



Universidad Nacional del Comahue

Centro Regional Universitario Bariloche

Variación genética en poblaciones marginales de
Nothofagus pumilio, su relación con procesos ecológico-
evolutivos e importancia en la conservación

Trabajo de tesis para optar por el grado de Doctora en Biología



Lic. Griselda Ignazi

Directora: Dra. Andrea C. Premoli

2019

Esta tesis está dedicada a todas las personas que defienden activamente el derecho a la educación pública y gratuita.

Indice

Resumen	5
Abstract	7
Capítulo I. Introducción General	9
I.1 Factores que influyen sobre la distribución geográfica de las especies	10
I.2 Poblaciones marginales y centrales	12
I.3 Cambios en el clima, el Último Máximo Glaciar en Patagonia	15
I.4 Gradientes climáticos de Patagonia	17
I.5 Marcadores moleculares en la reconstrucción biogeográfica a diferentes escalas temporales	22
I.6 Experimentos de jardín común y manipulativos para el estudio de adaptaciones locales	25
I.7 La especie bajo estudio	27
I.8 Objetivo general	33
I.9 Objetivos específicos e hipótesis particulares	33
I.10 Tablas y Figuras	35
Capítulo II Diversidad genética y flujo génico histórico y actual en poblaciones marginales y centrales de <i>Nothofagus pumilio</i> del norte de Patagonia	41
II.1 Introducción	42
II.2 Objetivos particulares	48
II.3 Hipótesis particulares	48
II.4 Materiales y métodos	49
II.5 Resultados	60
II.6 Discusión	66
II.7 Conclusiones	71
II.8 Tablas y Figuras	72
Capítulo III Efectos de los gradientes climáticos sobre la diversidad genética de <i>Nothofagus pumilio</i>	88
III.1 Introducción	89
III.2 Objetivo particular	93
III.3 Hipótesis particular	93
III.4 Materiales y métodos	94
III.5 Resultados	95
III.6 Discusión	98

III.7 Conclusiones	102
III.8 Tablas y Figuras	103
Capítulo IV Características ecofisiológicas de plántulas de poblaciones centrales y marginales de <i>Nothofagus pumilio</i> en jardín común y respuestas al déficit hídrico	116
IV.1 Introducción	117
IV.2 Objetivo particular	122
IV.3 Hipótesis particular	122
IV.4 Materiales y métodos	122
IV.5 Resultados	131
IV.6 Discusión	133
IV.7 Conclusiones	139
IV.8 Tablas y Figuras	140
Capítulo V Discusión general	154
V.1 Discusión	155
V.2 Conclusiones generales	161
Referencias	166
Agradecimientos	182
Apéndice I	183
Trabajo de respaldo	198

Resumen

En años recientes ha habido un interés creciente por las poblaciones ubicadas hacia los extremos de distribución de las especies en relación con el impacto del cambio climático. Se predice que con el aumento de la temperatura las especies se ajustarán a las nuevas condiciones rastreando su óptimo ecológico migrando hacia zonas relativamente más frías, como mayores latitudes y elevaciones. Se plantea por otro lado que hacia el extremo opuesto, es decir en el frente de retracción, las poblaciones habitarían áreas propensas a sufrir sequías y donde se predice que tendrá lugar la pérdida de poblaciones. Por lo tanto, es relevante analizar las poblaciones ubicadas en estos márgenes y su potencial para responder a cambios futuros. En particular las poblaciones marginales, usualmente consideradas de tamaño pequeño y relativamente aisladas entre sí, han sido objeto de numerosos estudios, ya sea los que plantean el marco conceptual y los factores biogeográficos y ecológicos que las impactan, como así también trabajos empíricos donde se analizan sus características genéticas. Sin embargo, los resultados de estos últimos lejos están de mostrar patrones concordantes y recientemente se ha destacado que las dimensiones geográficas, ecológicas y genéticas de la marginalidad no siempre son concordantes, destacando la importancia de factores, no sólo que impactan regionalmente, sino también localmente. En esta tesis el objetivo fue analizar los efectos del clima y la historia biogeográfica sobre las características genéticas tanto neutrales como adaptativas de *Nothofagus pumilio*, la especie leñosa montana que habita el abrupto gradiente de precipitación del norte de la Patagonia. Se tomaron muestras de follaje de 70 poblaciones ubicadas a lo largo del gradiente de precipitación, que fueron clasificadas como centrales y marginales ubicadas al oeste y este de la isohieta de 850 mm, respectivamente. Dichas muestras fueron analizadas mediante distintos marcadores moleculares. Se utilizaron secuencias de ADN del cloroplasto con baja tasa de mutación para analizar efectos históricos, como las oscilaciones pasadas en el clima, y genotipos de marcadores biparentales como las isoenzimas y los microsátélites para cuantificar el impacto de la deriva genética y el aislamiento contemporáneo. Dado que *N. pumilio* habita amplios gradientes ambientales, se analizó a lo largo de la latitud, longitud y altitud el efecto de distintas variables bioclimáticas en relación con la variación en parámetros genéticos. Se cultivaron plántulas provenientes de seis sitios (3 centrales y 3 marginales) en invernadero bajo condiciones homogéneas de jardín común, para analizar potenciales diferencias adaptativas de base genética cuantitativas en el crecimiento, la morfología de las hojas, la arquitectura de las plantas y la fenología de la brotación de las hojas. Las mismas se sometieron a experimentos manipulativos de estrés hídrico y se midieron caracteres ecofisiológicos de intercambio gaseoso y potencial hídrico. Los resultados genéticos mostraron la existencia de variación genética y grado de divergencia poblacional comparable en poblaciones marginales y centrales, presentando ambas regiones la presencia de variantes genéticas particulares para todos los marcadores utilizados. Por otro lado, se encontró un relativamente bajo grado de aislamiento entre las regiones marginal y central pero significativo. Estos resultados sugieren que *N. pumilio* habría subsistido localmente en ambas regiones a oscilaciones en el clima y que se habrían

acumulado diferencias producto del aislamiento. Los resultados obtenidos muestran una relación entre el clima y los diferentes gradientes ambientales; y cómo éstos afectan a la variación genética de *N. pumilio*. Las variables bioclimáticas más influyentes están relacionadas a las precipitaciones de verano y temperaturas de invierno, siendo la tendencia general de mayor diversidad genética a mayores precipitaciones y temperaturas moderadas. Esto demuestra que la distribución espacial de la diversidad genética de esta especie no ocurre aleatoriamente, sino que los patrones de estructuración responden a modelos climáticos. Los resultados del cultivo en jardín común bajo condiciones óptimas muestran diferencias significativas con mayor crecimiento de las plantas centrales, mientras que no se encontraron diferencias entre ellas para caracteres foliares y fenológicos. Las plantas de las poblaciones marginales respondieron diferencialmente al experimento de estrés hídrico mostrando un mejor uso del agua y alcanzando potenciales hídricos menos negativos. Por lo tanto, las plántulas de *N. pumilio* provenientes de ambientes con regímenes de precipitación contrastantes presentan respuestas adaptativas y rasgos ecofisiológicos diferentes. Las poblaciones marginales de *N. pumilio* soportaron mejor el estrés hídrico que las poblaciones centrales de origen más méxico, lo que podría implicar una mayor susceptibilidad de estas últimas a la desecación. En conclusión, los resultados de esta tesis muestran que las poblaciones de *N. pumilio* habitando gradientes de precipitación poseen diferencias genéticas producto de una historia de aislamiento y adaptativas en respuesta a climas contrastantes. Esta evidencia destaca la importancia y urgencia del desarrollo de medidas de conservación tendientes a preservar las poblaciones marginales, la mayoría de las cuales se encuentran fuera de áreas protegidas. Las mismas serían un reservorio de variación adaptativa, que podría utilizarse para la restauración de poblaciones que actualmente sufren los efectos de sequías extremas hacia los márgenes húmedos de la distribución. En estos sitios la selección natural habría purgado los genotipos resistentes a la desecación que se encuentran actualmente hacia el este de la distribución de *N. pumilio* del norte de la Patagonia.

Abstract

In recent years there has been growing interest in populations located towards the extremes of species' distributions in relation to the impact of climate change. It is predicted that with the increase of the temperature the species will adjust to the new conditions tracking their ecological optimum migrating towards relatively cooler areas such as higher latitudes and elevations known as the advanced front or leading edge. On the other hand, it is suggested that populations facing the opposite extreme, i.e. on the retraction front or trailing edge, they would inhabit areas prone to drought and where population loss is predicted to take place. Therefore, it is relevant to analyze populations located in these margins and their potential to respond to future changes. In particular, marginal populations usually considered small in size and relatively isolated from each other, have been the subject of numerous studies, either those that present the conceptual framework and the biogeographical and ecological factors that impact them, as well as empirical studies where their genetic characteristics are shown. However, the results of the latter are far from showing concordant patterns and recently it has been emphasized that the geographic, ecological and genetic dimensions of marginality are not always concordant, highlighting the importance of those factors, that not only impact regionally, but also locally. In this thesis, the objective was to analyze the effects of climate and biogeographic history on the neutral and adaptive genetic characteristics of *Nothofagus pumilio*, the woody mountain species that inhabits the abrupt precipitation gradient of northern Patagonia. Foliage samples were taken from 70 populations along the gradient of precipitation that were classified as central and marginal located to the west and east of the isohyet of 850 mm, respectively. Samples were analyzed by different molecular markers. Chloroplast DNA sequences with low mutation rate were used to analyze historical effects such as past oscillations in climate and genotypes of two biparentally inherited markers as isoenzymes and microsatellites to quantify the impact of genetic drift and contemporary isolation. Given that *N. pumilio* inhabits complex environmental gradients, we analyze along the latitude, longitude and altitude the effect of different bioclimatic variables in relation to the variation in genetic parameters. Seedlings from six sites (3 central and 3 marginal) were grown in a greenhouse under homogeneous common garden conditions to analyze potential differences in quantitative traits such as growth, leaf morphology, plant architecture, plant phenology, and phenological rhythms during leaf burst. Plants from both marginal and central provenances were subjected to manipulative experiments of water stress and ecophysiological characters of gas exchange and water potential were measured. The genetic results showed comparable levels of genetic variation and degree of population divergence in marginal and central populations, both regions also showing the presence of particular genetic variants for all markers used. A relatively low but significant degree of isolation was found between marginal and central regions. These results suggest that *N. pumilio* would have subsisted locally in both regions to climate oscillations and that genetic differences have accumulated due to isolation between such gene pools. The results obtained showed a strong relationship between the climates along the different environmental gradients that affected the genetic variation of *N. pumilio*. The most influential

bioclimatic variables are related to summer rainfall and winter temperatures, with the general tendency of greater genetic diversity to higher rainfall and moderate temperatures. This shows that the spatial distribution of the genetic diversity of this species does not occur randomly, but that the patterns of genetic structuring respond to models complex climatic. The results of the cultivation in common garden under optimal conditions show significant differences with greater growth of the central plants while no differences were found between them for foliar and phenological characters. The plants of marginal populations responded differentially to the water stress experiment, showing a better use of water and reaching less negative water potentials. Therefore, *N. pumilio* seedlings from environments with contrasting precipitation regimes present adaptive responses and different ecophysiological features. The marginal populations of *N. pumilio* supported hydric stress better than the central populations of more mesic origin, which could imply a greater susceptibility of the latter to desiccation. In conclusion, the results of this thesis show that *N. pumilio* populations inhabiting precipitation gradients have genetic differences as a result of a history of isolation and adaptation in response to contrasting climates. This evidence highlights the importance and urgency of the development of conservation measures aimed at preserving marginal populations, most of which are outside protected areas. They are a reservoir of adaptive variation that could be used for the restoration of populations that currently suffer the effects of extreme droughts towards the wet margins of the distribution. At these sites, natural selection would have purged the drying-resistant genotypes that are currently east of the distribution of *N. pumilio* from northern Patagonia.

Capítulo I. Introducción General



I.1 Factores que influyen sobre la distribución geográfica de las especies

La presencia o ausencia de las especies y la forma en que se distribuyen en el espacio geográfico se definen por factores históricos, ecológicos y fisiológicos que varían a lo largo de la distribución sometiendo a las especies a diferentes condiciones abióticas y bióticas. Los factores abióticos son los distintos componentes del ambiente que establecen sus características físico-químicas, dentro de los más importantes figuran el agua, la temperatura y la luz. Los factores bióticos son todos los seres vivos y sus interacciones, tales como depredación, competencia, parasitismo, etc. Cuando un factor alcanza valores más allá de los márgenes de tolerancia de una especie genera estrés y actúa como un factor limitante para la supervivencia de esa especie.

El área de distribución de una especie se define como la fracción del espacio geográfico donde se encuentra presente e interactúa en forma no efímera con el ecosistema (Zunino y Palestrini, 1991). *“El nicho ecológico es un hipervolumen multidimensional donde se concentra un conjunto de condiciones bióticas y abióticas en las que una especie es capaz de persistir y mantener un tamaño poblacional estable”* Hutchinson, 1957. La amplitud del nicho y los límites de distribución de las especies dependen de la tolerancia ambiental producto de distintos procesos evolutivos que moldean a los organismos (Wiens y Graham, 2005). Las áreas de distribución son por lo tanto dinámicas a lo largo del tiempo, experimentando contracciones y expansiones por la influencia de los distintos factores biológicos, ecológicos, climáticos y biogeográficos entre otros. Hutchinson (1957) también distinguió entre el nicho fundamental y el real, el nicho fundamental está determinado por las condiciones abióticas en las que una especie es capaz de persistir, mientras que el nicho real describe las condiciones de persistencia en relación a la presencia de otras especies, por ejemplo, competidores y depredadores. Muchos aspectos del nicho fundamental de las especies se pueden conservar a lo largo tiempo, esta tendencia a retener aspectos de su nicho fundamental se denomina conservadurismo de nicho (Wiens y Graham, 2005).

Bajo escenarios cambiantes, si las especies no se adaptan lo suficientemente rápido o su amplitud de tolerancia es muy restringida, deberán desplazarse en el espacio geográfico para encontrar condiciones ambientalmente favorables dando lugar a procesos de colonización o extinción. El cambio climático global puede afectar el área de distribución de las especies (Parmesan, 1996), y sus modificaciones dependerán de los límites de tolerancia fisiológica (Peterson et al., 2001; Broennimann et al., 2006), la capacidad de respuesta adaptativa y aclimatación de las mismas para ajustarse a los cambios ambientales (Peterson et al., 2001). Comprender los factores que influyen sobre la distribución de las especies y la variación genética de las especies en su rango de distribución es necesario para predecir las consecuencias del cambio climático y orientar planes de conservación (Kapeller et al., 2016).

I.2 Poblaciones marginales y centrales

Las especies tienen un rango de tolerancia fisiológica y ecológica en función de los cuales pueden ocupar distintos ambientes a lo largo de gradientes ambientales. En los extremos de este rango las especies se encuentran bajo condiciones limitantes para sus requerimientos de desarrollo y sobrevivencia, en comparación con los óptimos ecológicos que generalmente existen hacia el centro de su distribución (Lesica y Allendorf, 1995).

Las poblaciones suelen ser más abundantes en el centro geográfico de distribución de una especie, donde las condiciones son relativamente óptimas para su desarrollo y se encuentran dentro de su rango de tolerancia ecológica. A medida que las condiciones se alejan del óptimo ecológico las poblaciones se tornan cada vez menos abundantes (Hengeveld y Haeck, 1982; Brown, 1984). Hacia los límites del rango de su distribución las poblaciones se vuelven más pequeñas y espacialmente aisladas entre sí (Brussard, 1984; Lawton, 1993; Vucetich y Waite, 2003). La idea de que las poblaciones cercanas a los límites del área de distribución de las especies pueden presentar diferencias fundamentales en comparación con las ubicadas en la parte central de su distribución, se conoce como “abundancia central” (e.g. Sagarin y Gaines, 2002; Sexton et al., 2009). Es un principio fundamental en ecología y biogeografía, conocido también como “centro-periferia” (e.g. Pironon et al., 2015; Papuga et al., 2018) y “central-marginal” (e.g. Eckert et al., 2008).

En esta tesis se denomina poblaciones marginales a aquellas que habitan hacia los bordes del rango de distribución de una especie y se estudiarán en relación con el gradiente de precipitación que varía con la longitud en Patagonia. Estas poblaciones por lo general, se encuentran aisladas, poseen tamaños relativamente pequeños y están ubicadas a cierta distancia del centro de distribución de la especie. El origen de las poblaciones marginales puede deberse a una distribución más amplia de la especie en el pasado (poblaciones relictuales) o poblaciones nuevas de una especie que se encuentra expandiendo su rango de distribución (Quiroga y Premoli, 2013) (Fig. I.1). Una población relictual, por lo tanto, es un tipo de población marginal cuyo

origen se debe a la retracción de una población original de mayor tamaño y que se encuentra fragmentada actualmente. En el caso de las poblaciones marginales relictuales se espera que las poblaciones sean genéticamente diversas y/o que presenten variantes genéticas particulares que reflejen un rango amplio en el pasado. Mientras que en el segundo caso, el origen de las poblaciones marginales se debe al establecimiento de nuevas poblaciones. En este último caso, habrían sufrido del efecto de la deriva genética por la colonización de un área a partir de un reducido número de individuos. A lo largo de este proceso de expansión habrían tenido lugar cuellos de botella genéticos y por lo tanto se trataría de poblaciones genéticamente empobrecidas. Los cuellos de botella ocurren cuando en una población se produce una reducción drástica en su tamaño poblacional, provocando un error de muestreo que modifica la composición del conjunto génico de la población (Pierce 2010).

Asimismo, la marginalidad de las poblaciones está determinada por la interacción de una gran variedad de factores que incluyen condiciones climáticas y ambientales locales, fragmentación de hábitat, características de las especies, fisiología e interacciones bióticas, así como la demografía y genética de las poblaciones (Vilà-Cabrera et al., 2019). Por lo tanto, sobre las poblaciones marginales se encuentran en juego mecanismos ecológicos y evolutivos que dependen de mucho más que la ubicación geográfica de una población (Hampe y Petit, 2005; Pironon et al., 2016; Sexton et al., 2009). El concepto de marginalidad posee entonces distintas dimensiones pudiendo descomponerse en marginalidad geográfica, marginalidad ecológica y marginalidad genética.

Las poblaciones marginales están generalmente compuestas por poblaciones aisladas relativamente entre ellas a diferencia de las que se ubican hacia el centro de distribución, por lo tanto, se espera que el aislamiento afecte el grado de divergencia genética entre ellas. Las poblaciones marginales se caracterizan también por estar sometidas a altas intensidades de selección cuyos efectos pueden ser variados. Si bien puede prevalecer la selección unidireccional, lo cual puede reducir la variación genética para caracteres adaptados a condiciones extremas (Kopp y Matuszewski, 2014), también podría existir mayor diversidad adaptativa, asociada a condiciones fluctuantes

(Eckert et al., 2008). Existen numerosos trabajos que discuten y revisan estudios empíricos sobre la variabilidad genética y el potencial evolutivo de las poblaciones centrales y marginales, sin embargo sus resultados son contradictorios (Brussard 1984; Lessica y Allendorf 1995; Gaston 2003; Eckert et al., 2008). Esto sugiere que la presunción de “abundancia central” no es un supuesto generalizable para hacer predicciones sobre la variación geográfica en la estructura genética de las poblaciones (Eckert et al., 2008).

Además de los efectos de la selección natural mencionados anteriormente, las poblaciones marginales pueden estar sometidas a la endogamia (cruza entre parientes), que trae aparejada un aumento en la homocigosis pudiendo expresarse alelos perjudiciales antes enmascarados en condición heterocigota. La deriva genética mencionada anteriormente y la endogamia actuando de manera conjunta pueden conducir a la fijación de alelos, que en el caso de ser perjudiciales, podrían generar depresión por endogamia que puede afectar la aptitud de los individuos reduciendo su viabilidad y fecundidad (Young et al., 1993, 1999; Couvet, 2002). Por lo tanto, es probable que las poblaciones marginales sean afectadas por endogamia y deriva genética producto del aislamiento histórico, y selección diferencial (Lessica y Allendorf, 1995; Vakkari et al., 2009).

Debido a la selección diferencial las poblaciones marginales pueden presentar adaptaciones locales cruciales para la supervivencia de las especies frente al cambio climático global (Sabatier et al., 2011; Kreyling et al., 2014) y por lo tanto ser de gran utilidad en programas de desarrollo y conservación. Entender cómo la adaptación genética y/o los factores ambientales influyen sobre el rango de distribución de las especies resulta esencial para evaluar su supervivencia a largo plazo (Kapeller et al., 2016).

Uno de los objetivos de la conservación de recursos genéticos forestales de especies con amplios rangos de distribución, es preservar la integridad del acervo genético de las mismas, a través de la protección de variantes genéticas únicas, centros de variación genética y patrones de flujo génico interpoblacional (Millar y Libby 1991). Por lo tanto, el estudio e interpretación de patrones de variación genética se ha convertido en un objetivo prioritario en

conservación. Particularmente las poblaciones marginales pueden presentar variantes genéticas particulares y ser importantes en potenciales eventos de especiación (Brown, 1984; Lesica y Allendorf, 1995; Matthies et al., 2004) y de ahí su relevancia en conservación (Lesica y Allendorf, 1995). Las adaptaciones locales podrían ser de suma importancia ya que las poblaciones marginales podrían convertirse en centros de expansión que posibiliten cambios en la distribución geográfica de las especies (Safriel et al., 1994).

Bajo el escenario de cambio climático global, es prioritario conocer las potenciales respuestas genéticas y/o plásticas de especies clave de bosque, ya que podrían modificarse sus rangos de distribución. Éstos cambios podrían ser más pronunciados hacia los extremos de distribución de las especies donde habitan las poblaciones marginales (Premoli et al., 2011). Por ejemplo los bosques en contacto con la estepa patagónica presentan, en respuesta a una intensificación del déficit hídrico, una tendencia negativa de crecimiento durante el siglo XX (Srrur et al., 2008).

Nothofagus pumilio es una especie clave de los bosques australandinos con amplia distribución. Se han realizado numerosos estudios sobre las características de sus poblaciones a lo largo de gradientes latitudinales y altitudinales pero resulta escasa la información de poblaciones del gradiente longitudinal de precipitación consideradas marginales (Fig. 1.2), siendo necesario investigar la potencial variación genética y su posible valor adaptativo.

I.3 Cambios en el clima, el Último Máximo Glaciar en Patagonia

La historia biogeográfica de las plantas leñosas de Patagonia se encuentra modelada por las glaciaciones que comenzaron hace aproximadamente entre 7 y 5 Ma atrás durante el Neógeno (Rabassa et al., 2005). Esta época se caracterizó por la alternancia cíclica de períodos glaciarios de climas fríos con períodos interglaciarios más cálidos (Hewitt, 1999). Durante los períodos glaciarios gran parte de la superficie terrestre fue cubierta por mantos de hielo,

cuya máxima extensión en el sur de Sudamérica, denominada Gran Glaciación Patagónica, se data en aproximadamente hace un millón de años (Mercer, 1976).

El último máximo glacial (UMG) ocurrió hace aproximadamente 20000 años (Rabassa, 2008). La extensión de sus hielos ha sido inferida en base a registros fósiles (sobre todo polínicos), depósitos glaciarios y técnicas más modernas de modelaje de nicho ecológico. Durante el UMG el ambiente periglacial con capas de suelo congelado (permafrost) se habría extendido hasta la zona extraandina (Trombotto, 2000).

Como en otros lugares del mundo, durante los períodos fríos las especies sensibles al frío (i.e. mesotérmicas) tendieron a reducir sus rangos de distribución, quedando restringidas a zonas denominadas de refugio bajo microclimas que mitigaron los fenómenos climáticos extremos (Hampe y Jump, 2011). Dadas las condiciones físicas del sur de Sudamérica, tales como la mayor influencia oceánica y la heterogeneidad del paisaje debido a la presencia de la Cordillera de los Andes, se postuló que las especies tolerantes a las bajas temperaturas (microtérmicas) habrían sobrevivido a las glaciaciones en reductos climatológicamente favorables (Markgraf et al., 1995) a lo largo de sus rangos actuales de distribución, dando lugar a la existencia de refugios múltiples (Premoli et al., 2000).

Se han realizado estudios para conocer el efecto de las últimas glaciaciones sobre la distribución de distintas especies en Patagonia. Utilizando marcadores moleculares en especies arbóreas, se ha demostrado la supervivencia de éstas en refugios al este de los Andes, tal es el caso de *Fitzroya cupressoides* (Premoli et al., 2000), *Embothrium coccineum* (Souto y Premoli, 2007), *Podocarpus nubigenus* (Quiroga y Premoli, 2010) y otras especies del género *Nothofagus* (Marchelli y Gallo, 2006; Azpilicueta et al., 2009; Pastorino et al., 2009).

Los efectos del UMG tuvieron diferencias latitudinales en Patagonia. Hacia el norte de los 40°S los glaciares fueron de extensión reducida, principalmente glaciares de valles, con poca acción erosiva que permitió mantener el paisaje pre-glacial intacto (Glasser et al., 2008). Estas condiciones

podieron haber facilitado la permanencia de especies arbóreas como *N. pumilio*, una de las especies con mayor distribución actual en Patagonia, en áreas libres de hielo (Mathiasen y Premoli, 2010). Hacia el sur la capa de hielo fue más continua, sin embargo utilizando técnicas de modelaje de nicho ecológico, que permiten proyectar la distribución de las especies en el pasado a base de modelos climáticos, se postuló la persistencia local de *N. pumilio* a latitudes tan altas como Tierra del Fuego (Premoli et al., 2010).

Linajes antiguos como *Nothofagus* muestran adaptaciones a condiciones del ambiente físico que cambiaron a la largo de su historia evolutiva. Por lo tanto tendrían el potencial de responder a cambios climáticos, no solamente a los asociados a las glaciaciones ocurridas desde el Neógeno (Premoli, et al., 2012a; Acosta et al., 2014). Actualmente en el norte de Patagonia existen poblaciones marginales de *N. pumilio* ubicadas hacia el extremo oriental del gradiente de precipitación. El estudio de este tipo de poblaciones es clave para entender como las especies responderán a ambientes cambiantes (Kreyling et al., 2014).

I.4 Gradientes climáticos de Patagonia

La región patagónica ha sido modelada por distintos procesos geológicos y climáticos a lo largo del tiempo que han generado una gran heterogeneidad espacial. Cualquier especie que se desarrolle en un rango de distribución más o menos amplio en este territorio, se va a encontrar con este medioambiente en extremo variado (Donoso 1987). Esto se vio reflejado en la distribución de los polimorfismos genéticos en especies de amplio rango como los *Nothofagus* (Acosta et al., 2014). En Patagonia, se puede identificar la presencia de tres importantes gradientes ambientales: latitudinal (norte-sur), longitudinal (este-oeste) y altitudinal de elevación. A lo largo de estos gradientes existe variación en los distintos factores climáticos que afectan la distribución de la vegetación en el sur de Sudamérica (Veblen et al., 1996). El clima general es templado frío, influenciado por la latitud y la elevación sobre el nivel del mar, y las temperaturas extremas son moderadas por las grandes masas de agua

oceánicas y lacustres. Las nevadas son más frecuentes y copiosas en los lugares más australes o de mayor elevación y ocurren principalmente en invierno. Estos gradientes pueden covariar, así por ejemplo la duración de la estación de crecimiento depende de factores climáticos afectados por los gradientes latitudinal y altitudinal (Fig. I.6, Mathiasen 2010). Mientras más al sur y mayor sea la elevación sobre el nivel del mar, más corta será la estación de crecimiento (Donoso et al., 1995).

La heterogeneidad ambiental producto de los distintos gradientes, puede generar barreras al flujo génico influyendo en la estructura genética de las poblaciones (Manel et al., 2003). Por lo tanto, las especies de amplia distribución que habitan gradientes ambientales pueden presentar variación en una gran cantidad de caracteres, muchos de los cuales poseen base genética. Conocer el grado de variación genética y/o de plasticidad fenotípica de especies dominantes para distintos caracteres es relevante para predecir posibles respuestas futuras a cambios en el clima. Bajo escenarios de calentamiento global se espera una retracción en el rango de distribución de especies arbóreas con escasa capacidad de migración, dispersión y largos tiempos generacionales (Mathiasen y Premoli, 2016). Las poblaciones con reducida variación genética ubicadas en los extremos de los gradientes ambientales, serán las que sufrirán en mayor medida los efectos negativos del cambio climático al tener limitada su capacidad de respuesta a cambios ambientales (Premoli y Mathiasen, 2011). Los gradientes ambientales pueden considerarse “experimentos naturales” a lo largo de los cuales es posible analizar las respuestas de los organismos a variaciones en las condiciones físicas del ambiente (Premoli y Mathiasen, 2011).

A continuación se describen brevemente los gradientes geográficos de Patagonia que serán analizados en detalle en el Capítulo III. Cabe mencionar que los gradientes geográficos se consideran gradientes ambientales a lo largo de los cuales varían las condiciones ecológicas tanto abióticas como bióticas resultando en presiones diferenciales de selección que impactan sobre el acervo genético de las poblaciones y especies que los habitan. En el caso particular de esta tesis se analizará el efecto del clima sobre las características genéticas de *N. pumilio*.

Gradiente latitudinal

La radiación solar que llega a la superficie de la tierra varía considerablemente con la latitud, mientras más al sur la radiación es menor. Esto se debe principalmente a que a latitudes más altas la radiación incide con mayor inclinación teniendo que atravesar una capa de aire mayor para llegar a la superficie terrestre. Además, también por la inclinación, la radiación se reparte en una superficie más grande, generando menor radiación por unidad de superficie. De esta forma, la energía recibida es menos intensa que la recibida por latitudes más bajas. La manera en que el ángulo de incidencia varía a lo largo del año es responsable de la variación estacional de la temperatura y la duración de los días.

La precipitación y las temperaturas también disminuyen hacia el sur de los Andes patagónicos. Las temperaturas medias anuales descienden de 12°C en el norte (37-42°S) hasta 6°C hacia el sur (al sur de los 47°S) (Villalba et al., 2003). En el norte de la Patagonia, existe una marcada estacionalidad en las precipitaciones, estas se concentran principalmente en invierno y comienzos de primavera en forma de lluvia o nieve; durante el verano y otoño temprano las precipitaciones disminuyen dando lugar a un período seco y templado. Hacia el sur, el régimen cambia de manera gradual hasta un patrón regular de lluvias distribuidas uniformemente en el que no habría déficit hídrico durante todo el año. Estas diferencias latitudinales en las precipitaciones se deben a una mayor influencia de la cordillera en el norte de la Patagonia que genera un efecto sombra de precipitaciones (López Bernal et al., 2012). A su vez también se encuentran influenciadas por los cambios estacionales en posición e intensidad del anticiclón del pacífico sur (Paruelo et al., 1998).

Debido a estas diferencias climáticas existe una disminución latitudinal de los límites inferior y superior de los bosques patagónicos hacia el sur (Veblen et al., 1996). En el extremo más austral del continente el límite inferior se extiende hasta el nivel del mar. En relación al límite superior del bosque, se ha documentado una disminución de 60 m de altitud por grado de latitud (Lara et al., 2005), desde los 1800 m a los 38°S hasta los 600 m en Tierra del Fuego (Veblen et al., 1996).

Gradiente altitudinal

En el gradiente altitudinal las condiciones ambientales tales como la temperatura, la radiación solar, la exposición al viento y las características del suelo varían drásticamente en distancias de unos pocos cientos de metros. A medida que se asciende la temperatura media del aire disminuye a razón de $0,7^{\circ}\text{C}$ cada 100 m, esto se debe a la disminución de la densidad del aire (y con ello las presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono) y al alejamiento de la superficie de la tierra que es una gran fuente de emisión de calor debido a la reflexión de la energía solar. Con el incremento de la elevación también disminuye la temperatura del suelo, se acorta el período libre de heladas y se produce un aumento en las precipitaciones, siendo mayor el porcentaje de nevadas (Barrera et al., 2000).

En las pendientes más escarpadas son comunes los deslizamientos y avalanchas, ante esto las plantas suelen conformar grupos compactos evitando la erosión del suelo. La orientación de las laderas también condiciona la acumulación de nieve, el grado de insolación y la exposición al viento; debido a esto, las laderas con orientación norte y oeste reciben mayor irradiación, y son más secas en comparación a las laderas este y sur.

Todos estos cambios pueden afectar tanto la biodiversidad como las características de una especie en particular a distintas alturas, encontrándose una gran variación morfológica en especies que habitan un amplio rango altitudinal. Poblaciones de individuos separados por escasas decenas de metros pueden estar bajo regímenes de selección divergentes resultando en una marcada diferenciación genética. A su vez, diferencias fenológicas debidas a la capacidad de aclimatación con la altura pueden aislar reproductivamente dichas poblaciones al limitar el flujo génico entre ellas, incrementando la diferenciación genética aún en poblaciones contiguas (Premoli et al., 2007).

A pesar del aspecto desértico de los extensos pedreros de altura y de la baja cobertura de sus comunidades vegetales, el ambiente altoandino posee una alta diversidad y varios endemismos (Ferreyra et al., 1998).

En relación al cambio climático global, el aumento de la temperatura favorece el crecimiento de las plantas en el límite altitudinal superior del bosque, pero intensifica el déficit hídrico en el límite inferior en combinación con una reducción en las precipitaciones (Srur et al., 2008).

Gradiente longitudinal

Sobre las laderas orientales de la Cordillera de los Andes existe un marcado gradiente longitudinal de precipitación. Esto se debe principalmente a la influencia de los vientos predominantes provenientes del océano Pacífico que encuentran en las cadenas montañosas una barrera para la circulación atmosférica (Paruelo et al., 1998; Villalba et al., 2003). La mayor parte de humedad contenida en las masas de aire oceánicas es descargada sobre las laderas chilenas, y el aire se vuelve más caliente y seco a través de un calentamiento adiabático al descender por el lado Argentino de los Andes (Paruelo et al., 1998). De esta manera se genera uno de los más pronunciados “efecto sombra de precipitación” del planeta (Blisniuk et al., 2005) (Fig. I.3). Las precipitaciones anuales descienden abruptamente de oeste a este de 3000 mm a menos de 800 mm en una distancia de sólo 50 km (Veblen et al., 1996) y se ven reflejadas por una transición de distintos tipos de vegetación: bosque, estepa gramínea, estepa arbustivo-gramínea, estepa arbustiva y erial también de oeste a este (Soriano 1956, Movia et al., 1987, Jobbágy et al., 1996, León et al., 1998).

Desde los Andes hasta la estepa la temperatura media anual varía de 6°C en el bosque australandino cercano al límite altitudinal superior, a 8°C en el ecotono entre el bosque australandino y la estepa (Gallopín, 1978). Este gradiente de precipitación y temperatura afecta también la profundidad de la nieve acumulada y su permanencia en las altas cumbres sobre las distintas laderas de los Andes, que resulta mayor sobre el oeste (Premoli 2004). La posición de los cerros en el gradiente de precipitación también determina diferencias en las alturas del límite altitudinal superior y de la nieve permanente, por ejemplo el límite altitudinal superior hacia el oeste en el Cerro

Tronador es a los 1640 m s.n.m. y hacia el este en el Cerro Ñireco es de 1800 m s.n.m. (Ferreyra et al., 1998; Ezcurra y Brion 2005).

Se ha encontrado una mayor riqueza de flora altoandina relacionada a cerros situados hacia el este que en cerros con mayores precipitaciones situados al oeste. Esto puede deberse a varios factores como un menor espesor y permanencia de nieve en invierno que posibilita una estación de crecimiento más larga para las plantas. Además, los cerros del este poseen una mayor heterogeneidad ambiental, desde laderas secas y expuestas a mallines y bordes de arroyos, mientras que los cerros del oeste, por la mayor cantidad de precipitación, son más homogéneos. También puede deberse a que las montañas del este hayan estado menos influenciadas por la erosión glaciaria o hayan sido áreas libre de hielo durante el último máximo glacial (Ferreyra et al., 1998).

I.5 Marcadores moleculares en la reconstrucción biogeográfica a diferentes escalas temporales

La estructura genética de las poblaciones es producto de eventos históricos ocurridos a distintas escalas temporales que pueden estudiarse mediante marcadores moleculares. La disponibilidad de distintos tipos de marcadores, en términos de las regiones de ADN involucradas, su tipo de herencia y tasa de mutación posibilitan reconstruir eventos del pasado y contemporáneos analizando un gran número de individuos y poblaciones con relativa facilidad.

Los marcadores moleculares comúnmente utilizados en estudios poblacionales son considerados neutros, ya que miden la influencia de la deriva genética y las barreras al flujo génico. Pueden dividirse en marcadores de herencia biparental (isoenzimas, microsatélites y otros) o uniparental (ADN de mitocondrias y cloroplastos). El flujo génico es relativamente mayor en marcadores de herencia biparental, ya que sufren los procesos involucrados en la reproducción sexual, recombinación y segregación independiente, y en el caso de las plantas pasan a la siguiente generación a través de dos vectores, el polen y las semillas. Por el contrario, los marcadores de herencia uniparental

poseen menor tasa de mutación dada por los errores que se producen durante la duplicación del ADN. Así, los distintos marcadores poseen diferentes tasas de mutación, gracias a las cuales es posible analizar procesos que afectan las poblaciones en diferentes ventanas temporales (Petit et al., 2005).

Utilizando marcadores biparentales nucleares es posible analizar procesos como las glaciaciones del Cuaternario, que afectan las tasas de flujo génico y deriva contemporáneos sobre el acervo genético de especies de plantas (Hewitt, 2000). Ejemplo de este tipo de marcadores usados desde el inicio del desarrollo de la disciplina de la genética de poblaciones son las isoenzimas; cuya diferencia de movilidad electroforética debido a diferencias en su carga eléctrica y tamaño molecular permite detectar distintas isoenzimas y aloenzimas. Las isoenzimas comprenden todas las formas enzimáticas con función similar producidas por diferentes loci génicos, es decir enzimas que catalizan la misma reacción pero codificadas en distintos sitios del genoma. Las aloenzimas son variaciones en las cadenas polipeptídicas que representan diferentes alternativas alélicas del mismo locus, es decir variantes de un gen en una posición determinada dentro del genoma. Las isoenzimas han sido utilizadas por ejemplo para analizar la supervivencia *in situ* de numerosas especies leñosas de Patagonia (Sérsic et al., 2011).

Otros marcadores moleculares biparentales más recientemente desarrollados son los microsatélites o secuencias simples repetidas, que consisten en secuencias de ADN de uno a cinco nucleótidos, cuya variación en el número de repeticiones en tandem crea diferentes alelos que se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN y por lo tanto poseen una alta tasa de mutación, que los hace altamente polimórficos. Tanto las isoenzimas como los microsatélites presentan herencia mendeliana y se expresan de manera codominante, permitiendo por lo tanto distinguir los estados homocigota y/o heterocigota de los genotipos de los individuos. Se utilizan para caracterizar la estructura genética de las poblaciones en cuanto a diversidad, divergencia y endogamia (Kirk y Freeland, 2011).

El ADN del cloroplasto (ADNc) es considerado un marcador más conservado temporalmente debido a su herencia uniparental y baja tasa de mutación, que permite reconstruir relaciones genealógicas entre haplotipos y desarrollar análisis filogeográficos (Kremer y Petit, 1993; Petit et al., 1993). En este sentido regiones no codificantes del ADNc han sido utilizadas para evaluar procesos históricos ocurridos en Patagonia previos al Pleistoceno. En linajes antiguos como *Nothofagus* los polimorfismos de ADNc pueden reflejar patrones de dispersión y vicarianza que ocurrieron durante migraciones y aislamientos históricos (Premoliet et al., 2012b; Acosta et al., 2014).

El uso combinado de distintos marcadores moleculares permite diferenciar entre los patrones históricos y contemporáneos de flujo génico. Representan una herramienta crucial para evaluar las consecuencias genéticas de modificaciones pasadas en la distribución de las especies y de esa manera predecir potenciales escenarios futuros, sobre todo frente al cambio climático global.

Generalmente se considera que las poblaciones marginales exhiben baja diversidad genética y mayor diferenciación genética como consecuencia del conjunto de fuerzas evolutivas actuantes, sin embargo este supuesto está pobremente probado (Eckert et al., 2008). La forma de analizar los distintos factores sobre las poblaciones marginales se analizará en esta tesis combinando marcadores moleculares de distinta tasa de mutación que permiten desentrañar por un lado efectos históricos (si las poblaciones son relictuales de una distribución más amplia en el pasado) utilizando secuencias conservadas de ADN del cloroplasto, los efectos de la selección (en relación con el gradiente de precipitación) utilizando experimentos de jardín común y manipulativos de estrés hídrico y la influencia de la deriva y el aislamiento utilizando marcadores de herencia biparental.

I.6 Experimentos de jardín común y manipulativos para el estudio de adaptaciones locales

El fenotipo es el conjunto de caracteres observables que un individuo presenta como resultado de la interacción entre su genotipo (constitución genética) y el medio ambiente. La capacidad de un organismo de presentar distintos fenotipos en respuesta a cambios ambientales se denomina plasticidad fenotípica o aclimatación; y el conjunto de respuestas fenotípicas en un gradiente ambiental se define como norma de reacción. Cuando estas respuestas tienen base genética existe una respuesta evolutiva adaptativa a los distintos ambientes (Kopp y Matuszewski, 2014). La supervivencia de una especie puede ser facilitada en gran medida por la plasticidad fenotípica, y la variación en la plasticidad heredable puede acelerar la evolución genética (Kopp y Matuszewski, 2014).

Los efectos combinados de las fuerzas evolutivas como la deriva genética, el flujo génico y la selección natural, determinan las características genéticas de las poblaciones. A diferencia de las dos primeras fuerzas evolutivas mencionadas anteriormente consideradas neutrales, la selección natural consiste en la reproducción diferencial de genotipos que opera cuando algunos individuos presentan rasgos adaptativos con base genética y dejan mayor descendencia que otros individuos de la población (Pierce 2010).

Las características genéticas de las poblaciones pueden analizarse mediante marcadores moleculares. Sin embargo, el uso de marcadores moleculares neutrales tradicionales como las isoenzimas y los microsatélites, analizan los efectos de la deriva genética y el aislamiento y por lo tanto no permiten evaluar potenciales diferencias adaptativas producto del efecto de la selección natural. Con el fin de analizar y poder separar el componente genético del ambiental se pueden realizar experimentos de genética ecológica como en jardines comunes (Villemereuil et al., 2016). Existen distintos diseños experimentales, dependiendo de su duración (largo o corto plazo) y el grado de manipulación o control de las condiciones ambientales.

En los estudios de jardín común (a campo o invernadero) se cultivan plantas de distintas procedencias bajo condiciones homogéneas con el objetivo de discriminar si las diferencias fenotípicas observadas a campo poseen base genética producto del efecto selectivo de ambientes contrastantes. Estos experimentos permiten determinar la potencial base genética de la variación fenotípica. Sin embargo, los estudios bajo condiciones homogéneas por sí mismos no pueden proveer información sobre el valor adaptativo diferencial de la variación fenotípica. Por lo tanto, para poder analizar la ventaja adaptativa de ciertos genotipos en relación con determinados ambientes, se utilizan otros abordajes metodológicos como la manipulación de factores ambientales en condiciones controladas.

Si el objetivo de un estudio es analizar la influencia de un determinado factor ambiental, los ensayos en jardín común con manipulación en invernadero permiten minimizar la variabilidad y efecto de los factores que no están siendo objeto de estudio. Por ejemplo, si se quieren investigar los efectos de la disponibilidad de agua, se deben controlar todos los demás factores (condiciones de luz, temperatura, nutrientes, etc) para que, de esta forma, la variación fenotípica encontrada pueda asociarse a variación genética relacionada al factor en estudio.

La persistencia de las poblaciones bajo cambios ambientales como el cambio climático global, puede ser posible si las poblaciones incluyen variantes genéticas adaptadas a esos ambientes (Sabatier et al., 2011), y/o exhiben alta plasticidad fenotípica (Safriel et al., 1994). La adaptación local de las plantas puede definirse como la mayor aptitud de los individuos locales en su lugar de origen en comparación con individuos no locales de la misma especie (Biere y Verhoeven, 2008). En particular, las poblaciones ubicadas hacia los márgenes de distribución de las especies pueden presentar fenotipos novedosos debido a la intensa selección resultante de cambios evolutivos y ecológicos (Hardie y Hutchings, 2010).

En esta tesis se realizaron experimentos de jardín común y manipulativos de déficit hídrico para comparar las respuestas ecofisiológicas de plántulas de procedencia marginal y central de *Nothofagus pumilio* identificando

si existen diferentes respuestas adaptativas y/o plásticas entre ambos tipos de poblaciones.

I.7 La especie bajo estudio

Nothofagus pumilio (Poepp. et Endl.) Krasser, es la principal especie que domina zonas de montaña y de altas latitudes de Patagonia, donde generalmente forma bosques puros. Se la conoce popularmente con el nombre de “lenga”, palabra proveniente de la lengua mapuche “mapuzungun”. Presenta una gran distribución geográfica encontrándose en los distintos tipos de bosques de templado cálidos a fríos en los Andes Australes, a lo largo de aproximadamente 3000km de la Cordillera de los Andes (Fig. I.4). Juntamente con *N. antarctica*, *N. pumilio* posee el mayor rango de distribución latitudinal en Patagonia. Su centro de distribución se encuentra alrededor de los 41°S donde forma el límite altitudinal superior del bosque aproximadamente a los 2000 m sobre el nivel del mar (Veblen et al., 1996). Además a esta latitud la especie presenta un amplio gradiente longitudinal el cual permite seleccionar un amplio número de poblaciones para su estudio. Hacia el este domina el ecotono entre los bosques y la vegetación subalpina. Abarca desde los 35°35´S por el sector chileno occidental de la Cordillera de los Andes y desde los 36°50´S según Tortorelli (1956) o los 37°30´S según Cozzo (1967) por el sector argentino oriental de la misma Cordillera, hasta el extremo austral del continente a los 56°S (Donoso, 1995).

N. pumilio es una especie de interés forestal explotada principalmente en el extremo austral de su distribución en Tierra del Fuego (Martínez Pastur et al., 2004; Martínez Pastur et al., 2007). A estas latitudes los bosques de *N. pumilio* pueden extenderse hasta el nivel del mar sobre la costa Atlántica (Veblen et al., 1996). Es una especie monoica y con dispersión anemófila de polen. Al igual que otras especies cercanamente emparentadas del subgénero *Nothofagus* es principalmente auto-incompatible (Riveros et al., 1995) y con altas tasas de fecundación cruzada (Premoli, 1997). Sin embargo, posee relativamente baja tasa de germinación de semillas (no supera el 26 %, Premoli, 2004) y limitada

dispersión de las mismas, ya que ocurre fundamentalmente por gravedad y poseen escasa dispersión, sólo 110 m del árbol semillero (Barrera et al., 2000; Cuevas, 2000). Sus hojas son deciduas, de 2 a 4cm de largo, borde crenado con una escotadura internervial, base levemente asimétrica y pecíolos de hasta 0,5 cm de largo (Dimitri y Milano, 1950) (Fig. 1.5). Sus plántulas suelen crecer lentamente durante varios años en el sotobosque sombreado creando bancos de plántulas en espera de aperturas del dosel para prosperar (Martínez Pastur et al., 2007).

Sobre las laderas de montaña *N. pumilio* muestra variación continua (clinal) en rasgos morfológicos hasta alcanzar el límite de la vegetación arbórea (Premoli, 2004). En el extremo inferior del gradiente altitudinal, crece como árboles erectos alcanzando hasta 30 m de altura y diámetros de 1,7 m, mientras que en el límite altitudinal superior, producto de las condiciones extremas, presentan una forma achaparrada y retorcida denominada “krummholz” (en alemán, krummholz significa árbol de forma achaparrada) (Hueck, 1978; Donoso, 1981). Al igual que otras especies emparentadas sus ramas son aplanadas en estratos y flexibles, permitiendo que la nieve se deslice sin quebrarlas. En cuanto a longevidad las edades máximas rondan los 350 años (Veblen et al., 1996; Fajardo y Piper, 2011), pero se han datado individuos que alcanzan más de 400 años de edad (Villalba et al., 1997). Dados sus rangos de distribución, características funcionales y morfológicas de sus hojas y estudios ecofisiológicos, *N. pumilio* se considera una especie tolerante al frío de la misma manera que otros miembros del subgénero *Nothofagus*. Sin embargo, en comparación a otros congéneres, presenta una escasa amplitud térmica (Alberdi, 1987) y limitaciones a temperaturas extremadamente bajas, por lo tanto suele ocupar sitios microclimáticamente más moderados (Premoli, 2004).

Debido a su amplio rango de distribución *N. pumilio* se ve afectada por los gradientes ambientales altitudinal, latitudinal y longitudinal. La variación en caracteres de base genética fue objeto de estudios previos en los gradientes altitudinal y latitudinal mientras que la variación a lo largo del gradiente longitudinal aún no ha sido explorada. En relación al gradiente altitudinal se han descrito patrones de variación en distintas características fenotípicas (e.g.

Barrera et al., 2000; Cuevas, 2000; Premoli, 2004), se han realizado experimentos de jardín común (Premoli et al., 2007), trasplantes recíprocos (Mathiasen y Premoli, 2016), y se ha analizado la variación genética (Premoli, 2003; Mathiasen y Premoli, 2013).

A lo largo del gradiente altitudinal *N. pumilio* presenta una variación morfológica significativa en sus formas de crecimiento y en el modo de regeneración, lo que podría resultar en una compleja estructuración genética en las poblaciones que habitan condiciones contrastantes del gradiente altitudinal, e incluso presentar adaptaciones locales a ambientes extremos en sitios donde las condiciones climáticas son adversas. Así, por ejemplo, un árbol adulto puede alcanzar hasta 30 m de altura en el límite altitudinal inferior del gradiente donde forma bosques puros, y va decreciendo paulatinamente hasta transformarse en plantas de forma achaparrada o de “krummholz” en el límite altitudinal superior del bosque. El tamaño de las hojas también decrece con la altitud y se reduce la estación de crecimiento (Rusch, 1993). Muchas de estas variaciones morfológicas podrían estar determinadas por la combinación de plasticidad fenotípica (potencial para desarrollarse bajo distintas condiciones ambientales) y diferencias genéticas de la especie. Las marcadas variaciones en caracteres autoecológicos que existen en los extremos del gradiente altitudinal han demostrado tener una base genética (Premoli, 2004; Premoli et al., 2007; Premoli y Brewer, 2007). Se ha descrito además un alto grado de asociación fenológica con la altitud, habiendo un desfase de 2 semanas en la apertura de las yemas (y por lo tanto en la floración) entre sitios de los límites altitudinal inferior y superior (Rusch, 1993). Existe un retardo en la brotación de yemas y apertura de hojas entre 5-9 días por cada 100 m de incremento con la altura (Barrera et al., 2000). El mantenimiento de estas diferencias en jardín común demostró que la fenología de la brotación está determinada genéticamente (Premoli et al., 2007) y confiere ventajas adaptativas (Mathiasen y Premoli, 2016).

Los modelos demográficos en gradientes altitudinales de *N. pumilio* mostraron que la disponibilidad de semillas y el establecimiento de adultos se vuelven cada vez más escasos con el aumento de la altitud, lo que lleva a la formación de un borde abrupto comúnmente visto en el límite altitudinal

superior del bosque. Si bien *N. pumilio* alcanza la madurez reproductiva a partir de los 20-30 años, la producción de semillas varía en el tiempo con ciclos de alta producción cada 8 años (Cuevas, 1999, 2000). Se ha demostrado que la viabilidad y el porcentaje de germinación de las semillas son mayores en años de alta producción (masting). Hacia el límite altitudinal superior del bosque la producción de semillas es menor, y la regeneración ocurre principalmente por una abundante producción de rebrotes (y escasa de renuevos) (Martínez Pastur, 1997; Cuevas, 2000; Daniels, 2000; Premoli, 2004). En cambio, en el límite inferior del bosque la regeneración de *N. pumilio* ocurre principalmente gracias a la apertura de claros bajo el dosel, ya sea por la caída de árboles (Heinemann et al., 2000) u otros disturbios a mayor escala (e. g. avalanchas, incendios, vulcanismo).

Estudios de diversidad genética mediante análisis de isoenzimas desarrollados en tres cerros en el NO de la Patagonia mostraron que la diversidad genética en *N. pumilio* disminuye con la altitud, y que además las poblaciones ubicadas en la misma franja altitudinal en distintos cerros eran más similares entre sí que con las poblaciones pertenecientes a otras franjas altitudinales del mismo cerro. Esto se atribuye a las diferencias fenológicas encontradas con la altitud, que restringen el flujo génico aislando reproductivamente a las poblaciones separadas por escasos cientos de metros dentro de un mismo cerro y facilitando el intercambio genético entre franjas altitudinales similares de distintos cordones montañosos (Premoli, 2003).

A nivel de rodal, el análisis de la estructura genética espacial a escala fina de *N. pumilio* utilizando marcadores isoenzimáticos y de microsatélites con un diseño de muestreo espacialmente explícito en condiciones contrastantes del gradiente altitudinal en tres pares de sitios de estudio, mostraron que el modo de regeneración afecta la distribución espacial de los genotipos a escalas espaciales menores a los 100 m (Mathiasen y Premoli, 2013). En bosques de baja a mediana altitud la diversidad genética es mayor y la estructura demográfica más compleja. La regeneración predominante por semillas y el establecimiento de plántulas en claros abiertos bajo el dosel en sitios cercanos al árbol semillero, contribuyen a un agrupamiento espacial de individuos con genotipos emparentados. En cambio, en el límite altitudinal superior, predomina

la regeneración vegetativa con una esporádica reproducción sexual, debido a que las condiciones climáticas adversas no son favorables para la producción de semillas y establecimiento de plántulas en dichos sitios, lo que contribuye a una mayor homogeneidad genética y una marcada estructuración intrapoblacional mantenida por rebrote (Mathiasen y Premoli, 2013).

Experimentos de jardín común realizados con plántulas provenientes de condiciones contrastantes del gradiente altitudinal colectadas en bosques de *N. pumilio* al norte de su rango (Valle del Challhuaco a 1100 y 1500 m s.n.m) que fueron cultivadas durante 4 años en condiciones homogéneas, muestran que características arquitecturales de las plantas, rasgos morfológicos de las hojas y la fenología foliar difieren significativamente con la altitud (Premoli et al., 2007). Las plántulas provenientes de bosques de baja altitud presentan mayor elongación del tallo, hojas de mayor tamaño en lugares donde la competencia por luz es el mayor limitante del crecimiento, mientras que las plantas del límite altitudinal superior presentaron un crecimiento más compacto, con tallos más cortos y mayor número de ramas, hojas más pequeñas y elongadas, y además la apertura de las yemas es más tardía en plantas provenientes de localidades donde los fuertes vientos y la mayor irradiación solar favorecen este tipo de crecimiento (Premoli et al., 2007). Las diferencias encontradas entre plantas provenientes de distintos sitios aún en condiciones de jardín común, estarían indicando que las plantas de *N. pumilio* de altura presentan adaptaciones en los patrones de crecimiento y en la fenología en respuesta a presiones de selección extremas que estarían fijadas genéticamente.

El valor adaptativo de las variaciones morfológicas y genéticas a lo largo del gradiente altitudinal se evaluó a través de experimentos de trasplante recíproco a largo plazo durante 10 años (Mathiasen y Premoli, 2016). En el sitio experimental de baja altitud, las plantas locales presentaron mayor crecimiento que las plantas traslocadas. Allí, las plantas de altura presentaron un mayor crecimiento que en su sitio de origen; sin embargo, la supervivencia fue menor. En el sitio ubicado en el límite altitudinal superior, las plantas provenientes de sitios de baja altitud superaron en crecimiento a las plantas locales, y presentaron una alta supervivencia, lo que sugiere que bajo escenarios de calentamiento global los genotipos adaptados a las condiciones extremas de

sitios de altura podrían perderse y ser reemplazados por genotipos más plásticos y/o con mayor polimorfismo genético provenientes de sitios de menor altitud durante el proceso de migración altitudinal esperado por el cambio climático (Mathiasen y Premoli, 2016).

En relación al gradiente latitudinal, se realizaron análisis-filogeográficos en combinación con técnicas de modelaje de nicho. En base a secuencias del ADN del cloroplasto se demostró que poblaciones de *N. pumilio* habrían sobrevivido en refugios a lo largo de su rango actual durante el último máximo glacial. Se encontraron dos grupos monofiléticamente simétricos segregados latitudinalmente con una disyunción significativa al norte y al sur de los 42°S conteniendo 11 y 3 haplotipos únicos (es decir, solamente presentes en uno de los grupos de poblaciones segregados latitudinalmente), respectivamente (Mathiasen y Premoli, 2010). Las poblaciones ubicadas hacia el sur no mostraron evidencia de menor diversidad genética que las del norte y sus parámetros poblacionales de heterocigosis y riqueza alélica presentan mayores valores utilizando marcadores isoenzimáticos (Mathiasen y Premoli, 2010). Si bien, en parte los resultados de ADNc son congruentes con la subsistencia de *N. pumilio* en refugios glaciares a ambos extremos de la distribución latitudinal, la antigüedad datada de dicha disyunción da cuenta de un evento de vicarianza debido a una barrera al flujo génico prolongada y antigua ocurrida a latitudes medias de Patagonia que precede a las glaciaciones (Premoli et al., 2012b; Acosta et al., 2014).

También se detectó que las poblaciones ubicadas a latitudes medias de Patagonia son las que poseen mayor diversidad y que esta puede deberse a un contacto secundario entre dos acervos genéticos ya diferenciados previamente al pleistoceno (Mathiasen, 2010). Un modelaje de las temperaturas de Patagonia durante el último máximo glacial indicó que las poblaciones a latitudes medias fueron las que alcanzaron las más bajas temperaturas. Por lo tanto, estos resultados sugieren la presencia de un acervo genético que fue aislado debido al clima extremadamente frío que afectó la persistencia de las poblaciones a latitudes medias (Premoli et al., 2010).

A diferencia de los gradientes latitudinal y altitudinal, el gradiente ambiental longitudinal marcado por la abrupta variación en las precipitaciones ha sido escasamente analizado. En el norte de la Patagonia, a lo largo de una distancia de 100 km o menos, es posible encontrar una diferencia en la precipitación que puede superar los 4000 mm. Esto se debe a la influencia de los vientos predominantes del Pacífico y la presencia de la Cordillera de los Andes, que determinan el marcado gradiente de precipitación oeste-este. Así, cerca del centro de su distribución (41°S) la precipitación anual supera los 5000 mm sobre las laderas oeste de los Andes (5600 mm en Antillanca) y menos de 800 mm en los sitios más orientales del bosque de *N. pumilio* en Argentina (Veblen et al., 1996). Por otro lado, si bien recientemente se ha sugerido que *N. pumilio*, habría persistido durante periodos fríos en refugios hacia el extremo oriental de su distribución actual, hasta en áreas tan australes como Tierra del Fuego a 55° de latitud sur (Premoli et al., 2010), no se ha estudiado aún si las poblaciones marginales del norte habrían actuado también como refugios.

I.8 Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es analizar las características genéticas neutrales y adaptativas e identificar las fuerzas ecológico-evolutivas que actúan sobre las poblaciones de *Nothofagus pumilio* (lenga) ubicadas hacia los extremos de precipitación de su distribución en el norte de su rango.

I.9 Objetivos específicos e hipótesis particulares

Objetivo 1 Analizar la persistencia *in situ* a largo plazo de las poblaciones ubicadas hacia los márgenes orientales secos y occidentales húmedos del rango de *Nothofagus pumilio* a lo largo del tiempo, utilizando secuencias no codificantes del ADN del cloroplasto y genotipos de marcadores biparentales.

❖ **Hipótesis 1** Las poblaciones de *Nothofagus pumilio* sobrevivieron *in situ* a los cambios en el clima tanto en el extremo seco como el húmedo.

- **Predicción 1** Se espera que zonas de elevada diversidad genética y/o con presencia de variantes genéticas particulares, correspondan a zonas refugio.

Objetivo 2 Determinar las variables climáticas de mayor influencia sobre la variación genética de las poblaciones a lo largo de gradientes ambientales.

❖ **Hipótesis 2** Los gradientes ambientales latitudinal, altitudinal y longitudinal de Patagonia modelan la diversidad genética de *Nothofagus pumilio*.

- **Predicción 2** Se espera que *Nothofagus pumilio* presente mayor diversidad genética bajo condiciones ambientales óptimas para su desarrollo.

Objetivo 3 Comparar las respuestas ecofisiológicas a experimentos de jardín común y déficit hídrico sobre plántulas de poblaciones centrales y marginales de *Nothofagus pumilio* identificando si existen diferencias adaptativas entre ambos tipos de poblaciones provenientes de los extremos del gradiente de precipitación.

❖ **Hipótesis 3** Las condiciones ambientales en los márgenes de la distribución de *Nothofagus pumilio* generan presiones de selección diferenciales.

- **Predicción 3** Se espera que en ambientes donde la especie se encuentra en condiciones de sequías estivales, las poblaciones muestren caracteres ecofuncionales relacionados con la reducida disponibilidad de agua durante la estación de crecimiento que les permitan sobrevivir tales condiciones adversas.

I.10 Tablas y Figuras

Figura I.1 Posibles orígenes de poblaciones marginales. A) Poblaciones relicto de una distribución más amplia de la especie en el pasado. B) Poblaciones nuevas de una especie que se encuentra expandiendo su rango de distribución.

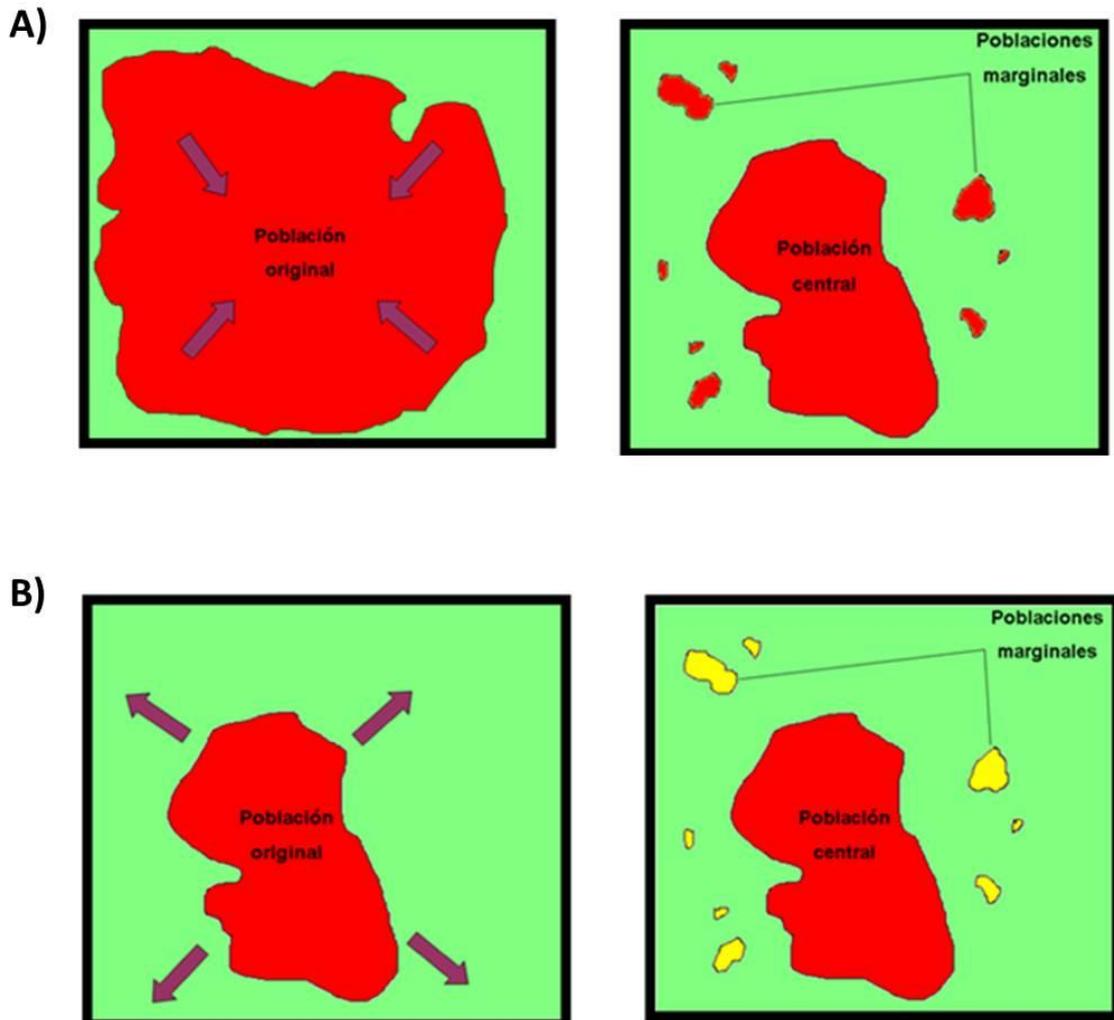


Figura I.2 Gradiente de precipitación oeste-este sobre la Cordillera de los Andes a los 41°S mostrando la ubicación de poblaciones marginales y centrales de *Nothofagus pumilio*.

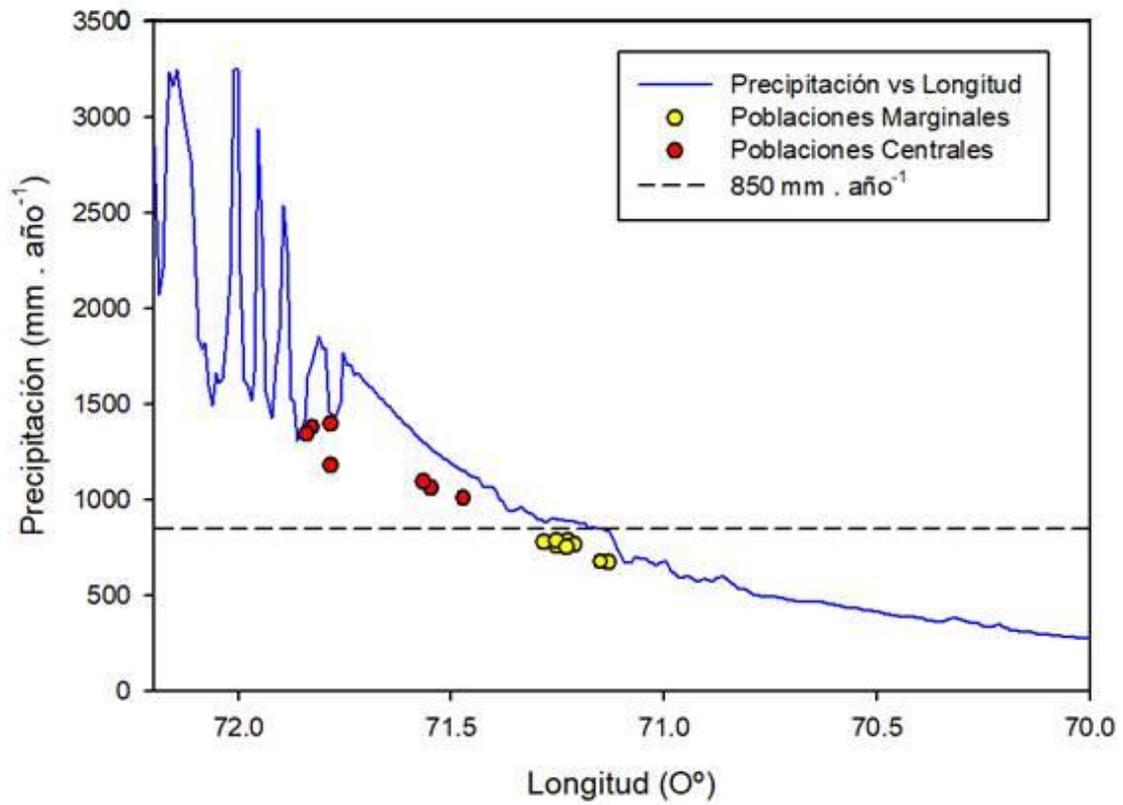


Figura I.3 Efecto sombra de precipitación sobre la Cordillera de los Andes.
 Fuente <https://www.nahuelhuapi.gov.ar/flora.html>.

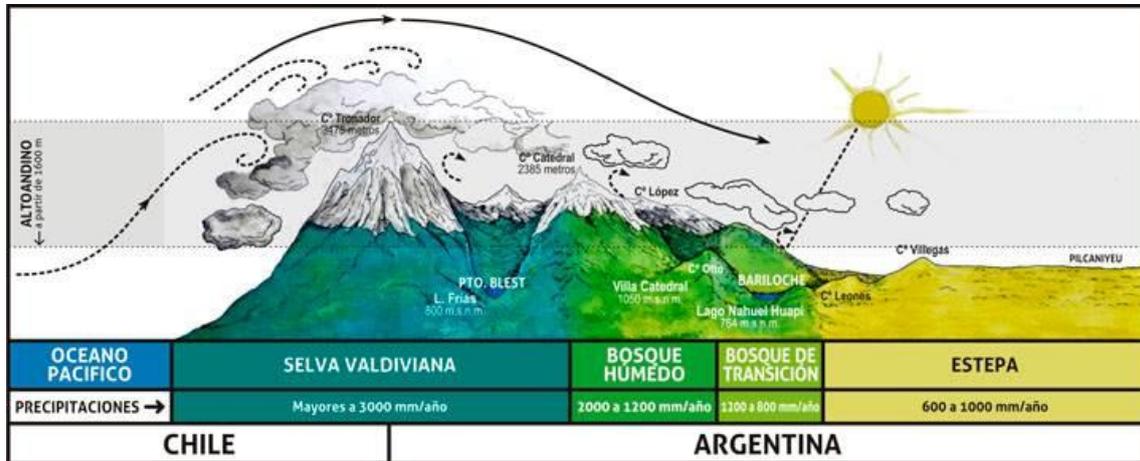


Figura I.4 Mapa del área de distribución espacial de *N. pumilio* en los Andes del sur (A), y fotografías donde se muestran poblaciones ubicadas en los extremos de los gradientes latitudinal (B), longitudinal (C), y altitudinal (D).

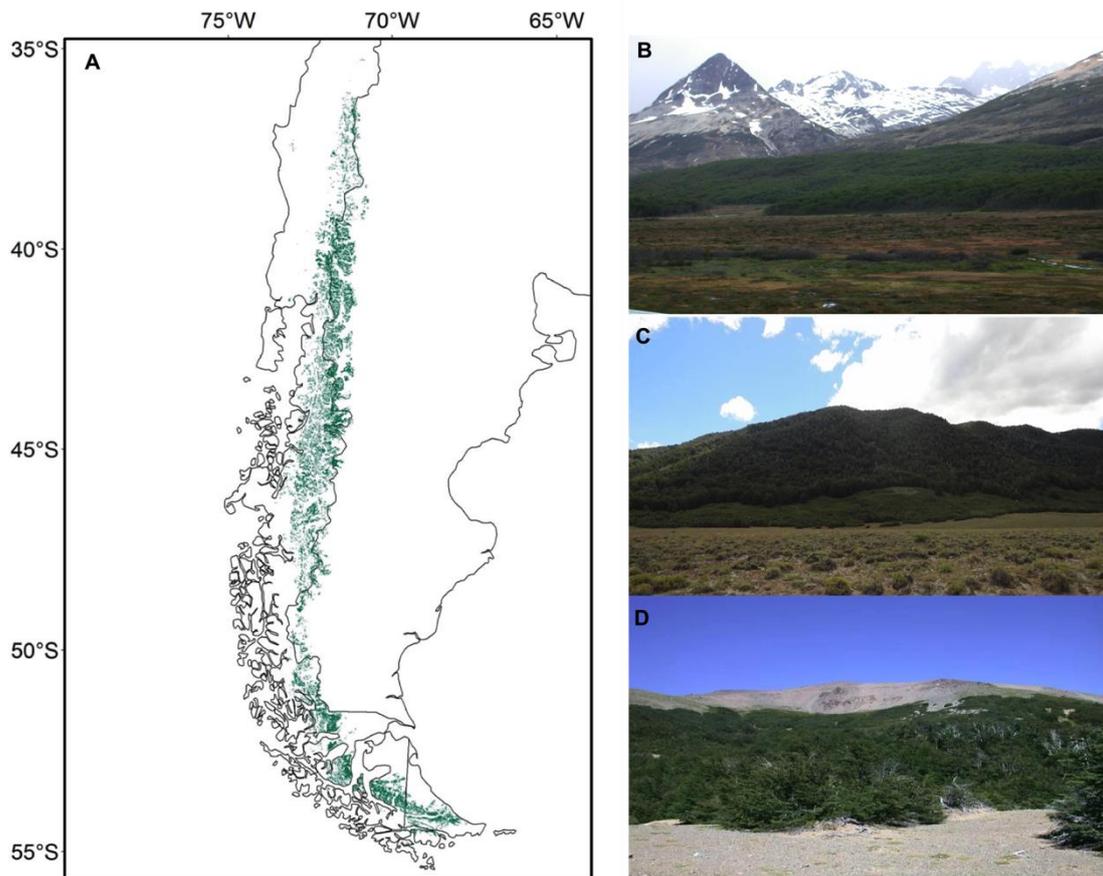


Figura I.5 Características de la especie *Nothofagus pumilio*. A) Flores masculinas, B) Flores femeninas, C) Semillas y D) Hojas.



Capítulo II Diversidad genética y flujo génico histórico y actual en poblaciones marginales y centrales de *Nothofagus pumilio* del norte de Patagonia



II.1 Introducción

La biogeografía comprende el estudio de las distribuciones presentes y pasadas de las especies en un contexto evolutivo. La comprensión de los patrones geográficos en la abundancia de las especies y las poblaciones puede proporcionar información sobre preguntas ecológicas y evolutivas fundamentales, por ejemplo cómo fluyen los genes entre las poblaciones y cómo se modifican los rangos de las especies bajo condiciones climáticas cambiantes (Sagarin y Gaines, 2002).

Hacia el centro geográfico de distribución de una especie se postula que las poblaciones suelen ser más abundantes, se encuentran dentro de su rango de tolerancia ecológica y bajo condiciones óptimas para su desarrollo (Eckert et al., 2008). A medida que las condiciones se alejan del óptimo ecológico las poblaciones se tornan cada vez menos abundantes (Hengeveld y Haeck, 1982; Brown, 1984). Por lo tanto, hacia los límites del rango de su distribución, las poblaciones se vuelven más pequeñas y espacialmente aisladas entre sí (Brussard, 1984; Lawton, 1993; Vucetich y Waite, 2003), a estas poblaciones se las denomina marginales. En términos genéticos, se considera que existirá una baja diversidad genética dentro y mayor diferenciación genética entre las poblaciones marginales como consecuencia de un menor tamaño efectivo poblacional y mayor aislamiento geográfico (Sagarin y Gaines, 2002; Eckert et al., 2008; Trumbo et al., 2016). Es decir, tales características genéticas estarían asociadas a efectos combinados de la deriva génica (variación aleatoria en las frecuencias alélicas, que suele tener mayor efecto en poblaciones pequeñas), y el aislamiento (reducción del flujo génico). Por otro lado, es probable que las poblaciones marginales sean afectadas por fuerzas evolutivas tales como la endogamia producto del aislamiento histórico y la selección natural (Lesica y Allendorf, 1995; Vakkari et al., 2009). En particular, las poblaciones marginales se caracterizan por estar sometidas a altas intensidades de selección cuyos efectos pueden ser variados. Si bien puede prevalecer la selección unidireccional, lo cual puede reducir la variación genética para caracteres adaptados a condiciones extremas (Kopp y Matuszewski, 2014), también podría existir mayor diversidad adaptativa

asociada a condiciones fluctuantes (Eckert et al., 2008). Si bien existe evidencia de que ciertas poblaciones muestran las características genéticas planteadas en el contexto central-marginal, otros trabajos no cumplen con dichas predicciones (Sagarin et al., 2006; Eckert et al., 2008; Hardie y Hutchings, 2010).

Desde el punto de vista demográfico, la idea de abundancia central supone que el flujo génico entre poblaciones centrales y marginales es asimétrico, siendo mayor desde el centro (fuente) hacia los márgenes (sumideros), lo cual limitaría la divergencia adaptativa entre poblaciones (Hoffmann y Hercus, 2000). Por esta razón, se ha sugerido que la distribución de las especies estaría restringida por un elevado flujo génico desde poblaciones centrales hacia marginales evitando adaptaciones locales y la consiguiente expansión del rango (Haldane, 1956; Kirkpatrick y Barton, 1997). No obstante, otros autores sostienen que no existe evidencia suficiente en ambientes naturales de que el flujo génico asimétrico pueda “inundar de genes” (“swamping genes”) provocando maladaptación (Sexton et al., 2014; Sexton y Dickman, 2016; Pironon et al., 2017). Sin embargo, cuando el flujo es reducido y el ambiente ejerce intensas presiones de selección, las poblaciones marginales pueden divergir fuertemente y albergar componentes importantes de variación intraespecífica (Hardie y Hutchings, 2010).

Dado que las condiciones ambientales y los rangos de las especies cambian a lo largo del tiempo, poblaciones actualmente consideradas ecológica o geográficamente centrales pueden haber sido marginales en el pasado y viceversa (Pironon et al., 2017). Entender los procesos y patrones del flujo génico y adaptación local requiere un conocimiento detallado de cómo las características del paisaje estructuran las poblaciones y cómo lo hicieron en el pasado. Esta comprensión es crucial, no sólo para mejorar el conocimiento ecológico, sino también para gestionar adecuadamente la diversidad genética de las poblaciones (Manel et al., 2003) en especial hacia los márgenes de distribución donde las poblaciones suelen estar fragmentadas, más susceptibles a cambios o fluctuaciones ambientales y en consecuencia más propensas a extinciones locales (Kawecki, 2008).

La presunción de abundancia central supone una concordancia entre la marginalidad geográfica y la marginalidad ecológica. Sin embargo, este supuesto, al igual que el de menor diversidad genética hacia los márgenes, está siendo sujeto a debate (Vilà-Cabrera et al., 2019). Generalmente los trabajos sobre el tema no han evaluado realmente si las condiciones ambientales se vuelven menos óptimas o de menor calidad hacia los márgenes de distribución y recientemente se ha demostrado que la marginalidad geográfica y ecológica no siempre coinciden (Pironon et al., 2017; Vilà-Cabrera et al., 2019).

La genética de poblaciones estudia los niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones de las especies y los explica en relación a la acción de las distintas fuerzas evolutivas. El equilibrio de Hardy-Weinberg (HW) es un modelo que describe cómo se comporta la variación genética en ausencia de tales fuerzas evolutivas y por lo tanto provee de la hipótesis nula con la cual se contrastan los datos de poblaciones naturales. Cuando una población se encuentra en equilibrio HW las frecuencias genotípicas y alélicas se mantienen constantes de generación en generación, por lo tanto, las desviaciones del equilibrio HW sugieren la acción de fuerzas evolutivas. En 1965 Wright desarrolló otra herramienta de suma importancia para el estudio de la genética de poblaciones, los estadísticos F , que permiten analizar la estructuración de las poblaciones en base a la distribución de la variación genética en distintos niveles jerárquicos, individual, subpoblación y población.

La historia biogeográfica de Patagonia se encuentra altamente influenciada por fenómenos geológicos y climáticos, antiguos y contemporáneos. El surgimiento de la cordillera de los Andes ocurrido durante el Mioceno, fue un fenómeno orogénico de gran trascendencia. Al elevarse la cadena montañosa, se drenaron simultáneamente las paleocuenas que caracterizaban la región patagónica y se modificó la circulación de los vientos, generando un fuerte cambio climático y ecológico al este de la cordillera (Blisniuk et al., 2005). De esta manera, se originó una de las sombras orográficas de lluvias más pronunciadas del planeta (Blisniuk et al., 2006) provocando un abrupto gradiente de precipitación (Barreda et al., 2007).

En el límite entre el Mioceno y el Plioceno el clima se fue enfriando progresivamente dando lugar a las primeras glaciaciones patagónicas hace aproximadamente 5–7 Ma (Rabassa et al., 2005). Posteriormente, hace unos 1,8 Ma, el Pleistoceno se caracterizó por oscilaciones climáticas de períodos glaciarios alternados con breves periodos interglaciarios (Rabassa et al., 2005). Esta variabilidad climática impuso un estrés único sobre las especies provocando el aislamiento de comunidades, la reducción y la fragmentación de hábitats y el empobrecimiento de las floras establecidas durante el Paleógeno (Markgraf y McGlone 2006). Las consecuencias de estos factores geológicos y climáticos sobre las poblaciones difirieron según las distintas características de historia de vida de las especies (i.e. autoecológicas.) afectando su distribución. Se ha postulado que especies tolerantes al frío habrían sobrevivido localmente los periodos glaciarios pleistocénicos, en sitios microclimatológicamente favorables a lo largo de sus rangos actuales de distribución aún en áreas que se consideran haber estado glaciadas. Esta hipótesis, denominada de refugios múltiples *sensu* Premoli (1998), se ha visto respaldada por los niveles elevados de diversidad genética encontrados hacia el este de los Andes y su elevada similitud genética con poblaciones al oeste de los mismos en *Fitzroya cupressoides* (Premoli et al., 2000). Evidencia genética en otras especies tolerantes a las bajas temperaturas (microtéricas) apoyaron esta hipótesis, como en *Embothrium coccineum* (Souto y Premoli, 2007), *Podocarpus nubigenus* (Quiroga y Premoli, 2010) y especies del género *Nothofagus* (Premoli, 1997; Marchelli y Gallo, 2006; Azpilicueta et al., 2009; Pastorino et al., 2009; Mathiasen y Premoli, 2010; Premoli et al., 2010). A diferencia de esto, las especies susceptibles a las bajas temperaturas (mesotéricas) habrían sobrevivido hacia el extremo cálido (norte) del bosque templado en Chile. En este sentido, evidencias del registro de polen fósil y genéticas muestran que la conífera *Austrocedrus chilensis* habría alcanzado su distribución actual por migración hacia el extremo sur luego del retiro de los hielos durante el Holoceno (Souto et al., 2015).

La utilización conjunta de marcadores moleculares con distintas tasas de mutación permite el estudio de la variación genética de las poblaciones a distintas escalas temporales. Por ejemplo, marcadores que por su naturaleza

nuclear y biparental resultan altamente variables, posibilitan el estudio del efecto de eventos contemporáneos sobre la variabilidad genética. Las isoenzimas y los microsatélites pertenecen a este tipo de marcadores, por lo tanto, permiten analizar procesos relativamente contemporáneos (cientos a miles de años) que afectan las tasas de flujo génico y deriva de las especies (Hewitt, 2000). En cambio marcadores más conservados como las regiones no codificantes del ADN del cloroplasto (ADNc), con herencia citoplasmática materna y por lo tanto no recombinante y con menor tasa de mutación, permiten reconstruir patrones de dispersión y vicarianza producto de migraciones y aislamientos históricos más antiguos (decenas de miles a millones de años). De esta manera, para comprender mejor procesos como las glaciaciones del Pleistoceno que dieron forma a la estructura genética contemporánea de las plantas, se necesitan estudios basados tanto en ADNc como marcadores nucleares, que puedan reflejar historias filogeográficas antiguas y recientes, respectivamente (Eidesen et al., 2007).

El género *Nothofagus* ha sido considerado clave para el estudio de la evolución y biogeografía de plantas del hemisferio sur (van Steenis 1971; Dettmann et al., 1990; Hill 1992). Al ser un linaje antiguo, los polimorfismos de ADNc pueden reflejar patrones de dispersión y vicarianza que ocurrieron durante migraciones y aislamientos históricos, por ejemplo durante el Terciario (Mathiasen, 2010; Mathiasen y Premoli, 2010; Premoli et al., 2012b). Estudios abarcando los rangos completos de distribución de las especies del subgénero *Nothofagus* utilizando ADNc muestran concordancia geográfica en los patrones filogeográficos, reflejando de esta manera una estructura geográfica antigua (previa al Pleistoceno) conservada hasta el presente (Acosta y Premoli, 2010; Mathiasen, 2010; Mathiasen y Premoli, 2010). Esta concordancia se relaciona con la posibilidad de hibridación entre algunos miembros del subgénero al compartir el mismo tipo de polen (Premoli, 1996; Stecconi et al., 2004; Quiroga et al., 2005). Así, las especies tolerantes al frío: *N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. pumilio* comparten haplotipos del ADNc producto de eventos de hibridación e introgresión, tanto presentes como pasados, debido a fenómenos de captura de ADNc (Acosta y Premoli, 2010). La datación molecular encontró que las divergencias en los linajes de cloroplasto de estas

especies son previas a la historia glacial del Neógeno, y espacial y temporalmente concordantes con transgresiones marinas episódicas ocurridas durante el Eoceno/Mioceno de Patagonia (Premoli et al., 2012b; Acosta et al., 2014).

Nothofagus pumilio domina los bosques altoandinos y de altas latitudes por lo que puede considerarse tolerante al frío. Posee una de las mayores distribuciones latitudinales donde generalmente forma bosques monoespecíficos y define el límite altitudinal del bosque. Debido a su amplio rango de distribución *N. pumilio* se ve afectada por tres gradientes ambientales presentes en Patagonia: latitudinal (norte-sur), longitudinal (este-oeste) y altitudinal de elevación. Los mismos representan gradientes diversos dados por un paisaje montañoso por la presencia de la Cordillera de los Andes y la influencia de los vientos predominantes del oeste que determinan un abrupto gradiente de precipitación longitudinal.

Trabajos combinando marcadores nucleares (isoenzimáticos), regiones no codificantes de ADNc y técnicas de modelaje de nicho ecológico demostraron que poblaciones de *N. pumilio* habrían sobrevivido en refugios a lo largo de su rango latitudinal actual (Mathiasen, 2010; Mathiasen y Premoli, 2010; Premoli et al., 2010). Además se ha sugerido que en áreas australes como Tierra del Fuego la especie habría persistido durante períodos fríos en el extremo oriental de su distribución actual (Premoli et al., 2010). Sin embargo, hasta el momento no se ha estudiado si las poblaciones del norte situadas hacia el este habrían actuado también como refugios. Estas poblaciones, actualmente poblaciones geográficamente marginales de la especie, se encuentran en el ecotono entre el bosque andino patagónico y la estepa y en zonas que habrían estado libres de hielo (Fig.II.3).

Los marcadores moleculares son una herramienta que puede aportar a la localización de posibles refugios brindando importante información para dilucidar el origen y dinámica de las actuales poblaciones centrales y marginales de *N. pumilio* del norte de la Patagonia. Desde un punto de vista genético, si las poblaciones funcionaron como refugios durante períodos glaciares, se esperaría que fueran genéticamente diversas para marcadores

nucleares y secuencias de ADNc producto de la permanencia *in situ* a lo largo del tiempo. El estudio de la dinámica post-glacial de distribución de las especies y ubicación de áreas con elevada estabilidad ambiental a lo largo del tiempo (refugios) podría ayudar a la identificación de “hotspots” de diversidad genética (Carnaval et al., 2009) de relevancia en conservación y bajo escenarios de cambio climático.

II.2 Objetivos particulares

Objetivo II.1 Analizar la persistencia *in situ* a largo plazo de las poblaciones ubicadas hacia los márgenes orientales secos y occidentales húmedos del rango de *Nothofagus pumilio* a lo largo del tiempo, utilizando secuencias no codificantes del ADN del cloroplasto y genotipos de marcadores biparentales.

Objetivo II.2 Determinar el grado de diversidad y divergencia genética, dentro y entre poblaciones marginales y centrales respectivamente, de *Nothofagus pumilio* utilizando marcadores biparentales neutrales.

II.3 Hipótesis particulares

Las hipótesis y predicciones planteadas en este capítulo fueron las siguientes

- ❖ **Hipótesis II.1** Las poblaciones de *Nothofagus pumilio* sobrevivieron *in situ* a oscilaciones climáticas pasadas tanto en el extremo seco como el húmedo.
 - **Predicción II.1** Se espera que zonas de elevada diversidad genética y/o con presencia de variantes genéticas particulares correspondan a zonas de refugio.

- ❖ **Hipótesis II.2** Las poblaciones marginales y centrales de *Nothofagus pumilio* sufren el efecto combinado del aislamiento y la deriva genética a lo largo de la longitud.

- **Predicción II.2** Se espera encontrar niveles similares de diversidad y divergencia genética dentro y entre poblaciones centrales y marginales, respectivamente ya que ambas áreas habrían funcionado como refugios.

- ❖ **Hipótesis II.3** Las poblaciones de *Nothofagus pumilio* subsistieron en refugios a largo plazo y se expandieron localmente en áreas centrales y marginales.
 - **Predicción II.3** Se espera encontrar diferencias en las frecuencias y/o presencia de ciertos alelos, pudiendo algunos ser exclusivos para poblaciones tanto centrales como marginales.

II.4 Materiales y métodos

Se estudiaron un total de 70 poblaciones de *Nothofagus pumilio* entre los 40° y 43° S comprendiendo un área en las que el bosque ocupa una extensión significativa a lo largo del gradiente de precipitación que se encuentra a esas latitudes. Se utilizaron muestras de 37 y 33 poblaciones marginales y centrales respectivamente, siendo 6 poblaciones marginales y 9 centrales extraídas de trabajos anteriores (Mathiasen y Premoli, 2010) (Tablas II.1 y II.2 y Fig. II.1). Esta clasificación se realizó siguiendo un criterio basado en la precipitación media anual de cada sitio estimada a partir de Worldclim v.1, con una resolución espacial de 30 seg. (Hijmans et al., 2005; <http://www.worldclim.org>). Se consideraron poblaciones marginales para el muestreo aquellas inmersas en una matriz de estepa (criterio ecológico), es decir las ubicadas en el ecotono entre el bosque australandino y la estepa. Debido a que estos cambios en la vegetación son generados principalmente por el gradiente longitudinal de precipitación, se identificó el valor 850 mm de precipitación media anual como el más adecuado para dicha clasificación. Todas las poblaciones fueron utilizadas para analizar ADNc habiendo secuenciado entre 2 y 5 individuos por población. Para los análisis isoenzimáticos se utilizaron 24 poblaciones marginales y 18 centrales, dado que algunas poblaciones utilizadas para ADNc se encontraban cercanas geográficamente. Para los análisis con microsatélites

se utilizaron un total de 25 poblaciones marginales y 26 centrales analizando un individuo por población (Tablas II.1 y II.2 y Fig. II.1).

Colección de muestras

Se colectaron muestras de follaje fresco de 30 individuos adultos seleccionados al azar por población que fueron transportadas al laboratorio en heladeras portátiles. El número de individuos colectados varió en algunos sitios en relación con el tamaño poblacional, ya que en algunos casos, particularmente las poblaciones marginales, consistieron de fragmentos de bosque con escasos individuos. Todas las muestras fueron tomadas en el límite altitudinal inferior del bosque de *N. pumilio* para minimizar la influencia de la altitud, con excepción de algunas poblaciones marginales fragmentadas, de escasos individuos y de difícil acceso, donde los límites altitudinales superior e inferior del bosque no están bien delimitados. Se minimizó la influencia de la altitud debido a que trabajos previos demostraron que tiene efectos sobre la arquitectura, la morfología foliar y caracteres ecofisiológicos con base genética (Premoli, 2004; Premoli et al., 2007; Premoli y Brewer, 2007).

La información contenida en este capítulo está organizada de tal manera que se presentan por separado cada marcador molecular utilizado. El primero corresponde a secuencias de ADN del cloroplasto que permitirá analizar la señal histórica por tratarse de una región conservada (es decir con baja tasa de mutación) en la evolución. Luego se presentan los marcadores biparentales tanto de isoenzimas como microsatélites que permiten analizar la influencia de eventos contemporáneos.

Análisis de marcadores moleculares de ADN conservados

Amplificación y secuenciación de ADNc: Se extrajo ADN de 2 a 5 individuos por población siguiendo el método con ATMAB descrito en Dumolin et al. (1995) a partir de extractos de isoenzimas (Arbetman y Premoli, 2011). A continuación se amplificaron mediante reacción en cadena de polimerasa

(PCR), las regiones del cloroplasto de los espaciadores intergénicos trnH-psbA (HA), trnL-trnF (LF) y psbB-psbH (BH), por ser los más variables para *N. pumilio* encontrados en trabajos anteriores (Mathiasen, 2010; Mathiasen y Premoli, 2010).

Previo a la amplificación se llevó a cabo una reacción para facilitar la liberación del ADN con 2 µL de extracto de ADN y 6 µL de GeneReleaser® (BioVentures). Luego las muestras se colocaron en el termociclador (Eppendorf) bajo las condiciones de 15' a 85 °C y se mantuvo a 32 °C. La mezcla de reacción de la PCR estuvo compuesta por 2 µL de extracto de ADN; 2,5 µL de buffer de reacción 10X (Invitrogen); 1,5 µL MgCl₂ 50 mM; 0,5 µL de cada dNTP; 0,75 µL de cada iniciador y 0,1 U de Taq polimerasa (Invitrogen), en un volumen total de 25 µL. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 4 min a 95 °C; 35 ciclos (desnaturalización por 1 min a 94 °C; anclaje por 1 min a 56 °C para BH, 56 °C para HA y 54 °C para LF; extensión por 1,5 min a 72 °C) y una extensión final por 6 min a 72 °C. El tamaño de los fragmentos fue estimado por electroforesis en un gel de agarosa 1% y comparado con marcadores de peso molecular de 1 kb (Fermentas).

Una vez verificada la amplificación en geles de agarosa al 1%, los productos de PCR se purificaron, mediante una reacción usando 0,025 µL de Exonucleasa I (Thermo scientific), 0,25 µL de Rapid Fosfatasa Alcalina (Roche) y 0,725 µL buffer 10 X (Roche) cada 10 µL en un termociclador (Eppendorf) bajo las condiciones: 15 min a 37 °C, y 15 min a 85 °C. A continuación los fragmentos amplificados fueron enviados a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) para ser secuenciados.

Análisis de secuencias de ADN de cloroplasto

Las tres regiones de ADNc amplificadas fueron corregidas, alineadas y concatenadas en una única base de datos combinada para los análisis posteriores utilizando el programa MEGA7 (Kumar et al., 2015). Se

determinaron los distintos haplotipos identificando la presencia de sitios variables con inserciones-delecciones (indels) y sustituciones nucleotídicas.

Para cada población se calcularon los siguientes parámetros de diversidad: tamaño de alineamiento, número de haplotipos (H), contenido porcentual de C/G (%CG), número de sitios variables, número de transiciones (Ts), número de transversiones (Tv), número de inserciones / delecciones o indels (I), diversidad haplotípica (h) y nucleotídica (π) utilizando el programa ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier et al., 2015). La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar de una muestra sean diferentes y la diversidad nucleotídica es el la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos tomados al azar en una muestra sean distintos.

Análisis filogenéticos

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos fueron inferidas mediante análisis Bayesiano (IB) con el programa MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist y Huelsenbeck 2003). Los indels de más de un par de bases (pb) fueron considerados como un único carácter producto de un único evento mutacional. El análisis de IB se realizó mediante 2 réplicas con 4 cadenas (1 fría y 3 calientes) que fueron corridas por 5000000 de generaciones, muestreando cada 1000 generaciones y con un período de quemado equivalente al 10% de los árboles muestreados. El modelo de sustitución nucleotídica implementado fue GTR + G y se determinó usando el programa MRMODELTEST v2.3 (Nylander 2004) bajo el criterio de información de Akaike (AIC). Como grupo externo se utilizaron secuencias de tres especies del subgénero *Lophozonia* (*N. glauca*, *N. nervosa* y *N. obliqua*). La numeración de los haplotipos se basó en la utilizada para esta especie en Mathiasen (2010), siendo continuada correlativamente con la aparición de nuevos haplotipos.

Para visualizar las relaciones entre los haplotipos se construyó una red de Median-Joining utilizando el programa NETWORK v5.0.1.1 (Bandelt et al., 1999) con todos los individuos analizados. Las conexiones ambiguas (“loops”)

en la red se resolvieron según la teoría de coalescencia (Crandall y Templeton, 1993), principalmente siguiendo el criterio geográfico.

Análisis de marcadores moleculares variables

Electroforesis isoenzimática

La extracción de enzimas, electroforesis y tinción isoenzimática se realizaron siguiendo la metodología descrita anteriormente por Premoli (1996, 1998, 2003). El extracto proteico se obtuvo mediante la trituración de aproximadamente 1g de follaje fresco por individuo con nitrógeno líquido (-185°C) y homogeneización en 1 ml de buffer de extracción de Mitton et al. (1979) en morteros de porcelana. Los extractos fueron conservados en freezer ultrafrío a -70°C hasta el momento de realización de las corridas electroforéticas. La electroforesis se realizó sobre geles de almidón al 12% p/v (Starch Art Corporation). Esta técnica se basa en la separación de isoenzimas que se diferencian en tamaño y carga (y por lo tanto presentan diferencias de movilidad electroforética) como resultado de diferencias alélicas y entre loci. La visualización o revelado de las isoenzimas se basa en su actividad catalítica, para ellos se promueve una reacción en la que intervienen el sustrato específico, cofactores y dadores de electrones y un producto coloreado. Se analizaron cinco sistemas isoenzimáticos con dos sistemas buffer gel / electrodo que permitieron resolver 6 loci génicos putativos. En el sistema buffer morfolina citrato (MC) de Ranker et al. (1989) se revelaron las enzimas aldolasa (Ald 1), isocitrato deshidrogenasa (Idh2), malato deshidrogenasa (Mdh2, Mdh3) y shikimato deshidrogenasa (Skdh1); y en el sistema B (CB) de Conkle et al. (1982) se analizó la enzima fosfoglucoisomerasa (Pgi 2) (Apéndice I.3). Las porciones anódicas de los geles se cortaron en rebanadas horizontales de aproximadamente 2 mm de espesor y se vertieron sobre ellas las tinciones suspendidas en agarosa 1% p/v según Mitton et al. (1979) y Soltis et al. (1983).

Para la obtención de los genotipos de cada sistema enzimático, los loci y alelos fueron numerados consecutivamente según su movilidad relativa en el

gel, asignando al más anódico el número más bajo siguiendo a numeración utilizada en estudios previos (Premoli, 2003; Mathiasen y Premoli, 2013) (Fig. II.2 A, B y C). Los loci fueron considerados putativos, ya que no se llevaron a cabo análisis genéticos cuantitativos en individuos segregantes de esta especie. Sin embargo, los patrones de bandas observados fueron similares a los encontrados en los mismos sistemas enzimáticos estudiados en otras especies y fueron consistentes con los patrones de bandeo esperados para aquellas especies en las cuales sí se han realizado análisis formales (Murphy et al., 1996).

Amplificación y genotipado de microsatélites

Se extrajo ADN de 1 individuo por población de 25 poblaciones marginales y 26 centrales siguiendo el método con ATMAB descrito en Dumolin et al. (1995) a partir de extractos de isoenzimas (Arbetman y Premoli, 2011). A continuación se amplificaron mediante PCR los loci de microsatélites *ncutas4*, *ncutas12*, *ncutas21*, *ncutas22* (Jones et al., 2004) y *NnBIO111* (Marchelli et al., 2008). Estos loci fueron elegidos por haber sido utilizados anteriormente con éxito en *N. pumilio* dando productos de amplificación confiables y un número de alelos considerable (Mathiasen y Premoli, 2013).

La mezcla de reacción de la PCR contenía: 1,5 μ L de extracto de ADN; 1 μ L de buffer de reacción 10X (Invitrogen); 0,4 μ L de solución de $MgCl_2$ 50 mM; 0,2 μ L de cada dNTP; 0,5 μ M de cada iniciador y 0,1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen) en un volumen total de 10 μ L. Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización inicial por 5 min a 94 °C; seguido por 35 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 94 °C; 30 seg. a la temperatura específica de anclaje para cada primer (Apéndice I.4), extensión por 1,5 min a 72 °C) y una extensión final por 30 min a 72 °C.

Los productos de PCR fueron enviados a Macrogen Inc. (Seúl, Corea) para ser secuenciados mediante la técnica de electroforesis capilar. Los distintos genotipos se identificaron con el programa Peak Scanner v 1.0

(Guichoux et al., 2011) asignando a cada alelo el tamaño del fragmento amplificado comparado con un marcador de tamaño estándar (GS500LIZ).

Análisis de datos

Se realizó el cálculo de frecuencias alélicas para todos los loci de isoenzimas y microsatélites analizados y se analizó la diferencia en la distribución de las mismas entre regiones marginal y central mediante chi-cuadrado (test de heterogeneidad de frecuencias alélicas). Para ello se trataron todos los individuos del conjunto de poblaciones de cada área (marginal y central) como si fueran una única población. En el caso de las isoenzimas y por contar con múltiples individuos por población, se realizó dicho análisis a lo largo de las poblaciones marginales por un lado y centrales por otro utilizando el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander 1989).

Cada población (isoenzimas) y región (isoenzimas y microsatélites) fue caracterizada en base a distintos parámetros de diversidad genética: número promedio de alelos por locus (A), número de alelos por locus polimórfico (A_P), porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto* (presencia de al menos dos alelos independientemente de su frecuencia) (%P), heterocigosis observada y esperada bajo la condición de equilibrio Hardy Weinberg (H_O y H_E respectivamente) utilizando el programa BIOSYS-1 (Swofford y Selander 1989); y el número efectivo de alelos (A_e) utilizando POPGENE v. 1.32 (Yeh et al., 1999). También se calcularon por conteo directo a partir de las frecuencias alélicas el número de alelos totales (A_T), el número de alelos de baja frecuencia (B_F , frecuencia $\leq 0,1$) y el número de alelos únicos (A_{UP}). Se calculó además la riqueza alélica (R_A) con el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001). Para evaluar la existencia de diferencias significativas entre poblaciones centrales y marginales ($P < 0,05$) se realizaron test de Mann Whitney pareados por locus para los parámetros de diversidad genética poblacional mediante el programa STATISTICA v.7.0 StatSoft, Inc. (2004).

Utilizando datos isoenzimáticos y de microsatélites se calcularon con el programa BIOSYS-1 los índices de Fijación ($F = 1 - [H_O/H_E]$) de cada población

(isoenzimas) y región (isoenzimas y microsatélites). Para las isoenzimas se analizaron además desviaciones de la condición de equilibrio HW por defecto (endogamia) o exceso (exogamia) de heterocigotas por locus y población debido a que se contaba con información de más de un individuo por población. Cuando F resulta positivo, el número de heterocigotas es menor que el esperado y cuando es negativo existe un exceso de heterocigotas.

Para ambos marcadores variables se evaluó la ocurrencia de cuellos de botella genéticos por población (isoenzimas) y región (microsatélites) utilizando el programa BOTTLENECK versión 1.2.02 (Piry et al., 1999). Este programa calcula para cada muestra poblacional y para cada locus la distribución de la diversidad genética esperada respecto del número observado de alelos, para un tamaño muestral (n) bajo el supuesto de equilibrio mutación-deriva y bajo el modelo de alelos infinitos (IAM). Las poblaciones que han experimentado una reciente reducción de su tamaño efectivo poblacional muestran una reducción del número de alelos y diversidad genética (H_E o heterocigosidad de Hardy-Weinberg) en loci polimórficos, siendo la reducción del número de alelos más rápida que la reducción de la diversidad de genes. Debido a esto, en una población que recientemente ha sufrido un cuello de botella, la diversidad genética observada es mayor que la diversidad esperada en el equilibrio Hardy-Weinberg que se calcula a partir del número observado de alelos bajo el supuesto de tamaño poblacional constante (Luikart et al., 1998).

La estructura genética poblacional se analizó para los datos isoenzimáticos (dentro y entre regiones) utilizando los estadísticos F de Wright (1965) con el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001). Los índices F_{IS} y F_{IT} son los coeficientes de endogamia intrapoblacional y total respectivamente y el índice F_{ST} es una medida de divergencia interpoblacional. La significancia de las estimaciones fue analizada mediante intervalos de confianza del 95% calculados por permutaciones sobre todos los loci polimórficos según Weir y Cockerham (1984). Los valores promedio de los estadísticos F fueron considerados significativos cuando los intervalos de confianza no incluían al cero.

Utilizando datos de isoenzimas y microsatélites también se realizaron análisis de varianza molecular (AMOVA) con el objetivo de estimar los principales componentes de varianza y análogos a las estadísticas F que reflejan la diversidad genotípica a diferentes niveles de subdivisión jerárquica mediante el programa GenAlEx 6.5b4 (Peakall y Smouse 2006, 2012). De esta manera se puso a prueba la existencia de diferencias entre regiones marginales y centrales, permitiendo calcular el porcentaje de variación genética debido a diferencias entre poblaciones y regiones, determinando a la vez si dicho porcentaje es estadísticamente significativo.

Para evaluar la estructura genética espacial de las poblaciones en las regiones marginal y central se realizaron análisis de autocorrelación espacial de los genotipos utilizando los datos de isoenzimas y microsatélites con el programa GenAlEx 6.5b4 (Peakall y Smouse 2006, 2012). Se exploraron distintas distancias y números de clases de distancias en búsqueda de desviaciones significativas respecto de una disposición espacial aleatoria. Finalmente se evaluaron 6 clases continuas de distancia en intervalos cada 20 km. Las desviaciones significativas para cada valor calculado fueron analizadas mediante el cálculo de intervalos de confianza del 95% por medio de simulaciones de MCMC con 999 permutaciones. La existencia de autocorrelación positiva indica que las poblaciones más cercanas entre sí son más similares en comparación a aquellas que están más alejadas.

La estructura genética se exploró para evaluar si existe diferenciación genética entre poblaciones o regiones y la existencia de grupos de individuos genéticamente homogéneos utilizando datos de isoenzimas y microsatélites con el programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al., 2000, Falush et al., 2003). Este programa se basa en un algoritmo bayesiano para establecer la asignación de individuos a un número específico de K grupos genéticos de forma aleatoria por medio de MCMC, es decir sin suponer poblaciones predefinidas. Bajo el modelo de frecuencias alélicas correlacionadas y un modelo de mezcla o mixtura que permite flujo génico entre grupos (en inglés admixture), se ejecutaron 10 corridas con valores de K 1 a 10 con 200000 iteraciones MCMC y un período de quemado de 100000. La mejor agrupación fue determinada usando el logaritmo de la probabilidad de los datos (Pritchard

et al., 2000) y siguiendo la prueba estadística “ad hoc” propuesta por Evanno et al.(2005). Esta prueba considera que la moda del parámetro Delta K de Evanno es el mejor indicador de los probables K grupos. Los resultados fueron analizados con STRUCTURE HARVESTER vA.2 (Earl et al., 2012) y visualizados con el programa DISTRUCT v1.1 (Rosenberg 2004). Este análisis no se realizó con los datos de ADNc debido a que el programa no admite datos haploides.

Para evaluar el grado de aislamiento por distancia entre poblaciones se realizaron pruebas de mantel con los tres marcadores en estudio. La prueba de Mantel (1967) estima la correlación entre matrices de distancia genética y geográfica, si el coeficiente de correlación es significativo indica que existe una estructura espacial que puede relacionarse a la distancia geográfica o barreras al flujo génico (Guillot et al., 2009). Para las isoenzimas se correlacionaron valores de divergencia genética (F_{ST}) y distancias geográficas en km entre todos los pares de poblaciones utilizando el programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001). En el caso de los microsatélites y las secuencias de ADNc se correlacionaron distancias genéticas euclídeas calculadas con el programa GenAlEx y distancias geográficas en km. Se probaron los datos sin transformar y con distintas transformaciones (F_{ST} linealizados como $F_{ST}/(1-F_{ST})$ y \ln de las distancias geográficas) en búsqueda del mejor ajuste lineal entre las distancias.

Para determinar el flujo génico histórico y actual entre poblaciones marginales y centrales, y evaluar su posible relación con eventos biogeográficos, se realizaron análisis con los tres marcadores en estudio. Utilizando el programa MIGRATE N-v3.6.11 (Beerli y Palczewski, 2010) se estimaron el tamaño poblacional y parámetros de migración entre las regiones para cada marcador por separado. Las estimaciones se realizaron por inferencia bayesiana y bajo el modelo de mutación de movimiento aleatorio browniano basado en la teoría de coalescencia (Beerli y Palczewski, 2010). Este programa calcula el tamaño efectivo poblacional (θ) y la tasa de migración escalados por la tasa de mutación (M) (ec.II.1 a II.3). A partir de estos valores se infirió el tamaño poblacional efectivo (N_e) utilizando la tasa de mutación por generación y por locus (μ) de cada marcador. Las tasas de mutación para cada marcador fueron extraídas de la literatura y siguiendo el modelo empírico

propuesto por Petit et al.(2005) que muestra diferentes niveles de flujo génico en marcadores con distinto modo de transmisión genética, siendo 1×10^{-9} para ADNc, 5×10^{-7} para isoenzimas y 5×10^{-5} para microsatélites.

$$\theta = 4N_e \times \mu \text{ para marcadores diploides} \quad \text{ec.II.1}$$

$$\theta = 2N_e \times \mu \text{ para marcadores haploides} \quad \text{ec.II.2}$$

$$M = m / \mu \quad \text{ec.II.3}$$

Luego utilizando los parámetros de divergencia F_{ST} para isoenzimas, R_{ST} para microsatélites y Φ_{ST} para ADNc obtenidos con el programa GenAlEx 6.5b4 (Peakall y Smouse 2006, 2012), se calcularon los tiempos de coalescencia promedio (TR), tiempo de coalescencia en generaciones (τ), y finalmente el tiempo de coalescencia absoluta en años (t) (ec.II.4 a II.7) siguiendo a la metodología usada en Souto, et al. (2015). El tiempo generacional utilizado fue de 50 años (Mathiasen y Premoli, 2010).

$$TR = 4 F_{ST} / 1 - F_{ST} \text{ (para isoenzimas)} \dots \text{ec.II.4}$$

$$TR = 4 R_{ST} / 1 - R_{ST} \text{ (para microsatélites)} \quad \text{ec.II.5}$$

$$TR = 4 \Phi_{ST} / 1 - \Phi_{ST} \text{ (para ADNc)} \quad \text{ec.II.6}$$

$$\tau = TR \times N_e \quad \text{ec.II.7}$$

Para las secuencias de ADNc además se estimó el tiempo de divergencia entre las poblaciones marginales y centrales utilizando un método computacional de aproximación Bayesiana (*Approximate Bayesian Computation, ABC*) con el programa DIYABC versión 2.0 (Cornuet et al. 2014) simulando un modelo demográfico histórico de divergencia poblacional entre las dos regiones. El escenario evolutivo probado consideró dos poblaciones de tamaño N_1 (para marginales) y N_2 (para centrales) que han divergido en t generaciones en el pasado de una población ancestral de tamaño $N_1 + N_2$ (Apéndice I.7). Los valores iniciales de los parámetros demográficos se definieron en base a varias simulaciones preliminares (que consideraron diferentes combinaciones de valores que iban de 1 a 200.000) siguiendo una

distribución uniforme para el tamaño efectivo poblacional y el tiempo generacional, con un valor mínimo de 10 y un máximo de 200,000 y 100,000 (para N1 y N2 respectivamente); y un mínimo de 1 y un máximo de 10,000 para t . Se asumió el modelo evolutivo de Kimura de dos parámetros (Kimura 1980) con una fracción de sitios constantes fijada en el 10% y el parámetro de la forma de la distribución Gamma de las mutaciones entre sitios igual a 2. Los valores iniciales de la distribución de los parámetros para los modelos de mutación se dejaron por defecto con un valor promedio de la tasa de mutación de 1×10^{-9} . Los valores de las probabilidades posteriores de N1, N2, y t , fueron estimados en base a 1.000.000 de simulaciones, de las cuales el 10% (100.000) fueron utilizadas para evaluar el desempeño del modelo mediante una regresión lineal local y un análisis de componentes principales en base a los parámetros estimados y observados (Apéndice I.18). El tiempo de coalescencia promedio se determinó multiplicando la mediana del número de generaciones por el tiempo generacional. El tiempo generacional fue considerado como 50 años, basado en estudios previos desarrollados en *N. pumilio* (Mathiasen y Premoli 2010).

II.5 Resultados

Marcadores moleculares de ADN conservados

Se analizaron 186 secuencias de ADNc pertenecientes a 37 poblaciones marginales (región marginal) y 33 centrales (región central) de *N. pumilio* dando como resultado 9 haplotipos diferentes. El número de haplotipos presentes en la región marginal fue 8 y en la región central 6 (Apéndice I.1 y I.2 respectivamente). El tamaño del alineamiento de las secuencias concatenadas de ADNc varió entre 1634 y 1670 pb (Tabla II.1). Ambas regiones presentaron 17 sitios variables correspondientes a 7 indels (inserciones / deleciones) y 10 transversiones (una base purina se sustituye por una pirimidina o viceversa). El contenido de C/G también fue similar en ambas regiones marginal y central (Tabla II.1). La diversidad haplotípica y nucleotídica promedio alcanzó mayores valores en la región marginal respecto a la central (Tabla II.1). La numeración

de los haplotipos se basó en la utilizada para esta especie en Mathiasen (2010), siendo continuada correlativamente con la aparición de nuevos haplotipos. Se identificaron 4 haplotipos nuevos para la especie, siendo uno de ellos nuevo para el subgénero. De estos, tres haplotipos fueron exclusivos de la región marginal H15, H16 y H18 y uno de la central, H17, encontrándose este último solo en la población Paso de las Nubes (PDN). El haplotipo H18 perteneciente a la población marginal Chenqueniye (CHE) resultó a su vez nuevo para el subgénero y se caracteriza por presentar una variante única (T)9 en el sitio 1120 poli T de la región LF de la secuencia de ADNc. El haplotipo más frecuente y con mayor distribución geográfica en ambas regiones fue H8 con una frecuencia de 0,31 en la región marginal y 0,6 en la central (Fig. II.3). Los haplotipos H9, H10, H11 y H12 fueron compartidos por las dos regiones marginal y central. Todos los haplotipos presentaron una duplicación de 15 pb en el fragmento HB con excepción del haplotipo H12 que corresponde al linaje sur (Premoli et al., 2012b). También se encontró una duplicación de 19 pb en el fragmento HA de todos los haplotipos anteriormente descritos como pertenecientes al linaje norte (Premoli et al., 2012b), excepto en los haplotipos H12 y H16 en los que dicha duplicación estuvo ausente. El resto de los indels correspondieron a bases únicas en regiones de repeticiones poli-A/T (Apéndice I.5). Se detectó variación intrapoblacional en la población marginal Arroyo las Minas (ALM) con los haplotipos H16 y H8; y en las poblaciones centrales Los Clavos (CLA) con H9 y H8, Paso de las Nubes (PDN) con H17 y H8 y Ruta 40 (RUT) con H9 y H8. El haplotipo H16, presente en las poblaciones marginales Arroyo las Minas (ALM), Cañadón del Zorro (CDZ) y Leleque (LEL), compartió características con linajes del norte y del sur descritos previamente para el subgénero *Nothofagus sensu* Premoli et al. (2012b) (duplicación de 15 pb en HB y ausencia de duplicación de 19 pb en HA respectivamente) (Apéndice I.5).

La red de haplotipos (Fig. II.4) muestra que el haplotipo más frecuente (H8) tuvo una posición interna manteniendo el mayor número de conexiones directas (cinco) con otros haplotipos. El haplotipo H12 presente en las poblaciones al sur de los 42° 25' se separó de los demás por 14 cambios mutacionales, incluyendo una duplicación de 15 pb y otra de 19 pb. Los haplotipos H9, H15 y H10 se encuentran relacionados entre sí con diferencias

de solo uno y/o dos cambios mutacionales. Tanto el árbol filogenético como la red de haplotipos fueron consistentes, mostrando a H12 separado del resto de los haplotipos y relacionando cercanamente los haplotipos H9, H15 y H10.

En el árbol filogenético (Fig. II.5) se observa la separación del haplotipo H12 presente en las poblaciones al sur de los 42° 25' S del resto de los haplotipos. Los haplotipos H9, H10 y H15, presentes en el centro y con mayor frecuencia en el norte del área de estudio, formaron un clado con un soporte de 0,94. El resto de los haplotipos presentó una politomía que no permite una clara identificación de las relaciones entre los haplotipos.

Marcadores moleculares variables

Utilizando isoenzimas se determinó el genotipo de un total de 715 individuos pertenecientes a 24 poblaciones marginales de *N. pumilio*. Estos fueron comparados con 575 genotipos de individuos pertenecientes a 18 poblaciones centrales (7 de las cuales fueron publicadas anteriormente). Se resolvieron 6 loci isoenzimáticos, resultando todos polimórficos con el criterio *sensu stricto* en al menos una de las poblaciones. Los alelos comunes fueron compartidos por poblaciones marginales y centrales (Apéndice I.6 y I.7 respectivamente). Los test de chi-cuadrado para heterogeneidad de frecuencias alélicas resultaron significativos para todos loci tanto en poblaciones marginales como centrales ($P < 0,05$) (Apéndice I.6 y I.7 respectivamente). La isoenzima Pgi2 presentó el mayor polimorfismo con un total de 5 alelos, de los cuales Pgi2-2 se encuentra únicamente en la población marginal Chenqueniye (Apéndice I.6). La cantidad de loci presentes en la región marginal fue mayor que en la central (23 y 19 respectivamente) (Apéndice I.8). Los test de chi-cuadrado de heterogeneidad en las frecuencias alélicas para loci polimórficos de isoenzimas a lo largo de las poblaciones en las regiones marginal y central resultaron significativos para todos los loci excepto Ald1 ($P < 0,05$) (Apéndice I.9). Se encontraron 4 alelos exclusivos (presentes en una única población), todos ellos pertenecientes a poblaciones marginales (Tabla II.2). Los análisis para inferir cuellos de botella genéticos debido a un exceso de heterocigosis en relación a lo esperado bajo equilibrio Hardy-Weinberg resultaron significativos ($P < 0,05$) solamente para 6

poblaciones marginales y 2 centrales (Apéndice I.10 y I.11 respectivamente) indicando que la mayoría de las poblaciones de ambas regiones marginal y central analizadas no habrían sufrido reducciones significativas recientes en el tamaño poblacional.

Los valores promedio de los parámetros de variabilidad genética y endogamia para las regiones marginales y centrales resultaron similares (Apéndice I.12). Los resultados de los test de t pareados por locus para distintos parámetros de diversidad genética entre regiones arrojaron valores significativamente más altos en las poblaciones marginales para el número promedio de alelos por locus (A) y la riqueza alélica (R_A) mientras que para el resto de los mismos alcanzaron valores similares en poblaciones marginales y centrales ($P > 0,05$) (Tabla II.3). La endogamia promedio de las poblaciones centrales y marginales fue similar (0,233 y 0,204 respectivamente), y lo mismo sucedió para la proporción de loci con índices de fijación no significativamente distintos de cero (55 y 53% respectivamente) mientras que los que arrojaron valores positivos fueron (43 y 45 respectivamente) (Apéndice I.13). Los índices de fijación (F) significativos fueron mayoritariamente positivos para ambas regiones marginal y central, indicando un desvío del equilibrio HW por deficiencia de heterocigotas, es decir endogamia. Sólo 3 test significativos fueron negativos por exceso de heterocigotas (Apéndice I.13).

Los valores promedio de los estadísticos F de Wright dentro y entre poblaciones y total resultaron significativamente distintos de cero para ambas regiones marginal y central (Tabla II.4). La diferenciación interpoblacional (F_{ST}) resultó moderada tanto entre poblaciones marginales como centrales y los valores de endogamia intrapoblacional (F_{IS}) fueron significativos, y con valores positivos, indicando un desvío del equilibrio HW debido a un defecto en la proporción esperada de heterocigotas (Tabla II.4).

El AMOVA jerárquico fue significativo para todos los niveles analizados ($P = 0,001$), siendo los valores de variación entre regiones relativamente bajos (3 %), mientras que el resto de las fuentes de variación resultaron elevadas, siendo entre poblaciones del 31 %, entre individuos del 33 % y dentro de los individuos del 33 % (Tabla II.5).

Analizando los cinco loci de microsatélites se determinó el genotipo de un individuo por población de 25 poblaciones de la región marginal y 26 de la región central. Los alelos comunes fueron compartidos por ambas regiones y todos los loci resultaron polimórficos (Apéndice I.14). Los test de chi-cuadrado para heterogeneidad de frecuencias alélicas de loci polimórficos resultaron significativos sólo para los loci *ncutas4* y *ncutas22* ($P < 0.05$) (Apéndice I.15). El microsatélite *Ncutas21* presentó el mayor polimorfismo con un total de ocho alelos, siendo tres de ellos exclusivos de poblaciones centrales. Se encontraron un total de nueve alelos exclusivos de la región central y sólo uno de la región marginal presente en tres poblaciones marginales (FOR, CHE, ALM) (Tabla II.6). Los parámetros de diversidad y endogamia analizados resultaron similares en ambas regiones (Test de t pareados) (Tabla II.7) y ninguna de las dos regiones presentó evidencias de cuellos de botella genéticos.

Los análisis de varianza molecular con microsatélites arrojaron una estructura jerárquica significativa ($P = 0,001$) (Tabla II.8). Los valores de variación entre regiones fueron bajos (6%) pero significativos, mientras que las fuentes de variación entre individuos y dentro de los individuos fueron del 36 y 58% respectivamente (Tabla II.8).

La autocorrelación espacial resultó significativa con un índice de correlación r positivo y significativo ($P < 0,05$) que superó el intervalo de confianza a escalas espaciales menores a 40 km con isoenzimas y microsatélites de las poblaciones marginales indicando cierto grado de agrupamiento de genotipos (Figs. II.6 y II.8). En cambio, las poblaciones de la región central solo mostraron estructuración espacial significativa a escalas menores a 40 km utilizando isoenzimas (Fig. II.7). A escalas espaciales cercanas o mayores a 80 km las poblaciones de ambas regiones mostraron una clara estructuración y un comportamiento similar con los dos tipos de marcadores analizados (Figs. II.6 a II.9).

Los análisis bayesianos de estructuración geográfica, tanto para isoenzimas como microsatélites, arrojaron dos grupos ($K=2$) cuyos acervos genéticos están compuestos por características de las regiones marginal y central en medidas similares (Figs. II.10 y II.11 respectivamente). Los valores

de la moda de Delta K utilizados para identificar el número real de grupos para isoenzimas y microsatélites fueron 12781,966 y 4,181559 respectivamente (Apéndice I.15 y I.16). Para los microsatélites 79,9 % de la región marginal y 65 % de la central pertenecieron al grupo K1 (Fig. II.11B). En tanto el 20,1 y 35 % restante de las regiones marginal y central respectivamente correspondieron al grupo K2 (Fig. II.11 B). En el caso de las isoenzimas 54,6 % de la región marginal y 58,5 % de la central pertenecieron al grupo K1 (Fig. II.10B). En tanto el 45,4 y 41,4 % restante de las regiones marginal y central respectivamente correspondieron al grupo K2 (Fig. II. 10B). Por lo tanto se evidenció con ambos marcadores mezcla o “*admixture*” entre regiones”.

La prueba de Mantel para las secuencias de ADNc mostró una correlación significativa y elevada entre las distancias genéticas de los distintos haplotipos y las distancias geográficas ($r = 0,742$, $P = 0,001$) sugiriendo ajuste a un modelo de aislamiento por distancia (Fig. II.12). Con los datos de isoenzimas (y sus transformaciones) indicó que no existe una correlación significativa entre los valores de F_{ST} y las distancias geográficas, mientras que con datos de microsatélites sí se encontró correlación significativa entre las matrices de distancias aunque con un valor de correlación bajo ($P = 0,046$ y $r = 0,104$, Fig. II.13).

Las tasas de migración fueron consistentemente mayores desde la región marginal hacia la central con los tres marcadores moleculares analizados. Para las isoenzimas el flujo génico de marginal a central fue aproximadamente 11 veces mayor que en sentido contrario, mientras que para ADNc y microsatélites fue mayor, pero del mismo orden de magnitud (Figs.II.14 a II.16). El tiempo de divergencia estimado con ADNc fue un orden de magnitud mayor comparado con los tiempos obtenidos con los marcadores biparentales utilizando el programa MIGRATE N-v3.6.11 (Beerli y Palczewski, 2010); mientras que utilizando el programa DIYABC versión 2.0 (Cornuet et al. 2014) el tiempo de divergencia estimado con ADNc fue del mismo orden de magnitud que el estimado con los marcadores variables ($t = 181,5$ Ka). El tamaño efectivo poblacional de las regiones marginal y central con el programa MIGRATE tuvo el mismo valor analizando ADNc, mientras que fue 1,56 veces mayor para la región marginal utilizando isoenzimas y 3,4 veces mayor para la región central

con microsatélites (Figs. II.14 a II 16 respectivamente). Utilizando el programa DIYABC el tamaño efectivo poblacional fue 1,95 veces mayor para la región marginal (N_e región marginal = 106000 y N_e región central = 54100). Las diferencias en las estimaciones con los distintos programas puede deberse a que el programa MIGRATE N-v3.6.11 (Beerli y Palczewski, 2010) fue diseñado para marcadores isoenzimáticos, siendo más apropiado el uso del programa DIYABC para secuencias de ADNc.

II.6 Discusión

Los resultados muestran que las poblaciones marginales y centrales poseen similares niveles de diversidad genética utilizando marcadores variables, e incluso para algunos parámetros las poblaciones marginales tuvieron mayor diversidad genética que las centrales utilizando marcadores conservados y medianamente variables como las isoenzimas. De esta manera los resultados obtenidos se contraponen con la idea de abundancia central que predice reducida diversidad genética en las poblaciones marginales, producto del mayor efecto de la deriva genética que en las centrales. Resultados similares fueron obtenidos por otros estudios en los cuales las poblaciones geográficamente marginales, poseen niveles de diversidad genética mayores o similares a las poblaciones centrales. Por ejemplo en Yang et al. (2016) la especie templada arbórea *Liriodendron chinense*, presenta similares niveles de diversidad genética en poblaciones marginales y centrales, debido a sobrevivencia en múltiples refugios *in situ* durante el último máximo glacial. A su vez, en la misma línea que otros trabajos (e.g. Pironon et al., 2015), se encontró que la dinámica temporal de la distribución de las especies en función de cambios climáticos históricos, tiene mayor efecto sobre los patrones genéticos contemporáneos que el clima y la geografía actuales, poniendo en relevancia la necesidad de evaluar la influencia histórica en relación a la genética de las poblaciones (Eckert et al., 2008).

La presencia de variantes genéticas particulares (haplotipos y alelos exclusivos) tanto en la región marginal como central, sugiere la existencia de

distintas zonas refugio donde la especie pudo haber sobrevivido a largo plazo *in situ* a oscilaciones climáticas del pasado. Estos refugios serían áreas libres de hielo (en el caso de las marginales) o sitios microclimatológicamente favorables (en el caso de las centrales) durante el último máximo glacial (Markgraf et al., 1995), donde el acervo genético de una especie microtémica (tolerante al frío) como *N. pumilio* habría sobrevivido localmente, preservando la diversidad genética original previa a las glaciaciones y desde los cuales expandió su rango recolonizando áreas previamente glaciadas luego del retiro de los hielos. Una de las características principales de los refugios, es su capacidad para desacoplar localmente las tendencias climáticas que ocurren a escala regional (Hampe y Jump, 2011). Este desacople se debería a particularidades del paisaje a escala local con efecto sobre el clima, tales como elevación, pendiente y corrientes de aire frío (Dobrowski, 2011); siendo estas particularidades frecuentes en sitios como fondos de valle, depresiones locales y cuencas generando cierta estabilidad ambiental que los convierte en buenos candidatos para microrefugios (Dobrowski, 2011). Estos resultados se relacionan con el comúnmente aceptado modelo genético, que predice una mayor diversidad genética en refugios glaciales (Petit et al., 2003; Pironon et al., 2015). Sustentando esta idea las poblaciones marginales estudiadas, salvo algunas, se encuentran fuera de los límites del hielo, sugiriendo que su origen sería relictos de una distribución original más amplia de la especie. Otra hipótesis alternativa es que las poblaciones marginales serían producto de la expansión de *N. pumilio* durante períodos fríos hacia zonas libres de hielo ubicadas sobre las vertientes orientales de los Andes y posterior aislamiento durante períodos cálidos. Los haplotipos y alelos exclusivos presentes tanto en poblaciones marginales y centrales también descartan la posibilidad que unas hayan dado origen a las otras. Por el contrario, apoyan la hipótesis de supervivencia local en refugios a largo plazo en ambas regiones, donde se habrían acumulado distintas variantes. Los haplotipos H15, H16 y H17 nuevos para la especie fueron encontrados anteriormente en otros miembros del subgénero *Nothofagus* en áreas geográficas cercanas (Acosta et al., 2014). Estudios filogeográficos previos han documentado una concordancia geográfica en la distribución de haplotipos entre distintos miembros simpátricos del subgénero *Nothofagus* debido a fenómenos de hibridación e introgresión

(captura de cloroplasto) (Acosta y Premoli, 2010; Premoli et al., 2012b). Estas secuencias compartidas de ADNc permiten, a través de sus eventos mutacionales, mapear eventos del pasado que han dejado huella en el acervo genético de las especies (Premoli, et al., 2012b). Tal es el caso de los haplotipos exclusivos de poblaciones marginales H15 y H16 que fueron identificados previamente en las especies *N. dombeyi* y *N. antarctica*; y el haplotipo exclusivo de la región central H17 encontrado cerca del límite con Chile, que también fue detectado en *N. dombeyi* en zonas cercanas. El haplotipo H18 nuevo para el subgénero, encontrado en la población marginal Chenqueniye, deriva del haplotipo H8 más común y con mayor distribución en el área estudiada. Se caracteriza por presentar una variante única en una región variable poli T de la secuencia de ADNc. Es destacable que las poblaciones marginales Fortín, Arroyo las Minas y Chenqueniye, que presentan haplotipos nuevos para la especie exclusivos de la región marginal (H15, H16 y H18 respectivamente), a su vez, mostraron alelos únicos de isoenzimas y/o microsatélites. Esta evidencia sugiere áreas de estabilidad climática donde la especie pudo refugiarse a lo largo del tiempo y donde surgieron *in situ* sus variantes genéticas particulares.

Trabajos anteriores en el subgénero *Nothofagus* indican una estructuración latitudinal de divergencia temprana de aproximadamente 46 millones de años producto de antiguas barreras al flujo génico (Acosta et al., 2014), indicando que poblaciones al norte y al sur de los 42 °S aproximadamente, han estado aisladas históricamente coincidiendo con la paleogeografía del Terciario (Mathiasen, 2010). Los resultados de este trabajo concuerdan con esta información, al encontrar un único haplotipo para todas las poblaciones al sur de los 42° 30' S apoyando de esta manera la hipótesis de una historia antigua previa al Pleistoceno que no se ha visto modificada con eventos posteriores como las últimas glaciaciones. En relación a esto, el haplotipo H16 de las poblaciones marginales se encuentra en el cordón montañoso Leleque geográficamente cercano a la zona de disyunción de los linajes norte y sur (Premoli et al., 2012b), presentando características de ambos linajes. Un estudio previo relaciona la distribución oeste-este del haplotipo H16 a lo largo de la Cordillera de los Andes, con la posibilidad de que

la Isla de Chiloé pudo haber sido parte del continente hace aproximadamente seis millones de años (Acosta et al., 2014), cuando durante las glaciaciones los niveles del mar eran bajos y podrían haber posibilitado conexión de la flora (Rabassa y Coronato, 2009).

La baja pero significativa divergencia entre poblaciones tanto marginales como centrales indica cierto grado de aislamiento entre las regiones. Sin embargo, los niveles similares de diversidad genética utilizando marcadores variables en poblaciones marginales y centrales dentro de cada región, junto con las tasas de migración encontradas, muestran la existencia de un flujo génico bajo a moderado entre poblaciones. Los tiempos de divergencia estimados entre las regiones marginal y central de *N. pumilio* en el norte de Patagonia coinciden con las oscilaciones climáticas del cuaternario (Rabassa et al., 2005). A su vez, el mayor flujo génico de poblaciones marginales hacia centrales sustenta la hipótesis de refugios glaciarios hacia el este de la cordillera, en áreas libres de hielo durante el último máximo glacial, donde actualmente habitan las poblaciones marginales y, desde donde la especie podría haberse expandido una vez retirados los hielos recolonizando áreas extensamente glaciadas como las ocupadas actualmente por la especie hacia la cordillera. En cambio los refugios ubicados en la región central podrían corresponder a supervivencia local en múltiples microrefugios dentro del área de extensión glaciada en valles o lugares con menor acumulación de hielo. Múltiples refugios hacia el este han sido propuestos también para la especie *Calceolaria polyrhiza*, la cual mostró alta variabilidad genética y presencia de haplotipos exclusivos asociados a una transecta longitudinal a los 71°O que coincide con el límite de extensión del hielo durante la Gran Glaciación Patagónica (Cosacov et al., 2010).

La similar y significativa endogamia encontrada tanto dentro de poblaciones marginales como centrales, indica la cruce entre individuos genéticamente similares. Esta endogamia puede deberse también, a la limitada capacidad de dispersión de las semillas y establecimiento de plántulas en claros abiertos bajo el dosel en sitios cercanos al árbol semillero, contribuyendo así a un agrupamiento espacial de individuos con genotipos emparentados (Mathiasen, 2010).

Se han realizado numerosos trabajos teóricos intentando explicar los factores que operan hacia los límites del rango de distribución de las especies (Sexton et al., 2009). En particular, existe preocupación creciente sobre el estrés bajo el que se encuentran las poblaciones marginales y la necesidad de desarrollar prácticas vinculadas con su conservación (Volis et al., 2016). La falta de conocimiento sobre el potencial evolutivo de las poblaciones marginales dificulta predecir potenciales respuestas al cambio climático global (Abeli et al., 2018). En este sentido, el estudio de la variación genética puede brindar información fundamental para entender posibles respuestas de las poblaciones marginales a cambios ambientales (Birkeland et al., 2017). Concretamente las poblaciones marginales son relevantes en conservación ya que pueden presentar variantes genéticas particulares y ser importantes en potenciales eventos de especiación (Brown, 1984; Lesica y Allendorf, 1995; Matthies et al., 2004). Dichas variantes pueden ser cruciales además, para la persistencia de la especie en el contexto del cambio climático global (Sabatier et al., 2011). El estudio de poblaciones marginales en relación a variables climáticas (pasadas, presentes y futuras) puede ayudar a determinar el potencial de adaptación de las mismas y orientar la priorización de esfuerzos de conservación (Abeli et al., 2018). En este capítulo, la evidencia encontrada de permanencia *in situ* a largo plazo de las poblaciones marginales, utilizando marcadores neutrales, sugiere que estas poseen características genéticas particulares. Estudios genómicos que permiten discernir entre la variación neutral y adaptativa podrían hacer un valioso aporte en este sentido. En particular, es necesario conocer si facilitarían la subsistencia de la especie frente a la alteración de los balances hídricos extremos predichos para el norte de Patagonia debido al cambio climático global (IPCC, 2014). Sin embargo, como la variación molecular neutra no puede utilizarse como sustituto de la variación cuantitativa selectivamente relevante en la toma de decisiones sobre conservación (Volis et al., 2016) en el capítulo IV de esta tesis, se mostrará evidencia de base genética adaptativa en poblaciones marginales para caracteres ecofisiológicos relacionados con estrés hídrico a partir de experimentos manipulativos en jardín común.

La variación similar en las secuencias de cloroplasto tanto en poblaciones marginales como centrales, la presencia de haplotipos únicos en ambas regiones y la variación isoenzimática sugieren entonces la presencia de múltiples refugios a lo largo de la distribución longitudinal de *Nothofagus pumilio* en el norte de Patagonia, con trayectorias evolutivas distintas que determinan la existencia de características genéticas particulares en las distintas poblaciones y regiones marginal y central. En relación a los microsatélites, se debería ampliar el número de individuos analizados para poder confirmar la existencia de alelos únicos en cada región. La información integral obtenida demuestra la importancia de conservar ambos tipos de poblaciones como unidades evolutivamente significativas diferentes bajo manejo independiente. Permite a su vez, la identificación de áreas con elevada diversidad genética (*hotspots*) que pueden guiar los esfuerzos de conservación del acervo genético y potencial evolutivo de la especie frente a los cambios climáticos venideros.

II.7 Conclusiones

Contrario a lo esperado, las poblaciones mostraron no solamente similares niveles de diversidad genética, sino además la presencia de variantes genéticas particulares en ambos tipos de poblaciones. Esto sugiere que tanto las poblaciones del extremo húmedo como el seco habrían subsistido localmente a lo largo del tiempo. Sin embargo, estas poblaciones habrían acumulado diferencias genéticas ya sea producto del aislamiento y/o presiones de selección diferenciales.

II.8 Tablas y Figuras

Tabla II.1 Parámetros de diversidad genética de tres regiones no codificantes de ADN del cloroplasto para las poblaciones marginales y centrales de *N. pumilio*. Número de poblaciones analizadas (P) y de individuos (N), el tamaño del alineamiento y el rango son indicados en pares de bases (pb), número de haplotipos (H), contenido de C/G (%CG), número de sitios variables (Ps), número de transiciones (Ts), número de transversiones (Tv), número de inserciones/delecciones o indels (I), y la diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π). Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

Región	P	N	Tamaño del alineamiento (pb)	Rango (pb)	H	CG%	Ps	Ts	Tv	I	h	π
Marginal	37	101	1675	1634-1670	8	33,37	17	0	10	7	0,8293 (0,019)	0,0113 (0,006)
Central	33	85	1675	1634-1670	6	33,36	17	0	10	7	0,5983 (0,052)	0,0109 (0,005)
Total	70	186	1675	1634-1670	9	33,36	18	0	10	8	0,7543 (0,025)	0,0111 (0,006)

Tabla II.2 Alelos isoenzimáticos únicos por población.

Región	Población	Locus	Alelo	Frecuencia
Marginal	AM	ALD1	4	0,094
Marginal	BUI	SKDH	4	0,042
Marginal	LHY	IDH2	4	0,100
Marginal	CHE	PGI2	2	0,050

Tabla II.3 Parámetros de variabilidad genética isoenzimática por región marginal y central, respectivamente. A, número promedio de alelos por locus; A_e , número efectivo de alelos; H_o y H_e , heterocigosis observada y esperada, respectivamente; F, índice de fijación y R_A , riqueza alélica. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Los asteriscos indican $P < 0,05$ utilizando test de t- pareado por locus entre regiones.

	Marginal	Central	Media
A	3,83 (0,28)*	3,7 (0,15)*	3,50 (0,33)
A_e	1,62 (0,05)	1,54 (0,05)	1,58 (0,04)
H_o	0,242 (0,028)	0,197 (0,018)	0,219 (0,023)
H_e	0,378 (0,021)	0,347 (0,020)	0,362 (0,015)
F	0,366 (0,049)	0,436 (0,031)	0,401 (0,035)
R_A	3,74 (0,24)*	3,17 (0,15)*	3,45 (0,29)

Tabla II.4 Endogamia total (F_{IT}), dentro (F_{IS}) y entre (F_{ST}) utilizando isoenzimas de los sitios de *Nothofagus pumilio* para cada región. Se presentan los valores promedio (DS) sobre todos los loci y los intervalos de confianza (IC) del 95 y 99% calculados según Weir y Cockerham (1984). En negrita se indican los valores promedio de los estadísticos F que resultaron significativamente distintos de cero.

Región	F_{IT}	F_{ST}	F_{IS}
Marginal	0,363 (0,059)	0,152 (0,023)	0,249 (0,064)
IC 95%	0,260 - 0,461	0,113 - 0,193	0,133 - 0,349
IC 99%	0,230 - 0,477	0,101 - 0,205	0,093 - 0,366
Central	0,442 (0,038)	0,169 (0,027)	0,330 (0,059)
IC 95%	0,374 - 0,501	0,123 - 0,213	0,221 - 0,417
IC 99%	0,356 - 0,512	0,109 - 0,217	0,189 - 0,437

Tabla II.5 Resumen del análisis de AMOVA jerárquico entre regiones marginal y central y distintos niveles jerárquicos dentro de cada una de ellas, para los 6 loci de isoenzimas de las 42 poblaciones de *Nothofagus pumilio* muestreadas. El valor de P fue calculado mediante un análisis de permutaciones con 999 réplicas y resultó significativo ($P < 0,001$) para todos los parámetros calculados.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Varianza estimada	%
Entre regiones	1	111,557	111,557	0,055	3%
Entre poblaciones	40	1265,067	31,627	0,496	31%
Entre individuos	1248	1988,570	1,593	0,533	33%
Dentro de individuos	1290	679,500	0,527	0,527	33%
Total	2579	4044,694		1,611	100%

Tabla II.6 Alelos únicos de microsatélites por región.

Región	Locus	Alelo	Frecuencia	Población
Marginal	NnBIO111	124	0,079	1 FOR, CHE, ALM
Central	NnBIO111	116	0,024	NEI
		Ncutas4	314	0,071
	Ncutas12	211	0,042	PAN, LLO
		215	0,021	NEI
	Ncutas21	232	0,053	TAL, ESC
		246	0,026	STE
		252	0,026	LOP
	Ncutas22	272	0,038	LN, COC
278		0,135	PAN, LOP, LN, TAL, STE, MOM, CAS	

Tabla II.7 Parámetros de variabilidad genética y endogamia (F_{IS}) utilizando microsatélites para las regiones marginal y central de *Nothofagus pumilio*. P, número de poblaciones / región; N, número de individuos analizados; A, número promedio de alelos por locus; A_P , número de alelos por locus polimórfico; R_A , riqueza alélica; B_F , número de alelos de baja frecuencia (>10%); A_R , número de alelos de baja frecuencia ponderado por el número total de alelos de la especie; A_e , número efectivo de alelos; A_T , número de alelos totales; % P, porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto*; H_O y H_E , heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. No se encontraron diferencias significativas utilizando test de t- pareado por locus entre regiones.

Región	N	A	A_P	R_A	B_F	A_R	A_e	A_T	%P	H_O	H_E	F_{IS}
Marginal	25	3,80 (0,58)	3,80	3,41 (0,54)	11	7,46	1,95 (0,33)	19	100	0,372 (0,154)	0,413 (0,113)	0,284 (0,242)
Central	26	5,40 (0,75)	5,40	4,75 (0,65)	15	14,46	2,42 (0,40)	27	100	0,459 (0,128)	0,545 (0,064)	0,180 (0,157)
Especie	51	5,60 (0,75)	5,60	4,20 (0,45)	19	19,00	2,12 (0,32)	28	100	0,410 (0,132)	0,482 (0,079)	0,185 (0,151)

Tabla II.8 Resumen del análisis de AMOVA jerárquico entre las regiones Central y Marginal y niveles jerárquicos inferiores, para los 5 loci de microsatélites de las 51 poblaciones de *Nothofagus pumilio* analizadas. El valor de P fue calculado mediante un análisis de permutaciones con 999 réplicas y resultó significativo ($P < 0,001$) para todos los parámetros calculados.

Fuente	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Varianza estimada	%
Entre regiones	1	6	6,284	0,085	6%
Entre individuos	49	95	1,946	0,537	36%
Dentro de individuos	51	45	0,873	0,873	58%
Total	101	146		1,494	100%

Figura II.1 Ubicación geográfica de las 70 poblaciones de *Nothofagus pumilio* estudiadas en el gradiente longitudinal de precipitación. Las poblaciones marginales y centrales se indican con color amarillo y verde respectivamente.

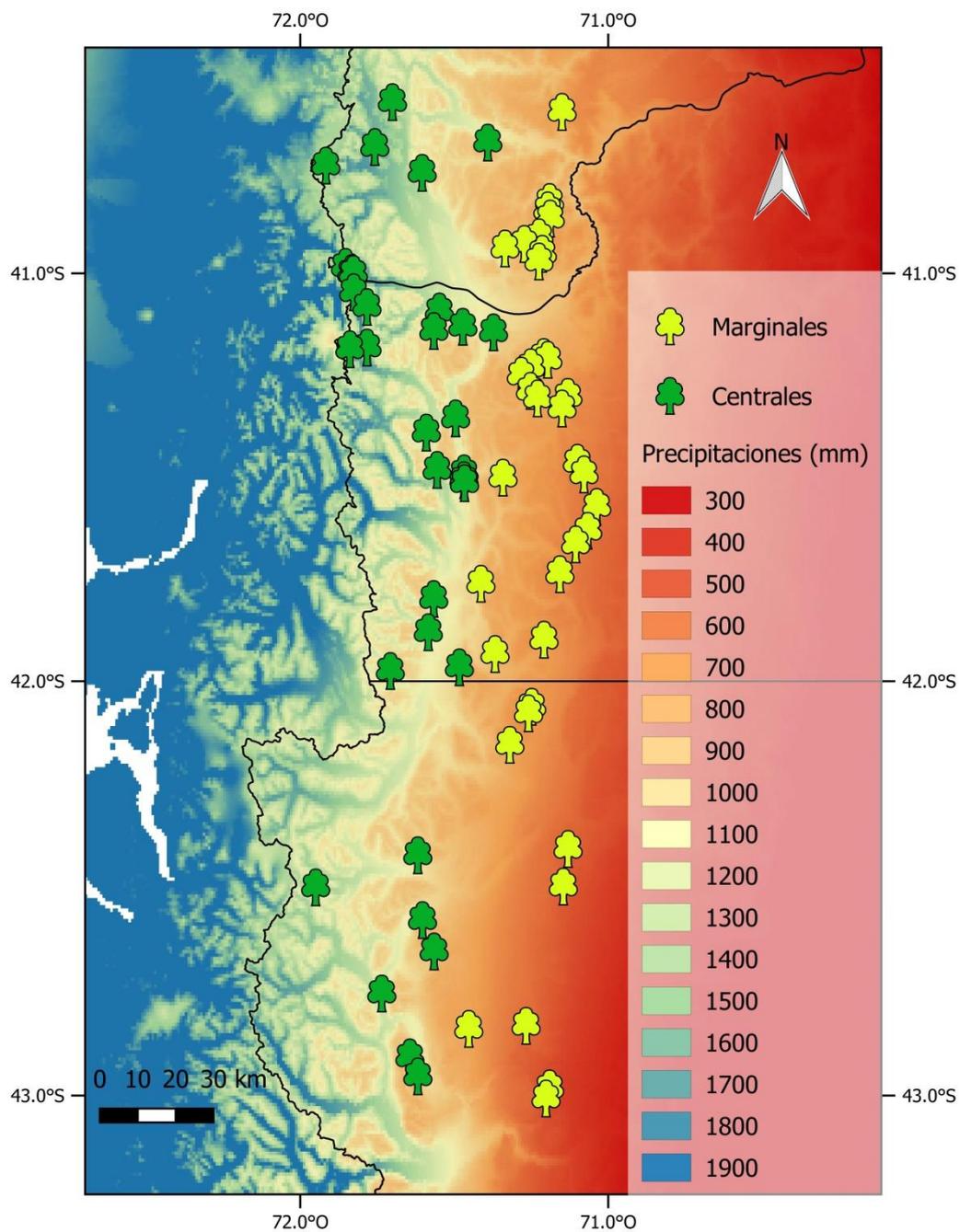
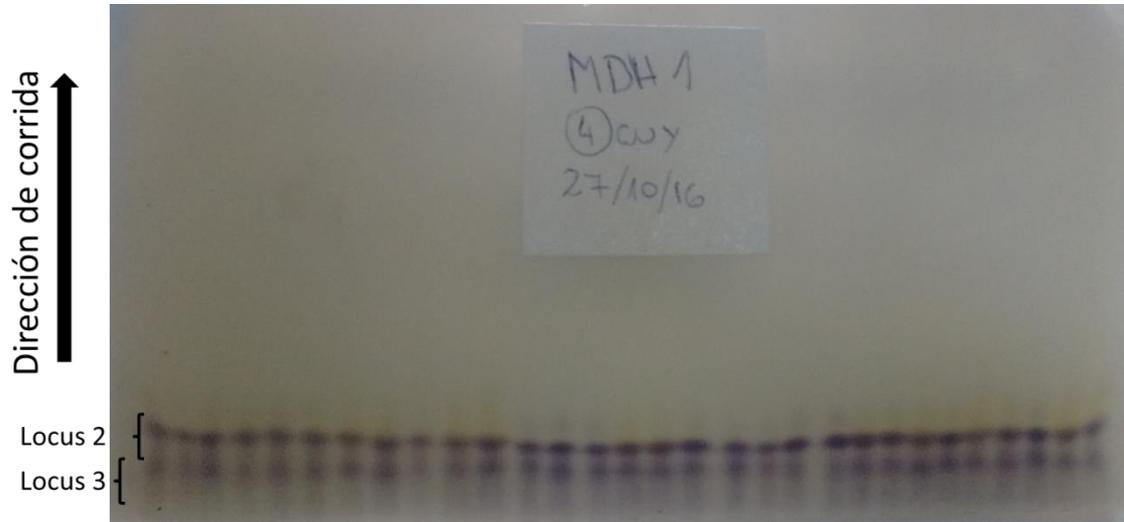
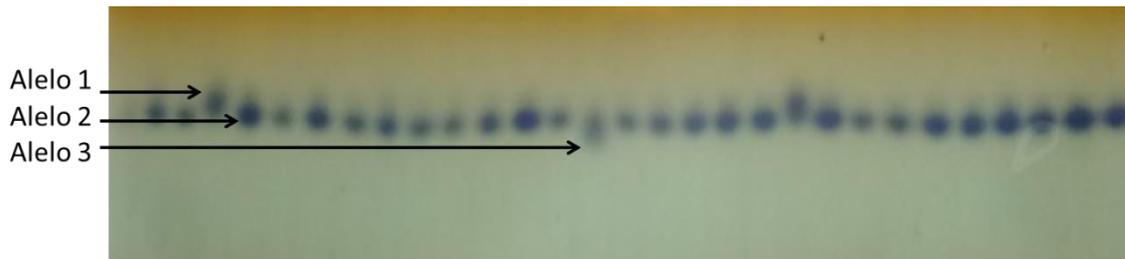


Figura II.2 Gel de almidón con tinción para la enzima Mdh1 mostrando dos loci para *Nothofagus pumilio* (A). Gel de almidón con tinción para la enzima Pgi (B) y diagrama mostrando la codificación de alelos para *Nothofagus pumilio* (C).

A)



B)



C)

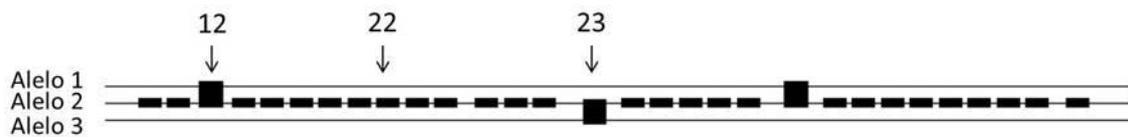


Figura II.3 Ubicación geográfica de las 70 poblaciones de *Nothofagus pumilio* estudiadas, los colores indican los distintos haplotipos, en sombreado celeste se indica el límite de las extensiones de hielo durante el último máximo glaciar.

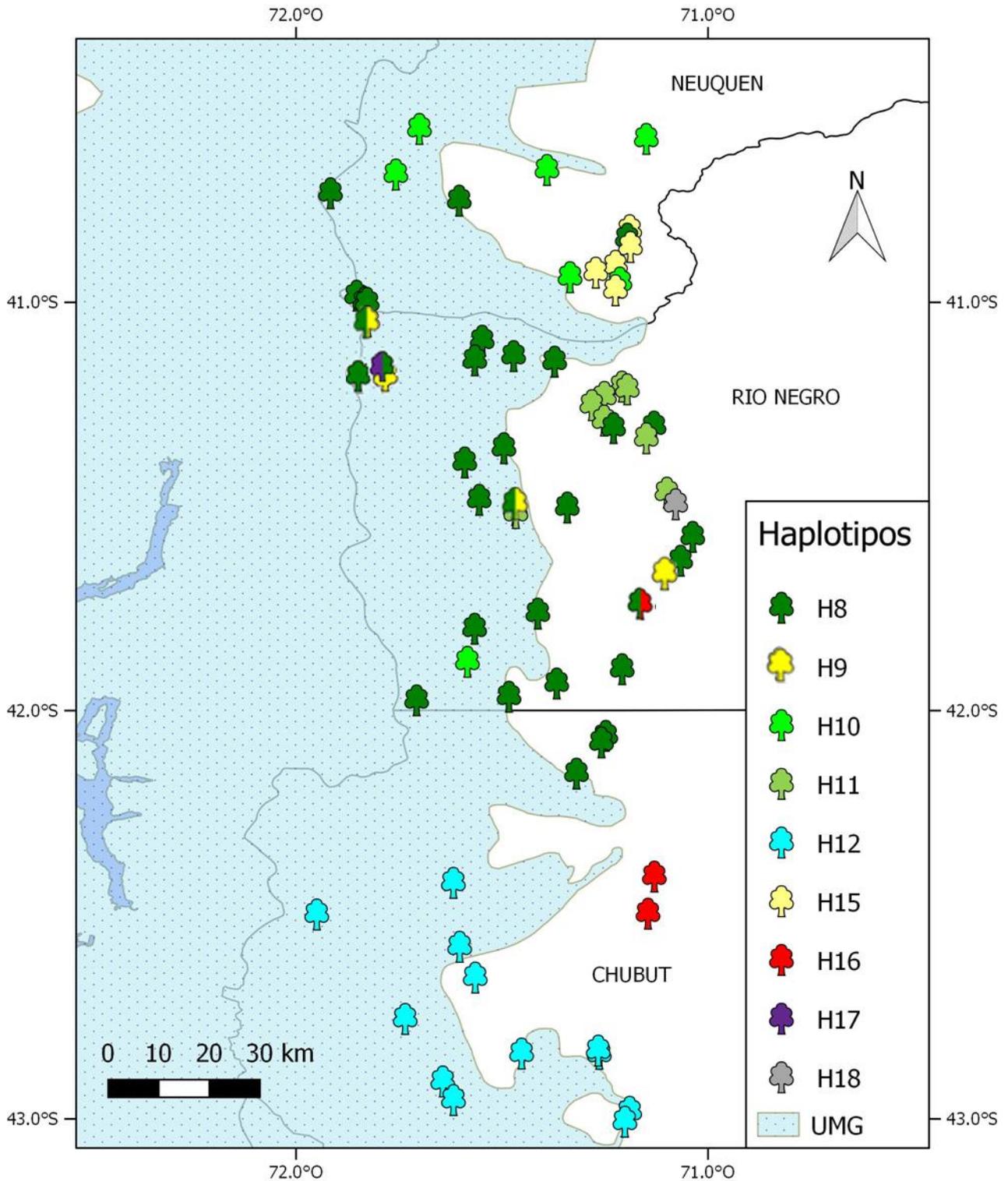


Figura II.4 Red de haplotipos mostrando las relaciones entre los 9 haplotipos de ADN del cloroplasto identificados en *Nothofagus pumilio* para las regiones psbB-psbH, trnL-trnF y trnH-psbA obtenidas con el método de median-joining. Cada círculo representa un haplotipo y su tamaño es proporcional a la frecuencia. Los números indican los sitios donde ocurrieron los cambios en las secuencias de ADN concatenadas. Los haplotipos exclusivos de poblaciones marginales y centrales se indican con las letras M y C respectivamente. Los sitios donde ocurrieron cambios en las secuencias de ADN concatenadas entre los distintos haplotipos se indican con guiones.

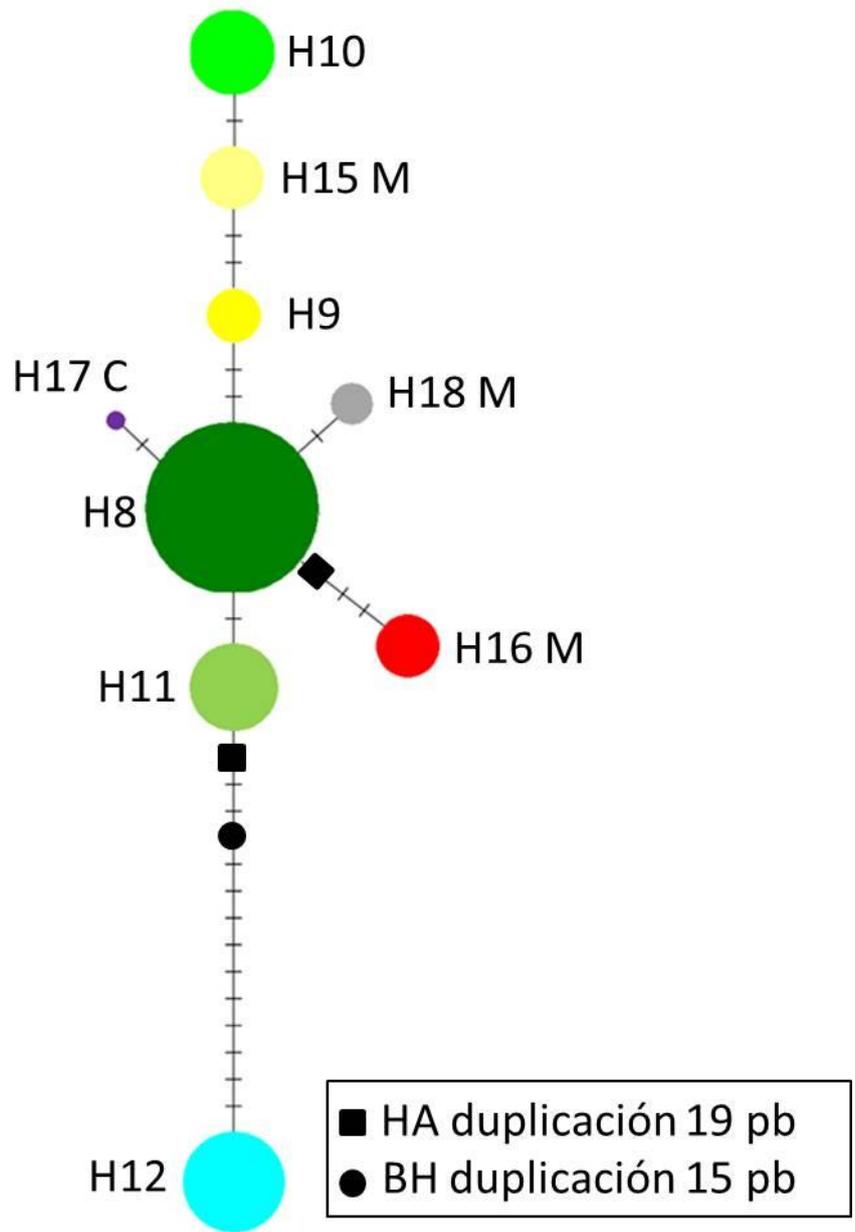


Figura II.5 Árbol filogenético mostrando las relaciones entre los 9 haplotipos de ADNc para las regiones concatenadas psbB-psbH, trnL-trnF y trnH-psbA de *Nothofagus pumilio* y 3 especies del subgénero *Lophozonia* (*Nothofagus nervosa*, *Nothofagus obliqua* y *Nothofagus glauca*) que fueron utilizadas como grupo externo. Los números sobre las ramas indican las probabilidades posteriores para el análisis bayesiano. Los haplotipos exclusivos de poblaciones marginales y centrales se indican con las letras M y C respectivamente.

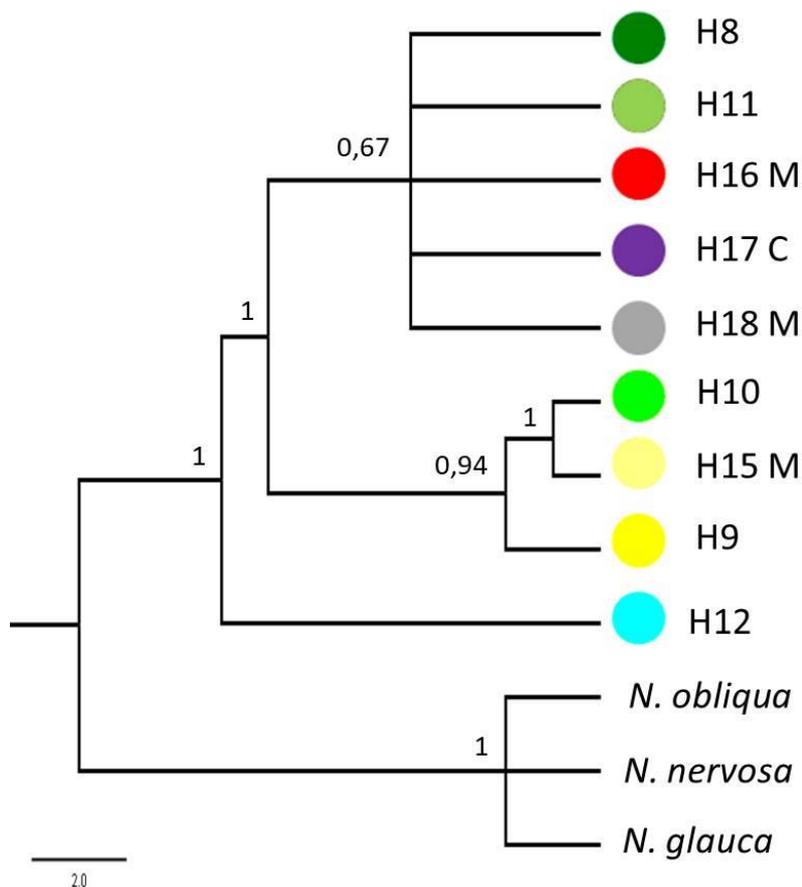


Figura II.5 Porcentaje de cada alelo de los 5 loci de microsatélites analizados para las regiones marginal y central de *Nothofagus pumilio*. Los recuadros amarillos y rojos indican alelos exclusivos de la region marginal y central respectivamente.

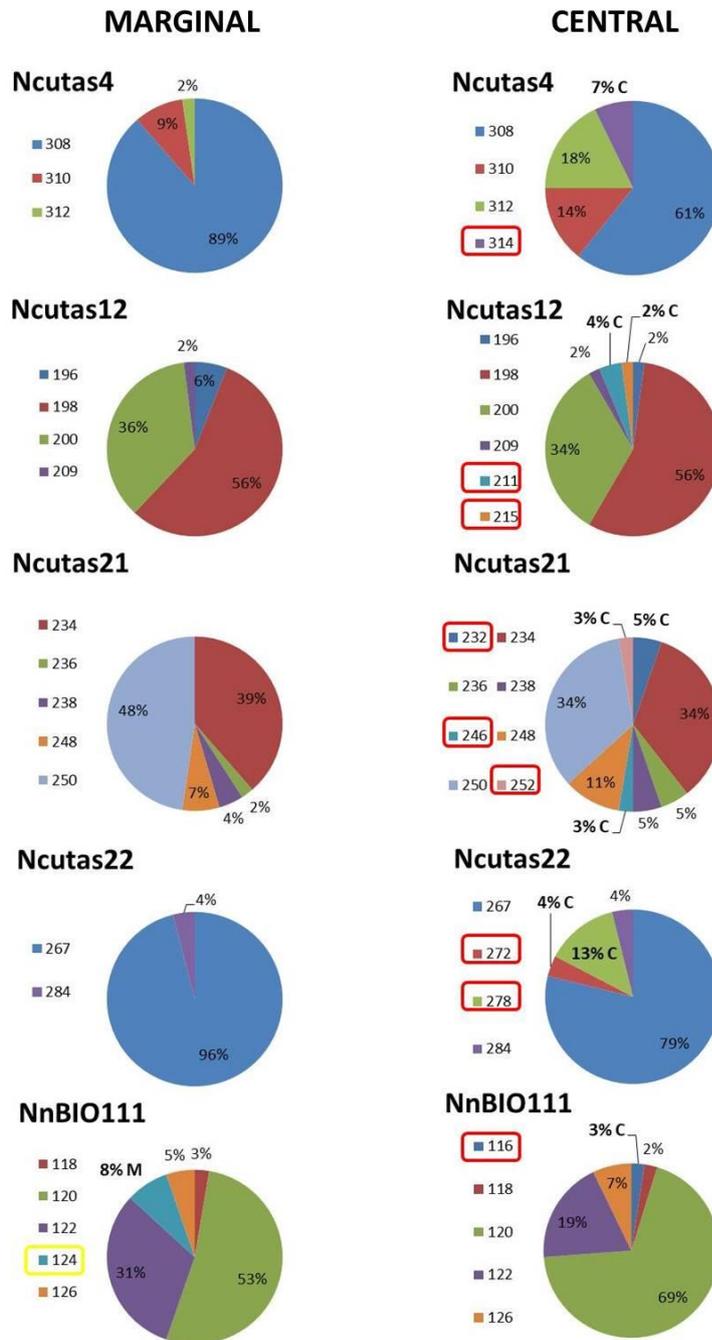


Figura II.6 Autocorrelograma espacial para las poblaciones marginales de *Nothofagus pumilio* utilizando isoenzimas. Se definieron 6 clases de distancia en intervalos de 20 km. Las líneas discontinuas rojas representan los intervalos de confianza del 95% superior e inferior. La línea azul representa los valores promedios del índice de correlación (r).

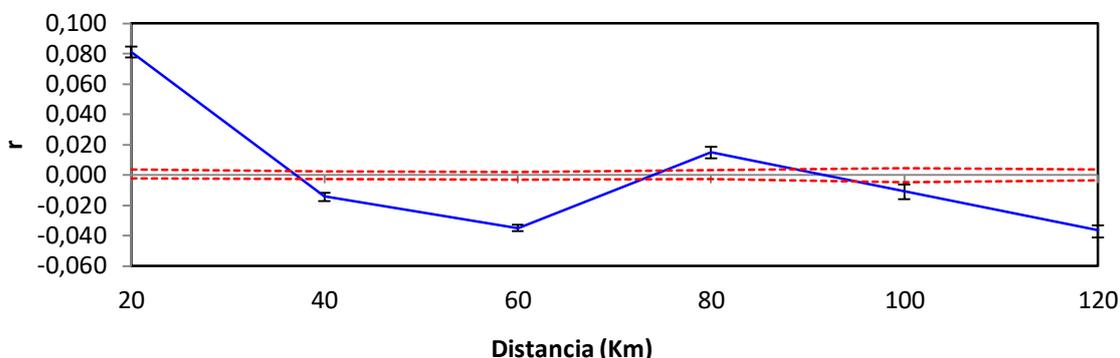


Figura II.7 Autocorrelograma espacial para las poblaciones centrales de *Nothofagus pumilio* utilizando isoenzimas. Se definieron 6 clases de distancia en intervalos de 20 km. Las líneas discontinuas rojas representan los intervalos de confianza del 95% superior e inferior. La línea azul representa los valores promedios del índice de correlación (r).

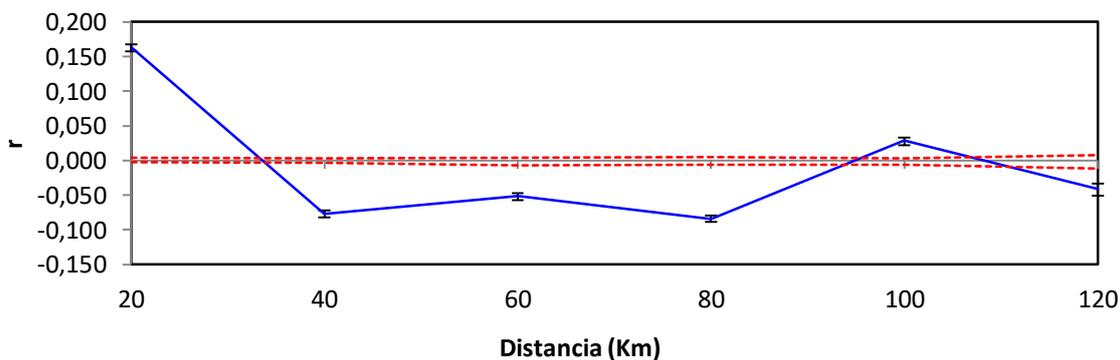


Figura II.8 Autocorrelograma espacial para las poblaciones marginales de *Nothofagus pumilio* utilizando microsatélites. Se definieron 6 clases de distancia en intervalos de 20 km. Las líneas discontinuas rojas representan los intervalos de confianza del 95% superior e inferior. La línea azul representa los valores promedios del índice de correlación (r).

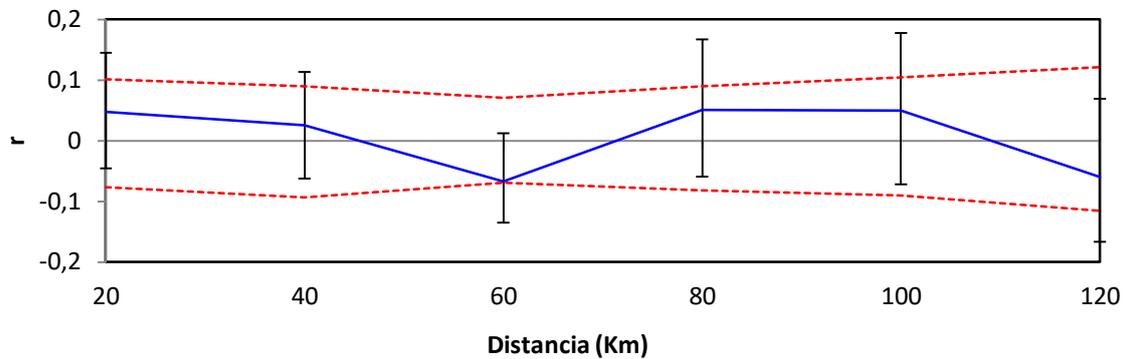


Figura II.9 Autocorrelograma espacial para las poblaciones centrales de *Nothofagus pumilio* utilizando microsatélites. Se definieron 6 clases de distancia en intervalos de 20 km. Las líneas discontinuas rojas representan los intervalos de confianza del 95% superior e inferior. La línea azul representa los valores promedios del índice de correlación (r).

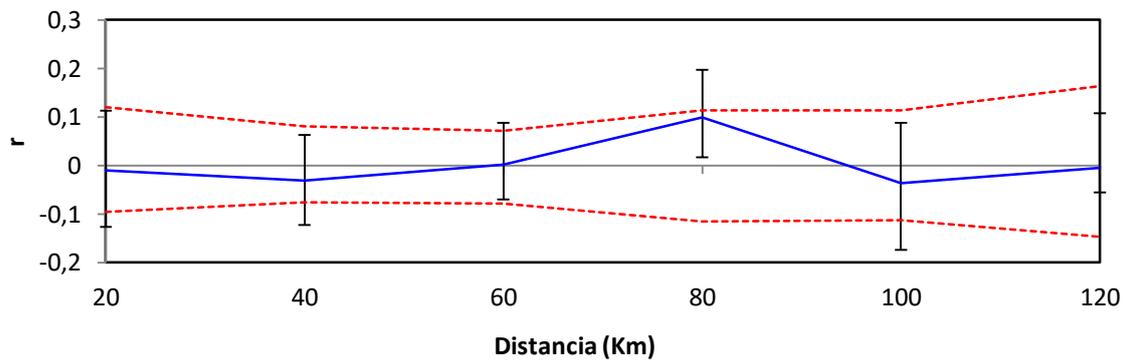


Figura II.10 Coeficiente de asignación por individuo para los dos K grupos genotípicos encontrados utilizando isoenzimas (A). Coeficiente de asignación promedio por región para los dos K grupos (B). Los colores amarillo y rojo representan los grupos K1 y K2 respectivamente.

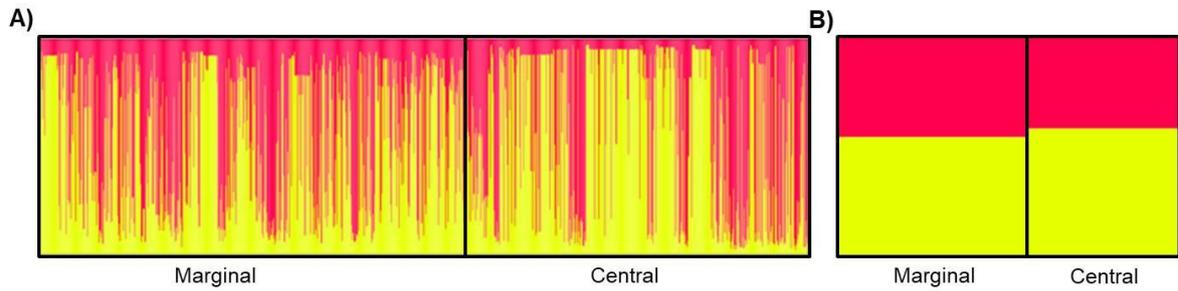


Figura II.11 Coeficiente de asignación por individuo para los dos K grupos genotípicos encontrados utilizando microsatélites (A). Coeficiente de asignación promedio por región para los dos K grupos (B). Los colores amarillo y rojo representan los grupos K1 y K2 respectivamente.

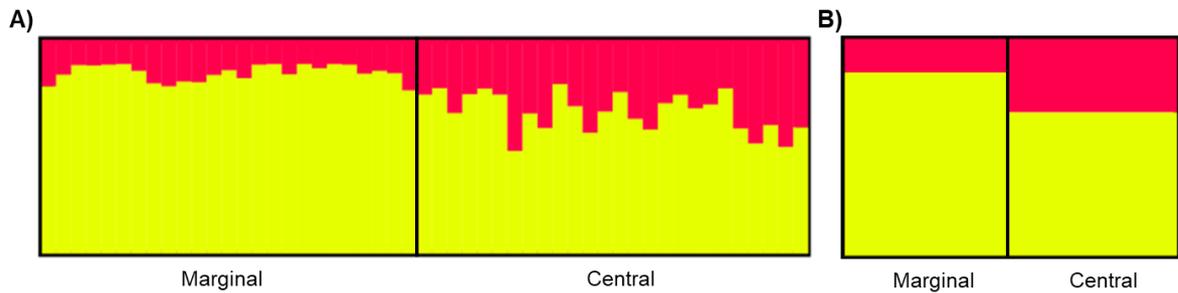


Figura II.12 correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica con datos de ADNc de las 70 poblaciones de *Nothofagus pumilio* analizadas.

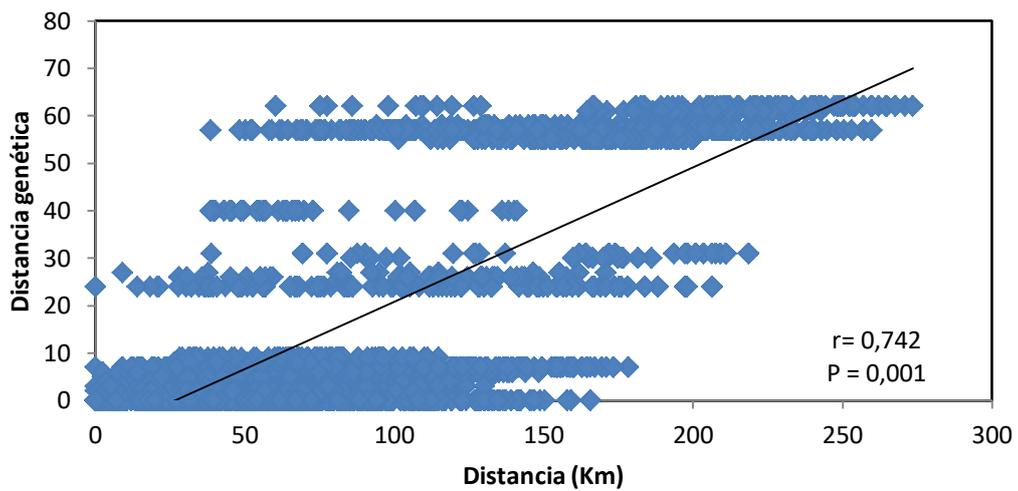


Figura II.13 correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica con datos de microsatélites de 51 poblaciones de *Nothofagus pumilio* analizadas.

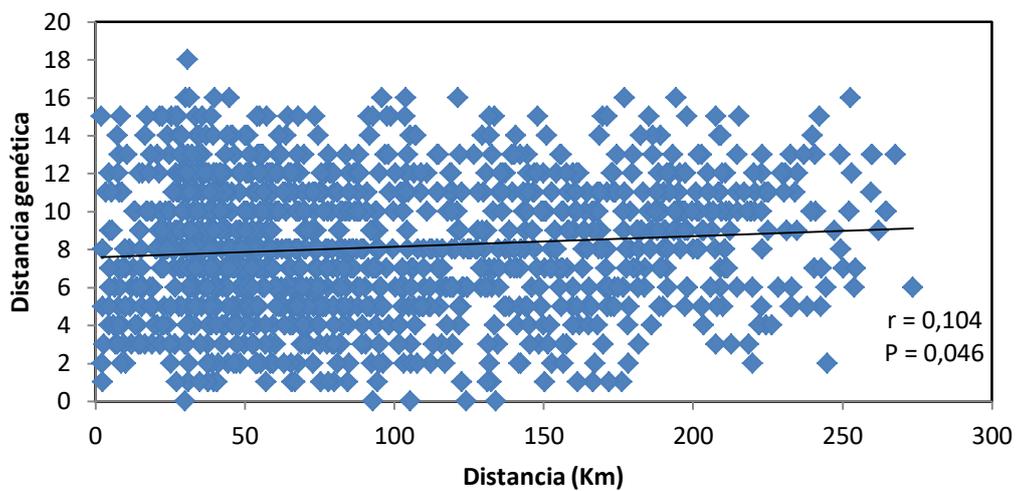


Figura II.14 Representación esquemática de los parámetros de migración estimados para *Nothofagus pumilio* con datos de ADNc utilizando en programa MIGRATE N-v3.6.11 (Beerli y Palczewski, 2010). Las flechas representan las tasas de migración medias escaladas por la tasa de mutación (M) entre poblaciones marginales y centrales. El grosor de las flechas es proporcional a M. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño efectivo poblacional (N_e). Sobre las flechas se muestran los tiempos absolutos de coalescencia en kilo años (Ka) antes del presente.

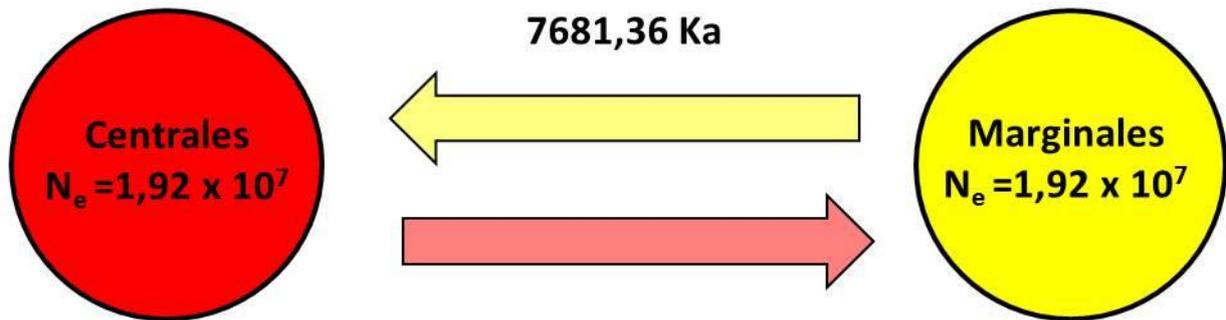


Figura II.15 Representación esquemática de los parámetros de migración estimados para *Nothofagus pumilio* con datos isoenzimáticos. Las flechas representan las tasas de migración medias escaladas por la tasa de mutación (M) entre poblaciones marginales y centrales. El grosor de las flechas es proporcional a M. El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño efectivo poblacional (N_e). Sobre las flechas se muestran los tiempos absolutos de coalescencia en kilo años (Ka) antes del presente.

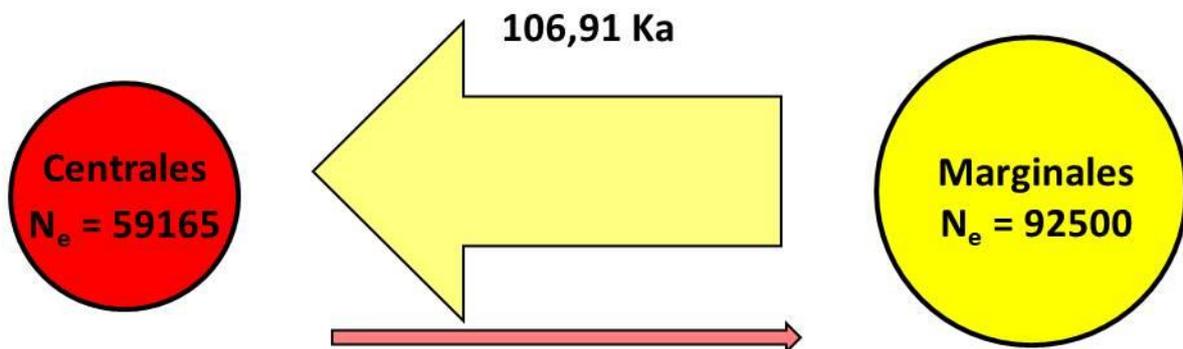
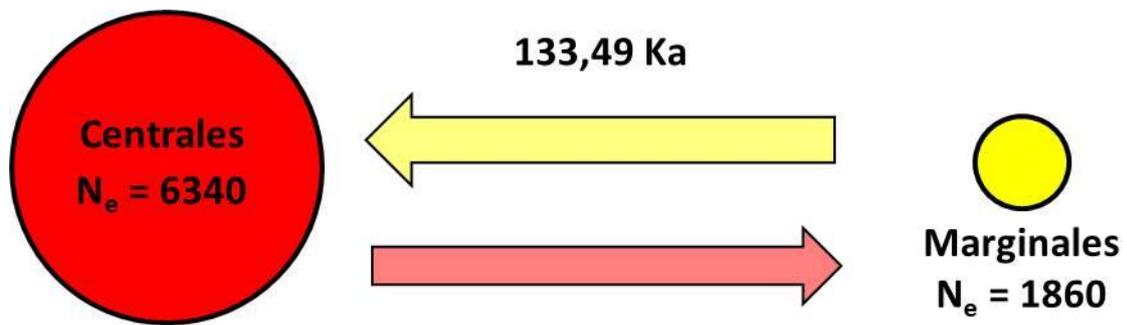


Figura II.16 Representación esquemática de los parámetros de migración estimados para *Nothofagus pumilio* con datos de microsatélites. Las flechas representan las tasas de migración medias escaladas por la tasa de mutación (M) entre poblaciones marginales y centrales. El grosor de las flechas es proporcional a M . El tamaño de los círculos es proporcional al tamaño efectivo poblacional (N_e). Sobre las flechas se muestran los tiempos absolutos de coalescencia en kilo años (Ka) antes del presente.



Capítulo III Efectos de los gradientes climáticos sobre la diversidad genética de *Nothofagus pumilio*



III.1 Introducción

Las especies de amplio rango que habitan a lo largo de gradientes ambientales encuentran condiciones cambiantes en el medio físico que generan presiones diferenciales de selección que juntamente con la plasticidad fenotípica resultan en poblaciones genéticamente polimórficas. Sumado a esto, las fuerzas neutrales como el aislamiento genético entre distintas poblaciones y las variaciones en los tamaños poblacionales sufridos a lo largo del tiempo, generan gran heterogeneidad a nivel intraespecífico que puede estudiarse en el seno de las poblaciones. El potencial de responder a cambios evolutivos depende de los niveles de variación genética (Reed y Frankham, 2003). Por lo tanto, poblaciones con reducida diversidad genética tendrían una capacidad limitada para responder a cambios ambientales (Sgrò et al., 2011). Esto es relevante bajo escenarios de cambio donde la resiliencia a cambios futuros estará dada por la diversidad genética presente en las poblaciones.

Los gradientes ambientales y las características del hábitat pueden influir en el flujo de genes entre poblaciones directamente, interrumpiendo la dispersión (por ejemplo, barreras físicas), o indirectamente, impidiendo el establecimiento exitoso y/o posterior supervivencia (por ejemplo, mediante mecanismos de adaptación local) (Nosil et al., 2005; White et al., 2010; Burgess et al., 2012).

Los bosques templados del sur de Sudamérica poseen el rasgo característico de estar dominados por especies del género *Nothofagus*. Estas son especies principalmente de árboles y también arbustos que están presentes a lo largo de los más de 3000 km de extensión latitudinal que posee el bosque templado de Sudamérica. Una de las especies más conspicuas de los bosques de Patagonia es *Nothofagus pumilio* y ha sido objeto de numerosos estudios de la distribución de la variación genética combinando

análisis moleculares con experimentos manipulativos en jardín común y de trasplantes recíprocos (Premoli et al., 2007; Mathiasen y Premoli, 2010, 2016).

Gradiente latitudinal, influencia de factores históricos

Para muchas especies arbóreas, es conocido el efecto que tuvieron las últimas glaciaciones sobre sus rangos de distribución. Durante períodos fríos las especies tendieron a reducir sus rangos de distribución, quedando restringidas a zonas denominadas de refugio, bajo climas menos extremos. En el caso del hemisferio norte muchas especies se refugiaron hacia el extremo sur (i.e. cálido) de distribución de las especies (Hewitt 2000). Tal sería el caso de especies sensibles al frío que no habrían tolerado las bajas temperaturas registradas durante periodos fríos. Sin embargo, especies tolerantes al frío habrían podido subsistir localmente aún a altas latitudes y en ambos hemisferios (e.g. Pruet y Winker 2008), esta idea en el caso de especies microtéricas (resistentes al frío) de bosques del hemisferio sur recibió el nombre de refugios múltiples (Premoli et al., 2000) (ver introducción capítulo I). El análisis genético de distintas poblaciones a lo largo de la distribución latitudinal de *N. pumilio* indicó que las poblaciones ubicadas hacia el sur no mostraron evidencia de menor diversidad genética que las del norte, tal como se esperaría si estas últimas hubieran sido producto de la colonización postglaciaria. No solamente no fue menor la diversidad genética hacia el sur, sino que algunos parámetros poblacionales como la heterocigosis y la riqueza alélica mostraron mayores valores en estas últimas utilizando marcadores isoenzimáticos (Mathiasen y Premoli, 2010). Además, sumado a esto, se han encontrado valores similares de diversidad genética a lo largo del gradiente latitudinal utilizando microsatélites (Soliani et al., 2015). Por lo tanto, estos resultados sugieren la presencia de un acervo genético que fue conservado a

lo largo de las oscilaciones climáticas del Cuaternario de Patagonia aún a altas latitudes bajo climas de características extremas.

Gradiente altitudinal, variación genética y demográfica

La Cordillera de los Andes presenta marcados gradientes altitudinales a lo largo de los cuales las condiciones ambientales tales como la temperatura, la radiación solar, la exposición al viento y las características del suelo varían marcadamente con la altitud en distancias de unos pocos cientos de metros. En el extremo superior del gradiente altitudinal, las condiciones extremas imponen restricciones severas para la reproducción y establecimiento de plantas por semillas, debido a un acortamiento de la estación de crecimiento, a las bajas temperaturas y a la persistencia de la cobertura de nieve (Körner, 2007). Como consecuencia, se espera encontrar una gran variación morfológica en especies que habitan un amplio rango altitudinal. Esta variación puede estar explicada no sólo por la capacidad de aclimatación de dichas especies a distintos ambientes (plasticidad fenotípica) sino también por la selección diferencial de genotipos bajo distintas condiciones de un gradiente ambiental.

A lo largo del gradiente altitudinal *N. pumilio* presenta una variación morfológica significativa en sus formas de crecimiento (Rusch, 1993; Barrera et al., 2000). Experimentos de jardín común mostraron que las diferencias en la arquitectura de las plantas, la morfología foliar y caracteres ecofisiológicos poseen base genética (Premoli, 2004; Premoli et al., 2007; Premoli y Brewer, 2007). Modelos demográficos en gradientes altitudinales de *N. pumilio* mostraron que la disponibilidad de semillas y el establecimiento de adultos se vuelven cada vez más escasos con el aumento de la altitud, donde además la regeneración ocurre principalmente por una abundante producción de rebrotes (y escasez de renuevos) (Martínez Pastur et al., 1997; Cuevas 2000; Daniels

2000; Premoli 2004). En cambio, en el límite inferior del bosque la regeneración de *N. pumilio* ocurre principalmente gracias a la apertura de claros bajo el dosel, ya sea por la caída de árboles (Heinemann et al., 2000) u otros disturbios a mayor escala (e. g. avalanchas, incendios, vulcanismo). Por lo tanto, el clima a lo largo de gradientes altitudinales puede tener una influencia significativa sobre la demografía y características genéticas de las poblaciones que los habitan.

Gradiente longitudinal de precipitación

Sobre las laderas orientales de la Cordillera de los Andes existe un marcado gradiente ambiental longitudinal. Esto se debe principalmente a la influencia de los vientos predominantes provenientes del océano Pacífico y el efecto sombra de la cordillera. De esta manera, se genera un pronunciado gradiente de precipitación de oeste a este, en el cual las precipitaciones anuales disminuyen de 3000 mm a menos de 800 mm en una distancia de sólo 50 Km (Veblen et al., 1996). Hacia el extremo seco del gradiente de precipitación, en el ecotono entre la estepa y bosque australandino, *N. pumilio* forma poblaciones pequeñas y aisladas. Dichas poblaciones *a priori* podrían ser consideradas geográfica y ecológicamente marginales, estando además sujetas al efecto combinado del aislamiento y la deriva genética, y presiones diferenciales de selección que podrían resultar en diferencias genéticas (Yang et al., 2016).

Si bien existe abundante información sobre las presiones de selección divergentes en *N. pumilio* a lo largo de su rango de distribución, resta analizar la influencia del clima sobre el acervo genético de sus poblaciones a lo largo del gradientes ambientales. Los patrones de variación en rasgos de base genética en relación con el clima podrían utilizarse para guiar la transferencia de semillas para reforestación e implementación de prácticas de translocación

de individuos y facilitar la adaptación rápida a climas cambiantes (Aitken y Whitlock, 2013). En este capítulo se analiza el efecto del clima sobre distintos parámetros de diversidad genética neutral de esta especie a lo largo de los gradientes ambientales de Patagonia. Para ello se utilizan datos genéticos propios del gradiente longitudinal e información previamente publicada de los gradientes altitudinal (Premoli 2003) y latitudinal (Mathiasen y Premoli 2010) como variables dependientes de modelos de regresión múltiple en las que las variables bioclimáticas a lo largo de cada uno de dichos gradientes serán utilizadas como variables explicatorias independientes.

III.2 Objetivo particular

Determinar las variables climáticas de mayor influencia sobre la variación genética de las poblaciones a lo largo de gradientes ambientales.

Las hipótesis y predicciones planteadas en este capítulo fueron las siguientes

III.3 Hipótesis particular

- ❖ **Hipótesis III.1** Los gradientes ambientales latitudinal, altitudinal y longitudinal de Patagonia modelan la diversidad genética de *Nothofagus pumilio*.
- **Predicción III.1** Se espera que *Nothofagus pumilio* presente mayor diversidad genética bajo condiciones ambientales óptimas para su desarrollo.

III.4 Materiales y métodos

Se analizó la variación en la diversidad genética neutral de *N. pumilio* a lo largo de los gradientes climáticos latitudinal, longitudinal y altitudinal mediante marcadores moleculares neutros isoenzimáticos. Para ello se utilizaron datos de diversidad genética extraídos de trabajos publicados anteriormente para 14 y 27 poblaciones de los gradientes altitudinal (Premoli, 2003) y latitudinal (Mathiasen y Premoli, 2010), respectivamente (Tablas III.1 y III.3). Para analizar el gradiente longitudinal se sumaron datos isoenzimáticos de 35 poblaciones de *N. pumilio* ubicadas entre los 40 y 43°S a los datos ya publicados de 7 poblaciones centrales en el mismo rango (Mathiasen y Premoli, 2010) (Tabla III.2). El procedimiento de extracción y análisis de isoenzimas para las nuevas poblaciones se realizó siguiendo la metodología descrita en Premoli (2003) (para más detalles ver metodología del capítulo II). Para cada localidad se extrajeron los datos climáticos en base a 19 variables bioclimáticas que fueron obtenidas de la base de datos de WorldClim versión 1 (Hijmans et al., 2005; <http://www.worldclim.org>) con una resolución espacial de 30 seg (Tabla III.4). Estas variables son derivadas de promedios mensuales de temperatura y precipitación representativos de las dimensiones climáticas relevantes para la determinación de la distribución de especies (Hijmans et al., 2005).

Análisis de datos

Se realizaron regresiones lineares simples para evaluar la relación entre las variables bioclimáticas y los diferentes gradientes ambientales latitudinal, longitudinal y altitudinal. Además, para evaluar la diversidad genética en cada gradiente se realizaron regresiones lineares simples utilizando cuatro variables de diversidad genética y la latitud, longitud y altitud para cada gradiente,

respectivamente. Los parámetros de diversidad genética consistieron en: número de alelos efectivo (A_e), riqueza alélica (A_r), heterocigosis observada (H_o) y heterocigosis esperada (H_E). Dichos parámetros fueron calculados utilizando los programas POPGENE v1.32 (Yeh et al., 1999) y FSTAT v 2.9.3 (Goudet 2001). Para evaluar la relación entre las variables de diversidad genética (variables dependientes) y las 19 variables bioclimáticas (variables independientes) se realizaron regresiones múltiples. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa STATISTICA v.7.0 (StatSoft, Inc. 2004) y se probaron los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (evaluada mediante gráfico de residuales vs. predichos). Las regresiones fueron consideradas significativas con una significancia de $P < 0,05$. En el caso de las regresiones múltiples los p-valores fueron corregidos siguiendo a Benjamini y Hochberg (1995).

III.5 Resultados

Los análisis de regresiones simples realizadas entre las 19 variables bioclimáticas y los diferentes gradientes ambientales arrojaron resultados significativos en la mayoría de los casos (Tablas III.5 a III.7). Para el gradiente latitudinal 16 de las 19 variables bioclimáticas mostraron una asociación significativa con la latitud, siendo las variables más significativas la estacionalidad en las precipitaciones (Bio15, $r^2 = 0,96$) y el rango de temperatura anual (Bio7, $r^2 = 0,92$). Las variables asociadas con la precipitación aumentan hacia latitudes más altas, mientras que las variables asociadas a la temperatura mostraron los menores valores hacia el sur de la distribución de la especie (Tabla III.5). En el gradiente longitudinal, 13 de las 19 variables bioclimáticas mostraron una asociación significativa con la longitud, siendo las variables relacionadas con la precipitación las más influyentes (Bio12, $r^2 = 0,8$;

Bio14, $r^2=0,9$; Bio17, $r^2= 0,92$ y Bio18, $r^2= 0,92$) junto con la estacionalidad en la temperatura (Bio4, $r^2= 0,79$). Las variables relacionadas con la precipitación disminuyen hacia el este de la distribución de la especie, mientras que las variables asociadas a la temperatura aumentan (Tabla III.6). Por otro lado, en el gradiente altitudinal, 14 de las 19 variables bioclimáticas arrojaron una relación significativa con la altitud (Tabla III.7), siendo las variables más significativas la temperatura del cuarto más frío (Bio8, $r^2=0,91$) y el rango diurno (Bio2, $r^2= 0,79$). Las variables de temperatura mostraron una relación negativa con la altitud, mientras que las variables de precipitación mostraron diferentes tendencias según la época del año. En los meses más fríos y húmedos, las precipitaciones fueron menores en altitudes menores, mientras que en los meses más cálidos y secos las precipitaciones fueron menores a mayor altitud (Tabla III.7).

Las regresiones simples entre la diversidad genética neutral y los distintos gradientes ambientales arrojaron relaciones significativas entre los parámetros de diversidad genética neutral y la latitud y la altitud (Tabla III.8, Fig. III.1). No se encontraron relaciones significativas entre los parámetros de diversidad genética y el gradiente longitudinal (Tabla III.8, Fig. III.1). Para el gradiente latitudinal, se encontró un incremento significativo ($P < 0,05$) de Ae ($r^2 = 0,30$), Ar ($r^2 = 0,29$), Ho ($r^2 = 0,33$), y He ($r^2 = 0,29$) con la latitud (Tabla III.8, Fig. III.1). Por otro lado, las regresiones simples realizadas para el gradiente altitudinal mostraron una disminución significativa ($P < 0,05$) en Ae ($r^2 = 0,31$), Ar ($r^2 = 0,38$), y en Ho ($r^2 = 0,63$) y He ($r^2 = 0,32$) con la altitud (Tabla III.8, Fig. III.1). Cabe mencionar que en el análisis del gradiente altitudinal se incluyeron dos poblaciones a distintas alturas de Tierra del Fuego; el resto fueron de latitudes a los 41°S. Estas poblaciones de Tierra del Fuego se encuentran a menores alturas debido a que con el aumento de la latitud la lenga disminuye su distribución en altura en el gradiente altitudinal. Sin embargo, estas dos poblaciones ajustaron a la regresión, mostrando además los mayores valores

de diversidad genética debido en parte a que se corresponden con el mayor poliformismo de la lenga a mayores latitudes.

Por último, los análisis de regresión múltiple entre los parámetros de diversidad genética y las variables bioclimáticas arrojaron resultados significativos para los distintos gradientes ambientales (Tabla III.9). En el gradiente latitudinal, Ae, Ar, Ho y He presentaron una relación positiva significativa con las variables de precipitación, especialmente precipitaciones de verano, y además presentaron mayores valores en sitios donde las variables de temperatura alcanzaban valores intermedios (Tabla III.9 y Fig. III.2). En el gradiente longitudinal, Ae mostró una relación significativa positiva con la precipitación del mes más seco, es decir la de verano (Tabla III.9, Fig. III.2). En el gradiente altitudinal, Ae y He presentaron una relación significativa y positiva con la precipitación del mes más seco (verano), mientras que las variables Ar y Ho mostraron una relación significativa y positiva con la temperatura media de los meses más húmedos, que corresponden a los meses de otoño-invierno (Tabla III.9, Fig. III.2).

III.6 Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia una relación entre el clima, a lo largo de gradientes ambientales (latitudinal, longitudinal y altitudinal) y los niveles de variación genética de las poblaciones de *N. pumilio*. Las variables bioclimáticas más influyentes sobre la diversidad genética se encontraron relacionadas principalmente a las precipitaciones de verano y temperaturas de invierno, siendo la tendencia general de mayor diversidad genética a mayores precipitaciones y temperaturas.

Las variables bioclimáticas más significativas relacionadas con la latitud fueron un menor rango de temperatura anual y menor estacionalidad de las precipitaciones hacia el sur, por lo tanto existe una tendencia a un clima más estable a mayores latitudes. Esta información sumada a la mayor diversidad genética encontrada hacia el sur (Mathiasen y Premoli 2003) sugiere que las poblaciones de *N. pumilio* situadas a altas latitudes se encontrarían bajo condiciones que promueven el mantenimiento de poblaciones de mayor tamaño y que consistirían de masas boscosas más continuas. Es decir, sufrirían en menor medida los impactos de la deriva genética y el aislamiento que tienden a empobrecer las poblaciones pequeñas y aisladas. Por ejemplo, la abundante regeneración y establecimiento de plántulas en latitudes tan al sur como Tierra del Fuego (Martínez Pastur et al., 1999) son raramente observables a menores latitudes (Premoli, AC UNComahue obs. Pers). La mayor diversidad genética de estas poblaciones australes, refleja además la persistencia a largo plazo a pesar de las oscilaciones en el clima regional por encontrarse bajo climas relativamente más oceánicos y estables (Premoli et al., 2010). Esta evidencia destaca su potencial adaptativo en el contexto de cambio climático, mientras que las ubicadas hacia el extremo norte de la distribución de la especie se encontrarían bajo mayor riesgo de extinción local en relación al

pronóstico de temperaturas más altas y mayor frecuencia de sequías extremas para climas de régimen Mediterráneo como los del norte de Patagonia.

Sobre el gradiente altitudinal las variables bioclimáticas más significativas determinan mayor rango diurno y menores temperaturas de invierno a mayor altura. Además, para este gradiente se encontró también una marcada estacionalidad en las precipitaciones, es decir en los meses más cálidos y secos las precipitaciones fueron menores a mayor altitud, mientras que en los meses más fríos y húmedos las precipitaciones fueron menores a menores altitudes. Estos resultados vinculados con la menor diversidad genética a mayor altura (Premoli 2003) podrían implicar que las poblaciones ubicadas en el extremo superior del gradiente altitudinal se encuentren bajo elevadas presiones de selección durante el verano. Los factores estresantes estarían vinculados a elevadas temperaturas, bajas precipitaciones, y una mayor cantidad de horas de exposición solar (este último factor podría relacionarse a una mayor pérdida de agua por evapotranspiración). Estas diferencias microclimáticas con la altitud resultan además en marcadas diferencias en caracteres adaptativos como la fenología, el crecimiento y caracteres ecofisiológicos que varían significativamente y con base genética en altitudes contrastantes (Premoli et al., 2007, Premoli y Brewer 2007). Así, la mayor diversidad genética encontrada bajo mayores temperaturas se correlaciona con mayor crecimiento a menores alturas (Premoli et al., 2007). Sin embargo, el acervo genético de las poblaciones no solamente reflejará los efectos directos del clima, sino también indirectos que impactan sobre la demografía de las poblaciones y se ven reflejados en su estructura genética. Así ocurre por ejemplo, en rodales de *N. pumilio* de baja a mediana altitud donde la predominante regeneración por semillas resulta en una estructura demográfica que consiste en el agrupamiento espacial de individuos con genotipos emparentados y una mayor diversidad genética (Mathiasen y Premoli, 2013). En cambio, en el límite altitudinal superior, predomina la

propagación vegetativa con una esporádica reproducción sexual, produciendo una mayor homogeneidad genética.

Información de base genética puede hacer un valioso aporte para comprender respuestas futuras y los gradientes altitudinales han sido objeto de modelos bajo cambios en el clima. En particular, bajo cambio global se predicen migraciones altitudinales de las especies hacia mayores alturas (Parmesan y Yohe, 2003). Experimentos de trasplantes recíprocos de *N. pumilio* sugieren que las poblaciones genéticamente diversas de menores altitudes tendrán más capacidad de respuesta que las que se encuentran hacia el límite altitudinal superior del bosque, las que a su vez serían propensas de sufrir decaimiento local (Mathiasen y Premoli, 2016). Esto resultaría en ascensos altitudinales de las poblaciones de menores altitudes.

En relación al gradiente longitudinal, las variables bioclimáticas más significativas se relacionan con una mayor precipitación y menor estacionalidad en la temperatura hacia mayores longitudes (hacia el oeste), sugiriendo que hacia el extremo oriental de la distribución de *N. pumilio* (ecotono entre el bosque australandino y la estepa) las condiciones climáticas resultan menos óptimas para la supervivencia de la especie en comparación a las condiciones hacia la cordillera de los Andes. Por lo cual las poblaciones de *N. pumilio* en los extremos más xéricos se encuentran bajo intensas presiones de selección. En este capítulo encontramos una asociación significativa entre el número efectivo de alelos y el aumento de la precipitación del mes más seco con la longitud. Además, el análisis de poblaciones a lo largo del gradiente longitudinal mediante secuencias conservadas de ADN del cloroplasto mostró la presencia de variantes genéticas únicas en ambos extremos de precipitación que sugiere que *N. pumilio* habría sobrevivido a lo largo del tiempo tanto en la zona húmeda como la seca. En la zona seca se encontró además un haplotipo nuevo para el subgénero *Nothofagus*, lo que destaca el rol de las poblaciones marginales

como reservorio genético en el largo plazo (ver Capítulo II de esta tesis). Por otro lado, el cultivo en jardín común de *N. pumilio* de los extremos del gradiente de precipitación, si bien resultaron similares para caracteres cuantitativos (número de ramas, rasgos morfológicos foliares y densidad estomática), las respuestas ecofisiológicas a un experimento de déficit hídrico de plántulas provenientes del extremo húmedo mostraron menor eficiencia en el uso del agua que las del seco sugiriendo la existencia de diferencias genéticas entre orígenes (ver Capítulo IV de esta tesis). Esta evidencia indica que las poblaciones de *N. pumilio* que habitan el extremo seco han desarrollado adaptaciones diferenciales a las condiciones contrastantes de precipitación del gradiente longitudinal.

Los gradientes ambientales son el resultado de interacciones de variables climáticas que impactan en el seno de las poblaciones naturales. Las especies de amplias distribuciones mostrarán ajustes a dichas variaciones ambientales pudiendo responder de manera adaptativa (i.e. con base genética) a dichos gradientes o bien de manera plástica. Si bien se espera que la selección natural opere principalmente sobre caracteres poligénicos cuantitativos, se ha sugerido que medidas de diversidad genética pueden utilizarse como sustitutos de la aptitud (Reed y Frankham, 2003). En particular, los patrones encontrados para marcadores neutrales en este trabajo en el gradiente altitudinal se pueden correlacionar con las respuestas adaptativas medidas sobre *N. pumilio* provenientes de condiciones contrastantes de altitud. Por ejemplo, experimentos de jardines comunes reflejaron diferencias de base genética fenológicas, ecofisiológicas, arquitecturales de las plantas y morfología foliar que reflejan el abrupto gradiente climático altitudinal (Premoli et al., 2007; Premoli y Brewer, 2007).

En este capítulo se resalta la importancia de la puesta en valor de la diversidad genética en el seno de las poblaciones como prioritario, no

solamente para la persistencia a largo plazo de las especies, sino también para amortiguar los impactos negativos de los rápidos cambios ambientales que ocurren actualmente. Por ejemplo, se predice que el calentamiento global provocará aumento de estrés por sequía, el cuál se espera sea aún más marcado hacia los extremos de distribución de las especies (Jump et al., 2009). En relación con esto último, las especies forestales estarían en riesgo debido a sus ciclos de vida largos y madurez reproductiva tardía, lo cual puede impactar negativamente sobre la capacidad de desarrollar respuestas rápidas (Jump et al., 2008). Resulta entonces primordial la protección y manejo ecológico de los hábitats hacia los extremos de distribución de las especies, reduciendo por ejemplo otras presiones extrínsecas de origen antrópico (Moritz et al., 2012), con el objetivo de conservar la diversidad existente (Kapeller et al., 2016).

III.7 Conclusiones

Las especies de amplia distribución que habitan gradientes ambientales presentan variación en una gran cantidad de caracteres, muchos de los cuales poseen base genética. Los resultados de este capítulo muestran que la mayor diversidad genética se relaciona con mayores precipitaciones y temperaturas. Por lo tanto, poblaciones de *N. pumilio* con otra combinación de variables climáticas se encuentran bajo cierto grado de estrés abiótico y reducida diversidad genética. Sería interesante poder evaluar las poblaciones a lo largo de gradientes ambientales mediante marcadores moleculares adaptativos para analizar no solo los efectos de fuerzas neutrales como la deriva y el aislamiento, sino también los efectos de la selección natural principalmente bajo escenarios cambiantes.

III.8 Tablas y Figuras

Tabla III.1 Características geográficas y diversidad genética de las 27 poblaciones analizadas de *Nothofagus pumilio* en el gradiente latitudinal. Ae, número de alelos efectivo; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada y He, heterocigosis esperada. * Datos extraídos de Mathiasen y Premoli (2010).

Población*	ID	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
Lag. Epulauquen	EPU	-36,86	-71,07	1663	1,12	1,13	0,058	0,063
Po. Icalma	ICA	-38,80	-71,27	1330	1,04	1,06	0,026	0,033
Vn Batea Mahuida.	BMH	-38,84	-71,23	1500	1,06	1,09	0,020	0,046
L. Moquehue	MIR	-39,00	-71,38	1275	1,05	1,08	0,028	0,041
L. Rucachoroi	RCH	-39,24	-71,21	1380	1,08	1,12	0,027	0,065
Po. Tromen	TRO	-39,59	-71,43	1125	1,05	1,08	0,039	0,043
Co. Chapelco	CHP	-40,20	-71,31	1375	1,08	1,13	0,055	0,066
Po. Cordoba	CBA	-40,59	-71,16	1360	1,05	1,08	0,036	0,042
Co. Challhuaco	CHA	-41,25	-71,28	1325	1,02	1,04	0,021	0,020
Co. Perito Moreno	PMO	-41,79	-71,56	990	1,05	1,09	0,033	0,046
Co. Piltriquitron	PQN	-41,97	-71,48	1250	1,02	1,03	0,008	0,016
Co. La Hoya	LHY	-42,84	-71,26	1275	1,18	1,21	0,067	0,108
L. Vintter	VIN	-43,97	-71,52	950	1,05	1,07	0,034	0,036
El Portezuelo	PTZ	-46,07	-71,69	1001	1,22	1,22	0,096	0,122
A. Canalele	CAN	-46,93	-71,86	1087	1,25	1,23	0,067	0,130
Mte. San Lorenzo	SLZ	-47,75	-72,35	1100	1,01	1,01	0,005	0,005
Co. Leones	LEO	-47,79	-72,12	890	1,09	1,09	0,034	0,052
L. Azara	AZA	-47,84	-72,27	900	1,07	1,09	0,046	0,049
Riviera	RIV	-47,94	-72,37	850	1,01	1,02	0,010	0,010
L. Burmeister	BUR	-47,95	-72,12	910	1,20	1,26	0,059	0,136
L. del Desierto	DES	-49,08	-72,89	457	1,38	1,41	0,095	0,221
Chaltén Seco	CTS	-49,21	-72,95	454	1,46	1,39	0,105	0,204
El Chaltén	CTN	-49,27	-72,95	687	1,34	1,38	0,122	0,200
L. Onelli	ONI	-50,11	-73,30	196	1,31	1,34	0,116	0,190
L. Grey	GRE	-51,59	-72,60	118	1,20	1,21	0,120	0,105
Mte. Alto	MAL	-52,08	-71,86	292	1,22	1,26	0,088	0,126
Pta. Arenas	ARE	-53,29	-71,05	162	1,10	1,15	0,060	0,078

Tabla III.2 Características geográficas y diversidad genética de las 42 poblaciones analizadas de *Nothofagus pumilio* en el gradiente longitudinal. Ae, número de alelos efectivo; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada y He, heterocigosis esperada. * Datos extraídos de Mathiasen y Premoli (2010).

Población	ID	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
Po. Córdoba*	CBA	-40,60	-71,15	1237	1,06	1,24	0,05	0,06
Co. La Mona	MON	-40,58	-71,70	1081	1,39	1,48	0,18	0,17
Cuyin Manzano 6	6CUY	-40,82	-71,19	1529	1,41	1,89	0,17	0,25
Cuyin Manzano 5	5CUY	-40,84	-71,20	1576	1,35	1,58	0,11	0,19
Cuyin Manzano 4	4CUY	-40,86	-71,19	1739	1,81	2,25	0,3	0,43
Cuyin Manzano 3	3CUY	-40,91	-71,22	1717	1,53	1,82	0,18	0,31
Cuyin Manzano 2	2CUY	-40,93	-71,27	1757	1,55	1,95	0,19	0,30
Cuyin Manzano 1	1CUY	-40,94	-71,34	1208	1,93	2,28	0,29	0,42
Ea. Altos del Fortín	FOR	-40,97	-71,22	1155	1,6	1,77	0,39	0,32
L. Ortiz Basualdo	BAS	-40,98	-71,85	1131	1,63	2,17	0,38	0,37
Lag. Los Clavos	CLA	-41,05	-71,83	1230	1,38	1,92	0,19	0,27
Po. de las nubes	PDN	-41,08	-71,78	1555	1,83	2,15	0,29	0,41
Co. López*	LOP	-41,09	-71,55	1213	1,22	1,56	0,08	0,15
Lag. Negra	LN	-41,14	-71,57	1184	1,59	1,88	0,23	0,31
Co. Otto*	OTO	-41,15	-71,37	1102	1,04	1,17	0,03	0,04
A. del medio	AM	-41,21	-71,21	1100	1,8	2,23	0,35	0,41
Jesus	JES	-41,23	-71,25	1003	1,34	1,80	0,14	0,23
Co. Challhuaco*	CHA	-41,25	-71,28	1325	1,03	1,13	0,03	0,03
Ñirihuau Arriba	NIR	-41,29	-71,25	1118	1,59	1,87	0,36	0,34
Ea. Buitrera	BUI	-41,30	-71,13	1299	1,81	2,31	0,36	0,39

Tabla III.2 (continuación)

Población	ID	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
V. Llodconto	LLO	-41,39	-71,59	1397	1,32	1,64	0,19	0,19
A. Chenquenillén	CHE	-41,50	-71,08	1390	1,4	1,87	0,28	0,26
Baguales	BAG	-41,50	-71,34	1371	1,91	2,33	0,24	0,44
Lengas de Oro	LDO	-41,67	-71,11	1224	1,08	1,25	0,05	0,06
A. las Minas	ALM	-41,74	-71,16	1242	1,33	1,73	0,16	0,23
Las Huaytekas	HUA	-41,76	-71,41	1349	1,67	1,92	0,22	0,38
Co. Perito Moreno*	PMO	-41,80	-71,57	990	1,07	1,25	0,04	0,06
Ref. Natación	NAT	-41,88	-71,58	1183	1,51	1,70	0,22	0,25
Ea. Mallín Kume	MAK	-41,90	-71,21	1058	1,45	1,89	0,21	0,28
Pob. Soto	SOT	-41,93	-71,37	940	1,76	1,99	0,21	0,43
Co. Piltriquitron*	PQN	-41,97	-71,48	1250	1,01	1,05	0,01	0,01
Ref. Motoco	MOT	-41,98	-71,71	813	1,44	1,70	0,2	0,27
Cñd. del zorro	CDZ	-42,41	-71,13	1081	1,7	2,27	0,27	0,41
Cholila	CHO	-42,42	-71,62	1200	1,95	2,40	0,24	0,44
Co. La Momia	MOM	-42,58	-71,60	950	2,36	2,64	0,23	0,52
Pob. Neira	NEI	-42,65	-71,57	1177	1,46	1,79	0,26	0,24
Lag. Escondida	ESC	-42,76	-71,74	913	1,75	2,03	0,23	0,39
Co. La Hoya*	LHY	-42,83	-71,27	1275	1,25	1,49	0,09	0,14
Alto del Rio Percey	PER	-42,84	-71,45	1049	1,4	1,54	0,23	0,22
A. Cascada	CAS	-42,91	-71,64	1061	1,69	2,06	0,17	0,37
Co. Cocinero	COC	-42,95	-71,62	1093	1,86	2,49	0,27	0,46
Co. Nahuel Pan	NAP	-43,01	-71,20	943	1,41	1,92	0,2	0,28

Tabla III.3 Características geográficas y diversidad genética de *Nothofagus pumilio* en los cuatro cerros analizados en el gradiente altitudinal. Ae, número de alelos efectivo; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada y He, heterocigosis esperada. * Datos extraídos de Premoli (2003).

Población*	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
Co. Challhuaco	-41,27	-71,30	1630	1,01	1,03	0,01	0,01
	-41,26	-71,30	1470	1,04	1,10	0,01	0,03
	-41,26	-71,28	1250	1,01	1,05	0,01	0,01
	-41,25	-71,28	1110	1,01	1,06	0,01	0,01
Co. López	-41,10	-71,56	1478	1,03	1,10	0,02	0,03
	-41,10	-71,56	1386	1,03	1,07	0,002	0,02
	-41,10	-71,55	1256	1,04	1,15	0,03	0,04
	-41,09	-71,55	1143	1,04	1,12	0,01	0,03
Co. Otto	-41,15	-71,39	1427	1,00	1,00	0,00	0,00
	-41,15	-71,38	1373	1,04	1,15	0,02	0,04
	-41,15	-71,36	1210	1,05	1,17	0,01	0,04
	-41,15	-71,34	1102	1,05	1,19	0,03	0,05
Vn. Martial	-54,79	-68,39	670	1,06	1,19	0,02	0,05
	-54,80	-68,37	385	1,05	1,18	0,04	0,04

Tabla III.4 Variables bioclimáticas extraídas de la base de datos de Worldclim.

ID	Variable bioclimática	Descripción	Unidades
BIO1	Temperatura media anual	Promedio de las temperaturas medias registradas en cada mes	°C
BIO2	Rango diurno promedio	Promedio de los valores mensuales de (Tmax-Tmin)	°C
BIO3	Isotermalidad	(BIO2/BIO7)*100	°C
BIO4	Estacionalidad de la temperatura	Desviación estándar *100	%
BIO5	Temperatura máxima del mes más cálido		°C
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío		°C
BIO7	Rango anual de la temperatura	(BIO5-BIO6)	°C
BIO8	Temperatura media del cuarto más húmedo	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más húmedos del año	°C
BIO9	Temperatura media del cuatrimestre más seco	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más secos del año	°C
BIO10	Temperatura media del cuatrimestre más cálido	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más cálidos del año	°C
BIO11	Temperatura media del cuatrimestre más frío	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más fríos del año	°C
BIO12	Precipitación anual		Mm
BIO13	Precipitación del mes más húmedo		Mm
BIO14	Precipitación del mes más seco		Mm
BIO15	Estacionalidad de la precipitación	Coefficiente de variación	%
BIO16	Precipitación del cuatrimestre más húmedo	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más húmedos del año	Mm
BIO17	Precipitación del cuatrimestre más seco	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más secos del año	Mm
BIO18	Precipitación del cuatrimestre más cálido	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más cálidos del año	Mm
BIO19	Precipitación del cuatrimestre más frío del año	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más fríos del año	Mm

Tabla III.5 Regresiones simples entre las 19 variables bioclimáticas y la latitud.

Variable dependiente	R ²	F(1;25)	P	β
BIO1	0,24	7,91	0,009	-0,49
BIO2	0,92	272,13	0,000	-0,96
BIO3	0,80	101,51	0,000	-0,90
BIO4	0,54	28,85	0,000	-0,73
BIO5	0,79	95,53	0,000	-0,89
BIO6	0,02	0,48	0,495	-0,14
BIO7	0,92	295,55	0,000	-0,96
BIO8	0,34	12,89	0,001	0,58
BIO9	0,75	74,83	0,000	-0,87
BIO10	0,52	27,12	0,000	-0,72
BIO11	0,10	2,67	0,115	-0,31
BIO12	0,33	12,36	0,002	-0,58
BIO13	0,71	61,89	0,000	-0,84
BIO14	0,22	7,22	0,013	0,47
BIO15	0,96	574,79	0,000	-0,98
BIO16	0,68	53,09	0,000	-0,82
BIO17	0,14	4,17	0,052	0,38
BIO18	0,20	6,32	0,019	0,45
BIO19	0,74	70,59	0,000	-0,86

Tabla III.6 Regresiones simples entre las 19 variables bioclimáticas y la longitud.

Variable dependiente	R ²	F(1;40)	P	β
BIO1	0,04	1,55	0,221	0,19
BIO2	0,66	78,29	<0,001	-0,81
BIO3	0,05	2,07	0,158	0,22
BIO4	0,79	154,17	<0,001	-0,89
BIO5	0,02	0,78	0,384	-0,14
BIO6	0,17	8,00	0,007	0,41
BIO7	0,73	109,29	<0,001	-0,86
BIO8	0,09	3,85	0,057	0,30
BIO9	0,01	0,44	0,509	0,10
BIO10	0,00	0,03	0,873	0,03
BIO11	0,13	6,13	0,018	0,36
BIO12	0,80	157,85	<0,001	0,89
BIO13	0,64	72,53	<0,001	0,80
BIO14	0,90	342,37	<0,001	0,95
BIO15	0,64	72,30	<0,001	-0,80
BIO16	0,73	106,29	<0,001	0,85
BIO17	0,92	433,84	<0,001	0,96
BIO18	0,92	465,11	<0,001	0,96
BIO19	0,70	95,04	<0,001	0,84

Tabla III.7 Regresiones simples entre las 19 variables bioclimáticas y la altitud.

Variable dependiente	R ²	F(1,12)	P	β
BIO1	0,20	2,91	0,114	0,44
BIO2	0,79	44,31	<0,001	0,89
BIO3	0,002	0,02	0,886	-0,04
BIO4	0,71	29,09	<0,001	0,84
BIO5	0,54	14,25	0,003	0,74
BIO6	0,17	2,39	0,148	-0,41
BIO7	0,72	31,30	<0,001	0,85
BIO8	0,91	116,66	<0,001	-0,95
BIO9	0,51	12,65	0,004	0,72
BIO10	0,40	7,86	0,016	0,63
BIO11	0,003	0,04	0,846	0,06
BIO12	0,25	3,96	0,070	0,50
BIO13	0,50	11,99	0,005	0,71
BIO14	0,70	28,16	<0,001	-0,84
BIO15	0,73	32,85	<0,001	0,86
BIO16	0,54	13,87	0,003	0,73
BIO17	0,42	8,83	0,012	-0,65
BIO18	0,64	21,30	<0,001	-0,80
BIO19	0,57	15,63	0,002	0,75

Tabla III.8 Regresiones simples entre las variables de diversidad genética y la latitud, la longitud y la altitud en cada gradiente.

Variable dependiente	R ²	F	GI	P	Variable predictora	β
<i>Gradiente latitudinal</i>						
Ae	0,30	10,68	1;25	0,003	Latitudinal	0,55
Ar	0,29	10,39	1;25	0,004	Latitudinal	0,54
Ho	0,33	12,56	1;25	0,002	Latitudinal	0,58
He	0,29	10,28	1;25	0,004	Latitudinal	0,54
<i>Gradiente longitudinal</i>						
Ae	0,04	1,53	1;40	0,224	Longitud	0,19
Ar	0,01	0,59	1;40	0,447	Longitud	0,12
Ho	0,00	0,17	1;40	0,681	Longitud	0,07
He	0,02	0,97	1;40	0,332	Longitud	0,15
<i>Gradiente altitudinal</i>						
Ae	0,31	5,36	1;12	0,039	Altitud	-0,56
Ar	0,38	7,37	1;12	0,019	Altitud	-0,62
Ho	0,63	7,96	1;12	0,015	Altitud	-0,63
He	0,32	5,70	1;12	0,034	Altitud	-0,57

Tabla III.9 Resumen de las regresiones múltiples entre las variables de diversidad genética y las 19 variables bioclimáticas para *N. pumilio* en los diferentes gradientes ambientales. A_e , número efectivo de alelos; A_r , riqueza alélica; H_o , heterocigosis observada; H_E , heterocigosis esperada. Las referencias de las variables bioclimáticas se encuentran en la Tabla III.4.

	Variable dependiente	R^2	F	Df	P	Variables predictoras	B
Gradiente latitudinal	A_e	0,80	13,52	6;20	<0,001	BIO14	2,56
						BIO17	-7,34
						BIO18	5,45
						BIO8	-0,61
						BIO9	0,83
						BIO15	-0,76
	A_r	0,78	9,44	7;19	0,029	BIO17	-6,89
						BIO18	5,02
						BIO8	-0,82
	H_o	0,79	12,47	6;20	0,033	BIO18	6,84
						BIO17	-8,57
						BIO8	-0,33
BIO14						2,49	
H_E	0,77	9,05	7;19	0,029	BIO9	0,67	
					BIO17	-6,59	
					BIO18	4,74	
						BIO8	-0,82
Gradiente longitudinal	A_e	0,32	3,46	5;36	0,050	BIO14	2,80
						BIO18	-4,36
						BIO9	-0,73
						BIO16	7,96
Gradiente altitudinal	A_e	0,38	7,31	1;12	0,019	BIO14	0,62
	A_r	0,39	7,56	1;12	0,018	BIO8	0,62
	H_o	0,47	4,87	2;11	0,050	BIO8	0,76
	H_E	0,35	6,41	1;12	0,026	BIO14	0,59

Figura III.1 Relación entre los parámetros de diversidad genética y los diferentes gradientes ambientales de *N. pumilio*. Ae, número efectivo de alelos; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada; He, heterocigosis esperada.

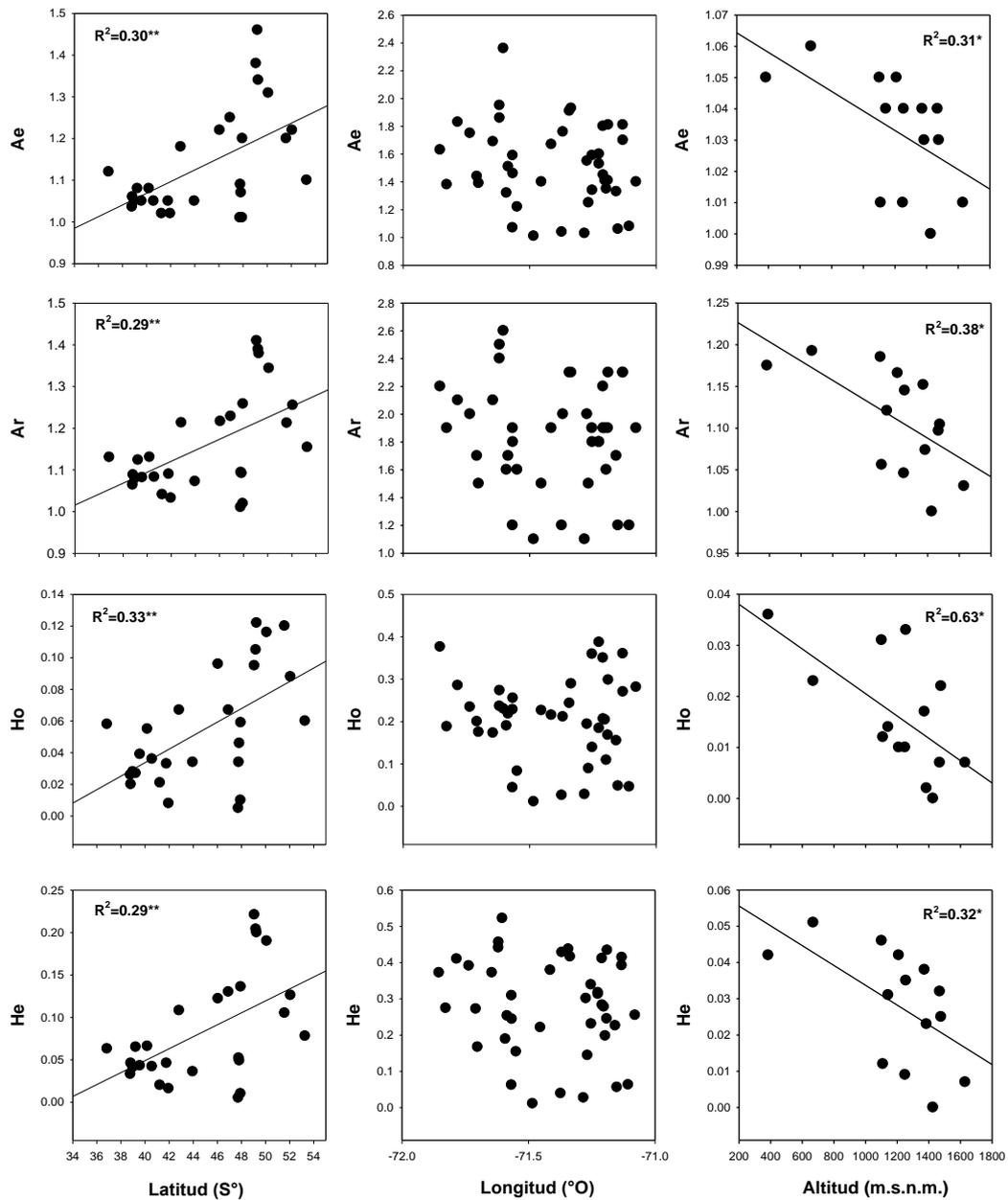
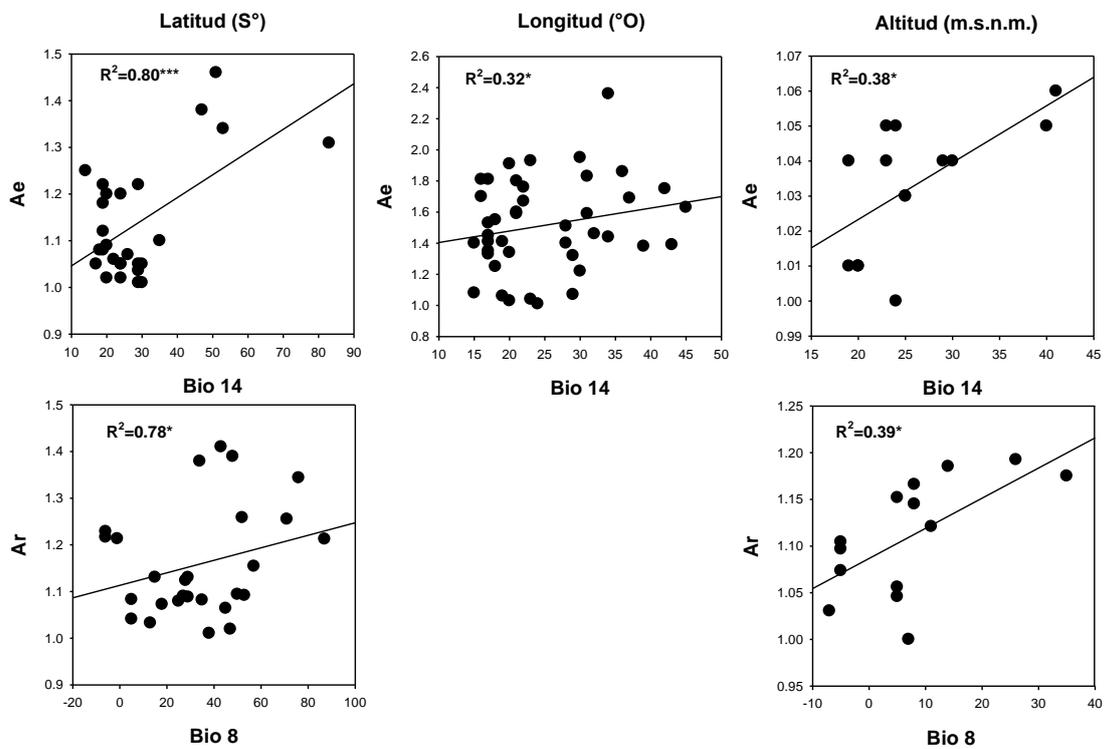


Figura III.2 Relación entre el número efectivo de alelos (Ae) y la riqueza alélica (Ar) y las variables bioclimáticas Bio 14 (mm) y Bio 8 (°C) que arrojaron resultados significativos en las regresiones múltiples para los distintos gradientes. Las unidades de la variable Bio 8 se encuentran multiplicadas por 10.



Capítulo IV Características ecofisiológicas de plántulas de poblaciones centrales y marginales de *Nothofagus pumilio* en jardín común y respuestas al déficit hídrico



IV.1 Introducción

Conocer el funcionamiento de las plantas en sus ambientes naturales y los patrones que determinan su distribución, supervivencia y crecimiento, es uno de los principales objetivos de la ecofisiología (Kramer y Boyer 1995; Lambers 1998; Ackerly et al., 2002). Hacia los centros de su distribución las especies por lo general se encuentran bajo condiciones ecológicas óptimas para su desarrollo, y hacia las márgenes las condiciones se vuelven limitantes (Lesica y Allendorf, 1995) generando intensas presiones de selección. Como resultado, estas poblaciones pueden presentar adaptaciones locales cruciales para la supervivencia de las especies frente al cambio climático global (Sabatier et al., 2011; Kreyling et al., 2014). Por lo tanto, el estudio de las variaciones fenotípicas a lo largo de gradientes ambientales y/o condiciones extremas y su posible base genética es sumamente relevante.

El aumento de las temperaturas medias de verano predichas para el norte de la Patagonia, podrían producir cambios en los balances hídricos y la intensidad de las sequías (IPCC, 2014). Bajo este escenario, es prioritario analizar las potenciales respuestas de especies clave para los ecosistemas boscosos; particularmente de especies con capacidad de dispersión limitada, ya que podrían ver restringida la posibilidad de modificar sus rangos de distribución frente a los cambios ambientales. Estos cambios pueden ser más pronunciados hacia los extremos de distribución de las especies donde habitan las poblaciones marginales (Premoli y Mathiasen, 2011). Además, sumado al cambio climático global, la influencia de la Cordillera de los Andes crea un pronunciado gradiente de precipitación de oeste a este debido a un efecto sombra de lluvia (Veblen et al., 1996; Daniels y Veblen, 2004). Las precipitaciones medias anuales disminuyen de 3000 mm a menos de 800 mm en una distancia de solo 50 km desde la cordillera hacia el este (Veblen et al., 1996). Por otra parte, las precipitaciones en Patagonia se concentran principalmente en invierno, lo que determina junto a las bajas temperaturas invernales, que la época húmeda y la temporada de crecimiento de las plantas no coincidan (Paruelo et al., 1998).

Cuando la disponibilidad de agua es escasa, las plantas exhiben estrés hídrico y se ve limitado su funcionamiento óptimo. El estrés hídrico de las plantas puede resultar de un déficit hídrico del suelo (edáfico), una demanda evaporativa atmosférica muy elevada o ambos factores. Frente a esto, las plantas han desarrollado un amplio espectro de estrategias de resistencia (Valladares et al., 2004) que pueden ser respuestas plásticas o genéticamente determinadas. Las estrategias para lidiar con ambientes secos incluyen: ajustes elásticos y osmóticos (activos y/o pasivos, e.g Mitchell et al., 2008; Scholz et al., 2012) cambios hidráulicos (i.e. disminución de la vulnerabilidad a la cavitación del xilema, diámetros menores de los vasos, (e.g., Nardini et al., 2012; Bucci et al., 2013; Blackman et al., 2014), mayor control estomático para limitar la pérdida de agua y evitar fallas hidráulicas (Bucci et al., 2008; Martin-StPaul et al., 2017; Flexas et al., 2018), así como un aumento en la eficiencia del uso de recursos y cambios en los patrones de asignación de carbono.

Estudios previos encontraron diferentes estrategias de resistencia a la sequía relacionadas a hábitats que difieren en sus regímenes de precipitación anual, tanto en especies estrechamente relacionadas (Ambrose et al., 2015) como dentro de una misma especie (Nguyen et al., 2017). En el género *Nothofagus* un estudio reciente sugiere que seis especies que habitan diferentes condiciones climáticas, presentan adaptaciones para mantener potenciales hídricos relativamente altos frente a una baja disponibilidad de agua (Bucci et al., 2012). En particular se ha encontrado que la especie *Nothofagus pumilio* presenta una respuesta de evitación de la sequía ante el estrés hídrico (Peri et al., 2009).

Es ampliamente aceptado que la regulación estomática es uno de los factores más importantes que puede contribuir al proceso de resistencia a la sequía (Tardieu y Simonneau, 1998; McDowell et al., 2008; Skelton et al., 2015; Nguyen et al., 2017). Según el grado de regulación estomática del potencial hídrico, las plantas pueden clasificarse en isohídricas o anisohídricas (Tardieu y Simonneau, 1998), aunque existen estudios que sugieren que no existe una dicotomía, sino un continuo entre ambos comportamientos (Klein, 2014).

La característica principal del comportamiento isohídrico es su capacidad de cierre estomático cuando se sensa una caída del potencial hídrico del suelo o un aumento de la demanda atmosférica. Es decir, que poseen un fuerte control estomático para mantener relativamente constante su potencial hídrico foliar bajo diferentes condiciones ambientales, evitando así pérdidas de conductividad hidráulica (Sperry et al., 2002) o de turgencia celular (Cochard et al., 2002). Sin embargo, como resultado del cierre estomático, la asimilación de carbono y la acumulación de compuestos del metabolismo primario podrían ser limitadas. En cambio en el comportamiento anisohídrico, el control estomático es débil y las plantas siguen transpirando incluso cuando el contenido de agua del suelo disminuye o existe un elevado déficit de presión de vapor, corriendo el riesgo de que el potencial de agua disminuya más allá de los umbrales de seguridad hidráulica y el punto de pérdida de turgor (Bucci et al., 2013). Ante un nivel de estrés elevado o prolongado, el comportamiento anisohídrico no puede ser mantenido, llegando a un límite a partir del cual la planta debe adoptar mecanismos de tipo isohídrico (Schultz, 2003; Maseda y Fernández, 2006). La apertura y cierre de los estomas es probablemente la actividad más importante de regulación de la pérdida de agua que ejercen las plantas, y siempre que los estomas permanezcan abiertos para incorporar dióxido de carbono, también dejarán que se escape el agua. Por lo tanto existe un compromiso entre el riesgo de una pérdida excesiva de agua y la fotosíntesis, una reducción de la fotosíntesis puede implicar un menor crecimiento para la planta, es decir que la transpiración puede tener efectos favorables y desfavorables.

El potencial hídrico es utilizado como indicador para conocer el estado hídrico en las plantas y su valor depende del balance de sus componentes, a saber: potencial osmótico (Ψ_o), potencial de presión o turgencia (Ψ_p), potencial mátrico (Ψ_m) y potencial gravitacional (Ψ_g). El valor de referencia es el agua pura, que en condiciones estándar a una presión atmosférica (1 atm = 0,1 MPa), y a la misma temperatura se considera $\Psi=0$ (Slatyer y Taylor, 1960). El potencial osmótico está dado por la presencia de solutos que disminuyen la capacidad del agua de realizar trabajo (disminuye la energía libre del agua), por esta razón su valor siempre es negativo. El potencial de presión está

relacionado con la resistencia que opone la pared celular al incremento del volumen celular siendo siempre mayor que cero. El potencial gravitacional es la tendencia del agua a moverse hacia abajo debido a la gravedad, un incremento de 10m de altura aumenta el potencial 0,1MPa (Taiz y Zeiger, 2003). El potencial mátrico se debe a la adsorción por capilaridad del agua a matrices sólidas o coloidales y disminuye el potencial hídrico. Los componentes del potencial hídrico tienen un efecto aditivo siendo el potencial hídrico total su suma algebraica (ec. 4.1).

$$\Psi_{H_2O} = \Psi_o + \Psi_m + \Psi_g + \Psi_p \quad (\text{ec. 4.1})$$

En las hojas el potencial mátrico es de bajo valor, por lo cual se asume despreciable (Fernández y Gyenge 2005) y generalmente se omite también el componente gravitatorio, ya que es insignificante en comparación con el potencial osmótico y el potencial de presión (Taiz y Zeiger, 2003).

La cantidad de agua que un suelo es capaz de retener en equilibrio con la gravedad se denomina capacidad de campo. Cuando el agua del suelo disminuye, su extracción es cada vez más difícil debido a la disminución del gradiente de potencial y al potencial mátrico del suelo. Si el agua sigue disminuyendo se alcanza el punto de marchitez permanente, a partir del cual las plantas ya no pueden absorber agua del suelo.

Las poblaciones de *N. pumilio* que habitan el ecotono entre el bosque australandino y la estepa se encuentran en el extremo más seco del rango de distribución de la especie, pudiendo estar bajo condiciones de estrés hídrico durante los veranos, periodo que coincide con su temporada de crecimiento. Aunque la variación latitudinal y altitudinal para los caracteres adaptativos y neutrales ya ha sido estudiada para *N. pumilio* (Premoli, 1998, Barrera et al., 2000; Cuevas, 2000; Mathiasen y Premoli, 2010; Fajardo y Piper, 2011), la variación longitudinal y la respuesta potencial al estrés hídrico es desconocido. Varios estudios sugieren que las respuestas de las plántulas de *N. pumilio* a gradientes ambientales parece estar modulada por el clima local y la variación intraespecífica en caracteres funcionales (Barrera et al., 2000; Premoli y Brewer, 2007; Fajardo y Piper, 2011; Piper et al., 2013), algunos de los cuales tienen base genética (Premoli et al., 2007) y por lo tanto son adaptativos

(Mathiasen y Premoli, 2016). A su vez, plántulas de *N. pumilio* provenientes de elevaciones contrastantes cultivadas bajo condiciones homogéneas de riego, también mostraron ajustes plásticos en el uso de agua, que podrían ser ventajosos en regímenes climáticos de tipo mediterráneo con sequías de verano (Premoli y Brewer, 2007).

Las poblaciones marginales son cruciales para comprender cómo responderán las especies a los entornos cambiantes (Kreyling et al., 2014). En el contexto del cambio climático, estas poblaciones pueden considerarse experimentos naturales, dado que pueden desempeñar un papel importante adecuándose localmente mediante una adaptación rápida, o bien rastreando su nicho óptimo mediante la migración a medida que cambian las condiciones ambientales. Específicamente el estudio de las poblaciones ubicadas en los extremos de los gradientes de precipitación tiene entonces gran importancia para comprender cómo las especies podrían responder a las condiciones de sequías más frecuentes y extremas pronosticadas para el norte de la Patagonia (CONAMA 2006). Se ha sugerido que los bosques en contacto con la estepa patagónica han presentado una tendencia negativa de crecimiento durante el siglo XX en respuesta a una intensificación del déficit hídrico (Srur et al., 2008). Otros estudios han encontrado una disminución en grandes áreas del bosque de *Nothofagus pumilio* (Rodríguez-Catón et al., 2016) y señales de mortalidad parcial de copa (Rodríguez-Catón et al., 2015) en relación a sequías severas, siendo estos efectos más pronunciados cerca del límite oriental de su distribución. Los experimentos de genética ecológica permiten separar el componente genético del ambiental siendo útiles para analizar plantas de distintas procedencias y la influencia de un determinado factor ambiental como el estrés hídrico.

IV.2 Objetivo particular

El objetivo de este capítulo es comparar los caracteres ecofisiológicos de plántulas de *Nothofagus pumilio* provenientes de poblaciones bajo regímenes de precipitación contrastantes (poblaciones centrales y marginales) en jardín común, y analizar respuestas al déficit hídrico, para diferenciar la existencia de bases genéticas de efectos ambientales.

IV.3 Hipótesis particular

Las hipótesis y predicciones planteadas en este capítulo fueron las siguientes

- ❖ **Hipótesis IV.1** El déficit hídrico en hábitats marginales genera presiones de selección sobre caracteres ecofuncionales.
 - **Predicción IV.1.1** las plántulas de procedencia marginal creciendo bajo condiciones de déficit hídrico presentarán mayor eficiencia en el uso de agua respecto a las plántulas centrales.
 - **Predicción IV.1.2** las plántulas de procedencia marginal creciendo bajo condiciones de déficit hídrico alcanzarán valores más negativos de potencial hídrico foliar con respecto a las plántulas centrales.

IV.4 Materiales y métodos

El presente estudio consistió en dos experimentos (un experimento de jardín común y un experimento manipulativo de déficit hídrico) sobre plántulas de *Nothofagus pumilio* provenientes de los extremos del gradiente de precipitación que ocurre a los 41°S en el norte de Patagonia. Esta área se encuentra bajo un clima de tipo mediterráneo, caracterizado por veranos secos y precipitaciones impredecibles durante la temporada de crecimiento. Las poblaciones de *N. pumilio* se encuentran principalmente entre 800 y 1800 mm de precipitación media anual.

Sitios de procedencia y colección de plántulas

Se trabajó con plántulas procedentes de tres poblaciones marginales y tres poblaciones centrales (Tabla IV.1 y Fig. IV.1). En cada sitio se colectaron plántulas germinadas bajo condiciones naturales durante la primavera austral (octubre – diciembre) de los años 2012 y 2013. Para minimizar una posible influencia de la altitud, todas las plántulas fueron colectadas sobre el límite inferior del bosque de *N. pumilio* (entre los 1000 y 1200 m s. n. m.).

La clasificación de las poblaciones en marginales o centrales se realizó utilizando un criterio basado en la precipitación media anual de cada sitio que fue estimada a partir de worldclim v.1, con una resolución espacial de 30 seg. (Hijmans et al., 2005; <http://www.worldclim.org>). Las poblaciones que reciben menos de 850 mm de precipitación media anual fueron clasificadas como marginales y las que reciben más, como poblaciones centrales (Fig. IV.1). Las precipitaciones medias anuales encontradas en las poblaciones central y marginal estudiadas fueron de 1102 y 781,3 mm, respectivamente.

Para evitar la existencia de estrés debido al trasplante, las plántulas fueron colectadas cuidadosamente reteniendo parte de su suelo original. Una vez en el invernadero, las raíces fueron lavadas y las plántulas se trasplantaron a macetas plásticas de 0,5 L con una mezcla de turba y suelo de bosque nativo (Premoli y Brewer, 2007). Se utilizó el mismo tipo de suelo en todas las macetas con el objetivo de homogeneizar el contenido de nutrientes del suelo.

Experimento de jardín común

Durante tres años, las plántulas fueron cultivadas en un invernadero localizado en el Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente INIBIOMA, de Bariloche bajo condiciones típicas del sotobosque de bosques de *N. pumilio* (PAR $\sim 700 \mu\text{molm}^{-2} \text{s}^{-1}$ al mediodía) (Fig. IV.2). Con el fin de minimizar efectos micro-ambientales, las plántulas fueron distribuidas en forma aleatoria y se rotaron regularmente, procurando que factores como luz y disponibilidad de agua fuesen similares para todas. A los dos años de permanencia en el

invernadero las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 1 L de capacidad (Fig. IV.3).

Mediciones del crecimiento y mortalidad

Cada año se registró el porcentaje acumulado de mortalidad como plantas vivas (1) o muertas (0) y el porcentaje acumulado de muerte parcial como plantas con (1) o sin (0) presencia de muerte parcial de su eje principal y/o ramas laterales.

En Octubre del 2015 y 2016 se midió la altura total (cm), diámetro a la altura del cuello (mm), número de ramas, y número total de hojas. La altura de cada individuo se midió con una cinta métrica desde el cuello del tallo principal hasta el extremo del eje principal extendido. El diámetro a la altura del cuello se midió con un calibre digital 723Z-6/150MM (Starrett, USA).

Mediciones de fenología foliar

Se observó el proceso de foliación desde la apertura de las yemas hasta la expansión foliar total siguiendo la clasificación de estadios fenológicos establecidos por Rusch (1993). El estadio de las plántulas fue registrado según la fenofase de yema y/u hoja más avanzada presente en cada individuo. Los estadios fueron: yemas en reposo, yemas hinchadas, hojas recién abiertas, y hojas completamente expandidas. Se registró el estadio fenológico de un total de 91 plántulas centrales y 158 marginales en tres fechas entre septiembre y octubre del 2014.

Densidad estomática y caracteres morfológicos foliares

Para evaluar la existencia de diferencias entre plántulas centrales y marginales en la densidad estomática y caracteres morfológicos foliares, se seleccionaron al azar 5 plántulas marginales y 5 centrales al final del experimento de jardín común. De cada plántula se colectaron 5 hojas de diferentes posiciones para obtener una muestra representativa de todo el individuo.

La densidad estomática se estimó a partir de improntas realizadas con esmalte de la superficie foliar abaxial (Brewer y Smith, 1997). En cada hoja se

contó el número de estomas de cinco campos a 400x de aumento con un microscopio óptico, los datos se corrigieron por área y los resultados se reportaron como número de estomas por mm^2 . Los parámetros medidos fueron longitud (L), ancho (A), área foliar (AF), perímetro (Per), redondez (R) y relación ancho-largo (A/L) de cada hoja con un escáner y el programa Digimizer v4.6.1 (MedCalc Software, Belgium). También se determinó el peso seco (PS) y el área foliar específica (AFE), calculada sobre un solo lado del área foliar por unidad de masa seca de las hojas, secando a $60\text{ }^\circ\text{C}$ hasta masa constante. El factor de redondez (R) está definido como $4\pi \times \text{área}/\text{perímetro}^2$, y es una medida adimensional de la redondez de un objeto (un círculo perfecto equivale a $R=1$)

Experimento manipulativo de déficit hídrico

A principios de noviembre del 2016 se dividieron 75 plántulas marginales y 28 centrales en dos grupos con regímenes de riego contrastantes: tratamiento control (C) y tratamiento de déficit hídrico (DH). La duración del experimento fue de 30 días y se decidió realizarlo a fines de la primavera para evitar temperaturas muy elevadas en el invernadero (Varela et al., 2010).

Para determinar la disponibilidad hídrica de los tratamientos, se obtuvieron los valores de capacidad de campo y punto de marchitez permanente a partir de una curva de retención hídrica del suelo realizada por el laboratorio de suelos del INTA EEA Bariloche (-0,03; -0,1; -0,15; -0,7 and -1,5 MPa). Los resultados de este método se expresan en unidades gravimétricas, por lo cual fueron convertidos a contenidos de humedad volumétricos multiplicándolos por la densidad aparente del suelo. La densidad aparente se estimó mediante el pesado de las macetas, el cálculo de su volumen y su nivel de humedad. El contenido de humedad volumétrico a lo largo del experimento fue monitoreado utilizando un sensor volumétrico de humedad EC-5 (Decagon devices).

Dado que el experimento fue realizado en macetas, también se calculó la capacidad de campo en macetas (pot capacity”, PC), que es una medida

análoga a la capacidad de campo siendo el contenido hídrico que entrega una distribución uniforme de agua dentro de una maceta. El PC, es por lo general, mayor a la capacidad de campo del mismo suelo medida en laboratorio por el método gravimétrico. Para su determinación se regaron hasta saturación tres macetas, se las cubrió con plástico para evitar evaporación y se dejaron drenar hasta registrar peso constante. El peso se estabilizó a las 96hs con un contenido volumétrico de $30,5 \pm 1,9$ % que se consideró el PC de las macetas. La diferencia entre la capacidad de campo y el punto de marchitez permanente se denomina agua útil o agua disponible, y el agua que permanece inaccesible para ser absorbida por las plantas se denomina residual o agua higroscópica.

El tratamiento control consistió en garantizar una buena disponibilidad hídrica a las plantas con un porcentaje de humedad volumétrico cercano al PC, evitando de esta manera que exista déficit hídrico. Para ello se mantuvo el porcentaje de humedad relativo entre 25 y 30% (Fig. IV.7B). Al finalizar el experimento se determinó que el potencial hídrico promedio del suelo durante el tratamiento control fue de -0,4 MPa (Fig. IV.7A). Esto se realizó tomando como referencia el potencial hídrico foliar de madrugada (potencial hídrico foliar máximo) ya que es considerado el mejor estimador del potencial hídrico del suelo en plantas que no transpiran de noche (Bucci et al., 2004).

El tratamiento de déficit hídrico consistió en mantener el porcentaje de humedad volumétrico del suelo en las macetas cercano al punto de marchitez permanente (13,8 %) con la intención de generar estrés hídrico en las plántulas, y que la disponibilidad de agua sea contrastante respecto al tratamiento control. Para ello se mantuvo el porcentaje de humedad relativo entre 10 y 15 % (Fig. IV.7B). Al finalizar el experimento se constató que el valor de potencial hídrico promedio del tratamiento fue de 1,1MPa (Fig. IV.7A).

Al comenzar el experimento todas las plántulas fueron regadas a saturación y se mantuvieron sin riego hasta alcanzar los porcentajes de humedad relativa determinados para cada tratamiento. Para mantener los niveles de humedad dentro de los rangos, se monitoreó diariamente el contenido volumétrico de agua en al menos 10 macetas con plantas de cada combinación de procedencia/tratamiento. La frecuencia y volumen de irrigación

para reponer el agua transpirada fue variable, siendo siempre mayor el volumen suministrado al tratamiento control y se realizó manualmente.

Tasa de crecimiento relativo

Con una cinta métrica se midió la altura en cm desde el cuello del tallo principal hasta el extremo de la rama más alta de cada individuo al inicio y al final del experimento de déficit hídrico. A partir de la altura se calculó la tasa de crecimiento relativo como $RGR = \ln (A2/A1)$, donde $A1$ = altura en $t1$ y $A2$ = altura en $t2$ (Premoli et al., 2007).

Intercambio gaseoso

El intercambio de gases puede utilizarse para evaluar cómo el estado hídrico afecta las plantas, y permite calcular la eficiencia en el uso del agua. La actividad fotosintética y la transpiración se pueden medir mediante la cuantificación de las concentraciones de CO_2 (fijado y emitido) y vapor de agua atmosférico con un analizador de gases infrarrojo (Fernández y Gyenge 2004). La eficiencia en el uso de agua es una medida de la efectividad de los estomas en maximizar la fotosíntesis reduciendo al mismo tiempo, la pérdida de agua.

Las medidas de intercambio gaseoso fueron realizadas sobre hojas completamente expandidas de un subset de 73 plántulas al final de los tratamientos hídricos, durante dos días consecutivos y en un orden aleatorio. Se registró la tasa de fotosíntesis neta (A_{net} , $\mu\text{mol } CO_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), la conductancia estomática (g_s , $\text{mol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) y la tasa de transpiración foliar (E , $\text{mmol } H_2O \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) usando un equipo medidor infrarrojo del intercambio gaseoso LICOR-6400 (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA) con una fuente 6400-02B LED que provee una densidad de flujo de fotones fotosintéticos de $700 \mu\text{mol } \text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Este nivel de radiación se encuentra por encima del punto de saturación para *N. pumilio* (Martínez Pastur 2007). La atmósfera de la cámara fue mantenida a 20°C , 40% de humedad relativa, con una concentración de CO_2 de 400 ppm. Se calculó la eficiencia en el uso de agua a nivel instantáneo (EUA) como el cociente entre A_{net} y E ($\mu\text{mol } CO_2$ fijados por mmol de H_2O transpirada).

N. pumilio presenta estomas solo en su superficie abaxial (Premoli y Brewer, 2007), por lo tanto A_{net} y g_s fueron reportadas sobre un solo lado del área foliar. Luego de las mediciones, las hojas fueron colectadas y se determinó el área foliar con un escáner y el programa Digimizer v4.6.1 (MedCalc Software, Belgium).

Estado hídrico de las plantas

Los potenciales hídricos de madrugada (máximo) y mediodía (mínimo), se miden cámara de presión de Schölander, la cual permite evaluar la variación en el potencial hídrico de las plantas en relación a la demanda atmosférica y el potencial hídrico del suelo. Esta cámara también se utiliza para construir curvas de presión volumen que permiten estudiar las estrategias de resistencia al estrés hídrico a nivel celular (ajuste osmótico y ajuste elástico).

Para estudiar el estado hídrico a partir de mediciones del potencial hídrico, se utilizaron diferentes sets de plántulas. Uno para medir los potenciales hídricos de madrugada (ψ_{max}) y mediodía (ψ_{min}), y otro para construir las curvas P-V. Es importante aclarar que estos procedimientos implican el corte de ramas, por lo cual fueron realizados luego de completar las otras mediciones fisiológicas para evitar que estas pudiesen verse afectadas. Todas las mediciones fueron realizadas al finalizar los 30 días de duración del experimento.

Los ψ_{max} y ψ_{min} fueron medidos con una cámara de presión Schölander (PMS 1000, PMS Instruments, Corvallis, Oregon, USA) en 5 plántulas por cada combinación de procedencia/tratamiento. A cada plántula se le extrajo una rama entre las 05:00 y 07:00 h y una segunda rama entre las 12:00 y 14:00 h. La decisión de utilizar ramas en lugar de hojas se realizó debido que los peciolos son muy cortos. Inmediatamente después del corte de cada rama se procedió a medir su potencial hídrico.

Para la construcción de las curvas P-V se utilizaron de 3 a 6 plántulas por combinación de procedencia/tratamiento. De cada plántula se cortó una rama con hojas completamente expandidas. Las ramas cortadas fueron

inmediatamente puestas a rehidratar en oscuridad durante 12 h con el extremo de corte sumergido en agua destilada para obtener su peso inicial a saturación. A continuación, siguiendo la técnica de transpiración libre (Tyree y Hammel, 1972) utilizando nuevamente una cámara de presión de Schölander se realizaron mediciones sucesivas del potencial hídrico sobre cada rama. Las mediciones se realizaron a intervalos regulares dejando secar la rama por exposición al aire, y tomando antes de cada medición su peso con una precisión de 0,001 g para registrar las reducciones en el contenido relativo de agua. Éste procedimiento se repitió al menos 8 veces por rama, para de esa manera, contar con suficientes puntos para la construcción de las curvas (Fernández y Gyenge, 2010). Las muestras fueron deshidratadas hasta que los valores del potencial hídrico permanecieron constantes o aumentaron por daños en los tejidos. Al finalizar se determinó el peso seco de las ramas mediante su secado en estufa a 60°C hasta peso constante.

Las curvas P-V son una representación gráfica de la inversa del potencial hídrico ($-1/\psi$) de una muestra frente a su volumen de agua simplástica (1-CRA). Las curvas P-V permitieron estimar el potencial osmótico a saturación (π_{sat} , MPa), el potencial hídrico en el punto de pérdida de turgor (PPT MPa), el contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgor (CRA_{ppt}), el módulo de elasticidad máximo de las paredes celulares (ϵ_{max} , MPa), y el contenido de agua apoplástica (CRA_{apop}).

Al graficar la relación entre $-1/\psi$ y 1-CRA se observa que esta tiene una porción inicial curvilínea con pendiente elevada, seguida por una porción más recta con menor pendiente (Fig. IV.8). El punto de inflexión entre las dos porciones se debe a la pérdida total de turgencia del tejido y se denomina punto de pérdida del turgor (PPT). Este punto se determinó realizando una regresión lineal entre $-1/\psi$ y 1-CRA, eligiendo la recta con mayor ajuste. El π_{sat} se estimó extrapolando la recta hasta el eje de las ordenadas y el potencial en el PPT extrapolando el PPT hasta el eje de las ordenadas. También, a través de la intersección de la recta con el eje de las abcisas ($-1/\psi = 0$) se calculó el porcentaje de agua almacenada en el apoplasto, como $\text{CRA}_{\text{apop}} = 1 - \text{CRA}$.

Se midió el módulo de elasticidad máximo (ϵ_{\max}) que cuantifica los cambios del potencial de presión o turgencia en función de variaciones del volumen celular y puede aumentar, disminuir o permanecer constante en respuesta al estrés hídrico (Goldstein *et al.* 1989). Se calculó como $\epsilon_{\max} = \Delta\psi_p / \text{CRA}$ para valores cercanos $\text{CRA} = 1$ (turgencia máxima), ya que se considera que en esa zona la pendiente es máxima y constante (Ike y Thurtell en Fernández y Gyenge, 2010).

Análisis de datos

La normalidad y homogeneidad de varianzas fue evaluada a través del test de Shapiro-Wilk y test de Levene respectivamente. Cuando los datos no se ajustaron a una distribución normal se utilizaron test no paramétricos. En el experimento de jardín común la mortalidad y muerte parcial fue comparada entre procedencias mediante test de t. Para analizar las variables medidas repetidamente en distintos años (altura, diámetro a la altura del cuello, número de ramas y número total de hojas) dentro de cada procedencia se utilizaron test de Wilcoxon y para las comparaciones entre procedencias test de Mann Whitney. Se analizó también el efecto de la edad sobre estas variables mediante análisis de covarianza (ANCOVA). Los estadios fenológicos se evaluaron mediante test de chi-cuadrado, mientras que la densidad estomática y caracteres morfológicos foliares entre procedencias se compararon mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. En el experimento manipulativo de déficit hídrico la existencia de diferencias estadísticamente significativas y efectos combinados de procedencia y tratamiento en las medidas de intercambio gaseoso, estado hídrico de las plantas y tasa de crecimiento relativo se realizaron tests no paramétricos de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples. Los parámetros derivados de las curvas de presión volumen fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Todos los análisis estadísticos fueron realizados con el programa STATISTICA v7.0 (Statsoft, Tulsa, OK).

IV.5 Resultados

Experimento de jardín común

Ambos tipos de plántulas presentaron incrementos similares de muerte parcial durante el cultivo en jardín común, alcanzando aproximadamente un 60% (Fig. IV.4A). Lo mismo sucedió para el porcentaje acumulado de mortalidad, aunque las plantas de las poblaciones centrales mostraron una mayor mortalidad al final del experimento (t-test, $P < 0,05$) (Fig. IV.4B).

El análisis de mediciones repetidas durante las temporadas de crecimiento 2015 y 2016 indicaron que la altura, diámetro a la altura del cuello, número de ramas y número total de hojas variaron significativamente para ambas procedencias a lo largo del experimento de jardín común (test de Wilcoxon, $P < 0,05$) (Figs. IV.5A a D respectivamente). En la comparación entre procedencias, se encontraron diferencias significativas en la altura y diámetro a la altura del cuello en ambas temporadas de crecimiento, siendo las plántulas centrales consistentemente de mayor altura y diámetro a la altura del cuello (test de Mann Whitney, $P < 0,05$) (Figs. IV.5A, B respectivamente). Para el número de hojas las diferencias significativas sólo se encontraron en la temporada de crecimiento 2016, siendo mayor para las plántulas centrales; no se encontraron diferencias en el número de ramas (test de Mann Whitney) (Figs. IV 5C, D respectivamente). Los test evaluando el efecto de la edad sobre estos caracteres arrojaron similares resultados. La fenología foliar resultó casi idéntica en las plántulas centrales y marginales, no encontrándose diferencias significativas durante el período observado (test de chi-cuadrado). Esta sincronización sugiere una duración similar del período de crecimiento (Fig. IV.6).

Densidad estomática y caracteres morfológicos foliares

Bajo condiciones de jardín común, la densidad estomática fue un 10% menor en las plántulas marginales comparadas con las centrales, sin embargo estas diferencias no fueron significativas. Los caracteres morfológicos foliares

también estuvieron altamente conservados, ya que no se observaron diferencias significativas entre ambas procedencias (Tabla IV.2).

Experimento manipulativo de déficit hídrico

Tasa de crecimiento relativo

El tratamiento de déficit hídrico afectó la tasa de crecimiento relativo (RGR) de plántulas centrales y marginales, pero el mayor impacto significativo y negativo fue sobre las plántulas de procedencia central, donde la disminución fue cercana a un 60% en comparación al tratamiento control. La RGR de las plántulas centrales bajo el tratamiento control fue similar al RGR de las plántulas marginales bajo control y déficit hídrico (test no paramétrico de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples, $P < 0,05$) (Fig. IV.9).

Intercambio de gases

Ambas procedencias mostraron una reducción significativa en A_{net} y g_s bajo condiciones de déficit hídrico en comparación al tratamiento control (test no paramétrico de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples, $P < 0,05$) (Figs. IV.10A y B). Las plántulas de procedencia marginal pudieron mantener valores positivos de A_{net} bajo déficit hídrico, sin embargo A_{net} decreció un 65% en comparación al tratamiento control. Por otro lado, las plántulas de procedencia central tuvieron valores negativos de A_{net} bajo déficit hídrico (Fig. IV.10A). La disminución de la g_s también fue menor en las plántulas marginales comparadas con las centrales. Mientras la g_s de las plántulas centrales bajo déficit hídrico decreció un 66% respecto al tratamiento control, la reducción en las plántulas marginales fue del 55% (Fig. IV.10B). La EUA fue significativamente menor bajo el tratamiento de déficit hídrico para las plántulas centrales. También se encontraron diferencias en la EUA entre ambas procedencias bajo déficit hídrico siendo mayor para las plántulas marginales (test no paramétrico de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples, $P < 0,05$) (Fig. IV.10C).

Estado hídrico de las plantas

Los $\psi_{\text{máx}}$ y ψ_{min} de las plántulas de procedencia marginal fueron significativamente menores (más negativos) bajo déficit hídrico que bajo el tratamiento control (test no paramétrico de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples, $P < 0,1$) Alcanzando valores más de tres veces negativos que en el tratamiento control (Figs. IV.11 A y B respectivamente).

Los ψ_{min} de las plantas centrales fueron 58 y 42% significativamente más negativos que $\psi_{\text{máx}}$ bajo los tratamientos control y déficit hídrico, respectivamente. En las plántulas marginales el ψ_{min} bajo déficit hídrico fue un 18% más negativo que $\psi_{\text{máx}}$; mientras que en el tratamiento control no se observaron diferencias significativas (Figs.11 A y B).

No se encontraron diferencias significativas en los parámetros derivados de las curvas P-V para las distintas combinaciones de procedencia/tratamiento (Tabla IV.3). Sólo se encontraron diferencias marginalmente significativas en el módulo de elasticidad (ANOVA de una vía, $P = 0,05$). Las paredes celulares fueron más rígidas bajo el tratamiento de déficit hídrico para ambas procedencias. Las plántulas de procedencia central pudieron mantener la turgencia celular (valores negativos de $\text{PPT} - \Psi_{\text{min}}$) en el tratamiento de déficit hídrico, mientras que las plántulas de procedencia marginal perdieron turgencia ($\psi_{\text{máx}}$ fue 0,22 MPa más negativo que el potencial osmótico en el punto de pérdida de la turgencia) (Tabla IV.3).

IV.6 Discusión

Los resultados del experimento de jardín común indicaron que las plántulas de *Nothofagus pumilio* provenientes de ambientes con regímenes de precipitación contrastantes presentan respuestas adaptativas y rasgos ecofisiológicos altamente conservados. Bajo condiciones homogéneas de crecimiento, las plántulas marginales, adaptadas a ambientes más estresantes,

consistentemente presentaron una menor performance en caracteres arquitecturales, demostrando una base genética para las diferencias. Esto podría ser similar a las diferencias genéticas observadas en plántulas de altura frente a factores ambientales estresantes asociados a elevadas altitudes (donde las restricciones relacionadas a bajas temperaturas representan otro tipo de hábitat marginal para esta especie), comparadas con aquellas de bajas altitudes (Premoli et al., 2007; Mathiasen y Premoli, 2016). Los hábitats marginales estresantes ejercen entonces presiones de selección, cuyos efectos sobre las plantas provocarían, como respuesta a largo plazo, reducciones en la altura y diámetro basal.

La sincronía en la fenología foliar medida en este capítulo en relación a regímenes contrastantes de precipitación, difiere con el marcado efecto de la variación ambiental sobre los ritmos fenológicos de *N. pumilio* encontrados a lo largo de gradientes principalmente térmicos, es decir, altitud (Rusch, 1993), siendo por lo tanto genéticamente controlados (Premoli et al., 2007) y de valor adaptativo (Mathiasen y Premoli, 2016). Debido a que las plántulas de ambas procedencias fueron deliberadamente colectadas en el límite altitudinal inferior del gradiente de elevación, parece ser que las plantas de elevaciones y latitudes similares, pero bajo regímenes de precipitación contrastantes, desarrollan sus hojas simultáneamente durante la primavera. Estudios previos encontraron que la temperatura es una variable crítica en la iniciación del proceso de foliación a lo largo de gradientes altitudinales (Barrera et al., 2000; Premoli et al., 2007; Mathiasen y Premoli, 2016), lo cual puede explicar la ausencia de diferencias entre las procedencias, cuyas elevaciones experimentan similares regímenes de temperatura. La sincronización en el proceso de apertura de yemas y expansión foliar, podría permitir de esta manera, el flujo génico entre poblaciones centrales y marginales que habitan pisos altitudinales equivalentes. Las fenologías foliar y floral se encuentran altamente correlacionadas en *Nothofagus* (G. Juri Universidad Nacional del Comahue, com. pers.). Por lo tanto, la falta de diferencias fenológicas puede resultar en un flujo génico extensivo, explicando de esta manera la divergencia genética reducida a moderada (pero significativamente distinta de cero) medida con marcadores neutros entre las poblaciones centrales y marginales de *N.*

pumilio ($F_{st} \sim 17\%$, ver capítulo II). La ausencia de diferencias significativas entre procedencias en el experimento de jardín común para la mortalidad, muerte parcial, caracteres morfológicos foliares y densidad estomática, sugiere que estas características se encuentran muy bien conservadas y/o muestran ajustes plásticos. Estos resultados son consistentes con otros estudios que no encontraron variación en el área foliar específica ($\text{g}\cdot\text{m}^{-2}$) relacionada a la precipitación en especies deciduas (Wright et al., 2004) y humedad del suelo en *N. pumilio* (Fajardo y Piper, 2011).

Las plántulas de *N. pumilio* provenientes del extremo más seco del bosque templado andino mostraron, bajo las distintas condiciones de disponibilidad hídrica del suelo, un comportamiento fisiológico relativamente similar y una adquisición de recursos más eficiente que las plantas de ambientes méxicos (i. e. más isohídricas). A su vez, las plántulas marginales también presentaron mayor RGR bajo déficit hídrico en comparación a las centrales. Estos resultados contrastan con otros estudios donde las plantas de ambientes más xéricos exhibieron menor potencial de crecimiento (e.g., Niinimets et al., 2010). Las poblaciones marginales de *N. pumilio* soportaron entonces mejor el estrés hídrico que las poblaciones centrales de origen más méxico, lo que podría implicar una mayor susceptibilidad de estas últimas a la desecación. Dado que el experimento fue realizado en jardín común, las diferencias encontradas entre las plantas provenientes de regímenes contrastantes de precipitación son posiblemente genéticas. Tanto las plántulas centrales como marginales presentaron una significativa reducción en A_{net} y g_s bajo déficit hídrico, esto podría ser consecuencia del cierre de estomas para evitar una excesiva pérdida de agua. Sin embargo, más allá de estas reducciones, se observó que las plántulas marginales presentan una mayor EUA en comparación a las plántulas centrales, proporcionando más evidencias de la existencia de diferencias genéticas relacionadas al control del uso de agua entre procedencias. La base genética encontrada en los caracteres ecofisiológicos relacionados al uso de agua, contrasta con estudios previos de plántulas de *N. pumilio* provenientes de alturas contrastantes en jardín común, donde estos caracteres parecerían responder a señales ambientales (Premoli y Brewer, 2007). Sin embargo, el experimento de manipulación aquí presentado

permite el análisis de diferencias ecofisiológicas potencialmente adaptativas, i. e. si confieren una ventaja selectiva bajo déficit hídrico. Aunque estos experimentos fueron realizados con plántulas, estudios ecofisiológicos comparativos utilizando plántulas y adultos de *N. pumilio* de elevaciones contrastantes en el norte de la Patagonia obtuvieron patrones similares (Premoli y Brewer, 2007).

Los estomas son responsables de la optimización en la fijación de carbono por unidad de pérdida de agua y el mantenimiento del estado hídrico de la planta cuando la disponibilidad de agua del suelo es limitada y/o la demanda evaporativa es alta, con el objetivo de evitar fallas hidráulicas (Park et al., 2016). Estos roles operan en la misma dirección y ambos pueden ser regulados (en principio) con los mismos mecanismos de control (Raven, 2002). Por lo tanto, la mayor EUA y la tendencia a un mayor crecimiento de las plántulas marginales bajo déficit hídrico, podría deberse a una menor reducción en la A_{net} en comparación con las plántulas centrales. Bajo condiciones de estrés por sequía, las plantas con una relativa mayor EUA serían capaces de acumular mayor biomasa que las plantas con una baja eficiencia (Touchette et al., 2007).

En la misma línea que estos resultados, otros estudios encontraron que la mayoría de las plantas tiende a mostrar un incremento en la EUA bajo déficit hídrico al restringir su pérdida en lugar de inhibir la fotosíntesis (Chaves et al., 2003; Park et al., 2016). Esto soporta la hipótesis de que la evolución favoreció la optimización en la asimilación de carbono por sobre la pérdida de agua (Raven, 2002). Aunque la EUA en las plántulas bajo déficit hídrico resultó en un compromiso entre reducir la asimilación de carbono y reducir la pérdida de agua (en comparación al tratamiento control), este compromiso fue relativamente menor en las plántulas marginales. En plántulas centrales la ganancia de carbono se encontró inhibida bajo déficit hídrico resultando en una menor RGR al final del tratamiento. Este comportamiento podría llevar a una deficiencia de carbono bajo una exposición más fuerte o prolongada al déficit hídrico a medida que los carbohidratos se agotan para mantener la respiración.

Las plantas pueden soportar condiciones de sequía evitando la deshidratación de sus tejidos, esto implica minimizar la pérdida de agua (por ejemplo, cerrando los estomas) y maximizar su absorción (Chaves et al., 2003). Una maximización en la absorción de agua podría estar relacionada a una capacidad de las plántulas marginales de incrementar las fuerzas conductivas para el flujo de agua desde el suelo hacia las hojas. En las plántulas de ambas procedencias, el gradiente de potencial hídrico entre el suelo y las hojas se incrementó bajo déficit hídrico como resultado de una disminución, tanto en $\psi_{\text{máx}}$ como en ψ_{min} , siendo éste comportamiento anisohídrico más notorio en las plantas centrales. Sin embargo, para las plántulas marginales esto implicó la pérdida de turgor, ya que ψ_{min} cayó a valores más negativos que el potencial osmótico en el punto de pérdida de turgor, no obstante, esta pérdida relativa en comparación con los $\psi_{\text{máx}}$, no fue tan marcada como en las plantas centrales. Muchos estudios han demostrado que la pérdida de turgor en las células guardianas esta desacoplada a la pérdida de turgor de las células epidérmicas (Frank y Farquhar, 2007; Scholz et al., 2012) y que su efecto sobre el intercambio de gases puede ser relativamente bajo. En este estudio, las plántulas de procedencia marginal sometidas a déficit hídrico tuvieron mayor g_s y asimilación de carbono que las plántulas de procedencia central, sugiriendo que las primeras son relativamente insensibles a la pérdida de turgor.

Aunque no se registraron ajustes osmóticos bajo el tratamiento de déficit hídrico (i. e. π_{sat} y PPT fueron similares al tratamiento control), se evidenció tanto en plántulas centrales como marginales, un cambio sustancial en las propiedades de las paredes celulares producto de un ajuste elástico (paredes celulares más rígidas bajo déficit hídrico). La interpretación del ajuste elástico desde un punto de vista adaptativo es compleja, dado que, en la naturaleza pueden observarse tanto disminuciones como incrementos del módulo de elasticidad máximo en respuesta a la sequía (Saito y Terashima, 2004; Fernández y Gyenge, 2010; Scholz et al., 2012). Paredes celulares más rígidas contribuyen a una disminución del potencial hídrico con sólo pequeñas disminuciones en el contenido celular de agua (Goldstein et al., 1989; Whitehead y Beadle, 2004).

La ausencia de diferencias significativas entre tratamientos y/o procedencias en las curvas P-V puede ser producto de un experimento de corta duración, bajos niveles de respuesta de estos caracteres en *N. pumilio*, o ambas. Una posible explicación para la falta de respuesta al déficit hídrico de las plántulas centrales en estos caracteres, podría ser que las plántulas operaron por encima del PPT, con lo cual no fue necesario asignar solutos osmóticamente activos al ajuste osmótico. Por otro lado, la baja sensibilidad a la pérdida de turgor de las plántulas marginales permitió mantener la asimilación de carbono al mediodía sin un costo metabólico asociado a la disminución en PPT. Además, aunque la mayoría de los estudios experimentales aplican un solo ciclo de sequía, otros estudios han mostrado que sucesivos ciclos de estrés pueden tener un efecto aditivo (Niinimets 2010). Es posible entonces, que rediseñando el experimento a repetidas exposiciones de ciclos de sequía, se pueda dilucidar la existencia o no de diferencias significativas para estos caracteres relacionada a la procedencia de las plántulas. Estos resultados proveen importante información pero deben considerarse otros importantes aspectos, como por ejemplo las diferentes respuestas durante la ontogenia de las plantas, para poder transferir el conocimiento de experimentos con plántulas en jardín común a los bosques (Niinimets 2010).

Siendo que la variación intraespecífica en los caracteres funcionales a lo largo del rango de distribución de las especies no ha sido suficientemente estudiada (Martinez-Vilalta et al., 2009; Violle et al., 2014), su investigación podría aportar nuevos conocimientos sobre las restricciones a la distribución, al sugerir limitaciones en los ajustes fisiológicos (Reichstein et al., 2014). Resulta necesario entonces relacionar la observación a nivel de organismos y ecosistemas (Violle et al., 2014) para una mejor comprensión de las interacciones bióticas con las restricciones ambientales; en este sentido la biogeografía funcional ofrece una oportunidad para explicar la variación funcional de los ecosistemas a gran escala (Reichstein et al., 2014).

Los resultados encontrados en este capítulo sugieren que las poblaciones centrales son más sensibles al déficit hídrico y por lo tanto podrían ser más afectadas por el cambio climático y subsecuente incremento en la

temperatura e intensidad de las sequías. Recientemente se ha sugerido que los bosques de *N. pumilio* ubicados actualmente en sitios relativamente másicos se volverán más susceptibles a declinar (Rodríguez-Catón et al., 2016), de manera similar, a las mortalidades masivas de bosques recientemente documentadas en otras partes del mundo en relación al cambio climático global (por ejemplo, Allen et al., 2010). Contrariamente, las poblaciones marginales, presentan características adaptativas relacionadas al intercambio de gases y relaciones hídricas que les otorgan mayor tolerancia a las condiciones de sequía. Frente al cambio climático global es de suma importancia la protección y manejo ecológico de los hábitats marginales, reduciendo por ejemplo otras presiones extrínsecas (Moritz et al., 2012), con el objetivo de conservar la diversidad adaptativa existente (Kapeller et al., 2016). Este conocimiento podría ser utilizado también con fines de restauración, minimizando los efectos del cambio climático a través de la introducción de individuos adaptados de poblaciones marginales para fomentar una adaptación más rápida de la población en general (Thiel et al., 2014).

Estos resultados ponen en valor la importancia de las poblaciones marginales para la preservación del potencial evolutivo de las especies. Por lo tanto, la conservación de las poblaciones que habitan los márgenes de distribución de las especies, como las poblaciones marginales más orientales de *N. pumilio*, es relevante frente al incremento de las temperaturas medias de verano, alteración de los balances hídricos e intensidad de las sequías.

IV.7 Conclusiones

Las poblaciones del origen húmedo mostraron mayor crecimiento que las del extremo seco bajo condiciones ambientales óptimas de jardín común. Esto sugiere que plantas de distintos orígenes han desarrollado diferencias genéticas. Sin embargo, bajo estrés hídrico, no solamente las del origen seco mostraron mayor crecimiento relativo sino que además se adecuaron mejor a la desecación mostrando mayor eficiencia en el uso del agua y un comportamiento más isohídrico.

IV.8 Tablas y Figuras

Tabla IV.1. Descripción de los sitios de colección de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal. Se indica tipo de procedencia, longitud, latitud, altitud y precipitación media anual.

Procedencia	Población	Longitud (O)	Latitud (S)	Altitud (m s.n.m.)	Precipitación (mm año⁻¹)
Central	Cerro Bayo	71°36'15"	40°45'5"	1200	1087
Central	Cerro Otto	71°22'21"	41°8'45"	1102	861
Central	Cerro Tronador	71°50'20"	41°11'15"	1100	1343
Marginal	Fortín	71°13'29,6"	40°58'15,2"	1155	783
Marginal	Challhuaco	71°18'04"	41°16'10"	1042	779
Marginal	Ñirihuau Arriba	71°15'9,1"	41°17'23,9"	1118	782

Tabla IV.2. Caracteres morfológicos foliares y densidad estomática de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencia central y marginal en jardín común. Los resultados se presentan como medias (\pm error estándar). Área foliar (AF), perímetro (Per), longitud (L), ancho (A), peso seco (PS), área foliar específica (AFE), redondez (R), relación ancho/largo (A/L) y densidad estomática (DE). Las comparaciones entre procedencias fueron analizadas con ANOVAs de una vía.

Procedencia	AF (cm²)	Per (cm)	L (cm)	A (cm)	PS (g)	AFE (cm² g⁻¹)	R	A/L	DE (estomas mm²)
Central	3,27 (0,25)	8,43 (0,2)	2,36 (0,08)	1,86 (0,06)	0,024 (0,002)	145,92 (6,59)	0,54 (0,03)	0,8 (0,02)	131,63 (9,77)
Marginal	3,23 (0,11)	9,1 (0,28)	2,43 (0,09)	1,87 (0,04)	0,024 (0,001)	142,57 (6,43)	0,48 (0,01)	0,77 (0,03)	118,3 (7,57)

Tabla IV.3. Parámetros derivados de las curvas de Presión- Volumen de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal. Los resultados se presentan como medias (\pm error estándar). Potencial osmótico a saturación (π_{sat} , MPa), contenido relativo de agua apoplástica (CRA_{apop}), contenido relativo de agua en el punto de pérdida de turgor (CRA_{ppt}), potencial hídrico en el punto de pérdida de turgor (PPT, MPa), diferencia entre el punto de pérdida de turgor y el potencial hídrico de madrugada (PPT- Ψ_{min}) y módulo de elasticidad máximo (ϵ_{max}). Las comparaciones entre combinaciones de procedencias/tratamientos fueron analizadas con ANOVAs de una vía.

Procedencia	Tratamiento	π_{sat} (Mpa)	CRA_{apop}	CRA_{ppt}	PPT (Mpa)	PPT - Ψ_{min} (MPa)	ϵ_{max}	N
Central	Control	-1,11 (0,02)	0,55 (0,11)	0,9 (0,01)	-1,37 (0,07)	-0,77	0,04 (0,01)	3
	Déficit hídrico	-1,04 (0,05)	0,45 (0,01)	0,86 (0,01)	-1,5 (0)	-0,18	0,1 (0,04)	3
Marginal	Control	-1,06 (0,14)	0,52 (0,1)	0,92 (0,01)	-1,25 (0,14)	-0,76	0,06 (0,03)	5
	Déficit hídrico	-1,11 (0,12)	0,59 (0,11)	0,89 (0,03)	-1,38 (0,1)	+0,22	0,13 (0,02)	6

Figura IV.1 Ubicación geográfica de las procencias marginal y central de las plántulas de *Nothofagus pumilio*

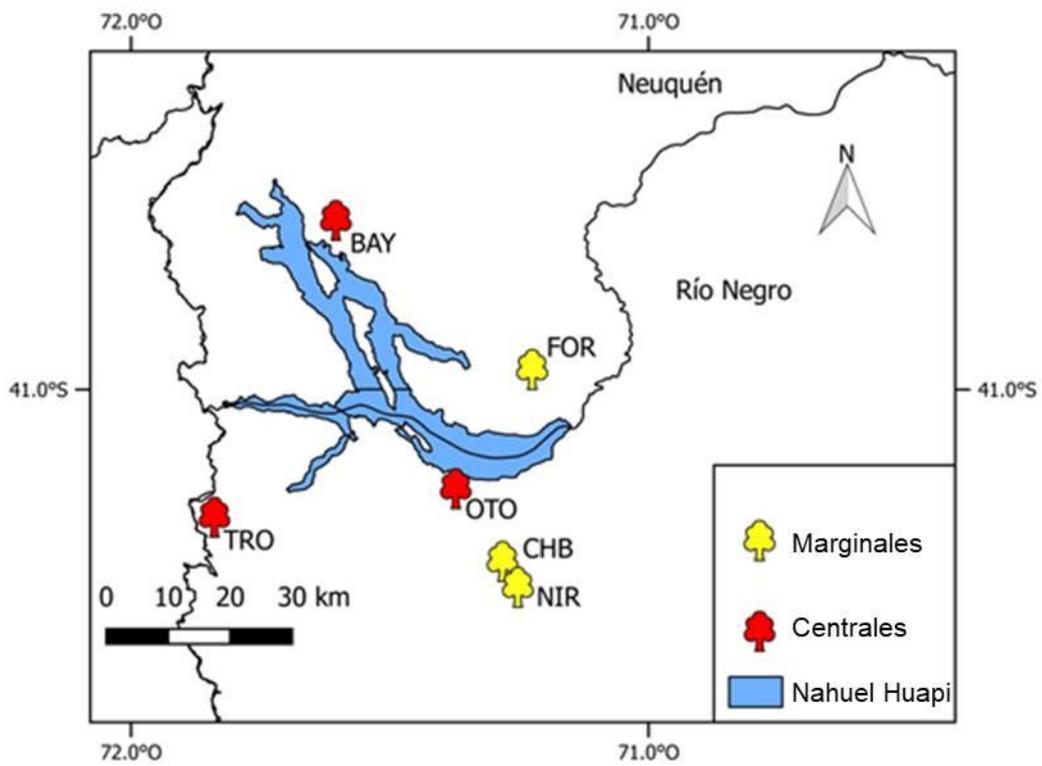


Figura IV.2 Plántulas de *Nothofagus pumilio* creciendo en condiciones de jardín común en invernadero.



Figura IV.3 Plántulas de *Nothofagus pumilio*.



Figura IV.4. Muerte parcial y Mortalidad de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal en jardín común. Los resultados se muestran como porcentajes acumulados de muerte parcial (A) y mortalidad (B) para cada procedencia por temporada de crecimiento. Las comparaciones entre procedencias se analizaron con test de t. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) se indican con letras minúsculas diferentes.

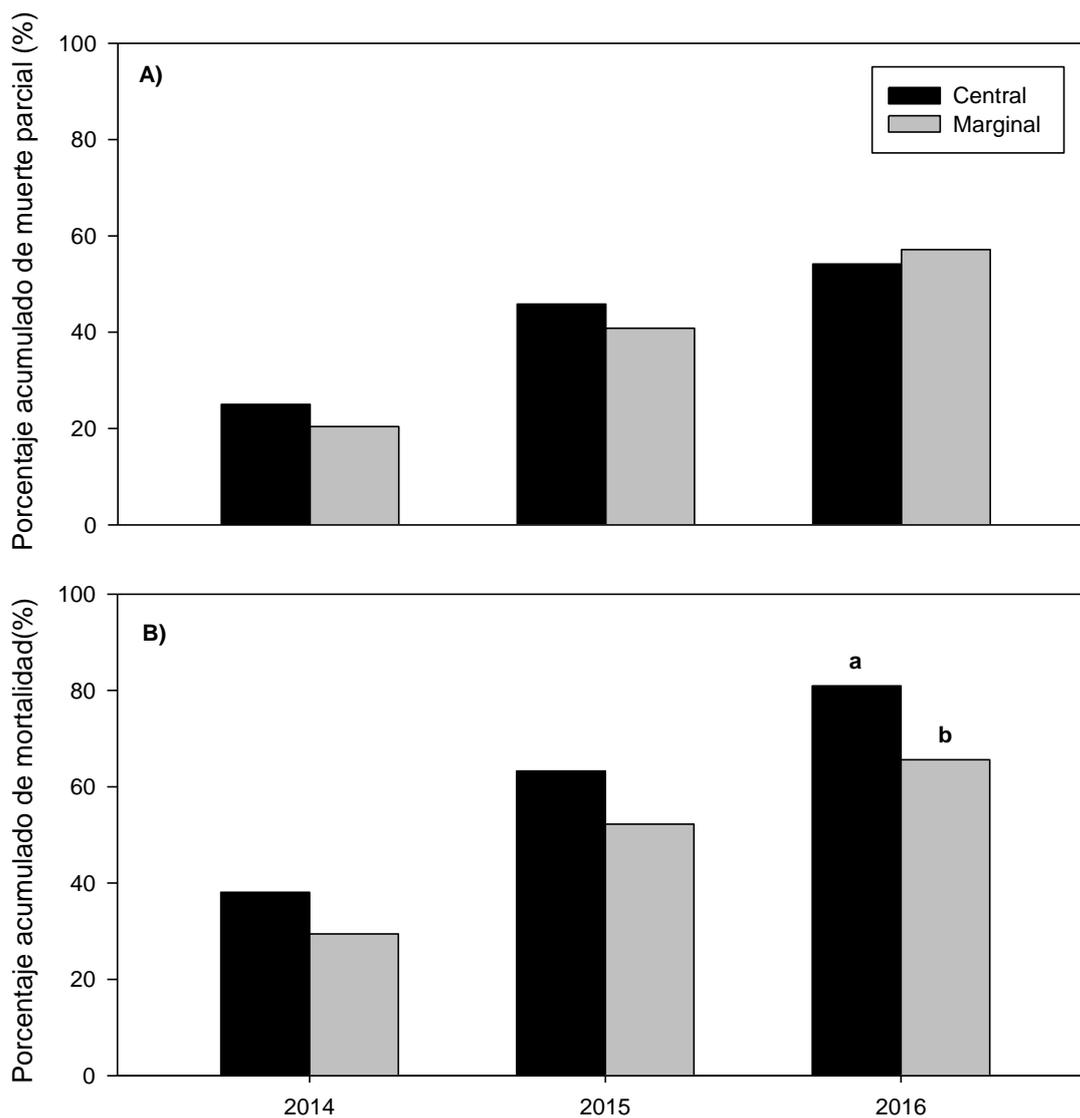


Figura IV.5. Mediciones repetidas de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal en jardín común. A) Altura, B) diámetro a la altura del cuello C) número de hojas y D) número de ramas. Las comparaciones dentro de cada procedencia a través de los diferentes años fueron analizadas con tests de Wilcoxon y entre las procedencias para cada año utilizando tests de Mann Whitney. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) con test de Wilcoxon se indican con diferentes letras minúsculas. Las mayúsculas muestran diferencias estadísticas con test de Mann Whitney. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar.

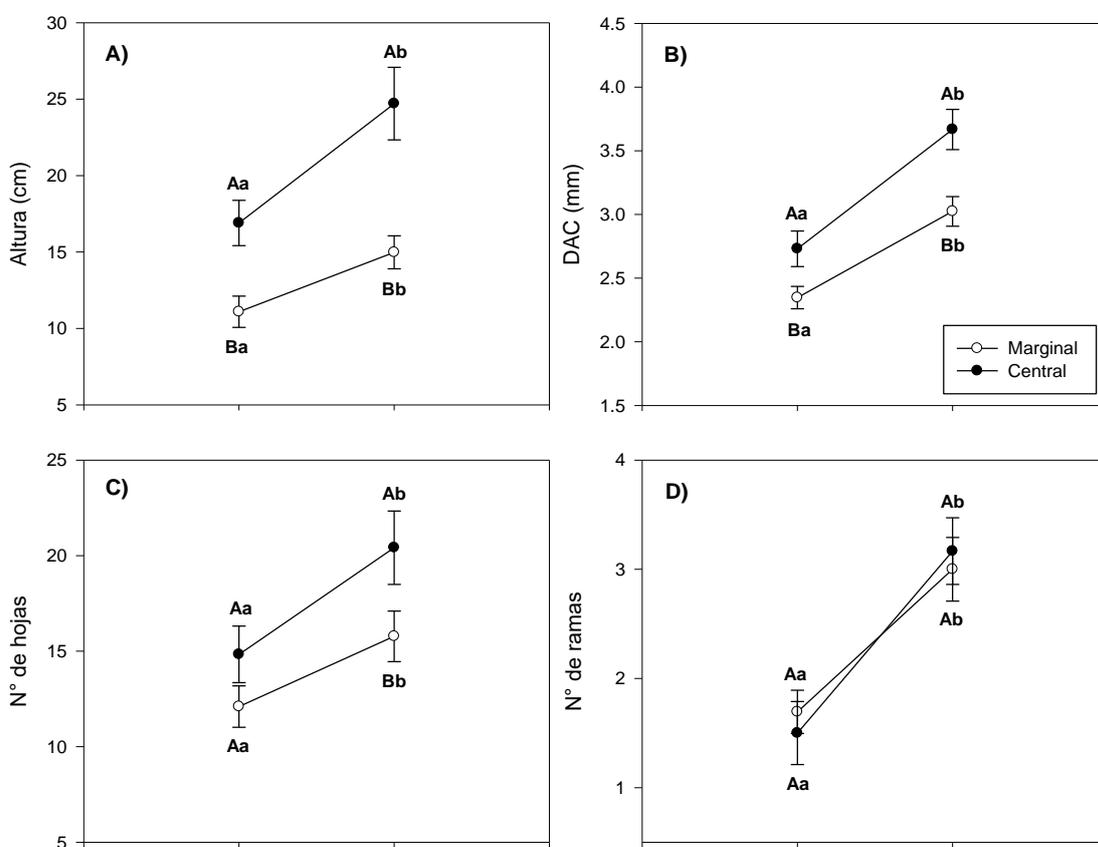


Figura IV.6. Estados fenológicos para las plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencia central y marginal en jardín común durante 2014. Los resultados son porcentajes de plántulas de cada procedencia en cada etapa fenológica por fecha de observación.

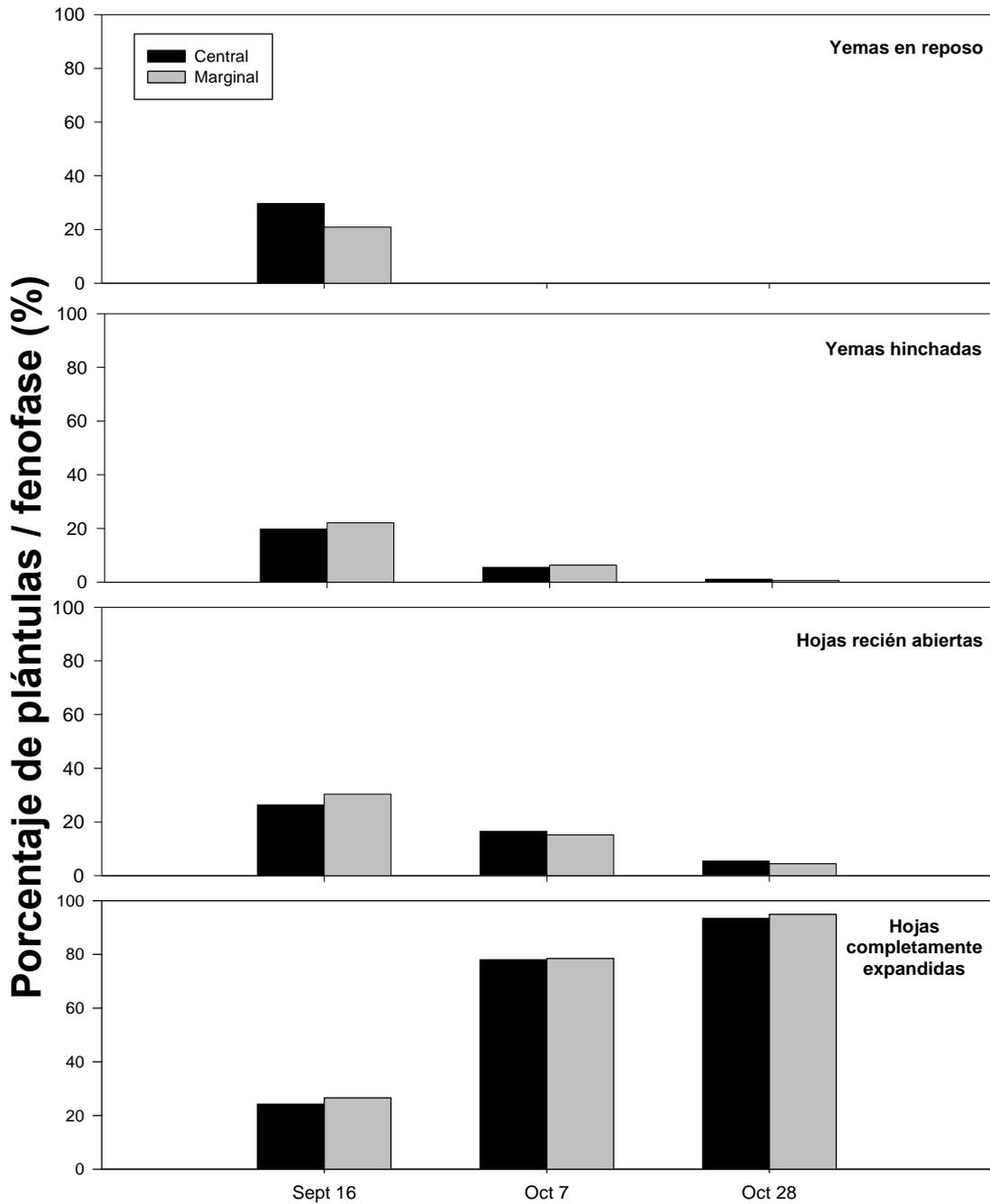


Figura IV.7. A) Potencial hídrico del suelo de las macetas (Ψ_{macetas}) y B) contenido volumétrico de agua de las macetas (CV) para los tratamientos control y déficit hídrico. Las barras representan medias \pm error estándar para cada tratamiento. Pot Capacity (PC) y Punto de Marchitez Permanente (PMP).

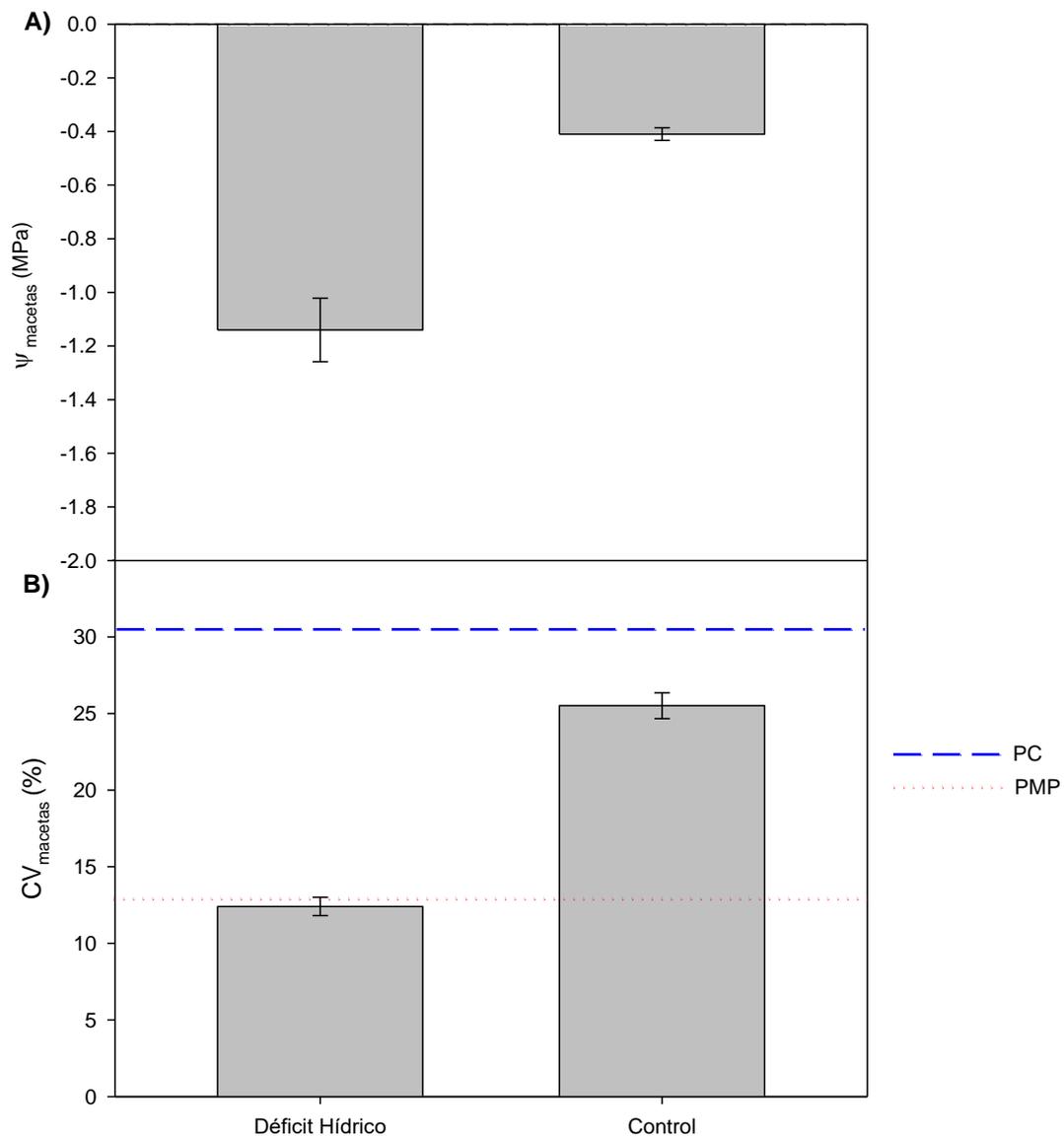


Figura IV.8 Curva de presión-volumen de una rama de *Nothofagus pumilio*. En puntos negros se grafica la inversa del potencial hídrico foliar ($-1/\Psi$) versus la pérdida relativa de agua (1-CRA). La línea roja representa la recta con mayor ajuste de la regresión lineal entre $-1/\Psi$ y 1-CRA. A es $-1/\Psi$ potencial osmótico a saturación. B es la fracción de agua simplástica. C es $-1/\Psi$ potencial osmótico en el punto de pérdida de turgencia. D es 1-CRA en el punto de pérdida de turgencia.

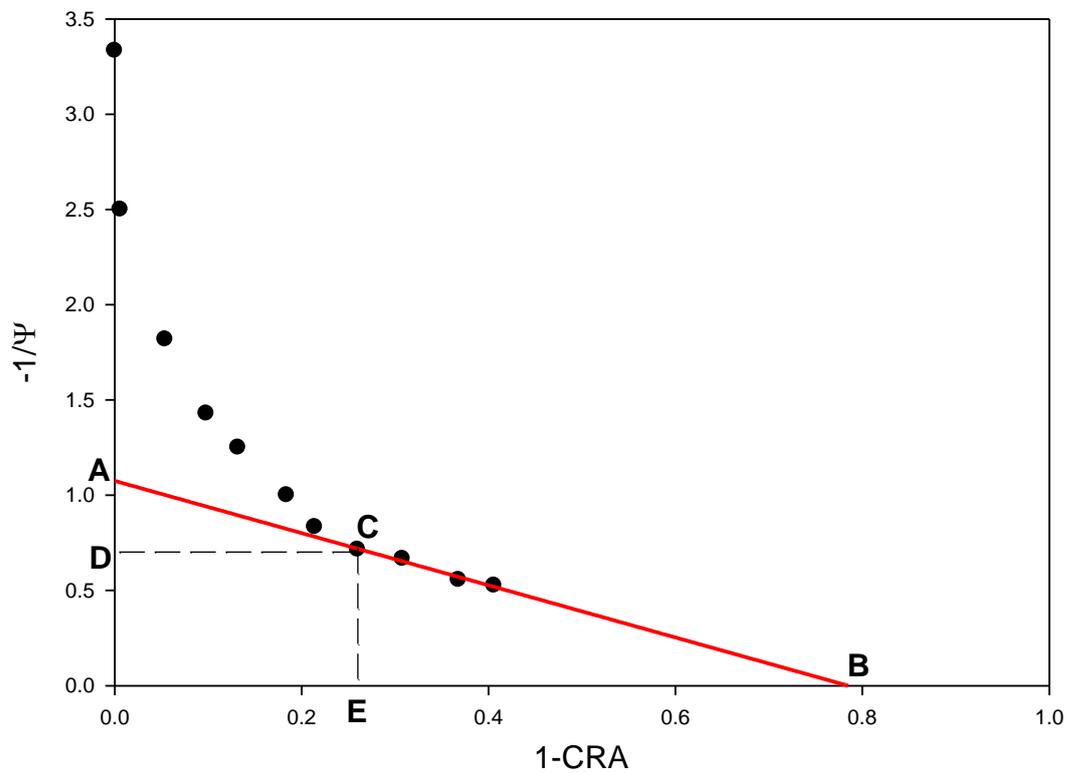


Figura IV.9. Tasa de crecimiento relativo (RGR) de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal bajo los tratamientos control (C) y déficit hídrico (DH). Las comparaciones entre procedencias y tratamientos dentro de las procedencias se analizaron con tests no paramétricos de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos dentro de cada procedencia se indican con distintas letras minúsculas y entre procedencias bajo el mismo tratamiento con distintas letras mayúsculas. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar.

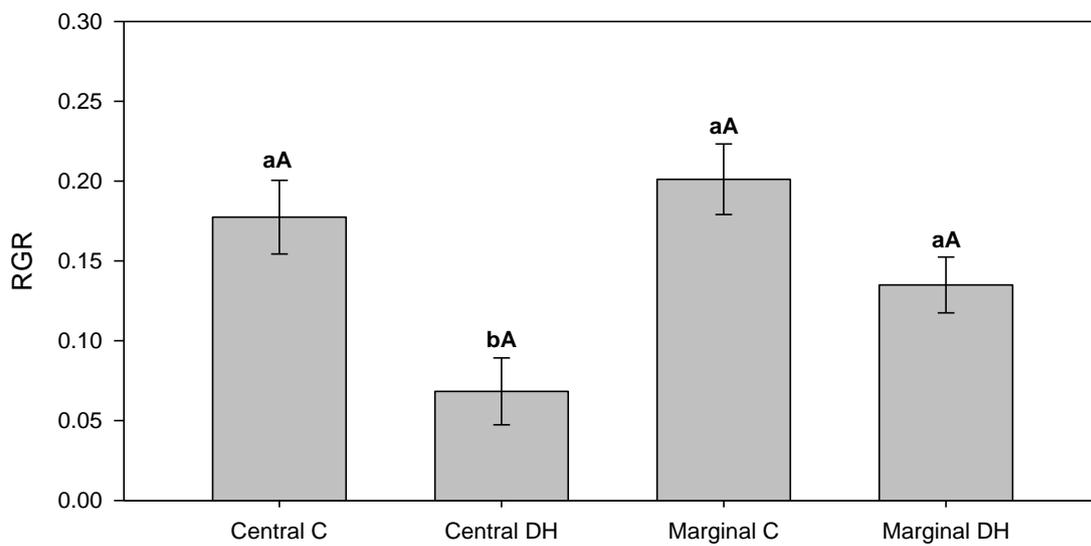


Figura IV.10. Medidas de intercambio gaseoso de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal bajo los tratamientos control (C) y déficit hídrico (DH). A) Tasa de fotosíntesis neta (A_{net}), B) conductancia estomática (gs), C) eficiencia en el uso del agua (EUA). Las comparaciones entre procedencias y tratamientos dentro de las procedencias se analizaron con tests no paramétricos de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples. Las diferencias significativas ($P < 0,05$) entre tratamientos dentro de cada procedencia se indican con distintas letras minúsculas y entre procedencias bajo el mismo tratamiento con distintas letras mayúsculas. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar.

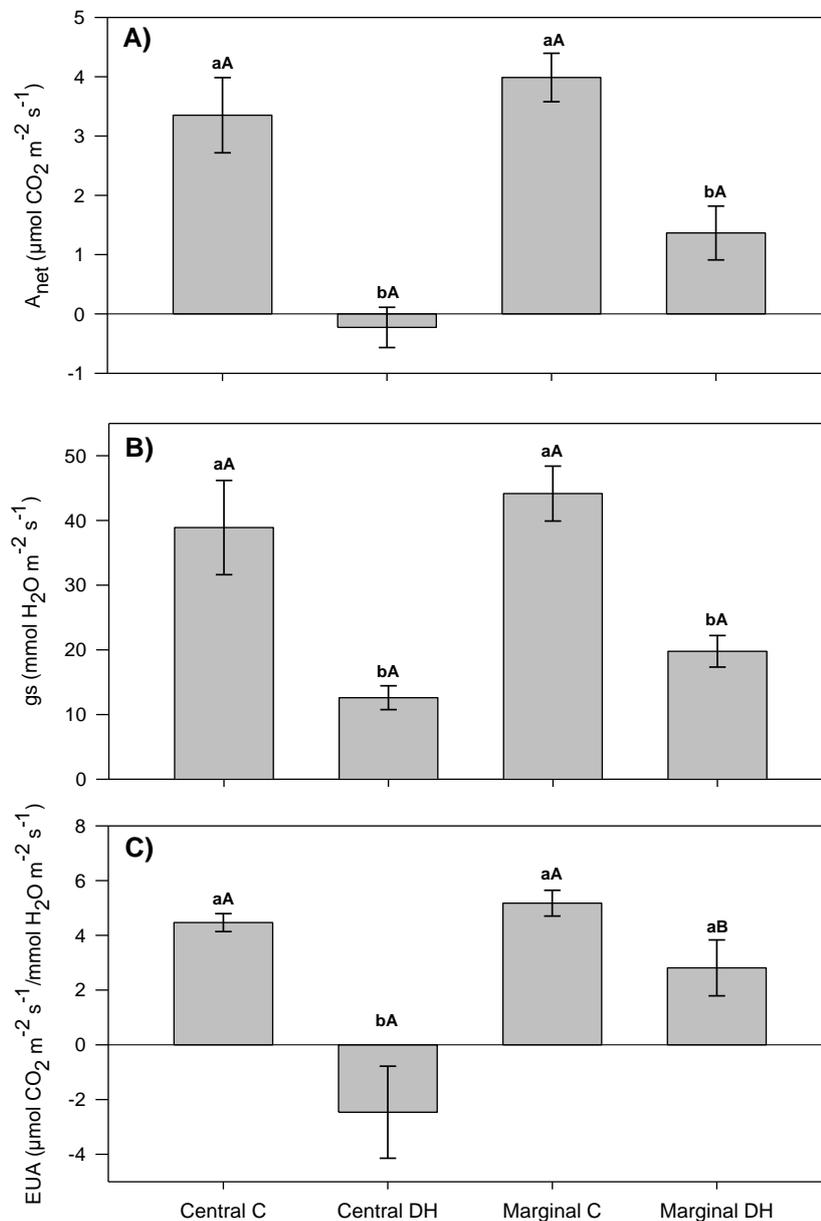
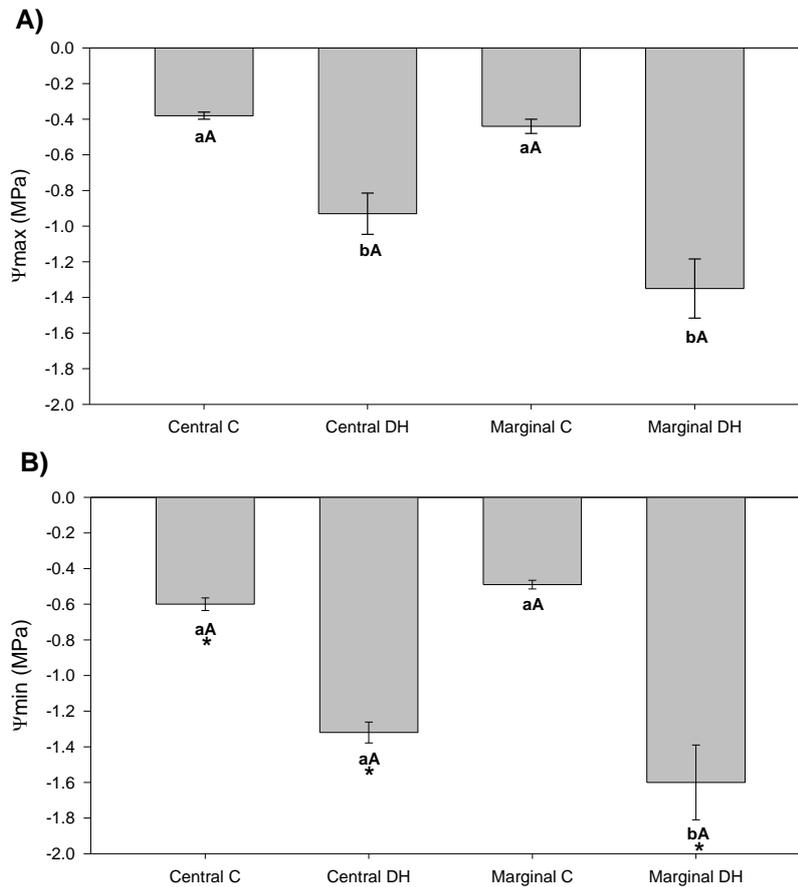


Figura IV.11. Potenciales hídricos de plántulas de *Nothofagus pumilio* de procedencias central y marginal bajo los tratamientos control (C) y déficit hídrico (DH). A) Potencial hídrico de madrugada (ψ_{\max}) y B) potencial hídrico de mediodía (ψ_{\min}). Las comparaciones entre procedencias y tratamientos dentro de las procedencias se analizaron con tests no paramétricos de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples. Las comparaciones entre ψ_{\max} y ψ_{\min} para cada combinación de tratamiento/procedencia se analizaron con test pareados de Wilcoxon. Las diferencias significativas ($P < 0,1$) entre tratamientos dentro de cada procedencia se indican con distintas letras minúsculas y entre procedencias bajo el mismo tratamiento con distintas letras mayúsculas. Los resultados se presentan como medias \pm error estándar. Los test de Wilcoxon significativos se indican con asteriscos.



Capítulo V Discusión general



V.1 Discusión

Las poblaciones ubicadas hacia los márgenes de distribución de las especies han sido objeto de numerosos estudios biogeográficos. A lo largo de dichos márgenes se pueden analizar los procesos ecológico-evolutivos que influyen sobre las poblaciones y los límites de distribución de las especies. Existen numerosos trabajos que proveen el marco conceptual y evidencia empírica sobre las características de las poblaciones habitando hacia los márgenes de distribución de las especies. Un trabajo de revisión reciente sobre poblaciones marginales muestra que de un total de 248 trabajos sólo 1/3 mencionan explícitamente la hipótesis a analizar y sus consecuencias utilizando los sinónimos de abundancia –central, central-marginal o centro- periferia (Pironon et al., 2017). La mayoría de estos trabajos analizan las poblaciones marginales en cuanto a sus características demográficas, genéticas, ecológicas y geográficas. Sin embargo, la variación en los distintos tipos de marginalidad no siempre resultará concordante (Pironon et al., 2015) especialmente en el caso de especies que habitan gradientes ambientales diversos.

En años recientes existe interés creciente en los efectos del cambio climático ya que afecta el funcionamiento y la distribución de las poblaciones y especies, por lo que es crucial predecir sus efectos a mediano y largo plazo. En particular, las poblaciones marginales son relevantes en el contexto de cambio global en relación con el aumento de la temperatura y frecuencia de sequías extremas. Como consecuencia, las teorías biogeográficas predicen la expansión de las especies rastreando su óptimo ecológico hacia zonas relativamente más frías, hacia mayores latitudes y la alta montaña (Parmesan, 2006). Por otro lado, plantean la retracción del rango de las especies en áreas propensas a sufrir sequías y donde se predice que tendrá lugar la declinación o pérdida de poblaciones. Los extremos de retracción son importantes porque consisten de poblaciones que son generalmente pequeñas, están sujetas a la estocasticidad demográfica, crecen bajo condiciones ecológicamente subóptimas, estarían empobrecidas genéticamente y por lo tanto con limitado potencial para adaptarse a condiciones de estrés, se encuentran relativamente aisladas de otras poblaciones y por lo tanto sufrirían mayor riesgo de extinción

local ante cambio climático (Vila Cabrera et al., 2019). En esta tesis se buscó aportar a la discusión sobre el destino de poblaciones marginales de *Nothofagus pumilio* ubicadas hacia el límite seco de su distribución a latitudes medias de Patagonia, las cuales, podrían ser susceptibles de sufrir declinación poblacional. Se buscó integrar información geográfica y climática con genética en base a marcadores moleculares con distinta tasa de mutación, e información adaptativa utilizando cultivo en jardín común y experimentos manipulativos de estrés hídrico, para analizar la hipótesis de mayor vulnerabilidad hacia los márgenes de distribución.

Generalizaciones sobre las características genéticas que tendrían las poblaciones a lo largo de la distribución de las especies consideran que las ubicadas hacia los márgenes de distribución tendrían menor diversidad genética debido a los efectos de la deriva genética, que afecta en mayor medida a poblaciones pequeñas, y al aislamiento por sufrir de restringido flujo génico (Eckert et al., 2008). Sin embargo, los estudios empíricos lejos están de apoyar dichas predicciones (Pironon et al., 2015) y eso ocurre también en árboles (Tabla V.1). En el capítulo II de esta tesis se mostró que, contrariamente a lo esperado y utilizando distintos marcadores moleculares, las poblaciones marginales y centrales de *N. pumilio* poseen niveles similares de diversidad genética y divergencia interpoblacional. Algunos autores sostienen que la marginalidad ecológica explica mejor la variación del desempeño demográfico de las especies en comparación a gradientes geográficos, y que los factores contemporáneos e históricos pueden contribuir interactivamente a los patrones espaciales de variación genética (Pironon et al., 2017). Por tal razón, para investigar los patrones espaciales de la variación genética, es adecuado integrar las características ecológicas de las especies junto con el estudio de su distribución actual y pasada (Pironon et al., 2017).

En esta tesis se encontró que las características genéticas particulares halladas en las poblaciones marginales y centrales de *N. pumilio*, juntamente con relativamente similares niveles de variación genética en ambas regiones, sostienen la hipótesis de persistencia *in situ* a largo plazo tanto hacia la cordillera como hacia el extremo oriental, donde habría sobrevivido a las oscilaciones climáticas del pasado. Esta hipótesis de supervivencia en refugios

múltiples (*sensu* Premoli 1998; Premoli et al., 2000) ya fue sugerida para *N. pumilio* a lo largo de su distribución latitudinal, habiéndose demostrado que para dicha especie tolerante al frío, habría sido posible persistir localmente en áreas tan australes, i.e. frías, como Tierra del Fuego (Premoli et al., 2010). Los refugios son zonas con capacidad para desacoplar localmente las tendencias climáticas que ocurren a escala regional (Hampe y Jump, 2011) debido, por ejemplo, a particularidades del paisaje a escala local (Dobrowski, 2011). De la misma manera, la presencia de haplotipos únicos de una molécula relativamente conservada como el ADN del cloroplasto, tanto en poblaciones marginales como centrales, apoya la hipótesis de refugios a largo plazo. La naturaleza individual de cada especie genera distintas respuestas a cambios climáticos, las cuales implican que la ubicación de los refugios varía en función del clima y de las adaptaciones de cada especie o población (Stewart et al., 2010). Por lo tanto, es posible que algunas poblaciones de *N. pumilio* persistan también el actual cambio climático global en áreas con estabilidad ambiental, como relictos climáticos (Hampe y Jump, 2011), sobre todo poblaciones marginales que a su vez han demostrado poseer características adaptativas de resistencia al déficit hídrico (Capítulo IV de la presente tesis). El aporte de esta tesis a la identificación de refugios pasados, es de utilidad para sugerir refugios contemporáneos, y abre la posibilidad de estudiar procesos a escala fina que amortigüen los efectos sobre las especies a los rápidos cambios climáticos (Gavin et al., 2014). Por ejemplo, estudiar cómo actúan los factores fisiográficos que median la temperatura y el equilibrio hídrico y la escala a la cual funcionan (Dobrowski, 2011). Un conocimiento más profundo de cómo se forman y mantienen los relictos climáticos contribuirá a la comprensión de potenciales impactos del cambio climático sobre la distribución de las especies, y nuestra capacidad para identificar las poblaciones que se encuentren en mayor riesgo (Hampe y Jump, 2011).

Las especies que ocupan amplios rangos geográficos se encuentran sujetas a gradientes ambientales a los cuales responden a través de adaptación y plasticidad fenotípica. Los gradientes climáticos modelan la diversidad genética de especies de amplia distribución como *N. pumilio*. En el capítulo III de la presente tesis se encontró una fuerte relación entre el clima y

los diferentes gradientes ambientales (latitudinal, altitudinal y longitudinal). Las variables bioclimáticas más influyentes se encuentran relacionadas a las precipitaciones de verano y temperaturas de invierno, siendo la tendencia general de mayor diversidad genética a mayores precipitaciones y temperaturas moderadas. Estos resultados demuestran que la distribución espacial de la diversidad genética de *N. pumilio* no ocurre aleatoriamente, sino que sus patrones de estructuración responden a modelos climáticos. Se encontró que las poblaciones ubicadas hacia el norte, en mayores alturas y hacia los extremos secos serían más vulnerables al calentamiento dada la relativamente reducida diversidad genética que poseen para responder a nuevas condiciones. Sin embargo, la evaluación de la variación de caracteres cuantitativos, i.e. adaptativos, dentro de las especies complementando estudios de variación genética aportan información sobre los forzantes biogeográficos de las especies y sus nichos funcionales (Violle et al., 2014). Así, resultados del jardín común del capítulo IV de la presente tesis muestran que las poblaciones de *N. pumilio* que habitan los extremos del gradiente de precipitación del norte de la Patagonia presentan diferencias en el crecimiento y que, por haber sido mantenidas en condiciones de cultivo homogéneas, indican que las mismas poseen base genética. Sin embargo, a pesar que ciertas características adaptativas como la fenología han mostrado diferencias significativas y de base genética en poblaciones de *N. pumilio* provenientes de distintas alturas (Premoli et al., 2007), no fue el caso para las ubicadas bajo regímenes hídricos contrastantes mostrados en esta tesis. Dado que la fenología de brotación de las hojas se encuentra acoplada a la de la floración en *N. pumilio* (G. Juri comunicación personal), se podría postular que ritmos fenológicos similares mantendrían el flujo génico potencial entre dichas poblaciones. Sin embargo, a pesar de ello, presentan características arquitecturales y ecofisiológicas asociadas al uso del agua significativamente diferentes. En particular, el mayor crecimiento relativo y la mejor respuesta de los individuos provenientes del extremo seco a los experimentos de estrés hídrico pueden considerarse como adaptaciones de base genética al déficit hídrico, a diferencia de las poblaciones centrales que serían más susceptibles a la desecación. Es interesante destacar que estas diferencias adaptativas se mantienen a pesar del flujo génico relativamente bajo pero significativo (AMOVA para isoenzimas y microsatélites

del 3 y 6 %, respectivamente; Capítulo III) que existe entre las regiones marginal y central.

La información presentada en esta tesis busca también hacer un aporte a la conservación de una especie, que si bien tiene amplia distribución y por lo tanto difícilmente entraría en riesgo de extinción, posee alto valor por formar bosques puros de la cual dependen otras numerosas especies de epífitas, hemiparásitas, insectos, aves, etc. Por lo tanto, es relevante diseñar prácticas de conservación particularmente de poblaciones ubicadas hacia el extremo seco, donde es la única leñosa arbórea que crece en una matriz de estepa y mayormente fuera de áreas protegidas (Fig. V.1). La conservación bajo cambio climático puede beneficiarse de los modelos de distribución conocidos como modelos de distribución de las especies o modelos de nicho ecológico (en inglés Species distribution modelling SDM o Environmental (ecological) niche modelling ENM. Estos modelos permiten estimar la distribución potencial presente, pasada y/o futura de las especies con la mayor precisión posible (Sexton et al., 2009). Consisten en combinar conjuntos de datos ambientales y ocurrencia de las especies para estimar áreas de idoneidad climática (modelado de nicho) (Pearman et al., 2008). Con el objetivo de determinar la distribución potencial de *N. pumilio* en el futuro, y evaluar posibles impactos sobre su acervo genético debidos al cambio climático global, se realizó un modelado de nicho ecológico para el año 2100. Para ello se utilizaron el programa MAXENT y 19 variables bioclimáticas disponibles en WorldClim bajo el modelo climático global CCM3 y dos veces las condiciones actuales atmosféricas de dióxido de carbono (Govindasamy et al., 2003). Los resultados del modelado sugieren una pérdida del 30% de la distribución potencial actual hacia el este, donde se ubican las poblaciones marginales, y una ganancia del 12% de la distribución futura hacia el oeste, que corresponde a un 9% más del área de distribución actual (Fig. V.2). Según estos resultados las áreas potencialmente habitables por *N. pumilio* se moverán hacia el oeste en respuesta al cambio climático global en curso. Si bien los modelajes de nicho son de gran utilidad, no permiten estimar con precisión el clima regional, debido a que las características locales del terreno se desacoplan de las condiciones atmosféricas, por lo tanto, existe un creciente reconocimiento de las

limitaciones de los datos climáticos a gran escala en la conservación y la investigación del cambio climático global. Para sortear esta dificultad, estudios que utilicen datos climáticos a escala fina con información fisiográfica, podrían revelar ubicaciones potenciales de microrefugios en el pasado (Dobrowski, 2011) y que además tengan la posibilidad de albergar a las especies en el futuro. De todas maneras, la evidencia presentada en el Capítulo IV sugiere que las poblaciones del extremo oriental tendrían el potencial para responder a sequías, lo cual les confiere relevancia en conservación y como potencial fuente de propágulas para restauración bajo un régimen de sequías frecuentes.

La existencia de fuertes correlaciones entre los extremos climáticos y los límites del área de distribución de las especies, junto con los cambios históricos en su abundancia y ocurrencia, muestran que los límites del área de distribución pueden verse fuertemente afectados por el clima (Hardie y Hutchings, 2010). Dado el consenso general respecto a la rápida velocidad del cambio climático durante este siglo, muchas especies de árboles deberán modificar sus límites de adaptación y/o su rango de distribución como ha sucedido en otros períodos históricos (Davis y Shaw, 2001; Shea y Furnier, 2002). La evidencia presentada en el Capítulo III de la existencia de flujo génico histórico y contemporáneo entre poblaciones marginales y centrales de *N. pumilio* estimado con los distintos marcadores, sugiere la posibilidad de migración de la especie hacia el oeste rastreando su óptimo ecológico y modificando su rango actual de distribución.

Sin embargo, la rápida velocidad a la que está sucediendo el calentamiento global representa la mayor amenaza (Hampe y Jump, 2011), ya que tendrá lugar a tasas probablemente mayores a las que las especies pueden responder. En el caso particular de migraciones potenciales de las especies ante el cambio climático tendrán lugar en matrices complejas de uso antrópico (Thuiller et al., 2008). Se predice que estos cambios, entre ellos sequías, serán más marcados hacia los extremos de distribución de las especies (Jump et al., 2009). Sin embargo, poblaciones ubicadas hacia los límites de retracción durante los cambios en la distribución causados por el clima, como las poblaciones marginales de esta tesis, podrían persistir en refugios a escala

local (relictos climáticos) en condiciones ambientales propicias para la especie, pero rodeadas de un clima regional inhóspito (Hampe y Jump, 2011).

V.2 Conclusiones generales

La presente tesis generó conocimiento acerca de características genéticas neutrales y adaptativas de poblaciones marginales haciendo un aporte a los distintos tipos de marginalidad (ecológica, geográfica y genética). Se analizaron distintas ecológico-evolutivas que actúan sobre las poblaciones de *Nothofagus pumilio* ubicadas hacia los extremos de precipitación de su distribución en el norte de su rango. Es decir las poblaciones ubicadas hacia el extremo seco podrían considerarse marginales desde el punto de vista (1) ecológico, por encontrarse bajo estrés climático, (2) geográfico por encontrarse en el extremo seco de la distribución y (3) genético por consistir de poblaciones relativamente pequeñas y aisladas que sufrirían los efectos de la deriva genética y el aislamiento las que juntamente por encontrarse bajo presiones selección direccional resultarían en poblaciones genéticamente empobrecidas. La evidencia de similares niveles de diversidad y divergencia genética encontrada tanto en poblaciones marginales como centrales de *N. pumilio*, sugiere que la especie sobrevivió a largo plazo *in situ* en refugios múltiples las oscilaciones climáticas del pasado a lo largo del gradiente de precipitación (Capítulo II). Se encontró también que los patrones de distribución espacial de la diversidad genética de esta especie responden a modelos climáticos, siendo las precipitaciones de verano y temperaturas de invierno las variables bioclimáticas más influyentes (Capítulo III). En relación a las presiones de selección en hábitats marginales, se encontró que las poblaciones marginales de *N. pumilio* presentan adaptaciones al déficit hídrico a diferencia de las poblaciones centrales, que son más susceptibles a la desecación (Capítulo IV). Por lo tanto, debido a que la mayoría de las poblaciones marginales de *N. pumilio* se encuentran fuera de áreas protegidas, es necesario desarrollar medidas para proteger la variación adaptativa presente hacia el margen seco frente al pronóstico de aumento de temperaturas, e intensidad y frecuencia de sequías

en el norte de Patagonia. La información integral obtenida, sugiere entonces, que hacia los extremos xéricos de la distribución de *N. pumilio* existen áreas que pueden constituir refugios locales a largo plazo frente al cambio climático global. A su vez, los resultados obtenidos indican que, en el caso de las poblaciones de *N. pumilio* del área estudiada, la marginalidad geográfica no es concordante ni con la marginalidad ecológica ni con la marginalidad genética. Se concluye entonces que las poblaciones marginales y centrales de *N. pumilio* en el norte de Patagonia poseen características históricas, genéticas neutras y ecofisiológicas adaptativas diferentes que deben preservarse y manejarse mediante medidas de conservación independientes.

Tabla V.1 Trabajos documentados que compararon diversidad y divergencia genética entre poblaciones marginales (M) y centrales (C) de una especie.

Especie	Marcador	Diversidad	Divergencia	Cita
<i>Abies balsamea</i>	Isoenzimas	M<C	--	Shea y Furnier 2002
<i>Cryptomeria japonica</i>	Isoenzimas	M>C	M<C	Tsumura y Ohba 1992
<i>Picea sitchensis</i>	Microsatelites ADN nuclear	M=C	M=C	Gapare et al. 2005
<i>Pinus contorta latifolia</i>	Isoenzimas	M<C	--	Yeh y Layton 1979
<i>Pinus massoniana</i>	Microsatelites ADN nuclear y secuencias ADNc	M>C	M>C	Ge et al. 2012
<i>Pinus strobus</i>	Microsatelites ADN nuclear	M<C	M=C	Chhatre y Rajora 2014
<i>Pinus sylvestris</i>	Isoenzimas	M=C	M>C	Prus Glowacki et al 2012
<i>Thuja occidentalis</i>	Microsatelites ADN nuclear	M<C	M>C	Pandey y Rajora 2012
<i>Ulmus laevis</i>	Isoenzimas	M<C	M<C	Vakkari et al. 2009

Figura V.1 Ubicación geográfica de las 70 poblaciones de *Nothofagus pumilio* estudiadas y áreas protegidas.

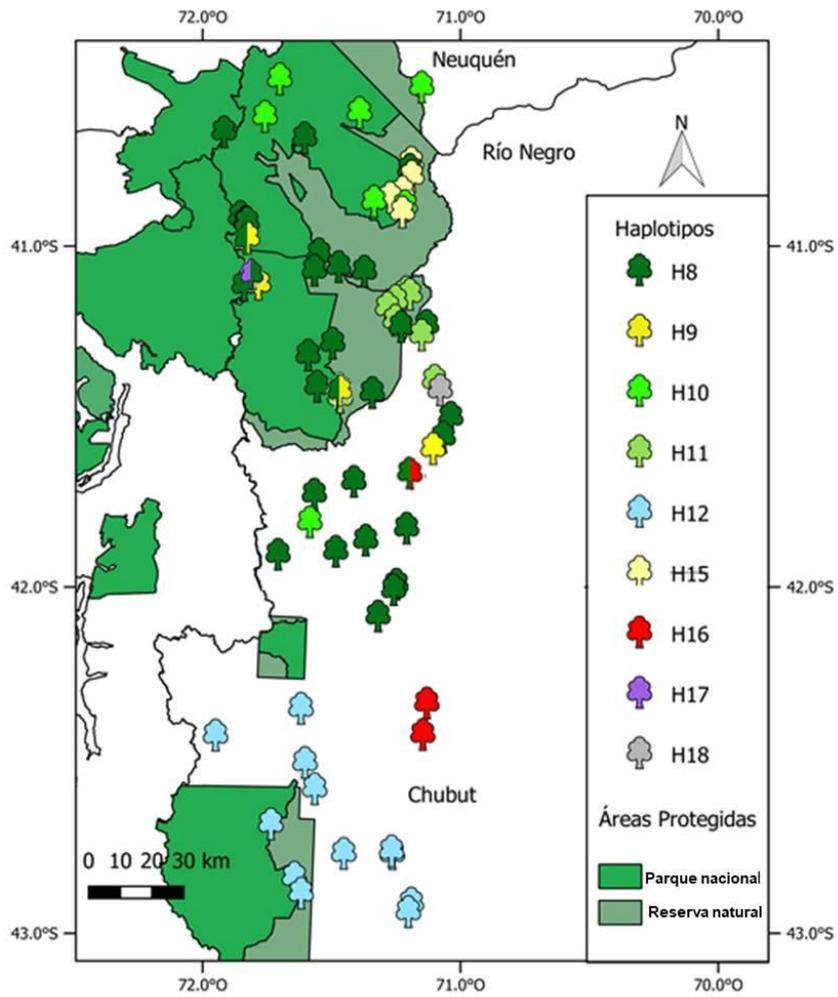
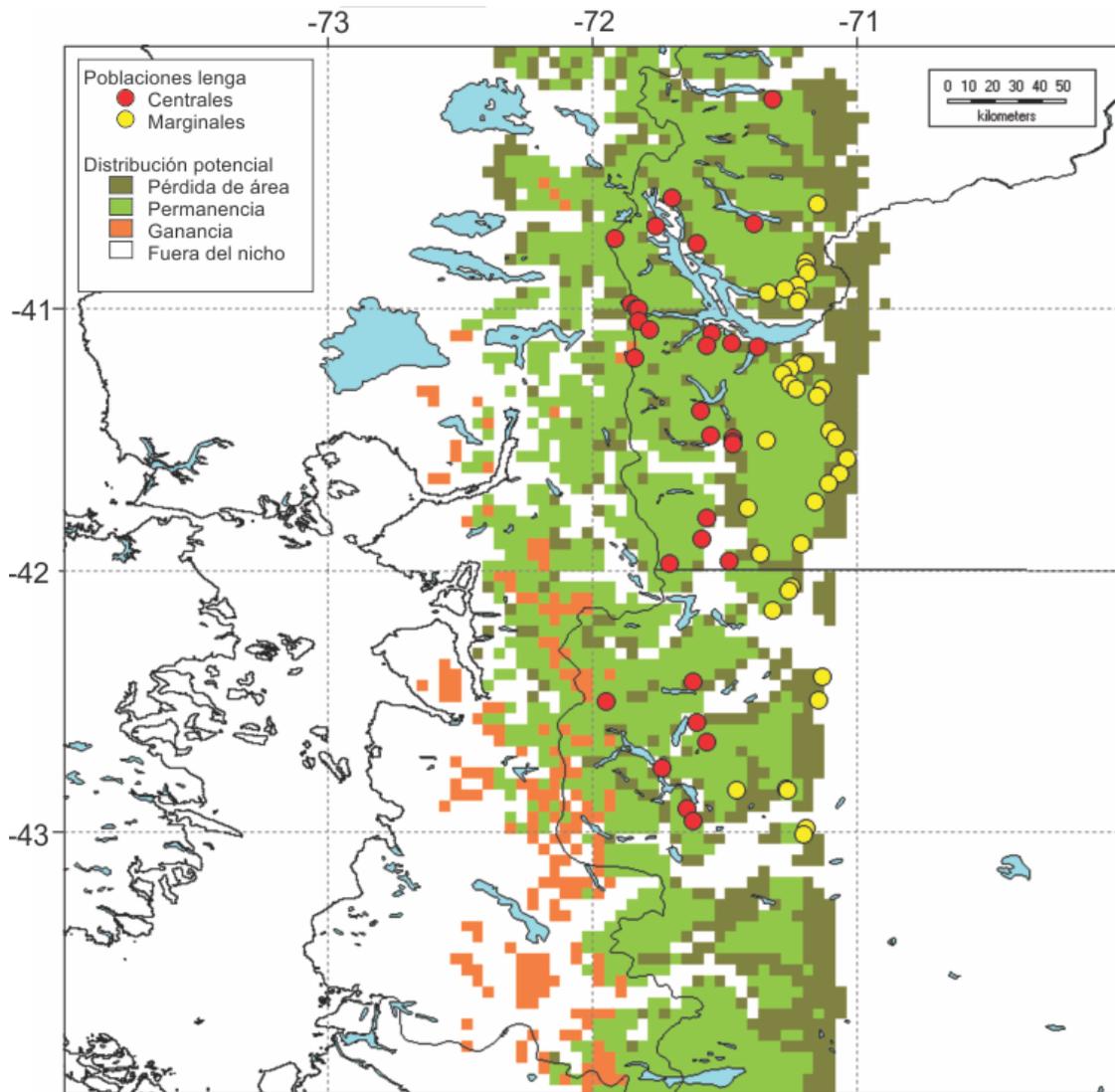


Figura V.1. Cambio en la distribución potencial de *Nothofagus pumilio* modelado para el año 2100.



Referencias

- Abeli, T., Vamosi, J.C., Orsenigo, S. 2018. The importance of marginal population hotspots of cold-adapted species for research on climate change and conservation. *Journal of Biogeography* 45: 977–985.
- Acosta, M.C., Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2014. Retracing the evolutionary history of *Nothofagus* in its geo-climatic context: new developments in the emerging field of phylogeology. *Geobiology* 12: 497–510.
- Acosta, M.C., Premoli, A.C. 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, *Nothofagaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 235–242.
- Ackerly, D., Knight, C., Weiss, S., Barton, K., Starmer, K. 2002. Leaf size, specific leaf area and microhabitat distribution of chaparral woody plants: contrasting patterns in species level and community level analyses. *Oecologia* 130: 449–457
- Aitken, S.N., Whitlock, M.C. 2013. Assisted Gene Flow to Facilitate Local Adaptation to Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 44: 367–388.
- Alberdi, L. 1987. Ecofisiología de especies chilenas del género *Nothofagus*. *Bosque* 8: 77–84.
- Allen, C.D., Macalady, A.K., Chenchouni, H., Bachelet, D., McDowell, N., Vennetier, M., Kitzberger, T. et al. 2010. A global overview of drought and heat-induced tree mortality reveals emerging climate change risks for forests. *Forest Ecology and Management* 259: 660–684.
- Ambrose, A.R., Baxter, W.L., Wong, C.S., Næsborg, R.R., Williams, C.B., Dawson, T.E. 2015. Contrasting drought-response strategies in California redwoods. *Tree Physiology* 35: 453–469.
- Arbetman, M.P., Premoli, A.C. 2011. Oldies (but Goldies!): Extracting DNA from cryopreserved allozyme homogenates. *Journal of Heredity* 102: 764–769.
- Azpilicueta, M.M., Marchelli, P., Gallo, L. A. 2009. The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics & Genomes* 5: 561–571.
- Barreda, V., Anzótegui, L.M., Prieto, A.R., Aceñolaza, P., Bianchi, M., Borromei, A.M., Brea, M. et al. 2007. Diversificación y cambios de las angiospermas durante el Neógeno en Argentina. *Asociación Paleontologica Argentina* 173–191.
- Barrera, M.D., Frangi, J.L., Richter, L.L., Perdomo, M.H., Pinedo, L.B. 2000. Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal Of Vegetation*

Science 11: 179–188.

- Beerli, P., Palczewski, M. 2010. Unified framework to evaluate panmixia and migration direction among multiple sampling locations. *Genetics* 185: 313–326.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the False Discovery Rate : A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing Author (s): Yoav Benjamini and Yosef Hochberg Source : Journal of the Royal Statistical Society . Series B (Methodological), Vol . 57 , No . 1 Published by : *Journal of the Royal Statistical Society, Series B (Methodological)* 57: 289–300.
- Biere, A., Verhoeven, K.J.F. 2008. Local adaptation and the consequences of being dislocated from coevolved enemies. *New Phytologist* 180: 265–268.
- Birkeland, S., Elisabeth Borgen Skjetne, I., Krag Brysting, A., Elven, R., Greve Alsos, I. 2017. Living on the edge: Conservation genetics of seven thermophilous plant species in a High Arctic archipelago. *AoB Plants* 9: plx001.
- Blackman, C.J., Gleason, S.M., Chang, Y., Cook, A.M., Laws, C., Westoby, M. 2014. Leaf hydraulic vulnerability to drought is linked to site water availability across a broad range of species and climates. *Annals of Botany* 114: 435–440.
- Blisniuk, P.M., Stern, L.A., Chamberlain, C.P., Idleman, B., Zeitler, P.K. 2005. Climatic and ecologic changes during Miocene surface uplift in the Southern Patagonian Andes. *Earth and Planetary Science Letters* 230: 125–142.
- Blisniuk, P.M., Stern, L.A., Chamberlain, C.P., Zeitler, P.K., Ramos, V.A., Sobel, E.R., Haschke, M. et al. 2006. Links between Mountain Uplift , Climate , and Surface Processes in the Southern Patagonian Andes 429-440 in O. Oncken, G. Chong, G. Franz, P. Giese, H-J. Götze, V. A. Ramos, M. R. Strecker, and P. Wigger. *The Andes: Active Subduction Orogeny*. Frontiers in Earth Sciences. Springer Verlag. Berlin.
- Brewer, C.A., Smith, W.K. 1997. Patterns of leaf surface wetness for montane and subalpine plants. *Plant, Cell and Environment* 20: 1–11.
- Broennimann, O., Thuiller, W., Hughes, G., Midgley, G.F., Alkemade, J.M.R., Guisan, A. 2006. Do geographic distribution, niche property and life form explain plants' vulnerability to global change? *Global Change Biology* 12: 1079–1093.
- Brown, J.H. 1984. On the relationship between abundance and distribution of species. *The American Naturalist* 124: 255–279.
- Brussard, P.F. 1984. Geographic Patterns and Environmental Gradients: The Central-Marginal Model in *Drosophila* Revisited. *Annual Review of Ecology and Systematics* 15: 25–64.
- Bucci, S.J., Scholz, F.G., Goldstein, G., Meinzer, F.C., Franco, A.C., Zhang, Y.,

- Hao, G.Y. 2008. Water relations and hydraulic architecture in Cerrado trees: Adjustments to seasonal changes in water availability and evaporative demand. *Brazilian Journal of Plant Physiology* 20: 233–245.
- Bucci, S.J., Scholz, F.G., Campanello, P.I., Montti, L., Jimenez-Castillo, M., Rockwell, F. a, Manna, L. La et al. 2012. Hydraulic differences along the water transport system of South American *Nothofagus* species: do leaves protect the stem functionality? *Tree physiology* 32: 880–893.
- Bucci, S.J., Scholz, F.G., Peschiutta, M.L., Arias, N.S., Meinzer, F.C., Goldstein, G. 2013. The stem xylem of Patagonian shrubs operates far from the point of catastrophic dysfunction and is additionally protected from drought-induced embolism by leaves and roots. *Plant, Cell and Environment* 36: 2163–2174.
- Burgess, S.C., Treml, E.A., Marshall, D.J. 2012. How do dispersal costs and habitat selection influence realized population connectivity? *Ecology* 93: 1378–1387.
- Carnaval, A.C., Hickerson, M.J., Haddad, C.F.B. 2009. Stability Predicts Genetic Diversity in the Brazilian Atlantic Forest Hotspot. *Science* 323: 785–789.
- Chaves, M.M., Maroco, J.P., Pereira, J.S. 2003. Understanding plant responses to drought - From genes to the whole plant. *Functional Plant Biology* 30: 239–264.
- Cochard, H., Coll, L., Le Roux, X., Ameglio, T. 2002. Unraveling the effects of plant hydraulics on stomatal closure during water stress in walnut. *Plant Physiology* 128: 282–290.
- Cosacov, A., Sérsic, A.N., Sosa, V., Johnson, L.A., Cocucci, A.A. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes : the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography* 37: 1463– 1477.
- Couvet, D. 2002. Deleterious Effect of Restricted GeneFlow in Fragmented Populations. *Conservation Biology* 16: 369–376.
- Crandall, K.A., Templeton, A.R. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959–969.
- Cuevas, J.G. 1999. Dinámica poblacional en el límite arbóreo superior de *Nothofagus pumilio* en Tierra del Fuego. PhD Thesis, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Cuevas, J.G. 2000. Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. *Journal of ecology* 88: 840–855.
- Daniels, L.D. 2000. The dynamics of altitudinal treelines in northern Patagonia: spatio- temporal influences of climate. Dissertation. Department of Geography, University of Colorado, Boulder, Colorado, USA.

- Daniels, L.D., Veblen, T.T. 2004. Spatiotemporal influences of climate on altitudinal treeline in northern Patagonia. *Ecology* 85: 1284–1296.
- Davis, M.B., Shaw, R.G. 2001. Range shifts and adaptive responses to quaternary climate change. *Science* 292: 673–679.
- De Villemeireuil, P., Gaggiotti, O. E., Mouterde, M., Till-Bottraud, I. 2016. Common garden experiments in the genomic era: New perspectives and opportunities. *Heredity*, 116: 249–254.
- Dobrowski, S.Z. 2011. A climatic basis for microrefugia: The influence of terrain on climate. *Global Change Biology* 17: 1022–1035.
- Donoso C. 1981. Tipos forestales de los bosques nativos de Chile, Documento de Trabajo No 38. Investigación y Desarrollo Forestal (CONAF-PNUD-FAO).
- Donoso, C. 1987. Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque*, 8: 85- 97.
- Donoso, C. 1995. Bosques templados de Chile y Argentina. 3ra ed. Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Dumolin, S., Demesure, B., Petit, R.J. 1995. Inheritance of chloroplast and mitochondrial genomes in pedunculate oak investigated with an efficient PCR method. *Theoretical and Applied Genetics* 91: 1253–1256.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., Loughheed, S.C. 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molecular ecology* 17: 1170–1188.
- Eidesen, P.B., Alsos, I.G., Popp, M., Stensrud, Suda, J., Brochmann, C. 2007. Nuclear vs. plastid data: Complex Pleistocene history of a circumpolar key species. *Molecular Ecology* 16: 3902–3925.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology* 14: 2611–2620.
- Ezcurra C., Brion, C. 2005. Plantas del Nahuel Huapi, catálogo de la flora vascular del Parque Nacional Nahuel Huapi, Argentina. Universidad Nacional del Comahue y Red Latinoamericana de Botánica, San Carlos de Bariloche. ISBN 987-1154-34-8.
- Fajardo, A., Piper, F.I. 2011. Intraspecific trait variation and covariation in a widespread tree species (*Nothofagus pumilio*) in southern Chile. *New Phytologist* 189: 259–271.
- Fernández, M.E., Gyenge, J. 2010. *Técnicas de medición en ecofisiología vegetal: Conceptos y procedimientos*. Ediciones INTA, Buenos Aires.
- Ferreira, M., Clayton, S., Ezcurra, C. 1998. La flora altoandina de los sectores este y oeste del Parque Nacional Nahuel Huapi. *Darwiniana* 36: 65–79.

- Flexas, J., Carriquí, M., Nadal, M. 2018. Gas exchange and hydraulics during drought in crops: Who drives whom? *Journal of Experimental Botany* 69: 3791–3795.
- Gallopín, G. C. 1978. Estudio ecológico integrado de la cuenca superior del Río Manso Superior (Río Negro, Argentina). I. Descripción general de la cuenca. *Anales de Parques Nacionales* 14: 161–230
- Gaston, K. J. 2003 The structure and dynamics of geographic ranges. Oxford, UK: Oxford University Press.
- Gavin, D.G., Fitzpatrick, M.C., Gugger, P.F., Heath, K.D., Dobrowski, S.Z., Hampe, A., Hu, F.S. et al. 2014. Climate refugia : joint inference from fossil records, species distribution models and phylogeography. *New Phytologist* 204: 37–54.
- Glasser, N.F., Jansson, K.N., Harrison, S., Kleman, J. 2008. The glacial geomorphology and Pleistocene history of South America between 38° S and 56° S. *Quaternary Science Reviews* 27: 365–390.
- Goldstein, G., Rada, F., Orozco, A, Montilla, M., Zabala, O., Cavelier, J., Azócar, A. 1989. Mantenimiento del turgor en especies leñosas tropicales: un modelo basado en cambios estacionales de osmolaridad y elasticidad. *Monographs in Systematic Botany from the Missouri Botanical Garden* 27: 37–49.
- Govindasamy, B., Duffy, P.B., Coquard, J. 2003. High-resolution simulations of global climate, part 2: Effects of increased greenhouse cases. *Climate Dynamics* 21: 391–404.
- Guillot, G., Leblois, R., Coulon, A., Frantz, A.C. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* 18: 4734–4756.
- Hampe, A., Jump, A.S. 2011. Climate Relicts : Past , Present , Future. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 42: 313–333.
- Hardie, D.C., Hutchings, J.A. 2010. Evolutionary ecology at the extremes of species' ranges. *Environmental Reviews* 18: 1–20.
- Heinemann, K., Kitzberger, T., Veblen, T.T. 2000. Influences of gap microheterogeneity on the regeneration of *Nothofagus pumilio* in a xeric old-growth forest of northwestern Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 25–31.
- Hengelveld, R., Haeck, J. 1982. The Distribution of Abundance . *Journal of Biogeography* 9: 303–316.
- Hewitt, G. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 87–112.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–13.
- Hoffmann, A.A., Hercus, M.J. 2000. Environmental stress as an evolutionary

- force. *BioScience* 50: 217–226.
- Hueck K. 1978. Los bosques de Sudamérica. Ecología, composición e importancia económica. Publicación de la Sociedad Alemana de Cooperación Técnica, Echborn, Alemania. 476 pp.
- IPCC. 2014. *Climate Change 2013 - The Physical Science Basis*. Intergovernmental Panel on Climate Change (ed.),. Cambridge University Press, Cambridge.
- Jones, R.C., Vaillancourt, R.E., Jordan, G.J. 2004. Microsatellites for use in *Nothofagus cunninghamii* (*Nothofagaceae*) and related species. *Molecular Ecology Notes* 4: 14–16.
- Jump, A.S., Marchant, R., Peñuelas, J. 2008. Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends in Plant Science* 14: 51–58.
- Jump, A.S., Mátyás, C., Peñuelas, J. 2009. The altitude-for-latitude disparity in the range retractions of woody species. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 694–701.
- Kapeller, S., Dieckmann, U., Schueler, S. 2016. Varying selection differential throughout the climatic range of Norway spruce in Central Europe. *Evolutionary Applications* 10: 25–38.
- Kawecki, T.J. 2008. Adaptation to Marginal Habitats. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 39: 321–342.
- Kirk, H., Freeland, J.R. 2011. Applications and Implications of Neutral versus Non-neutral Markers in Molecular Ecology. *International Journal of Molecular Sciences* 12: 3966–3988.
- Kirkpatrick, M., Barton, N.H. 1997. Evolution of a Species' Range. *American Naturalist* 150: 1–23.
- Klein, T. 2014. The variability of stomatal sensitivity to leaf water potential across tree species indicates a continuum between isohydric and anisohydric behaviours. *Functional Ecology* 28: 1313–1320.
- Kopp, M., Matuszewski, S. 2014. Rapid evolution of quantitative traits: Theoretical perspectives. *Evolutionary Applications* 7: 169–191.
- Körner, C. 2007. The use of “altitude” in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 569–574.
- Kramer, P.J., Boyer, J.S. 1995. *Water Relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego. 495
- Kreyling, J., Buhk, C., Backhaus, S., Hallinger, M., Huber, G., Huber, L., Jentsch, A. et al. 2014. Local adaptations to frost in marginal and central populations of the dominant forest tree *Fagus sylvatica* L. as affected by temperature and extreme drought in common garden experiments. *Ecology and Evolution* 4: 594–605.

- Lambers H, Chapin FS, Pons TL. 1998. Plant physiological ecology. Springer-Verlag New York, NY, USA.
- Lara, A., Villalba, R., Wolodarsky-Franke, A., Aravena, J.C., Luckman, B.H., Cuq, E. 2005. Spatial and temporal variation in *Nothofagus pumilio* growth at tree line along its latitudinal range (35°40'-55° S) in the Chilean Andes. *Journal of Biogeography* 32: 879–893.
- Lawton, J. 1993. Range, Population Abundance and Conservation. *Tree* 8: 409–413.
- Lesica, P., Allendorf, F.W. 1995. When Are Peripheral Populations Valuable for Conservation? *Conservation Biology* 9: 753–760.
- López Bernal, P.M., Deffossé, G.E., Quinteros, P.C., Bava, J.O. 2012. Sustainable Management of Lenga (*Nothofagus pumilio*) Forests Through Group Selection System. *Intech open* 2: 45–66.
- Luikart, G., Allendorf, F.W., Cornuet, J., Sherwin, W.B. 1998. Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *The American Genetic Association* 89: 238–247.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., Taberlet, P. 2003. Landscape genetics: Combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189–197.
- Marchelli, P., Caron, H., Azpilicueta, M.M., Gallo, L.A. 2008. Primer note: A new set of highly polymorphic nuclear microsatellite markers for *Nothofagus nervosa* and related South American species. *Silvae Genetica* 57: 82–85.
- Marchelli, P., Gallo, L.A. 2006. Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation genetics* 4: 591–603
- Markgraf, V., McGlone, M., Hope, G. 1995. Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems - a southern perspective. *Tree* 4: 143–147.
- Markgraf, V. y McGlone, M. 2006. Southern temperate ecosystem responses. En: T.E. Lovejoy y L. Hannah (eds.), *Climate change and biodiversity*, Yale University Press, New Haven and Londres. pp. 142-156.
- Martin-StPaul, N., Delzon, S., Cochard, H. 2017. Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. *Ecology Letters* 20: 1437–1447.
- Martinez-Vilalta, J., Cochard, H., Mencuccini, M., Sterck, F.J., Herrero, A., Korhonen, J.F.K., Llorens, P. et al. 2009. Hydraulic adjustment of Scots pine across Europe. *New Phytologist* 184: 353–364.
- Martínez Pastur, G. 1997. Germinación de semillas y sistemas de propagación clonal en bosques de *Nothofagus pumilio* de Tierra del Fuego. En *II° Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano.*, pp. 13–15.
- Martínez Pastur, G., Peri, P.L., Fernández, M.C., Staffieri, G., 1999. Desarrollo

- de la regeneración a lo largo del ciclo del manejo forestal de un bosque de *Nothofagus pumilio*: 1. Incidencia de la cobertura y el aprovechamiento o cosecha. *Bosque* 20: 39–46.
- Martínez Pastur, G., Lencinas, M.V., Peri, P.L., Arena, M. 2007. Photosynthetic plasticity of *Nothofagus pumilio* seedlings to light intensity and soil moisture. *Forest Ecology Management* 243: 274–282.
- Maseda, P.H., Fernández, R.J. 2006. Stay wet or else: Three ways in which plants can adjust hydraulically to their environment. *Journal of Experimental Botany* 57: 3963–3977.
- Mathiasen, P. 2010. Variación y estructura genética en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endle) Krasser "lenga" a lo largo de diferentes gradientes ambientales Tesis Doctoral. Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Rio Negro, Argentina
- Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2010. Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (*Nothofagaceae*) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular ecology* 19: 371–85.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2013. Fine-scale genetic structure of *Nothofagus pumilio* (lenga) at contrasting elevations of the altitudinal gradient. *Genetica* 141: 95–105.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2016. Living on the edge: adaptive and plastic responses of the tree *Nothofagus pumilio* to a long-term transplant experiment predict rear-edge upward expansion. *Oecologia* 181: 607–619.
- Matthies, D., Brauer, I., Maibom, W., Tschardt, T. 2004. Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105: 481–488.
- McDowell, N., Pockman, W. T., Allen, C. D., Breshears, D. D., Cobb, N., Kolb, T., Plaut, J., Sperry, J., West, A., Williams, D. G., Yee, E. A. 2008. Mechanisms of plant survival and mortality during drought: why do some plants survive while others succumb to drought? *New Phytologist* 178:719–739.
- Mercer, J.H. 1976. Glacial history of Southernmost South America. *Quaternary Research* 6: 125–166.
- Millar, C. I. y W. J. Libby. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. En: Genetics and Conservation of Rare Plants (eds Falk DA, Holsinger KE), 149–170. Oxford University Press, New York.
- Mitchell, P.J., Veneklaas, E.J., Lambers, H., Burgess, S.S.O. 2008. Leaf water relations during summer water deficit: Differential responses in turgor maintenance and variation in leaf structure among different plant communities in south-western Australia. *Plant, Cell and Environment* 31: 1791–1802.

- Moritz, C., Langham, G., Kearney, M., Krockenberger, A., VanDerWal, J., Williams, S. 2012. Integrating phylogeography and physiology reveals divergence of thermal traits between central and peripheral lineages of tropical rainforest lizards. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 367: 1680–1687.
- Movia, C., Soriano, A., Leon, R. 1987. La vegetación de la cuenca del rio santa cruz (provincia de santa cruz, argentina). *Darwiniana* 28: 9–78.
- Murphy, R.W., Sites, J.W., Buth, D.G., Haufler, C.H. 1996. *Proteins: Isozyme electrophoresis*. En: Hilli DM, Moritz C, Mable BK (eds) Molecular systematic. Sinauer Associates, Massuchestts, USA.
- Nardini, A., Pedà, G., La Rocca, N. 2012. Trade-offs between leaf hydraulic capacity and drought vulnerability : Morpho-anatomical bases , carbon costs and ecological consequences. *New Phytologist* 196: 788–798.
- Nguyen, Q.N., Polle, A., Pena, R. 2017. Intraspecific variations in drought response and fitness traits of beech (*Fagus sylvatica* L.) seedlings from three provenances differing in annual precipitation. *Trees* 31: 1215–1225.
- Nosil, P., Vines, T.H., Funk, D.J. Perspective: reproductive isolation caused by natural selection against immigrants Divergent Habitats. *Evolution* 59: 705–719.
- Papuga, G., Gauthier, P., Pons, V., Farris, E., Thompson, J.D. 2018. Ecological niche differentiation in peripheral populations: a comparative analysis of eleven Mediterranean plant species. *Ecography* 41: 1650–1664.
- Park, G.E., Lee, D.K., Kim, K.W., Batkhuu, N.O., Tsogtbaatar, J., Zhu, J.J., Jin, Y. et al. 2016. Morphological characteristics and water-use efficiency of siberian elm trees (*Ulmus pumila* L.) within arid regions of northeast asia. *Forests* 7: 280-299.
- Parmesan, C. 1996. Climate and species' range. *Nature* 382: 765–766.
- Parmesan, C. 2006. Ecological and Evolutionary Responses to Recent Climate Change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 637–669.
- Parmesan, C., Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421: 37–42.
- Paruelo, J.M., Beltran, A., Jobbagy, E., Sala, O.E., Golluscio, R.A. 1998. The climate of Patagonia: General patterns and controls on biotic processes. *Ecologia Austral* 8: 85–101.
- Pastorino, M.J., Marchelli, P., Milleron, M., Soliani, C., Gallo, L. A. 2009. The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus antarctica*. *Genetica* 136: 79–88.
- Pearman, P.B., Guisan, A., Broennimann, O., Randin, C.F. 2008. Niche dynamics in space and time. *Trends in Ecology and Evolution* 23: 149–158.

- Peri, P.L., Martínez Pastur, G., Lencinas, M. V. 2009. Photosynthetic response to different light intensities and water status of two main *Nothofagus* species of southern Patagonian forest, Argentina. *Journal of Forest Science* 55: 101–111.
- Peterson, T.A., Sanchez-Cordero, V., Soberon, J., Bartley, J., Buddemeier, R.W., Navarro-Sigüenza, A.G., Peterson, A.T., Navarro-Sigüenza, A.G. 2001. Effects of global climate change on geographic distributions of Mexican *Cracidae*. *Ecological Modelling* 144: 21–30.
- Petit, R.J., Aguinagalde, I., de Beaulieu, J.-L., Bittkau, C., Brewer, S., Cheddadi, R., Ennos, R. et al. 2003. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science* 300: 1563–1565.
- Petit, R.J., Duminil, J., Fineschi, S., Hampe, A., Salvini, D., Vendramin, G.G. 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology* 14: 689–701.
- Pierce BA. Genetics: a conceptual approach. 4ed. W. H. Freeman Publisher. USA. 2010. p. 400.
- Piper, F.I., Fajardo, A., Cavieres, L.A. 2013. Simulated warming does not impair seedling survival and growth of *Nothofagus pumilio* in the southern Andes. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 15: 97–105.
- Pironon, S., Papuga, G., Villellas, J., Angert, A.L., García, M.B., Thompson, J.D. 2017. Geographic variation in genetic and demographic performance: new insights from an old biogeographical paradigm. *Biological Reviews* 92: 1877–1909.
- Pironon, S., Villellas, J., Morris, W.F., Doak, D.F., García, M.B. 2015. Do geographic, climatic or historical ranges differentiate the performance of central versus peripheral populations? *Global Ecology and Biogeography* 24: 611–620.
- Premoli, A.C. 1996. Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hybridization of South American *Nothofagus*. *Genetica* 97: 55–64.
- Premoli, A.C. 1997. Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography* 24: 883–892.
- Premoli, A.C. 1998. Use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas for more widespread species. In: Proceedings of an International Workshop on Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management (ed. International Foundation for Science), pp. 157–171. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, Brazil.
- Premoli, A.C. 2003. Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity* 94: 218–226.
- Premoli, A.C. 2004. Variación en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Lenga). En *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los*

bosques templados de Chile y Argentina, (eds. Donoso C, Premoli AC, Gallo L, Iliniza R), pp. 145- 166. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, Chile.

- Premoli, A.C., Brewer, C.A. 2007. Environmental v. genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Australian Journal of Botany* 55: 585–591.
- Premoli, A.C., Mathiasen, P. 2011. Respuestas ecofisiológicas adaptativas y plásticas en ambientes secos de montaña: *Nothofagus pumilio*, el árbol que acaparó los andes australes. *Ecología Austral* 21: 251–269.
- Premoli, A.C., Kitzberger, T., Veblen, T.T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251-260
- Premoli, A.C., Raffaele, E., Mathiasen, P. 2007. Morphological and phenological differences in *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations: Evidence from a common garden. *Austral Ecology* 32: 515–523.
- Premoli, A.C., Mathiasen, P., Kitzberger, T. 2010. Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: Genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54°S) glacial refugia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 298: 247–256.
- Premoli, A.C., Acosta, M.C., Mathiasen, P., Quiroga, M.P., Souto, C.P. 2011. Tendiendo puentes entre la ecología evolutiva y la conservación del mundo vertical. *Journal of Basic & Applied Genetics* 20: 1-8.
- Premoli, A.C., Acosta, M.C., Mathiasen, P., Donoso, C. 2012a. Variación genética en *Nothofagus* (subgénero *Nothofagus*). *Bosque* 33: 115–125.
- Premoli, A.C., Mathiasen, P., Acosta, M.C, Ramos, V. A. 2012b. Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be? *New Phytologist* 193: 261–275.
- Pruett, C.L., Winker, K. 2008. Evidence for cryptic northern refugia among high- and temperate-latitude species in Beringia: A response to Stewart and Dalén. 2008. *Climatic Change* 86: 23–27.
- Quiroga, M.P., Premoli, A.C. 2010. Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (*Podocarpaceae*) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 285: 186–193.
- Quiroga, M.P., Premoli, A.C. 2013. El rol de las poblaciones marginales en la conservación del acervo genético de la única conífera del sur de Yungas en Argentina y Bolivia, *Podocarpus parlatorei* (*Podocarpaceae*). *Ecología en Bolivia* 48: 4-16.
- Quiroga, M.P., Vidal Russell, R.A., Premoli, A.C. 2005. Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patagónico. *Bosque* 26: 25–32.

- Rabassa, J. 2008. Late Cenozoic Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Science* 11: 151–204.
- Rabassa, J., Coronato, A. 2009. Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego during the Ensenadan Stage / Age (Early Pleistocene – earliest Middle Pleistocene). *Quaternary International* 210: 18–36.
- Rabassa, J., Coronato, A.M., Salemme, M. 2005. Chronology of the Late Cenozoic Patagonian glaciations and their correlation with biostratigraphic units of the Pampean region (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences* 20: 81–103.
- Raven, J.A. 2002. Selection pressures on stomatal evolution. *New Phytologist* 153: 371–386.
- Reed, D.H., Frankham, R. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17: 230–237.
- Reichstein, M., Bahn, M., Mahecha, M.D., Kattge, J., Baldocchi, D.D. 2014. Linking plant and ecosystem functional biogeography. *Proceedings of the national academy of sciences* 111: 13697–13702.
- Rodríguez-Catón, M., Villalba, R., Srur, A.M., Luckman, B. 2015. Long-term trends in radial growth associated with *Nothofagus pumilio* forest decline in Patagonia: Integrating local- into regional-scale patterns. *Forest Ecology and Management* 339: 44–56.
- Rodríguez-catón, M., Villalba, R., Morales, M., Srur, A. 2016. Influence of droughts on *Nothofagus pumilio* forest decline across northern Patagonia , Argentina. *Ecosphere* 7: 1–17.
- Rusch, V.E. 1993. Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 66: 131–141.
- Sabatier, Y., Azpilicueta, M.M., Marchelli, P., González-Peñalba, M., Lozano, L., García, L., Martínez, A. et al. 2011. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46: 131–138.
- Safriel, U.N., Volis, S., Kark, S. 1994. Core and Peripheral Populations and Global Climate Change. *Israel Journal of Plant Sciences* 42: 331–345.
- Sagarin, R.D., Gaines, S.D. 2002. The “abundant centre” distribution: To what extent is it a biogeographical rule? *Ecology Letters* 5: 137–147.
- Sagarin, R.D., Gaines, S.D., Gaylord, B. 2006. Moving beyond assumptions to understand abundance distributions across the ranges of species. *Trends in ecology and evolution* 21: 524–530.
- Saito, T., Terashima, I. 2004. Reversible decreases in the bulk elastic modulus of mature leaves of deciduous *Quercus* species subjected to two drought treatments. *Plant, Cell and Environment* 27: 863–875.
- Scholz, F.G., Bucci, S.J., Arias, N., Meinzer, F.C., Goldstein, G. 2012. Osmotic and elastic adjustments in cold desert shrubs differing in rooting depth:

- Coping with drought and subzero temperatures. *Oecologia* 170: 885–897.
- Schultz, H.R. 2003. Differences in hydraulic architecture account for near-isohydric and anisohydric behaviour of two field-grown *Vitis vinifera* L. cultivars during drought. *Plant, Cell and Environment* 26: 1393–1406.
- Sérsic, A.N., Cosacov, A., Cocucci, A. A., Johnson, L. A., Pozner, R., Avila, L.J., SITES Jr., J.W., Morando, M. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 475–494.
- Sexton, J.P., Dickman, E.E. 2016. What can local and geographic population limits tell us about distributions? *American Journal of Botany* 103: 129–139.
- Sexton, J.P., McIntyre, P.J., Angert, A.L., Rice, K.J. 2009. Evolution and Ecology of Species Range Limits. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40: 415–436.
- Sexton, J.P., Hangartner, S.B., Hoffmann, A.A. 2014. Genetic isolation by environment or distance: Which pattern of gene flow is most common? *Evolution* 68: 1–15.
- Sgrò, C.M., Lowe, A.J., Hoffmann, A.A. 2011. Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications* 4: 326–337.
- Shea, K.L., Furnier, G.R. 2002. Genetic variation and population structure in central and isolated population of Balsam Fir, *Abies Balsamea* (Pinaceae). *American journal of botany* 89: 783–791.
- Skelton, R.P., West, A.G., Dawson, T.E. 2015. Predicting plant vulnerability to drought in biodiverse regions using functional traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112: 5744–5749.
- Slatyer, R.O., Taylor, S.A. 1960. Terminology in plant- and soil-water relations. *Nature* 187: 922–924.
- Soliani, C., Tsuda, Y., Bagnoli, F., Gallo, L. A., Vendramin, G.G., Marchelli, P. 2015. Halfway encounters: Meeting points of colonization routes among the southern beeches *Nothofagus pumilio* and *N. antarctica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85: 197–207.
- Soriano, A. 1956. Los distritos florísticos de la provincia Patagónica. *Revista de Investigaciones Agropecuarias* 10: 323-347.
- Souto, C.P., Premoli, A.C. 2007. Genetic variation in the widespread *Embothrium coccineum* (Proteaceae) endemic to Patagonia : effects of phylogeny and historical events. *Australian journal of botany* 55: 809–817.
- Souto, C.P., Kitzberger, T., Arbetman, M.P., Premoli, A.C. 2015. How do cold-sensitive species endure ice ages ? Phylogeographic and paleodistribution models of postglacial range expansion of the mesothermic drought-tolerant conifer *Austrocedrus chilensis*. *New Phytologist* 208: 960–972.

- Sperry, J.S., Hacke, U.G., Oren, R., Comstock, J.P. 2002. Water deficits and hydraulic limits to leaf water supply. *Plant, Cell and Environment* 25: 251–263.
- Srur, A.M., Villalba, R., Villagra, P.E., Hertel, D. 2008. Influencia de las variaciones climáticas y la concentración de CO₂ en el crecimiento y la eficiencia en el uso del agua de *Nothofagus pumillio* a lo largo de un gradiente altitudinal en la Patagonia. *Revista Chilena de Historia Natural* 81: 239–256.
- Stecconi, M., Marchelli, P., Puntieri, J., Picca, P., Gallo, L. 2004. Natural hybridization between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, *Nothofagaceae*) and an evergreen (*N. dombeyi*) forest tree species: Evidence from morphological and isoenzymatic traits. *Annals of Botany* 94: 775–786.
- Stewart, J.R., Lister, A.M., Barnes, I., Dalén, L. 2010. Refugia revisited: individualistic responses of species in space and time. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 661–671.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2003. *Plant Physiology*. 3rd edition. Sinauer Associates Inc., Sunderland.
- Tardieu, F., Simonneau, T. 1998. Variability among species of stomatal control under fluctuating soil water status and evaporative demand: modelling isohydric and anisohydric behaviours. *Journal of Experimental Botany* 49: 419–432.
- Thiel, D., Kreyling, J., Backhaus, S., Beierkuhnlein, C., Buhk, C., Egen, K., Huber, G. et al. 2014. Different reactions of central and marginal provenances of *Fagus sylvatica* to experimental drought. *European Journal of Forest Research* 133: 247–260.
- Thuiller, W., Albert, C., Araújo, M.B., Berry, P.M., Cabeza, M., Guisan, A., Hickler, T. et al. 2008. Predicting global change impacts on plant species' distributions: Future challenges. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 9: 137–152.
- Touchette, B.W., Iannacone, L.R., Turner, G.E., Frank, A.R. 2007. Drought tolerance versus drought avoidance: A comparison of plant-water relations in herbaceous wetland plants subjected to water withdrawal and repletion. *Wetlands* 27: 656–667.
- Trombotto, D. 2000. Survey of cryogenic processes, periglacial forms and permafrost conditions in South America. *Revista do Instituto Geológico* 21: 33–55.
- Trumbo, D.R., Epstein, B., Hohenlohe, P.A., Alford, R.A., Schwarzkopf, L., Storfer, A. 2016. Mixed population genomics support for the central marginal hypothesis across the invasive range of the cane toad (*Rhinella marina*) in Australia. *Molecular ecology* 25: 4161–4176.
- Tyree, M.T., Hammel, H.T. 1972. The measurement of the turgor pressure and the water relations of plants by the pressure-bomb technique. *Journal of*

Experimental Botany 23: 267–282.

- Vakkari, P., Rusanen, M., Kärkkäinen, K. 2009. High genetic differentiation in marginal populations of European White Elm (*Ulmus laevis*). *Silva Fennica* 43: 185–196.
- Valladares, F., Vilagrosa, A., Peñuelas, J., Ogaya, R., Julio, J., Corcuera, L., Sisó, S., 2004. Capítulo 6: Estrés hídrico: ecofisiología y escalas de la sequía. En Valladares, F. 2004. Ecología del bosque mediterráneo en un mundo cambiante. Páginas 163-190. Ministerio de Medio Ambiente, EGRAF, S. A., Madrid.
- Varela, S.A., Gyenge, J.E., Fernández, M.E., Schlichter, T. 2010. Seedling drought stress susceptibility in two deciduous *Nothofagus* species of NW Patagonia. *Trees* 24: 443–453.
- Veblen, T., Kitzberger, T., Burns, B., Rebertus, A.J. 1996. Natural disturbance and regeneration dynamics in Andean forests of southern Chile and Argentina. En pp. 169–198.
- Vilà-Cabrera, A., Premoli, A.C., Jump, A.S. 2019. Refining predictions of population decline at species' rear edges. *Global Change Biology* 25: 1549–1560.
- Villalba R., Boninsegna J.A., Veblen T.T., Schmelter A., Rubulis S. 1997. Recent Trends in Tree-Ring Records from High Elevation Sites in the Andes of Northern Patagonia. In: Diaz H.F., Beniston M., Bradley R.S. (eds) Climatic Change at High Elevation Sites. Springer, Dordrecht
- Villalba, R., Lara, A., Boninsegna, J.A., Masiokas, M., Delgado, S., Aravena, J.C., Roig, F.A. et al. 2003. Large-scale temperature changes across the southern andes : 20th-century variations in the context of the past 400 years. *Climatic Change* 59: 177–232.
- Violle, C., Reich, P.B., Pacala, S.W., Enquist, B.J., Kattge, J. 2014. The emergence and promise of functional biogeography. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111: 13690–13696.
- Volis, S., Ormanbekova, D., Yermekbayev, K., Song, M., Shulgina, I. 2016. The Conservation Value of Peripheral Populations and a Relationship Between Quantitative Trait and Molecular Variation. *Evolutionary Biology* 43: 26–36.
- Vucetich, J.A., Waite, T.A. 2003. Spatial patterns of demography and genetic processes across the species' range: Null hypotheses for landscape conservation genetics. *Conservation Genetics* 4: 639–645.
- Weir, B.S., Cockerham, C.C. 1984. Estimating F-Statistics for the Analysis of Population Structure. *Evolution* 38: 1358–1370.
- White, C., Selkoe, K.A., Watson, J., Siegel, D.A., Zacherl, D.C., Toonen, R.J. 2010. Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 1685–1694.
- Whitehead, D., Beadle, C.L. 2004. Physiological regulation of productivity and

- water use in *Eucalyptus*: A review. *Forest Ecology and Management* 193: 113–140.
- Wiens, J.J., Graham, C.H. 2005. Niche Conservatism: Integrating Evolution, Ecology, and Conservation Biology. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 36: 519–539.
- Wright, I.J., Reich, P.B., Westoby, M., Ackerly, D.D., Baruch, Z., Bongers, F., Cavender-Bares, J. et al. 2004. The worldwide leaf economics spectrum. *Nature* 428: 821–827.
- Yang, A., Dick, C.W., Yao, X., Huang, H. 2016. Impacts of biogeographic history and marginal population genetics on species range limits: A case study of *Liriodendron chinense*. *Scientific Reports* 6: 1–12.
- Young, A.G., Merriam, H.G., Warwick, S.I. 1993. The effects of forest fragmentation on genetic variation in *Acer saccharum* marsh, (Sugarmaple) populations. *Heredity* 71: 277–289.
- Young, A.G., Brown, A.H.D., Zich, F.A. 1999. Genetic Structure of Fragmented Populations of the Endangered Daisy *Rutidosia leptorrhynchoides*. *Conservation Biology* 13: 256–265.
- Zunino, M., Palestrini, C. 1991. *Anales de Biología* 17: 85–88.

Agradecimientos

A la educación pública y gratuita de nuestro país.

A la Universidad Nacional del Comahue por formarme en lo académico y humano.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por el financiamiento de beca doctoral.

A mi directora Dra. Andrea Premoli por darme la posibilidad de trabajar en su grupo y brindarme su apoyo profesional.

A la Dra. Paula Mathiasen por su generosa guía y asesoramiento diario en todos los aspectos de esta tesis.

A los miembros del jurado evaluador.

A todas las personas que me acompañaron con empatía en este proceso de aprendizaje.

Y sobre todo a mi familia y amigos, quienes siempre han creído en mis capacidades y me alentaron a cada paso.

Apéndice I

Apéndice I.1 Descripción de los sitios de colección de muestras de poblaciones marginales de *Nothofagus pumilio*. Se indican longitud, latitud, altitud, precipitación media anual y cantidad de individuos analizados (N) para cada marcador molecular. Se indican también los haplotipos encontrados en cada población. * Datos extraídos de Mathiasen y Premoli (2010).

Población	ID	Longitud	Latitud	Altitud (m s.n.m.)	Precipitación (mm año ⁻¹)	Microsatélites N	Isoenzimas N	ADNc N
Po. Córdoba*	CBA	71° 9' 00"	40° 36' 00"	1237	754	1	31	5 H10
Cuyin Manzano 6	6CUY	71° 11' 25.3"	40° 49' 25.6"	1529	711	1	30	2 H15
Cuyin Manzano 5	5CUY	71° 11' 46.6"	40° 50' 39.6"	1576	716	1	28	3 H8
Cuyin Manzano 4	4CUY	71° 11' 18.7"	40° 51' 53.1"	1739	700	1	30	2 H15
Cuyin Manzano 3	3CUY	71° 13' 29.6"	40° 54' 39.2"	1717	729	1	20	3 H15
Cuyin Manzano 2	2CUY	71° 16' 21.5"	40° 55' 39.6"	1757	753		30	2 H15
Cuyin Manzano 1	1CUY	71° 20' 6.3"	40° 56' 20"	1208	844		20	3 H10
Ea. Altos del Fortín 2	2FOR	71° 12' 50.7"	40° 57' 07.1"	1146	777	1		2 H10
Ea. Altos del Fortín 1	1FOR	71° 13' 29.6"	40° 58' 15.2"	1155	783	1	32	2 H15
A. del medio 1	1AM	71° 12' 33.2"	41° 12' 24.4"	1100	766	1	20	2 H11
A. del medio 2	2AM	71° 11' 46.4"	41° 12' 48.4"	1169	734			2 H11
Pob. Jesus	JES	71° 15' 6.4"	41° 13' 55.2"	1003	760	1	29	2 H11
Co. Challhuaco*	CHB	71° 16' 55.8"	41° 15' 8.4"	1325	779	1	30	5 H11
Ñirihuau Arriba	NIR	71° 15' 9.1"	41° 17' 23.9"	1118	782	1	32	2 H11
Ea. Buitrera	BUI	71° 7' 52.4"	41° 18' 17.1"	1299	671	1	62	2 H8
Ea. La Esperanza	ESP	71° 13' 46.29"	41° 18' 30.61"	1161	753	1		2 H8
R. Pichileufu*	PLF	71° 09' 00"	41° 20' 00"	1100	675			2 H11
Ea. El Foyel*	LW	71° 06' 00"	41° 28' 00"	1581	629			3 H11

Apéndice I.1 (continuación...)

Población	ID	Longitud	Latitud	Altitud (m s.n.m.)	Precipitación (mm año⁻¹)	Microsatélites N	Isoenzimas N	ADNc N
A. Chenqueniye	CHE	71° 4' 43.3"	41° 29' 42.1"	1390	614	1	30	5 H18
Baguales	BAG	71° 20' 30.5"	41° 30' 10.8"	1371	791		30	2 H8
Pico Quemado	PQ	71° 2' 14.1"	41° 34' 29.9"	1493	576	1		3 H8
La Serrucha*	LSE	71° 04' 00.1"	41° 37' 59.9"	1727	585			3 H8
Lengas de Oro	LDO	71° 6' 20.1"	41° 39' 59.2"	1224	613	1	30	2 H9
A. las Minas	ALM	71° 9' 25.2"	41° 44' 22"	1242	661	1	30	4 H8 / 1 H16
Las Huaytekas	HUA	71° 24' 47.8"	41° 45' 46.2"	1349	819		21	2 H8
Ea. Mallín Kume	MAK	71° 12' 30.9"	41° 53' 57.2"	1058	674	1	30	2 H8
Pob. Soto	SOT	71° 22' 3"	41° 56' 3.2"	940	833		30	2 H8
Cñd de los ensueños	CEN	71° 14' 53.9"	42° 03' 44.9"	929	682			2 H8
Co. Azul	CA	71° 15' 31.8"	42° 04' 42.3"	1187	674	1		2 H8
Co. el Coihue	CC	71° 19' 10.3"	42° 09' 17.7"	965	716	1		2 H8
Cñd. del zorro	CDZ	71° 7' 49.6"	42° 24' 25.7"	1081	528	1	30	5 H16
Cdón. Leleque	LEL	71° 08' 45.1"	42° 29' 52.7"	1067	522	1		5 H16
Co. La Hoya 2	LHG	71° 15' 50.7"	42° 50' 28.9"	1363	576			2 H12
Co. La Hoya 1*	LHY	71° 16' 00"	42° 50' 00"	1275	576	1	30	3 H12
Altos del Rio Percey	PER	71° 27' 9.5"	42° 50' 26.3"	1049	721	1	30	3 H12
Co. Nahuel Pan 2	NAH	71° 11' 25.2"	42° 58' 59.9"	931	486			3 H12
Co. Nahuel Pan 1	NAP	71° 12' 6.9"	43° 0' 27.2"	943	491	1	30	2 H12

Apéndice I.2 Descripción de los sitios de colección de muestras de poblaciones centrales de *Nothofagus pumilio*. Se indican longitud, latitud, altitud, precipitación media anual y cantidad de individuos analizados (N) para cada marcador molecular. Se indican también los haplotipos encontrados en cada población. * Datos extraídos de Mathiasen y Premoli (2010).

Población	ID	Longitud	Latitud	Altitud (m s.n.m.)	Precipitación (mm año⁻¹)	Microsatélites N	isoenzimas N	ADNc N
Co. La Mona	MON	71° 42' 2.8"	40° 34' 32.7"	1081	1421	1	29	2 H10
Co. Negro	NEG	71° 23' 28"	40° 40' 34.2"	1300	886	1		2 H10
Co. Panguinal	PAN	71° 45' 28.78"	40° 41' 14.44"	1222	1359	1		2 H10
Po. Puyehue*	PUY	71° 55' 00"	40° 44' 00"	1173	1550			5 H8
Co. Bayo	BAY	71° 36' 15"	40° 45' 05"	1200	1087	1		2 H8
L. Ortiz Basualdo	BAS	71° 51' 11.86"	40° 59' 3.37"	1131	1515	1	29	2 H8
El alerzal*	EAL	71° 50' 00"	40° 60' 00"	1119	1692			3 H8
La Heladera*	LHE	71° 49' 03"	41° 00' 6.41"	900	1692			3 H8
Lag. los Clavos	CLA	71° 49' 35.35"	41° 2' 48.91"	1230	1381	1	30	1 H9 / 2 H8
Co. López*	LOP	71° 32' 54"	41° 05' 40"	1213	1062	1	90	2 H8
Co. Bella Vista	BV	71° 28' 1"	41° 07' 55.7"	1100	1006	1		2 H8
Lag. Negra	LN	71° 33' 58.52"	41° 08' 33.29"	1184	1096	1	25	2 H8
Co. Otto*	OTO	71° 22' 21"	41° 8' 45"	1102	861	1	90	2 H8
Po. de las nubes	PDN	71° 47' 32.8"	41° 9' 49.6"	1155	1180	1	20	1 H17 / 2 H8
Tronador la Almohadilla	TAL	71° 47' 00"	41° 11' 00"	1100	1396	1		3 H9
Co. Tronador	TRO	71° 50' 20"	41° 11' 15"	1100	1343	1		3 H8

Apéndice I.2 (continuación...)

Población	ID	Longitud	Latitud	Altitud (m s.n.m.)	Precipitación (mm año⁻¹)	Microsatélites N	isoenzimas N	ADNc N
L. Guillermo	GUI	71° 29' 44.1"	41° 21' 27.9"	950	1062	1		2 H8
V. Llodconto	LLO	71° 35' 26.6"	41° 23' 33.6"	1397	1058	1	28	2 H8
L. Steffen	STE	71° 33' 20.3"	41° 29' 03.3"	950	1211	1		1 H8
Ruta 40	RUT	71° 28' 5.2"	41° 29' 33.5"	1050	997	1		2 H9 / 1 H8
Mosca	MOS	71° 28' 5.8"	41° 30' 34"	1000	1011	1		3 H8
Cñd. De la Mosca*	CMA	71° 28' 00"	41° 31' 00"	1056	1043			3 H11
Co. Perito Moreno*	PMO	71° 34' 00"	41° 48' 00"	990	1061		31	5 H8
Ref. Natación	NAT	71° 35' 3.2"	41° 52' 51.6"	1183	1002	1	29	2 H10
Co. Piltriquitron*	PQN	71° 29' 00"	41° 58' 00"	1250	880		30	5 H8
Ref. Motoco	MOT	71° 42' 27.22"	41° 58' 31.89"	813	1176	1	10	2 H8
L. Cholila	CHO	71° 37' 5.9"	42° 25' 20.8"	1200	923	1	25	2 H12
R. Tigre*	RTI	71° 57' 00"	42° 30' 00"	720	1409			3 H12
Co. la Momia	MOM	71° 36' 11"	42° 34' 44.3"	950	933	1	30	2 H12
Pob. Neira	NEI	71° 33' 55.1"	42° 39' 16.1"	1177	867	1	31	2 H12
Lag. Escondida	ESC	71° 44' 7.18"	42° 45' 20.68"	913	1074	1	17	2 H12
A. Cascada	CAS	71° 38' 38.4"	42° 54' 32.4"	1061	926	1	11	2 H12
Co. Cocinero	COC	71° 37' 5.1"	42° 57' 16"	1093	899	1	20	2 H12

Apéndice I.3 Sistemas buffer, condiciones de electroforesis y enzimas reveladas en *Nothofagus pumilio*.

Sistema	Buffer		Corriente (mA)	Tiempo de corrida (h)	Enzimas
	Gel	Electroforesis			
MC	Ac. Cítrico - Morfolina, pH~8	Ac. Cítrico, pH~8	25	6	ALD IDH SKDH MDH
CB	Tris - Ac. Cítrico, pH~8,8	Ac. Bórico NaOH, pH~8	50	6	PGI

Apéndice I.4 Lista de iniciadores de los cinco microsatélites utilizados y especificaciones técnicas particulares para cada uno.

	Secuencias iniciadores	Repetición	Temperatura de anclaje (°C)	Rango (pb)
NnBIO111	F: GATCCCACATGTCCTTGGTC R: CGCTCTTCAGACCAGAAAGG	(GT)2A(GT)10	57	116-126
ncutas04	F: CTCCCGTGAGAAGGTTTGAAT R: AATGGGCATATGGTTATTGTGATAG	(CA)11	57	308-314
ncutas12	F: GCATCATCCCATCCTAAGTTAT R: CTGAACACTGGCATCTTTAATG	(CA)16	50	196-215
ncutas21	F: CTCCAAGGATAAGAAGCTATC R: CAGTACCCCTAAGTGTTTTCTAAGT	(AC)7	55	232-252
ncutas22	F: GATGGGGTTATCATAGGTGTCGT R: TCAGCGAGAATTCCTTTGATGTA	(CT)14(AC)11	58	267-284

Apéndice I.5 Sitios variables de las secuencias alineadas de ADN del cloroplasto de las regiones *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA* para los 9 haplotipos de *Nothofagus pumilio* analizados. * Duplicación de 15-pb “TTTTTGTGATTTGGC”. *** Duplicación de 19-pb “GATTAAGAAGAACGTATAT”.

Haplotipo	Frecuencia	<i>psbB-psbH</i>				<i>trnL-trnF</i>		<i>trnH-psbA</i>										
		43	150	203	218	922	1120	1279	1292	1293	1366	1379	1380	1386	1388	1434	1458	1501
8	0,441	C	T	*	A	(T)8	(T)8	(T)13	-	A	G	T	A	T	(A)5	***	A	T
9	0,043	C	T	*	A	(T)8	(T)8	(T)13	-	A	G	T	A	A	(A)6	***	A	T
10	0,102	C	T	*	A	(T)8	(T)7	(T)13	-	A	G	A	A	A	(A)6	***	C	T
11	0,113	C	T	*	A	(T)8	(T)8	(T)12	-	A	G	T	A	T	(A)5	***	A	T
12	0,151	A	A	-	C	(T)9	(T)10	(T)11	-	C	T	T	C	A	(A)3	-	A	G
15	0,059	C	T	*	A	(T)8	(T)7	(T)13	-	A	G	A	A	A	(A)6	***	A	T
16	0,059	C	T	*	A	(T)8	(T)8	(T)14	-	-	G	T	A	T	(A)5	-	A	T
17	0,005	C	T	*	A	(T)8	(T)8	(T)12	G	A	G	T	A	T	(A)5	***	A	T
18	0,027	C	T	*	A	(T)8	(T)9	(T)13	-	A	G	T	A	T	(A)5	***	A	T

Apéndice I.6 Frecuencias alélicas para todos los loci isoenzimáticos analizados en 24 poblaciones marginales de *Nothofagus pumilio*. χ^2 : test de chi-cuadrado para heterogeneidad de frecuencias alélicas de loci polimórficos, en negrita se indican las diferencias significativas ($P < 0,001$)

Población	ALD1				IDH2				SKDH				MDH2			MDH3			PGI2					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	2	3	4	5	6	
CBA	0,065	0,935	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,952	0,048	0,000	0,000	0,065	0,935	0,000	
6CUY	0,000	1,000	0,000	0,000	0,161	0,679	0,161	0,000	0,033	0,850	0,117	0,000	0,000	0,917	0,083	0,000	0,967	0,033	0,000	0,000	0,117	0,683	0,200	
5CUY	0,000	1,000	0,000	0,000	0,107	0,893	0,000	0,000	0,036	0,964	0,000	0,000	0,000	0,768	0,232	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,058	0,519	0,423	
4CUY	0,263	0,737	0,000	0,000	0,000	0,775	0,225	0,000	0,000	0,786	0,214	0,000	0,067	0,500	0,433	0,133	0,800	0,067	0,000	0,000	0,155	0,552	0,293	
3CUY	0,417	0,583	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,441	0,559	0,000	0,000	0,000	0,900	0,100	0,000	0,850	0,150	0,000	0,000	0,053	0,737	0,211	
2CUY	0,000	1,000	0,000	0,000	0,033	0,700	0,267	0,000	0,067	0,550	0,383	0,000	0,083	0,883	0,033	0,050	0,950	0,000	0,000	0,000	0,083	0,667	0,250	
1CUY	0,079	0,605	0,316	0,000	0,000	0,737	0,263	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,147	0,853	0,000	0,471	0,412	0,118	0,000	0,079	0,263	0,474	0,184	
1FOR	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,732	0,268	0,000	0,267	0,667	0,067	0,000	0,422	0,578	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,450	0,000	0,533	0,017	
AM	0,125	0,156	0,625	0,094	0,222	0,778	0,000	0,000	0,235	0,706	0,059	0,000	0,575	0,425	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,075	0,000	0,550	0,375	
JES	0,000	0,914	0,086	0,000	0,034	0,914	0,052	0,000	0,034	0,672	0,293	0,000	0,000	0,796	0,204	0,017	0,948	0,034	0,000	0,069	0,000	0,914	0,017	
CHB	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,967	0,033	0,000	0,000	0,033	0,950	0,017	
NIR	0,000	0,867	0,133	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,097	0,774	0,129	0,000	0,548	0,452	0,000	0,306	0,694	0,000	0,000	0,383	0,000	0,617	0,000	
BUI	0,409	0,427	0,164	0,000	0,095	0,681	0,224	0,000	0,183	0,608	0,167	0,042	0,192	0,808	0,000	0,000	0,986	0,014	0,000	0,040	0,020	0,810	0,130	
CHE	0,000	1,000	0,000	0,000	0,133	0,867	0,000	0,000	0,000	0,886	0,114	0,000	0,091	0,909	0,000	0,000	0,750	0,250	0,050	0,150	0,133	0,667	0,000	
BAG	0,000	1,000	0,000	0,000	0,233	0,617	0,150	0,000	0,250	0,583	0,167	0,000	0,167	0,700	0,133	0,000	0,683	0,317	0,000	0,017	0,379	0,534	0,069	
LDO	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,087	0,913	0,000	0,000	0,100	0,883	0,017	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
ALM	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,767	0,233	0,000	0,000	0,737	0,263	0,000	0,000	0,950	0,050	0,000	0,911	0,089	0,000	0,017	0,069	0,810	0,103	
HUA	0,000	0,750	0,250	0,000	0,333	0,667	0,000	0,000	0,167	0,750	0,083	0,000	0,475	0,525	0,000	0,000	0,571	0,429	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
MAK	0,000	0,729	0,271	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,789	0,211	0,000	0,093	0,667	0,241	0,019	0,852	0,130	0,000	0,000	0,034	0,897	0,069	
SOT	0,200	0,800	0,000	0,000	0,000	0,556	0,444	0,000	0,000	0,717	0,283	0,000	0,017	0,569	0,414	0,000	0,534	0,466	0,000	0,000	0,000	0,817	0,183	
CDZ	0,328	0,672	0,000	0,000	0,000	0,750	0,250	0,000	0,286	0,696	0,018	0,000	0,167	0,700	0,133	0,107	0,750	0,143	0,000	0,000	0,103	0,810	0,086	
LHY	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,633	0,267	0,100	0,000	1,000	0,000	0,000	0,117	0,883	0,000	0,000	0,933	0,067	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
PER	0,446	0,554	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,107	0,821	0,071	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,460	0,540	0,000	
NAP	0,174	0,826	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,857	0,143	0,000	0,000	0,759	0,241	0,117	0,767	0,117	0,000	0,000	0,143	0,786	0,071	
χ^2		516,684				408,784				284,96				565,167			478,452				800			
GL		69				69				69				46			46				92			

Apéndice I.7 Frecuencias alélicas para todos los loci isoenzimáticos analizados en 18 poblaciones centrales de *Nothofagus pumilio*. χ^2 : test de chi-cuadrado para heterogeneidad de frecuencias alélicas de loci polimórficos, en negrita se indican las diferencias significativas ($P < 0,001$)

Población	ALD1			IDH2			SKDH			MDH2			MDH3			PGI2					
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	2	3	4	5	6	
MON	0,000	0,792	0,208	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,231	0,404	0,365	
BAS	0,000	0,804	0,196	0,121	0,741	0,138	0,379	0,621	0,000	0,143	0,750	0,107	0,268	0,661	0,071	0,000	0,000	0,034	0,948	0,017	
CLA	0,250	0,750	0,000	0,000	0,765	0,235	0,071	0,857	0,071	0,117	0,883	0,000	0,050	0,850	0,100	0,000	0,000	0,083	0,917	0,000	
LOP	0,000	1,000	0,000	0,033	0,800	0,167	0,000	1,000	0,000	0,117	0,794	0,089	0,000	1,000	0,000	0,000	0,017	0,117	0,867	0,000	
LN	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,188	0,667	0,146	0,020	0,500	0,480	0,480	0,500	0,020	0,000	0,020	0,120	0,840	0,020	
OTO	0,000	1,000	0,000	0,006	0,978	0,017	0,000	1,000	0,000	0,067	0,933	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,017	0,017	0,967	0,000	
PDN	0,000	1,000	0,000	0,125	0,475	0,400	0,107	0,821	0,071	0,000	0,700	0,300	0,425	0,575	0,000	0,000	0,000	0,125	0,550	0,325	
LLO	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,089	0,786	0,125	0,000	0,857	0,143	0,000	0,000	0,089	0,643	0,268	
PMO	0,033	0,967	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,883	0,117	0,000	0,000	0,050	0,950	0,000	
NAT	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,069	0,638	0,293	0,000	0,707	0,293	0,000	0,017	0,069	0,448	0,466	
PQN	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,967	0,033	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
MOT	0,500	0,500	0,000	0,000	0,900	0,100	0,000	1,000	0,000	0,350	0,650	0,000	0,200	0,800	0,000	0,000	0,000	0,050	0,950	0,000	
CHO	0,435	0,565	0,000	0,000	1,000	0,000	0,292	0,542	0,167	0,095	0,810	0,095	0,217	0,587	0,196	0,000	0,105	0,237	0,579	0,079	
MOM	0,000	1,000	0,000	0,341	0,455	0,205	0,140	0,600	0,260	0,183	0,550	0,267	0,167	0,500	0,333	0,000	0,190	0,328	0,414	0,069	
NEI	0,000	1,000	0,000	0,097	0,903	0,000	0,000	1,000	0,000	0,177	0,774	0,048	0,177	0,823	0,000	0,000	0,000	0,207	0,534	0,259	
ESC	0,000	1,000	0,000	0,059	0,647	0,294	0,188	0,594	0,219	0,000	0,853	0,147	0,382	0,618	0,000	0,000	0,000	0,469	0,531	0,000	
CAS	0,750	0,250	0,000	0,000	1,000	0,000	0,318	0,545	0,136	0,000	0,909	0,091	0,500	0,500	0,000	0,000	0,000	0,667	0,222	0,111	
COC	0,316	0,579	0,105	0,000	0,821	0,179	0,025	0,775	0,200	0,325	0,625	0,050	0,125	0,750	0,125	0,000	0,125	0,200	0,625	0,050	
χ^2	197,342			237,215			106,744			262,325			437,988			564,888					
GL	34			34			34			34			34			51					

Apéndice I.8 Frecuencias alélicas para todos los loci de isoenzimas analizados en las regiones marginal (M) y central (C) de *Nothofagus pumilio*.

	ALD1				IDH2				SKDH				MDH2			MDH3			PGI2					
	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	4	1	2	3	1	2	3	2	3	4	5	6	
M	0,158	0,748	0,091	0,003	0,062	0,786	0,147	0,005	0,107	0,745	0,143	0,005	0,137	0,765	0,098	0,052	0,845	0,104	0,002	0,057	0,089	0,739	0,112	
C	0,159	0,784	0,057	0,000	0,051	0,853	0,096	0,000	0,147	0,746	0,107	0,000	0,097	0,809	0,094	0,119	0,821	0,060	0,000	0,025	0,130	0,774	0,071	

Apéndice I.9 test de chi-cuadrado (χ^2) para heterogeneidad de frecuencias alélicas para las regiones marginal y central de loci polimórficos de isoenzimas, los asteriscos indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

Locus	N° de Alelos	χ^2	GL
ALD1	4	6,186	3
IDH2	4	16,421*	3
SKDH	4	9,632*	3
MDH2	3	9,438*	2
MDH3	3	43,325*	2
PGI2	5	36,649*	4
Totales		121,651*	17

Apéndice I.10 Parámetros de variabilidad genética isoenzimática y endogamia (FIS) para todas las poblaciones marginales de *Nothofagus pumilio*. N, número de individuos analizados; A, número promedio de alelos por locus; A_P, número de alelos por locus polimórfico; R_A, riqueza alélica; B_F, número de alelos de baja frecuencia (>10%); A_R, número de alelos de baja frecuencia ponderado por el número total de alelos de la especie; A_e, número efectivo de alelos; A_T, número de alelos totales; % P, porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto*; H_O y H_E, heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Los asteriscos indican las poblaciones que presentaron diferencias significativas en el análisis para inferir cuellos de botella.

Población	N	A	A _P	R _A	B _F	A _R	A _e	A _T	%P	H _O	H _E	F _{IS}
CBA	31	1,5 (0,2)	2	1,2 (0,1)	3	1,2	1,06 (0,01)	9	50	0,048 (0,023)	0,056 (0,026)	0,146
6CUY	30	2,3 (0,3)	2,6	1,9 (0,3)	3	1,8	1,41 (0,08)	14	83,33	0,168 (0,081)	0,245 (0,086)	0,318
5CUY	28	1,8 (0,3)	2,3	1,6 (0,2)	2	1	1,35 (0,09)	11	66,67	0,109 (0,04)	0,198 (0,092)	0,452
4CUY	30	2,5 (0,2)	2,5	2,3 (0,2)	2	1,3	1,81 (0,08)	15	100	0,298 (0,086)	0,434 (0,047)	0,319
3CUY	20	2 (0,3)	2,2	1,8 (0,2)	2	1	1,53 (0,09)	12	83,33	0,184 (0,067)	0,313 (0,082)	0,418
2CUY	30	2,5 (0,3)	2,8	2 (0,3)	6	3,9	1,55 (0,09)	15	83,33	0,194 (0,067)	0,301 (0,094)	0,358
1CUY*	20	2,5 (0,4)	2,8	2,3 (0,4)	2	1,3	1,93 (0,17)	15	83,33	0,289 (0,138)	0,416 (0,104)	0,312
1FOR*	32	2 (0,4)	2,5	1,8 (0,3)	2	1	1,6 (0,08)	12	66,67	0,387 (0,129)	0,317 (0,102)	-0,223
AM*	20	2,5 (0,4)	2,8	2,2 (0,3)	3	2	1,8 (0,11)	15	83,33	0,35 (0,126)	0,411 (0,088)	0,156
JES	29	2,7 (0,2)	2,7	1,8 (0,1)	8	5,6	1,34 (0,05)	16	100	0,139 (0,039)	0,231 (0,057)	0,402
CHB	30	1,5 (0,3)	2,5	1,1 (0,1)	3	1,2	1,03 (0,01)	9	33,33	0,028 (0,018)	0,027 (0,018)	-0,021
NIR	32	2 (0,3)	2,2	1,9 (0,2)	1	0,5	1,59 (0,07)	12	83,33	0,359 (0,098)	0,339 (0,078)	-0,058
BUI	62	3 (0,4)	3	2,3 (0,3)	5	3,9	1,81 (0,08)	18	100	0,36 (0,088)	0,392 (0,089)	0,083
CHE	30	2,2 (0,4)	2,4	1,9 (0,3)	2	1,1	1,4 (0,07)	13	83,33	0,281 (0,102)	0,255 (0,075)	-0,105
BAG*	30	2,7 (0,4)	3	2,3 (0,3)	2	1,4	1,91 (0,09)	16	83,33	0,243 (0,051)	0,437 (0,09)	0,448
LDO	30	1,5 (0,3)	2,5	1,2 (0,2)	3	1,2	1,08 (0,02)	9	33,33	0,046 (0,03)	0,063 (0,04)	0,273
ALM	30	2,2 (0,4)	2,4	1,7 (0,2)	4	2,3	1,33 (0,05)	13	83,33	0,155 (0,043)	0,226 (0,066)	0,318
HUA	21	2 (0,3)	2,2	1,9 (0,2)	1	0,5	1,67 (0,08)	12	83,33	0,215 (0,047)	0,379 (0,078)	0,441
MAK	30	2,3 (0,3)	2,6	1,9 (0,2)	4	2,4	1,45 (0,06)	14	83,33	0,206 (0,06)	0,283 (0,071)	0,278
SOT*	30	2,2 (0,2)	2,2	2 (0)	1	0,6	1,76 (0,05)	13	100	0,211 (0,021)	0,428 (0,039)	0,511
CDZ	30	2,7 (0,2)	2,7	2,3 (0,1)	2	1,4	1,7 (0,03)	16	100	0,27 (0,049)	0,414 (0,021)	0,352
LHY	30	1,7 (0,3)	2,3	1,5 (0,3)	2	0,9	1,25 (0,08)	10	50	0,089 (0,071)	0,144 (0,084)	0,386
PER	30	1,7 (0,3)	2,3	1,5 (0,2)	1	0,4	1,4 (0,09)	10	50	0,226 (0,114)	0,221 (0,103)	-0,027
NAP*	30	2,2 (0,3)	2,4	1,9 (0,2)	1	0,6	1,41 (0,04)	13	83,33	0,204 (0,049)	0,278 (0,06)	0,273

Apéndice I.11 Parámetros de variabilidad genética isoenzimática y endogamia (FIS) para todas las poblaciones centrales de *N. pumilio*. N, número de individuos analizados; A, número promedio de alelos por locus; A_P, número de alelos por locus polimórfico; R_A, riqueza alélica; B_F, número de alelos de baja frecuencia (>10%); A_R, número de alelos de baja frecuencia ponderado por el número total de alelos de la especie; A_e, número efectivo de alelos; A_T, número de alelos totales; % P, porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto*; H_O y H_E, heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Los errores estándar se muestran entre paréntesis. Los asteriscos indican las poblaciones que presentaron diferencias significativas en el análisis para inferir cuellos de botella.

Población	N	A	A _P	R _A	B _F	A _R	A _e	A _T	%P	H _O	H _E	F _{IS}
MON	29	1,5 (0,3)	2,5	1,5 (0,3)	0	0	1,39 (0,14)	9	33,33	0,175 (0,144)	0,167 (0,113)	-0,052
BAS	29	2,7 (0,2)	2,67	2,2 (0,2)	3	2,1	1,63 (0,06)	16	100	0,376 (0,085)	0,372 (0,06)	-0,011
CLA	30	2,3 (0,2)	2,33	1,9 (0,1)	5	3	1,38 (0,03)	14	100	0,188 (0,051)	0,274 (0,036)	0,321
LOP	90	2 (0,4)	3	1,6 (0,3)	3	1,6	1,22 (0,03)	12	50	0,083 (0,044)	0,154 (0,071)	0,46
LN	25	2,5 (0,5)	3,25	1,9 (0,3)	4	2,6	1,59 (0,11)	15	66,67	0,228 (0,083)	0,309 (0,105)	0,267
OTO	90	1,8 (0,4)	2,67	1,2 (0,1)	5	2,4	1,04 (0,01)	11	50	0,026 (0,012)	0,039 (0,021)	0,338
PDN	20	2,3 (0,3)	2,6	2,1 (0,3)	1	0,6	1,83 (0,13)	14	83,33	0,285 (0,077)	0,41 (0,093)	0,311
LLO	28	1,8 (0,4)	2,67	1,6 (0,3)	2	1	1,32 (0,08)	11	50	0,19 (0,104)	0,189 (0,091)	-0,011
PMO	31	1,5 (0,2)	2	1,2 (0,1)	2	0,8	1,07 (0,02)	9	50	0,044 (0,027)	0,062 (0,034)	0,286
NAT	29	2 (0,5)	3	1,7 (0,3)	3	1,6	1,51 (0,11)	12	50	0,218 (0,117)	0,253 (0,115)	0,14
PQN	30	1,2 (0,2)	2	1,1 (0,1)	1	0,3	1,01 (0,01)	7	16,67	0,011 (0,011)	0,011 (0,011)	-0,018
MOT	10	1,8 (0,2)	2	1,7 (0,2)	2	1	1,44 (0,13)	11	83,33	0,2 (0,068)	0,272 (0,086)	0,275
CHO	25	2,7 (0,4)	3	2,4 (0,3)	3	2,1	1,95 (0,12)	16	83,33	0,236 (0,056)	0,441 (0,098)	0,472
MOM*	30	2,8 (0,4)	3,2	2,6 (0,3)	1	0,7	2,36 (0,13)	17	83,33	0,23 (0,054)	0,522 (0,106)	0,564
NEI	31	2 (0,4)	2,5	1,8 (0,3)	2	1	1,46 (0,1)	12	66,67	0,255 (0,11)	0,244 (0,097)	-0,048
ESC*	17	2,2 (0,3)	2,4	2,0 (0,3)	1	0,6	1,75 (0,12)	13	83,33	0,234 (0,076)	0,391 (0,09)	0,409
CAS	11	2,2 (0,3)	2,4	2,1 (0,3)	1	0,6	1,69 (0,16)	13	83,33	0,173 (0,048)	0,372 (0,097)	0,548
COC	20	3 (0,3)	3	2,5 (0,2)	3	2,3	1,86 (0,08)	18	100	0,273 (0,068)	0,456 (0,045)	0,409

Apéndice I.12 Parámetros de variabilidad genética isoenzimática y endogamia (F_{IS}) para las regiones marginales y centrales de *N. pumilio*. Se muestran además promedios poblacionales totales. P, número de poblaciones / región; N, número de individuos analizados; A, número promedio de alelos por locus; A_P , número de alelos por locus polimórfico; R_A , riqueza alélica; B_F , número de alelos de baja frecuencia (>10%); A_R , número de alelos de baja frecuencia ponderado por el número total de alelos de la especie; A_e , número efectivo de alelos; A_T , número de alelos totales; % P, porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto*; H_O y H_E , heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

Región	P	N	A	A_P	R_A	B_F	A_R	A_e	A_T	%P	H_O	H_E	F_{IS}
Marginal	24	715	2,18 (0,44)	2,50 (0,51)	1,85 (0,38)	2,71 (0,55)	1,60 (0,33)	1,51 (0,31)	13,00 (2,65)	77,08 (15,73)	0,211 (0,043)	0,284 (0,058)	0,242 (0,049)
Central	18	575	2,13 (0,12)	2,62 (0,09)	1,84 (0,10)	2,33 (0,33)	1,35 (0,21)	1,53 (0,08)	12,59 (0,97)	68,52 (5,70)	0,190 (0,023)	0,274 (0,035)	0,259 (0,049)
Población	42	30,7	2,15 (0,33)	2,55 (0,39)	1,84 (0,28)	2,55 (0,39)	1,50 (0,23)	1,52 (0,23)	12,83 (1,98)	73,41 (11,33)	0,202 (0,031)	0,280 (0,043)	0,249 (0,038)

Apéndice I.13 Índices de fijación (F) isoenzimáticos para las regiones Marginal y Central de *Nothofagus pumilio*. Valores promedio de F (\pm DS), número de test significativos positivos (+), significativos negativos (-), no significativos (n.s.) y número de test realizados por región y total. Entre paréntesis se muestran los porcentajes de los test.

Región	F (DS)	+	-	n.s.	Total
Marginal	0,204 (0,213)	50 (45,45)	2 (1,82)	58 (52,73)	110
Central	0,233 (0,193)	32 (43,24)	1 (1,35)	41 (55,41)	74
Total	0,217 (0,203)	82 (44,57)	3 (1,63)	99 (53,80)	184

Apéndice I.14 Frecuencias alélicas para todos los loci de microsatélites analizados en las regiones marginal (M) y central (C) de *Nothofagus pumilio*.

	<i>ncutas4</i>				<i>ncutas12</i>						<i>ncutas21</i>								<i>ncutas22</i>				<i>NnBIO111</i>					
	308	310	312	314	196	198	200	209	211	215	232	234	236	238	246	248	250	252	267	272	278	284	116	118	120	122	124	126
M	0,886	0,091	0,023	0,000	0,060	0,560	0,360	0,020	0,000	0,000	0,000	0,386	0,023	0,045	0,000	0,068	0,477	0,000	0,960	0,000	0,000	0,040	0,000	0,026	0,526	0,316	0,079	0,053
C	0,607	0,143	0,179	0,071	0,021	0,563	0,333	0,021	0,042	0,021	0,053	0,342	0,053	0,053	0,026	0,105	0,342	0,026	0,788	0,038	0,135	0,038	0,024	0,024	0,690	0,190	0,000	0,071

Apéndice I.15 test de chi-cuadrado (χ^2) para heterogeneidad de frecuencias alélicas de loci polimórficos de microsatélites, los asteriscos indican diferencias significativas (P < 0.05).

Locus	N° de Alelos	χ^2	GL
ncutas4	4	10.261*	3
ncutas12	6	4.097	5
ncutas21	8	6.488	7
ncutas22	4	9.515*	3
NnBIO111	6	6.469	5
Totales		36.829	23

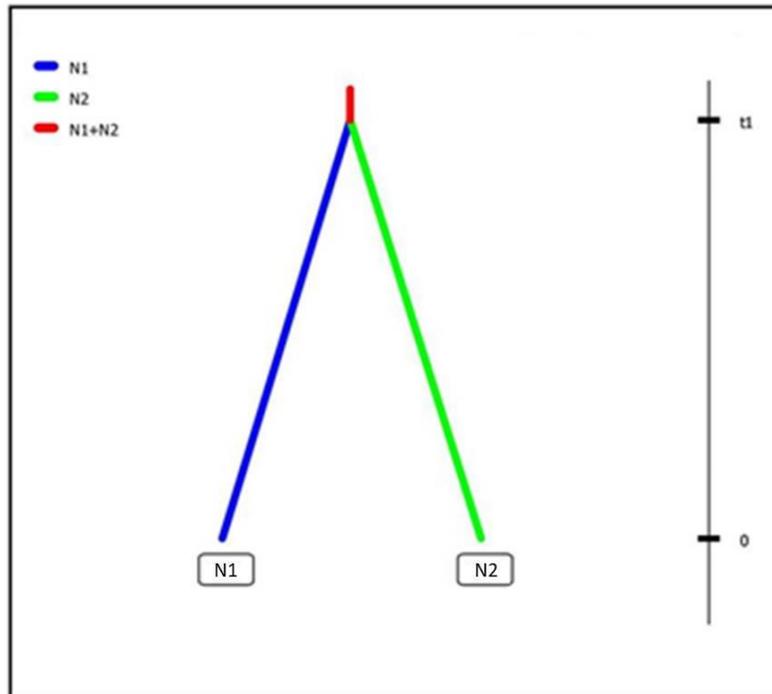
Apéndice I.15 Prueba estadística “ad hoc” propuesta por Evanno (2005) para los datos de isoenzimas. K, número real de grupos. $\text{LnP}(K)$, logaritmo de la probabilidad de los datos. $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$ derivada primera y $|L''(K)| = |L'(K + 1) - L'(K)|$ derivada segunda del logaritmo de la probabilidad de los datos. Delta K= media ($|L''(K)|$) / d.e.(L(K)).

K	Media $\text{LnP}(K)$	Desvio Estándar $\text{LnP}(K)$	$\text{Ln}'(K)$	$ \text{Ln}''(K) $	Delta K
1	-75055,110	105343,263	-	-	-
2	-7607,100	5,253	67448,010	67140,140	12781,966
3	-7299,230	37,499	307,870	698,270	18,621
4	-7689,630	699,010	-390,400	889,180	1,272
5	-7190,850	76,760	498,780	460,350	5,997
6	-7152,420	56,470	38,430	12,080	0,214
7	-7101,910	55,316	50,510	17,920	0,324
8	-7069,320	42,340	32,590	48,320	1,141
9	-7085,050	67,478	-15,730	176,560	2,617
10	-7277,340	278,493	-192,290	-	-

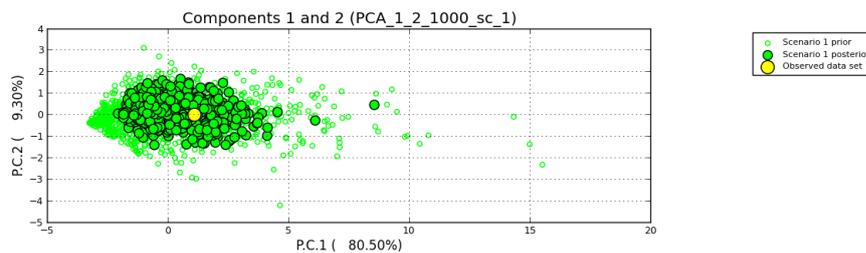
Apéndice I.16 Prueba estadística “ad hoc” propuesta por Evanno (2005) para los datos de microsátélites. K, número real de grupos. $\text{LnP}(K)$, logaritmo de la probabilidad de los datos. $L'(K) = L(K) - L(K - 1)$ derivada primera y $|L''(K)| = |L'(K + 1) - L'(K)|$ derivada segunda del logaritmo de la probabilidad de los datos. Delta K= media ($|L''(K)|$) / d.e.(L(K)).

K	Media $\text{LnP}(K)$	Desvio Estándar $\text{LnP}(K)$	$\text{Ln}'(K)$	$ \text{Ln}''(K) $	Delta K
1	-426,030	0,245	-	-	-
2	-421,220	1,870	4,810	7,820	4,181559
3	-424,230	3,034	-3,010	0,240	0,079097
4	-427,480	5,708	-3,250	3,350	0,586911
5	-427,380	6,746	0,100	3,560	0,527759
6	-430,840	2,763	-3,460	5,530	2,001499
7	-428,770	6,088	2,070	0,700	0,114976
8	-427,400	1,447	1,370	0,190	0,131321
9	-426,220	1,255	1,180	1,620	1,290801
10	-426,660	1,849	-0,440	-	-

Apéndice I.17 Esquema del escenario evolutivo utilizado por el método computacional de aproximación Bayesiana para estimar el tiempo de divergencia entre las poblaciones marginales y centrales de *Nothofagus pumilio*. N1, región marginal. N2, región central. N1+N2, población ancestral. t1, tiempo de divergencia (no esta en escala).



Apéndice I.18 Análisis de componentes principales (PCA) de los datos simulados calculados en base a los valores iniciales de los parámetros, donde se evalúa la capacidad del escenario evolutivo utilizado para predecir datos similares a los observados mediante la comparación de la posición de los datos observados (punto amarillo) con los datos simulados (puntos verdes).



Trabajo de respaldo

Gradientes climáticos modelan la diversidad genética en especies leñosas de amplia distribución: el caso de *Nothofagus pumilio* en los Andes del sur

G. Ignazi¹, P. Mathiasen¹, A. C. Premoli^{1,*}

(1) Laboratorio Ecotono, CRUB-Universidad Nacional del Comahue, INIBIOMA-CONICET, Quintral 1250, 8400 Bariloche, Argentina

* Autor de correspondencia: A.C. Premoli [andrea.premoli@gmail.com]

> Recibido el 12 de enero de 2018 - Aceptado el 10 de enero de 2019

Ignazi, G., Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2019. Gradientes climáticos modelan la diversidad genética en especies leñosas de amplia distribución: el caso de *Nothofagus pumilio* en los Andes del sur. *Ecosistemas* 28(1):35-47 Doi.: 10.7818/ECOS.1547

Los gradientes climáticos modelan la diversidad genética en especies leñosas de amplia distribución: este es el caso del *Nothofagus* ampliamente distribuido en los Andes del sur. Las especies de amplia distribución son un excelente modelo para analizar las respuestas adaptativas a distintos hábitats. Se estudió la variación genética en *Nothofagus pumilio* que habita bosques de montaña y altas latitudes, a lo largo de diferentes gradientes climáticos en Patagonia. Los resultados obtenidos muestran una fuerte relación entre el clima y los diferentes gradientes ambientales; y cómo éstos afectan a la variación genética de *N. pumilio*. Las variables bioclimáticas más influyentes están relacionadas a las precipitaciones de verano y temperaturas de invierno, siendo la tendencia general de mayor diversidad genética a mayores precipitaciones y temperaturas moderadas. Esto demuestra que la distribución espacial de la diversidad genética de esta especie no ocurre aleatoriamente, sino que los patrones de estructuración responden a modelos climáticos complejos. Comprender cómo la adaptación genética y/o los factores ambientales influyen sobre el rango de distribución de las especies resulta esencial para evaluar su supervivencia a largo plazo. Mientras que algunos genotipos pueden extinguirse localmente bajo distintos escenarios climáticos, otros podrían estar adaptados a condiciones climáticas particulares. Taxones de amplia distribución como *N. pumilio* han soportado cambios climáticos en el pasado, como los períodos glaciarios, a través de la adaptación y la plasticidad. Resaltamos la importancia de conservar la diversidad genética de las poblaciones, no solamente para la persistencia a largo plazo, sino también para amortiguar los impactos negativos del cambio climático global.

Palabras clave: adaptación local; cambio climático; plasticidad fenotípica; variables bioclimáticas

Ignazi, G., Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2019. Climatic gradients model genetic diversity in widespread woody trees: the case of *Nothofagus pumilio* in the southern Andes. *Ecosistemas* 28(1):35-47 Doi.: 10.7818/ECOS.1547

Climatic gradients model genetic diversity in widespread woody trees: the case of the widely distributed *Nothofagus* in the southern Andes. Widespread forest species are well suited to be the subject of studies combining adaptive responses to distinct habitats. We studied the genetic diversity of the wide-ranging *Nothofagus pumilio* that inhabits high-elevation and high-latitude forests, along different environmental gradients in Patagonia. The results of this study show a strong relationship between climate and the different environmental gradients; which in turn affect the genetic variation of *N. pumilio*. The most influential variables were related to summer precipitations and winter temperatures, where greater genetic diversity was associated to higher precipitations and milder temperatures. This demonstrates that the genetic diversity of this species is not randomly distributed in space, but it is structured according to complex climatic models. To understand how genetic adaptation and/or environmental aspects influence species' distribution ranges is crucial to evaluate their potential for long term survival. While some genotypes may become locally extinct under different climatic settings, others might be locally adapted to particular climatic conditions, which may allow them to endure such changes. Widespread taxa as *N. pumilio* has undergone past environmental changes, such as those that occurred during glacial periods, through adaptation and plasticity. We highlight the importance of conserving genetic diversity of populations, not only to ensure the long-term persistence, but also to mitigate the negative impacts of global climate change.

Key words: local adaptation; climate change; phenotypic plasticity; bioclimatic variables

Una perspectiva general de la genética de poblaciones y la variabilidad en especies leñosas del hemisferio sur

Las especies de amplio rango que habitan a lo largo de gradientes ambientales encuentran condiciones cambiantes en el medio físico que generan presiones diferenciales de selección que juntamente con la plasticidad fenotípica resultan en poblaciones genéticamente polimórficas. Sumado a esto, las fuerzas neutrales

como el aislamiento genético entre distintas poblaciones y a las variaciones en los tamaños poblacionales sufridos a lo largo del tiempo, generan gran heterogeneidad a nivel intraespecífico que puede estudiarse en el seno de las poblaciones.

El potencial de responder a cambios evolutivos depende de los niveles de variación genética (Reed y Frankham 2003). Por lo tanto, poblaciones con reducida diversidad genética tendrían una capacidad limitada para responder a cambios ambientales (Sgrò et al. 2011). Esto es relevante bajo escenarios de cambio donde la resi-

liencia a cambios futuros estará dada por la diversidad genética presente en las poblaciones. La diversidad genética también se integra con múltiples componentes de la demografía de la población que influyen en la tasa de crecimiento poblacional y la viabilidad, a saber, procesos estocásticos debido al tamaño de la población (es decir, deriva génica) y dispersión entre poblaciones (es decir, flujo de genes) (Allendorf et al. 2013). Poblaciones pequeñas o con conectividad reducida a menudo poseen baja diversidad genética y, por lo tanto, capacidad reducida para responder al cambio ambiental futuro a través de ajustes adaptativos por selección natural, y mayor probabilidad de sufrir los efectos negativos de la endogamia (Willi et al. 2006; Hoffmann y Willi 2008).

Los gradientes ambientales y las características del hábitat pueden influir en el flujo de genes entre poblaciones directamente, interrumpiendo la dispersión (por ejemplo, barreras físicas), o indirectamente, impidiendo el establecimiento exitoso y/o posterior supervivencia (por ejemplo, mediante mecanismos de adaptación local) (Nosil et al. 2005; White et al. 2010; Burgess et al. 2012). Asimismo, cambios a lo largo de dichos gradientes, como los ocurridos durante las oscilaciones climáticas del período Cuaternario, afectaron significativamente a las poblaciones ocupando distintas porciones de los mismos y acarreado diferentes consecuencias en especies que difieren en sus características de historia de vida (i.e. autoecológicas). Así, por ejemplo, aquellas especies sensibles a las bajas temperaturas probablemente sufrieron cuellos de botella demográficos y hasta en algunos casos se podría haber producido la extinción local de sus poblaciones, debiendo colonizar el área perturbada una vez restablecidas las condiciones favorables (Souto et al. 2015). Esto resulta en poblaciones empobrecidas genéticamente debido al efecto fundador, que surge de la acción de la deriva genética a lo largo del frente de recolonización, a diferencia de las especies tolerantes a las bajas temperaturas, que pudieron sobrevivir localmente conservando su estructura genética original (Markgraf et al. 1995; Premoli et al. 2000).

Los bosques templados del sur de Sudamérica poseen el rasgo característico de estar dominados por especies del género *Nothofagus*. Estas son especies principalmente de árboles y también arbustos que están presentes a lo largo de los más de 3000 km de extensión latitudinal que posee el bosque templado de Sudamérica. Una de las especies más conspicuas de los bosques de Patagonia es *Nothofagus pumilio* y ha sido objeto de numerosos estudios de la distribución de la variación genética combinando análisis moleculares con experimentos manipulativos en jardín común y de trasplantes recíprocos (Premoli et al. 2007; Mathiasen y Premoli 2010; Mathiasen y Premoli 2016).

Gradiente latitudinal, influencia de factores históricos

Para muchas especies arbóreas, es conocido el efecto que tuvieron las últimas glaciaciones sobre sus rangos de distribución. Durante períodos fríos las especies tendieron a reducir sus rangos de distribución, quedando restringidas a zonas denominadas de refugio, bajo climas menos extremos. En el caso del hemisferio norte muchas especies se refugiaron hacia el extremo sur (i.e. cálido) de distribución de las especies (Hewitt 2000). Tal sería el caso de especies sensibles al frío que no habrían tolerado las bajas temperaturas registradas durante periodos fríos. Sin embargo, dadas las condiciones físicas del sur de Sudamérica tales como la mayor influencia oceánica y la heterogeneidad del paisaje debido a la presencia de la Cordillera de los Andes, se postuló que las especies tolerantes a las bajas temperaturas habrían podido sobrevivir en pequeñas poblaciones bajo condiciones microclimáticas favorables (Markgraf et al. 1995) a lo largo de sus distribuciones actuales dando lugar a la existencia de refugios múltiples (Premoli et al. 2000). Esta hipótesis fue analizada mediante marcadores moleculares y técnicas de modelado de nicho ecológico a lo largo de la distribución latitudinal de *N. pumilio* que permitieron establecer que *N. pumilio* subsistió a las condiciones del último máximo glacial, ocurrido en Patagonia 25 000 años antes del presente, principalmente hacia el extremo norte (i.e. cálido) de su distribución latitudinal.

Sin embargo, no solamente el modelaje de nicho sino también la presencia de polen a altas latitudes, daban cuenta de la posible presencia *in situ* de *Nothofagus* a través del tiempo a latitudes tan australes como Tierra del Fuego (Premoli et al. 2010). El análisis genético de distintas poblaciones a lo largo de la distribución latitudinal de *N. pumilio* indicó que las poblaciones ubicadas hacia el sur no mostraron evidencia de menor diversidad genética que las del norte, tal como se esperaría si estas últimas hubieran sido la fuente de propágulas de la colonización postglaciaria. No solamente no fue menor la diversidad genética hacia el sur, sino que algunos parámetros poblacionales como la heterocigosis y la riqueza alélica mostraron mayores valores en estas últimas (Mathiasen y Premoli 2010). Por lo tanto, estos resultados sugieren la presencia de un acervo genético que fue conservado a lo largo de las oscilaciones climáticas del Cuaternario de Patagonia.

Gradiente altitudinal, variación genética y demográfica

Las especies leñosas generalmente poseen fecundación cruzada predominante, debido a la polinización y dispersión de semillas anemófilas, y configuran poblaciones de gran tamaño con amplias distribuciones geográficas. Las poblaciones de gran tamaño son relativamente menos afectadas por la deriva génica, que erosiona la diversidad genética en poblaciones pequeñas (Allendorf et al. 2013). Esto, juntamente con el hecho de que las especies principalmente alógamas mantienen altas tasas de flujo génico entre distintas poblaciones, resulta en especies genéticamente variables. Sin embargo, dicha variación genética está lejos de distribuirse homogéneamente en las poblaciones y suele estructurarse a distintas escalas espaciales de manera jerárquica; desde individuos, familias (i.e. grupos de individuos emparentados), poblaciones (conjunto de individuos que comparten un acervo genético común y relativamente diferenciado de otras poblaciones), y regiones geográficas (e.g. Epperson 2003; Wagner y Fortin 2013).

La Cordillera de los Andes presenta marcados gradientes altitudinales a lo largo de los cuales las condiciones ambientales tales como, la temperatura, la radiación solar, la exposición al viento y las características del suelo, varían marcadamente con la altitud en distancias de unos pocos cientos de metros. En el extremo superior del gradiente altitudinal, las condiciones extremas imponen restricciones severas para la reproducción y establecimiento de plantas por semillas, debido a un acortamiento de la estación de crecimiento, a las bajas temperaturas y a la persistencia de la cobertura de nieve (Körner 2007). Como consecuencia, se espera encontrar una gran variación morfológica en especies que habitan un amplio rango altitudinal. Esta variación puede estar explicada no sólo por la capacidad de aclimatación de dichas especies a distintos ambientes (plasticidad fenotípica) sino también por la selección diferencial de genotipos bajo distintas condiciones de un gradiente ambiental. Además, un restringido flujo génico dentro y entre poblaciones, provocaría un incremento en la diferenciación genética resultando en una compleja estructura genética. Dichas restricciones al flujo génico dentro de las poblaciones pueden ocurrir por limitada dispersión de semillas y establecimiento local de propágulos, y/o marcadas diferencias en la fenología de la floración que aíslan reproductivamente aún a poblaciones contiguas.

A lo largo del gradiente altitudinal *N. pumilio* presenta una variación morfológica significativa en sus formas de crecimiento (Rusch 1993; Barrera et al. 2000). Experimentos de jardín común mostraron que las diferencias en la arquitectura de las plantas, la morfología foliar y caracteres ecofisiológicos poseen base genética (Premoli 2004; Premoli y Brewer 2007; Premoli et al. 2007). Se ha descrito un alto grado de asociación fenológica con la altitud, habiendo un desfase significativo de dos semanas en la apertura de las yemas (y por lo tanto en la floración) entre sitios de los límites altitudinal inferior y superior (Rusch 1993). El mantenimiento de dichas diferencias en jardín común demostró que la fenología foliar está determinada genéticamente (Premoli et al. 2007). Modelos demográficos en gradientes altitudinales de *N. pumilio* mostraron que la disponibilidad de semillas y el establecimiento de adultos se vuel-

ven cada vez más escasos con el aumento de la altitud donde además la regeneración ocurre principalmente por una abundante producción de rebrotes (y escasez de renuevos) (Martínez-Pastur et al. 1997; Cuevas 2000; Daniels 2000; Premoli 2004). En cambio, en el límite inferior del bosque la regeneración de *N. pumilio* ocurre principalmente gracias a la apertura de claros bajo el dosel, ya sea por la caída de árboles (Heinemann et al. 2000) u otros disturbios a mayor escala (e. g. avalanchas, incendios, vulcanismo).

Gradiente longitudinal de precipitación

Sobre las laderas orientales de la Cordillera de los Andes existe un marcado gradiente ambiental longitudinal. Esto se debe principalmente a la influencia de los vientos predominantes provenientes del océano Pacífico y el efecto sombra de la cordillera. De esta manera, se genera un pronunciado gradiente de precipitación de oeste a este, en el cual las precipitaciones anuales disminuyen de 3000 mm a menos de 800 mm en una distancia de sólo 50 Km (Veblen et al. 1996). Hacia el extremo seco del gradiente de precipitación, en el ecotono entre la estepa y bosque subandino, *N. pumilio* forma poblaciones pequeñas y aisladas. Dichas poblaciones consideradas marginales sufren el efecto combinado del aislamiento y la deriva genética que juntamente con presiones diferenciales de selección resultarán en diferencias genéticas (Yang et al. 2016).

Caso de estudio: variación genética y ecológica de una especie leñosa de amplia distribución en el hemisferio Sur (*Nothofagus pumilio*)

Si bien existe abundante información sobre las presiones de selección divergentes en *N. pumilio* a lo largo de su rango de distribución, resta analizar la influencia del clima sobre el acervo genético

de sus poblaciones. En este trabajo analizamos el efecto del clima sobre distintos parámetros de diversidad genética neutral de una especie de bosque de amplia distribución que ocupa los gradientes ambientales altitudinal, latitudinal, y longitudinal de Patagonia. El objetivo del trabajo es dilucidar las variables climáticas que mayor influencia tienen sobre la variación genética de las poblaciones. De esta manera, patrones de variación en rasgos de base genética en relación con el clima podrían utilizarse para guiar la transferencia de semillas para reforestación e implementación de prácticas de translocación de individuos y facilitar la adaptación rápida a climas cambiantes (Aitken y Whitlock 2013). Se utilizarán datos genéticos propios (gradiente longitudinal) e información previamente publicada por los demás autores de este trabajo (gradientes altitudinal y latitudinal) como variables dependientes de modelos de regresión múltiple en las que las variables bioclimáticas a lo largo de cada uno de dichos gradientes serán utilizadas como variables explicatorias independientes.

Material y métodos

Especie de estudio

Nothofagus pumilio es una especie de hoja caduca que forma bosques puros y domina el límite altitudinal superior a lo largo de toda la distribución del bosque templado austral, ocupando también los pisos altitudinales inferiores llegando hasta el nivel del mar en el extremo austral (Fig.1). Por lo tanto, se ve afectada por los tres gradientes: latitudinal (norte-sur), longitudinal (este-oeste) y altitudinal de elevación. Los mismos representan gradientes complejos dados por un paisaje montañoso con la presencia de la Cordillera de los Andes que corre de norte a sur y la influencia de los vientos predominantes del oeste que determinan el más abrupto de los gradientes ambientales y que corresponde al longitudinal.

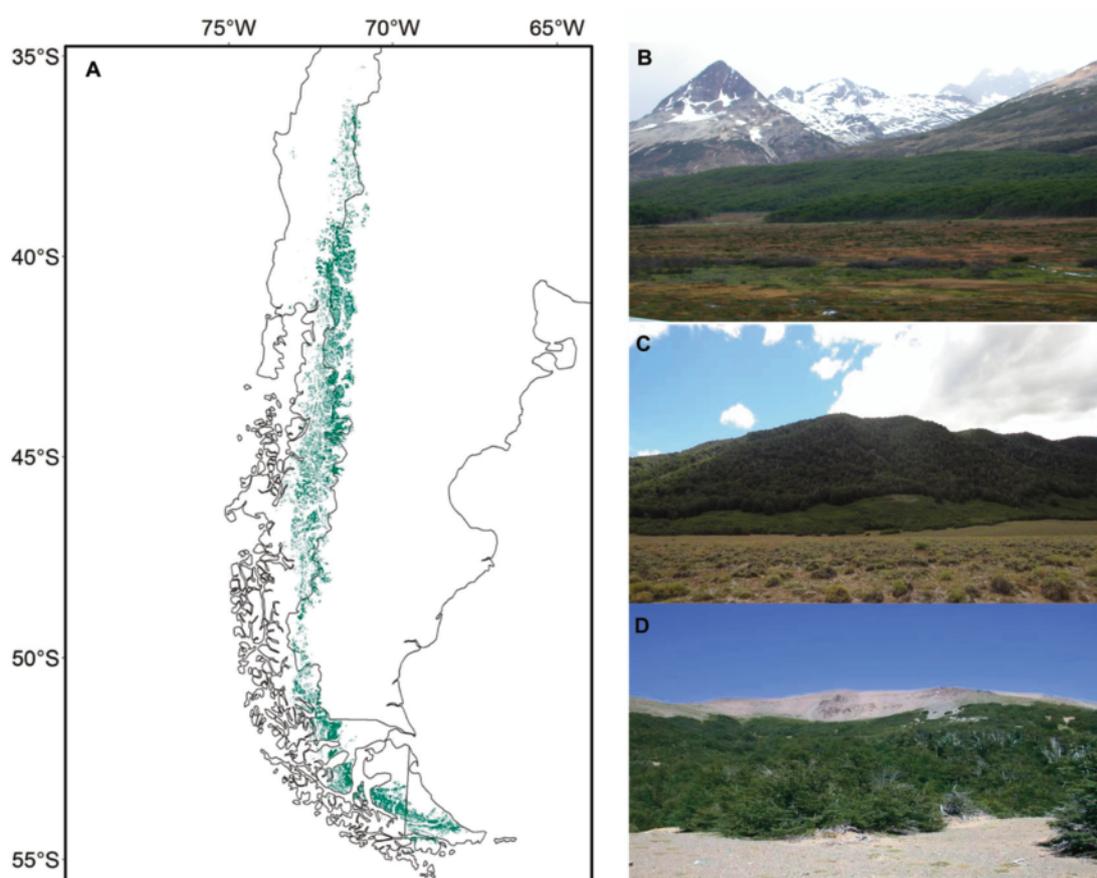


Figura 1. Mapa del área de distribución espacial de *N. pumilio* en los Andes del sur (A), y fotografías donde se muestran poblaciones ubicadas en los extremos de los gradientes latitudinal (B), longitudinal (C), y altitudinal (D).

Figure 1. Map of the spatial distribution area of *N. pumilio* in the southern Andes (A), and photographs depicting populations in the extremes of the latitudinal (B), longitudinal (C), and altitudinal (D) gradients.

Análisis de datos

Se analizó la variación en la diversidad genética neutral de *N. pumilio* a lo largo de los gradientes climáticos latitudinal, longitudinal y altitudinal mediante marcadores moleculares neutros isoenzimáticos. Se utilizaron datos de diversidad genética extraídos de trabajos publicados anteriormente para 14 y 27 poblaciones de los gradientes altitudinal (Premoli 2003) y latitudinal (Mathiasen y Premoli 2010), respectivamente (Tablas A1, A2 y A3). Para el gradiente longitudinal se sumaron datos isoenzimáticos de 35 poblaciones de *N. pumilio* ubicadas entre los 40 y 43°S a los datos ya publicados de 7 poblaciones centrales en el mismo rango (Mathiasen y Premoli 2010). El procedimiento de extracción y análisis de isoenzimas para las nuevas poblaciones se realizó siguiendo la metodología descrita en Premoli (2003). Para cada sitio se extrajeron los datos climáticos en base a 19 variables bioclimáticas que fueron obtenidas de la base de datos de WorldClim versión 1 (Hijmans et al. 2005; <http://www.worldclim.org>) con una resolución espacial de 30 seg (Tabla A4). Estas variables son derivadas de promedios mensuales de temperatura y precipitación representativos de las dimensiones climáticas relevantes para la determinación de la distribución de especies (Hijmans et al. 2005). A continuación, se realizaron regresiones lineares simples para evaluar la relación entre las variables bioclimáticas y los diferentes gradientes ambientales latitudinal, longitudinal y altitudinal. Además, para evaluar la diversidad genética en cada gradiente se utilizaron los datos de cuatro parámetros de diversidad genética extraídos de los trabajos mencionados anteriormente, que consistieron en: número de alelos efectivo (Ae), riqueza alélica (Ar), heterocigosis observada (Ho) y heterocigosis esperada (He). Dichos parámetros fueron calculados utilizando los programas POPGENE v1.32 (Yeh et al. 1999) y FSTAT v 2.9.3 (Goudet 2001). Para evaluar la variación en la diversidad genética de la especie en función de los gradientes latitudinal, longitudinal y altitudinal se realizaron regresiones lineares simples entre las cuatro variables de diversidad genética (Ae, Ar, Ho y He) y la latitud, longitud y altitud para cada gradiente, respectivamente. Se realizaron regresiones múltiples para evaluar la relación entre las variables de diversidad genética (variables dependientes) y las 19 variables bioclimáticas (variables independientes). Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa STATISTICA v.7.0 (StatSoft, Inc. 2004) y se probaron los supuestos de normalidad (prueba de Kolmogorov-Smirnov) y homocedasticidad (evaluada mediante gráfico de residuales vs. predichos). Las regresiones fueron consideradas significativas con una significancia de $P < 0.05$. En el caso de las regresiones múltiples los p-valores fueron corregidos siguiendo a Benjamini y Hochberg (1995).

Resultados

Los análisis de regresiones simples realizadas entre las 19 variables bioclimáticas y los diferentes gradientes ambientales arrojaron resultados significativos en la mayoría de los casos (Tablas A5-A7). Para el gradiente latitudinal 16 de las 19 variables bioclimáticas mostraron una asociación significativa con la latitud, las variables asociadas con la precipitación aumentan hacia latitudes más altas, mientras que las variables asociadas a la temperatura mostraron los menores valores hacia el sur de la distribución de la especie (Tabla A5). En el gradiente longitudinal, 13 de las 19 variables bioclimáticas mostraron una asociación significativa con la longitud, de manera que las variables relacionadas con la precipitación disminuyen hacia el este de la distribución de la especie, mientras que las variables asociadas a la temperatura aumentan (Tabla A6). Por otro lado, en el gradiente altitudinal, 14 de las 19 variables bioclimáticas arrojaron una relación significativa con la altitud (Tabla A7). Las variables de temperatura mostraron una relación negativa con la altitud, mientras que las variables de precipitación mostraron diferentes tendencias según la época del año. En los meses más fríos y húmedos, las precipitaciones fueron menores en altitudes menores, mientras que en los meses más cálidos y secos las precipitaciones fueron menores a mayor altitud (Tabla A7).

Las regresiones simples entre la diversidad genética neutral y los distintos gradientes ambientales arrojaron relaciones significativas entre los parámetros de diversidad genética neutral y la latitud y la altitud (Tabla A8, Fig. 2). No se encontraron relaciones significativas entre los parámetros de diversidad genética y el gradiente longitudinal (Tabla A8, Fig. 2). Para el gradiente latitudinal, se encontró un incremento significativo ($P < 0.05$) de Ae ($r^2 = 0.30$), Ar ($r^2 = 0.29$), Ho ($r^2 = 0.33$), y He ($r^2 = 0.29$) con la latitud (Tabla A8, Fig. 2). Por otro lado, las regresiones simples realizadas para el gradiente altitudinal mostraron una disminución significativa ($P < 0.05$) en Ae ($r^2 = 0.31$), Ar ($r^2 = 0.38$), y en Ho ($r^2 = 0.63$) y He ($r^2 = 0.32$) con la altitud (Tabla A8, Fig. 2).

Por último, los análisis de regresión múltiple entre los parámetros de diversidad genética y las variables bioclimáticas arrojaron resultados significativos para los distintos gradientes ambientales (Tabla 1). En el gradiente latitudinal, Ae, Ar, Ho y He presentaron una relación positiva significativa con las variables de precipitación, especialmente precipitaciones de verano, y además presentaron mayores valores en sitios donde las variables de temperatura alcanzaban valores intermedios (Tabla 1, Fig. A1). En el gradiente longitudinal, Ae mostró una relación significativa positiva con la precipitación del mes más seco, es decir la de verano (Tabla 1, Fig. A1). En el gradiente altitudinal, Ae y He presentaron una relación significativa y positiva con la precipitación del mes más seco (verano), mientras que las variables Ar y Ho mostraron una relación significativa y positiva con la temperatura media de los meses más húmedos, que corresponden a los meses de otoño-invierno (Tabla 1, Fig. A1).

Discusión

Los resultados obtenidos en este trabajo ponen en evidencia una fuerte relación entre el clima, a lo largo de gradientes ambientales (latitudinal, longitudinal y altitudinal) modelando los niveles de variación genética de las poblaciones de *N. pumilio*. Las variables bioclimáticas más influyentes sobre la diversidad genética se encontraron relacionadas principalmente a las precipitaciones de verano y temperaturas de invierno, siendo la tendencia general de mayor diversidad genética a mayores precipitaciones y temperaturas.

Comprender cómo la adaptación genética y/o los factores ambientales influyen sobre el rango de distribución de las especies resulta esencial para evaluar su supervivencia a largo plazo (Kappeler et al. 2016). La persistencia de las poblaciones bajo cambios ambientales puede ser posible si las poblaciones incluyen variantes genéticas adaptadas a esos ambientes (Safriel et al. 1994; Sabatier et al. 2011), o exhiben alta plasticidad fenotípica. Bajo escenarios de calentamiento global se espera una retracción en el rango de distribución de las especies, siendo las poblaciones ubicadas en los extremos de los gradientes ambientales (latitudinal, longitudinal y altitudinal) las que sufrirán en mayor medida los efectos negativos del cambio climático. La sensibilidad potencial de las especies a estos cambios puede ser, al menos en parte, estimada *a priori* a partir de su distribución geográfica a lo largo de gradientes y de sus características de nicho (Broennimann et al. 2006). Si las especies no se adaptan lo suficientemente rápido, o su amplitud de tolerancia es muy restringida para responder mediante plasticidad fenotípica, deberán desplazarse en el espacio geográfico para encontrar condiciones ambientalmente favorables, dando lugar a procesos de colonización o extinción local. Debido a esto, el estudio e interpretación de patrones de variación genética a lo largo de gradientes ambientales se ha convertido en un objetivo prioritario en conservación. Una de las predicciones bajo calentamiento es la migración de las especies hacia altas latitudes, i.e. hacia el sur en el Hemisferio Sur, rastreando su óptimo climático (Parmesan y Yohe 2003). El aumento de la variación genética encontrado hacia el sur sugiere que dichas poblaciones de *N. pumilio* contarían con un acervo genético diverso para responder ante climas cambiantes.

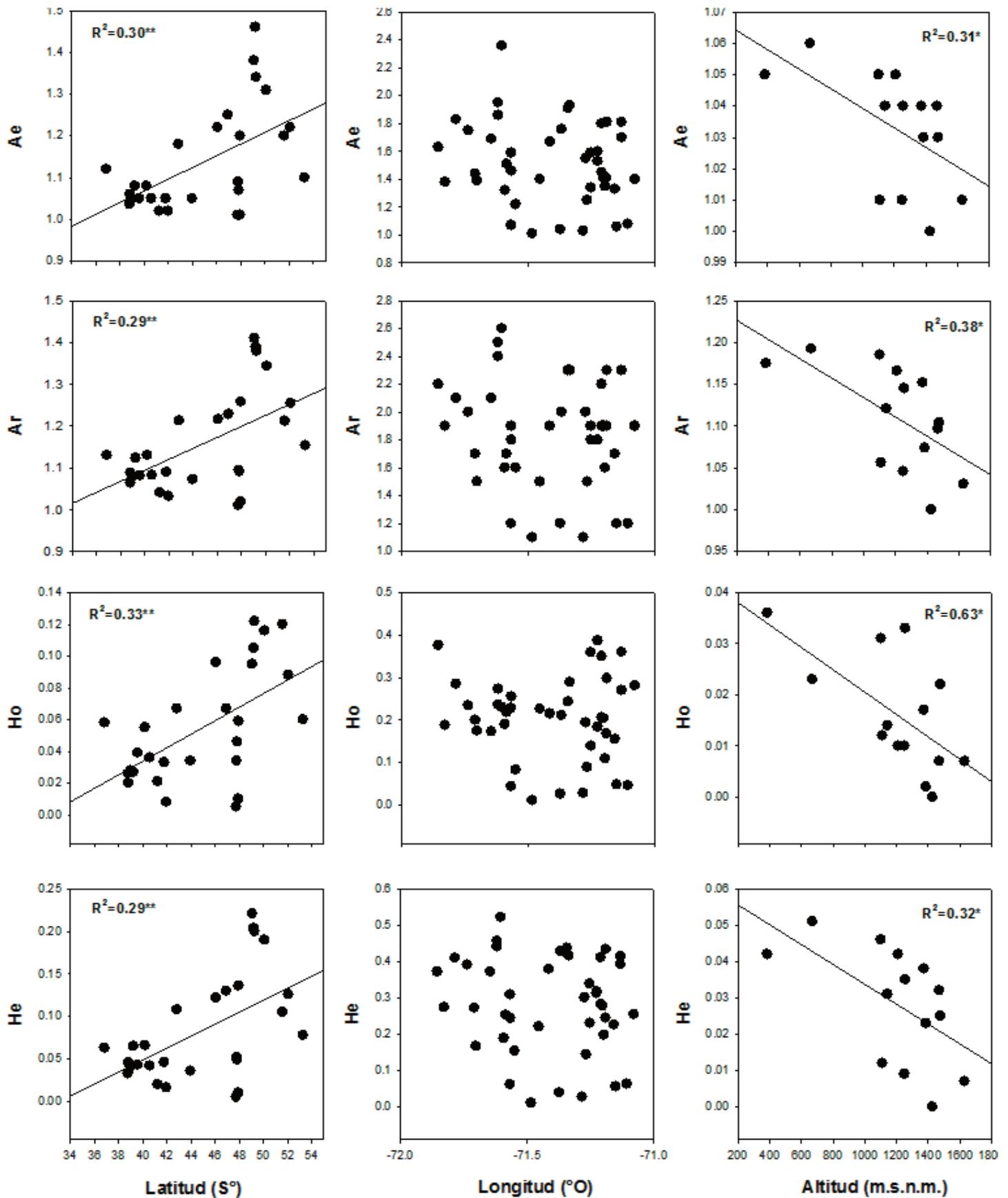


Figura 2. Relación entre los parámetros de diversidad genética y los diferentes gradientes ambientales de *N. pumilio*. Ae, número efectivo de alelos; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada; He, heterocigosis esperada.

Figure 2. Relationship among genetic diversity parameters and the different environmental gradients of *N. pumilio*. Ae, effective number of alleles; Ar, allelic richness; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity.

Tabla 1. Resumen de las regresiones múltiples entre las variables de diversidad genética y las 19 variables bioclimáticas para *N. pumilio* en los diferentes gradientes ambientales. Ae, número efectivo de alelos; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada; He, heterocigosis esperada. Las referencias de las variables bioclimáticas se encuentran en la Tabla A4.

Table 1. Multiple regression summary among genetic diversity parameters and the 19 bioclimatic variables for *N. pumilio* for the different environmental gradients. Ae, effective number of alleles; Ar, allelic richness; Ho, observed heterozygosity; He, expected heterozygosity. References for bioclimatic variables are in Table A4.

	Variable dependiente	R ²	F	Df	P	Variables predictoras	B
Gradiente latitudinal	Ae	0.80	13.52	6;20	<0.001	BIO14	2.56
						BIO17	-7.34
						BIO18	5.45
						BIO8	-0.61
						BIO9	0.83
						BIO15	-0.76
	Ar	0.78	9.44	7;19	0.029	BIO17	-6.89
						BIO18	5.02
						BIO8	-0.82
	Ho	0.79	12.47	6;20	0.033	BIO18	6.84
						BIO17	-8.57
						BIO8	-0.33
BIO14						2.49	
BIO9						0.67	
He	0.77	9.05	7;19	0.029	BIO17	-6.59	
					BIO18	4.74	
					BIO8	-0.82	
Gradiente longitudinal	Ae	0.32	3.46	5;36	0.050	BIO14	2.80
						BIO18	-4.36
						BIO9	-0.73
						BIO16	7.96
Gradiente altitudinal	Ae	0.38	7.31	1;12	0.019	BIO14	0.62
	Ar	0.39	7.56	1;12	0.018	BIO8	0.62
	Ho	0.47	4.87	2;11	0.050	BIO8	0.76
	He	0.35	6.41	1;12	0.026	BIO14	0.59

Los gradientes ambientales son el resultado de interacciones complejas de variables climáticas que impactan en el seno de las poblaciones naturales. Las especies de amplias distribuciones mostrarán ajustes a dichas variaciones ambientales pudiendo responder de manera adaptativa (i.e. con base genética) en respuesta a dichos gradientes. Si bien se espera que la selección natural opere principalmente sobre caracteres poligénicos cuantitativos, se ha sugerido que medidas de diversidad genética pueden utilizarse como sustitutos de la aptitud (Reed y Frankham 2003). En particular, los patrones encontrados para marcadores neutrales en este trabajo en el gradiente altitudinal se pueden correlacionar con las respuestas adaptativas medidas sobre *N. pumilio* provenientes de condiciones contrastantes de altitud.

Experimentos de jardines comunes reflejaron diferencias de base genética fenológicas, ecofisiológicas, arquitecturales de las plantas y morfología foliar que reflejan el abrupto gradiente climático altitudinal (Premoli et al. 2007; Premoli y Brewer 2007). Así, la mayor diversidad genética encontrada bajo mayores temperaturas se correlaciona con mayor crecimiento a menores alturas (Premoli et al. 2007). Sin embargo, el acervo genético de las poblaciones no solamente reflejará los efectos directos del clima, sino también indirectos que impactan sobre la demografía de las poblaciones y se ven reflejados en su estructura genética. Así ocurre por ejemplo, en rodales de *N. pumilio* de baja a mediana altitud donde la predo-

minante regeneración por semillas resulta en una estructura demográfica compleja que consiste en el agrupamiento espacial de individuos con genotipos emparentados y una mayor diversidad genética (Mathiasen y Premoli 2013). En cambio, en el límite altitudinal superior, predomina la propagación vegetativa con una esporádica reproducción sexual, produciendo una mayor homogeneidad genética. Si bien bajo cambio global se predicen migraciones altitudinales de las especies (Parmesan y Yohe 2003), experimentos de trasplantes recíprocos de *N. pumilio* sugieren que las poblaciones genéticamente diversas de menores altitudes tendrán más capacidad de respuesta que las que se encuentran hacia el límite altitudinal superior del bosque, las que a su vez serían propensas de sufrir decaimiento local (Mathiasen y Premoli 2016). Estos resultados muestran que las repuestas que se predicen bajo calentamiento en el gradiente altitudinal pueden ser más complejas que lo esperado.

Otra de las predicciones bajo el calentamiento global se refiere al aumento de estrés por sequía, el cual se espera sea aún más marcado hacia los extremos de distribución de las especies (Jump et al. 2009). Sumado a esto, en Patagonia, la influencia de la Cordillera de los Andes crea un pronunciado gradiente de precipitación longitudinal de oeste a este debido al efecto sombra de lluvia de los vientos húmedos provenientes del Pacífico (Veblen et al. 1996). Por lo cual las poblaciones de *N. pumilio* en los extremos más xé-

ricos se encuentran bajo intensas presiones de selección. En este trabajo encontramos una asociación significativa entre el número efectivo de alelos y el aumento de la precipitación del mes más seco con la longitud. Sin embargo, el análisis de poblaciones a lo largo del gradiente longitudinal mediante secuencias conservadas de ADN del cloroplasto mostró la presencia de variantes genéticas únicas hacia el extremo seco de precipitación, lo que destaca el rol de las poblaciones marginales como reservorio genético en el largo plazo (Ignazi G. datos sin publicar). Por otro lado, el cultivo en jardín común de *N. pumilio* de los extremos del gradiente de precipitación, si bien resultaron similares para caracteres cuantitativos (número de ramas, rasgos morfológicos foliares y densidad estomática), las respuestas ecofisiológicas a un experimento de déficit hídrico de plántulas provenientes del extremo húmedo mostraron menor eficiencia en el uso del agua que las del seco sugiriendo la existencia de diferencias genéticas entre orígenes (Ignazi G. datos sin publicar). Esta evidencia indica que las poblaciones de *N. pumilio* que habitan el extremo seco han desarrollado adaptaciones diferenciales a las condiciones contrastantes de precipitación del gradiente longitudinal.

Conclusiones

En este trabajo resaltamos la importancia de la puesta en valor de la diversidad genética en el seno de las poblaciones como prioritario, no solamente para la persistencia a largo plazo de las especies, sino también para amortiguar los impactos negativos de los rápidos cambios ambientales que ocurren actualmente. En relación con esto último, las especies forestales estarían en riesgo debido a sus ciclos de vida largos y madurez reproductiva tardía, lo cual puede impactar negativamente sobre la capacidad de desarrollar respuestas rápidas (Jump et al. 2008). Resulta entonces primordial la protección y manejo ecológico de los hábitats hacia los extremos de distribución de las especies, reduciendo por ejemplo otras presiones extrínsecas de origen antrópico (Moritz et al. 2012), con el objetivo de conservar la diversidad existente (Kapeller et al. 2016).

Las especies de amplia distribución que habitan gradientes ambientales presentan variación en una gran cantidad de caracteres, muchos de los cuales poseen base genética. Conocer el grado de variación genética y/o de plasticidad fenotípica para distintos caracteres de especies dominantes, es relevante para predecir posibles respuestas futuras a cambios en el clima. Bajo escenarios de calentamiento global se espera una retracción en el rango de distribución de las especies. Se hipotetiza que las poblaciones ubicadas en los extremos de los gradientes ambientales (latitudinal, longitudinal y altitudinal) serán las que sufrirán en mayor medida los efectos negativos del cambio climático. Las poblaciones ubicadas hacia el norte, en mayores alturas y hacia los extremos secos serían más vulnerables al calentamiento dada la relativamente reducida diversidad genética que poseen para responder a nuevas condiciones.

Referencias

- Aitken, S.N., Whitlock, M.C. 2013. Assisted gene flow to facilitate local adaptation to climate change. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 44:367-388.
- Allendorf, F.W., Luikart, G., Aitken, S.N. 2013. *Conservation and the Genetics of Populations*, 2nd edition. Wiley- Blackwell, Oxford, Reino Unido.
- Benjamini, Y., Hochberg, Y. 1995. Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society, series B* 57: 289-300.
- Barrera, M.D., Frangi, J.L., Richter, L.L., Perdomo, M.H., Pinedo, L.B. 2000. Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Vegetation Science* 11: 179-188.
- Broennimann, O., Thuiller, W., Hughes, G.O., Midgley, G.F., Alkemade, J.R.M., Guisan, A. 2006. Do geographic distribution, niche property and life form explain plants' vulnerability to global change? *Global Change Biology* 12: 1079-1093.
- Burgess, S.C., Treml, E., Marshall, D.J. 2012. How do dispersal costs and habitat selection influence realized population connectivity? *Ecology* 93: 1378-1387.
- Cuevas, J.G. 2000. Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Ecology* 88: 840-855.
- Daniels, L.D. 2000. *The dynamics of altitudinal treelines in northern Patagonia: spatio-temporal influences of climate*. Ph.D Thesis, University of Colorado, Estados Unidos.
- Epperson, B.K. 2003. *Geographical Genetics*. Princeton University Press, New Jersey, Estados Unidos.
- Goudet, J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (v 2.9.3)*. Disponible en <https://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>.
- Heinemann, K., Kitzberger, T., Veblen, T.T. 2000. Influences of gap micro-heterogeneity on the regeneration of *Nothofagus pumilio* in a xeric old-growth forest of northwestern Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 25-31.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J.L., Jones, P.G., Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25:1965-1978.
- Hoffmann, A.A., Willi, Y. 2008. Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics* 9: 421-432.
- Jump, S., Marchant, R., Peñuelas, J. 2008. Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends in Plant Science* 14: 51-58.
- Jump, A.S., Csaba, M., Peñuelas, J. 2009. The altitude-for-latitude disparity in the range retractions of woody species. *Trends in Ecology and Evolution* 24: 694-701.
- Kapeller, S., Dieckmann, U., Schueler, S. 2016. Varying selection differential throughout the climatic range of Norway spruce in Central Europe. *Evolutionary Applications* 10: 25-38.
- Körner, C. 2007. The use of altitude in ecological research. *Trends in Ecology and Evolution* 22: 569-574.
- Markgraf, V., McGlone, M., Hope, G. 1995. Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems a southern perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 10: 143-147.
- Martínez Pastur, G.J., Pinedo, L., Fernández D.C. 1997. Germinación de semillas y sistemas de propagación clonal en bosques de Tierra del Fuego. *Actas II Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Tomo Bosques Nativos y Protección Ambiental. Posadas, Argentina*.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2010. Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular ecology* 19: 371-85.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2013. Fine-scale genetic structure of *Nothofagus pumilio* (lenga) at contrasting elevations of the altitudinal gradient. *Genetica* 141: 95-105.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C. 2016. Living on the edge: adaptive and plastic responses of the tree *Nothofagus pumilio* to a long-term transplant experiment predict rear-edge upward expansion. *Oecologia* 181: 607-619.
- Moritz, C., Langham, G., Kearney, M., Krockenberger, A., VanDerWal, J., Williams, S. 2012. Integrating phylogeography and physiology reveals divergence of thermal traits between central and peripheral lineages of tropical rainforest lizards. *Philosophical Transactions of the Royal Society B* 367: 1680-1687.
- Nosil, P., Vines, T.H., Funk, D.J. 2005. Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution* 59: 705-719.
- Parmesan, C., Yohe, G. 2003. A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature* 421: 37-42.
- Premoli, A.C. 2003. Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity* 94: 218-226.
- Premoli, A.C. 2004. Variación en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasner (Lenga). En: Donoso, C., Premoli, A.C., Gallo, L., Iliniza, R.(eds) *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*, pp. 145-166. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, Chile.
- Premoli, A.C., Brewer, C.A. 2007. Environmental vs genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Australian Journal of Botany* 55: 585-591.

- Premoli, A.C., Kitzberger, T., Veblen, T.T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251-260.
- Premoli, A.C., Raffaele, E., Mathiasen, P. 2007. Morphological and phenological differences in *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations: Evidence from a common garden. *Austral Ecology* 32: 515-523.
- Premoli, A.C., Mathiasen, P., Kitzberger, T. 2010. Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: Genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54°S) glacial refugia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 298: 247-256.
- Reed, D.H., Frankham, R. 2003. Correlation between Fitness and Genetic Diversity. *Conservation Biology* 17: 230-237.
- Rusch, V.E. 1993. Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* 66: 131-141.
- Sabatier, Y., Azpicueta, M.M., Marchelli, P., González-Peñalba, M., Lozano, L., García, L., Martínez, A. et al. 2011. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 46: 131-138.
- Safriel, U.N., Volis, S., Kark, S. 1994. Core and Peripheral Populations and Global Climate Change. *Israel Journal of Plant Sciences* 42: 331-345.
- Sgrò, C.M., Lowe, A.J., Hoffmann, A.A. 2011. Building evolutionary resilience for conserving biodiversity under climate change. *Evolutionary Applications* 4: 326-337.
- Souto, C.P., Kitzberger, T., Arbetman, M.P., Premoli, A.C. 2015. How do cold-sensitive species endure ice ages? Phylogeographic and paleodistribution models of postglacial range expansion of the mesothermic drought-tolerant conifer *Austrocedrus chilensis*. *New Phytologist* 208: 960-972.
- StatSoft, Inc. 2004. *STATISTICA (data analysis software system)*, version 7. Disponible en <https://www.statsoft.com>.
- Veblen, T.T., Donoso, C., Kitzberger, T., Rebertus, A. 1996. Ecology of Southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. En: Veblen, T.T., Hill, R.S., Read, J. (eds.), *The ecology and biogeography of Nothofagus forests*, pp. 293-353. Yale University Press, New Haven, Estados Unidos.
- Wagner, H.H., Fortin, M. 2013. A conceptual framework for the spatial analysis of landscape genetic data. *Conservation Genetics* 14: 253-261.
- White C., Selkoe, K.A., Watson, J., Siegel, D.A. Zacherl, D.C., Toonen, R.J. 2010. Ocean currents help explain population genetic structure. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 277: 1685-1694.
- Willi, Y., Van Buskirk, J., Hoffmann, A.A. 2006. Limits to the Adaptive Potential of Small Populations. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 37: 433-458.
- Yang, A., Dick, C.W., Yao, X., Huang, H. 2016. Impacts of biogeographic history and marginal population genetics on species range limits: a case study of *Liriodendron chinense*. *Scientific Reports* 6: 1-12.
- Yeh, F.C., Yang, R.C., Boyle, T.B.J., Ye, Z.H., Mao, J.X. 1999. *POPGENE 1.32*, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis. *Molecular Biology and Biotechnology Center*, University of Alberta, Edmonton, Estados Unidos. Disponible en <https://sites.ualberta.ca/~fyeh/popgene.html>.

Anexo

Tabla A1. Características geográficas y diversidad genética de las 27 poblaciones analizadas de *Nothofagus pumilio* en el gradiente latitudinal. Ae, número de alelos efectivo; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada y He, heterocigosis esperada.

Table A1. Geographical characteristics and genetic diversity of the 27 analyzed populations of *Nothofagus pumilio* for the latitudinal gradient. Ae, effective number of alleles; Ar, allelic richness; Ho, observed heterozygosity and He, expected heterozygosity.

Población*	ID	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
Lag. Epulauquen	EPU	-36.86	-71.07	1663	1.12	1.13	0.058	0.063
Po. Icalma	ICA	-38.80	-71.27	1330	1.04	1.06	0.026	0.033
Vn Batea Mahuida.	BMH	-38.84	-71.23	1500	1.06	1.09	0.020	0.046
L. Moquehue	MIR	-39.00	-71.38	1275	1.05	1.08	0.028	0.041
L. Rucachoroi	RCH	-39.24	-71.21	1380	1.08	1.12	0.027	0.065
Po. Tromen	TRO	-39.59	-71.43	1125	1.05	1.08	0.039	0.043
Co. Chapelco	CHP	-40.20	-71.31	1375	1.08	1.13	0.055	0.066
Po. Cordoba	CBA	-40.59	-71.16	1360	1.05	1.08	0.036	0.042
Co. Challhuaco	CHA	-41.25	-71.28	1325	1.02	1.04	0.021	0.020
Co. Perito Moreno	PMO	-41.79	-71.56	990	1.05	1.09	0.033	0.046
Co. Piltriquitron	PQN	-41.97	-71.48	1250	1.02	1.03	0.008	0.016
Co. La Hoya	LHY	-42.84	-71.26	1275	1.18	1.21	0.067	0.108
L. Vintter	VIN	-43.97	-71.52	950	1.05	1.07	0.034	0.036
El Portezuelo	PTZ	-46.07	-71.69	1001	1.22	1.22	0.096	0.122
A. Canalele	CAN	-46.93	-71.86	1087	1.25	1.23	0.067	0.130
Mte. San Lorenzo	SLZ	-47.75	-72.35	1100	1.01	1.01	0.005	0.005
Co. Leones	LEO	-47.79	-72.12	890	1.09	1.09	0.034	0.052
L. Azara	AZA	-47.84	-72.27	900	1.07	1.09	0.046	0.049
Riviera	RIV	-47.94	-72.37	850	1.01	1.02	0.010	0.010
L. Burmeister	BUR	-47.95	-72.12	910	1.20	1.26	0.059	0.136
L. del Desierto	DES	-49.08	-72.89	457	1.38	1.41	0.095	0.221
Chaltén Seco	CTS	-49.21	-72.95	454	1.46	1.39	0.105	0.204
El Chaltén	CTN	-49.27	-72.95	687	1.34	1.38	0.122	0.200
L. Onelli	ONI	-50.11	-73.30	196	1.31	1.34	0.116	0.190
L. Grey	GRE	-51.59	-72.60	118	1.20	1.21	0.120	0.105
Mte. Alto	MAL	-52.08	-71.86	292	1.22	1.26	0.088	0.126
Pta. Arenas	ARE	-53.29	-71.05	162	1.10	1.15	0.060	0.078

* datos extraídos de [Mathiasen y Premoli \(2010\)](#).

Tabla A2. Características geográficas y diversidad genética de las 42 poblaciones analizadas de *Nothofagus pumilio* en el gradiente longitudinal. Ae, número de alelos efectivo; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada y He, heterocigosis esperada.

Table A2. Geographical characteristics and genetic diversity of the 42 analyzed populations of *Nothofagus pumilio* for the longitudinal gradient. Ae, effective number of alleles; Ar, allelic richness; Ho, observed heterozygosity and He, expected heterozygosity.

Población	ID	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
Po. Córdoba*	CBA	-40.60	-71.15	1237	1.06	1.24	0.05	0.06
Co. La Mona	MON	-40.58	-71.70	1081	1.39	1.48	0.18	0.17
Cuyin Manzano 6	6CUY	-40.82	-71.19	1529	1.41	1.89	0.17	0.25
Cuyin Manzano 5	5CUY	-40.84	-71.20	1576	1.35	1.58	0.11	0.19
Cuyin Manzano 4	4CUY	-40.86	-71.19	1739	1.81	2.25	0.3	0.43
Cuyin Manzano 3	3CUY	-40.91	-71.22	1717	1.53	1.82	0.18	0.31
Cuyin Manzano 2	2CUY	-40.93	-71.27	1757	1.55	1.95	0.19	0.30
Cuyin Manzano 1	1CUY	-40.94	-71.34	1208	1.93	2.28	0.29	0.42
Ea. Altos del Fortín	FOR	-40.97	-71.22	1155	1.6	1.77	0.39	0.32
L. Ortiz Basualdo	BAS	-40.98	-71.85	1131	1.63	2.17	0.38	0.37
Lag. Los Clavos	CLA	-41.05	-71.83	1230	1.38	1.92	0.19	0.27
Po. de las nubes	PDN	-41.08	-71.78	1555	1.83	2.15	0.29	0.41
Co. López*	LOP	-41.09	-71.55	1213	1.22	1.56	0.08	0.15
Lag. Negra	LN	-41.14	-71.57	1184	1.59	1.88	0.23	0.31
Co. Otto*	OTO	-41.15	-71.37	1102	1.04	1.17	0.03	0.04
A. del medio	AM	-41.21	-71.21	1100	1.8	2.23	0.35	0.41
Jesus	JES	-41.23	-71.25	1003	1.34	1.80	0.14	0.23
Co. Challhuaco*	CHA	-41.25	-71.28	1325	1.03	1.13	0.03	0.03
Ñirihuau Arriba	NIR	-41.29	-71.25	1118	1.59	1.87	0.36	0.34
Ea. Buitrera	BUI	-41.30	-71.13	1299	1.81	2.31	0.36	0.39
V. Llodconto	LLO	-41.39	-71.59	1397	1.32	1.64	0.19	0.19
A. Chenquenillén	CHE	-41.50	-71.08	1390	1.4	1.87	0.28	0.26
Baguales	BAG	-41.50	-71.34	1371	1.91	2.33	0.24	0.44
Lengas de Oro	LDO	-41.67	-71.11	1224	1.08	1.25	0.05	0.06
A. las Minas	ALM	-41.74	-71.16	1242	1.33	1.73	0.16	0.23
Las Huaytekas	HUA	-41.76	-71.41	1349	1.67	1.92	0.22	0.38
Co. Perito Moreno*	PMO	-41.80	-71.57	990	1.07	1.25	0.04	0.06
Ref. Natación	NAT	-41.88	-71.58	1183	1.51	1.70	0.22	0.25
Ea. Mallín Kume	MAK	-41.90	-71.21	1058	1.45	1.89	0.21	0.28
Pob. Soto	SOT	-41.93	-71.37	940	1.76	1.99	0.21	0.43
Co. Piltriquitron*	PQN	-41.97	-71.48	1250	1.01	1.05	0.01	0.01
Ref. Motoco	MOT	-41.98	-71.71	813	1.44	1.70	0.2	0.27
Cñd. del zorro	CDZ	-42.41	-71.13	1081	1.7	2.27	0.27	0.41
Cholila	CHO	-42.42	-71.62	1200	1.95	2.40	0.24	0.44
Co. La Momia	MOM	-42.58	-71.60	950	2.36	2.64	0.23	0.52
Pob. Neira	NEI	-42.65	-71.57	1177	1.46	1.79	0.26	0.24
Lag. Escondida	ESC	-42.76	-71.74	913	1.75	2.03	0.23	0.39
Co. La Hoya*	LHY	-42.83	-71.27	1275	1.25	1.49	0.09	0.14
Alto del Río Percey	PER	-42.84	-71.45	1049	1.4	1.54	0.23	0.22
A. Cascada	CAS	-42.91	-71.64	1061	1.69	2.06	0.17	0.37
Co. Cocinero	COC	-42.95	-71.62	1093	1.86	2.49	0.27	0.46
Co. Nahuel Pan	NAP	-43.01	-71.20	943	1.41	1.92	0.2	0.28

* Datos extraídos de Mathiasen y Premoli (2010),

Tabla A3. Características geográficas y diversidad genética de *Nothofagus pumilio* en los cuatro cerros analizados en el gradiente altitudinal. Ae, número de alelos efectivo; Ar, riqueza alélica; Ho, heterocigosis observada y He, heterocigosis esperada.

Table A3. Geographical characteristics and genetic diversity of *Nothofagus pumilio* in the four mountains analyzed for the altitudinal gradient. Ae, effective number of alleles; Ar, allelic richness; Ho, observed heterozygosity and He, expected heterozygosity.

Población*	Latitud	Longitud	Altitud	Ae	Ar	Ho	He
Co. Challhuaco	-41.27	-71.30	1630	1.01	1.03	0.01	0.01
	-41.26	-71.30	1470	1.04	1.10	0.01	0.03
	-41.26	-71.28	1250	1.01	1.05	0.01	0.01
	-41.25	-71.28	1110	1.01	1.06	0.01	0.01
Co. López	-41.10	-71.56	1478	1.03	1.10	0.02	0.03
	-41.10	-71.56	1386	1.03	1.07	0.002	0.02
	-41.10	-71.55	1256	1.04	1.15	0.03	0.04
	-41.09	-71.55	1143	1.04	1.12	0.01	0.03
Co. Otto	-41.15	-71.39	1427	1.00	1.00	0.00	0.00
	-41.15	-71.38	1373	1.04	1.15	0.02	0.04
	-41.15	-71.36	1210	1.05	1.17	0.01	0.04
	-41.15	-71.34	1102	1.05	1.19	0.03	0.05
Vn. Martial	-54.79	-68.39	670	1.06	1.19	0.02	0.05
	-54.80	-68.37	385	1.05	1.18	0.04	0.04

* datos extraídos de Premoli (2003).

Tabla A4. Variables bioclimáticas extraídas de la base de datos de Worldclim.

Table A4. Bioclimatic variables extracted from the Worldclim database.

D	Variable bioclimática	Descripción	Unidades
BIO1	Temperatura media anual	Promedio de las temperaturas medias registradas en cada mes	°C
BIO2	Rango diurno promedio	Promedio de los valores mensuales de (Tmax-Tmin)	°C
BIO3	Isotermalidad	(BIO2/BIO7)*100	°C
BIO4	Estacionalidad de la temperatura	Desviación estándar *100	%
BIO5	Temperatura máxima del mes más cálido		°C
BIO6	Temperatura mínima del mes más frío		°C
BIO7	Rango anual de la temperatura	(BIO5-BIO6)	°C
BIO8	Temperatura media del cuarto más húmedo	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más húmedos del año	°C
BIO9	Temperatura media del cuatrimestre más seco	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más secos del año	°C
BIO10	Temperatura media del cuatrimestre más cálido	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más cálidos del año	°C
BIO11	Temperatura media del cuatrimestre más frío	Promedio de la temperatura de los cuatro meses más fríos del año	°C
BIO12	Precipitación anual		Mm
BIO13	Precipitación del mes más húmedo		Mm
BIO14	Precipitación del mes más seco		Mm
BIO15	Estacionalidad de la precipitación	Coficiente de variación	%
BIO16	Precipitación del cuatrimestre más húmedo	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más húmedos del año	Mm
BIO17	Precipitación del cuatrimestre más seco	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más secos del año	Mm
BIO18	Precipitación del cuatrimestre más cálido	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más cálidos del año	Mm
BIO19	Precipitación del cuatrimestre más frío del año	Promedio de la precipitación de los cuatro meses más fríos del año	Mm

Tabla A5. Regresiones simples entre las 19 variables bioclimáticas y la latitud.**Tabla A5.** Simple regressions among the 19 bioclimatic variables and latitude.

Variable dependiente	R ²	F(1;25)	P	β
BIO1	0.24	7.91	0.009	-0.49
BIO2	0.92	272.13	0.000	-0.96
BIO3	0.80	101.51	0.000	-0.90
BIO4	0.54	28.85	0.000	-0.73
BIO5	0.79	95.53	0.000	-0.89
BIO6	0.02	0.48	0.495	-0.14
BIO7	0.92	295.55	0.000	-0.96
BIO8	0.34	12.89	0.001	0.58
BIO9	0.75	74.83	0.000	-0.87
BIO10	0.52	27.12	0.000	-0.72
BIO11	0.10	2.67	0.115	-0.31
BIO12	0.33	12.36	0.002	-0.58
BIO13	0.71	61.89	0.000	-0.84
BIO14	0.22	7.22	0.013	0.47
BIO15	0.96	574.79	0.000	-0.98
BIO16	0.68	53.09	0.000	-0.82
BIO17	0.14	4.17	0.052	0.38
BIO18	0.20	6.32	0.019	0.45
BIO19	0.74	70.59	0.000	-0.86

Tabla A6. Regresiones simples entre las 19 variables bioclimáticas y la longitud.**Tabla A6.** Simple regressions among the 19 bioclimatic variables and longitude.

Variable dependiente	R ²	F(1;40)	P	β
BIO1	0.04	1.55	0.221	0.19
BIO2	0.66	78.29	<0.001	-0.81
BIO3	0.05	2.07	0.158	0.22
BIO4	0.79	154.17	<0.001	-0.89
BIO5	0.02	0.78	0.384	-0.14
BIO6	0.17	8.00	0.007	0.41
BIO7	0.73	109.29	<0.001	-0.86
BIO8	0.09	3.85	0.057	0.30
BIO9	0.01	0.44	0.509	0.10
BIO10	0.00	0.03	0.873	0.03
BIO11	0.13	6.13	0.018	0.36
BIO12	0.80	157.85	<0.001	0.89
BIO13	0.64	72.53	<0.001	0.80
BIO14	0.90	342.37	<0.001	0.95
BIO15	0.64	72.30	<0.001	-0.80
BIO16	0.73	106.29	<0.001	0.85
BIO17	0.92	433.84	<0.001	0.96
BIO18	0.92	465.11	<0.001	0.96
BIO19	0.70	95.04	<0.001	0.84

Tabla A7. Regresiones simples entre las 19 variables bioclimáticas y la altitud.**Tabla A7.** Simple regressions among the 19 bioclimatic variables and altitude.

Variable dependiente	R ²	F(1;12)	P	β
BIO1	0.20	2.91	0.114	0.44
BIO2	0.79	44.31	<0.001	0.89
BIO3	0.002	0.02	0.886	-0.04
BIO4	0.71	29.09	<0.001	0.84
BIO5	0.54	14.25	0.003	0.74
BIO6	0.17	2.39	0.148	-0.41
BIO7	0.72	31.30	<0.001	0.85
BIO8	0.91	116.66	<0.001	-0.95
BIO9	0.51	12.65	0.004	0.72
BIO10	0.40	7.86	0.016	0.63
BIO11	0.003	0.04	0.846	0.06
BIO12	0.25	3.96	0.070	0.50
BIO13	0.50	11.99	0.005	0.71
BIO14	0.70	28.16	<0.001	-0.84
BIO15	0.73	32.85	<0.001	0.86
BIO16	0.54	13.87	0.003	0.73
BIO17	0.42	8.83	0.012	-0.65
BIO18	0.64	21.30	<0.001	-0.80
BIO19	0.57	15.63	0.002	0.75

Tabla A8. Regresiones simples entre las variables de diversidad genética y la altitud, la longitud y la latitud en cada gradiente.**Tabla A8.** Simple regressions among genetic diversity variables and the latitude, longitude and altitude for each gradient.

Variable dependiente	R ²	F	GI	P	Variable predictora	β
Gradiente latitudinal						
Ae	0.30	10.68	1;25	0.003	Latitudinal	0.55
Ar	0.29	10.39	1;25	0.004	Latitudinal	0.54
Ho	0.33	12.56	1;25	0.002	Latitudinal	0.58
He	0.29	10.28	1;25	0.004	Latitudinal	0.54
Gradiente longitudinal						
Ae	0.04	1.53	1;40	0.224	Longitud	0.19
Ar	0.01	0.59	1;40	0.447	Longitud	0.12
Ho	0.00	0.17	1;40	0.681	Longitud	0.07
He	0.02	0.97	1;40	0.332	Longitud	0.15
Gradiente altitudinal						
Ae	0.31	5.36	1;12	0.039	Altitud	-0.56
Ar	0.38	7.37	1;12	0.019	Altitud	-0.62
Ho	0.63	7.96	1;12	0.015	Altitud	-0.63
He	0.32	5.70	1;12	0.034	Altitud	-0.57

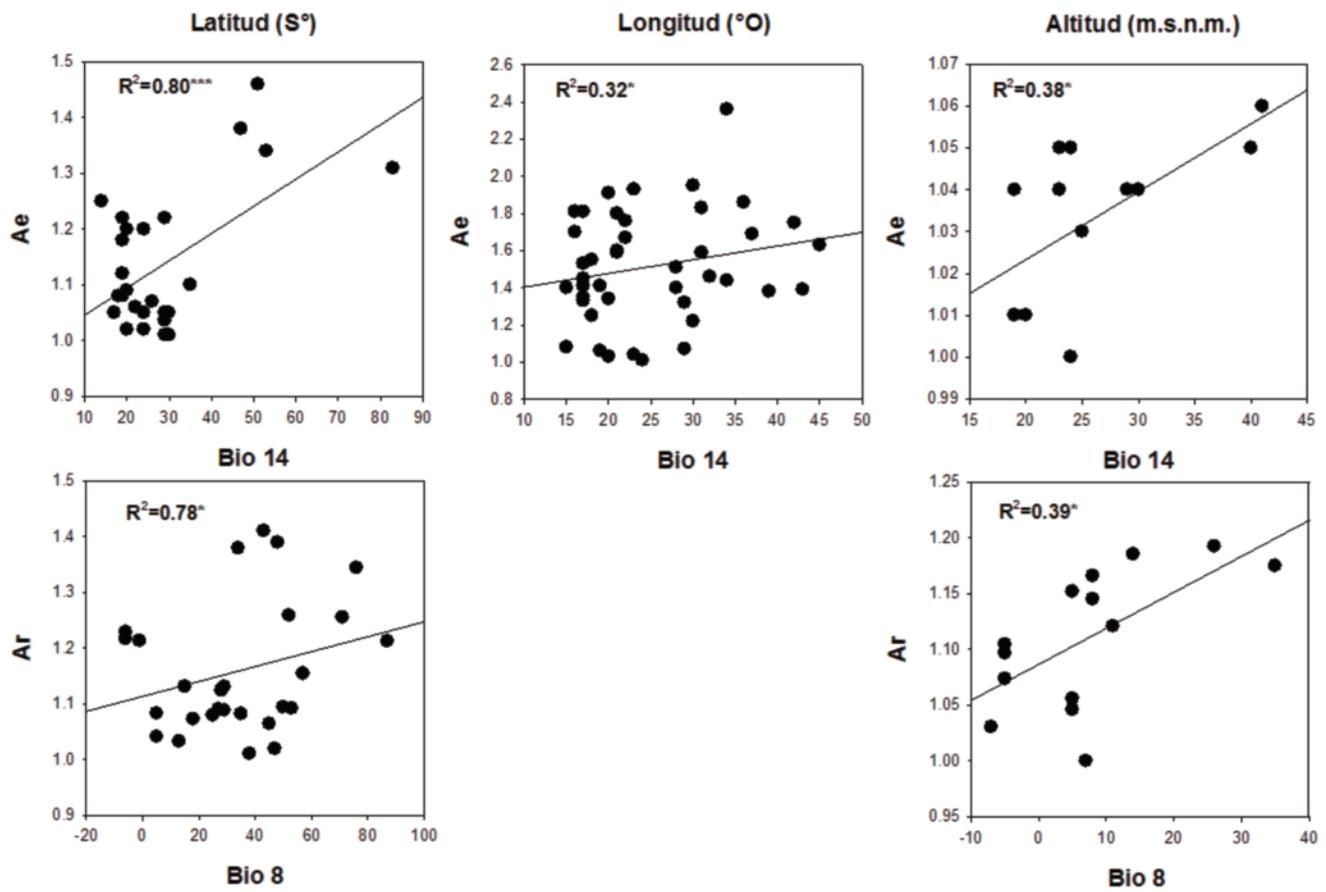


Figure A1. Relación entre el número efectivo de alelos (Ae) y la riqueza alélica (Ar) y las variables bioclimáticas Bio 14 y Bio 8 que arrojaron resultados significativos en las regresiones múltiples para los distintos gradientes.

Figure A1. Relationship among the effective number of alleles (Ae) and allelic richness (Ar) and the bioclimatic variables Bio 14 and Bio 8 that yielded significant results in the multiple regressions for the different gradients.