en su interior, observando que la
1098 temperatura interna se mantenía constante e inalterada (ver sección 2.2.1). Luego de la
1099 liberación de las semillas se comprobó la viabilidad de las mismas mediante el método de
1100 presión (Zuluaga et al., 2004), donde las semillas que resistieron una suave presión realizada
1101 con una pinza fina fueron consideradas viables. Las semillas de los distintos orígenes
1102 (plantación e invasión) fueron sometidas a distintos tratamientos de germinación post-fuego
1103 de manera experimental analizando los efectos de condiciones ambientales asociadas al
1104 fuego: solución acuosa de ceniza y dos shocks térmicos (90° y 120° C por 5 min), así como
1105 también un control sin shock térmico ni presencia de ceniza. Las temperaturas utilizadas
1106 fueron consideradas en estudios previos que analizaron el efecto de la temperatura sobre la
1107 germinación de especies de pinos; estas, son similares a las registrados en la superficie del
1108 suelo durante incendios de media y alta intensidad (Martínez-Sánchez, Marín, Herranz,
1109 Ferrandis, y De las Heras, 1995; Núñez y Calvo, 2000). Los tratamientos de shock térmico se
1110 aplicaron colocando las semillas en sobres de papel, ya que este material permitió que las

1111 semillas alcancen rápidamente la temperatura de la estufa pero sin producir un
1112 calentamiento extra. A su vez se colocaron termopares en el interior de los sobres que
1113 sirvieron para corroborar que se alcanzaron las temperaturas deseadas (90° y 120° C) durante
1114 el tiempo de exposición. Las semillas no fueron hidratadas previo a realizar el tratamiento.
1115 La obtención de la ceniza se realizó mediante la colecta de material fresco de la parte aérea
1116 de los árboles y también material senescente seco presente en el suelo y la posterior quema
1117 total de hojas, conos y ramas de *P. radiata* del sitio de estudio. Las soluciones de ceniza se
1118 obtuvieron diluyendo 5 g de ceniza en un litro de agua destilada. Esta es considerada una
1119 concentración alta de ceniza y se basó en un trabajo previo realizado para esta especie (Reyes
1120 & Casal, 1998). La aplicación del tratamiento se realizó mediante el riego diferenciado de las
1121 semillas, donde para los tratamientos de shock térmico y control se usó agua destilada y para
1122 el tratamiento de ceniza se utilizó la solución acuosa de ceniza con concentración 5g/L
1123 mencionada.

1124 Una vez realizados los tratamientos se utilizaron 10 placas de Petri, previamente
1125 esterilizadas en autoclave para cada tratamiento (2 orígenes [invasión y plantación] * 4
1126 tratamientos de fuego [control, ceniza, 90° y 120°] * 10 placas * 10 semillas por placa = 800
1127 semillas totales). El ensayo se realizó en una cámara de germinación (INGELAB modelo I-
1128 316PF), con un fotoperíodo de 16/8 horas de luz/oscuridad diarias y 20° C de temperatura
1129 constante (sin variaciones entre el día y la noche), condiciones consideradas óptimas para
1130 esta especie (Willan, 1986).

1131 El número de semillas germinadas por placa de Petri se contó cada 5 días durante 30
1132 días, periodo luego del cual ya no germinaron más semillas. Se consideró como germinada a
1133 toda semilla que presentaba radícula protruida al momento del monitoreo, sin importar el
1134 largo de la misma (Figura 3.1). La tasa de germinación se cuantificó como número de
1135 semillas germinadas en función del tiempo. Las semillas que no habían germinado después
1136 de 30 días fueron diseccionadas para verificar su contenido. Se encontró que todas las
1137 semillas no germinadas presentaban características internas normales en cuanto a color y
1138 turgencia y se asumió que eran viables. Al final del experimento de germinación se
1139 seleccionaron 40 plántulas al azar que fueron trasplantadas a macetas de un litro y cultivadas
1140 en un invernadero bajo iluminación natural en las inmediaciones del INIBIOMA en
1141 Bariloche. El cultivo se realizó en un invernadero con un control de temperatura máxima (30°
1142 C) mediante un sistema de refrigeración. Las plántulas fueron ubicadas de manera aleatoria y
1143 rotadas cada 7 días para disminuir efectos microambientales. Al momento del trasplante se

1144 midió el largo de la radícula y se tomó nota de si las plántulas presentaban o no cotiledones
1145 libres y plenamente desarrollados (Figura 3.1). En el invernadero se midió la supervivencia
1146 de estas plántulas a los 30 días del trasplante.



1147 **Figura 3.1.** (A) Semillas de *Pinus radiata* germinadas, con diferentes largos de radícula al momento
1148 del monitoreo, se indica la escala en la esquina superior izquierda, esta escala corresponde a 2 mm en
1149 las dos imágenes superiores de la columna y 5mm en la imagen inferior. (B) Proceso de liberación de
1150 los cotiledones en plántulas de *Pinus radiata*, secuencia temporal de arriba abajo, se indica la escala
1151 correspondiente a 5 mm en la esquina superior izquierda de las dos imágenes superiores de la
1152 columna.
1153

1154

1155 3.2.2 Análisis de datos

1156 Analizamos los efectos del origen de la semilla (Plantación e Invasión), shock térmico y
1157 ceniza sobre la tasa de germinación en un periodo de 30 días mediante regresiones múltiples
1158 de Cox y curvas de Kaplan-Meier en un análisis de tipo *time-to-event* (McNair, Sunkara, y
1159 Frobish, 2013). Las curvas de Kaplan-Meier muestran las probabilidades de supervivencia
1160 estimadas en función del tiempo (McNair et al., 2013; Schober y Vetter, 2018). La
1161 probabilidad estimada de supervivencia es constante entre los eventos; por lo tanto, la curva
1162 es una función escalonada en la que cada escalón indica la ocurrencia de uno o más eventos
1163 de germinación (McNair et al., 2013; Schober y Vetter, 2018). Las curvas de Kaplan-Meier
1164 se compararon mediante un test de rangos logarítmicos en inglés *Log-rank* (McNair et al.,
1165 2013). Los efectos de estas variables sobre el porcentaje de germinación al final del
1166 experimento se analizaron mediante un GLM con distribución binomial, el modelo incluyó la
1167 germinación (0= semilla no germinada, 1= semilla germinada) como variable respuesta y el
1168 origen y los tratamientos asociados al fuego como variables explicativas.

1169 Los efectos del origen de las semillas y los tratamientos asociados a incendios sobre
1170 la longitud de radícula, presencia de cotiledones desarrollados al final del experimento y
1171 supervivencia temprana se testearon mediante GLM. En el caso de la longitud de radícula y
1172 debido a la naturaleza continua de la variable respuesta, el modelo se realizó con una
1173 distribución gamma (Hedberg y Hedberg, 2018). La presencia de cotiledones y la
1174 supervivencia se modelaron mediante una distribución binomial, donde 0 = sin cotiledones
1175 presentes o plántula muerta y 1 = cotiledones presentes o plántula viva dependiendo del
1176 modelo (i.e. presencia de cotiledones o supervivencia). Los tres modelos incluyeron el origen
1177 y los tratamientos asociados a fuego como variables explicativas. A posteriori se realizaron
1178 comparaciones múltiples por el método basado en la tasa de falsos descubrimientos (FDR por
1179 sus siglas en inglés False Discovery Rate) (Bretz, Hothorn, y Westfall, 2016). Todos los
1180 modelos, pruebas y gráficos reportados se realizaron en el lenguaje para análisis estadísticos
1181 R (RCoreTeam, 2018).

1182

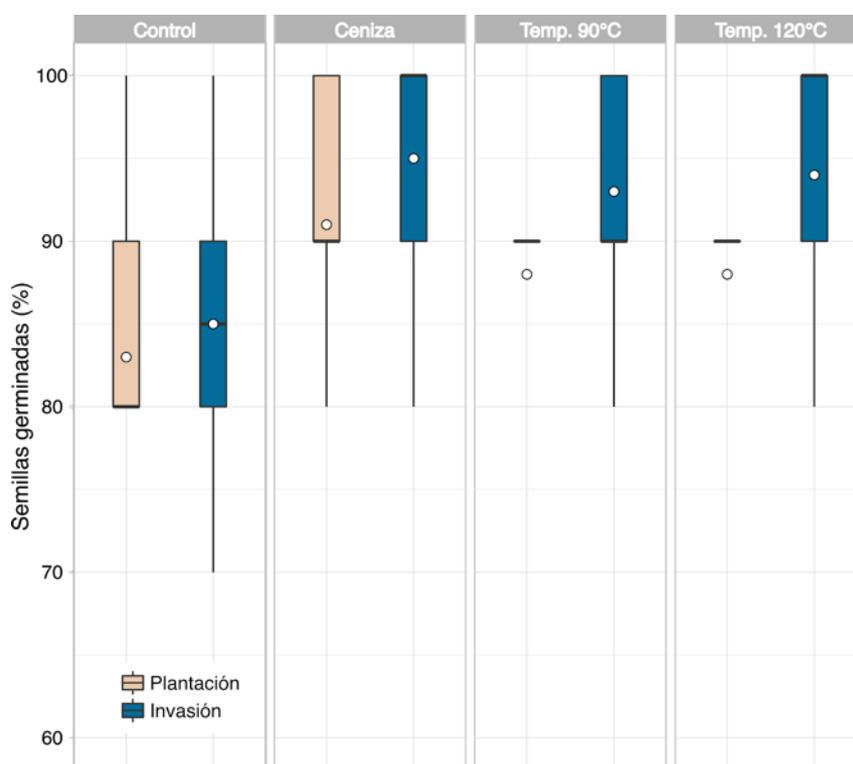
1183 **3.3 Resultados**

1184

1185 3.3.1 Germinación

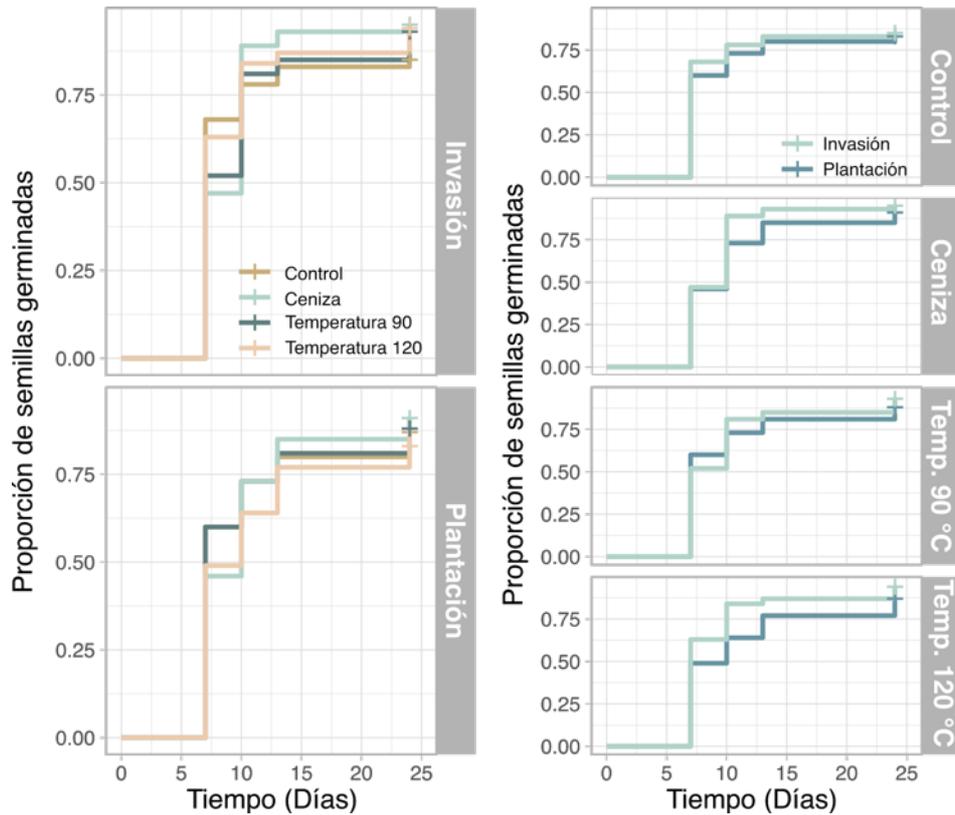
1186 Los porcentajes de germinación obtenidos fueron altos (entre 80 % y 100 %) para ambos
1187 orígenes y en todos los tratamientos asociados a fuego aplicados (Figura 3.2) y con un tiempo

1188 de germinación media de ~7 días para todos los casos. Si bien se observó un efecto
 1189 significativo tanto del origen de las semillas ($p < 0,05$; Tabla S3.1), como de los tratamientos
 1190 de fuego sobre el porcentaje de germinación ($p < 0,05$; Tabla S3.1), no se encontraron
 1191 interacciones estadísticamente significativas entre ambos factores. Si bien el porcentaje de
 1192 germinación no presenta diferencias significativas en las comparaciones de a pares, se
 1193 observa una tendencia hacia mayores porcentajes de germinación en los tres tratamientos de
 1194 fuego aplicados respecto al control tanto para las semillas provenientes de plantación como
 1195 de invasión post-fuego (Figura 3.2). Al observar las curvas de Kaplan-Meier, observamos que
 1196 las tasas de germinación de las semillas provenientes de la invasión y las sometidas a los
 1197 tratamientos asociados a fuego mostraron una tendencia mayor respecto de las de plantación
 1198 y los controles (Figura 3.3), sin embargo, la regresión múltiple de Cox no mostró efectos
 1199 significativos de ninguno de los factores ni de sus interacciones (Tabla S3.2).



1200 **Figura 3.2.** Porcentaje de germinación para semillas provenientes de rodales de plantación e invasión
 1201 de *Pinus radiata* en función de los tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos
 1202 temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C). Los gráficos de caja indican la mediana (línea
 1203 horizontal oscura), la media (círculo), el primer y tercer cuartil (caja) y el rango excluyendo valores
 1204 atípicos (línea vertical).

1206

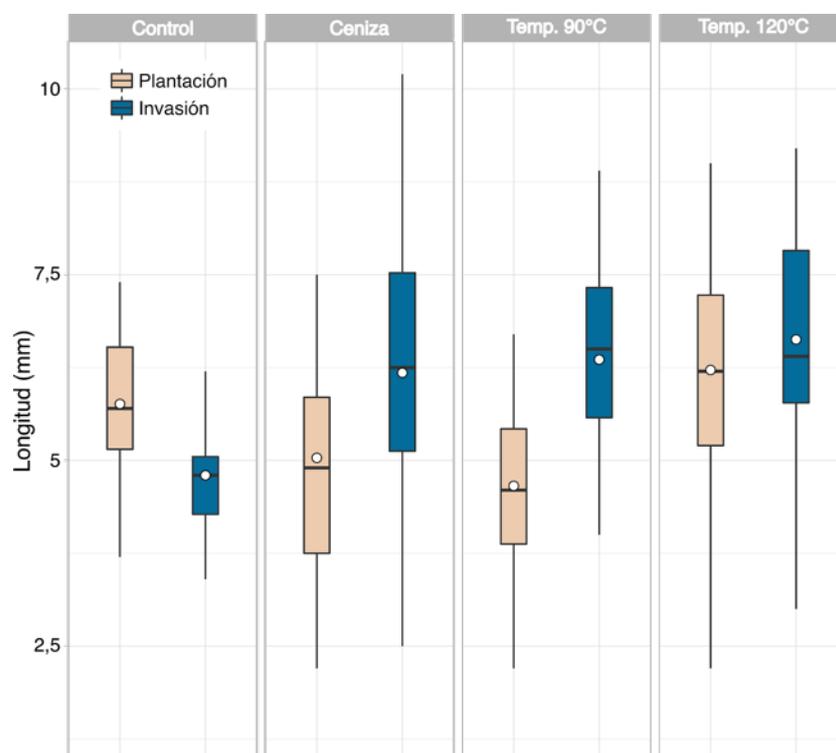


1207
 1208 **Figura 3.3.** Tasa de germinación para semillas provenientes de rodales de plantación e invasión de
 1209 *Pinus radiata* en función del tiempo para (A) tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos
 1210 temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C) representados por separado para el origen de
 1211 las semillas (plantación e invasión) y (B) orígenes de las semillas representados por separado para los
 1212 tratamientos asociados a fuego.

1213
 1214 3.3.2 Supervivencia y vigor temprano

1215 Tanto el origen de la semilla como los tratamientos asociados al fuego mostraron un efecto
 1216 significativo ($p < 0,001$) sobre la longitud de la radícula, excepto del shock térmico a 120°C
 1217 (Tabla S3.3). Sin embargo, no se observaron interacciones estadísticamente significativas
 1218 entre ambos factores. Para las plántulas provenientes de semillas de plantación solo aquellas
 1219 del tratamiento de shock térmico a 90°C fueron significativamente diferentes del control ($p <$
 1220 $0,01$; Tabla S3.4) con radículas más largas en el caso del control ($5,76 \pm 0,92$ cm [media \pm
 1221 SD]) que para el shock térmico a 90°C ($4,66 \pm 1,06$ cm [media \pm SD]). Respecto a las
 1222 plántulas provenientes de semillas de invasión todos los tratamientos fueron
 1223 significativamente diferentes del control ($p < 0,001$; Tabla S3.4), presentando radículas más
 1224 largas los tres tratamientos asociados al fuego (Ceniza: $6,18 \pm 1,94$ cm [media \pm SD],
 1225 Temperatura 90°C: $6,36 \pm 1,27$ cm [media \pm SD], Temperatura 120°C: $6,63 \pm 1,5$ cm
 1226 [media \pm SD]) respecto al control ($4,8 \pm 0,7$ cm [media \pm SD]).

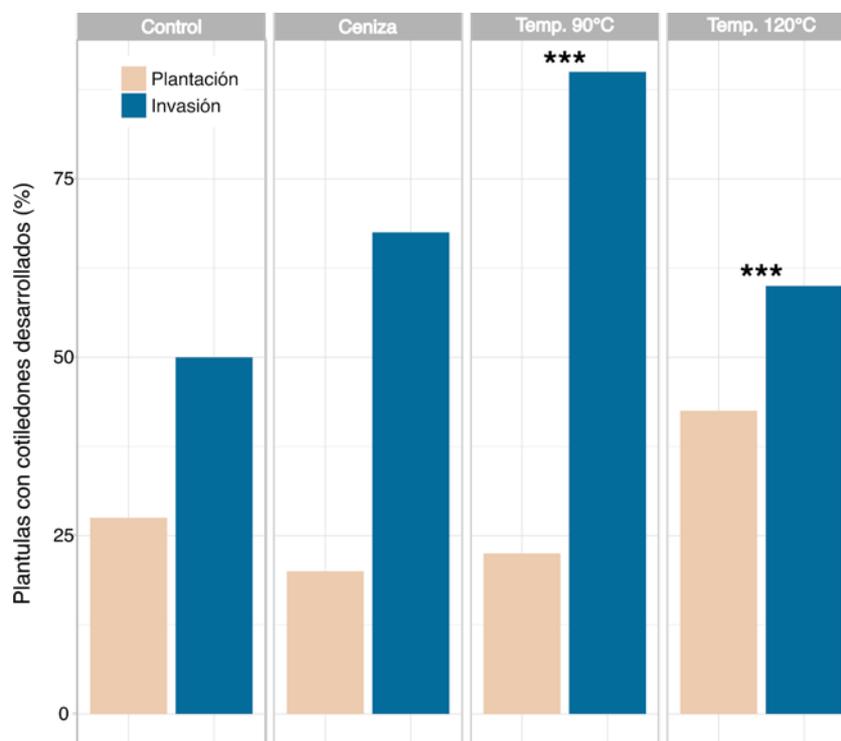
1227 tratamientos asociados a fuego entre invasión y plantación (Figura 3.4) observamos: (a)
 1228 radículas significativamente más largas en el control para las plántulas de plantación respecto
 1229 a la invasión (P: $5,76 \pm 0,92$ cm [media \pm SD], I: $4,8 \pm 0,73$ cm [media \pm SD]; $p < 0,05$;
 1230 Tabla S3.4); (b) radículas significativamente más largas en el tratamiento de ceniza para las
 1231 plántulas de invasión respecto a las de plantación (P: $5,04 \pm 1,5$ cm [media \pm SD], I: $6,18 \pm$
 1232 $1,94$ cm [media \pm SD]; $p < 0,01$; Tabla S3.4); (c) radículas significativamente más largas en
 1233 el tratamiento de shock térmico a 90°C para las plántulas de invasión respecto a las de
 1234 plantación (P: $4,66 \pm 1,06$ cm [media \pm SD], I: $6,36 \pm 1,27$ cm [media \pm SD]; $p < 0,001$;
 1235 Tabla S3.4) y (d) no se observaron diferencias significativas en el largo de la radícula para el
 1236 tratamiento de shock térmico a 120°C (P: $6,22 \pm 1,48$ cm [media \pm SD], I: $6,63 \pm 1,5$ cm
 1237 [media \pm SD]; Tabla S3.4).



1238 **Figura 3.4.** Longitud de la radícula, al momento del trasplante, de las plántulas provenientes de
 1239 semillas de rodales de plantación e invasión de *Pinus radiata*, que fueron sometidas a los tratamientos
 1240 asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120°C). Los
 1241 gráficos de caja indican la mediana (línea horizontal oscura), la media (círculo), el primer y tercer
 1242 cuartil (caja) y el rango excluyendo valores atípicos (línea vertical).
 1243
 1244

1245 Tanto el origen de la semilla como el shock térmico a 90°C mostraron un efecto
 1246 significativo sobre el porcentaje de plántulas con cotiledones libres y desarrollados, siendo
 1247 este efecto marginalmente significativo para el caso del shock térmico a 120°C (Tabla S3.5).

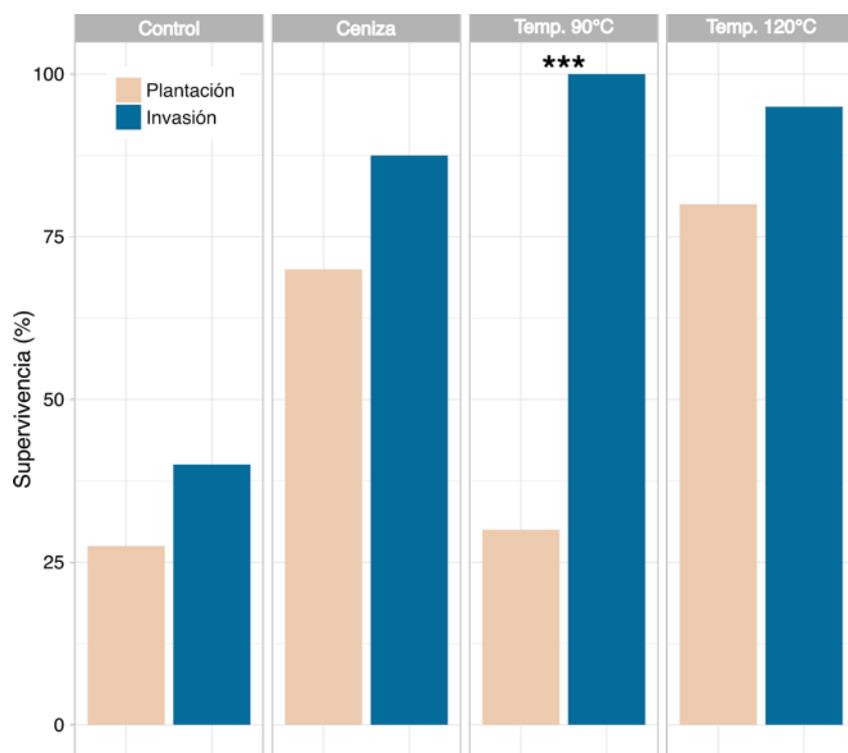
1248 No se observaron interacciones estadísticamente significativas entre ambos factores. Para las
 1249 plántulas provenientes de semillas de plantación ninguno de los tratamientos asociados al
 1250 fuego presento diferencias significativas respecto del control en cuanto al porcentaje de
 1251 plántulas con cotiledones desarrollados al momento del trasplante (Figura 3.5; Tabla S3.6).
 1252 En las plántulas provenientes de semillas de invasión solo el tratamiento de shock térmico a
 1253 90°C presentó un mayor porcentaje de plántulas con cotiledones desarrollados mayor que el
 1254 control ($p < 0,01$; Tabla S3.6; Figura 3.5). En cuanto a la comparación entre invasión y
 1255 plantación para el control y los tratamientos asociados a fuego observamos un mayor número
 1256 de plántulas provenientes de invasión con cotiledones desarrollados al momento del
 1257 trasplante en todos los casos (Figura 3.5), siendo estas diferencias estadísticamente
 1258 significativas solo en los casos de los tratamientos de ceniza y shock térmico a 90°C ($p <$
 1259 0,001; Tabla S3.6).



1260 **Figura 3.5.** Porcentaje de plántulas con cotiledones al momento del trasplante de las plántulas
 1261 provenientes de semillas de rodales de plantación e invasión de *Pinus radiata*, que fueron sometidas a
 1262 los tratamientos asociados al fuego (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas:
 1263 90 y 120 °C). Los asteriscos señalan diferencias estadísticamente significativas entre invasión y
 1264 plantación.
 1265

1266
 1267 Tanto el origen de las semillas como los tratamientos asociados a fuego presentaron
 1268 un efecto significativo sobre la supervivencia temprana de las plántulas (Tabla S3.7), no

1269 observándose interacciones estadísticamente significativas entre ambos factores (Tabla
 1270 S3.7). La supervivencia de las plántulas provenientes de semillas de plantación que fueron
 1271 sometidas a cenizas y a 120 °C fue significativamente mayor respecto del control (Figura 3.6;
 1272 Tabla S3.8). Mientras que para las plántulas provenientes de semillas de invasión la
 1273 supervivencia en todos los tratamientos asociados a fuego fue significativamente mayores
 1274 que el control (Figura 3.6; Tabla S3.8). La mayor supervivencia se registró en las plántulas
 1275 provenientes de invasión para todos los tratamientos (Figura 3.6), siendo estas diferencias
 1276 estadísticamente significativas solo en el caso del shock térmico a 90°C ($p < 0,001$; Tabla
 1277 S3.8).



1278 **Figura 3.6.** Número de plántulas vivas a los 30 días del trasplante provenientes de semillas de rodales
 1279 de plantación e invasión de *Pinus radiata*, que fueron sometidas a los tratamientos asociados al fuego
 1280 (control, ceniza, y dos temperaturas de shock sobre las semillas: 90 y 120 °C). Los asteriscos señalan
 1281 diferencias estadísticamente significativas entre invasión y plantación.
 1282

1283
 1284 **3.4 Discusión**

1285 Los individuos que provienen del reclutamiento post-fuego poseen semillas y plántulas con
 1286 una mayor tolerancia a las condiciones de incendios como el shock térmico a 90°C y
 1287 presencia de ceniza que aquellas provenientes de plantaciones no quemadas. Esto refuerza la
 1288 idea que los factores asociados al fuego impactan favorablemente sobre la germinación y el
 1289 establecimiento temprano de las plántulas provenientes de semillas contenidas en conos

1290 serótinios, y que en esta especie la serotinia es una adaptación al fuego. Si bien la serotinia
1291 ha sido descripta principalmente como una estrategia adaptativa de reclutamiento frente a
1292 incendios, también otorga ventajas frente a otros factores como la predación pre-dispersiva o
1293 la sequía (Lamont y Enright, 2000). Entonces, para que sea considerada como una estrategia
1294 adaptativa frente a incendios, debe presentarse de forma acoplada a la tolerancia de las
1295 semillas y plántulas frente a las condiciones post-fuego (Goubitz et al., 2003). En esta tesis se
1296 encontró que las semillas serotinas de *P. radiata* mostraron un alto porcentaje de germinación
1297 en periodos de tiempo muy cortos para las dos cohortes estudiadas, aunque con valores
1298 levemente mayores en el caso de la invasión. Así mismo la ventaja adaptativa otorgada por el
1299 incremento en los niveles de serotinia es apoyada por la mayor supervivencia y vigor
1300 temprano de las plántulas provenientes de semillas de invasión respecto a las de plantación al
1301 ser sometidas a las condiciones post-fuego analizadas en este estudio (ceniza, y dos
1302 temperaturas de shock sobre las semillas 90 y 120 °C), principalmente en el caso del shock
1303 térmico a 90°C. Esto se esclarece al comparar los resultados con otra especie serótina del
1304 mismo género (*P. halepensis*); donde, si bien los conos se abren y liberan las semillas con las
1305 altas temperaturas provocadas por el fuego (piriscencia), la tasa de germinación se reduce
1306 significativamente en estas mismas condiciones (Goubitz et al., 2003; Martínez-Sánchez
1307 et al., 1995). Esto indicaría que *P. halepensis* no está realmente adaptada al fuego, sino que
1308 en este caso la serotinia quizás pueda ser una ventaja adaptativa frente a otros factores como
1309 las condiciones climáticas (Goubitz et al., 2003).

1310 Los efectos de las altas temperaturas y la ceniza sobre la germinación en especies del género
1311 *Pinus* son diferentes, presentando efectos positivos la temperatura y negativos la ceniza
1312 (Herrero et al., 2007; O. Reyes y Casal, 2004; Otilia Reyes y Casal, 1998; Woodard, 1983).
1313 En nuestro caso tanto el porcentaje como la tasa de germinación se mantuvieron constantes o
1314 incluso aumentaron levemente bajo los tratamientos asociados al fuego. Para el caso de la
1315 ceniza se ha encontrado que actúa como inhibidor y/o retrasando la respuesta germinativa,
1316 tanto en condiciones experimentales como sobre el suelo, para especies como *Pinus radiata*,
1317 *Pinus pinaster*, *Pinus sylvestris*, *Pinus nigra* y *Pinus contorta* (O. Reyes y Casal, 2004; Otilia
1318 Reyes y Casal, 1998; Woodard, 1983). Este efecto negativo puede deberse a diversas razones
1319 entre las que se han sugerido: (i) el hecho de que una gran cantidad de ceniza impediría que
1320 el agua llegue al embrión dada la alta presión osmótica del medio, o a la toxicidad de ciertos
1321 iones presentes en la ceniza; y (ii) que las condiciones altamente alcalinas dadas por la
1322 presencia de ceniza pueden diferir en el caso de especies adaptadas a suelos generalmente

1323 ácidos (e.g. *P. radiata* y *P. pinaster*). Reyes y Casal (2004) midieron también el crecimiento
1324 temprano de *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. sylvestris* y *P. nigra* luego de haber expuesto las
1325 semillas a la presencia de ceniza durante la germinación y no observaron diferencias en el
1326 crecimiento respecto del control. En nuestro caso la ceniza estimuló el crecimiento temprano
1327 de las plántulas provenientes de semillas recolectadas en las áreas de invasión post-fuego,
1328 observándose un mayor porcentaje de plántulas con cotiledones totalmente desarrollados y
1329 mayor longitud de radícula a los 30 días de iniciada la germinación (Figuras 3.4 y 3.5). En
1330 cambio, para el caso de la plantación se observó un efecto menor coincidente con lo
1331 observado para *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. sylvestris*, *P. nigra* y *P. contorta* (O. Reyes y Casal,
1332 2004; Otilia Reyes y Casal, 1998; Woodard, 1983). El hecho de que en nuestro caso *P.*
1333 *radiata* no sea afectado negativamente por la ceniza, tal como ocurre en otras especies del
1334 género y otros ambientes habitados por coníferas del género *Pinus*, también podría estar
1335 indicando una selección favoreciendo condiciones post-fuego en el sitio de estudio. En este
1336 sentido los resultados acá presentados difieren de los reportados para otras poblaciones
1337 exóticas de *P. radiata* (Otilia Reyes y Casal, 1998), mostrando aquí una mejor respuesta
1338 frente a condiciones de reclutamiento post-fuego que la mayoría de las especies de pino,
1339 estudiadas en un escenario similar.

1340 En el área de estudio las especies arbóreas nativas más representativas son coihue
1341 (*Nothofagus dombeyi*) y ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*), con menor
1342 representatividad de otras especies de *Nothofagus* como lenga (*Nothofagus pumilio*) y ñire
1343 (*Nothofagus antarctica*). Estudios de germinación de *A. chilensis*, *N. antarctica* y *N. pumilio*
1344 frente a tratamientos asociados a incendios (ceniza, y shocks térmicos a 90 y 120°C)
1345 encontraron tiempos de germinación de ~30 días o más para todos los tratamientos asociados
1346 a fuego, con porcentajes de germinación de entre 5 (*N. antarctica*) y 50 % (*A. chilensis*)
1347 (Blackhall, Franzese, Raffaele, y Gobbi, 2016). En algunos casos incluso, Blackhall et. al.
1348 (2016) encontraron que el efecto de los tratamientos asociados a fuego fue completamente
1349 inhibitorio sobre la germinación, por ejemplo los *shocks* térmicos en *N. pumilio*. De manera
1350 coincidente en un estudio de germinación sobre sustratos de suelo correspondiente a un post-
1351 fuego, (Urretavizcaya y Defossé, 2004) encontraron una notable disminución de la
1352 germinación de *A. chilensis* cuando se lo sometía a condiciones asociadas a incendios. Otros
1353 estudios de germinación para especies arbóreas nativas de la región patagónica como el notro
1354 (*Embotrium coccineum*) y la araucaria (*Araucaria araucana*) también encontraron
1355 porcentajes de germinación menores a los reportados para *Pinus radiata* en este trabajo; con

1356 ~ 60% a 100° durante 5 minutos para *A. araucana* (Boberg et al., 2010) y 1.5 % a 90°
1357 durante 5 minutos para *E. coccineum* (Olguin Loreto Labbe, 2013). Entonces, en un post-
1358 fuego reciente los altos porcentajes de germinación, junto con la alta velocidad de
1359 germinación, y la densidad de semillas (Capítulo 2) le confieren a esta especie invasora
1360 (*Pinus radiata*) una gran ventaja frente a las especies arbóreas dominantes nativas de
1361 Patagonia. A esto se le suma el efecto positivo gracias a la apertura de zonas iluminadas
1362 necesarias para el reclutamiento de la especie, como observaron Williams and Wardle (2005)
1363 para zonas invadidas de Australia. Coincidentemente en Puerto Patriada podemos encontrar
1364 reclutamientos masivos luego de incendios, con una media de 200.000 individuos por
1365 hectárea a dos años del incendio 2015 (Figura 3.7). Entonces, el incremento de la capacidad
1366 de reclutamiento en condiciones post-incendio de *P. radiata*, y la ventaja que esto le confiere
1367 respecto a las especies nativas, promoverían la exclusión competitiva de la vegetación nativa.
1368 Es esperable que en sitios con incendios recurrentes donde *Pinus radiata* fue implantado, las
1369 condiciones post-fuego generen condiciones favorables para el establecimiento de genotipos
1370 seleccionados por incendios previos. Promoviendo entonces, características de reclutamiento
1371 que favorezcan la invasión de esta especie. Esto contribuiría a explicar su alta invasividad en
1372 regiones con estas características donde la especie es considerada invasora como España,
1373 Australia, Sudáfrica, Nueva Zelanda, Chile y Argentina (Mead, 2013).



1374
1375 **Figura 3.7.** Imagen del sitio de estudio donde puede observarse la alta densidad de individuos de
1376 *Pinus radiata* reclutados luego del incendio de 2015.

Capítulo 4

Variación genética neutral y fenotípica de *Pinus radiata*

1377

1378

1379

1380

4.1 Introducción

1381

1382

1383

1384

1385

1386

1387

1388

1389

1390

1391

1392

1393

1394

1395

1396

1397

1398

1399

1400

1401

1402

1403

1404

1405

1406

1407

1408

1409

Las especies introducidas con fines forestales por lo general poseen bajos niveles de diversidad genética. Esto se debe a que provienen de programas de mejoramiento en huertos semilleros donde la intensidad de la selección aplicada, por ejemplo para obtener un mayor crecimiento en menor tiempo, restringe el número de genotipos que se utilizan como fuentes de semillas para forestar (Chezhian, Yasodha, y Ghosh, 2010; El-Kassaby, 1992; Zelener, Poltri, Bartoloni, Lopez, y Hopp, 2005). Por otro lado, cuando se produce la invasión, i.e. escape, de una especie exótica a partir de la plantación, se puede esperar un empobrecimiento genético debido a cuellos de botella y al aislamiento reproductivo respecto de las poblaciones nativas (Dlugosch y Parker, 2008; Puillandre et al., 2008). La capacidad de algunas especies exóticas para invadir y así aumentar su área de distribución, independientemente de su reducida diversidad genética, se denomina la paradoja genética de las invasiones (Allendorf y Lundquist, 2003; Estoup et al., 2016). Esto quiere decir que a pesar de su baja variación genética y por lo tanto un limitado potencial para por ejemplo colonizar nuevos ambientes, los individuos tienen la capacidad de escapar a la plantación e invadir. Las especies exóticas en general están sujetas a diversos factores que las afectan durante el transporte, la introducción y el establecimiento, como competidores, patógenos, enemigos naturales, nuevos regímenes de disturbios y nuevas condiciones climáticas (Alpert, Bone, y Holzapfel, 2000; Richardson et al., 2000), que afectan su acervo genético (Prentis et al., 2008). Por consiguiente, muchas de las especies exóticas superan todas estas barreras a pesar de contar con una diversidad genética relativamente reducida ya sea por tener una considerable plasticidad fenotípica y/o porque desarrollan mecanismos de adaptación rápida (Lee, 2002; Prentis et al., 2008). Esto podría ser una explicación de por qué algunas especies exóticas se establecen, proliferan y se convierten en invasoras (Lee, 2002; Prentis et al., 2008).

Estos eventos de cuellos de botella o selecciones artificiales en programas de mejoramiento, por lo general llevan aparejado un aumento en los niveles de endogamia. Donde, la endogamia es definida como la producción de descendencia a partir del apareamiento de individuos u organismos que están estrechamente relacionados genéticamente (Hamilton, 2011). La endogamia, o apareamiento entre individuos emparentados, lleva asociados diversos efectos (sobre todo si se prolonga durante

1410 generaciones) como la pérdida de aptitud biológica (Hamilton, 2011). Una forma de medir
1411 la endogamia en una población es mediante los estadísticos F (Wright, 1951), que pueden ser
1412 considerados como medidas de parentesco entre individuos dentro y entre poblaciones
1413 (Hamilton, 2011). A su vez, los niveles de endogamia de una población pueden ser inferidos
1414 de manera indirecta mediante las medidas de heterocigosis y diversidad genética, esperando
1415 que poblaciones muy endogámicas presenten bajos niveles tanto de heterocigosis como de
1416 diversidad (Pemberton, 2004)

1417 Las isoenzimas son marcadores neutrales de base genética que permiten analizar el
1418 grado de diversidad y de las diferencias entre poblaciones mediante el parámetro F_{ST} que
1419 mide la varianza en las frecuencias alélicas de las poblaciones. Al mismo tiempo existen
1420 índices como el Q_{ST} (Pujol, Wilson, Ross, y Pannell, 2008; Spitze, 1993) que evalúa el grado
1421 de diferenciación fenotípica sobre un conjunto de rasgos cuantitativos. Un rasgo o carácter
1422 cuantitativo es un fenotipo medible que puede variar entre los individuos, a lo largo de un
1423 rango, para producir una distribución continua de fenotipos (Roff, 2012); pudiendo ser estos
1424 caracteres cuantitativos de naturaleza morfológica o fisiológica, o características a nivel del
1425 genoma, como la cantidad de ARN o la expresión de proteínas para un gen específico (Walsh
1426 y Lynch, 2018). Estos rasgos cuantitativos suelen mostrar una gran variación dentro de las
1427 poblaciones y entre ellas, pudiendo estas diferencias deberse tanto a la selección natural
1428 como a la deriva génica (Walsh y Lynch, 2018).

1429 La comparación de los índices F_{ST} y Q_{ST} puede ser utilizada para inferir el grado de
1430 adaptación local (Leinonen, McCairns, O'Hara, y Merilä, 2013; McKay y Latta, 2002; Pujol
1431 et al., 2008; Spitze, 1993):

- 1432 i) $Q_{ST} > F_{ST}$ significa que los rasgos cuantitativos muestran un mayor nivel de
1433 diferenciación que la esperada por deriva genética; entonces, la selección
1434 natural podría estar induciendo la diferenciación entre poblaciones
1435 favoreciendo diferentes fenotipos (i.e. selección diversificadora) (McKay y
1436 Latta, 2002);
- 1437 ii) $Q_{ST} < F_{ST}$ puede estar indicando influencia de la selección natural, pero con
1438 tendencias hacia el mismo fenotipo óptimo entre poblaciones (i.e. selección
1439 estabilizadora) (McKay y Latta, 2002);
- 1440 iii) $Q_{ST} = F_{ST}$ significa que no se observan desvíos de lo esperado en un escenario
1441 neutral y que muy probablemente el grado de diferenciación en los rasgos
1442 cuantitativos se obtuvo por deriva génica, aunque la contribución de la

1443 selección no puede ser excluida (McKay y Latta, 2002).

1444 Sin embargo, el tipo de diseño requerido para calcular el QST sensu stricto no es
1445 aplicable a individuos de poblaciones silvestres, debido principalmente a que la estimación de
1446 las varianzas genéticas aditivas (necesarias para el cálculo de QST) requieren de
1447 experimentos de jardín común; donde las contribuciones genéticas y ambientales a la
1448 variación fenotípica pueden separarse (Brommer, 2011; Leinonen, O'Hara, Cano, y Merilä,
1449 2008). En estos casos el QST puede ser aproximado por la divergencia fenotípica (PST) de
1450 un rasgo en las poblaciones (Brommer, 2011).

1451 El objetivo de este capítulo es analizar la estructura y la diversidad genética de *Pinus*
1452 *radiata*, después de invasiones sucesivas post-incendio dentro del sitio de estudio (Puerto
1453 Patriada) y su relación con la diferenciación fenotípica para distintos caracteres cuantitativos
1454 adaptativos entre una cohorte adulta sin fuego y una reclutada luego de incendio. Este
1455 capítulo se enmarca en la hipótesis de que, el fuego actúa como una fuerza evolutiva
1456 produciendo cuellos de botella y divergencia genética entre cohortes de invasión y sin fuego
1457 de *Pinus radiata*. En el marco de esta hipótesis esperamos que: (i) la diversidad genética será
1458 menor en las generaciones reclutadas post-fuego por efecto de cuellos de botella
1459 demográficos, y (ii) la divergencia fenotípica para caracteres adaptativos entre cohortes con y
1460 sin fuego será mayor a la divergencia genética neutral y por lo tanto un indicador de
1461 selección sobre esos caracteres.

1462

1463 **4.2 Materiales y Métodos**

1464

1465 4.2.1 Diseño muestral

1466 Durante el verano de 2018 se recolectaron al azar muestras de follaje fresco de 100
1467 individuos de cada una de 4 cohortes: plantaciones no quemadas y tres cohortes de invasión
1468 post-fuego reclutadas luego de los incendios ocurridos en los años 1987, 2012 y 2015 (Figura
1469 4.1). Los individuos muestreados de la plantación e invasión 1987 eran adultos, mientras que
1470 los de las invasiones 2012 y 2015 eran renovales y plántulas. En algunos casos donde
1471 individuos de plantación e invasión 1987 se encontraban intercalados en el paisaje se
1472 diferenciaron mediante dendrocronología teniendo en cuenta las fechas en que se realizaron
1473 las plantaciones y del reclutamiento post-fuego (Cap. 2, sección 2.2.1). Las muestras se
1474 tomaron de individuos separados por lo menos 30 metros para minimizar la probabilidad de
1475 individuos genéticamente similares.



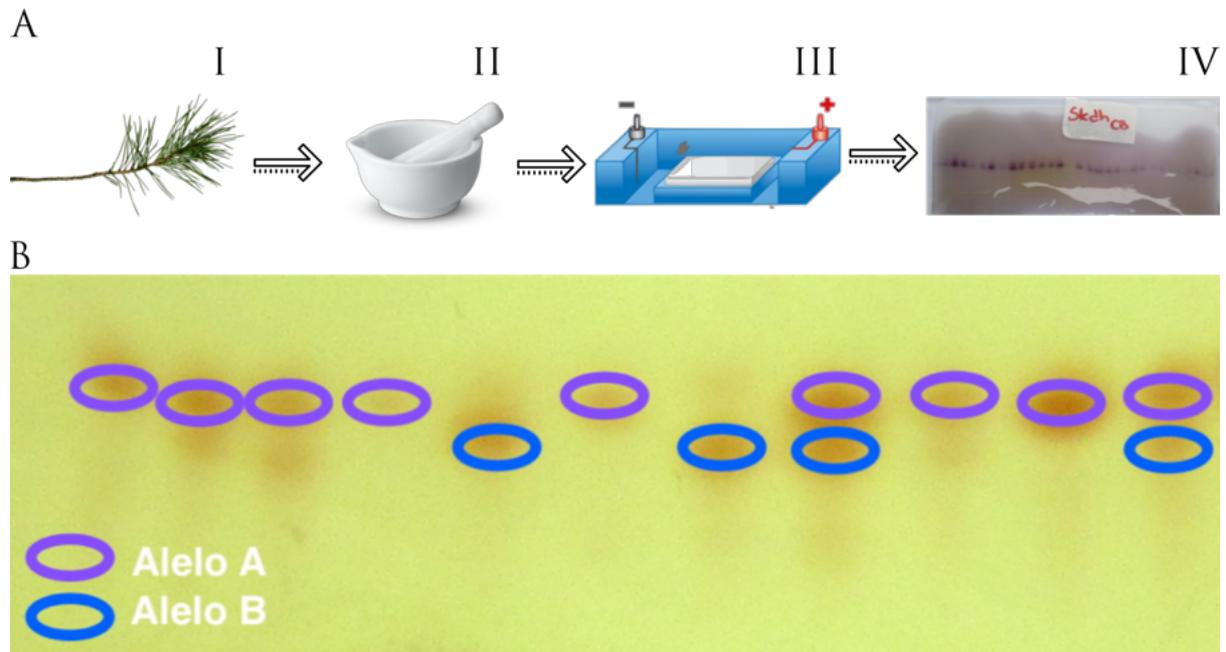
1476
1477

Figura 4.1. Escenarios representativos de las 4 cohortes de *Pinus radiata* (plantación e invasiones posteriores a los incendios de 1987, 2012 y 2015) muestreadas en este capítulo. Tanto las plantaciones como la invasión 1987 están compuestas por individuos adultos, mientras que las invasiones 2012 y 2015 están compuestas por plántulas.

1481

1482 4.2.2 Análisis isoenzimático y estimación de divergencia fenotípica

1483 Se realizó la extracción de los homogenatos proteicos para cada una de las muestras
 1484 utilizando el buffer de extracción de Mitton et al. (1979) y luego se analizaron por
 1485 electroforesis isoenzimática horizontal en geles de almidón al 12% p/v (Figura 4.2 A; Moran
 1486 and Bell 1987; Yang, Yeh, and Yanchuk 1996). Basándonos en la suposición de que los
 1487 cambios en la movilidad electroforética de las enzimas reflejan cambios en la secuencia del
 1488 ADN (Murphy, Sites, Buth, y Haufler, 1990), podemos detectar fenotipos electroforéticos
 1489 con base genética (Figura 4.2 B). Los patrones de las enzimas fueron inferidos a partir de las
 1490 composiciones conocidas de las subunidades y el número de isoenzimas comúnmente
 1491 observadas para especies de plantas (Murphy et al., 1990).



1492
1493

Figura 4.2. (A) Esquema general del proceso de análisis de isoenzimas mediante electroforesis horizontal sobre geles de almidón que incluye: (I) colecta de las muestras, (II) extracción de homogenatos proteicos, (III) electroforesis horizontal y (IV) análisis de fenotipos electroforéticos. **(B)** Ejemplo de fenotipos electroforéticos para *Pinus radiata*, obtenidos para la enzima peroxidasa anódica. Se pueden observar dos alelos para este sitio, el alelo A en violeta y el alelo B en azul. Se pueden observar individuos homocigotas (solo presentan el alelo A o B) o heterocigotas (presentan ambos alelos).

1500

1501 Se revelaron nueve sistemas de isoenzimas que proporcionaron información sobre 12
1502 loci genéticos putativos utilizando dos sistemas, definidos como distintas combinaciones de
1503 soluciones tampón utilizadas para preparar los geles y realizar las corridas isoenzimáticas,
1504 respectivamente. El sistema de la morfolina-citrato con pH 7,5 (Ranker, Haufler, Soltis, y
1505 Soltis, 1989) corrido a 15 mA durante 6 h se utilizó para resolver las siguientes enzimas:
1506 glicerato 2 deshidrogenasa (G2d), malato deshidrogenasa (Mdh1, Mdh2 y Mdh3), peroxidasa
1507 anódica (PerA1 y PerA2), peroxidasa catódica C (PerC) y la fosfoglucoisomerasa (Pgi).
1508 También se utilizó un sistema histidina-citrato con pH 7 (King y Dancik, 1983) corrido a 35
1509 mA durante 6 h para resolver la isocitrato deshidrogenasa (Idh), enzima málica (Me),
1510 fosfoglucomutasa (Pgm) y la shikimato deshidrogenasa (Skdh). Sobre la base de los fenotipos
1511 electroforéticos, se calcularon distintos parámetros de diversidad genética estándar dentro de
1512 la población para describir las características genéticas de cada cohorte. Estos índices
1513 incluyeron: el número promedio de alelos por locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e) el
1514 porcentaje de loci polimórficos (P) *sensu stricto*, la heterocigosis observada (H_o) y la

1515 heterocigosis esperada bajo el equilibrio de Hardy - Weinberg (H_E). También se calculó el
1516 coeficiente de endogamia o índice de fijación dentro de la población (F_{IS}) para cada una de
1517 las cohortes; así como la diversidad genética total (H_T), intrapoblacional (H_S) e
1518 interpoblacional (D_{ST}) que se utiliza para calcular la divergencia entre poblaciones como D_{ST}
1519 / H_T promediado por los loci analizados. Se realizaron comparaciones pareadas por locus
1520 tanto para los niveles de diversidad genética como para los de endogamia (F_{IS}) entre las
1521 cohortes utilizando la prueba de Friedman con comparaciones *post-hoc* mediante la prueba de
1522 los rangos con signos de Wilcoxon que se implementaron en R (RCoreTeam, 2018).

1523 El grado de diferenciación fenotípica Q_{ST} se aproximó mediante el P_{ST} (Da Silva y Da
1524 Silva, 2018) para cinco variables morfométricas cuantitativas (Altura, DAP, diámetro y área
1525 de copa y serotinia) entre plantación e invasión post-fuego 1987. Esta comparación se realizó
1526 solo para estas dos cohortes ya que eran las únicas compuestas por individuos adultos,
1527 estando las cohortes de invasión post-fuego 2012 y 2015 compuestas por plantulas. El P_{ST} se
1528 calculó directamente a partir de los componentes de la varianza fenotípica total sin distinción
1529 entre la contribución relativa de las variaciones genéticas y ambientales:

$$1530 \quad P_{ST} = \frac{c\sigma_b^2}{c\sigma_b^2 + 2h^2c\sigma_w^2}$$

1531
1532 donde σ_b^2 y σ_w^2 son las varianzas fenotípicas entre y dentro de las poblaciones
1533 respectivamente, c es una estimación de la proporción de la varianza total debida a los efectos
1534 genéticos aditivos entre las poblaciones, y h^2 es la herencia, i.e. la proporción de la varianza
1535 fenotípica debida a los efectos genéticos aditivos. El valor de P_{ST} con sus respectivos
1536 intervalos de confianza (límites del 95% inferior y superior, calculados mediante 1000
1537 repeticiones de *bootstraps*) se calcularon usando el paquete *Pstat* en R (Da Silva y Da Silva,
1538 2018).

1539

1540 **4.3 Resultados**

1541 No se observaron cambios significativos entre la plantación y las tres cohortes de invasión
1542 post-fuego (1987, 2012 y 2015) para el número de alelos por locus (N_a), el número efectivo
1543 de alelos (N_e) o la heterocigosis observada (H_O) y esperada (H_E) (Tabla 4.1). Sin embargo, en
1544 las distintas cohortes post-fuego, las diferencias entre los valores observados y esperados para
1545 la heterocigosis aumentan (Tabla 4.1). Esto se refleja en un incremento en el coeficiente de

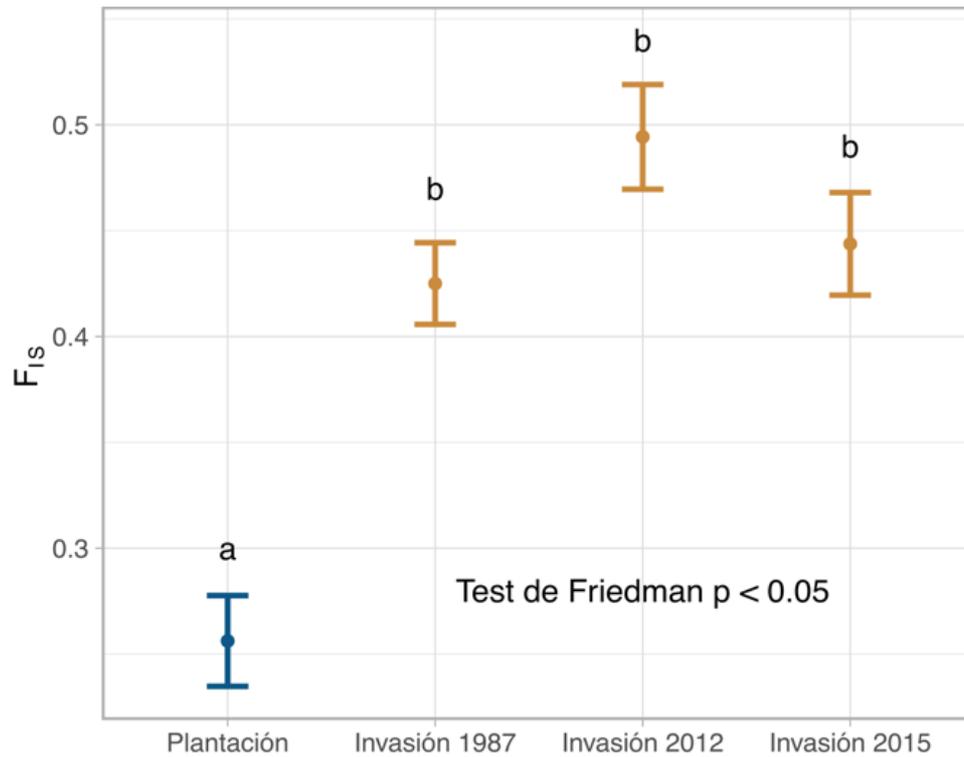
1546 endogamia (F_{IS}) dentro de la población en las cohortes de invasión post-fuego en relación a
 1547 la plantación no quemada (Figura 4.3; $p < 0,05$) no observando diferencias significativas entre
 1548 las 3 cohortes reclutadas post fuego. Tampoco se observaron diferencias significativas en
 1549 cuanto a la diversidad genética intra-poblacional (H_S), presentando valores similares tanto la
 1550 plantación como las tres cohortes post-fuego (Figura 4.4). La diversidad genética total (H_T)
 1551 media fue de 0,275, siendo el componente con mayor aporte a la misma la diversidad
 1552 genética intra-poblacional (H_S) con un 0,266, mientras que la diversidad genética
 1553 interpoblacional (D_{ST}) resultó bastante baja con solo un 0,009 aportando solo un 3,27% (G_{ST})
 1554 a la diversidad genética total (H_T). Al analizar la divergencia genética por pares para las
 1555 cohortes estudiadas mediante el estadístico F_{ST} , podemos observar valores relativamente
 1556 bajos para todas las comparaciones; y solo encontramos diferencias significativamente
 1557 diferentes de cero para la comparación de plantación respecto a las invasiones 2012 y 2015, y
 1558 la invasión 1987 respecto de la invasión 2012 (Tabla 4.2).

1559

1560 **Tabla 4.1.** Diversidad genética para la plantación no quemada y tres cohortes de invasión post-fuego
 1561 (Invasiones 1987, 2012 y 2015) de *Pinus radiata* estimada mediante el número medio de alelos por
 1562 locus (N_a), número efectivo de alelos (N_e), heterocigosis observada (H_o) y esperada bajo la condición
 1563 de equilibrio Hardy Weinberg (H_E). Las comparaciones entre las diferentes cohortes se realizaron
 1564 aplicando Test de Friedman.

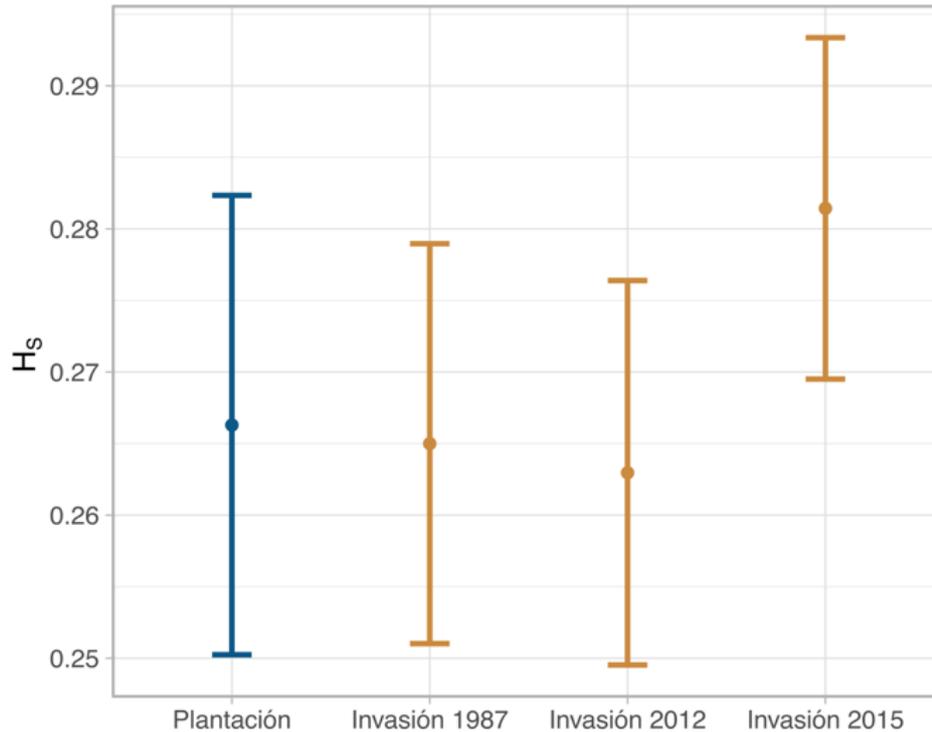
	N_a		N_e		H_o		H_E	
	Media	SE	Media	SE	Media	SE	Media	SE
Plantación	2,167	0,241	1,445	0,108	0,180	0,044	0,263	0,055
Invasión 1987	2,333	0,225	1,430	0,105	0,158	0,036	0,263	0,048
Invasión 2012	2,417	0,229	1,412	0,094	0,117	0,026	0,259	0,045
Invasión 2015	2,250	0,218	1,436	0,084	0,150	0,036	0,278	0,041
Test de Friedman	$p = 0,493$		$p = 0,989$		$p = 0,53$		$p = 0,979$	

1565



1566
 1567
 1568
 1569
 1570
 1571
 1572

Figura 4.3. Cambios (Media \pm SE) en el índice de fijación (F_{is}) para las 4 cohortes de *Pinus radiata* analizadas (plantación no quemada e invasiones post-incendios de 1987, 2012 y 2015). Se señalan mediante letras los grupos con diferencias estadísticas significativas, comparados de manera pareada por locus utilizando la prueba de Friedman y usando como test a *posteriori* la prueba de los rangos con signos de Wilcoxon.



1573 **Figura 4.4.** Media (\pm SE) de la diversidad genética intra-poblacional (H_s) para las 4 cohortes de *Pinus*
 1574 *radiata* analizadas (plantación no quemada e invasiones post-incendios de 1987, 2012 y 2015).
 1575

1576 **Tabla 4.2.** Comparaciones de a pares de la divergencia genética (F_{ST}) para la plantación no quemada
 1577 y tres cohortes de invasión post-fuego (Invasiones 1987, 2012 y 2015) de *Pinus radiata* analizadas en
 1578 este capítulo. Se señala con un asterisco aquellos F_{ST} significativamente diferentes de cero teniendo en
 1579 cuenta los intervalos de confianza (IC) calculados mediante remuestreo.
 1580

Cohorte	Invasión 1987	Invasión 2012	Invasión 2015
Plantación	0,011	0,0202 (*)	0,025 (*)
Invasión 1987	--	0,0136 (*)	0,0269
Invasión 2012		--	0,0417
Invasión 2015			--

1581
 1582 Las comparaciones de $F_{ST} - P_{ST}$ entre plantación e invasión post-fuego 1987
 1583 revelaron que los valores de P_{ST} para todas las variables cuantitativas analizadas fueron
 1584 significativamente superiores al valor de F_{ST} (Tabla 4.3). A su vez, dentro de las variables
 1585 cuantitativas analizadas la serotinia mostró mayores valores en la invasión respecto a la
 1586 plantación, mientras que las variables morfométricas fueron significativamente menores en la
 1587 invasión que en la plantación (capítulo 2).
 1588

1589 **Tabla 4.3.** Divergencia genética (F_{ST}) y divergencia fenotípica (P_{ST}) para cinco caracteres
 1590 morfológicos cuantitativos entre individuos de *Pinus radiata* de plantación no quemada y de invasión
 1591 reclutada luego del incendio de 1987. Se informan los intervalos de confianza (IC) superior e inferior
 1592 calculados por bootstrap.

	F _{ST}	P _{ST}					P _{ST} Promedio
		Altura	DAP	Diámetro de Copa	Área de Copa	Serotinia	
	0,011	0,923	0,978	0,963	0,959	0,566	0,878
IC 95% inf.	-0,001	0,812	0,966	0,940	0,933	0,228	0,776
IC 95% sup.	0,049	0,961	0,986	0,978	0,977	0,871	0,955

1593

1594 **4.4 Discusión**

1595 Las cohortes reclutadas post-fuego mostraron un aumento en la endogamia respecto de las
 1596 plantaciones no quemadas, con niveles de diversidad genética constantes y similares entre las
 1597 cohortes reclutadas post-fuego. Los valores de diversidad genética encontrados son altos,
 1598 incluso comparados con valores reportados para el rango nativo u Oceanía (Tabla 4.4). Como
 1599 se mencionó previamente, muchas especies exóticas se consideran una paradoja genética ya
 1600 que si bien presentan una diversidad genética menor que la de las poblaciones de origen,
 1601 toleran las diversas consecuencias negativas que esto produce (e.g. depresión por endogamia
 1602 que puede limitar la producción de propágulos y el crecimiento de la población) y se adaptan
 1603 con éxito a las nuevas condiciones o filtros abióticos y bióticos (Estoup et al., 2016; Ward,
 1604 Gaskin, y Wilson, 2019). Los resultados de este estudio muestran que, la diversidad genética
 1605 encontrada en las cohortes de plantaciones no quemadas e invasión post-fuego de *P. radiata*
 1606 no es menor que la de las poblaciones del rango nativo y por lo tanto no puede ser
 1607 considerada una paradoja genética. Los diferentes niveles de diversidad genética en el área de
 1608 distribución nativa y no nativa pueden deberse a diferencias en los acervos génicos utilizados
 1609 en los procesos de forestación iniciales. Estas diferencias deben ser consideradas con
 1610 cuidado, ya que se sustentan en una comparación realizada en base a información de trabajos
 1611 previos (Moran y Bell, 1987; Moran et al., 1988), con diferencias en el tamaño muestral,
 1612 número de replicas y donde no todas las enzimas usadas eran coincidentes. Además, en el
 1613 caso de las isoenzimas este tipo de comparaciones pueden llevar a sesgos ya que es una
 1614 técnica muy dependiente del observador y las condiciones bajo las que se la realizó.

1615

1616 **Tabla 4.4.** Diversidad genética intra-poblacional (HS) media para *Pinus radiata* en cuatro cohortes
 1617 del sitio de estudio (Argentina), siete poblaciones exóticas de Australia y Nueva Zelanda (Oceanía) y

1618 las cinco poblaciones nativas en Estados Unidos y México (Rango Nativo). En los tres casos el
1619 marcador molecular utilizado fueron isoenzimas.

Sitio	HS	Referencia
Argentina	0,266	(Presente capitulo)
Oceanía	0,117	(Moran y Bell, 1987)
Rango nativo	0,113	(Moran et al., 1988)

1620

1621 Si bien la pérdida de variación genética es lo más frecuente después de la
1622 introducción de una especie exótica (Dlugosch y Parker, 2008; Hagenblad et al., 2015), se
1623 han observado otros casos atípicos (como los encontrados en este estudio) en las plantas
1624 herbáceas *Bromus tectorum* y *Trifolium hirtum* (Novak y Mack, 2005). Encontrando
1625 poblaciones de *B. tectorum* en el oeste de Norteamérica y otras áreas de distribución exóticas
1626 que contienen más alelos y loci polimórficos que las poblaciones nativas de Eurasia (Novak y
1627 Mack, 2005). Algo similar ocurre con *T. hirtum*, ya que poblaciones exóticas de California
1628 muestran una mayor diversidad genética que la registrada en las poblaciones nativas
1629 euroasiáticas, presentando incluso una heterocigosis esperada cinco veces mayor las
1630 poblaciones introducidas que las poblaciones nativas (Novak y Mack, 2005). En el caso de *P.*
1631 *radiata*, su carácter serótino puede amortiguar el impacto de la deriva genética, ya que el
1632 banco aéreo actuaría como un reservorio genético, evitando la reducción de la diversidad
1633 genética durante la regeneración post-fuego. Esto le confiere una ventaja adaptativa frente a
1634 especies nativas de Patagonia como *Nothofagus dombeyi*, donde se han comprobado una
1635 reducción de la diversidad genética como producto de la deriva genética luego de incendios
1636 (Premoli y Kitzberger, 2005). Los bancos de semillas, tanto aéreos como de suelo, en zonas
1637 con poblaciones invasoras pueden contener valiosa información genética relativa a los
1638 procesos de invasión y por tanto actuar como reservorios frente a posibles disturbios
1639 (Fennell, Gallagher, Vintro, y Osborne, 2014; Mandák, Zákřavský, Mahelka, y Plačková,
1640 2012). También, los incendios frecuentes pueden actuar como una fuerte fuerza selectiva en
1641 el rango no nativo, cambiando eventualmente el acervo genético hacia frecuencias más altas
1642 de alelos que constituyen los genotipos más exitosos (que sobreviven a los incendios y se
1643 reproducen a una tasa más rápida). Ya que el marcador molecular utilizado en este estudio
1644 (isoenzimas) es de carácter neutral no nos permite realizar inferencias en este sentido, sin
1645 embargo esto pudo ser explorado gracias uso de técnicas genómicas que nos permiten
1646 diferenciar las señales adaptativa y neutral (capitulo 5)

1647 La comparación $F_{ST} - P_{ST}$ indica una posible selección diversificadora mediada por
1648 fuego para cinco caracteres cuantitativos (i.e. serotinia y cuatro variables relacionadas al
1649 tamaño) de *P. radiata*, en solo una generación dentro de un área de ocurrencia en su rango
1650 exótico (Tabla 4.3). Resultados similares, en cuanto al grado de serotinia han sido observados
1651 en *Pinus halepensis* (Hernández-Serrano et al., 2013, 2014) donde poblaciones con régimen
1652 de incendios recurrentes son más serótinas que aquellas con incendios infrecuentes;
1653 encontrando además una menor divergencia neutral (F_{ST}) que cuantitativa (Q_{ST}) entre
1654 procedencias, lo que sugiere el impacto de selección diversificadora para este carácter. A
1655 diferencia del caso de *P. halepensis halepensis* (Hernández-Serrano et al., 2013, 2014), donde
1656 la asociación de las poblaciones con su régimen de incendios es de larga data, en este trabajo
1657 encontramos que en *P. radiata* los cambios se produjeron en solo una generación, por lo que
1658 podría ser considerado un proceso de adaptación rápida. Estos procesos de adaptación local
1659 en rasgos relacionados con la historia de vida y la aptitud, como es el caso de la serotinia, han
1660 sido observados también para otras especies invasoras, aunque no en un periodo de tiempo
1661 tan corto (Chun et al., 2011; Maron et al., 2004). Esta capacidad para adaptarse localmente
1662 podría tratarse de un importante mecanismo determinante del potencial invasivo de una
1663 especie. En estos casos donde se busca estudiar el potencial de adaptación y la capacidad de
1664 invadir de una especie exótica, es de gran importancia estudiar los rasgos cuantitativos, y no
1665 solo la variación neutral que carecería de valor adaptativo intrínseco *per se*. Esto se debe a
1666 que los patrones de diversidad genética revelados podrían reflejar procesos estocásticos o
1667 cuellos de botella pasados o históricos, siendo bastante diferentes de los patrones que
1668 determinarían el éxito futuro y la viabilidad a largo plazo de las poblaciones.

1669 En las coníferas la heterocigosis generalmente tiende a aumentar con la edad,
1670 teniendo los rodales maduros un exceso y las plántulas un déficit de heterocigotas (Plessas y
1671 Strauss, 1986). El exceso de homocigosis en las semillas y plántulas en *P. radiata*
1672 probablemente se debe a la endogamia (Ledig, Hodgskiss, y Jacob-Cervantes, 2002). Este
1673 mismo patrón fue reportado en otras especies de pinos en las cuales se vio además que, al
1674 envejecer los rodales, los niveles de endogamia disminuyen. Esto último probablemente
1675 debido a una selección que favorezca a los heterocigotas con el paso del tiempo (Bower y
1676 Aitken, 2011; Bower y Aitken, 2007; Politov, Belokon', y Belokon', 2006). Sin embargo,
1677 esto no es completamente consistente con lo que se encontró en este trabajo. Aunque
1678 observamos un incremento en el F_{IS} en las cohortes reclutadas post-fuego, no encontramos
1679 diferencias en los niveles de heterocigosis entre los rodales maduros (plantación e invasión

1680 1987) y las plántulas (invasión 2015). Entonces, el incremento en los valores de F_{IS} en las
1681 sucesivas generaciones post-fuego podría deberse a la endogamia entre los individuos
1682 remanentes que sobreviven a los incendios y son los parentales de los individuos reclutados
1683 post-fuego. Por otro lado, como ya se mencionó, gracias a la producción de conos serótinicos,
1684 esta especie acumula semillas producto de múltiples cruzamientos en sucesivos años, que se
1685 liberan masivamente y se establecen después del fuego y contribuyen a mantener la
1686 diversidad genética incluso después de eventos devastadores como los incendios.

Capítulo 5

Variación genética adaptativa de *Pinus radiata*

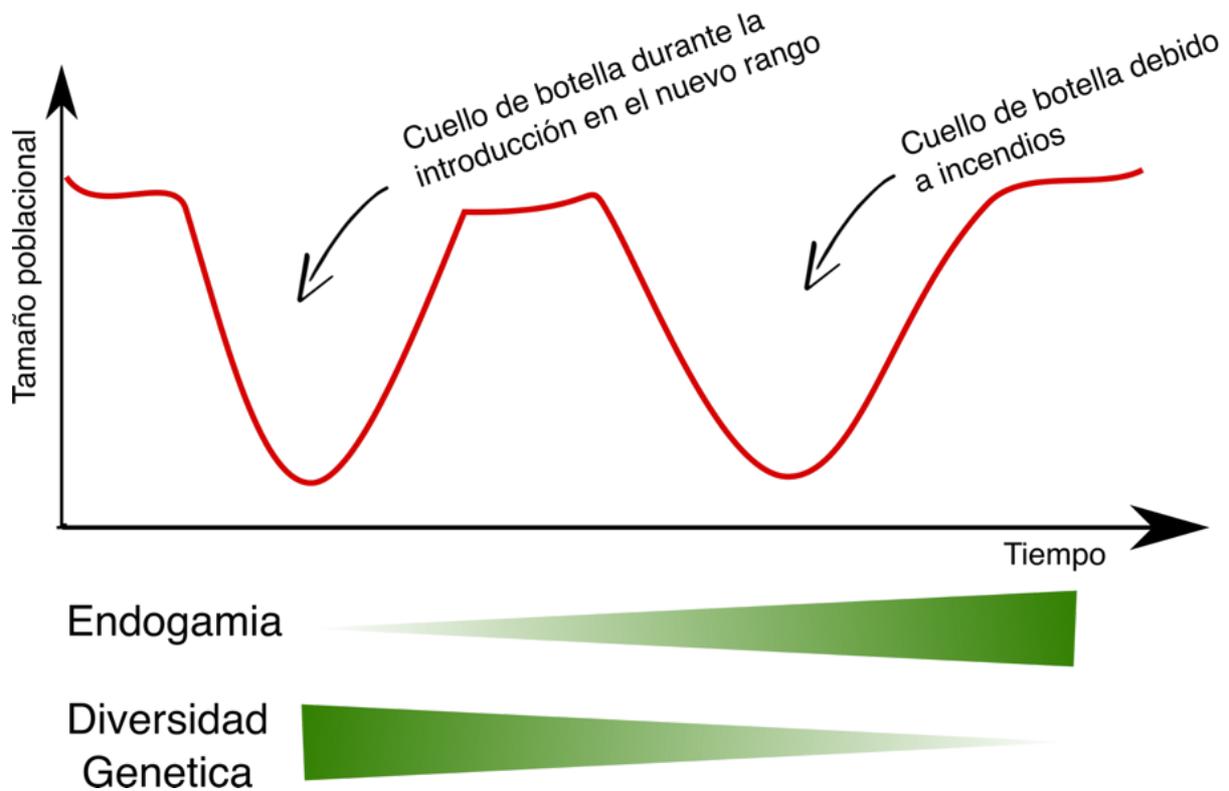
1687
1688
1689
1690
1691
1692
1693
1694
1695
1696
1697
1698
1699
1700
1701
1702
1703
1704
1705
1706
1707
1708
1709
1710
1711
1712
1713
1714
1715
1716
1717
1718
1719

5.1 Introducción

En su libro “*El origen de las especies*” Charles Darwin (1859) propuso el mecanismo evolutivo de la selección natural de descendencia con modificación según el cual “la variación es una característica de las poblaciones naturales y cada población produce más progenie de lo que su entorno puede manejar, por lo tanto aquellos individuos con la mejor aptitud genética para responder al medio ambiente que ocupan producirán proporcionalmente más progenie y que competirán exitosamente en ese entorno y estos descendientes tendrán una mayor representación en las generaciones posteriores”. Es decir que aquellos genotipos que posean un mejor ajuste (i.e. aptitud) a las condiciones ambientales estarán más representados en las poblaciones. Más recientemente, y de manera contrapuesta (pero no excluyente) a la selección natural, Motoo Kimura propuso su teoría neutralista de la evolución molecular (1983) donde establece que la gran mayoría de los cambios evolutivos son causados por fuerzas evolutivas neutrales como la deriva génica. Según esta teoría los cambios en las poblaciones se producen por modificaciones aleatorias de las frecuencias alélicas de una población las cuales tienden a ser de mayor magnitud en poblaciones de menor tamaño. Estas fuerzas evolutivas (i.e. deriva génica y selección natural) pueden operar de manera individual o conjunta durante introducción, naturalización y expansión del rango en el proceso de invasión de una especie exótica (Capítulo 1, Sakai et al. 2001; Lee 2002; Wares et al. 2005).

Durante la introducción en un nuevo rango, es de esperar que debido a los efectos asociados a eventos fundadores (formación de una nueva población a partir de un número inicial de individuos muy reducido), como cuellos de botella demográficos y genéticos, las poblaciones presenten reducción de la diversidad genética por acción de la deriva genética e incrementos en la endogamia debido a una mayor probabilidad de cruzamientos consanguíneos en poblaciones pequeñas (Figura 5.1). Como se mencionó en el Capítulo 4, se considera como paradoja genética de las invasiones (Estoup et al., 2016; Ward et al., 2019) a aquellas especies exóticas que pese a presentar una reducida diversidad genética son exitosas durante la invasión y se adaptan a las nuevas condiciones y/o filtros abióticos y bióticos (Estoup et al., 2016; Ward et al., 2019). Es decir, toleran las consecuencias perjudiciales de la escasa diversidad como menor capacidad de responder a condiciones ambientales variables

1720 y/o sufrir los efectos de la depresión por endogamia (i.e. consanguinidad) que disminuye la
 1721 aptitud de los individuos por ejemplo limitando la viabilidad de la progenie y el crecimiento
 1722 de la población. Sin embargo, en contra de lo esperado, muchos casos de invasiones
 1723 biológicas no muestran evidencia de reducida diversidad genética (Holanda 2000; Kolbe y
 1724 otros 2004; Golani y otros 2007; Dlugosch y Parker 2008; Geller et al. 2010). Asimismo,
 1725 algunas poblaciones exóticas no son paradójicas en todos los niveles; tal es el caso de la
 1726 aparente paradoja que se observa en poblaciones exóticas con baja diversidad para
 1727 marcadores neutrales pero que mantienen una alta variación genética en rasgos con valor
 1728 adaptativo (Estoup et al. 2016).



1729 **Figura 5.1.** Tamaño poblacional en función del tiempo para una población exótica hipotética que
 1730 sufre dos cuellos de botella; el primero durante el proceso de introducción en el nuevo rango y el
 1731 segundo frente a un disturbio como el fuego. Luego de los cuellos de botella se espera una
 1732 disminución de la diversidad genética y un incremento de la endogamia.
 1733
 1734

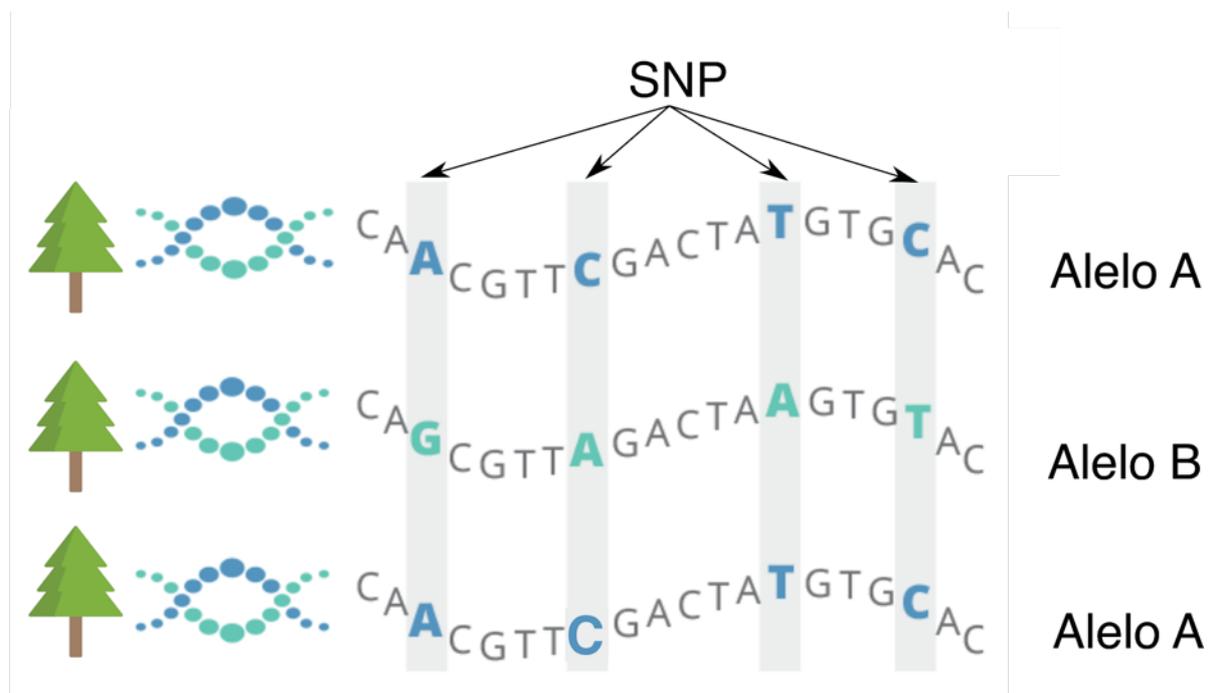
1735
 1736 Las especies invasoras que han sido transportadas a través de barreras biogeográficas
 1737 están expuestas y deben responder a nuevos filtros ambientales, climáticos y bióticos y estos
 1738 nuevos entornos pueden considerarse como nuevas fuerzas selectivas (Chown et al. 2015;
 1739 Dlugosch et al. 2015). A su vez estos filtros, entre los que encontramos los disturbios, pueden

1740 actuar como cuellos de botella (Figura 5.1) modificando el acervo genético de la población
1741 invasora (Prentis et al., 2008). Los cambios en el régimen selectivo que actúa sobre la especie
1742 invasora pueden incluir tanto una mayor selección para los genotipos mejor adaptados al
1743 nuevo entorno abiótico, como una relajación para la defensa debido a la ausencia de
1744 enemigos naturales y patógenos (Hanfling y Kollmann 2002). Estos cambios evolutivos en
1745 las poblaciones invasoras se producen a lo largo de escalas de tiempo relativamente cortas y
1746 se consideran cada vez más como una oportunidad única para explorar diversos procesos
1747 ecológicos y evolutivos rápidos (Lee 2002; Lawson Handley et al. 2011). Concretamente, la
1748 identificación de los genes que subyacen a estas transformaciones se está convirtiendo en uno
1749 de los temas fundamentales de la biología evolutiva (Shimada et al. 2011; Wang et al. 2012).
1750 Estos cambios evolutivos pueden impactar sobre las características genéticas favoreciendo el
1751 establecimiento y reproducción diferencial de genotipos particulares durante la invasión.
1752 Como consecuencia, estas fuerzas neutras y/o selectivas pueden contribuir a la
1753 diferenciación genética de las poblaciones exóticas con respecto a las de su rango nativo
1754 (Prentis et al., 2008). En este contexto, el éxito de la invasión de muchas especies puede
1755 depender más de su capacidad para responder a nuevos regímenes de selección y/o cuellos de
1756 botella demográficos y genéticos que de una amplia tolerancia fisiológica o plasticidad a las
1757 nuevas condiciones ambientales y/o climáticas en el rango introducido (Lee, 2002).

1758 Realizar estudios genómicos de manera comparativa entre rangos de distribución nativos
1759 y exóticos, así como en presencia de diversos filtros o factores de selección (e.g. disturbios
1760 como el fuego) es de gran importancia en el estudio genético-evolutivo de especies invasoras.
1761 Ya que esto nos permite no solo entender las características intrínsecas de las especies que se
1762 convierten en invasoras, sino también estudiar e identificar tanto los genes o regiones
1763 genómicas particulares como los procesos evolutivos involucrados en un proceso invasión. El
1764 advenimiento de los métodos de secuenciación de siguiente generación (next generation
1765 sequencing NGS en inglés) y genotipado de alto rendimiento y su aplicación han brindado
1766 nuevas oportunidades para abordar cuestiones clave relacionadas con la genética de distintas
1767 especies no modelo. Estas son especies que habitan ambientes naturales y que generalmente
1768 no han sido objeto de numerosos estudios de base genética como la especie *Arabidopsis*
1769 *thaliana* considerada la especie de planta vascular modelo por excelencia en cuestiones de
1770 genética y biología molecular. Más particularmente, enfoques moleculares como el
1771 genotipado por secuenciación (genotyping by sequencing GBS en inglés) (Elshire et al.
1772 2011), permiten genotipar (i.e. asignar genotipos) un número razonablemente grande de

1773 individuos para varios miles de marcadores moleculares, incluso en ausencia de un genoma
1774 de referencia para las especies de interés. Esto no solamente contribuye a localizar genes
1775 asociados a la capacidad de invasión (Estoup et al. 2016) como también analizar mecanismos
1776 adaptativos que permitan una rápida respuesta a las condiciones novedosas encontradas en el
1777 rango de distribución invadido.

1778 Dentro de una misma población con relativa homogeneidad genotípica, podemos
1779 encontrar cambios sutiles en la secuencia de ADN que afectan únicamente a un nucleótido
1780 (Figura 5.2). Estos cambios denominados polimorfismos de nucleótido único (*Single*
1781 *Nucleotide Polimorphisim* [SNP] en inglés) son un tipo de polimorfismo que producen una
1782 variación en un solo par de bases. Los SNPs generalmente se originan de errores de
1783 replicación del ADN durante la división celular de las células germinales (Thavamanikumar
1784 et al. 2011). Si bien son abundantes y están ampliamente distribuidos en los genomas, para
1785 ser usados como marcadores genéticos se requiere que uno de sus alelos esté presente en al
1786 menos el 1% de la población (Brookes 1999). Los SNPs pueden ocurrir tanto en regiones
1787 codificantes como no codificantes. Si un SNP se produce dentro de un gen, entonces se
1788 considera que ese gen tiene más de un alelo (Figura 5.2). En estos casos, los SNP pueden dar
1789 lugar a variaciones en la secuencia de aminoácidos, y muchas las diferentes variantes pueden
1790 llevar a cambios en la aptitud de los individuos; lo que hace que estas variantes puedan estar
1791 sujetas a distintas presiones selectivas. Entonces, aquellos SNPs que por estar localizados en
1792 zonas codificantes de genes candidatos para caracteres adaptativos están potencialmente
1793 afectados por la selección natural son considerados como marcadores adaptativos. Identificar
1794 y clasificar los SNPs según si se encuentran o no bajo selección nos permite diferenciar las
1795 señales correspondientes a fuerzas neutrales y adaptativas.



1796
1797

Figura 5.2. Esquema gráfico para tres individuos hipotéticos con diferencias en Polimorfismos de Nucleótido Único. Se señalan en gris lo sitios polimórficos, i.e. aquellos sitios donde existen diferencias entre individuos. Puede observarse que dos de los individuos presentan la variante alélica A y el otro individuo difieren en los sitios de SNP y presenta la variante alélica B.

1801

1802

Algunas coníferas exóticas, como *Pinus radiata*, presentan una serie de características adaptativas que les permiten sobrevivir y reproducirse después de un incendio (Keeley, Pausas, et al., 2011; Pausas, 2012) confiriéndoles una ventaja competitiva frente a especies nativas luego de este disturbio en Patagonia. Una de estas características adaptativas frente a incendios es la serotinia, que consiste en conos que permanecen cerrados al madurar con la consiguiente formación de un banco de semillas aéreo (Cap. 2) hasta que la influencia de un factor externo como el fuego determina la apertura simultánea de los mismos y la liberación masiva de semillas las cuales poseen gran tolerancia germinativa frente a las condiciones post-fuego (Cap. 3). Los resultados de los capítulos dos y tres muestran que en sólo una generación de invasión post-fuego los niveles de serotinia y el vigor temprano de las plántulas durante el reclutamiento en condiciones post-fuego aumentan respecto a las plantaciones no quemadas.

1814

En este capítulo se analiza la hipótesis de que las poblaciones exóticas e invasoras como *Pinus radiata*, en ecosistemas propensos a incendios, pueden diferir genéticamente respecto de sus poblaciones nativas, producto de efectos fundadores, deriva genética y procesos selectivos durante su introducción, establecimiento y en presencia/ausencia de

1817

1818 incendios en el área invadida. Para esto evaluamos la estructura y diversidad genética, así
1819 como evidencias de selección sobre loci particulares asociados a su rango de distribución
1820 (nativo – exótico) y cohortes que en el rango invadido fueron reclutadas con y sin fuego (CF
1821 y SF) también mencionadas en este capítulo como post-fuego o en ausencia de incendios
1822 respectivamente.

1823

1824 5.2 Materiales y Métodos

1825

1826 5.2.1 Diseño Muestral

1827 Las comparaciones realizadas en este capítulo incluyeron:

- 1828 i) Rango = nativo y exótico. Incluyendo poblaciones del rango nativo de *P.*
1829 *radiata* (N=10) y de Puerto Patriada (N=40) donde esta especie es exótica e
1830 invasora (Figura 5.3)
- 1831 ii) Cohortes en el rango exótico = sin y con fuego. Donde las cohortes de Puerto
1832 Patriada en ausencia de fuego consistieron de individuos introducidos (adultos
1833 de la plantación original N=10) y plántulas establecidas naturalmente bajo el
1834 dosel (N=10, Figura 5.3) y las cohortes post-fuego consistieron de individuos
1835 adultos post-fuego establecidos luego del incendio 1987 (N=10) y plántulas
1836 (N=10) del post-fuego 2015; Figura 5.3).

1837 Durante el verano de 2018 recolectamos al azar muestras de follaje fresco de un total de
1838 10 individuos para cada una de las cohortes estudiadas de Puerto Patriada. Colectamos
1839 muestras de individuos separados por al menos 30 metros para minimizar la probabilidad de
1840 muestrear individuos genéticamente similares. En el año 2019 colectamos muestras de 10
1841 individuos adultos dentro del rango nativo de la especie. Estos individuos provienen cada uno
1842 de 10 localidades diferentes distanciadas ~5 km entre sí, de la costa de California.

1843



1844 **Figura 5.3.** Escenarios representativos de las distintas situaciones muestreadas e incluidas en los dos
1845 tipos de comparaciones realizadas en este capítulo para *Pinus radiata*, agrupando a los individuos
1846 diferencialmente en: i) gris claro: por rango (nativo y exótico) y ii) gris oscuro: por cohortes (post-
1847 fuego o libre de incendios).

1848

1849 5.2.1 Extracción de ADN, armado de librerías y secuenciación

1850 La extracción de ADN de alta calidad se realizó siguiendo el protocolo propuesto por Diaz,
1851 Mathiasen, y Premoli (2020) y la integridad del ADN genómico se evaluó mediante
1852 electroforesis en gel de agarosa al 1%. Posteriormente cuantificamos el ADN en un
1853 espectrofotómetro NanoDrop™ 2000, y evaluamos su pureza teniendo en cuenta las
1854 relaciones de absorbancia 260/280 que indica presencia de proteínas, fenol y otros
1855 contaminantes que pueden ser leídos a 280 nm; así como la relación 260/230, que indica la
1856 presencia de contaminantes como EDTA y carbohidratos que absorben a 230 nm. Debido a
1857 las altas concentraciones de ADN detectadas mediante espectrofotometría realizamos una
1858 primera dilución, para posteriormente cuantificar por un método de mayor sensibilidad con
1859 un fluorómetro Qubit (Invitrogen). Luego de la cuantificación mediante flurometría diluimos
1860 todas las muestras a una concentración final de 20 ng/ul, y las enviamos a la Plataforma de
1861 análisis genómicos de la Universidad de Laval (Canadá) donde se realizó el armado de la
1862 librería genómica, mediante una digestión con dos enzimas de restricción: SbfI y MspI. Las
1863 enzimas de restricción son enzimas que reconoce secuencias específicas en el ADN y hacen
1864 cortes de la doble cadena cerca de estas secuencias, se considera que evolucionaron como un
1865 mecanismo de defensa que le permitía a las bacterias degradar el ADN exógeno
1866 potencialmente nocivo (por ejemplo, ADN de virus que infectan bacterias). En biología
1867 molecular las enzimas de restricción son ampliamente utilizadas ya que nos permiten obtener
1868 fragmentos de ADN con extremos conocidos (debido a que reconocen una secuencia
1869 específica) y de un tamaño relativamente regular, esto es de gran utilidad en diversas técnicas
1870 de ingeniería genética y sobre todo para las técnicas de secuenciamiento de siguiente
1871 generación. En el proceso de armado de la librería genómica se añadieron códigos de barras
1872 específicos que permitieron identificar a cada individuo dentro de la librería. Esta librería fue
1873 optimizada para un secuenciación de tipo *Paired-End*, que permite secuenciar ambos
1874 extremos de un fragmento de ADN y generar datos de secuencia de alta calidad, alineables y
1875 de mayor longitud. Las muestras fueron secuenciadas en un solo carril de Illumina HiSeq

1876 4000, en el Laboratorio de Secuenciación Genómica de *Genome Quebec Inc.* en Montreal
1877 (Canadá).

1878

1879 5.2.3 Filtrado de secuencias, genotipado y análisis de SNPs

1880 Como no contamos con un genoma de referencia de *Pinus radiata*, se realizó un ensamblado
1881 *de novo* de las secuencias mediante las herramientas de análisis genómicos disponibles en la
1882 *pipeline* Stacks (Catchen, Hohenlohe, Bassham, Amores, y Cresko, 2013). Una vez obtenidos
1883 los resultados de secuenciación analizamos la calidad de los datos mediante el programa
1884 FastQC (Andrews, 2015). Luego de corroborar que las secuencias obtenidas poseían buena
1885 calidad procedimos a separarlas en muestras para cada individuo particular en un proceso
1886 denominado demultiplexado, usando “Raw Reads” el primer módulo del pipeline de trabajo
1887 Stacks (Catchen et al., 2013). Este módulo, enfocado en la limpieza y filtrado de datos
1888 genómicos, nos permitió identificar los códigos de barras aplicados y los sitios de corte para
1889 ambas enzimas (SbfI y MspI) pudiendo obtener por separado las secuencias de cada uno de
1890 los individuos. En este primer paso también descartamos las lecturas que tenían baja calidad,
1891 contaminación de adaptadores o no presentaban las secuencias correspondientes a los códigos
1892 de barras o los sitios de corte de las enzimas de restricción. Para todos los fragmentos
1893 conservados también eliminamos la secuencia combinada del código de barras más el sitio de
1894 restricción. Siguiendo con el flujo de trabajo propuesto en Stacks (Catchen et al., 2013)
1895 acoplamos las lecturas *paired-end* para cada fragmento, realizamos la construcción de loci
1896 putativos (ustacks), creamos un catálogo de loci (cstacks), y cotejamos cada una de las
1897 muestras con ese catálogo (sstacks).

1898

1899 5.2.4 Diversidad genética y estructura poblacional

1900 Calculamos diversos parámetros de diversidad y estructura genética mediante “populations”,
1901 el último módulo del pipeline Stacks, similares a los usados en el capítulo 3. Estos fueron:
1902 número de alelos privados i.e. alelos exclusivos de una población y compartidos con las otras
1903 poblaciones (AP), diversidad haplotídica (DH), diversidad nucleotídica (II), grado de
1904 polimorfismo (número de sitios polimórficos [SP] y porcentaje de loci polimórficos [%P]),
1905 heterocigosis observada (H_O) y heterocigosis esperada bajo el supuesto de equilibrio Hardy -
1906 Weinberg (H_E). La diversidad haplotídica mide la singularidad de un haplotipo en una
1907 población dada en relación con el tamaño muestral, mientras que la diversidad nucleotídica es
1908 usada para medir el grado de polimorfismo en una población y se define como el número

1909 medio de diferencias de nucleótidos por sitio (Nei and Li. 1979). También, calculamos el
1910 coeficiente de endogamia o índice de fijación dentro de la población (F_{IS}) para cada una de
1911 las cohortes y el grado de diferenciación genética entre distintas cohortes con el índice F_{ST} de
1912 Wright (Wright, 1951).

1913

1914 5.2.6 Marcadores adaptativos

1915 Con el fin de identificar aquellos SNP que muestran evidencias de selección, identificamos
1916 los valores atípicos de F_{ST} . Para esto, utilizamos el método de verosimilitud bayesiano
1917 mediante MCMC (reversible-jump Monte Carlo Markov chain) en el software BayeScan
1918 (Foll, 2012). Este método utiliza componentes de los coeficientes de F_{ST} específicos para la
1919 población y el locus y supone que las frecuencias alélicas siguen una distribución de
1920 Dirichlet. La selección se introduce mediante la descomposición de los coeficientes de F_{ST}
1921 en un componente exclusivo de la población (beta), compartido por todos los loci y un
1922 componente específico del locus (alfa) compartido por todas las poblaciones. La no
1923 neutralidad en un locus determinado se asume cuando el componente de F_{ST} específico del
1924 locus es necesario para explicar el patrón de diversidad observado (alfa significativamente
1925 diferente de 0). Un valor positivo del alfa sugiere selección diversificadora, mientras que
1926 valores negativos sugieren selección estabilizadora. En el algoritmo implementado en
1927 BayeScan, utilizamos 10 repeticiones de 1000 iteraciones cada una para ajustar la
1928 distribución y seleccionar aquellos loci atípicos.

1929 Finalmente, asociamos todos los loci atípicos, i.e. bajo selección, con genes
1930 codificantes especialmente de especies del género *Pinus* y coníferas utilizando la base de
1931 datos GenBank, mediante la herramienta de alineamiento de secuencias BLAST (Mount,
1932 2007), y con las bases de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI),
1933 mediante su herramienta de búsqueda de similitud de secuencias (Madeira et al., 2019). Esta
1934 asociación se realizó mediante el alineamiento de cada una de nuestras secuencias con las
1935 secuencias presentes en ambas bases de datos en búsqueda de similitudes. Solo consideramos
1936 aquellas asociaciones con una gran similitud entre nuestra secuencia y la arrojada por la base
1937 de datos, tomando solo aquellas coincidencias con valores de $E \leq 0,001$, con lo cual la
1938 probabilidad de obtener el mismo resultado por azar es menor al 0,001. Cuando encontramos
1939 secuencias coincidentes, las clasificamos en genes codificantes de proteínas con producto
1940 conocido y aquellas correspondientes a RNA mensajero pero cuyo producto aún no ha sido
1941 identificado.

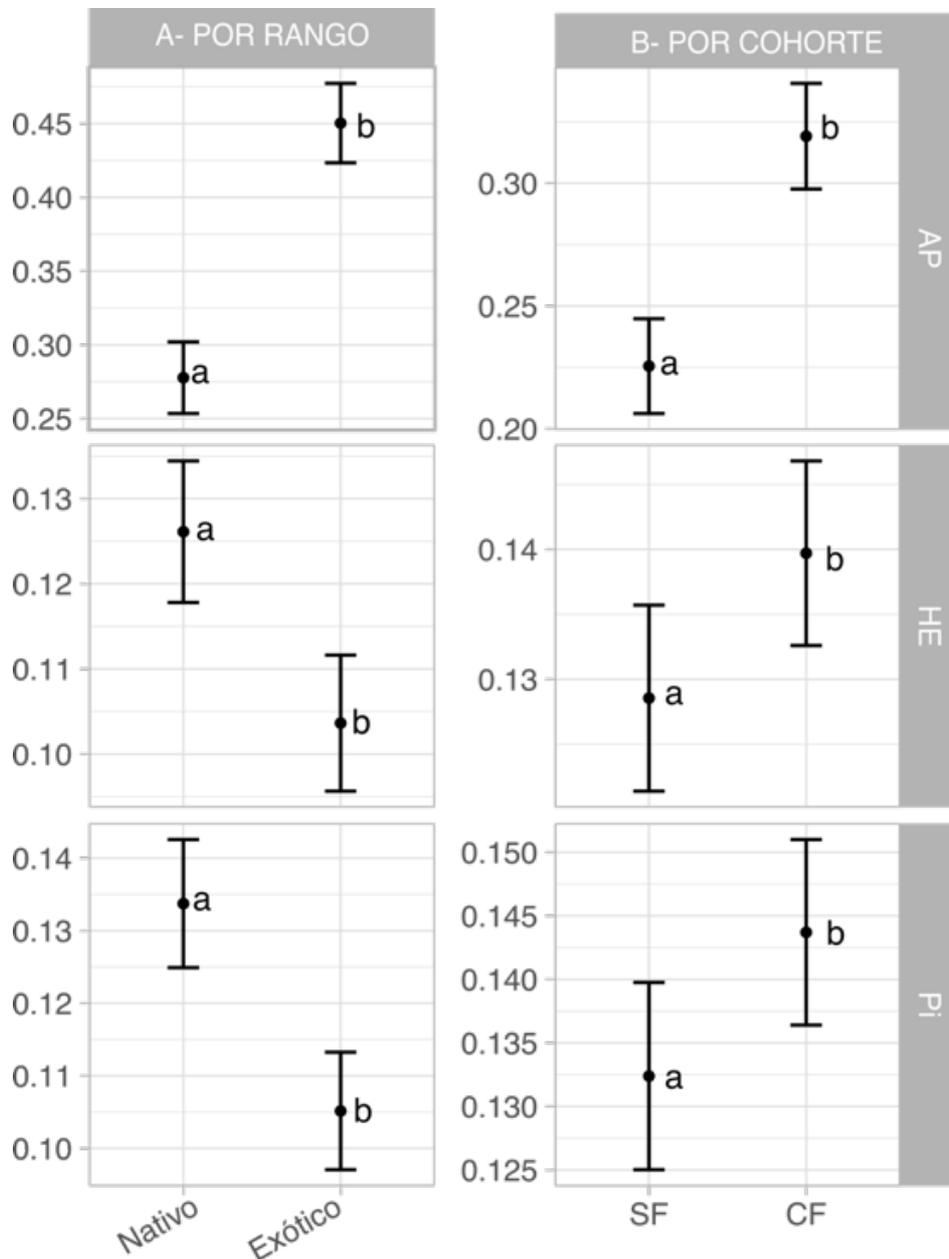
1942

1943 **5.3 Resultados**

1944 Obtuvimos alrededor de 750 millones de secuencias totales (en ambos sentidos de
1945 secuenciación *paired-end*). De estos 750 millones de secuencias iniciales, descartamos ~ 35
1946 millones que no coincidieron con ninguno de los códigos de barra asignados a cada
1947 individuo, ~ 2 millones que presentaron baja calidad y ~ 83 millones que no presentaron
1948 coincidencias para los sitios de restricción (i.e. regiones reconocidas por las enzimas de
1949 restricción). Luego de estos pasos de depuración retuvimos 621.977.175 de secuencias en
1950 ambos sentidos de secuenciación. Luego de unir las secuencias de ambos sentidos para cada
1951 región obtuvimos un total 460.930 regiones, que a partir de ahora serán consideradas como
1952 posibles loci. Realizamos un filtrado riguroso de estos loci, quedándonos en el caso de la
1953 comparación por rangos con aquellos que se encontraban presentes en ambos rangos (nativo
1954 y exótico) y en el caso de la comparación por cohortes con aquellos que se encontraban
1955 presentes en los dos tipos de cohortes analizadas. Además, solo se retuvieron aquellos loci
1956 presentes en al menos el 80 % de los individuos de cada tipo de cohorte o región según
1957 corresponda. Esto nos dio un total de 26.406 sitios secuenciados para las comparaciones entre
1958 rangos y 25.417 sitios secuenciados para las comparaciones entre tipos de cohortes, todos con
1959 buena calidad y con gran representatividad a lo largo de todos los individuos estudiados. Por
1960 último, realizamos un filtrado para quedarnos solo con aquellos loci putativos que
1961 presentaban variabilidad, i.e. loci polimórficos, obteniendo un total de 171 loci finales para
1962 los rangos y 162 loci finales para las cohortes, que presentaron una longitud promedio de 140
1963 pb. Al analizar los valores atípicos de F_{ST} se encontraron un total de 15 loci para las
1964 comparaciones entre rangos y 14 loci para las comparaciones entre tipos de cohortes, que
1965 podrían encontrarse bajo selección.

1966 Cuando se analizaron todos los loci el rango exótico mostró una mayor proporción de
1967 alelos privados (AP) que el rango nativo (exótico: 0,45; nativo: 0,27; $p < 0,001$; Figura 5.4),
1968 mientras que dentro del rango exótico las cohortes reclutadas post-fuego mostraron a su vez
1969 una mayor proporción de alelos privados que aquellas sin fuego (CF: 0,32; SF: 0,22; $p <$
1970 $0,001$; Figura 5.4). A su vez la heterocigosis esperada (H_E) total fue menor en el rango
1971 exótico que en el nativo (exótico: 0,103; nativo: 0,136; $p < 0,001$; Figura 5.4), y dentro del
1972 exótico fue mayor en las cohortes reclutadas post-fuego (CF: 0,138; SF: 0,129; $p < 0,05$;
1973 Figura 5.4). Un patrón similar al de H_E se encontró en la diversidad nucleotídica (Π) total con
1974 menores valores en el rango exótico que el nativo (exótico: 0,105; nativo: 0,133; $p < 0,001$;

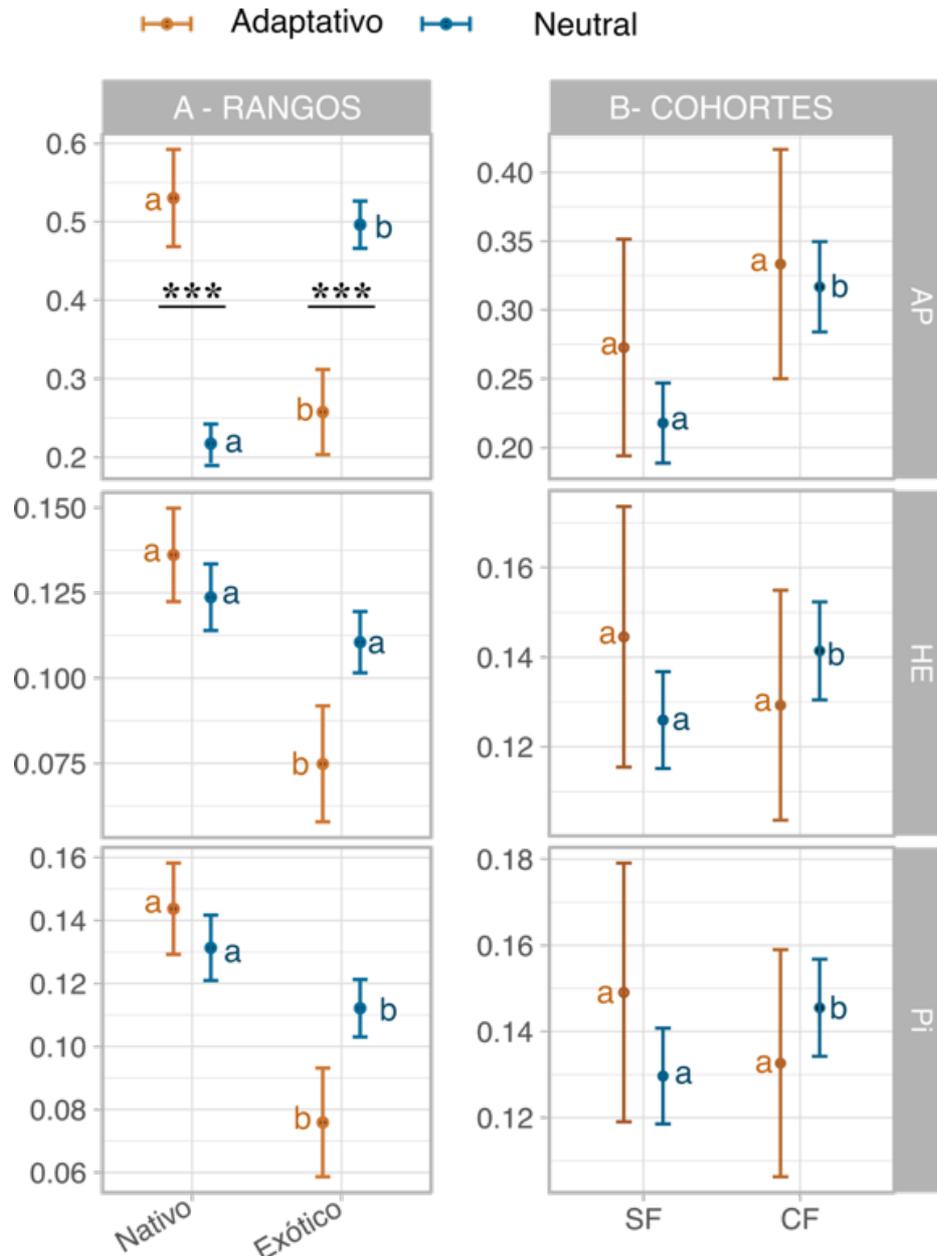
1975 Figura 5.4), dentro del rango exótico los mayores niveles de diversidad nucleotídica se
 1976 encontraron también en las cohortes reclutadas pos-fuego (CF: 0,143; SF: 0,132; $p < 0,05$;
 1977 Figura 5.4).



1978 **Figura 5.4.** Índices de diversidad genética para loci totales, entre (A) rangos [nativo y exótico] y (B)
 1979 entre cohortes sin fuego [SF] y reclutadas post-fuego [CF] de *Pinus radiata*. Comparaciones de
 1980 la varianza en el número de alelos privados (AP), heterocigosis esperada (HE) y diversidad
 1981 nucleotídica (Pi = P). Las letras representan significancia estadística en análisis de la varianza
 1982 (ANOVA) y comparaciones múltiples por pares mediante test de T pareado por locus.
 1983
 1984

1985 Cuando se analizaron por separado las señales correspondientes a loci adaptativos y
1986 neutrales respecto de la proporción de alelos privados (AP) para la comparación de rangos, se
1987 observó en el rango exótico una mayor AP para los loci neutrales (exótico: 0,49; nativo: 0,21;
1988 $p < 0,001$; Figura 5.5) y una menor AP para los loci adaptativos (exótico: 0,25; nativo: 0,53;
1989 $p < 0,001$; Figura 5.5). A su vez, dentro del rango exótico la tendencia fue similar tanto para
1990 neutrales (CF: 0,31; SF: 0,21; $p < 0,001$; Figura 5.5) como para adaptativos (CF: 0,33; SF:
1991 0,27; Figura 5.5) con mayores valores en el caso de las cohortes reclutadas post-fuego, pero
1992 con diferencias estadísticamente significativas solo en el caso de los neutrales. Al comparar
1993 las proporciones de alelos privados entre adaptativos y neutrales en un mismo rango o tipo de
1994 cohorte se observaron diferencias estadísticamente significativas tanto dentro del rango
1995 nativo como el exótico, pero no para el caso de las cohortes dentro del rango exótico (Figura
1996 5.5). Ambos conjuntos de individuos analizados tanto del rango nativo como exótico y de las
1997 distintas cohortes sin y con fuego presentan una alta proporción de alelos únicos ($\geq 25\%$ del
1998 total analizado). De la misma manera, al desglosar la proporción de alelos privados según
1999 loci adaptativos y neutrales en todas las comparaciones realizadas se observa un efecto
2000 significativo de la selección natural y de la deriva y el aislamiento ya que más del 50%
2001 resultan únicos.

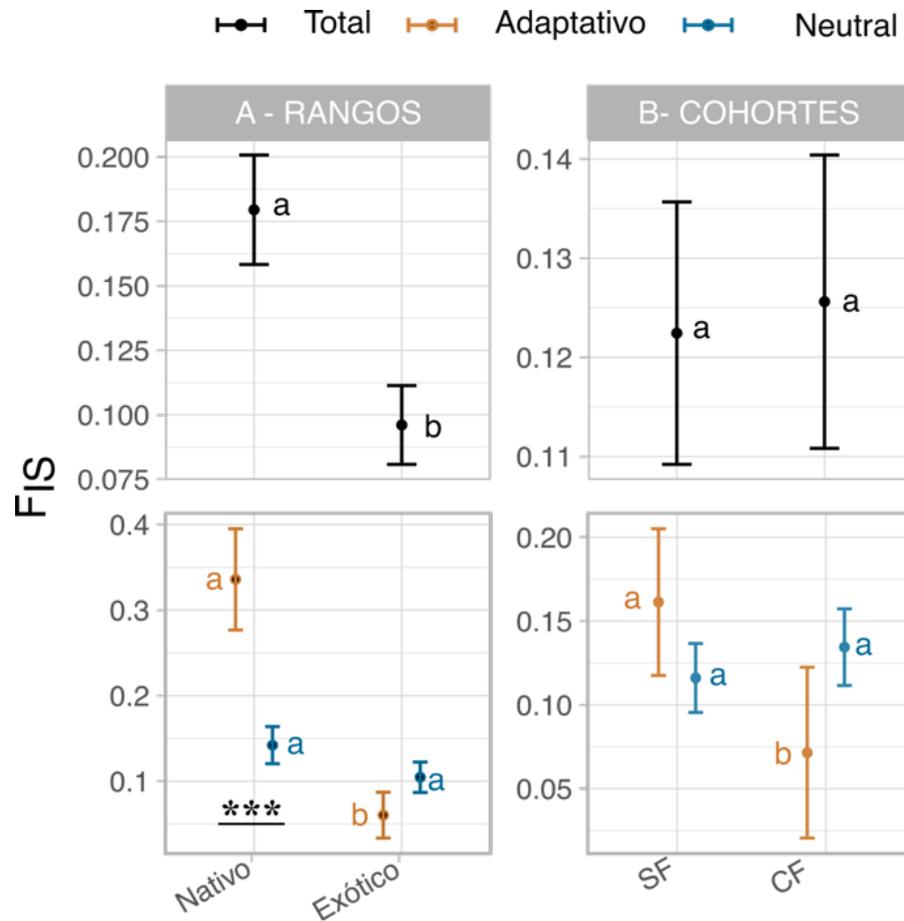
2002 En las comparaciones entre rangos la heterocigosis esperada (H_E) para los loci
2003 adaptativos fue significativamente menor en el rango exótico respecto al nativo (exótico:
2004 0,07; nativo: 0,13; $p < 0,001$; Figura 5.5), mientras que no se encontraron diferencias para los
2005 loci neutrales (exótico: 0,11; nativo: 0,12; Figura 5.5). Dentro del rango exótico no se
2006 observaron diferencias significativas en la H_E para loci adaptativos (CF: 0,13; SF: 0,14;
2007 Figura 5.5), pero en el caso de los loci neutrales la invasión reclutada post-fuego mostró
2008 mayores valores (CF: 0,14; SF: 0,12; $p < 0,05$; Figura 5.5). No se observaron diferencias al
2009 comparar la H_E entre adaptativos y neutrales en un mismo rango o tipo de cohorte. En las
2010 comparaciones por rangos de la diversidad nucleotídica se observó la misma tendencia, con
2011 mayores valores en el rango nativo respecto del exótico tanto para loci neutrales (exótico:
2012 0,11; nativo: 0,13; $p < 0,001$; Figura 5.5) como adaptativos (exótico: 0,07; nativo: 0,14; $p <$
2013 $0,001$; Figura 5.5). Mientras que dentro del rango exótico se observó en los loci neutrales una
2014 mayor diversidad nucleotídica en las cohortes reclutadas post fuego (CF: 0,14; SF: 0,13; $p <$
2015 $0,05$; Figura 5.5) pero sin diferencias significativas en los loci adaptativos (CF: 0,13; SF:
2016 0,14; Figura 5.5). No se observaron diferencias al comparar la diversidad nucleotídica entre
2017 adaptativos y neutrales en un mismo rango o tipo de cohorte.



2018
 2019 **Figura 5.5.** Índices de diversidad genética para loci adaptativos (naranja) y neutrales (azul), entre
 2020 rangos (A) y entre cohortes sin fuego [SF] y reclutadas post-fuego [CF] (B) de *Pinus radiata*.
 2021 Comparaciones de la varianza en el número de alelos privados (AP), heterocigosis esperada (HE) y
 2022 diversidad nucleotídica ($P_i = P$). Las letras representan significancia estadística en análisis de la
 2023 varianza (ANOVA) y comparaciones múltiples por pares mediante test de T pareado por locus. Las
 2024 letras coloreadas representan diferencias dentro de cada tipo de locus, mientras que las diferencias
 2025 entre loci adaptativos y neutrales para ese rango o cohorte se representan con asteriscos (***)
 2026

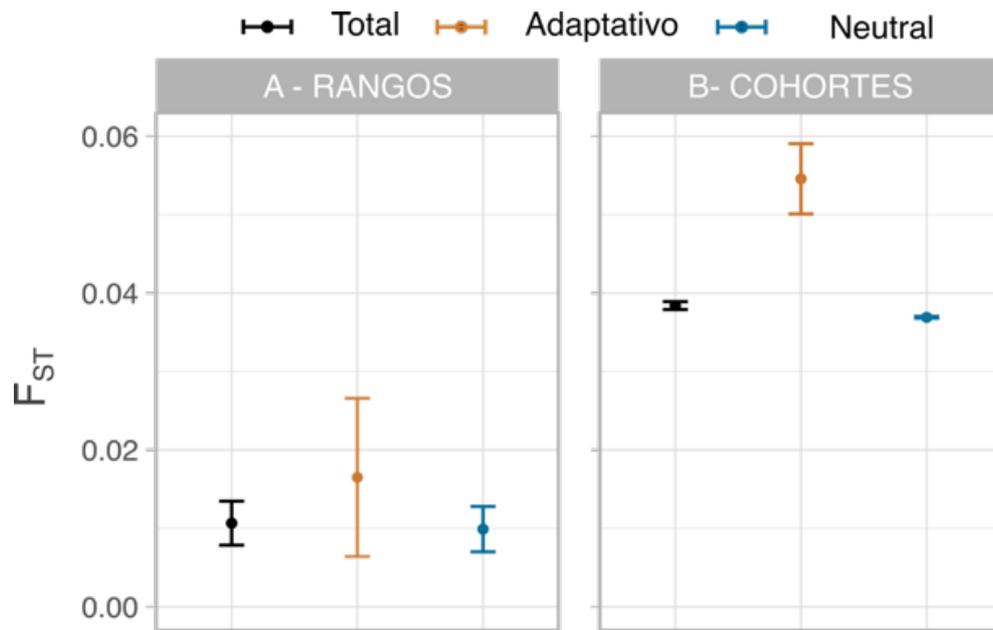
2027 Al comparar todos los loci estudiados, el rango exótico mostró niveles de endogamia F_{IS}
 2028 significativamente inferiores que el rango nativo ($p < 0,001$; Figura 5.6); no observándose
 2029 diferencias entre las cohortes con y sin fuego dentro del rango exótico (Figura 5.6). Al

2030 analizar de manera individual los loci adaptativos se observaron menores niveles de F_{IS}
 2031 dentro del rango exótico ($p < 0,001$; Figura 5.6), y dentro de este la menor endogamia la
 2032 presentaron las cohortes reclutadas post-fuego ($p < 0,01$; Figura 5.6). No se observaron
 2033 diferencias significativas al analizar de manera individual a los loci neutrales (Figura 5.6).



2034 **Figura 5.6.** Índice de fijación (F_{IS}) para loci totales (negro) adaptativos (naranja) y neutrales (azul),
 2035 entre rangos (A) y entre cohortes sin fuego [SF] y reclutadas post-fuego [CF] (B) de *Pinus*
 2036 *radiata*. Las letras representan significancia estadística en análisis de la varianza (ANOVA) y
 2037 comparaciones por pares múltiples por pares mediante test de T pareado por locus. Las letras
 2038 coloreadas representan diferencias dentro de cada tipo de locus, mientras que las diferencias entre loci
 2039 adaptativos y neutrales para ese rango o cohorte se representan con asteriscos (***)
 2040

2041
 2042 La estructura poblacional evaluada con el índice F_{ST} de Wright mostró una
 2043 diferenciación muy baja entre el rango nativo y exótico tanto evaluando todos los loci en
 2044 conjunto como al evaluar por separado loci adaptativos y neutrales (Figura 5.7). Sin embargo,
 2045 aunque con diferencias mínimas, dentro del rango exótico se observaron mayores niveles de
 2046 diferenciación entre las cohortes con y sin fuego, mostrando los mayores niveles de
 2047 diferenciación los loci adaptativos (Figura 5.7).



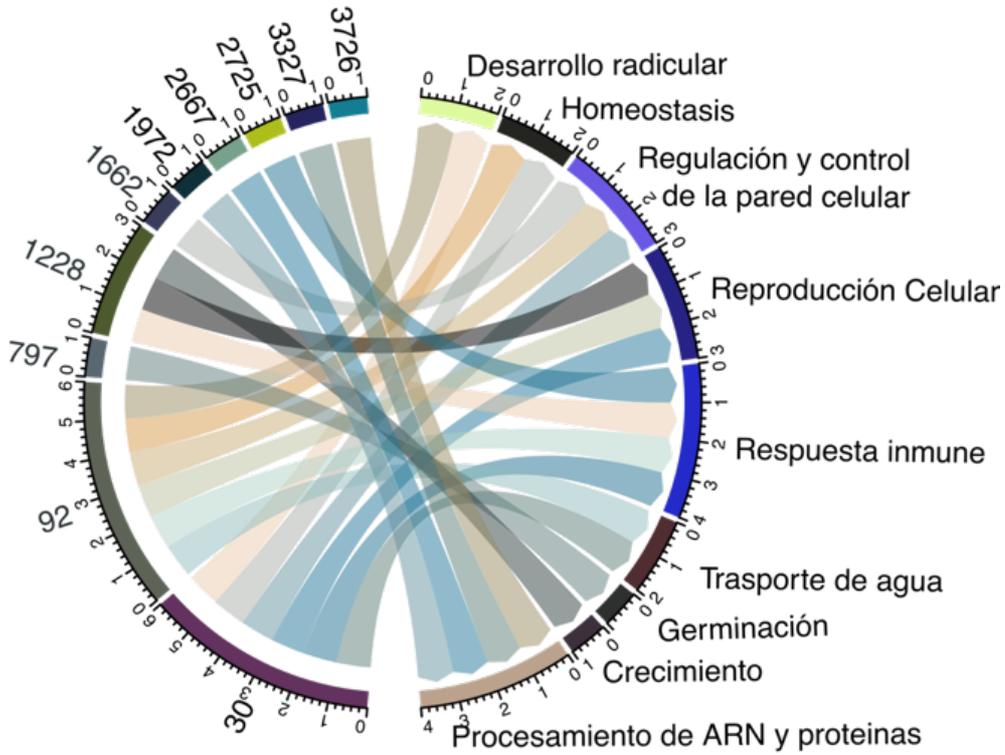
2048 **Figura 5.7.** Distancias F_{ST} para loci totales (negro), adaptativos (naranja) y neutrales (azul), entre
 2049 rangos (A) y entre cohortes (B) de *Pinus radiata*. Las barras indican intervalos de confianza del 95%
 2050 calculados por bootstrap con mil repeticiones.
 2051

2052

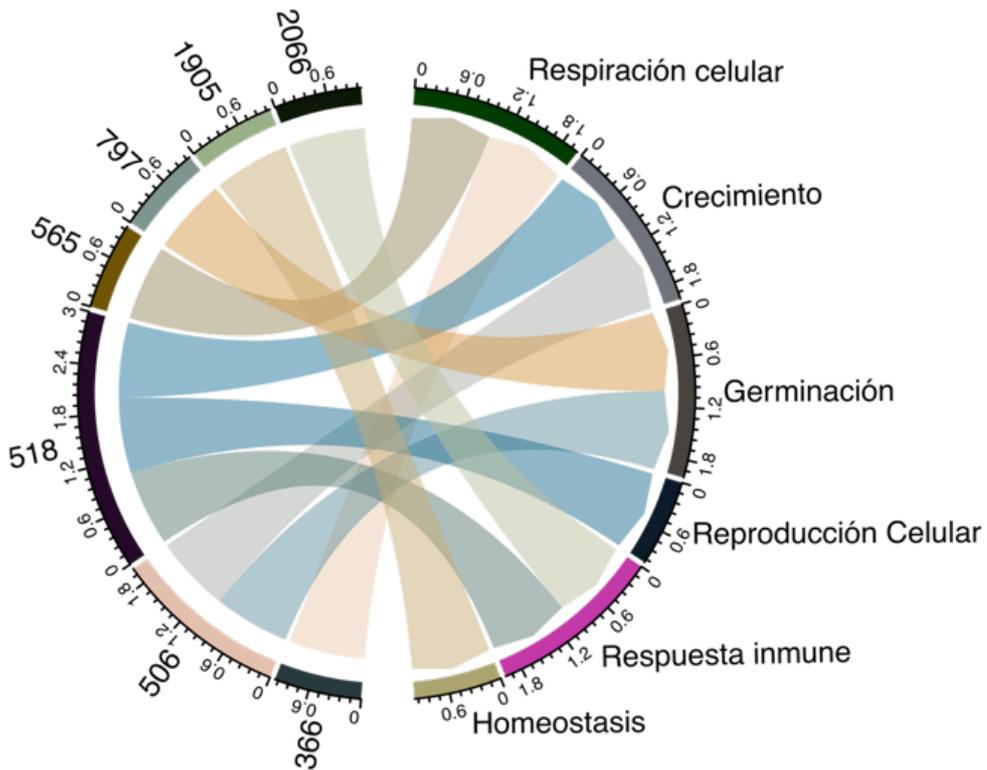
2053 Al contrastar los loci con valores de F_{ST} atípicos de la comparación entre rangos con las
 2054 entradas del GenBank y el EMBL-EBI encontramos que de las 15 secuencias solo 1 (6,67%,
 2055 Tabla S 5.1) no presentó coincidencias con las bases de datos. Las 14 secuencias que sí
 2056 presentaron coincidencias correspondieron en su totalidad a secuencias expresadas (i.e.
 2057 poseen un producto proteico). Pudimos identificar el producto proteico de 11 de estas
 2058 secuencias (Tabla S 5.1), mientras que para los 3 restantes (Tabla S 5.1) la búsqueda en base
 2059 de datos dio coincidencias con ARNm cuyo producto proteico no ha sido identificado. Los
 2060 genes potenciales identificados para las 11 secuencias con producto proteico se encuentran
 2061 relacionados con diversas funciones biológicas como: crecimiento, desarrollo radicular,
 2062 germinación, homeostasis, regulación y control de la pared celular, reproducción celular,
 2063 respiración celular, respuesta inmune, transporte de agua y procesamiento de ARN y proteínas
 2064 (Figura 5.8 A). Al realizar una búsqueda en bases de datos de las secuencias con valores de
 2065 F_{ST} atípicos para la comparación entre cohortes encontramos que 5 de las 14 secuencias
 2066 (35,71%, Tabla S 5.1) no presentó coincidencias con las bases de datos. Las 9 secuencias que
 2067 sí presentaron coincidencias correspondieron en su totalidad a secuencias expresadas.
 2068 Pudimos identificar el producto proteico de 7 de estas secuencias (Tabla S 5.1), mientras que
 2069 para los 2 restantes (Tabla S 5.1) la búsqueda dio coincidencias con ARNm cuyo producto
 2070 proteico no ha sido identificado. Estos loci estuvieron principalmente relacionados a la

2071 respiración celular, crecimiento, germinación, reproducción celular, respuesta inmune y
 2072 homeostasis (Figura 5.8 B).

A - Por Rangos



B - Por Cohortes



2073

2074 **Figura 5.8.** Diagrama de cuerdas representando la relación entre los loci bajo selección y los
2075 principales procesos biológicos con los que podrían estar relacionados, para la comparación entre (A)
2076 rangos nativo y exótico y (B) entre cohortes con y sin fuego de *Pinus radiata*. A la izquierda se
2077 señalan los números identificadores de cada loci y a la derecha los procesos biológicos con los que se
2078 relacionan.

2079

2080 La mayoría de los loci bajo selección, en ambas comparaciones, son o están
2081 relacionados a reguladores de varias vías de transducción de señales. Por ejemplo, muchos
2082 actúan como componentes centrales en la transducción de señales del ácido abscísico (ABA),
2083 una fitohormona reguladora del crecimiento vegetal considerada habitualmente como
2084 retardadora o inhibidora de los procesos de crecimiento, y con gran importancia sobre los
2085 tiempos de latencia, dormancia y germinación. Así mismo, se encontraron diversos loci
2086 relacionados a distintos tipos de respuestas inmune frente a daños, hongos, bacterias, o
2087 agentes químicos. En ambos casos la mayoría de las coincidencias encontradas
2088 correspondieron a datos reportados para especies altamente emparentadas con *P. radiata*
2089 (Tabla S 5.1).

2090

2091 **5.4 Discusión**

2092 En el rango exótico *P. radiata* tiene, en promedio, una menor heterocigosis esperada y
2093 diversidad nucleotídica. Estas tendencias se sostienen al desglosar las señales en base a los
2094 loci adaptativos y neutrales. La genética de poblaciones de las especies invasoras se ha
2095 basado en su mayor parte en la paradoja de la reducida diversidad genética en las poblaciones
2096 exóticas; siendo esto una consecuencia de los efectos de cuellos de botella genéticos
2097 asociados a los eventos fundadores (Allendorf y Lundquist, 2003) que tienden a empobrecer
2098 genéticamente a las poblaciones. El hecho de que en un sitio dentro del rango exótico (Puerto
2099 Patriada) *Pinus radiata* presente características que promuevan su invasión (capítulos 2 y 3),
2100 con una clara reducción de la diversidad genética respecto al rango nativo es evidencia de que
2101 esta especie puede ser considerada como una paradoja genética de las invasiones. Las
2102 especies exóticas que se consideran una paradoja genética son aquellas que presentan una
2103 diversidad genética menor que la de las poblaciones de origen; y que sin embargo, toleran las
2104 diversas consecuencias deletéreas que esto conlleva (e.g. depresión por endogamia que limita
2105 la producción de propágulos y el crecimiento de la población) y se adaptan con éxito a las
2106 nuevas condiciones o filtros bióticos y abióticos (Estoup et al., 2016; Ward et al., 2019).
2107 Estos resultados no son coincidentes con los análisis de isoenzimas, donde la diversidad

2108 genética encontrada en Puerto Patriada (Capítulo 4) fue mayor que la reportada previamente
2109 para esta especie usando el mismo marcador genético (Moran y Bell, 1987; Moran et al.,
2110 1988). Esto puede deberse a dos sesgos en el caso de las isoenzimas: i) se trata de un método
2111 ampliamente afectado por el observador y ii) la comparación se realizó con datos
2112 previamente publicados por otros grupos de investigación. Al comparar la diversidad
2113 genética en situaciones con y sin fuego, observamos un aumento de la diversidad en las
2114 cohortes reclutadas post-fuego; esta tendencia se sostiene al observar los loci neutrales, sin
2115 diferencias para los loci adaptativos. Este resultado coincide con lo encontrado al utilizar
2116 isoenzimas mostrado en el capítulo anterior. Es probable que esto se deba al carácter serótipo
2117 de *P. radiata*, ya que los bancos de semillas han sido propuestos como importantes
2118 reservorios genéticos (Mandák et al., 2012), lo que podría amortiguar el impacto de la deriva
2119 genética durante la regeneración post-fuego. Entonces, mientras que los individuos sin fuego
2120 que son remanentes de los distintos incendios del sitio muestran los efectos de la deriva (con
2121 la consiguiente pérdida de diversidad), los individuos reclutados post-fuego son el producto
2122 de un reclutamiento masivo a partir de las semillas almacenadas en el banco aéreo donde
2123 acumularon diversidad genética, ya que las semillas almacenadas en este banco aéreo son
2124 producto de distintos eventos reproductivos.

2125 Las poblaciones de *Pinus radiata* estudiadas mostraron una disminución en la
2126 endogamia en el rango exótico. Una posible explicación para la disminución de la
2127 endogamia en el rango exótico respecto del nativo es la ocurrencia de múltiples eventos de
2128 introducción a partir de diferentes poblaciones del rango nativo. Múltiples introducciones de
2129 orígenes genéticamente diferentes pueden contribuir a mantener e incluso aumentar la
2130 diversidad con respecto a las poblaciones nativas evitando el incremento en la endogamia y
2131 sus efectos negativos (Dlugosch y Parker, 2008; Frankham, 2005). Otra posibilidad es el
2132 cruce de diferentes orígenes poblacionales durante el proceso de domesticación de la especie,
2133 antes de ser introducida en el sitio. Entonces, las poblaciones exóticas de *P. radiata* producto
2134 de diversos orígenes tanto de manera directa en el sitio como indirecta en el proceso de
2135 domesticación. Contrariamente al aumento de la endogamia encontrado en las cohortes post-
2136 fuego utilizando isoenzimas, la misma no varió para loci neutrales y disminuyó
2137 significativamente para los loci adaptativos utilizando SNPs. Si bien estos resultados
2138 muestran una clara tendencia, deben ser considerados con cuidado debido al tamaño muestral
2139 utilizado, ya que el número de individuos está en el límite inferior recomendado para la
2140 técnica por lo que podría estar afectando los resultados. Ciertas variantes genéticas que

2141 promuevan la invasión post-fuego podrían estar siendo beneficiadas en ambientes con alta
2142 frecuencia de incendios como los del norte de la Patagonia manteniendo genotipos novedosos
2143 y enmascarando el efecto perjudicial de mutaciones perjudiciales en homocigosis.

2144 Ambos conjuntos de individuos analizados tanto del rango nativo como exótico y de
2145 las distintas cohortes sin y con fuego presentan una alta proporción de alelos únicos ($\geq 25\%$
2146 del total analizado). De la misma manera, al desglosar la proporción de alelos privados según
2147 loci adaptativos y neutrales en todas las comparaciones realizadas se observa un efecto
2148 significativo de la selección natural y de la deriva y el aislamiento ya que más del 50%
2149 resultan únicos. La presencia de variantes únicas en el rango nativo y exótico sólo se traducen
2150 en una divergencia significativamente distinta de cero, pero muy baja ($F_{st} \approx 1\%$). Sin
2151 embargo, las distintas cohortes analizadas del rango exótico mostraron un grado de
2152 divergencia genética algo mayor ($F_{st} \approx 5\%$) entre grupos de individuos sometidos o no a la
2153 influencia del fuego. El hecho de la diferenciación genética sea mayor entre cohortes (con y
2154 sin fuego) que, entre rangos, y que la mayor diferenciación genética la presenten los loci
2155 adaptativos, podría ser un indicio de que el fuego estaría ejerciendo un poder selectivo
2156 significativo a favor de determinadas variantes de base genética pudiendo facilitar su
2157 invasión.

2158 Las comparaciones de las secuencias bajo selección con bases de datos revelaron una
2159 serie de loci implicados en diversas funciones o procesos biológicos que van desde la
2160 regulación en el procesamiento de ARN y proteínas hasta el desarrollo radicular y el
2161 crecimiento. En el caso de la comparación entre rangos, una de las funciones biológicas con
2162 mayor cantidad de loci bajo selección asociados fue la de respuesta inmune. Si bien con la
2163 metodología aplicada no se pueden conocer los efectos finales sobre la respuesta inmune de
2164 los individuos quizás estos cambios con base genómica podrían estar representando un
2165 proceso de relajación de los mecanismos de defensa. A su vez, observamos loci coincidentes
2166 con diversos procesos relacionados a la germinación, desarrollo, crecimiento y homeostasis.
2167 La hipótesis de la evolución de la capacidad competitiva aumentada (EICA por sus siglas en
2168 inglés), propuesta por Blossey and Notzold (1995), propone que las plantas invasoras
2169 cambiarán su asignación de recursos a defensa al aumento del crecimiento o la reproducción
2170 debido a la ausencia de sus enemigos del rango nativo. Si bien nuestros resultados podrían ser
2171 el primer reporte de cambios con base genómica que apoyen esta hipótesis, es necesario
2172 estudiar la direccionalidad del proceso selectivo en los grupos de loci relacionados a cada
2173 proceso biológico, i.e. determinar si estos cambios son dirigidos hacia genotipos de mayor

2174 crecimiento y menor respuesta de defensa. Para abordar la comprobación de EICA desde un
2175 contexto ecológico molecular para *P. radiata*, se debería realizar un estudio acoplado y
2176 complementario. Donde el análisis del crecimiento, defensas y reproducción, se realicen no
2177 solo desde una aproximación basada en el estudio y cuantificación de caracteres fenotípicos
2178 como la producción de biomasa, número de semillas viables y concentración de defensas
2179 químicas. Sino también con un enfoque que podría centrarse en técnicas como RNAseq que
2180 nos permite estudiar la presencia, identidad y cantidad de ARN en una muestra. De esta
2181 forma podríamos ver qué genes relacionados al crecimiento, defensas y reproducción están
2182 siendo expresados en los individuos, y si esta expresión es diferenciada entre los rangos
2183 nativo y exótico.

2184 Si bien el número de secuencias bajo selección registradas fue similar en ambas
2185 comparaciones (i.e. por rangos y por tipos de cohortes), el número de loci identificados en
2186 base a estas secuencias fue menor en el caso de la comparación por tipos de cohortes. Entre
2187 los loci identificados se encontraron dos relacionados a la señalización por ácido abscísico
2188 (ABA). El ácido abscísico regula los principales acontecimientos durante la formación de las
2189 semillas, como el depósito de reservas de almacenamiento, la prevención de la germinación
2190 precoz, la adquisición de tolerancia a la desecación y la inducción de la latencia primaria
2191 (Kermode, 2005). Los cambios en la síntesis y metabolismo del ABA provocan cambios en
2192 las señales hormonales que regulan los puntos de control críticos en las transiciones de la
2193 inactividad a la germinación y de la germinación al crecimiento (Feurtado et al., 2004;
2194 Kermode, 2005). Si bien se requieren estudios específicos para corroborarlo, es posible que
2195 estos loci identificados como bajo selección estén relacionados a los cambios en los tiempos
2196 de germinación y vigor temprano encontrados en el capítulo 2.

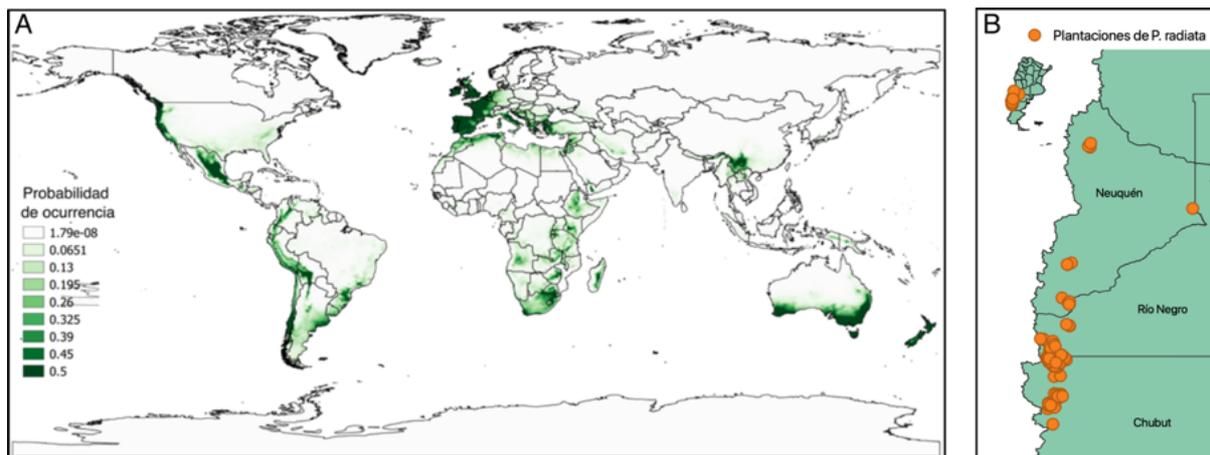
2197 El estudio genómico comparativo entre poblaciones de *P. radiata* del rango nativo y
2198 exótico, así como con y sin fuego dentro del rango exótico, nos permitió corroborar que tanto
2199 la deriva génica como la selección natural actúan promoviendo la divergencia de las
2200 poblaciones exóticas respecto de las nativas. A su vez, y de manera concordante con los
2201 resultados obtenidos de las comparaciones FST-QST (Capítulo 4), pudimos corroborar la
2202 existencia de un proceso selectivo rápido luego de los eventos de fuego. La existencia de loci
2203 identificados como bajo selección, en solo una generación, en la comparación entre los
2204 rangos de distribución nativo y exótico apoya la hipótesis de que el fuego actúa como un
2205 factor de selección rápida, promoviendo la divergencia de las cohortes reclutadas luego de
2206 incendios.

Capítulo 6

Discusión general y Conclusiones

2207
2208
2209
2210
2211
2212
2213
2214
2215
2216
2217
2218
2219
2220
2221
2222
2223
2224
2225
2226

El propósito de esta Tesis de Doctorado fue contribuir a la caracterización de la invasión de *Pinus radiata*, bajo una alta frecuencia incendios en el norte de la Patagonia haciendo foco en aspectos evolutivos, genético-poblacionales y ecológicos que pudieran asociarse con su potencial capacidad invasora. El trabajo se realizó en el marco de la hipótesis de que el fuego actúa como una fuerza selectiva rápida que favorece en la descendencia post-fuego una mayor adaptación a este disturbio. Además, las poblaciones exóticas e invasoras en ecosistemas propensos a incendios diferirán genéticamente respecto de las poblaciones nativas del rango de origen de esta especie exótica, producto de efectos fundadores, deriva genética y procesos selectivos mediados por fuego durante la introducción y establecimiento en el área invadida. La importancia del estudio de *P. radiata* radica en que es la especie forestal más ampliamente implantada a nivel mundial (Mead, 2013); e inclusive al realizar modelos para determinar el área ambientalmente apta para la especie (Figura 6.1 A) vemos que se encuentra ampliamente distribuida en los cinco continentes y que el área apta climatológicamente para ser invadida es incluso más amplia. Además, si bien esta tesis se enfocó en el estudio de la relación fuego-invasión de *P. radiata* en Puerto Patriada, tal vez esta situación podría ser extrapolable a las más de 150 plantaciones de esta especie en Patagonia (Figura 6.1 B).



2227
2228
2229
2230
2231
2232

Figura 6.1. (A) Modelo de distribución potencial para *Pinus radiata* realizado en base a datos de ocurrencias reportados en bases de datos públicas (GBIF 2014). Se muestra la probabilidad de ocurrencia de la especie en una gama creciente de color verde, donde verdes oscuros indican mayor probabilidad de ocurrencia y por tanto una mayor aptitud ambiental. El modelo fue realizado mediante el algoritmo *Random Forest* a partir de datos de ocurrencia publicados en GBIF. **(B)** Mapa

2233 de la ubicación de las plantaciones de *Pinus radiata* en Patagonia, realizado en base a información
2234 proporcionada por el centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Patagónico (CIEFAP).

2235

2236 La mayor parte de los estudios sobre el rol y la dinámica de los procesos evolutivos
2237 durante las invasiones de plantas han sido realizados en especies con ciclos de vida cortos
2238 (e.g. herbáceas anuales), mientras que casi no se encuentra información sobre estos procesos
2239 en árboles. Esto puede deberse a los largos ciclos de vida y tiempos generacionales en
2240 árboles, lo que dificulta las inferencias sobre la dinámica evolutiva a lo largo de múltiples
2241 generaciones (Zenni et al. 2017). Esta tesis muestra la existencia de procesos evolutivos
2242 rápidos en una especie longeva pero que entra en edad reproductiva a una edad relativamente
2243 baja (en el sitio de estudio se observaron arboles con conos a los 5 años de edad, capítulo 2).
2244 Esto nos lleva a pensar que estos procesos evolutivos rápidos pueden estar ocurriendo en
2245 otras especies longevas con una edad reproductiva baja como en *P. radiata*. Los casos como
2246 el de *Pinus radiata* en Puerto Patriada donde podemos encontrar distintas cohortes con y sin
2247 fuego (e incluso producto de más de un incendio sucesivo) son excelentes laboratorios
2248 naturales que nos permiten aumentar el conocimiento de estos procesos evolutivos en
2249 especies arbóreas. A continuación, se expondrán las principales conclusiones obtenidas y su
2250 importancia dentro del marco teórico expuesto en esta tesis.

2251 Los cambios en el grado de serotinia y tamaño del banco de semillas aéreo entre
2252 individuos de plantaciones no quemadas e individuos reclutados post-fuego, descritos en el
2253 capítulo 2, sugieren que el aumento de serotinia podría resultar de un proceso de selección
2254 y/o plasticidad fenotípica. Este proceso puede promover la divergencia en rasgos vinculados
2255 a fuego. Si bien existe numerosa evidencia de que el fuego actúa como agente de selección
2256 (Keeley, Pausas, Rundel, Bond, y Bradstock, 2011; Lamont y He, 2017), con evidencias de
2257 este proceso selectivo para la serotinia en numerosas especies de pinos en sus áreas de
2258 distribución nativas (Goubitz et al., 2004; Hernández-Serrano et al., 2013; Linhart, 1978;
2259 Radeloff et al., 2004). Estos trabajos analizan cambios entre diferentes poblaciones y por lo
2260 tanto una gran escala temporal de divergencia; incluso, recientemente se ha propuesto que los
2261 casos donde se favorecen los altos niveles de serotinia esta característica se acumula en la
2262 población a lo largo muchas generaciones sucesivas (Lamont et al., 2020) y por lo tanto es
2263 necesario registrar grandes periodos para lograr un registro del impacto evolutivo (Lamont,
2264 2020). En cambio, los cambios en el grado de serotinia reportados en esta tesis ocurrieron en
2265 una generación, observándose que en este caso el impacto evolutivo del fuego como

2266 promotor de divergencia ocurrió en una ventana temporal muy pequeña. La serotinia se
2267 considera como una ventaja adaptativa en ambientes propensos a incendios, siempre que el
2268 intervalo entre incendios permita el total desarrollo y madurez de los individuos (Lamont y
2269 Enright, 2000). En general, el rol del fuego como factor de selección sobre la serotinia se
2270 aborda en un contexto donde se analiza la aptitud de un síndrome serótino vs. uno no
2271 serótino (Lamont et al., 2020). Cuando se habla de las variaciones del grado de serotinia se
2272 propone estas variaciones como una respuesta plástica (Lamont et al., 2020). Si bien la
2273 contribución ambiental y por lo tanto la plasticidad fenotípica no pueden ser descartadas, las
2274 diferencias encontradas en esta tesis apoyadas por los resultados genéticos parecen ser el
2275 producto de un proceso selectivo rápido mediado por fuego con base genética.

2276 A su vez para realmente considerar a la serotinia como una ventaja adaptativa debe ir
2277 acompañada de tolerancia de las semillas y plántulas frente a las condiciones post-fuego
2278 (Goubitz et al., 2003). Los resultados de este estudio muestran que el incremento en el grado
2279 de serotinia es acompañado por semillas y plántulas que no solo toleran las condiciones de
2280 reclutamiento post-fuego analizadas, sino que también la germinación y el vigor temprano de
2281 las plántulas se ve favorecido por dichas condiciones (capítulo 3). Entonces, el proceso de
2282 selección descrito actuaría promoviendo la invasión de esta especie en áreas recientemente
2283 quemadas, debido a que : i) las especies arbóreas nativas dominantes del bosque templado
2284 patagónico no presentan este tipo de síndrome de almacenamiento de las semillas en el banco
2285 aéreo, y si bien algunas de ellas presentan algún tipo de banco de semillas en el suelo, como
2286 el ciprés (*Austrocedrus chilensis*) (Urretavizcaya y Defossé, 2004) o *Nothofagus dombeyi*, *N.*
2287 *obliqua* y *N. alpina* (Dezzotti, Manzoni, y Sbrancia, 2016) este es de carácter transitorio y el
2288 número de semillas conservadas en el mismo es ínfimo en comparación con los valores
2289 alcanzados en el banco aéreo de *P. radiata*; ii) se observa un proceso de divergencia con
2290 tendencia hacia árboles con una mayor producción y disponibilidad de semillas, lo que
2291 implica un aumento en la presión de propágulos; y iii) se encontraron altos porcentajes de
2292 germinación y una alta velocidad de germinación, con tendencias hacia un incremento en
2293 ambas variables analizadas en las semillas provenientes de individuos reclutados luego de
2294 incendios. En las especies de leñosas nativas de la región que dependen de semillas para su
2295 establecimiento la producción de semillas en gran cantidad se produce de forma esporádica
2296 (semillazón o masting en inglés), por lo que la colonización post-disturbio puede no ser
2297 instantánea luego de un incendio. Estos factores actúan incrementando la capacidad de

2298 reclutamiento en condiciones post-fuego de *P. radiata*, y la ventaja competitiva que esto le
2299 confiere, promueve el reemplazo del bosque nativo.

2300 El hecho de que estos cambios en caracteres morfológicos se correspondan con un
2301 proceso selectivo (y no a deriva génica) pudo corroborarse mediante estudios comparativos
2302 entre las medidas de divergencia en rasgos cuantitativos (Q_{ST}) y en marcadores moleculares
2303 neutros (F_{ST}) (Spitze, 1993; Merilä y Crnokrak, 2001). Se detectó una posible selección
2304 diversificadora mediada por fuego para la serotinia y cuatro variables relacionadas al tamaño
2305 de los individuos; marcando este posible proceso selectivo mediado por fuego una tendencia
2306 hacia árboles con un mayor grado de serotinia, pero de menor tamaño. Entonces, las
2307 diferencias encontradas en esta tesis no parecen ser el producto de plasticidad fenotípica, sino
2308 de un proceso selectivo rápido mediado por fuego con base genética. A su vez la hipótesis del
2309 proceso selectivo mediado por fuego se ve reforzada al realizar análisis con base genómica;
2310 ya que pudimos observar la presencia de loci bajo selección tanto en la comparación entre el
2311 rango nativo y Puerto Patriada como entre los individuos con y sin fuego dentro de Puerto
2312 Patriada. Encontrando pruebas de selección en loci relacionados a diversas funciones o
2313 procesos biológicos que van desde la regulación en el procesamiento de ARN y proteínas
2314 hasta el desarrollo radicular y el crecimiento. Esta capacidad para adaptarse localmente
2315 podría tratarse de un importante mecanismo determinante del potencial invasivo de esta
2316 especie. La base genética de la serotinia ha sido estudiada previamente para *Pinus contorta*
2317 (Parchman et al., 2012) y *Pinus pinaster* (Budde et al., 2014) y se encontró que poseía una
2318 herencia de tipo poligénica con múltiples loci asociados a la variación fenotípica de este
2319 carácter. Sin embargo en ninguno de estos trabajos encontraron una estructura genética para
2320 esta característica, mientras que en nuestro caso, encontramos una variación temporal
2321 mediada por fuego en solo una generación. Este tipo de estudio exploratorios sobre el tipo de
2322 herencia para la serotinia fue realizado de manera más integral para *Pinus halepensis* y *Pinus*
2323 *pinaster* (Castellanos et al., 2015), encontrando una alta componente heredable para este
2324 carácter y una clara asociación entre sitios con alta frecuencia de fuegos de copa y altos
2325 niveles de serotinia. El trabajo de Castellanos et al. (2015) enfoca su estudio en diversas
2326 poblaciones dos especies diferentes, siendo esta la gran limitante de esta tesis. Nuestro
2327 trabajo fue realizado en una sola localidad y si bien creemos que estos resultados pueden ser
2328 extrapolables a situaciones similares, ampliar el número de localidades muestreadas sería un
2329 importante paso de validación.

2330 En el marco de las paradojas genéticas de las invasiones y al comparar Puerto
2331 Patriada con el rango nativo de la especie encontramos resultados contrapuestos: al usar
2332 isoenzimas obtuvimos pruebas de un mantenimiento e incluso incremento de la diversidad
2333 genética lo que indicaría que no es una paradoja genética, pero al usar SNPs observamos con
2334 una reducción sostenida tanto en los loci neutrales como en aquellos bajo selección poniendo
2335 a la especie dentro de los casos considerados como paradojas genéticas. Estos resultados
2336 contrapuestos pueden deberse a que (como se mencionó en el capítulo 4) el método basado en
2337 isoenzimas está ampliamente afectado por el observador y la comparación se realizó con
2338 estudios realizados por otros grupos de investigación. Además, sería necesario ampliar el
2339 tamaño muestral para el estudio con aproximación genómica (SNPs); porque si bien el
2340 número de individuos usado se encuentra dentro del rango común para este tipo de análisis,
2341 un estudio más exhaustivo podría permitirnos aumentar la potencia y fiabilidad con la que
2342 detectamos las señales neutrales y adaptativa. Sin embargo, de manera concordante en ambos
2343 marcadores, se encontró una endogamia significativamente distinta y mayor que cero. Si bien
2344 en poblaciones endógamas como la descrita frente a situaciones de estrés ambiental se
2345 reduce la tasa de crecimiento y el tamaño poblacional, las condiciones ecológicas benignas
2346 pueden mitigar los efectos negativos de la endogamia y permitir que las poblaciones
2347 endógamas persistan, se reproduzcan y se expandan (Schrieber y Lachmuth, 2017). La
2348 reducción en la diversidad genética observada luego de la introducción en un sitio del rango
2349 exótico (observada en la comparación rango nativo vs. Puerto Patriada) no se ve acompañada
2350 por una reducción luego de incendios, lo que nos indica que este disturbio no estaría actuando
2351 como un cuello de botella. Esto puede deberse a que el banco de semillas aéreo (posible
2352 gracias al carácter serótino de la especie) puede actuar como reservorio genético (Fennell
2353 et al., 2014; Mandák et al., 2012) y por lo tanto amortigua la posible disminución esperada en
2354 la diversidad genética durante la regeneración post-fuego.

2355 En los últimos años el riesgo de incendios forestales en la región ha aumentado
2356 debido a diversos factores asociados al cambio climático como el aumento de las
2357 temperaturas, el incremento de las igniciones por factores antropogénicos, y la sustitución de
2358 la vegetación autóctona por plantaciones de coníferas no autóctonas más inflamables (Veblen
2359 et al., 2008). En este marco, el proceso selectivo mediado por fuego (en el que se seleccionan
2360 aquellos genotipos más adaptados) descripto en esta tesis, actuaría promoviendo la invasión
2361 de *P. radiata* y reforzando el ciclo de fuego - invasión.

2362

2363 **Conclusiones y consideraciones finales**

2364 Los resultados encontrados en esta tesis apoyan en general la afirmación de que las plantas
2365 exóticas pueden sufrir un proceso de evolución rápida, y que la evolución adaptativa puede
2366 ser uno de los diversos mecanismos clave que permiten a las especies exóticas convertirse en
2367 invasoras. A lo largo de este trabajo y teniendo a *Pinus radiata* como modelo de estudio
2368 encontramos pruebas de:

- 2369 i) Un incremento en solo una generación en los niveles de serotinia, un carácter
2370 relacionado a la aptitud reproductiva de la especie frente a incendios,
2371 ii) Estos cambios en los niveles de serotinia se encuentran acompañados por un
2372 incremento en la respuesta germinativa y la tolerancia de las plántulas frente a
2373 condiciones asociadas a incendios,
2374 iii) La divergencia fenotípica (Q_{ST}) entre los individuos con y sin fuego dada por
2375 estos cambios es mayor a la esperada por deriva génica (F_{ST}),
2376 iv) El posible proceso selectivo, mediado por fuego, que promueve estos cambios
2377 podría tener base genómica y estar afectando distintas características y funciones
2378 biológicas.

2379 Podemos concluir entonces, que el fuego puede actuar como una fuerza selectiva
2380 sobre *P. radiata*, favoreciendo en la descendencia post-fuego una mayor adaptación a este
2381 disturbio y promoviendo la invasión. Estos resultados pueden dar lugar a una mayor
2382 comprensión de la relación entre la arquitectura genética y los factores ecológico-evolutivos
2383 que confieren el éxito de la invasión.

2384

- 2418 Bass, D. A., Crossman, N. D., Lawrie, S. L., & Lethbridge, M. R. (2006). The importance of
 2419 population growth, seed dispersal and habitat suitability in determining plant
 2420 invasiveness. *Euphytica*, 148(1-2), 97-109. <https://doi.org/10.1007/s10681-006-5944-6>
- 2421 Benkman, C. W., & Siepielski, A. M. (2004). A keystone selective agent? Pine squirrels and
 2422 the frequency of serotiny in lodgepole pine. *Ecology*, 85(8), 2082-2087.
 2423 <https://doi.org/10.1890/04-0177>
- 2424 Blackhall, M. (2012). Respuestas de especies leñosas a herbívoros e incendios en bosques y
 2425 matorrales del noroeste de la Patagonia: Estudio de la inflamabilidad vegetal.
 2426 *Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche, SC de*
 2427 *Bariloche*, 184.
- 2428 Blackhall, M., Franzese, J., Raffaele, E., & Gobbi, M. E. (2016). Efecto del fuego sobre la
 2429 germinación de especies leñosas y trepadoras de los bosques y matorrales del noroeste
 2430 patagónico. *Ecofuego II*. Esquel.
- 2431 Blackhall, M., & Raffaele, E. (2019). Flammability of Patagonian invaders and natives:
 2432 When exotic plant species affect live fine fuel ignitability in wildland-urban interfaces.
 2433 *Landscape and Urban Planning*, 189, 1-10.
 2434 <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2019.04.002>
- 2435 Blair, A. C., & Wolfe, L. M. (2004). The evolution of an invasive plant: an experimental
 2436 study with *Silene latifolia*. *Ecology*, 85(11), 3035-3042.
- 2437 Blossey, B., & Notzold, R. (1995). Evolution of increased competitive ability in invasive
 2438 nonindigenous plants: a hypothesis. *Journal of Ecology*, 83(5), 887-889.
- 2439 Boberg, P., Raffaele, E., Chaia, E. E., Eneström, J., Pettersson, L. B., & D'Hertefeldt, T.
 2440 (2010). The effect of high temperatures on seed germination of one native and two
 2441 introduced conifers in Patagonia. *Nordic Journal of Botany*, 28(2), 231-239.
- 2442 Bond, W. J., & Midgley, J. J. (2003). The Evolutionary Ecology of Sprouting in Woody
 2443 Plants Author (s): William J . Bond and Jeremy J . Midgley Source : International
 2444 Journal of Plant Sciences , Vol . 164 , No . S3 , Evolution of Functional Traits in Plants (
 2445 May 2003), pp . S103-S114 Publ. *International Journal of Plant Sciences*, 164(S3),
 2446 103-114. [https://doi.org/1058-5893/2003/16403S-0008\\$15.00](https://doi.org/1058-5893/2003/16403S-0008$15.00)
- 2447 Bond, W. J., & van Wilgen, B. W. (2012). *Fire and plants*. Springer Science & Business
 2448 Media.
- 2449 Bonnesoeur, V., Locatelli, B., Guariguata, M. R., Ochoa-Tocachi, B. F., Vanacker, V., Mao,
 2450 Z., ... Mathez-Stiefel, S.-L. (2019). Impacts of forests and forestation on hydrological

2451 services in the Andes: A systematic review. *Forest Ecology and Management*, 433,
2452 569-584. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2018.11.033>

2453 Boscutti, F., Sigura, M., De Simone, S., & Marini, L. (2018). Exotic plant invasion in
2454 agricultural landscapes: A matter of dispersal mode and disturbance intensity. *Applied*
2455 *Vegetation Science*, 21(2), 250-257. <https://doi.org/10.1111/avsc.12351>

2456 Bower, A. D., & Aitken, S. N. (2011). Changes in genetic diversity of whitebark pine (*Pinus*
2457 *albicaulis* Engelm.) associated with inbreeding and white pine blister rust infection.
2458 *Silvae Genetica*, 60(3-4), 113-123. <https://doi.org/10.1515/sg-2011-0016>

2459 Bower, Andrew D., & Aitken, S. N. (2007). Mating system and inbreeding depression in
2460 whitebark pine (*Pinus albicaulis* Engelm.). *Tree Genetics and Genomes*, 3(4), 379-388.
2461 <https://doi.org/10.1007/s11295-007-0082-4>

2462 Bradstock, R. A., Tozer, M. G., & Keith, D. A. (1997). Effects of High Frequency Fire on
2463 Floristic Composition and Abundance in a Fire-prone Heathland near Sydney.
2464 *Australian Journal of Botany*, 45(4), 641. <https://doi.org/10.1071/BT96083>

2465 Bretz, F., Hothorn, T., & Westfall, P. (2016). *Multiple comparisons using R*. CRC Press.

2466 Brommer, J. E. (2011). Whither Pst? The approximation of Qst by Pst in evolutionary and
2467 conservation biology. *Journal of Evolutionary Biology*, 24(6), 1160-1168.
2468 <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2011.02268.x>

2469 Brooks, M. L., D'antonio, C. M., Richardson, D. M., Grace, J. B., Keeley, J. E., DiTomaso, J.
2470 M., ... Pyke, D. (2004). Effects of invasive alien plants on fire regimes. *BioScience*,
2471 54(7), 677-688. Recuperado de
2472 <https://academic.oup.com/bioscience/article/54/7/677/223532>

2473 Brown, J. K., & Smith, J. K. (2000). Wildland fire in ecosystems: effects of fire on flora.
2474 *Gen. Tech. Rep. RMRS-GTR-42-vol. 2. Ogden, UT: US Department of Agriculture,*
2475 *Forest Service, Rocky Mountain Research Station. 257 p., 42.*

2476 Brown, J. S., & Eckert, C. G. (2005). Evolutionary increase in sexual and clonal reproductive
2477 capacity during biological invasion in an aquatic plant *Butomus umbellatus*
2478 (*Butomaceae*). *American journal of botany*, 92(3), 495-502.

2479 Buckley, Y. M., Briese, D. T., & Rees, M. (2003). Demography and management of the
2480 invasive plant species *Hypericum perforatum*. II. Construction and use of an individual-
2481 based model to predict population dynamics and the effects of management strategies.
2482 *Journal of Applied Ecology*, 40(3), 494-507.

2483 Budde, K. B., Heuertz, M., Hernández-Serrano, A., Pausas, J. G., Vendramin, G. G., Verdú,

2484 M., ... Gonz, S. C. (2014). In situ genetic association for serotiny, a fire-related trait, in
 2485 Mediterranean maritime pine (*Pinus pinaster*). *New Phytologist*, 201(1), 230-241.
 2486 <https://doi.org/10.1111/nph.12483>

2487 Buhle, E. R., Margolis, M., & Ruesink, J. L. (2005). Bang for buck: cost-effective control of
 2488 invasive species with different life histories. *Ecological Economics*, 52(3), 355-366.
 2489 <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2004.07.018>

2490 Bustamante, R. O., & Simonetti, J. A. (2005). Is *Pinus radiata* invading the native vegetation
 2491 in Central Chile? Demographic responses in a fragmented forest. *Biological Invasions*,
 2492 7(2), 243-249. <https://doi.org/10.1007/s10530-004-0740-5>

2493 Byun, C., de Blois, S., & Brisson, J. (2015). Interactions between abiotic constraint,
 2494 propagule pressure, and biotic resistance regulate plant invasion. *Oecologia*, 178(1),
 2495 285-296. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-3188-z>

2496 Cabrera, A. L. (1976). *Regiones fitogeográficas argentinas*.

2497 Callaway, R. M. (2000). Invasive Plants Versus Their New and Old Neighbors: A
 2498 Mechanism for Exotic Invasion. *Science*, 290(5491), 521-523.
 2499 <https://doi.org/10.1126/science.290.5491.521>

2500 Calvo, L., Hernández, V., Valbuena, L., & Taboada, A. (2016). Provenance and seed mass
 2501 determine seed tolerance to high temperatures associated to forest fires in *Pinus pinaster*.
 2502 *Annals of Forest Science*, 73(2), 381-391. <https://doi.org/10.1007/s13595-015-0527-0>

2503 Cary, G. J., & Banks, J. C. G. (2000). *Fire Regime Sensitivity to Global Climate Change: An*
 2504 *Australian Perspective*. 233-246. https://doi.org/10.1007/0-306-47959-1_13

2505 Castellanos, M. C., González-Martínez, S. C., & Pausas, J. G. (2015). Field heritability of a
 2506 plant adaptation to fire in heterogeneous landscapes. *Molecular ecology*, 24(22), 5633-
 2507 5642.

2508 Catchen, J., Hohenlohe, P. A., Bassham, S., Amores, A., & Cresko, W. A. (2013). Stacks: an
 2509 analysis tool set for population genomics. *Molecular ecology*, 22(11), 3124-3140.

2510 Catford, J. A., Morris, W. K., Vesk, P. A., Gippel, C. J., & Downes, B. J. (2014). Species and
 2511 environmental characteristics point to flow regulation and drought as drivers of riparian
 2512 plant invasion. *Diversity and Distributions*, 20(9), 1084-1096.
 2513 <https://doi.org/10.1111/ddi.12225>

2514 Cavallero, L., López, D. R., Raffaele, E., & Aizen, M. A. (2015). Structural-functional
 2515 approach to identify post-disturbance recovery indicators in forests from northwestern
 2516 Patagonia: A tool to prevent state transitions. *Ecological Indicators*, 52, 85-95.

2517 <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.11.019>

2518 Chezhan, P., Yasodha, R., & Ghosh, M. (2010). Genetic diversity analysis in a seed orchard
2519 of *Eucalyptus tereticornis*. *New Forests*, *40*(1), 85-99. [https://doi.org/10.1007/s11056-](https://doi.org/10.1007/s11056-009-9184-1)
2520 [009-9184-1](https://doi.org/10.1007/s11056-009-9184-1)

2521 Chun, Y. J., Le Corre, V., & Bretagnolle, F. (2011). Adaptive divergence for a fitness-related
2522 trait among invasive *Ambrosia artemisiifolia* populations in France. *Molecular Ecology*,
2523 *20*(7), 1378-1388. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05013.x>

2524 Claridge, K., & Franklin, S. B. (2002). Compensation and plasticity in an invasive plant
2525 species. *Biological Invasions*, *4*(4), 339-347. <https://doi.org/10.1023/A:1023671006342>

2526 Cobar-Carranza, A. J., García, R. A., Pauchard, A., & Peña, E. (2014). Effect of *Pinus*
2527 *contorta* invasion on forest fuel properties and its potential implications on the fire
2528 regime of *Araucaria araucana* and *Nothofagus antarctica* forests. *Biological Invasions*,
2529 *16*(11), 2273-2291. <https://doi.org/10.1007/s10530-014-0663-8>

2530 Colautti, R. I., & Barrett, S. C. (2013). Rapid Adaptation to Climate Facilitates Range
2531 Expansion of an Invasive Plant. *Science*, *342*(6156), 364-366.
2532 <https://doi.org/10.1126/science.1242121>

2533 Corley, J. C., Dimarco, R. D., Fischbein, D., Lantschner, M. V, Martínez, A. S., Masciocchi,
2534 M., ... Villacide, J. M. (2018). A synthesis on the impact of non-native conifer
2535 plantations on ant and beetle diversity in north-western Patagonia. *Southern Forests: a*
2536 *Journal of Forest Science*, *80*(4), 285-291.
2537 <https://doi.org/10.2989/20702620.2018.1432536>

2538 Crooks, J. A., Soulé, M. E., & Sandlund, O. T. (1999). Lag times in population explosions of
2539 invasive species: causes and implications. *Invasive species and biodiversity*
2540 *management*, *103*, 125.

2541 D'Antonio, C. M., & Vitousek, P. M. (1992). Biological Invasions by Exotic Grasses, the
2542 Grass/Fire Cycle, and Global Change. *Annual Review of Ecology and Systematics*,
2543 *23*(1), 63-87. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.23.110192.000431>

2544 Da Silva, S. B., & Da Silva, A. (2018). Pstat: an R package to assess population
2545 differentiation in phenotypic traits. *The R Journal*, *10*(1), 447-454.

2546 Davis, K. T., Callaway, R. M., Fajardo, A., Pauchard, A., Nuñez, M. A., Brooker, R. W., ...
2547 Gundale, M. J. (2019). Severity of impacts of an introduced species corresponds with
2548 regional eco-evolutionary experience. *Ecography*, *42*(1), 12-22.
2549 <https://doi.org/10.1111/ecog.04014>

- 2550 Davis, K. T., Maxwell, B. D., & Caplat, P. (2019). *Simulation model suggests that fire*
 2551 *promotes lodgepole pine (Pinus contorta) invasion in Patagonia. 1.*
 2552 <https://doi.org/10.1007/s10530-019-01975-1>
- 2553 Dezzotti, A., Manzoni, M., & Sbrancia, R. (2016). Producción, almacenamiento en el suelo y
 2554 viabilidad de las semillas de *Nothofagus dombeyi*, *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus*
 2555 *alpina* (Nothofagaceae) en un bosque templado del noroeste de la Patagonia argentina.
 2556 *Revista de la Facultad de Agronomía, 115*(2), 143-160.
- 2557 Diaz, D. G., Mathiasen, P., & Premoli, A. C. (2020). Subtle precipitation differences yield
 2558 adaptive adjustments in the mesic *Nothofagus dombeyi*. *Forest Ecology and*
 2559 *Management, 461*, 117931. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117931>
- 2560 Dietz, H., & Edwards, P. J. (2006). Recognition that causal processes change during plant
 2561 invasion helps explain conflicts in evidence. *Ecology, 87*(6), 1359-1367.
 2562 [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1359:RTCPD\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1359:RTCPD]2.0.CO;2)
- 2563 Dimitrakopoulos, A. P. (2001). A statistical classification of Mediterranean species based on
 2564 their flammability components. *International Journal of Wildland Fire, 10*(2), 113-118.
- 2565 Dlugosch, K. M., & Parker, I. M. (2008). Founding events in species invasions: Genetic
 2566 variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology,*
 2567 *17*(1), 431-449. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x>
- 2568 Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., ... Lautenbach, S.
 2569 (2013). Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study
 2570 evaluating their performance. *Ecography, 36*(1), 027-046.
 2571 <https://doi.org/10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x>
- 2572 Drake, J. A., Mooney, H. A., Di Castri, F., Groves, R. H., Kruger, F. J., Rejmanek, M., ...
 2573 Invasions, B. (1989). *Biological Invasions. A global perspective.* Chichester, UK: Wiley
 2574 & Sons.
- 2575 Ehrenfeld, J. G. (2003). Effects of exotic plant invasions on soil nutrient cycling processes.
 2576 *Ecosystems, 6*(6), 503-523. <https://doi.org/10.1007/s10021-002-0151-3>
- 2577 El-Kassaby, Y. A. (1992). Domestication and genetic diversity — should we be concerned?
 2578 *The Forestry Chronicle, 68*(6), 687-700. <https://doi.org/10.5558/tfc68687-6>
- 2579 Elton, C. S. (2000). *The ecology of invasions by animals and plants.* University of Chicago
 2580 Press.
- 2581 Eschtruth, A. K., & Battles, J. J. (2009). Assessing the relative importance of disturbance,
 2582 herbivory, diversity, and propagule pressure in exotic plant invasion. *Ecological*

2583 *Monographs*, 79(2), 265-280. <https://doi.org/10.1890/08-0221.1>

2584 Espelta, J. M., Arnan, X., & Rodrigo, A. (2011). Non-fire induced seed release in a weakly
2585 serotinous pine: climatic factors, maintenance costs or both? *Oikos*, 120(11), 1752-1760.

2586 Estoup, A., Ravigne, V., Hufbauer, R., Vitalis, R., Gautier, M., & Facon, B. (2016). Annual
2587 Review of Ecology, Evolution, and Systematics Integrating Networks, Phylogenomics,
2588 and Population Genomics for the Study of Polyploidy Copy number variation (CNV):
2589 variation in the number of copies of a gene that an individual possesses we close wi.
2590 *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 47(July), 51-72.
2591 <https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415>

2592 Farjon, A. (2013). *Pinus radiata*. The IUCN Red List of Threatened Species 2013:
2593 e.T42408A2977955. [https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-](https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T42408A2977955.en)
2594 [1.RLTS.T42408A2977955.en](https://doi.org/https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2013-1.RLTS.T42408A2977955.en)

2595 Feduck, M., Henry, P., Winder, R., Dunn, D., Alfaro, R., & Hawkes, B. (2015). The genetic
2596 basis of cone serotiny in *Pinus contorta* as a function of mixed-severity and stand-
2597 replacement fire regimes. *BioRxiv*, 23267.

2598 Fennell, M., Gallagher, T., Vintro, L. L., & Osborne, B. (2014). Using soil seed banks to
2599 assess temporal patterns of genetic variation in invasive plant populations. *Ecology and*
2600 *Evolution*, 4(9), 1648-1658. <https://doi.org/10.1002/ece3.1043>

2601 Fenner, M., & Thompson, K. (2005). *The Ecology of Seeds*. Recuperado de
2602 www.cambridge.org/9780521653114

2603 Ferreras, A. E., & Galetto, L. (2010). From seed production to seedling establishment:
2604 Important steps in an invasive process. *Acta Oecologica*, 36(2), 211-218.
2605 <https://doi.org/10.1016/j.actao.2009.12.005>

2606 Feurtado, J. A., Ambrose, S. J., Cutler, A. J., Ross, A. R. S., Abrams, S. R., & Kermode, A.
2607 R. (2004). Dormancy termination of western white pine (*Pinus monticola* Dougl. Ex D.
2608 Don) seeds is associated with changes in abscisic acid metabolism. *Planta*, 218(4), 630-
2609 639. <https://doi.org/10.1007/s00425-003-1139-8>

2610 Foll, M. (2012). BayeScan v2. 1 user manual. *Ecology*, 20, 1450-1462.

2611 Fonda, R. W. (2001). Burning characteristics of needles from eight pine species. *Forest*
2612 *Science*, 47(3), 390-396.

2613 Frankham, R. (2005). Resolving the genetic paradox in invasive species. *Heredity*, 94(4),
2614 385. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800634>

2615 Franklin, J., Serra-Diaz, J. M., Syphard, A. D., & Regan, H. M. (2016). Global change and

2616 terrestrial plant community dynamics. *Proceedings of the National Academy of*
2617 *Sciences of the United States of America*, 113(14), 3725-3734.
2618 <https://doi.org/10.1073/pnas.1519911113>

2619 Franzese, J., & Ghermandi, L. (2011). Seed longevity and fire: Germination responses of an
2620 exotic perennial herb in NW Patagonian grasslands (Argentina). *Plant Biology*, 13(6),
2621 865-871. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2011.00447.x>

2622 Franzese, Jorgelina, & Ghermandi, L. (2012). Effect of fire on recruitment of two dominant
2623 perennial grasses with different palatability from semi-arid grasslands of NW Patagonia
2624 (Argentina). *Plant Ecology*, 213(3), 471-481.

2625 Franzese, Jorgelina, & Raffaele, E. (2017). Fire as a driver of pine invasions in the Southern
2626 Hemisphere: a review. *Biological Invasions*, 19(8), 2237-2246.
2627 <https://doi.org/10.1007/s10530-017-1435-z>

2628 Franzese, Jorgelina, Raffaele, E., Blackhall, M., Rodriguez, J., & Soto, A. Y. (2019). Land
2629 cover change due to non-native pine introduction modifies litter traits of temperate
2630 forests in Patagonia. *Journal of Vegetation Science*, jvs.12847.
2631 <https://doi.org/10.1111/jvs.12847>

2632 Franzese, Jorgelina, Raffaele, E., Blackhall, M., Rodriguez, J., & Soto, A. Y. (2020).
2633 Changes in land cover resulting from the introduction of non-native pine modifies litter
2634 traits of temperate forests in Patagonia. *Journal of Vegetation Science*, 31(2), 223-233.

2635 Franzese, Jorgelina, Ripa, R., Blackhall, M., Pissolito, C., & Raffaele, E. (2018). El control
2636 de la invasión de pinos como práctica de restauración en patagonia: análisis del
2637 combustible fino. *IV Taller Regional sobre Rehabilitación Restauración en la Diagonal*
2638 *Árida de la Argentina y I Taller Internacional de Restauración Ecológica*.
2639 <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17992.98560>

2640 Franzese, Jorgelina, Urrutia, J., García, R. A., Taylor, K., & Pauchard, A. (2017). Pine
2641 invasion impacts on plant diversity in Patagonia: invader size and invaded habitat
2642 matter. *Biological Invasions*, 19(3), 1015-1027. [https://doi.org/10.1007/s10530-016-](https://doi.org/10.1007/s10530-016-1344-6)
2643 [1344-6](https://doi.org/10.1007/s10530-016-1344-6)

2644 Frazer, G. W., Canham, C. D., & Lertzman, K. P. (1999). Gap Light Analyzer (GLA),
2645 Version 2.0: Imaging software to extract canopy structure and gap light transmission
2646 indices from true-colour fisheye photographs, users manual and program documentation.
2647 *Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, and the Institute of Ecosystem*
2648 *Studies, Millbrook, New York*, 36.

- 2649 García-Ramos, G., & Rodríguez, D. (2002). Evolutionary speed of species invasions.
2650 *Evolution*, 56(4), 661-668.
- 2651 García, R. A., Franzese, J., Policelli, N., Sasal, Y., Zenni, R. D., Nuñez, M. A. M. A., ...
2652 Pauchard, A. (2018). Non-native pines are homogenizing the ecosystems of South
2653 America. En *From Biocultural Homogenization to Biocultural Conservation* (pp. 245-
2654 263). https://doi.org/10.1007/978-3-319-99513-7_15
- 2655 Gauthier, S., Bergeron, Y., & Simon, J.-P. (1996). Effects of Fire Regime on the Serotiny
2656 Level of Jack Pine. *The Journal of Ecology*, 84(4), 539. <https://doi.org/10.2307/2261476>
- 2657 Gioria, M., Pyšek, P., & Moravcová, L. (2012). Soil seed banks in plant invasions: Promoting
2658 species invasiveness and long-term impact on plant community dynamics. *Preslia*,
2659 84(2), 327-350.
- 2660 Goldammer, J. G., Cwielong, P., Rodriguez, N., & Goergen, J. (1996). One thousand years of
2661 fire history of Andino-Patagonian forests recovered from sediments of the Río Epuýén
2662 river, Chubut Province, Argentina. *Biomass burning and global change*, 2, 653-659.
- 2663 Gonzalez, S. L., & Ghermandi, L. (2012). *Fire cue effects on seed germination of six species*
2664 *of northwestern Patagonian grasslands*.
- 2665 Goubitz, S., Nathan, R., Roitemberg, R., Shmida, A., & Ne'eman, G. (2004). Canopy seed
2666 bank structure in relation to: fire, tree size and density. *Plant Ecology (formerly*
2667 *Vegetatio)*, 173(2), 191-201. <https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000029324.40801.74>
- 2668 Goubitz, S., Werger, M. J. A., & Ne'eman, G. (2003). Germination response to fire-related
2669 factors of seeds from non-serotinous and serotinous cones. *Plant Ecology*, 169(2), 195-
2670 204. <https://doi.org/10.1023/A:1026036332277>
- 2671 Günster, A. (1994). Seed bank dynamics — longevity, viability and predation of seeds of
2672 serotinous plants in the central Namib Desert. *Journal of Arid Environments*, 28(3), 195-
2673 205. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(05\)80057-6](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(05)80057-6)
- 2674 Guthrie, S. G., Crandall, R. M., & Knight, T. M. (2016). Fire indirectly benefits fitness in two
2675 invasive species. *Biological invasions*, 18(5), 1265-1273.
- 2676 Hagenblad, J., Hülskötter, J., Acharya, K. P., Brunet, J., Chabrierie, O., Cousins, S. A. O., ...
2677 Graae, B. J. (2015). Low genetic diversity despite multiple introductions of the invasive
2678 plant species *Impatiens glandulifera* in Europe. *BMC Genetics*, 16(1), 1-16.
2679 <https://doi.org/10.1186/s12863-015-0242-8>
- 2680 Hairston Jr, N. G., Ellner, S. P., Geber, M. A., Yoshida, T., & Fox, J. A. (2005). Rapid
2681 evolution and the convergence of ecological and evolutionary time. *Ecology letters*,

2682 8(10), 1114-1127.

2683 Hamilton, C. D. (1965). Changes in the soil under pinus radiata. *Australian Forestry*, 29(4),
2684 275-289. <https://doi.org/10.1080/00049158.1965.10675968>

2685 Hamilton, M. (2011). *Population genetics*. John Wiley & Sons.

2686 Hedberg, E. C., & Hedberg, E. C. (2018). Statistical Distributions. En *Introduction to Power*
2687 *Analysis: Two-Group Studies*. <https://doi.org/10.4135/9781506343105.n6>

2688 Hejda, M., Pyšek, P., & Jarošík, V. (2009). Impact of invasive plants on the species richness,
2689 diversity and composition of invaded communities. *Journal of Ecology*, 97(3), 393-403.
2690 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2009.01480.x>

2691 Hernández-Serrano, A., Verdú, M., González-Martínez, S. C., & Pausas, J. G. (2013). Fire
2692 structures pine Serotiny at different scales. *American Journal of Botany*, 100(12), 2349-
2693 2356. <https://doi.org/10.3732/ajb.1300182>

2694 Hernández-Serrano, A., Verdú, M., Santos del Blanco, L., Climent, J., González-Martínez, S.
2695 C., & Pausas, J. G. (2014). Heritability and quantitative genetic divergence of serotiny, a
2696 fire persistence plant trait. *MEDPINE5. 5th International Conference on Mediterranean*
2697 *Pines*, 31.

2698 Herrero, C., San Martín, R., & Bravo, F. (2007). Effect of heat and ash treatments on
2699 germination of Pinus pinaster and Cistus laurifolius. *Journal of Arid Environments*,
2700 70(3), 540-548. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2006.12.027>

2701 Higgins, S. I., & Richardson, D. M. (1998). Pine invasions in the southern hemisphere:
2702 modelling interactions between organism, environment and disturbance. *Plant Ecology*,
2703 135(1), 79-93.

2704 Hulme, P. E. (2009). Trade, transport and trouble: Managing invasive species pathways in an
2705 era of globalization. *Journal of Applied Ecology*, 46(1), 10-18.
2706 <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2008.01600.x>

2707 Jauni, M., Gripenberg, S., & Ramula, S. (2015). Non-native plant species benefit from
2708 disturbance: A meta-analysis. *Oikos*, 124(2), 122-129. <https://doi.org/10.1111/oik.01416>

2709 Keane, R., & Crawley, M. J. (2002). Exotic plant invasions and the enemy release
2710 hypothesis. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(4), 164-170.
2711 [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02499-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02499-0)

2712 Keeley, J. E. (1986). Resilience of Mediterranean shrub communities to fires. En *Resilience*
2713 *in Mediterranean-type ecosystems* (pp. 95-112). Springer.

2714 Keeley, J. E. (1998). Coupling demography, physiology and evolution in chaparral shrubs.

2715 En *Landscape disturbance and biodiversity in mediterranean-type ecosystems* (pp.
2716 257-264). Springer.

2717 Keeley, J. E., Bond, W. J., Bradstock, R. A., Pausas, J. G., & Rundel, P. W. (2011). *Fire in*
2718 *Mediterranean ecosystems: ecology, evolution and management*. Cambridge University
2719 Press.

2720 Keeley, J. E., & Fotheringham, C. J. (2000). Role of fire in regeneration from seed. *Seeds:*
2721 *the ecology of regeneration in plant communities*, 2, 311-330.

2722 Keeley, J. E., Pausas, J. G., Rundel, P. W., Bond, W. J., & Bradstock, R. A. (2011). Fire as an
2723 evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in Plant Science*, 16(8), 406-411.
2724 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.04.002>

2725 Kermode, A. R. (2005). Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *Journal of Plant Growth*
2726 *Regulation*, 24(4), 319-344. <https://doi.org/10.1007/s00344-005-0110-2>

2727 Kimura, M. (1983). *The neutral theory of molecular evolution*. Cambridge University Press.

2728 King, J. N., & Dancik, B. P. (1983). Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (
2729 *Picea glauca*) . *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 25(5), 430-436.
2730 <https://doi.org/10.1139/g83-066>

2731 Kitzberger, T., Raffaele, E., Heinemann, K., & Mazzarino, M. J. (2005). Effects of fire
2732 severity in a north Patagonian subalpine forest. *Journal of Vegetation Science*, 16(1), 5-
2733 12.

2734 Kitzberger, T., & Veblen, T. T. (1999). Fire-induced changes in northern Patagonian
2735 landscapes. *Landscape Ecology*, 14(1), 1-15.

2736 Koenig, W. D., & Knops, J. M. H. (2005). The mystery of masting in trees: some trees
2737 reproduce synchronously over large areas, with widespread ecological effects, but how
2738 and why? *American Scientist*, 93(4), 340-347.

2739 Kolbe, J. J., Glor, R. E., Schettino, L. R., Lara, A. C., Larson, A., & Losos, J. B. (2004).
2740 Genetic variation increases during biological invasion by a Cuban lizard. *Nature*,
2741 431(7005), 177-181.

2742 Lamont, B. B. (2020). Evaluation of seven indices of on-plant seed storage (serotiny) shows
2743 that the linear slope is best. *Journal of Ecology*. [https://doi.org/10.1111/1365-](https://doi.org/10.1111/1365-2745.13436)
2744 2745.13436

2745 Lamont, B. B., & Enright, N. J. (2000). Adaptive advantages of aerial seed banks. *Plant*
2746 *Species Biology*, 15(2), 157-166. <https://doi.org/10.1046/j.1442-1984.2000.00036.x>

2747 Lamont, B. B., & He, T. (2017). Fire-Proneness as a Prerequisite for the Evolution of Fire-

2748 Adapted Traits. *Trends in Plant Science*, 22(4), 278-288.
2749 <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.11.004>

2750 Lamont, B. B., He, T., & Yan, Z. (2019). Evolutionary history of fire-stimulated resprouting,
2751 flowering, seed release and germination. *Biological Reviews*, 94(3), 903-928.
2752 <https://doi.org/10.1111/brv.12483>

2753 Lamont, B. B., Le Maitre, D. C., Cowling, R. M., & Enright, N. J. (1991). Canopy seed
2754 storage in woody plants. *The Botanical Review*, 57(4), 277-317.
2755 <https://doi.org/10.1007/BF02858770>

2756 Lamont, B. B., Pausas, J. G., He, T., Witkowski, E. T. F., & Hanley, M. E. (2020). Fire as a
2757 Selective Agent for both Serotiny and Nonserotiny Over Space and Time. *Critical*
2758 *Reviews in Plant Sciences*, 39(2), 140-172.
2759 <https://doi.org/10.1080/07352689.2020.1768465>

2760 Lavergne, S., & Molofsky, J. (2007). Increased genetic variation and evolutionary potential
2761 drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,
2762 104(10), 3883-3888.

2763 Lavergne, S., Muenke, N. J., & Molofsky, J. (2010). Genome size reduction can trigger rapid
2764 phenotypic evolution in invasive plants. *Annals of Botany*, 105(1), 109-116.
2765 <https://doi.org/10.1093/aob/mcp271>

2766 Ledig, F. T., Hodgskiss, P. D., & Jacob-Cervantes, V. (2002). Genetic diversity, mating
2767 system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez.
2768 *Conservation Genetics*, 3(2), 113-122. <https://doi.org/10.1023/A:1015297621884>

2769 Lee, C. E. (2002). *Evolutionary genetics of invasive species*. 17(8), 9-11.

2770 Leger, E. A., & Rice, K. J. (2003). Invasive California poppies (*Eschscholzia californica*
2771 Cham.) grow larger than native individuals under reduced competition. *Ecology letters*,
2772 6(3), 257-264.

2773 Leibold, M. A., Holyoak, M., Mouquet, N., Amarasekare, P., Chase, J. M., Hoopes, M. F., ...
2774 Tilman, D. (2004). The metacommunity concept: a framework for multi-scale
2775 community ecology. *Ecology letters*, 7(7), 601-613.

2776 Leinonen, T., McCairns, R. J. S., O'Hara, R. B., & Merilä, J. (2013). QST–FST comparisons:
2777 evolutionary and ecological insights from genomic heterogeneity. *Nature Reviews*
2778 *Genetics*, 14(3), 179-190. <https://doi.org/10.1038/nrg3395>

2779 Leinonen, T., O'Hara, R. B., Cano, J. M., & Merilä, J. (2008). Comparative studies of
2780 quantitative trait and neutral marker divergence: a meta-analysis. *Journal of*

2781 *evolutionary biology*, 21(1), 1-17.

2782 Lesica, P., & Martin, B. (2003). Effects of Prescribed Fire and Season of Burn on
2783 Recruitment of the Invasive Exotic Plant, *Potentilla recta*, in a Semiarid Grassland.
2784 *Restoration Ecology*, 11(4), 516-523. [https://doi.org/10.1046/j.1526-](https://doi.org/10.1046/j.1526-100X.2003.rec0298.x)
2785 100X.2003.rec0298.x

2786 Linhart, Y. B. (1978). Maintenance of Variation in Cone Morphology in California Closed-
2787 Cone Pines: The Roles of Fire, Squirrels and Seed Output. *The Southwestern Naturalist*,
2788 23(1), 29. <https://doi.org/10.2307/3669977>

2789 Lloret, F., Medail, Fr., Brandu, G., Camarda, I., Moragues, Ev., Rita, Ju., ... Hulme, P. E.
2790 (2005). Species attributes and invasion success by alien plants on Mediterranean islands.
2791 *Journal of Ecology*, 93(3), 512-520. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2005.00979.x>

2792 Lockwood, J. L., Cassey, P., & Blackburn, T. (2005). The role of propagule pressure in
2793 explaining species invasions. *Trends in Ecology & Evolution*, 20(5), 223-228.
2794 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.02.004>

2795 Lotan, J. E. (1976). Cone serotiny-fire relationships in lodgepole pine. *Proc. Tall Timbers*
2796 *Fire Ecology Conference*, 14, 267-278.

2797 MacDougall, A. S., McCann, K. S., Gellner, G., & Turkington, R. (2013). Diversity loss with
2798 persistent human disturbance increases vulnerability to ecosystem collapse. *Nature*,
2799 494(7435), 86-89.

2800 Mack, M. C., & D'Antonio, C. M. (1998). Impacts of biological invasions on disturbance
2801 regimes. *Trends in Ecology & Evolution*, 13(5), 195-198. [https://doi.org/10.1016/S0169-](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(97)01286-X)
2802 5347(97)01286-X

2803 Mack, R. N., Simberloff, D., Mark Lonsdale, W., Evans, H., Clout, M., & Bazzaz, F. A.
2804 (2000). Biotic invasions: causes, epidemiology, global consequences, and control.
2805 *Ecological applications*, 10(3), 689-710.

2806 Madeira, F., Park, Y. mi, Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., ... Lopez, R.
2807 (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids*
2808 *Research*, 47(W1), W636-W641. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz268>

2809 Mandák, B., Zákavský, P., Mahelka, V., & Plačková, I. (2012). Can Soil Seed Banks Serve
2810 as Genetic Memory? A Study of Three Species with Contrasting Life History Strategies.
2811 *PLoS ONE*, 7(11), e49471. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049471>

2812 Mandle, L., Bufford, J. L., Schmidt, I. B., & Daehler, C. C. (2011). Woody exotic plant
2813 invasions and fire: Reciprocal impacts and consequences for native ecosystems.

2814 *Biological Invasions*, 13(8), 1815-1827. <https://doi.org/10.1007/s10530-011-0001-3>

2815 Manfredi, R., Postler, V., Urretavizcaya, F., Grosfeld, J., Ramilo, E., Caracotche, S., ...

2816 Caracotche, S. (1999). Plan Estratégico de Manejo de la Reserva Forestal Cuartel Lago

2817 Epuayén. *Caracterización y Diagnóstico. Consejo Federal de Inversiones, Dirección*

2818 *General de Bosques y Parques de la Provincia del Chubut, Centro de Investigación y*

2819 *Extensión Forestal Andino Patagónico*, 162.

2820 Maron, J. L. J., Vila, M., Bommarco, R., Vilà, M., Bommarco, R., Elmendorf, S., ...

2821 Bommarco, R. (2004). Rapid evolution of an invasive plant. *Ecological Monographs*,

2822 74(2), 261-280. <https://doi.org/10.1890/03-4027>

2823 Martín-Sanz, R. C., Santos-Del-Blanco, L., Notivol, E., Chambel, M. R., San-Martín, R., &

2824 Climent, J. (2016). Disentangling plasticity of serotiny, a key adaptive trait in a

2825 mediterranean conifer. *American Journal of Botany*, 103(9), 1582-1591.

2826 <https://doi.org/10.3732/ajb.1600199>

2827 Martina, J. P., & von Ende, C. N. (2012). Highly plastic response in morphological and

2828 physiological traits to light, soil-N and moisture in the model invasive plant, *Phalaris*

2829 *arundinacea*. *Environmental and Experimental Botany*, 82, 43-53.

2830 <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.03.010>

2831 Martínez-Sánchez, J. J., Marín, A., Herranz, J. M., Ferrandis, P., & De las Heras, J. (1995).

2832 Effects of high temperatures on germination of *Pinus halepensis* Mill. and *P. pinaster*

2833 *Aiton* subsp. *pinaster* seeds in southeast Spain. *Vegetatio*, 116(1), 69-72.

2834 McDonald, P. M., & Laacke, R. J. (1990). *Pinus radiata* D. Don. *Forest Service Agriculture*

2835 *Handbook*, 1(654), 433-441. Recuperado de

2836 <http://dendro.cnre.vt.edu/dendrology/USDAFSSilvics/232.pdf>

2837 McKay, J. K., & Latta, R. G. (2002). Adaptive population divergence: markers, QTL and

2838 traits. *Trends in Ecology & Evolution*, 17(6), 285-291. [https://doi.org/10.1016/S0169-](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02478-3)

2839 [5347\(02\)02478-3](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02478-3)

2840 McNair, J. N., Sunkara, A., & Frobish, D. (2013). How to analyse seed germination data

2841 using statistical time-to-event analysis: Non-parametric and semi-parametric methods.

2842 *Seed Science Research*, 22(2), 77-95. <https://doi.org/10.1017/S0960258511000547>

2843 Mead, D. J. (2013). *Sustainable management of Pinus radiata plantations* (FAO Forest;

2844 FAO., Ed.). Rome.

2845 Mermoz, M., Kitzberger, T., & Veblen, T. T. (2005). Landscape influences on occurrence

2846 and spread of wildfires in Patagonian forests and shrublands. *Ecology*, 86(10), 2705-

2847 2715.

2848 Michelsen, A., Lisanework, N., Friis, I., & Holst, N. (1996). Comparisons of understorey
2849 vegetation and soil fertility in plantations and adjacent natural forests in the Ethiopian
2850 highlands. *Journal of Applied Ecology*, 33(3), 627-642. <https://doi.org/10.2307/2404991>

2851 Milkovic, M., Paruelo, J. M., & Noretto, M. D. (2019). Hydrological impacts of afforestation
2852 in the semiarid Patagonia: A modelling approach. *Ecohydrology*, 12(6).
2853 <https://doi.org/10.1002/eco.2113>

2854 Miller, G., Friedel, M., Adam, P., & Chewings, V. (2010). Ecological impacts of buffel grass
2855 (*Cenchrus ciliaris* L.) invasion in central Australia - Does field evidence support a fire-
2856 invasion feedback? *Rangeland Journal*, 32(4), 353-365.
2857 <https://doi.org/10.1071/RJ09076>

2858 Mitton, J. B., Linhart, Y. B., Sturgeon, K. B., & Hamrick, J. L. (1979). Allozyme
2859 polymorphisms detected in mature needle tissue of ponderosa pine. *Journal of Heredity*,
2860 70(2), 86-89.

2861 Moran, G. F., & Bell, J. C. (1987). The origin and genetic diversity of *Pinus radiata* in
2862 Australia. *Theoretical and Applied Genetics*, 73(4), 616-622.

2863 Moran, G. F., Bell, J. C., & Eldridge, K. G. (1988). The genetic structure and the
2864 conservation of the five natural populations of *Pinus radiata*. *Canadian Journal of*
2865 *Forest Research*, 18(5), 506-514.

2866 Mount, D. W. (2007). Using the basic local alignment search tool (BLAST). *Cold Spring*
2867 *Harbor Protocols*, 2007(7), pdb-top17.

2868 Moyano, J., Chiuffo, M. C., Nuñez, M. A., & Rodriguez-Cabal, M. A. (2019). Seed predation
2869 does not explain pine invasion success. *Oecologia*, 189(4), 981-991.
2870 <https://doi.org/10.1007/s00442-019-04354-8>

2871 Murphy, G. E. P., & Romanuk, T. N. (2014). A meta-analysis of declines in local species
2872 richness from human disturbances. *Ecology and evolution*, 4(1), 91-103.

2873 Murphy, R. W. (1996). Proteins: isozyme electrophoresis. *Molecular systematics*.

2874 Murphy, R. W., Sites, J. W., Buth, D. G., & Haufler, C. H. (1990). Proteins: isozyme
2875 electrophoresis. *Molecular systematics*. *Sinauer Association, Sunderland*.

2876 Naghipour, A. A., Bashari, H., Khajeddin, S. J., Tahmasebi, P., & Iravani, M. (2016). Effects
2877 of smoke, ash and heat shock on seed germination of seven species from Central Zagros
2878 rangelands in the semi-arid region of Iran. *African Journal of Range & Forage Science*,
2879 33(1), 67-71. <https://doi.org/10.2989/10220119.2015.1119194>

- 2880 Nathan, R., Safriel, U. N., Noy-Meir, I., & Schiller, G. (1999). Seed release without fire in
2881 *Pinus halepensis*, a Mediterranean serotinous wind-dispersed tree. *Journal of Ecology*,
2882 87(4), 659-669. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2745.1999.00382.x>
- 2883 Noss, R. F., Franklin, J. F., Baker, W. L., Schoennagel, T., & Moyle, P. B. (2006). Managing
2884 fire-prone forests in the western United States. *Frontiers in Ecology and the*
2885 *Environment*, 4(9), 481-487.
- 2886 Novak, S. J., & Mack, R. N. (2005). Genetic bottlenecks in alien plant species: influence of
2887 mating systems and introduction dynamics. *Species invasions: insights into ecology,*
2888 *evolution and biogeography*, 201-228.
- 2889 Nuñez, M. A., Simberloff, D., & Relva, M. A. (2008). Seed predation as a barrier to alien
2890 conifer invasions. *Biological Invasions*, 10(8), 1389-1398.
2891 <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9214-x>
- 2892 Núñez, M. R., & Calvo, L. (2000). Effect of high temperatures on seed germination of *Pinus*
2893 *sylvestris* and *Pinus halepensis*. *Forest Ecology and Management*, 131(1-3), 183-190.
- 2894 O'Brien, M. J., O'Hara, K. L., Erbilgin, N., & Wood, D. L. (2007). Overstory and shrub
2895 effects on natural regeneration processes in native *Pinus radiata* stands. *Forest Ecology*
2896 *and Management*, 240(1-3), 178-185. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2006.12.025>
- 2897 Olguin Loreto Labbe, D. (2013). *Efecto del fuego sobre la viabilidad y germinación de*
2898 *semillas en ecosistemas Patagónicos*.
- 2899 Ooi, M. K. J., Denham, A. J., Santana, V. M., & Auld, T. D. (2014). Temperature thresholds
2900 of physically dormant seeds and plant functional response to fire: variation among
2901 species and relative impact of climate change. *Ecology and evolution*, 4(5), 656-671.
- 2902 Orrock, J. L., Levey, D. J., Danielson, B. J., & Damschen, E. I. (2006). Seed predation, not
2903 seed dispersal, explains the landscape-level abundance of an early-successional plant.
2904 *Journal of Ecology*, 94(4), 838-845. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2006.01125.x>
- 2905 Parchman, T. L., Gompert, Z., Mudge, J., Schilkey, F. D., Benkman, C. W., Buerkle, C. A.,
2906 ... Buerkle, C. A. (2012). Genome-wide association genetics of an adaptive trait in
2907 lodgepole pine. *Molecular ecology*, 21(12), 2991-3005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05513.x>
- 2909 Paritsis, J., & Aizen, M. A. (2008). Effects of exotic conifer plantations on the biodiversity of
2910 understory plants, epigeal beetles and birds in *Nothofagus dombeyi* forests. *Forest*
2911 *ecology and management*, 255(5), 1575-1583.
- 2912 Paritsis, J., Landesmann, J. B., Kitzberger, T., Tiribelli, F., Sasal, Y., Quintero, C., ... Nuñez,

2913 M. A. (2018). Pine plantations and invasion alter fuel structure and potential fire
 2914 behavior in a Patagonian forest-steppe ecotone. *Forests*, 9(3), 1-16.
 2915 <https://doi.org/10.3390/f9030117>

2916 Paritsis, J., Raffaele, E., & Veblen, T. T. (2006). Vegetation disturbance by fire affects plant
 2917 reproductive phenology in a shrubland community in northwestern Patagonia,
 2918 Argentina. *New Zealand Journal of Ecology*, 387-395.

2919 Parker, J. D., & Hay, M. E. (2005). Biotic resistance to plant invasions ? Native herbivores
 2920 prefer non-native plants. *Ecology Letters*, 959-967. [https://doi.org/10.1111/j.1461-](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00799.x)
 2921 [0248.2005.00799.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00799.x)

2922 Pausas, J. G. (2012). *Incendios forestales. Una visión desde la ecología*. Consejo Superior de
 2923 Investigaciones Científicas (España).

2924 Pausas, J. G., & Bradstock, R. A. (2007). Fire persistence traits of plants along a productivity
 2925 and disturbance gradient in mediterranean shrublands of south-east Australia. *Global*
 2926 *Ecology and Biogeography*, 16(3), 330-340. [https://doi.org/10.1111/j.1466-](https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2006.00283.x)
 2927 [8238.2006.00283.x](https://doi.org/10.1111/j.1466-8238.2006.00283.x)

2928 Pawson, S. M., McCarthy, J. K., Ledgard, N. J., & Didham, R. K. (2010). Density-dependent
 2929 impacts of exotic conifer invasion on grassland invertebrate assemblages. *Journal of*
 2930 *Applied Ecology*, 47(5), 1053-1062. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01855.x>

2931 Pearson, D. E., Hierro, J. L., Chiuffo, M., & Villarreal, D. (2014). Rodent seed predation as a
 2932 biotic filter influencing exotic plant abundance and distribution. *Biological Invasions*,
 2933 16(5), 1185-1196. <https://doi.org/10.1007/s10530-013-0573-1>

2934 Pejchar, L., & Mooney, H. A. (2009). Invasive species, ecosystem services and human well-
 2935 being. *Trends in Ecology & Evolution*, 24(9), 497-504.
 2936 <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.03.016>

2937 Pemberton, J. (2004). Measuring inbreeding depression in the wild.pdf. *Trends in Ecology*
 2938 *and Evolution*, 19(12), 7-9.

2939 Pimentel, D. (2014). Biological Invasions: Economic and Environmental Costs of Alien
 2940 Plant, Animal, and Microbe Species. En *CRC press*.

2941 Plessas, M. E., & Strauss, S. H. (1986). *Allozyme differentiation among populations, stands*
 2942 *and cohorts in Monterey pine*.

2943 Politov, D. V., Belokon', M. M., & Belokon', I. S. (2006). Dynamics of allozyme
 2944 heterozygosity in Siberian dwarf pine *Pinus pumila* (Pall.) Regel populations of the
 2945 Russian Far East: comparison of embryos and maternal plants. *Genetika*, 42(10), 1348-

- 2946 1358. <https://doi.org/10.1134/S102279540610005X>
- 2947 Potgieter, L. J., Douwes, E., Gaertner, M., Measey, J., Paap, T., & Richardson, D. M. (2020).
 2948 Biological Invasions in South Africa's Urban Ecosystems: Patterns, Processes, Impacts,
 2949 and Management. En *Biological Invasions in South Africa* (pp. 275-309).
 2950 https://doi.org/10.1007/978-3-030-32394-3_11
- 2951 Premoli, A. C., & Kitzberger, T. (2005). Regeneration mode affects spatial genetic structure
 2952 of *Nothofagus dombeyi* forests. *Molecular Ecology*, *14*(8), 2319-2329.
 2953 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2005.02629.x>
- 2954 Prentis, P. J., Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Richardson, D. M., & Lowe, A. J. (2008).
 2955 Adaptive evolution in invasive species. *Trends in plant science*, *13*(6), 288-294.
- 2956 Puillandre, N., Dupas, S., Dangles, O., Zeddani, J. L., Capdevielle-Dulac, C., Barbin, K., ...
 2957 Silvain, J. F. (2008). Genetic bottleneck in invasive species: The potato tuber moth adds
 2958 to the list. *Biological Invasions*, *10*(3), 319-333. [https://doi.org/10.1007/s10530-007-](https://doi.org/10.1007/s10530-007-9132-y)
 2959 [9132-y](https://doi.org/10.1007/s10530-007-9132-y)
- 2960 Pujol, B., Wilson, A. J., Ross, R. I. C., & Pannell, J. R. (2008). Are Q ST - F ST comparisons
 2961 for natural populations meaningful? *Molecular Ecology*, *17*(22), 4782-4785.
 2962 <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2008.03958.x>
- 2963 Pyšek, P., & Richardson, D. M. (2008). Invasive Plants. En S. E. Jørgensen & B. D. Fath
 2964 (Eds.), *Ecological Engineering. Vol. [3] of Encyclopedia of Ecology* (pp. 2011-2020).
 2965 Oxford: Elsevier.
- 2966 Radeloff, V. C., Mladenoff, D. J., Guries, R. P., & Boyce, M. S. (2004). Spatial patterns of
 2967 cone serotiny in *Pinus banksiana* in relation to fire disturbance. *Forest Ecology and*
 2968 *Management*, *189*(1-3), 133-141. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2003.07.040>
- 2969 Radosevich, S. R., Stubbs, M. M., & Ghera, C. M. (2003). *Plant invasions — process and*
 2970 *patterns*. *51*(2), 254-259. [https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1614/0043-](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0254:PIPAP]2.0.CO;2)
 2971 [1745\(2003\)051\[0254:PIPAP\]2.0.CO;2](https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0254:PIPAP]2.0.CO;2)
- 2972 Raffaele, E., Franzese, J., Ripa, R., Moreyra, A., Pissolito, C., & Blackhall, M. (2018). Una
 2973 nueva degradación de la tierra en Patagonia: retroalimentación positiva entre fuego e
 2974 invasión de pinos. En E. M. Abraham, A. Therburg, M. C. Rubio, P. Lizana, & C.
 2975 Bottero (Eds.), *I Jornada Nacional de la Evaluación Integrada de la Desertificación:*
 2976 *Enfoques y Metodologías Socioambientales* (pp. 49-52). Mendoza: Observatorio
 2977 Nacional de la Degradación de Tierras y Desertificación - IADIZA.
- 2978 Raffaele, E., Nuñez, M. A., Eneström, J., & Blackhall, M. (2016). Fire as mediator of pine

2979 invasion: evidence from Patagonia, Argentina. *Biological Invasions*, 18(3), 597-601.
 2980 <https://doi.org/10.1007/s10530-015-1038-5>
 2981 Raffaele, E., Núñez, M. A., & Relva, M. A. (2015). Plantaciones de coníferas exóticas en
 2982 Patagonia: Los riesgos de plantar sin un manejo adecuado. *Ecologia Austral*, 25(2), 89-
 2983 92.
 2984 Ranker, T. A., Haufler, C. H., Soltis, P. S., & Soltis, D. E. (1989). Genetic Evidence for
 2985 Allopolyploidy in the Neotropical Fern *Hemionitis pinnatifida* (Adiantaceae) and the
 2986 Reconstruction of an Ancestral Genome. *Systematic Botany*, 14(4), 439.
 2987 <https://doi.org/10.2307/2418989>
 2988 RCoreTeam. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna,
 2989 Austria.: R Foundation for Statistical Computing.
 2990 Rejmanek, M., & Richardson, D. M. (1996). What Attributes Make Some Plant Species More
 2991 Invasive? *Ecology*, 77(6), 1655-1661. <https://doi.org/10.2307/2265768>
 2992 Rencher, A. C. (2003). *Methods of multivariate analysis* (Vol. 492). John Wiley & Sons.
 2993 Reyes, O., & Casal, M. (2004). Effects of forest fire ash on germination and early growth of
 2994 four pinus species. *Plant Ecology*, 175(1), 81-89.
 2995 <https://doi.org/10.1023/B:VEGE.0000048089.25497.0c>
 2996 Reyes, Otilia, & Casal, M. (1998). Germination of *Pinus pinaster*, *P. radiata* and *Eucalyptus*
 2997 *globulus* in relation to the amount of ash produced in forest fires. *Annales des Sciences*
 2998 *Forestieres*, 55(7), 837-845. <https://doi.org/10.1051/forest:19980707>
 2999 Richardson, D. M., & Higgins, S. I. (2000). Pines as invaders in the southern hemisphere. En
 3000 *Ecology and biogeography of Pinus* (Vol. 450, pp. 450–473). Cambridge University
 3001 Press.
 3002 Richardson, D. M., Pyšek, P., Rejmánek, M., Barbour, M. G., Dane Panetta, F., & West, C. J.
 3003 (2000). Naturalization and invasion of alien plants: Concepts and definitions. *Diversity*
 3004 *and Distributions*, 6(2), 93-107. <https://doi.org/10.1046/j.1472-4642.2000.00083.x>
 3005 Richardson, D. M., & Rejmánek, M. (2004). Conifers as invasive aliens: A global survey and
 3006 predictive framework. *Diversity and Distributions*, 10(5-6), 321-331.
 3007 <https://doi.org/10.1111/j.1366-9516.2004.00096.x>
 3008 Richardson, D. M., & Rundel, P. W. (1998). Ecology and biogeography of *Pinus*: an
 3009 introduction. *Ecology and biogeography of Pinus*, 3-46.
 3010 Roff, D. A. (2012). *Evolutionary quantitative genetics*. Springer Science & Business Media.
 3011 Rogers, D. L. (2004). In situ genetic conservation of a naturally restricted and commercially

3012 widespread species, *Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management*, 197(1-3), 311-
3013 322. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2004.05.022>

3014 Rogers, W. E., & Siemann, E. (2004). Invasive ecotypes tolerate herbivory more effectively
3015 than native ecotypes of the Chinese tallow tree *Sapium sebiferum*. *Journal of applied*
3016 *ecology*, 41(3), 561-570.

3017 Roy, D. F. (1966). Silvical Characteristics of Monterey Pine (*Pinus radiata*). *U.S. Forest*
3018 *Service Research Paper PSW - 31*, 1-21. Recuperado de
3019 https://www.fs.fed.us/psw/publications/documents/psw_rp031/psw_rp031.pdf

3020 Sahin, C. (2016). Comparison and Calibration of Mobile Phone Fisheye Lens and Regular
3021 Fisheye Lens via Equidistant Model. *Journal of Sensors*, 2016, 1-11.
3022 <https://doi.org/10.1155/2016/9379203>

3023 Schaefer, C. H. (1962). Life History of *Conophthorus radiatae* (Coleoptera: Scolytidae) and
3024 its Principal Parasite, *Cephalonomia utahensis* (Hymenoptera: Bethyilidae)1. *Annals of*
3025 *the Entomological Society of America*, 55(5), 569-577.
3026 <https://doi.org/10.1093/aesa/55.5.569>

3027 Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years
3028 of image analysis. *Nature methods*, 9(7), 671.

3029 Schober, P., & Vetter, T. R. (2018). Survival analysis and interpretation of time-to-event
3030 data: the tortoise and the hare. *Anesthesia and analgesia*, 127(3), 792.

3031 Scholz, F. W., & Stephens, M. A. (1987). K-sample Anderson–Darling tests. *Journal of the*
3032 *American Statistical Association*, 82(399), 918-924.
3033 <https://doi.org/10.1080/01621459.1987.10478517>

3034 Schooler, S. S., Cook, T., Prichard, G., & Yeates, A. G. (2010). Disturbance-mediated
3035 competition: The interacting roles of inundation regime and mechanical and herbicidal
3036 control in determining native and invasive plant abundance. *Biological Invasions*, 12(9),
3037 3289-3298. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9722-y>

3038 Schrieber, K., & Lachmuth, S. (2017). The genetic paradox of invasions revisited: the
3039 potential role of inbreeding× environment interactions in invasion success. *Biological*
3040 *Reviews*, 92(2), 939-952.

3041 Schwilk, D. W., & Ackerly, D. D. (2001). Flammability and serotiny as strategies: correlated
3042 evolution in pines. *Oikos*, 94(2), 326-336. [https://doi.org/10.1034/j.1600-](https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.940213.x)
3043 [0706.2001.940213.x](https://doi.org/10.1034/j.1600-0706.2001.940213.x)

3044 Schwilk, D. W., & Caprio, A. C. (2011). Scaling from leaf traits to fire behaviour:

3045 community composition predicts fire severity in a temperate forest. *Journal of Ecology*,
3046 99(4), 970-980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2745.2011.01828.x>

3047 Silva, J. S., dos Santos, P., Sérgio, A., & Gomes, F. (2016). Effects of heat on dehiscence and
3048 germination in *Eucalyptus globulus* Labill. *International Journal of Wildland Fire*,
3049 25(4), 478. <https://doi.org/10.1071/WF15078>

3050 Simberloff, D. (2009). The Role of Propagule Pressure in Biological Invasions. *Annual*
3051 *Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 40(1), 81-102.
3052 <https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120304>

3053 Simberloff, D., Nuñez, M. A., Ledgard, N. J., Pauchard, A., Richardson, D. M., Sarasola, M.,
3054 ... Ziller, S. R. (2010). Spread and impact of introduced conifers in South America:
3055 Lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecology*, 35(5), 489-504.
3056 <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2009.02058.x>

3057 Spitze, K. (1993). Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic
3058 variation. *Genetics*, 135(2), 367-374.

3059 Stenberg, P., Linder, S., Smolander, H., & Flower-Ellis, J. (1994). Performance of the LAI-
3060 2000 plant canopy analyzer in estimating leaf area index of some Scots pine stands. *Tree*
3061 *Physiology*, 14(7-9), 981-995. <https://doi.org/10.1093/treephys/14.7-8-9.981>

3062 Stephens, S. L., Piirto, D. D., & Caramagno, D. F. (2004). Fire Regimes and Resultant Forest
3063 Structure in the Native Año Nuevo Monterey Pine (*Pinus radiata*) Forest, California. *The*
3064 *American Midland Naturalist*, 152(1), 25-36. [https://doi.org/10.1674/0003-](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2004)152[0025:frarfs]2.0.co;2)
3065 [0031\(2004\)152\[0025:frarfs\]2.0.co;2](https://doi.org/10.1674/0003-0031(2004)152[0025:frarfs]2.0.co;2)

3066 Suarez, A. V., & Tsutsui, N. D. (2008). The evolutionary consequences of biological
3067 invasions. *Molecular Ecology*, 17(1), 351-360.

3068 Sultan, S. E., Horgan-Kobelski, T., Nichols, L. M., Riggs, C. E., & Waples, R. K. (2013). A
3069 resurrection study reveals rapid adaptive evolution within populations of an invasive
3070 plant. *Evolutionary Applications*, 6(2), 266-278. [https://doi.org/10.1111/j.1752-](https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00287.x)
3071 [4571.2012.00287.x](https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2012.00287.x)

3072 Taylor, K. T., Brummer, T., Rew, L. J., Lavin, M., & Maxwell, B. D. (2014). *Bromus*
3073 *tectorum* Response to Fire Varies with Climate Conditions. *Ecosystems*, 17(6), 960-973.
3074 <https://doi.org/10.1007/s10021-014-9771-7>

3075 Thanos, C. A. (2004). Bradychory—the coining of a new term. *Proceedings 10th MEDECOS*
3076 *conference, Rhodes, Greece. Millpress, Rotterdam, ISBN, 90(5966), 16.*

3077 Thanos, C. A., Daskalaku, E. N., & Nikolaidou, S. (1996). Early post-fire regeneration of a

3078 Pinus halepensis forest on Mount Párnis, Greece. *Journal of Vegetation Science*, 7(2),
3079 273-280. <https://doi.org/10.2307/3236328>

3080 Theoharides, K. A., & Dukes, J. S. (2007). Plant invasion across space and time: Factors
3081 affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. *New*
3082 *Phytologist*, 176(2), 256-273. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02207.x>

3083 Thuiller, W., Richardson, D. M., Rouget, M., Procheş, Ş., & Wilson, J. R. U. (2006).
3084 Interactions between environment, species traits, and human uses describe patterns of
3085 plant invasions. *Ecology*, 87(7), 1755-1769. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2006\)87\[1755:IBESTA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1755:IBESTA]2.0.CO;2)

3087 Todorović, S., Božić, D., Simonović, A., Filipović, B., Dragićević, M., Giba, Z., & Grubišić,
3088 D. (2010). Interaction of fire-related cues in seed germination of the potentially invasive
3089 species *Paulownia tomentosa* Steud. *Plant Species Biology*, 25(3), 193-202.
3090 <https://doi.org/10.1111/j.1442-1984.2010.00293.x>

3091 Toro, J., & Gessel, S. P. (1999). Radiata pine plantations in Chile. *New Forests*, 18(1), 33-44.
3092 <https://doi.org/10.1023/A:1006597823190>

3093 Tyler, C. M. (1995). Factors contributing to postfire seedling establishment in chaparral:
3094 direct and indirect effects of fire. *Journal of ecology*, 1009-1020.

3095 Urretavizcaya, M. F. M. F., & Defossé, G. E. (2004). Soil seed bank of *Austrocedrus*
3096 *chilensis* (D. Don) Pic. Serm. et Bizarri related to different degrees of fire disturbance in
3097 two sites of southern Patagonia, Argentina. *Forest Ecology and Management*, 187(2-3),
3098 361-372. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2003.07.001>

3099 Valéry, L., Fritz, H., Lefeuvre, J. C., & Simberloff, D. (2008). In search of a real definition of
3100 the biological invasion phenomenon itself. *Biological Invasions*, 10(8), 1345-1351.
3101 <https://doi.org/10.1007/s10530-007-9209-7>

3102 Van Kleunen, M., Weber, E., & Fischer, M. (2010). A meta-analysis of trait differences
3103 between invasive and non-invasive plant species. *Ecology Letters*, 13(2), 235-245.
3104 <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01418.x>

3105 Van Staden, J, Jager, A. K., Light, M. E., & Burger, B. V. (2004). *Isolation of the major*
3106 *germination cue from plant-derived smoke*.

3107 Van Staden, Johannes, Brown, N. A. C., Jäger, A. K., & Johnson, T. A. (2000). Smoke as a
3108 germination cue. *Plant Species Biology*, 15(2), 167-178.

3109 van Wilgen, B. W., Forsyth, G. G., Le Maitre, D. C., Wannenburgh, A., Kotzé, J. D. F., van
3110 den Berg, E., & Henderson, L. (2012). An assessment of the effectiveness of a large,

3111 national-scale invasive alien plant control strategy in South Africa. *Biological*
3112 *Conservation*, 148(1), 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2011.12.035>

3113 van Wilgen, B. W., Reyers, B., Le Maitre, D. C., Richardson, D. M., & Schonegevel, L.
3114 (2008). A biome-scale assessment of the impact of invasive alien plants on ecosystem
3115 services in South Africa. *Journal of Environmental Management*, 89(4), 336-349.
3116 <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2007.06.015>

3117 van Wilgen, B. W., Richardson, D. M., Maitre, D. C. L. E., Marais, C., & Magadlela, D.
3118 (2001). The Economic Consequences of Alien Plant Invasions: Examples of Impacts
3119 and Approaches to Sustainable Management in South Africa. *Environment,*
3120 *Development and Sustainability*, 3, 145–168.
3121 <https://doi.org/https://doi.org/10.1023/A:1011668417953>

3122 Vaz, A. S., Kueffer, C., Kull, C. A., Richardson, D. M., Vicente, J. R., Kühn, I., ... Honrado,
3123 J. P. (2017). Integrating ecosystem services and disservices: insights from plant
3124 invasions. *Ecosystem Services*, 23, 94-107.

3125 Veblen, T. T., Holz, A., Paritsis, J., Raffaele, E., Kitzberger, T., & Blackhall, M. (2011).
3126 Adapting to global environmental change in Patagonia: what role for disturbance
3127 ecology? *Austral Ecology*, 36(8), 891-903.

3128 Veblen, T. T., & Kitzberger, T. (2002). Inter-hemispheric comparison of fire history: the
3129 Colorado front range, USA, and the northern Patagonian Andes, Argentina. *Plant*
3130 *Ecology*, 163(2), 187-207.

3131 Veblen, T. T., Kitzberger, T., Raffaele, E., & Lorenz, D. C. (2003). Fire history and
3132 vegetation changes in northern Patagonia, Argentina. En *Fire and climatic change in*
3133 *temperate ecosystems of the western Americas* (pp. 265-295). Springer.

3134 Veblen, T. T., & Lorenz, D. C. (1988). Recent vegetation changes along the forest/steppe
3135 ecotone of northern Patagonia. *Annals of the Association of American Geographers*,
3136 78(1), 93-111.

3137 Vilà, M., Basnou, C., Pyšek, P., Josefsson, M., Genovesi, P., Gollasch, S., ... Hulme, P. E.
3138 (2010). How well do we understand the impacts of alien species on ecosystem services?
3139 A pan-European, cross-taxa assessment. *Frontiers in Ecology and the Environment*,
3140 8(3), 135-144. <https://doi.org/10.1890/080083>

3141 Vilà, M., Espinar, J. L., Hejda, M., Hulme, P. E., Jarošík, V., Maron, J. L., ... Pyšek, P.
3142 (2011). Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on
3143 species, communities and ecosystems. *Ecology Letters*, 14(7), 702-708.

3144 <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01628.x>

3145 Vilà, M., & Hulme, P. E. (2017). *Impact of biological invasions on ecosystem services* (Vol. 12). Springer.

3146

3147 Vilà, M., & Pujadas, J. (2001). Land-use and socio-economic correlates of plant invasions in
3148 European and North African countries. *Biological Conservation*, *100*(3), 397-401.
3149 [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00047-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00047-7)

3150 Walsh, B., & Lynch, M. (2018). *Evolution and selection of quantitative traits*. Oxford
3151 University Press.

3152 Ward, A. S. M., Gaskin, J. F., & Wilson, L. M. (2019). Ecological Genetics of Plant
3153 Invasion : What Do We Know ? *BioOne*, *1*(1), 98-109. [https://doi.org/10.1614/IPSM-07-](https://doi.org/10.1614/IPSM-07-022.1)
3154 [022.1](https://doi.org/10.1614/IPSM-07-022.1)

3155 Whisenant, S. G. (1990). *Changing fire frequencies on Idaho's Snake River Plains:*
3156 *ecological and management implications*. 351.

3157 Whitney, K. D., & Gabler, C. A. (2008). Rapid evolution in introduced species, «invasive
3158 traits» and recipient communities: Challenges for predicting invasive potential. *Diversity*
3159 *and Distributions*, *14*(4), 569-580. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2008.00473.x>

3160 Willan, R. L. (1986). *A guide to forest seed handling*.

3161 Williams, M. C., & Wardle, G. M. (2005). The invasion of two native Eucalypt forests by
3162 *Pinus radiata* in the Blue Mountains, New South Wales, Australia. *Biological*
3163 *conservation*, *125*(1), 55-64.

3164 Williams, M. C., & Wardle, G. M. (2007). *Pinus radiata* invasion in Australia: Identifying
3165 key knowledge gaps and research directions. *Austral Ecology*, *32*(7), 721-739.
3166 <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2007.01760.x>

3167 Willis, A. J., Memmott, J., & Forrester, R. I. (2000). Is there evidence for the post-invasion
3168 evolution of increased size among invasive plant species? *Ecology Letters*, *3*(4), 275-
3169 283. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2000.00149.x>

3170 Woodard, P. M. (1983). Germination success of *Pinus contorta* Dougl. and *Picea*
3171 *Engelmannii* Parry on burned seedbeds. *Forest Ecology and Management*, *5*(4), 301-
3172 306. [https://doi.org/10.1016/0378-1127\(83\)90034-8](https://doi.org/10.1016/0378-1127(83)90034-8)

3173 Wright, S. (1951). The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, *15*, 323-354.

3174 Wu, H. X., Eldridge, K. G., Matheson, A. C., Powell, M. B., McRae, T. A., Butcher, T. B., &
3175 Johnson, I. G. (2007). Achievements in forest tree improvement in Australia and New
3176 Zealand 8. Successful introduction and breeding of radiata pine in Australia. *Australian*

3177 *Forestry*, 70(4), 215-225. <https://doi.org/10.1080/00049158.2007.10675023>

3178 Yang, R.-C. C., Yeh, F. C., & Yanchuk, A. D. (1996). A comparison of isozyme and
3179 quantitative genetic variation in *Pinus contorta* ssp. *latifolia* by FST. *Genetics*, 142(3),
3180 1045-1052.

3181 Zelener, N., Poltri, S. N. M., Bartoloni, N., Lopez, C. R., & Hopp, H. E. (2005). Selection
3182 strategy for a seedling seed orchard design based on trait selection index and genomic
3183 analysis by molecular markers: a case study for *Eucalyptus dunnii*. *Tree Physiology*,
3184 25(11), 1457-1467. <https://doi.org/10.1093/treephys/25.11.1457>

3185 Zhao, J., Solís-Montero, L., Lou, A., & Vallejo-Marín, M. (2013). Population structure and
3186 genetic diversity of native and invasive populations of *Solanum rostratum* (Solanaceae).
3187 *PLoS ONE*, 8(11), 1-9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0079807>

3188 Zuluaga, M. S., Acciaresi, H. A., & Chidichimo, H. O. (2004). Comparación de la viabilidad
3189 de las semillas obtenidas por medio de las técnicas de extracción física por lavado y de
3190 germinación. *Planta Daninha*, 22, 225-229.

3191

3192

3193

Agradecimientos

3194 En primer lugar agradezco a la Educación pública y Gratuita de nuestro País, en cuyas
3195 Universidades Nacionales he tenido el placer de formarme.

3196 A la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica y al Consejo Nacional de
3197 Investigaciones Científicas y Técnicas por el financiamiento de beca doctoral.

3198 Le agradezco a mis directoras, Andrea Premoli y Estela Raffaele, por la dedicación y apoyo
3199 que me han brindado, por sus consejos y sugerencias, por guiarme pero siempre respetando
3200 mis ideas y opiniones.

3201 A Jorgelina F., la mejor compañera de trabajo que me podría haber tocado, sin cuya guía y
3202 apoyo gran parte de esta tesis no hubiera sido posible, y sobre todo le agradezco por todos los
3203 buenos momentos compartidos en estos años. A Melisa B. por sus consejos (bibliográficos y
3204 de la vida), por las risas y las charlas de oficina.

3205 A todo el grupo de genética de Ecotono por los momentos compartidos, el apoyo y las ayudas
3206 en el laboratorio: Gri, Marian, Pau Q, Pau M, Cintia, Ivon, Day y Dai, Gabi y Lu.

3207 A todos mis compañeros del Laboratorio Ecotono y de INIBIOMA.

3208 A los integrantes de la Subsecretaría de Bosques e Incendios de Chubut y de la Brigada del
3209 Servicio Provincial de Manejo del Fuego de Puerto Patriada, por los permisos, la ayuda y la
3210 guía en todo el proceso de campo implicado en mi tesis.

3211 Gracias a los jurados, cuyos comentarios y sugerencias mejoraron la claridad y calidad del
3212 manuscrito.

3213 Gracias a mi familia. A mis padres por su amor y apoyo incondicional, por los valores que
3214 me han inculcado y por haberme dado la oportunidad de tener una excelente educación en el
3215 transcurso de mi vida, y sobre todo por ser un excelente ejemplo de vida a seguir. A mi
3216 hermana por ser tan importante en mi vida, por siempre estar ahí para aconsejarme en las
3217 crisis y por llenar mi vida de alegrías cuando más lo necesite.

3218 A mis amigos, gracias por el apoyo constante, por todos los momentos compartidos por los
3219 paseos y los consejos, por las ayudas en el campo y en el laboratorio, por las charlas
3220 presenciales y telefónicas.

3221 Gracias a todas las personas que hicieron esto posible.

3222

3223

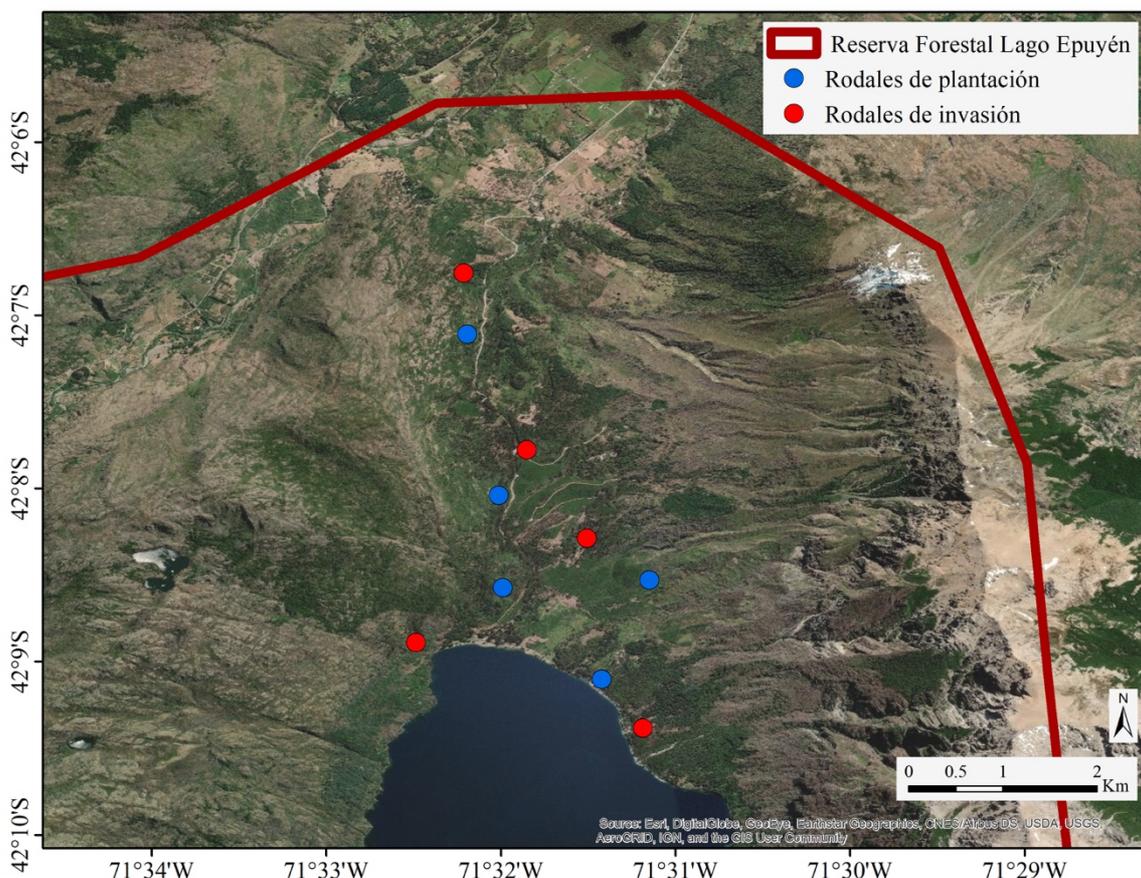
3224

3225

3226

Apéndices

3227



3230 **Figura S2.1:** Disposición de los rodales de Invasión (círculos rojos) y Plantación no quemada
 3231 (círculos azules) muestreados dentro de la Reserva Forestal Lago Epuyén.
 3232

3233 **Tabla S2.1.** Descripción en cuanto a la altitud, pendiente y exposición de los rodales de invasión (I) y
 3234 plantación (P) muestreados. La exposición se expresa en grados de orientación de brújula, donde 0 y
 3235 360° indican el Norte, 90° el Este, 180° el Sur y 270° el Oeste; la altitud se expresa en msn y la
 3236 pendiente en porcentaje.
 3237

	Pendiente	Altitud	Exposición
P			
R 1	6.43462	398	64.35529
R 2	10.61784	518	227.39427
R 3	6.48101	361	210.75842
R 4	12.41429	337	207.50807
R 5	6.48101	361	210.75842
I			
R 6	18.46354	424	186.24335

R 7	7.16499	416	211.32755
R 8	14.33077	403	186.52905
R 9	18.46354	424	186.24335
R 10	7.16499	416	211.32755

3239
3240
3241

Tabla S2.2: Estadísticas descriptivas y comparativas por rodal (R) de las características morfométricas, de *P. radiata* para rodales de plantación (P) y de invasión post-fuego (I). Variables comparadas: edad (años), diámetro a la altura del pecho (cm), altura (m), área de la copa (m²) y diámetro de la copa (m).

	Edad				DAP				Altura				Área de copa				Diámetro de copa			
	Media	SD	Max	Min	Media	SD	Max	Min	Media	SD	Max	Min	Media	SD	Max	Min	Media	SD	Max	Min
P																				
R 1	34.9	2.3	38	31	62.5	12.8	90	46	39	5.5	49.5	27.3	228.1	145.8	681.8	74.5	11.2	4.4	21.9	5.4
R 2	28.1	1.1	30	27	49.4	12.3	69.4	36.2	30.6	5.4	42	24.3	144.4	57.9	214.6	70.3	9.3	3	14	5.5
R 3	40.1	1.9	43	38	55.9	12.3	82	42	33.2	8.8	49.7	23.1	198	120.1	510.2	85.9	11.7	3.2	20	7.7
R 4	29.4	1.5	31	27	55.7	13.3	72	38	36.9	4.6	41.8	30.4	238.3	111.1	454.9	121.5	11.7	3.4	17.8	7.6
R 5	28.2	3.5	32	25	74.2	9.2	85.5	58.2	35.2	4.8	39.8	26.1	274	69.3	358.6	152.9	16.3	3.9	22.8	12
I																				
R 6	27.9	0.3	28	27	40.9	6.6	48	30.5	29.4	4.8	36.4	18.7	96.5	37.4	166.1	44.4	7.1	1.5	9.2	4.7
R 7	28	0	28	28	40.3	9.4	51	26.5	29.4	3.6	36.5	24.8	107.5	78.2	299.5	32.8	8.6	2.1	13.8	6.2
R 8	27.8	1.1	30	26	33.1	6.2	39.5	20.8	28.5	2.7	32.2	23.3	74.8	30.7	131.4	28.6	6.2	2.5	12.2	3.4
R 9	28	0	28	28	34.2	4.6	44	27.6	30.5	5.8	38.3	21.9	82.2	37.1	135	27	5.9	1.3	7.9	3.6
R 10	28.6	1	30	28	40.5	11.2	62	24	30.9	5.3	38	21	100.5	52.4	192.9	40.9	7.2	2.7	12.1	3.4

3242

3243 **Tabla S2.3.** Modelo lineal generalizado del efecto del tipo de rodal (Plantación [P] e Invasión [I]) de
 3244 *Pinus radiata*, densidad, edad, DAP y radiación solar sobre el grado de serotinia. El parámetro β
 3245 representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE
 3246 corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$.

	β estimado	SE	valor z	Pr(> z)	
Plantación (Intercepto)	1.74E+00	2.68E-01	6.504	7.84E-11	***
Invasión	3.92E+00	7.10E-01	5.515	3.48E-08	***
Densidad	-2.94E-04	5.52E-05	-5.328	9.91E-08	***
Edad	-7.10E-02	5.25E-03	-13.539	2.00E-16	***
DAP	8.32E-03	1.73E-03	4.813	1.49E-06	***
Radiación solar	3.15E-02	7.91E-03	3.982	6.83E-05	***

3247 **Apéndice 2: Material suplementario Capítulo 3**

3248

3249 **Tabla S3.1.** Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de
 3250 *Pinus radiata* y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico)
 3251 sobre el porcentaje de germinación. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad
 3252 de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro.
 3253 Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, .: $p < 0.1$.

	β estimado	SE	valor z	Pr(> z)	
Plantación Control (Intercepto)	1.443	0.218	6.620	0.000	***
Invasión	0.469	0.238	1.970	0.049	*
Ceniza	0.933	0.339	2.757	0.006	**
Temperatura 90	0.599	0.310	1.935	0.053	.
Temperatura 120	0.659	0.314	2.097	0.036	*

3254

3255 **Tabla S3.2.** Modelos de riesgo proporcional de Cox del efecto del origen de la semilla (Plantación e
 3256 Invasión) de *Pinus radiata* y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de
 3257 shock térmico) sobre la tasa de germinación. Los parámetros para plantación y tratamiento control no
 3258 son representados en el resumen ya que el modelo los incorpora como ordenada al origen.

3259

	Coefficiente	SE	valor z	p
Invasión	0.14397	0.15434	0.933	0.351
Ceniza	0.02137	0.15194	0.141	0.888
Temperatura 90	0.07548	0.15303	0.493	0.622
Temperatura 120	-0.08962	0.1535	-0.584	0.559
Invasión * Ceniza	0.04679	0.21303	0.22	0.826
Invasión * Temperatura 90	-0.07704	0.21439	-0.359	0.719
Invasión * Temperatura 120	0.22962	0.21447	1.071	0.284

3260

3261 **Tabla S3.3.** Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de
 3262 *P. radiata* y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de shock térmico)
 3263 sobre la longitud de la radícula. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x
 3264 para cada variable independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de
 3265 significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$.

	β estimado	SE	valor t	Pr(> t)	
Plantación * Control (Intercepto)	5.76	0.2141	26.907	2.00E-16	***
Invasión	-0.96	0.3027	-3.171	0.00167	**
Ceniza	-0.725	0.3027	-2.395	0.017219	*
Temperatura 90	-1.1025	0.3027	-3.642	0.000317	***
Temperatura 120	0.4575	0.3027	1.511	0.13175	

Invasión * Ceniza	2.105	0.4281	4.917	1.43E-06	***
Invasión * Temperatura 90	2.66	0.4281	6.213	1.66E-09	***
Invasión * Temperatura 120	1.37	0.4281	3.2	0.001516	**

3266
3267
3268
3269
3270
3271

Tabla S3.4. Comparaciones por pares para el modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla de *Pinus radiata* (Plantación e Invasión) y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de shock térmico) sobre la longitud de la radícula. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$, .: $p < 0.1$.

	β estimado	valor z	Pr(> z)	
I-90 vs I-120	-0.270	-0.892	0.987	
I-CE vs I-120	-0.448	-1.478	0.819	
I-CO vs I-120	-1.828	-6.037	0.001	***
P-120 vs I-120	-0.410	-1.354	0.878	
P-90 vs I-120	-1.970	-6.507	0.001	***
P-CE vs I-120	-1.593	-5.26	0.001	***
P-CO vs I-120	-0.868	-2.865	0.080	.
I-CE vs I-90	-0.178	-0.586	0.999	
I-CO vs I-90	-1.558	-5.145	0.001	***
P-120 vs I-90	-0.140	-0.462	1.000	
P-90 vs I-90	-1.700	-5.615	0.001	***
P-CE vs I-90	-1.323	-4.368	0.001	***
P-CO vs I-90	-0.598	-1.974	0.500	
I-CO vs I-CE	-1.380	-4.558	0.001	***
P-120 vs I-CE	0.038	0.124	1.000	
P-90 vs I-CE	-1.523	-5.029	0.001	***
P-CE vs I-CE	-1.145	-3.782	0.004	**
P-CO vs I-CE	-0.420	-1.387	0.863	
P-120 vs I-CO	1.418	4.682	0.001	***
P-90 vs I-CO	-0.143	-0.471	1.000	
P-CE vs I-CO	0.235	0.776	0.994	
P-CO vs I-CO	0.960	3.171	0.033	*
P-90 vs P-120	-1.560	-5.153	0.001	***
P-CE vs P-120	-1.183	-3.906	0.002	**
P-CO vs P-120	-0.458	-1.511	0.802	
P-CE vs P-90	0.378	1.247	0.918	
P-CO vs P-90	1.103	3.642	0.007	**
P-CO vs P-CE	0.725	2.395	0.244	

3272
3273
3274

Tabla S3.5. Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla de *Pinus radiata* (Plantación e Invasión) y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90° y 120° C de

3275 shock térmico) sobre la presencia de cotiledones al final del experimento. El parámetro β representa
 3276 el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al
 3277 error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: $p < 0.01$, *: $p < 0.05$,
 3278 $\therefore p < 0.1$.

	β estimado	SE	valor z	Pr(> z)	
Plantación * Control (Intercepto)	-1.381	0.29	-4.764	1.90E-06	***
Invasión	1.681	0.247	6.785	1.16E-11	***
Ceniza	0.2432	0.349	0.697	0.4861	
Temperatura 90	0.8392	0.351	2.389	0.016	*
Temperatura 120	0.6006	0.349	1.72	0.085	.

3279 **Tabla S3.6.** Comparaciones por pares para el modelo lineal generalizado del efecto del origen de la
 3280 semilla de *Pinus radiata* (Plantación e Invasión) y los tratamientos asociados a fuego (Control,
 3281 Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico) sobre la presencia de cotiledones al final del experimento. El
 3282 parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y
 3283 SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$, **: p
 3284 < 0.01 , *: $p < 0.05$, $\therefore p < 0.1$.

3286

	β estimado	SE	valor z	Pr(> z)	
I-90 vs I-120	1.7918	0.618	2.899	0.07078	.
I-CE vs I-120	0.3254	0.467	0.697	0.99702	
I-CO vs I-120	-0.4055	0.4518	-0.897	0.98602	
P-120 vs I-120	-0.7077	0.4544	-1.558	0.77179	
P-90 vs I-120	-1.6422	0.4975	-3.301	0.02096	*
P-CE vs I-120	-1.7918	0.5103	-3.511	0.01055	*
P-CO vs I-120	-1.3749	0.4791	-2.87	0.0766	.
I-CE vs I-90	-1.4663	0.6259	-2.343	0.26578	
I-CO vs I-90	-2.1972	0.6146	-3.575	0.00794	**
P-120 vs I-90	-2.4995	0.6165	-4.055	0.00119	**
P-90 vs I-90	-3.434	0.6489	-5.292	0.001	***
P-CE vs I-90	-3.5835	0.6588	-5.44	0.001	***
P-CO vs I-90	-3.1666	0.6349	-4.987	0.001	***
I-CO vs I-CE	-0.7309	0.4626	-1.58	0.75848	
P-120 vs I-CE	-1.0332	0.465	-2.222	0.33318	
P-90 vs I-CE	-1.9677	0.5073	-3.879	0.00251	**
P-CE vs I-CE	-2.1172	0.5198	-4.073	0.00112	**
P-CO vs I-CE	-1.7003	0.4892	-3.475	0.01171	*
P-120 vs I-CO	-0.3023	0.4498	-0.672	0.99763	
P-90 vs I-CO	-1.2368	0.4933	-2.507	0.18846	
P-CE vs I-CO	-1.3863	0.5062	-2.739	0.10882	

P-CO vs I-CO	-0.9694	0.4748	-2.042	0.44795
P-90 vs P-120	-0.9345	0.4957	-1.885	0.55552
P-CE vs P-120	-1.084	0.5085	-2.132	0.38901
P-CO vs P-120	-0.6671	0.4772	-1.398	0.85572
P-CE vs P-90	-0.1495	0.5474	-0.273	0.99999
P-CO vs P-90	0.2674	0.5184	0.516	0.99957
P-CO vs P-CE	0.4169	0.5307	0.786	0.99371

3287
3288 **Tabla S3.7.** Modelo lineal generalizado del efecto del origen de la semilla (Plantación e Invasión) de
3289 *Pinus radiata* y los tratamientos asociados a fuego (Control, Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico)
3290 sobre la supervivencia de las plántulas a los 30 días del trasplante. El parámetro β representa el
3291 cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable independiente, y SE corresponde al error
3292 estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***: $p < 0.001$.

	β estimado	SE	valor z	Pr(> z)	
Plantación * Control (Intercepto)	-1.6776	0.3249	-5.164	2.42E-07	***
Invasión	1.748	0.3068	5.698	1.21E-08	***
Ceniza	2.332	0.4043	5.767	8.05E-09	***
Temperatura 90	1.5423	0.3717	4.15	3.33E-05	***
Temperatura 120	3.023	0.4541	6.657	2.80E-11	***

3294
3295 **Tabla S3.8.** Comparaciones por pares para el modelo lineal generalizado del efecto del origen de la
3296 semilla (Plantación e Invasión) de *Pinus radiata* y los tratamientos asociados a fuego (Control,
3297 Ceniza, y 90 y 120 C de shock térmico) sobre la supervivencia de las plántulas a los 30 días del
3298 trasplante. El parámetro β representa el cambio en probabilidad por unidad de x para cada variable
3299 independiente, y SE corresponde al error estándar de dicho parámetro. Códigos de significancia: ***:
3300 $p < 0.001$, **: $p < 0.01$.

	β estimado	SE	valor z	Pr(> z)	
I-CE vs I-CO	2.351	0.576	4.076	0.001	***
I-T120 vs I-CO	3.349	0.794	4.219	0.001	***
I-T90 vs I-CO	18.97	0.319	0.018	0.001	***
P-CE vs I-CO	1.252	0.472	2.652	0.112	
P-CO vs I-CO	-0.563	0.479	-1.177	0.922	
P-T120 vs I-CO	1.791	0.510	3.511	0.008	**
P-T90 vs I-CO	-0.441	0.472	-0.935	0.977	
I-T120 vs I-CE	0.998	0.868	1.149	0.931	
I-T90 vs I-CE	16.62	0.319	0.016	1	
P-CE vs I-CE	-1.098	0.589	-1.863	0.524	
P-CO vs I-CE	-2.915	0.594	-4.9	0.001	***
P-T120 vs I-CE	-0.559	0.620	-0.902	0.981	

P-T90 vs I-CE	-2.793	0.589	-4.738	0.001	***
I-T90 vs I-T120	15.62	0.3	0.015	1	
P-CE vs I-T120	-2.097	0.803	-2.611	0.124	
P-CO vs I-T120	-3.913	0.807	-4.848	0.001	***
P-T120 vs I-T120	-1.558	0.826	-1.886	0.508	
P-T90 vs I-T120	-3.791	0.803	-4.72	0.001	***
P-CE vs I-T90	-17.71	0.319	-0.017	1	
P-CO vs I-T90	-19.53	0.319	-0.019	1	
P-T120 vs I-T90	-17.17	0.319	-0.017	1	
P-T90 vs I-T90	-19.41	0.319	-0.019	0.001	***
P-CO vs P-CE	-1.816	0.494	-3.674	0.004	**
P-T120 vs P-CE	0.539	0.524	1.027	0.961	
P-T90 vs P-CE	-1.694	0.488	-3.473	0.009	**
P-T120 vs P-CO	2.355	0.530	4.439	0.001	***
P-T90 vs P-CO	0.122	0.494	0.247	1	
P-T90 vs P-T120	-2.233	0.524	-4.257	0.001	***

3301

3302 **Apéndice 3: Material suplementario Capítulo 5**

3303

3304 **Tabla S 5.1.** Resultados de la asociación de los loci bajo selección con las bases de datos de
 3305 datos GenBank y con las bases de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-
 3306 EBI). Para cada loci (L) se indica: en que comparación (C) resultado indicado como bajo
 3307 selección (rangos [R] o cohortes [Co]), el gen o familia de genes con los que demostró mayor
 3308 similitud así como una descripción de la función de dicho gen y las principales especies a las
 3309 que correspondían las secuencias reportadas para dicho gen y con las que demostró similitud
 3310 nuestra secuencia. Las celdas en color verde indican que se encontró similitud para ese loci
 3311 con un gen cuya función esta descripta; las celdas de color amarillo que se encontró similitud
 3312 con secuencias de ARNm lo que no indica que puede ser una secuencia expresada pero sin
 3313 producto proteico reportado; y por ultimo las celdas de color rojo indican que no se
 3314 encontraron secuencias similares en bases de datos.

3315

L	C	Gen	Función	Especies coincidentes
30	R	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	Organización de la pared celular, desarrollo del embrión, fase de latencia de la semilla, establecimiento de la localización de las proteínas, desarrollo de la epidermis de la planta, homeostasis de potasio, regulación de la división celular, regulación de la especificación del destino celular, regulación del desarrollo y morfogénesis de las raíces, respuesta a las heridas, especificación de la polaridad del eje de los órganos de la planta, homeostasis del agua, transporte de agua.	<i>Brassica oleracea</i>
92	R	LRR receptor-like serine/threonine-protein kinase	Organización de la pared celular, desarrollo del embrión, fase de latencia de la semilla, establecimiento de la localización de las proteínas, desarrollo de la epidermis de la planta, homeostasis de potasio, regulación de la división celular, regulación de la especificación del destino celular, regulación del desarrollo y morfogénesis de las raíces, respuesta a las heridas,	<i>Cunninghamia lanceolata</i>

			especificación de la polaridad del eje de los órganos de la planta, homeostasis del agua, transporte de agua.	
146	C o	mRNA		<i>Picea glauca</i>
366	C o	NADH dehydrogenase subunit 5 (nad5)	Respiración celular	<i>Pinus sp. (30 especies)</i>
506	C o	F-box protein	Las proteínas F-box están involucradas en el crecimiento y desarrollo vegetativo y reproductivo de muchas plantas. Por ejemplo, la proteína F-box-FOA1 está involucrada en la señalización del ácido abscísico (ABA) para afectar la germinación de la semilla.	<i>Pinus taeda</i>
518	C o	12-oxophytodienoate reductase 7	Proceso biosintético del ácido jasmónico, proceso biosintético de la oxilipina, respuesta frente a los hongos, respuesta al ozono, desarrollo de los estambres.	<i>Pinus taeda, Pinus contorta</i>
565	C o	Nucleoside phosphatase	Producción de energía	<i>Pinus taeda y Macleaya cordata</i>
576	C o	mRNA		<i>Pinus banksiana, Picea sitchensis y Picea glauca</i>
797	R / C o	Protein phosphatase 2C (PP2C)	Señalización por ABA, reguladores de varias vías de transducción de señales	<i>Pinus taeda y Arabidopsis thaliana</i>
1228	R	12-oxophytodienoate reductase 7	Proceso biosintético del ácido jasmónico, proceso biosintético de la oxilipina, respuesta frente a los hongos, respuesta al ozono, desarrollo de los estambres.	<i>Pinus contorta</i>
1552	C o	NA	NA	NA

166 2	R	Pectate liasa	Controlan la remodelación de la pared celular en una amplia gama de procesos de desarrollo de las plantas.	<i>Pinus radiata</i> (mRNA) y <i>Eutrema salsugineum</i> (proteína putativa)
171 0	C o	NA	NA	NA
190 5	C o	Protein SULFUR DEFICIENCY-INDUCED 1 (SDI1)	Respuesta celular a la deficiencia de azufre, regulación del proceso biosintético del glucosinolato, regulación de la utilización de azufre	<i>Larix kaempferi</i> y <i>Nymphaea colorata</i>
197 2	R	Proteína de repetición de pentatricopepti de	Las proteínas de repetición de pentatricopeptide (PPR) son una gran familia de proteínas modulares de unión al ARN que median varios aspectos de la expresión génica principalmente en los orgánulos pero también en el núcleo. Estas proteínas facilitan el procesamiento, el empalme, la edición, la estabilidad y la traducción de los ARN.	<i>Larix kaempferi</i> (mRNA), <i>Picea glauca</i> (mRNA) y <i>Arabidopsis thaliana</i> (proteína putativa).
206 6	C o	isoflavone 3'-hydroxylase	Defensa contra patógenos y respuestas inducidas por insectos	<i>Pinus taeda</i>
227 0	R	mRNA		<i>Pinus taeda</i> y <i>Pinus silvestris</i>
232 1	C o	NA	NA	NA
240 6	C o	NA	NA	NA
267 7	R	ATP-dependent RNA helicase, chloroplastic-like	Procesamiento del ARN	<i>Larix kaempferi</i>
272 5	R	Protein ENHANCED DISEASE RESISTANCE 2	Vías de señalización activada por etileno, regulación negativa de la senescencia de la hoja, respuesta hipersensible de la planta, regulación de la respuesta de defensa contra los hongos, respuesta al etileno, respuesta al ácido salicílico.	<i>Pinus radiata</i> , y <i>Eutrema salsugineum</i>
321 7	R	Signal peptide peptidase-like	Proteólisis de proteínas de la membrana	<i>Picea glauca</i> y <i>Amborella trichopoda</i>
332 7	R	Protein unc-13 homolog	Movimiento estomal	<i>Pinus banksiana</i> , <i>Ziziphus jujuba</i>
373 6	R	Proteína con dominio dedo de Zinc	Regulación de la transcripción	<i>Pinus banksiana</i> y <i>Sesamum indicum</i>

420			NA		NA		NA
9	R						
748			mRNA				<i>Pinus pinaster y Picea glauca</i>
5	R						
850			NA		NA		NA
5	C						
244			mRNA				<i>Pinus silvestris</i>
67	R						

3316



Increased canopy seed-storage in post-fire pine invaders suggests rapid selection mediated by fire

Ramiro R. Ripa^{a,*}, Jorgelina Franzese^a, Andrea C. Premoli^b, Estela Raffaele^a

^aLaboratorio Ecotono, Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Universidad Nacional del Comahue - CONICET, Quintral 1250, 8400 San Carlos de Bariloche, RN, Argentina

^bInstituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente, Universidad Nacional del Comahue - CONICET, Quintral 1250, 8400 San Carlos de Bariloche, RN, Argentina

Received 5 August 2019; accepted 10 April 2020
Available online 26 April 2020

Abstract

Exotic species storing seeds in the canopy (serotinous species) can experience a clear advantage in fire-prone communities that lack native taxa with such fire-resistant traits. In addition, selection in the new environment can potentially increase the frequency of fire-adapted characteristics such as serotiny. We studied the potential role of fire favoring the serotinous, non-native conifer *Pinus radiata* in NW Patagonia. We characterized the degree of serotiny (percentage of serotinous cones) and the size of the canopy seed bank in the unburned plantation and in stands of trees recruited after a fire 30 years ago as a proxy for invasion potential. Fire had a positive effect, increasing serotiny in post-fire *P. radiata* stands. Post-fire recruited cohorts showed higher serotiny levels and a larger canopy seed bank compared with plantations. Our study suggests that fire-linked traits like serotiny may be subjected to a rapid, fire-driven selection process in fire-adapted species such as *P. radiata* invading fire-prone ecosystems. Thus, increased serotiny can lead to higher postfire invasion densities, which in turn create a positive feedback loop in invaded areas under recurrent fires.

© 2020 Gesellschaft für Ökologie. Published by Elsevier GmbH. All rights reserved.

Keywords: Canopy seed bank; Patagonia; Pine invasion; Post-fire regeneration; Rapid evolution

Introduction

Disturbance facilitates invasion, creating openings that exotic species can occupy (Boscutti, Sigura, De Simone & Marini, 2018; Jauni, Gripenberg & Ramula, 2015). If disturbance coincides with the availability of propagules of an exotic species, invasion of this species will be fostered. In addition, exotic species may alter the disturbance regime in some cases, promoting further invasion of the area (Buckley, Bolker & Rees, 2007; D'Antonio & Vitousek, 1992).

Introduced grasses are an example of this, as they increase fire frequency by increasing fuel load and fuelbed continuity, leading to positive feedback in terms of fire (Miller, Friedel, Adam & Chewings, 2010; Taylor, Brummer, Rew, Lavin & Maxwell, 2014; Whisenant, 1990).

Fire can be considered an important factor in the invasiveness of some exotic plants, particularly if the species have a number of characteristics that allow them to persist and reproduce after fire (Keeley, 1998; Lamont, He & Yan, 2019; Pausas & Bradstock, 2007). Woody species adapted to fire, such as serotinous species, can also invade after fire and modify the fire regime. These species exhibit seed-storing with pyriscence; they maintain a seed bank stored in the

*Corresponding author.

E-mail address: ramiro.ripa@gmail.com (R.R. Ripa).

canopy that is released by stand-killing fires (Lamont, Le Maitre, Cowling & Enright, 1991). This fire-adapted trait maximizes seed availability and establishment in post-fire stands under minimal competition, when conditions are therefore most favorable for seedling recruitment (Lamont & Enright, 2000).

The degree of serotiny can vary widely between individuals, populations and species as a result of various factors. The most important of these factors is usually associated with differences in the frequency and intensity of fires in a given habitat (Gauthier, Bergeron & Simon, 1996; Radeloff, Mladenoff, Guries & Boyce, 2004). In fire-prone environments, fire occurrence should favor the reproduction and spread of highly serotinous individual trees, since massive and synchronic release of propagules produced by serotinous cones will be favored (Goubitz, Nathan, Roitemberg, Shmida & Ne'eman, 2004; Lotan, 1976). Yet, some costs are associated with the maintenance of serotiny such as the release of seeds during dry and hot years, which may deplete the canopy seed bank and reduce the potential for post-fire regeneration (Martín-Sanz et al., 2016). Nonetheless, introduced serotinous species can experience a clear advantage in fire-prone communities lacking native species with this trait (Franzese & Raffaele, 2017; Raffaele, Nuñez, Eneström & Blackhall, 2016) and in the long term, successive fire events could increase the frequency of individuals highly adapted to fire. Hence, fire-prone environments would be highly susceptible to invasion by serotinous species (Davis, Maxwell & Caplat, 2019; Franzese & Raffaele, 2017).

Various pine species have been cultivated for forestry purposes in the Southern Hemisphere, and these have spread from plantations, invading adjacent areas (Richardson & Higgins, 2000). Many of the species introduced into South America inhabit fire-prone environments similar to their native ranges, and at least five of these are serotinous: *Pinus contorta*, *P. radiata*, *P. pinaster*, *P. halepensis* and *P. serotina* (Schwilk & Ackerly, 2001; Simberloff et al., 2010). The biodiversity and dynamics of many native ecosystems in South America have been severely impacted by pine invasion, in diverse ways (Estades Marfán, 1994; García et al., 2018; Lantschner, Rusch & Hayes, 2013; Machado, Moreira & Maltchik, 2012; Simberloff et al., 2010). In Northern Patagonia, large areas of native forest have been replaced by plantations of non-native pines, some of which have adaptations to fire. In the present work we studied the potential role of fire as a selective agent on serotiny, an adaptive character in *Pinus radiata*. This is a non-native conifer species that has been introduced into Northwestern Patagonia, and is the most widely planted forest species around the world (Mead, 2013). We characterized and compared the degree of serotiny and the abundance of the canopy seed bank in unburned plantations and in post-fire invaded areas with individuals recruited 30 years ago. We expected that individuals recruited after fire would present a greater degree of serotiny and seed abundance in the canopy seed bank than those from the unburned plantations. An increment in the

serotiny level in pines recruited after fire would indicate an ongoing selection process by fire on a trait which is crucial in determining pine invasion in areas of the Southern Hemisphere (Franzese & Raffaele, 2017).

Materials and methods

Study species

Pinus radiata D. Don is a species native to the Pacific coast of North America. Although fossil records indicate a widespread historical range, it currently consists of only five geographically restricted populations: three continental ones located on the coast of California and two island populations in Mexico (Rogers, 2004). In contrast to its restricted natural range, *P. radiata* has been widely planted around the world, such as in New Zealand, Spain, Australia, South Africa and Chile, and its introduced range surpassed the area covered by natural populations (Mead, 2013). It is a serotinous species highly adapted to fire, with a post-fire recruiting-type strategy (Stephens, Piirto & Caramagno, 2004).

Study site

This study was carried out in Reserva Forestal Lago Epuyén (42°17'–42°05'S and 71°24'–71°37' W), in Northern Patagonia, Argentina. The reserve originally consisted of mixed *Austrocedrus chilensis*-*Nothofagus dombeyi* forests. During the 1960s and 1970s this area was subjected to forestation plans using introduced species including *Pinus ponderosa*, *P. contorta*, *P. jeffreyi*, *Pseudotsuga menziesii* and *P. radiata* (Manfredi et al., 1999), the latter being the only Pinaceae that later massively invaded the reserve, particularly after fire.

The natural history of this region has been marked by the occurrence of extensive fires. Studies of ¹⁴C indicate an average fire interval of 100 years (Goldammer, Cwielong, Rodriguez & Goergen, 1996). Nevertheless, existing evidence shows an increase in fire frequency during the last three decades when four large fires affected almost 90% of the reserve (Manfredi et al., 1999). Following the fires, *P. radiata* invaded adjacent burned areas, and as a result several hectares inside the reserve are now covered by monospecific *P. radiata* stands produced after different fire events (mainly in 1987, 2012, and 2015), while recruitment during inter-fire periods was almost nil. Other originally planted pine species are no longer found in the site and native forest remains only as isolated patches. Plantations not affected by fire are also present in the area. Fire history and the introduction and spread of introduced pines can be considered the most relevant disturbances to have shaped the landscape of the Reserve. We, therefore sampled unburned plantations and stands of adult trees, which had been recruited after fires.

Sampling design

In spring and summer 2017 plantation and post-fire invaded stands of *P. radiata*, were selected within the study site. The post-fire invaded stands originated from a mature plantation, which burned in 1987, and thus consisted of c. 30-year-old individuals at the time of sampling. In certain cases, groups of individuals from plantation and post-fire invasion were interspersed in the landscape, so in order to assign each sampled individual to a stand type we determined the age of all sampled individuals by dendrochronology. A given individual was classified as belonging to a post-fire invaded stand if its age was 28 to 30 years [two years is the average period of time necessary for post-fire establishment for different serotinous pine species (Calvo, Hernández, Valbuena & Taboada, 2016; Thanos, Daskalou & Nikolaidou, 1996)]; otherwise it was classified as belonging to the plantation stand. The plantations in the study site were established in different years. Nonetheless, sampled individuals at each plantation stand were relatively homogenous in terms of age and size (See Appendix A: Table 1). In addition, plantation trees were on average only 5 years older than those from invasion (Table 1), therefore possible effects of tree and cone age on cone production and degree serotiny are minimized. Neither the original plantations nor the invaded stands had undergone management.

The degree of serotiny and the abundance of the canopy seed bank in plantations and in post-fire invaded areas were estimated by three measures: (1) the percent serotiny was estimated as the number of serotinous over the total number of cones, i.e. serotinous plus non-serotinous cones per tree, (2) the number of viable seeds per cone, and (3) the number of trees per stand. (1) To estimate the percentage of serotiny we sampled ten randomly chosen trees at five replicates of each stand type, totaling 100 sampled trees (i.e. 10 trees/stand x 5 stands [replicates] x 2 stand types [plantation and post-fire invaded stands]). The percentage of serotiny of each individual was determined photographically. This consisted of sideways photographs of the tree profile being taken of each tree with a camera equipped with a telephoto lens. These images were assembled in a high-quality panoramic frame that enabled cones to be counted and classified using

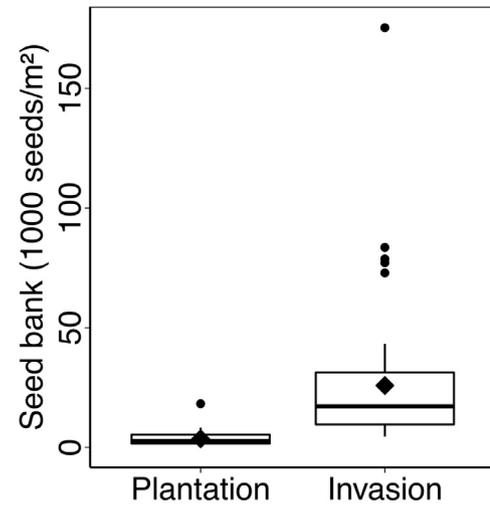


Fig. 1. *Pinus radiata* seed density comparison (as number of viable seeds per square meter) between plantation and post-fire invasion. Boxplots indicate the median (horizontal line), the mean (black diamond), the first and third quartiles (box), the range that excludes outliers (vertical line), and the outliers (black circles).

ImageJ software (Schneider, Rasband & Eliceiri, 2012) (See Appendix A: Fig. 1). Cones were classified as serotinous (closed till maturity), non-serotinous (partially or totally open) and immature. Immaturity was based on the color of the cones: cones that were green or intense brown in color were classified as immature, while mature serotinous cones were gray or light-brown in color (Goubitz et al., 2004). Immature cones were not considered for calculation of the serotiny percentage, since they could not be classified *a priori* as serotinous or non-serotinous. We consider this method suitable for radiata pine as the non-serotinous cones remain firmly attached to the tree even after opening, and the main cause of serotinous cones opening is fire (McDonald & Laacke, 1990; Stephens et al., 2004). Furthermore, in our case both types of stands are relatively young (Table 1) and can be considered to be at the same stage of their life cycle (Mead, 2013; Woollons & Manley, 2012). (2) The number of viable seeds per cone was estimated from a sample of 10 randomly selected trees that were cut down and from which 10 serotinous cones were collected at random from each

Table 1. Descriptive and comparative statistics of the morphometric and stand characteristics of *P. radiata* for plantation (P) and post-fire invasion (I) stands. Variables compared: age, height (H), diameter at breast height (DBH), crown area (CA), crown diameter (CD), tree density (D), canopy openness (CO) and total solar radiation (SR). Canopy openness was the only variable that did not show significant differences between stands.

Stand type	Age		H (m)		DBH (cm)		CA (m ²)		CD (m)		D (trees/ha)		CO (%)		SR (mol/m ²)	
	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I	P	I
Mean	33.9	28.1	35.4	29.7	59.3	37.8	145	63.4	11.7	7	1082	13,765	36.3	35.9	16.3	17.3
SD	5	0.7	6.8	4.4	13.7	8.3	88.8	38.4	4	2.2	185	757	8.1	3.7	3.7	1.5
Min	25	26	23.1	18.7	36.2	20.8	36.8	15.3	5.4	3.4	900	12,133	28.9	33	12.5	16.3
Max	43	30	49.7	38.3	90	62	383	259	22.8	13.8	1500	14,533	48.2	43.5	20.9	20.6
KW test	$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p < 0.001$		$p = 0.063$		$p < 0.05$	

individual at distinct positions within the crown unbiased by color or size. This resulted in a total of 100 cones from each stand type. Once in the laboratory, cones were exposed to 150 °C for 10 min in a dry heat oven to promote their opening and seed release. Potential thermal seed damage was verified by measuring the internal temperature of randomly selected cones with a K-type thermocouple placed inside them (through a minimal cone incision) during heat exposure (See Appendix A: Figs. 2 and 3). Seed viability was determined by the pressure method (Zuluaga, Acciaresi & Chidichimo, 2004) and we counted the number of viable seeds per cone. (3) The number of trees per hectare (density) was estimated using a plot method in 10 quadrants per stand of 10 × 10 m. Seed bank density, defined as the number of viable seeds per square meter, was calculated as the product of the mean number of viable seeds per cone, the mean number of cones per tree, and the density of trees per square meter.

The height of each tree was measured with a Haglof Vertex IV hypsometer (AB HAGLÖF SWEDEN, 2007), and using this as a reference we measured the crown diameter and crown area in the photographs (see above). The diameter at breast height (DBH) was measured with a diametric tape at 1.4 m above the ground. Percentage canopy openness and total solar radiation (Stenberg, Linder, Smolander & Flower-Ellis, 1994) were estimated by hemispherical

photography with a Mobile Phone Fisheye Lens (Sahin, 2016) and analyzed with the GAP Light Analyzer software (Frazer, Canham & Lertzman, 1999). These variables have been previously associated as influencing factors on the serotiny level for other species of the genus *Pinus* (Goubitz et al., 2004; Hernández-Serrano, Verdú, González-Martínez & Pausas, 2013).

Data analysis

Variables related to the size of the canopy seed bank (stand seed density, number of seeds per cone and serotinous cones per tree), stand characteristics (tree density and light exposure), and tree development (height, DBH, crown diameter and crown area) were compared between plantation and post-fire invasion by Kruskal-Wallis test.

A principal component analysis (PCA) was performed to analyze the ordination of the two stand types (plantation and post-fire invasion) according to the serotiny level, tree age, morphometric variables (height, DBH, diameter and crown area), light exposure and tree density. Previously, collinearity was checked by correlation coefficients between variables; those variables with a correlation of <0.7 were retained (Dormann et al., 2013). The retained variables were: density, age, percentage of serotiny, DBH and solar

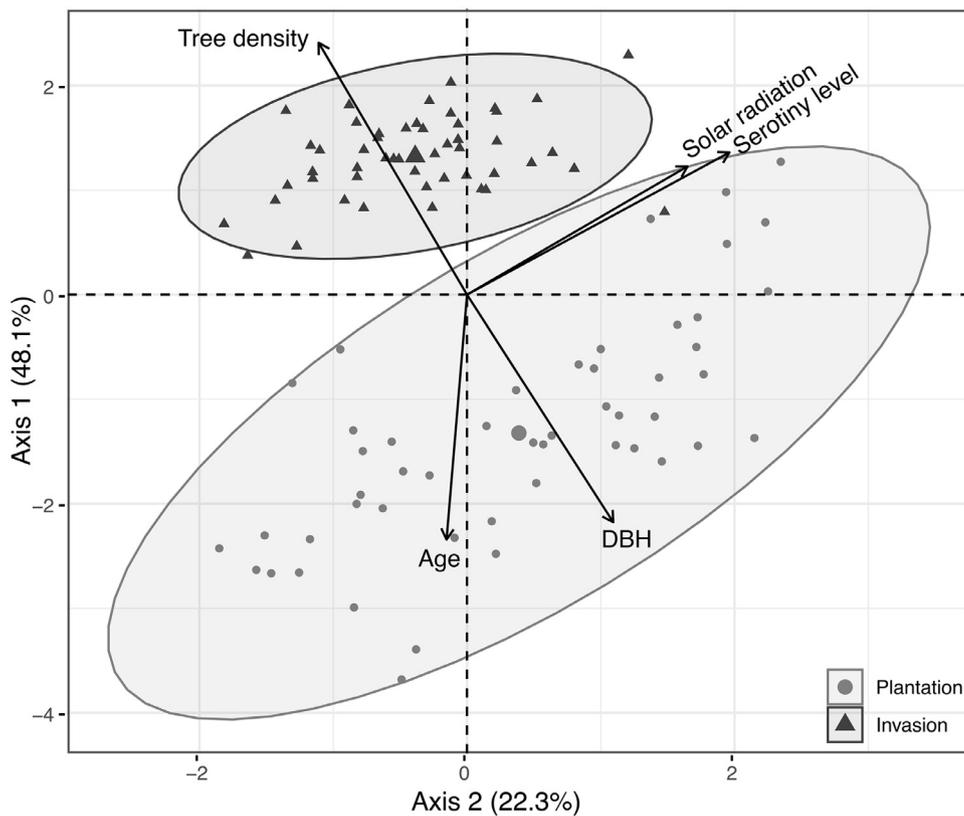


Fig. 2. Principal components analysis of each stand type: plantation (circles), and post-fire invaded (triangles), on the basis of five variables: Tree density, Age, DBH, Solar radiation and Serotiny level. The mean value of the ellipsoid is represented by a larger triangle or circle for plantation and post-fire invasion, respectively. Arrows indicate the effect direction of each variable.

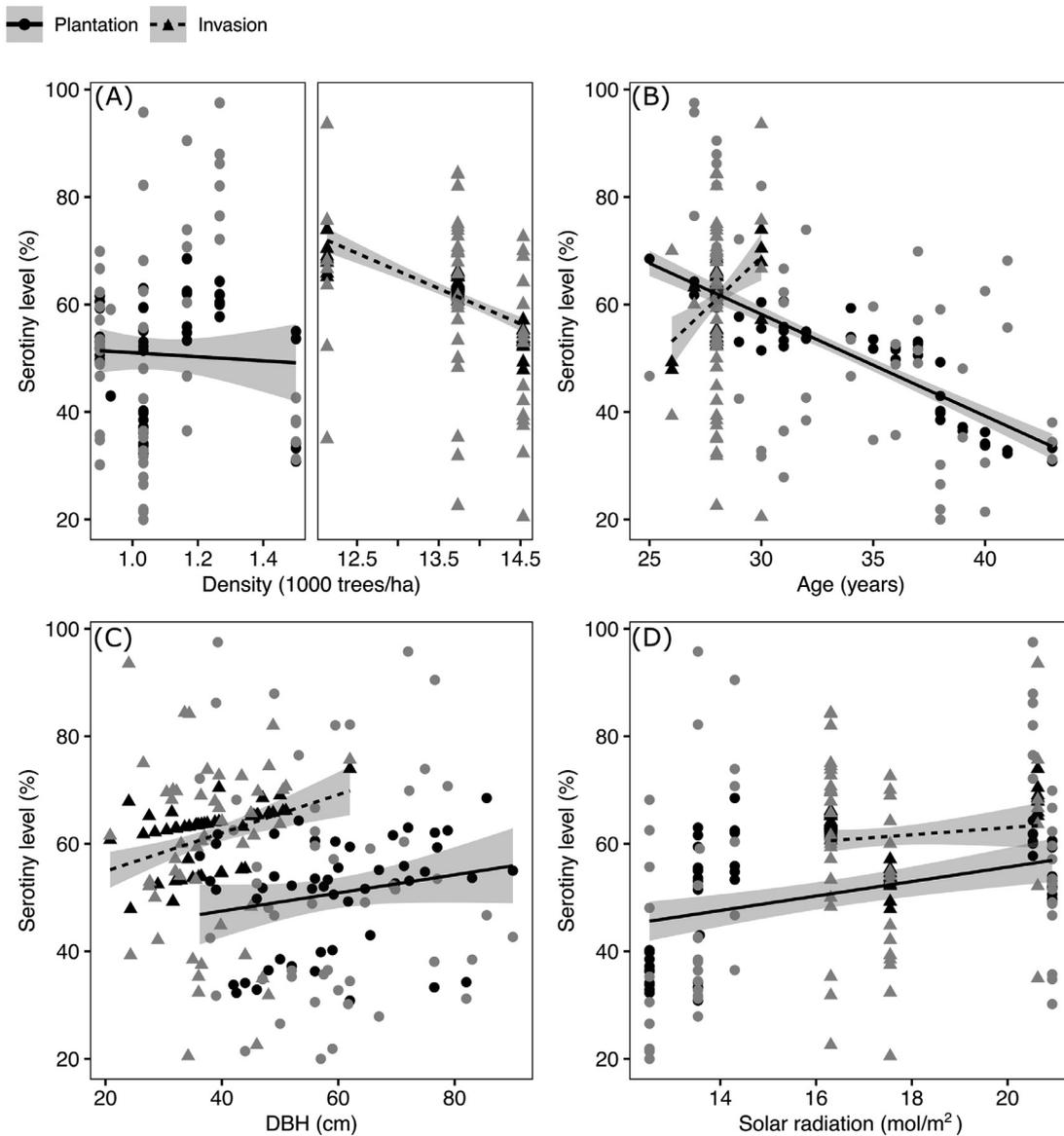


Fig. 3. Serotiny level (y axis) grouped by stand type as a function of (A) tree density (1000 trees/ha), (B) tree age (years), (C) DBH (cm), and (D) solar radiation (mol/m^2). Regression dashed lines represent post-fire invaded stands and full lines represent plantation stands. The shaded areas correspond to the 0.95 confidence intervals. Each symbol represents the percentage of serotiny (raw or estimated) per tree, in function of each of the explanatory variables. The raw (gray) and estimated (black) values are represented as triangles for post-fire invaded stands and circles for plantation, respectively.

radiation. According to Kaiser-Guttman's criteria, those principal components with eigenvalues greater than one were retained. The relationship between serotiny level and the other variables included in the PCA were also analyzed by GLMs with a binomial distribution. The model included cone serotiny (0 = serotinous, 1 = non-serotinous) as a response variable and all the variables included PCA as explanatory variables. Based on the modeled data obtained from the GLMs, the frequency distributions of estimated serotiny levels were compared between plantations and post-fire invaded stands using the Anderson Darling K-Sample test (Scholz & Stephens, 1987). All the reported models,

test and graphs were performed in R, the language and environment for statistical computing (RCoreTeam, 2018).

Results

Seed density was one order of magnitude higher in post-fire invaded stands [I] than in plantation stands [P] (I: $25,847.5 \pm 28,938$ seeds/ m^2 ; P: 3574.4 ± 3129 seeds/ m^2 ; mean \pm SD; Fig. 1; KW test $p < 0.001$). The highest values for the canopy seed bank size in the post-fire invaded stands were mainly given by the number of seeds per cone and the

number of trees per hectare, since the number of serotinous cones per tree was higher in the plantation stands (Table 2). No significant differences were found for the proportion of viable seeds per cone between plantation and post-fire invaded stands (Table 2). Plantation stands attained significantly higher values in the growth variables (height, crown diameter, crown area and DBH; Table 1), while presenting lower values for pine density and solar radiation (Table 1). Canopy openness was similar between stands (Table 1).

The principal component analysis revealed two distinct groups of trees corresponding to plantation and post-fire invaded stands (Fig. 2). The first two axes explained 70.4% of total variance. Axis 1 explained 48.1% of the data variation and represents increasing values for tree density (standardized factor loading: 0.8) and decreasing values for age and DBH (standardized factor loadings: -0.8 and -0.7, respectively) in post-fire invaded stands in comparison to plantations. Axis 2 explains 22.3% of the data variation and represents increasing values for solar radiation and serotiny level (standardized factor loadings: 0.5 and 0.6, respectively).

When modeling by GLM the effects of the variables included in the PCA on the level of serotiny we can observe that all the effects are statistically significant (See Appendix A: Table 2). The two types of stands presented the same pattern for the serotiny level in function of tree density, DBH and solar radiation, but the estimated curve for post-fire invaded stands always shows higher values (Fig. 3). The estimated serotiny level as function of age shows opposite patterns, increasing in the case of post-fire invaded stands and decreasing for plantation (Fig. 3). The estimated serotiny percentage was higher in post-fire invaded stands ($61.6 \pm 0.8\%$, mean \pm SE) than in plantation ones ($50.6 \pm 1.4\%$, mean \pm SE, $p < 0.001$), with post-fire invaded and plantation stands yielding different frequency distributions of the serotiny percentage (Anderson Darling test $p < 0.001$; Fig. 4). Analyzing the probability curves for the estimated data the post-fire invaded stands showed a pronounced peak of probable density at 62% serotiny and one less-pronounced peak around 75%; while for the plantation two less-pronounced peaks were observed around 35 and 55% of serotiny. In the raw data, post-fire invaded stands

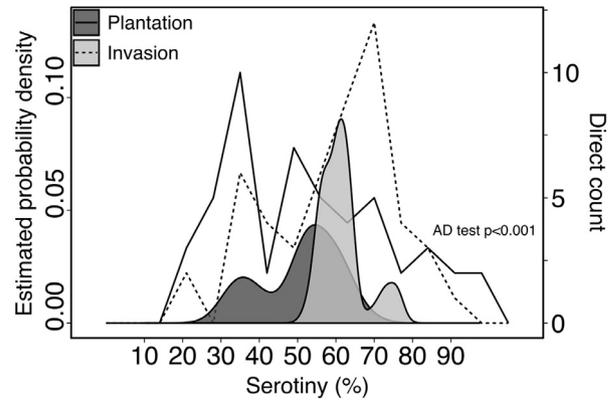


Fig. 4. Frequency distributions for serotiny levels based on modeled and observed data. X axis indicates the level of serotiny classes (percentage). The left Y axis indicates the probability density of the modeled estimated serotiny levels for plantation (dark gray) and post-fire invaded (light gray) stands. The right Y axis indicates the number of trees for percent serotiny classes based on observed data for plantation (full lines) and post-fire invaded (dashed lines) stands. The Anderson Darling K-Sample test (AD) reported a significant difference between the frequency distributions of plantation and post-fire invasion for both observed and modeled data.

presented a mode interval around 60% serotiny while for plantation the mode was around 30%.

Discussion

Our results show that post-fire recruited trees had greater levels of serotiny compared with trees from unburned plantations, suggesting that fire-adapted species such as *Pinus radiata* may be under a rapid selection process driven by fire promoting divergence at fire-linked traits as fast as in one generation. Little is known about the evolutionary changes and mechanisms that foster range expansion associated with invasiveness of introduced species, which include rapid adaptation of correlated traits such as growth rate and dispersal ability (Prentis, Wilson, Dormontt, Richardson & Lowe, 2008). Specifically, fire can act as a selection agent on adaptive characteristics (Keeley, Pausas, Rundel, Bond

Table 2. Descriptive and comparative statistics of the seed bank characteristics of *P. radiata* for plantation (P) and post-fire invaded (I) stands. Compared variables: number of viable seeds per cone, seed proportion (proportion of viable seeds per cone), number of cones per tree and number of trees per ha. Only viable seeds were considered for the seed bank estimation.

Stand type	Seeds per cone		Seed proportion		Cones per tree		Trees per ha	
	P	I	P	I	P	I	P	I
Mean	127	153	0.8	0.9	63.8	34.1	1082	13,765
SD	40.9	35.2	0.1	0.1	52.7	38.3	185	757
Min	28	72	0.2	0.4	7	6	900	12,133
Max	262	210	0.9	1	309	231	1500	14,533
KW test	$p < 0.001$		$p = 0.361$		$p < 0.001$		$p < 0.001$	

& Bradstock, 2011; Lamont & He, 2017), which would promote the invasion of fire-adapted non-native species by increasing their propagule pressure and spread into recently burned areas. This pattern was also observed for different *Pinus* species in their native ranges, where serotiny level was highest in areas affected by frequent crown fires (Goubitz et al., 2004; Hernández-Serrano et al., 2013; Linhart, 1978; Radeloff et al., 2004). For example, in the case of the principal stands of *P. halepensis* in Israel, higher levels of serotiny were found in burned than in unburned stands (Goubitz et al., 2004). Fire history can influence local frequencies of the degree of serotiny in different species of the genus *Pinus* (Givnish, 1981; Muir & Lotan, 1985; Pastor, 2016). These studies were carried out within the pines' native range, where the association of their populations with their respective fire frequencies is longstanding. The introduction of pine species into our study area occurred about 60 years ago, yet the recurrent fire occurrence for this area has now resulted in mostly monospecific stands dominated by the serotinous *Pinus radiata*. Post-fire invasion started after a fire in 1987 and repeated after fire events in 2012 and 2015. A tendency towards monospecific post-fire *P. radiata* stands has also been recorded in Australia (Williams & Wardle, 2009) and Chile (authors pers. obs.). This pattern is coincident with that found for the serotinous *P. contorta*, which has expanded in burned areas of its native (Lotan, 1976) and introduced ranges (Cóbar-Carranza, García, Pauchard & Peña, 2014; Davis et al., 2019; Raffaele et al., 2016; Taylor et al., 2017).

In our study, post-fire invaded stands were characterized by a large canopy seed bank, high density of individuals, and poor tree development. The size of their seed bank was not only bigger compared with the plantation, but also in comparison with other serotinous pine species either in their native or exotic ranges (Table 3). The greater size of the canopy seed bank in the 1987 invasion compared to the plantation implies a greater recruitment in the face of future fires. In addition, dense invasion consists of a continuous and more flammable fuel than the surrounding native communities (Cóbar-Carranza et al., 2014; Franzese, Raffaele, Blackhall, Rodriguez & Soto, 2019; Paritsis et al., 2018), which

strengthen the fire risk. This will increase *P. radiata* capacity to invade adjacent areas and hence contribute to the positive feedback of the fire-invasion cycle already observed (Franzese & Raffaele, 2017). Higher tree density promotes self-thinning and accumulation of dry fuel material, which increases not only the fire risk, but also the level of connectivity for the fire to spread (Agee, 1996; Cobar-Carranza et al., 2014; Franzese, Ripa, Blackhall, Pissolito & Raffaele, 2018; Noss, Franklin, Baker, Schoennagel & Moyle, 2006; Paritsis et al., 2018; Radeloff et al., 2004). Although the post-fire invaded stands have higher serotiny levels, they also have a higher density of trees and our results showed a decreasing tendency of the serotiny level as a function of the density in each stand type; but the serotiny level in post-fire invaded stands begins to decrease at higher densities than in plantation. These results suggest that the positive feedback in the fire-invasion cycle in post-fire regenerated stands is reflected in many individuals that provide serotinous cones and therefore seeds after fire, although at an individual level the tree development and the number of cones is lower in invaded areas than in plantation. This may be due to the fact that although frequent fires would select for more serotinous phenotypes, conditions during post-fire recruitment, such as high density, are not optimal for tree development (Goubitz et al., 2004). As an example, one year after the 2012 fire, we recorded near half a million pine seedlings per hectare in the study area. This extremely high density certainly negatively affects tree development.

Differentiated tendencies by stand type regarding the effect of age on the serotiny level may be due to differences in the age range of each stand type, the lower serotiny levels recorded in relatively older individuals from plantation may reflect fire-free conditions. Nonetheless, more studies are needed to test the significance of this trend and the relationship between tree age and development of distinct types of cones. Increased serotiny levels in relation to solar radiation may be related to higher levels of productivity due to increases in the rate of photosynthesis, since a positive relationship between solar radiation and dry matter production or growth has been previously described for other forest species (Dewar, 1996; Righi et al., 2007).

Table 3. Seed bank size for different pine species in their native and exotic ranges. The data from post-fire invasion (obtained in this study) are indicated with an asterisk; the other data are from plantations.

Species	Stand age	Location	Range type	Seeds/m ²	Reference
<i>P. radiata</i>	30	Chubut, Argentina	Non-native*	25,847	This study
<i>P. radiata</i>	40	Chubut, Argentina	Non-native	3574	This study
<i>P. radiata</i>	15	Longford, Australia	Non-native	9.8	Eldridge (1966)
<i>P. radiata</i>	15	Stockdale, Australia	Non-native	2.7	Eldridge (1966)
<i>P. halepensis</i>	15	Mira, Spain	Native	17.5	Tapias et al. (2001)
<i>P. halepensis</i>	15	Lujar, Spain	Native	100	Tapias et al. (2001)
<i>P. halepensis</i>	16	Ayora, Spain	Native	3.5	Tapias et al. (2001)
<i>P. halepensis</i>	70	Israel	Native	355	Goubitz et al. (2004)
<i>P. pinaster</i>	16	Ayora, Spain	Native	1.2	Tapias et al. (2001)

Conclusions

While several studies show rapid ongoing evolutionary changes in plant invaders (Lavergne & Molofsky, 2007; Michel et al., 2004; Oduor, 2013; Whitney & Gabler, 2008), to our knowledge our results provide the first evidence of this in a long-lived arboreal species. We show that fire acts as a selective agent, increasing the level of an adaptive character in an introduced pine species in Patagonia. The trend towards higher frequencies of individuals with increasing serotiny levels in only one generation of invasion provide evidence of a currently occurring directional selection for a fire-related trait. This, together with the two differentiated groups in the PCA, could indicate a process of rapid divergence for *Pinus radiata* in its exotic range. Furthermore, the risk of wildfires in this region has increased due to various climate change-associated factors such as higher temperatures, increased ignitions associated with anthropogenic drivers, and the replacement of native vegetation with plantations of more flammable, non-native conifers (Veblen et al., 2008). Higher levels of serotiny in conjunction with an increased fire risk can promote *P. radiata* invasion, reinforcing the fire-invasion cycle.

Acknowledgments

The study was funded by the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (PICT 2014-3466 and PICT 2017-0396) and Rufford Foundation (Grant number 24894-1). We thank Secretaria de Bosques de Chubut and Servicio de Prevención y Lucha Contra Incendios Forestales (SPLIF), and especially Gerardo Finster for providing us with valuable information about the natural history of the study site. For commenting on and improving the manuscript we thank Yan B. Linhar. For their valuable help in the field we thank Ariel Mayoral and Pablo Alvear.

Supplementary material

Supplementary material associated with this article can be found in the online version at doi:10.1016/j.baae.2020.04.002.

References

- AB-HAGLÖF-SWEDEN. (2007). *Users Guide Vertex IV and Transponder T3*.
- Agee, J. K. (1996). The influence of forest structure on fire behavior. In *Proceedings of the 17th Annual Forest Vegetation Management Conference* (pp. 52–68).
- Boscutti, F., Sigura, M., De Simone, S., & Marini, L. (2018). Exotic plant invasion in agricultural landscapes: A matter of dispersal mode and disturbance intensity. *Applied Vegetation Science*, 21(2), 250–257. doi:10.1111/avsc.12351.
- Buckley, Y. M., Bolker, B. M., & Rees, M. (2007). Disturbance, invasion and re-invasion: Managing the weed-shaped hole in disturbed ecosystems. *Ecology Letters*, 10(9), 809–817. doi:10.1111/j.1461-0248.2007.01067.x.
- Calvo, L., Hernández, V., Valbuena, L., & Taboada, A. (2016). Provenance and seed mass determine seed tolerance to high temperatures associated to forest fires in *Pinus pinaster*. *Annals of Forest Science*, 73(2), 381–391. doi:10.1007/s13595-015-0527-0.
- Cóbar-Carranza, A. J., García, R. A., Pauchard, A., & Peña, E. (2014). Effect of *Pinus contorta* invasion on forest fuel properties and its potential implications on the fire regime of *Araucaria araucana* and *Nothofagus antarctica* forests. *Biological Invasions*, 16(11), 2273–2291. doi:10.1007/s10530-014-0663-8.
- D'Antonio, C. M., & Vitousek, P. M. (1992). Biological Invasions by exotic grasses, the grass/fire cycle, and global change. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 23(1), 63–87. doi:10.1146/annurev.es.23.110192.000431.
- Davis, K.T., Maxwell, B.D., & Caplat, P. (2019). *Simulation model suggests that fire promotes lodgepole pine (Pinus contorta) invasion in Patagonia. I.* <https://doi.org/10.1007/s10530-019-01975-1>
- Dewar, R. C. (1996). The correlation between plant growth and intercepted radiation: An interpretation in terms of optimal plant nitrogen content. *Annals of Botany*, 78(1), 125–136. doi:10.1006/anbo.1996.0104.
- Dormann, C. F., Elith, J., Bacher, S., Buchmann, C., Carl, G., Carré, G., et al. (2013). Collinearity: A review of methods to deal with it and a simulation study evaluating their performance. *Ecography*, 36(1), 027–046. doi:10.1111/j.1600-0587.2012.07348.x.
- Estades Marfán, C. (1994). *Impacto de la sustitución del bosque natural por plantaciones de Pinus radiata sobre una comunidad de aves en la Octava Región de Chile*.
- Franzese, J., & Raffaele, E. (2017). Fire as a driver of pine invasions in the Southern Hemisphere: A review. *Biological Invasions*, 19(8), 2237–2246. doi:10.1007/s10530-017-1435-z.
- Franzese, J., Raffaele, E., Blackhall, M., Rodríguez, J., & Soto, A. Y. (2019). Changes in land cover resulting from the introduction of non-native pine modifies litter traits of temperate forests in Patagonia. *Journal of Vegetation Science*, 31(2), 223–233. doi:10.1111/jvs.12847
- Franzese, J., Ripa, R., Blackhall, M., Pissolito, C., & Raffaele, E. (2018). El control de la invasión de pinos como práctica de restauración en patagonia: análisis del combustible fino. Conference at the meeting “IV Taller Regional Sobre Rehabilitación Restauración En La Diagonal Árida de La Argentina y I Taller Internacional de Restauración Ecológica”, Salta, Argentina.
- Frazer, G. W., Canham, C. D., & Lertzman, K. P. (1999). *Gap light analyzer (GLA), version 2.0: Imaging software to extract canopy structure and gap light transmission indices from true-colour fisheye photographs, users manual and program documentation*: 36MillbrookNew York: Simon Fraser University, Burnaby, British Columbia, and the Institute of Ecosystem Studies.
- García, R.A., Franzese, J., Policelli, N., Sasal, Y., Zenni, R.D., Nuñez, M.A. et al. (2018). *Non-native pines are homogenizing the ecosystems of South America*. 245–263. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99513-7_15

- Gauthier, S., Bergeron, Y., & Simon, J.-P. (1996). Effects of fire regime on the serotiny level of Jack pine. *The Journal of Ecology*, 84(4), 539. doi:10.2307/2261476.
- Givnish, T. J. (1981). Serotiny, geography, and fire in the pine barrens of New Jersey. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, 35(1), 101. doi:10.2307/2407945.
- Goldammer, J. G., Cwielong, P., Rodriguez, N., & Goergen, J. (1996). One thousand years of fire history of Andino-Patagonian forests recovered from sediments of the Río Epuén river, Chubut Province, Argentina. *Biomass Burning and Global Change*, 2, 653–659.
- Goubitz, S., Nathan, R., Roittemberg, R., Shmida, A., & Ne'eman, G. (2004). Canopy seed bank structure in relation to: Fire, tree size and density. *Plant Ecology (Formerly Vegetatio)*, 173(2), 191–201. doi:10.1023/B:VEGE.0000029324.40801.74.
- Hernández-Serrano, A., Verdú, M., González-Martínez, S. C., & Pausas, J. G. (2013). Fire structures pine Serotiny at different scales. *American Journal of Botany*, 100(12), 2349–2356. doi:10.3732/ajb.1300182.
- Jauni, M., Gripenberg, S., & Ramula, S. (2015). Non-native plant species benefit from disturbance: A meta-analysis. *Oikos*, 124(2), 122–129. doi:10.1111/oik.01416.
- Keeley, J. E. (1998). Coupling demography, physiology and evolution in chaparral shrubs. In P. W. Rundel, G. Montenegro, F. M. Jaksic (Eds.), *Landscape disturbance and biodiversity in mediterranean-type ecosystems* (pp. 257–264). Berlin, Heidelberg.: Springer.
- Keeley, J. E., Pausas, J. G., Rundel, P. W., Bond, W. J., & Bradstock, R. A. (2011). Fire as an evolutionary pressure shaping plant traits. *Trends in Plant Science*, 16(8), 406–411. doi:10.1016/j.tplants.2011.04.002.
- Lamont, B. B., & Enright, N. J. (2000). Adaptive advantages of aerial seed banks. *Plant Species Biology*, 15(2), 157–166. doi:10.1046/j.1442-1984.2000.00036.x.
- Lamont, B. B., & He, T. (2017). Fire-Proneness as a Prerequisite for the Evolution of Fire-Adapted Traits. *Trends in Plant Science*, 22(4), 278–288. doi:10.1016/j.tplants.2016.11.004.
- Lamont, B. B., He, T., & Yan, Z. (2019). Evolutionary history of fire-stimulated resprouting, flowering, seed release and germination. *Biological Reviews*, 94(3), 903–928. doi:10.1111/brv.12483.
- Lamont, B. B., Le Maitre, D. C., Cowling, R. M., & Enright, N. J. (1991). Canopy seed storage in woody plants. *The Botanical Review*, 57(4), 277–317. doi:10.1007/BF02858770.
- Lantschner, M. V., Rusch, V., & Hayes, J. P. (2013). Do exotic pine plantations favour the spread of invasive herbivorous mammals in Patagonia. *Austral Ecology*, 38(3), 338–345. doi:10.1111/j.1442-9993.2012.02411.x.
- Lavergne, S., & Molofsky, J. (2007). Increased genetic variation and evolutionary potential drive the success of an invasive grass. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(10), 3883–3888.
- Linhart, Y. B. (1978). Maintenance of variation in cone morphology in California closed-cone pines: The roles of fire, squirrels and seed output. *The Southwestern Naturalist*, 23(1), 29. doi:10.2307/3669977.
- Lotan, J. E. (1976). Cone serotiny - fire relationships in lodgepole pine. Tall Timbers Fire Ecology Conference Proceedings 14 (pp. 267–278). Tall Timbers Research Center.
- Machado, I. F., Moreira, L. F. B., & Maltchik, L. (2012). Effects of pine invasion on anurans assemblage in southern Brazil coastal ponds. *Amphibia-Reptilia*, 33(2), 227–237. doi:10.1163/156853812x638518.
- Manfredi, R., Postler, V., Urretavizcaya, F., Grosfeld, J., Ramilo, E., Caracotche, S. et al. (1999). *Plan Estratégico de Manejo de La Reserva Forestal Cuartel Lago Epuén. Caracterización Y Diagnóstico. Consejo Federal de Inversiones, Dirección General de Bosques y Parques de la Provincia del Chubut, Centro de Investigación y Extensión Forestal Andino Pa.*
- Martín-Sanz, R. C., Santos-Del-Blanco, L., Notivol, E., Chambel, M. R., San-Martín, R., & Climent, J. (2016). Disentangling plasticity of serotiny, a key adaptive trait in a mediterranean conifer. *American Journal of Botany*, 103(9), 1582–1591. doi:10.3732/ajb.1600199.
- McDonald, P. M., & Laacke, R. J. (1990). *Pinus radiata* D. Don. *Forest Service Agriculture Handbook*, 1(654), 433–441. Retrieved from http://dendro.cnre.vt.edu/dendrology/USDAFS_Silvics/232.pdf.
- Mead, D. J. (2013). In F. A. O. Forest (Ed.), Rome: FAO.
- Michel, A., Arias, R. S., Scheffler, B. E., Duke, S. O., Netherland, M., & Dayan, F. E. (2004). Somatic mutation-mediated evolution of herbicide resistance in the nonindigenous invasive plant hydrilla (*Hydrilla verticillata*). *Molecular Ecology*, 13(10), 3229–3237.
- Miller, G., Friedel, M., Adam, P., & Chewings, V. (2010). Ecological impacts of buffel grass (*Cenchrus ciliaris* L.) invasion in central Australia - does field evidence support a fire-invasion feedback? *Rangeland Journal*, 32(4), 353–365. doi:10.1071/RJ09076.
- Muir, P. S., & Lotan, J. E. (1985). Disturbance history and serotiny of *Pinus contorta* in Western Montana. *Ecology*, 66(5), 1658–1668. doi:10.2307/1938028.
- Noss, R. F., Franklin, J. F., Baker, W. L., Schoennagel, T., & Moyle, P. B. (2006). Managing fire-prone forests in the western United States. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 4(9), 481–487.
- Oduor, A. M. O. (2013). Evolutionary responses of native plant species to invasive plants: A review. *New Phytologist*, 200(4), 986–992.
- Paritsis, J., Landesmann, J. B., Kitzberger, T., Tiribelli, F., Sasal, Y., Quintero, C., et al. (2018). Pine plantations and invasion alter fuel structure and potential fire behavior in a Patagonian forest-steppe ecotone. *Forests*, 9(3), 1–16. doi:10.3390/f9030117.
- Pastor, J. (2016). Fire Regimes and the Correlated Evolution of Serotiny and Flammability. In J. Pastor (Ed.), *What Should a Clever Moose Eat?* (pp. 227–235). Island Press: Washington, DC.
- Pausas, J. G., & Bradstock, R. A. (2007). Fire persistence traits of plants along a productivity and disturbance gradient in mediterranean shrublands of south-east Australia. *Global Ecology and Biogeography*, 16(3), 330–340. doi:10.1111/j.1466-8238.2006.00283.x.
- Prentis, P. J., Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Richardson, D. M., & Lowe, A. J. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, 13(6), 288–294.
- Radeloff, V. C., Mladenoff, D. J., Guries, R. P., & Boyce, M. S. (2004). Spatial patterns of cone serotiny in *Pinus banksiana* in relation to fire disturbance. *Forest Ecology and Management*, 189(1–3), 133–141. doi:10.1016/j.foreco.2003.07.040.
- Raffaele, E., Nuñez, M. A., Eneström, J., & Blackhall, M. (2016). Fire as mediator of pine invasion: Evidence from Patagonia,

- Argentina. *Biological Invasions*, 18(3), 597–601. doi:10.1007/s10530-015-1038-5.
- RCoreTeam. (2018). *R: A language and environment for statistical computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Richardson, D. M., & Higgins, S. I. (2000). Pines as invaders in the southern hemisphere. *Ecology and biogeography of pinus: 450* (pp. 450–473). Cambridge University Press.
- Righi, C. A., Bernardes, M. S., Lunz, A. M. P., Pereira, C. R., Dourado Neto, D., & Favarin, J. L. (2007). Measurement and simulation of solar radiation availability in relation to the growth of coffee plants in an agroforestry system with rubber trees. *Revista Árvore*, 31(2), 195–207. doi:10.1590/S0100-67622007000200002.
- Rogers, D. L. (2004). In situ genetic conservation of a naturally restricted and commercially widespread species, *Pinus radiata*. *Forest Ecology and Management*, 197(1–3), 311–322. doi:10.1016/j.foreco.2004.05.022.
- Sahin, C. (2016). Comparison and calibration of mobile phone fish-eye lens and regular fisheye lens via equidistant model. *Journal of Sensors* 9379203. doi:10.1155/2016/9379203.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671.
- Scholz, F. W., & Stephens, M. A. (1987). K-sample Anderson–Darling tests. *Journal of the American Statistical Association*, 82(399), 918–924. doi:10.1080/01621459.1987.10478517.
- Schwilk, D. W., & Ackerly, D. D. (2001). Flammability and serotiny as strategies: correlated evolution in pines. *Oikos*, 94(2), 326–336. doi:10.1034/j.1600-0706.2001.940213.x.
- Simberloff, D., Nuñez, M. A., Ledgard, N. J., Pauchard, A., Richardson, D. M., Sarasola, M., et al. (2010). Spread and impact of introduced conifers in South America: Lessons from other southern hemisphere regions. *Austral Ecology*, 35(5), 489–504. doi:10.1111/j.1442-9993.2009.02058.x.
- Stenberg, P., Linder, S., Smolander, H., & Flower-Ellis, J. (1994). Performance of the LAI-2000 plant canopy analyzer in estimating leaf area index of some Scots pine stands. *Tree Physiology*, 14(7–9), 981–995. doi:10.1093/treephys/14.7-8-9.981.
- Stephens, S. L., Piirto, D. D., & Caramagno, D. F. (2004). Fire regimes and resultant forest structure in the Native Año Nuevo Monterey Pine (*Pinus radiata*) Forest, California. *The American Midland Naturalist*, 152(1), 25–36. doi:10.1674/0003-0031(2004)152[0025:fRarfs]2.0.co;2.
- Taylor, K. T., Brummer, T., Rew, L. J., Lavin, M., & Maxwell, B. D. (2014). *Bromus tectorum* response to fire varies with climate conditions. *Ecosystems*, 17(6), 960–973. doi:10.1007/s10021-014-9771-7.
- Taylor, K. T., Maxwell, B. D., McWethy, D. B., Pauchard, A., Nuñez, M. A., & Whitlock, C. (2017). *Pinus contorta* invasions increase wildfire fuel loads and may create a positive feedback with fire. *Ecology*, 98(3), 678–687. doi:10.1002/ecy.1673.
- Thanos, C. A., Daskalidou, E. N., & Nikolaidou, S. (1996). Early post-fire regeneration of a *Pinus halepensis* forest on Mount Párnis, Greece. *Journal of Vegetation Science*, 7(2), 273–280. doi:10.2307/3236328.
- Veblen, T. T., Kitzberger, T., Raffaele, E., Mermoz, M., González, M. E., & Sibold, J. S. (2008). The historical range of variability of fires in the Andean - Patagonian *Nothofagus* forest region. *International Journal of Wildland Fire*, 17(6), 724. doi:10.1071/WF07152.
- Whisenant, S.G. (.1990). *Changing fire frequencies on Idaho's Snake River Plains: Ecological and management implications*. 351.
- Whitney, K. D., & Gabler, C. A. (2008). Rapid evolution in introduced species, “invasive traits” and recipient communities: Challenges for predicting invasive potential. *Diversity and Distributions*, 14(4), 569–580. doi:10.1111/j.1472-4642.2008.00473.x.
- Williams, M. C., & Wardle, G. M. (2009). *Pinus radiata* invasion in New South Wales: The extent of spread. *Plant Protection Quarterly*, 24(4), 146–156.
- Woollons, R. C., & Manley, B. R. (2012). Examining growth dynamics of *Pinus radiata* plantations at old ages in New Zealand. *Forestry*, 85(1), 79–86. doi:10.1093/forestry/cpr059.
- Zuluaga, M. S., Acciaresi, H. A., & Chidichimo, H. O. (2004). Comparación de la viabilidad de las semillas obtenidas por medio de las técnicas de extracción física por lavado y de germinación. *Planta Daninha*, 22, 225–229.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect