

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE  
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE  
LABORATORIO ECOTONO

TRABAJO PARA OPTAR POR EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

CONTRIBUCIÓN PARA LA CONSERVACIÓN DE  
PODOCARPACEAE DEL SUR DE SUDAMÉRICA A PARTIR  
DE PATRONES GENÉTICOS Y BIOGEOGRÁFICOS

**Lic. MARIA PAULA QUIROGA**

Centro Regional Universitario Bariloche INIBIOMA-CONICET  
Universidad Nacional del Comahue

**DIRECTORA: Dra. ANDREA C. PREMOLI**

Centro Regional Universitario Bariloche INIBIOMA-CONICET  
Universidad Nacional del Comahue

**CO-DIRECTORA: Dra. CECILIA EZCURRA**

Centro Regional Universitario Bariloche INIBIOMA-CONICET  
Universidad Nacional del Comahue

*Porque, a partir de la grandeza y hermosura de las cosas, se llega, por analogía, a contemplar a su Autor.*

Sabiduría 13, 5.

# Índice

Resumen .....	1
Abstract.....	3
Capítulo I: Contribución para la conservación de Podocarpaceae del sur de Sudamérica a partir de patrones genéticos y biogeográficos .....	5
I. 1. Introducción general .....	5
I. 2. Factores que afectan a las características genéticas de las especies.....	6
I. 2. 1. Efectos de la amplitud de la distribución geográfica .....	6
I. 2. 3. Especies raras vs. de amplio rango .....	8
I. 3. Factores históricos y filogeografía.....	10
I. 3. 1. Efecto climático del Neógeno en el Hemisferio Norte .....	12
I. 3. 2. Efecto climático del Neógeno en el Neotrópico .....	13
I. 3. 3. Efectos climáticos del Pleistoceno y Holoceno en Sudamérica austral.....	14
I. 4. Técnicas moleculares y su aplicación en conservación.....	17
I. 4. 1 Filogeografía.....	19
I. 5. Sistema de estudio .....	20
I. 5. 1. Historia biogeográfica de las Podocarpaceae de Sudamérica.....	20
I. 5. 2 Objetivos e hipótesis.....	20
I. 6. Área de distribución y caracterización de las especies en estudio .....	24
I. 6. 1. Bosque Montano de Yungas .....	24
I. 6. 2. Bosque Templado Austral.....	27
I. 7. Conservación de Podocarpaceae endémicas del BTA y BMY.....	32
Capítulo II: El enfriamiento del Neógeno afectó en forma diferencial a los géneros arbóreos del Bosque Templado Austral y del Bosque Montano de las Yungas .....	41
II. 1. Resumen .....	41
II. 2. Introducción.....	42
II. 3. Historia de los bosques del sur de Sudamérica .....	43
II. 3. 1 Paleógeno .....	44
II. 3. 2. Neógeno.....	46
II. 3. 3. Cuaternario.....	49

II. 4. Objetivo e hipótesis .....	49
II. 5. Áreas estudiadas .....	50
II. 6. Materiales y métodos.....	51
II. 6. 1. Análisis de los datos .....	52
II. 7. Resultados .....	52
II. 8. Discusión .....	54
Capítulo III: Patrones genéticos en <i>Podocarpus parlatorei</i> revelan persistencia a largo plazo de elementos tolerantes al frío en el sur de Yungas.....	71
III. 1. Resumen.....	71
III. 2. Introducción.....	72
III. 3. Objetivos e hipótesis.....	74
III. 4. Materiales y métodos .....	76
III. 4. 1. Muestreo de poblaciones naturales.....	76
III. 4. 2. Electroforesis de Isoenzimas .....	77
III. 4. 3. Secuenciación de ADN del cloroplasto.....	78
III. 4. 4. Análisis de electroforesis de isoenzimas .....	81
III. 5. Resultados .....	85
III. 5. 1. Isoenzimas.....	85
III. 5. 2. Secuenciación del espaciador intergénico <i>trn</i> L-F del cloroplasto .....	88
III. 6. Discusión.....	92
Capítulo IV: La historia glaciaria y el vulcanismo en Patagonia modelaron los patrones genéticos de <i>Podocarpus nubigena</i> .....	106
IV. 1. Resumen.....	106
IV. 2. Introducción .....	107
IV. 3. Objetivo e hipótesis .....	108
IV. 4. Materiales y métodos .....	109
IV. 4. 1. Poblaciones estudiadas de <i>Podocarpus nubigena</i> .....	109
IV. 4. 2. Electroforesis de isoenzimas .....	110
IV. 4. 3. Análisis de electroforesis de isoenzimas .....	111
IV. 4. 4. Secuenciación de ADN.....	113

IV. 5. Resultados.....	114
IV. 6. Discusión.....	120
Capítulo V: Diversidad, divergencia genética y relaciones filogenéticas de las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica .....	128
V. 1. Resumen .....	128
V. 2. Introducción.....	130
V. 2. 1. Efectos de la amplitud de la distribución geográfica.....	130
V. 2. 2. Filogenia .....	131
V. 3. Objetivos e hipótesis .....	132
V. 4. Materiales y Métodos .....	134
V. 4. 1. Análisis isoenzimáticos para <i>Podocarpus saligna</i> , <i>Prumnopytis andina</i> y <i>Saxegothaea conspicua</i> .....	134
V. 4. 2. Comparación de los niveles de variación genética entre las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica .....	136
V. 4. 3. Estudio filogenético de las especies del género <i>Podocarpus</i> .....	139
V. 5. Resultados .....	144
V. 5. 1. Comparación de los niveles de variación genética isoenzimática entre las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica.....	144
V. 5. 2. Análisis de distancia genética entre especies.....	148
V. 5. 3. Análisis filogenético.....	148
V. 6. Discusión .....	150
V. 6. 1. Efectos de la amplitud de la distribución geográfica.....	150
V. 6. 2. Factores históricos.....	154
Capítulo VI: Conclusiones generales .....	167
VI. 2. Implicancias para la conservación de Podocarpaceae Sudamericanas.....	171
VI. 3. Aporte a la conservación de las Podocarpaceae del sur de Sudamérica .....	175
Capítulo VII: Agradecimientos.....	192

# Resumen

La familia Podocarpaceae, biogeográficamente disyunta en Sudamérica, permite analizar hipótesis acerca de los patrones de divergencia intra e interespecíficos en respuesta a los cambios climáticos y tectónicos ocurridos en el sur de Sudamérica durante el Neógeno y Cuaternario. En esta tesis se evalúan las características genéticas poblacionales, filogeográficas y filogenéticas de *Podocarpus parlatoresi* que habita el Bosque Montano de Yungas (BMY) y *P. nubigena*, *P. saligna*, *Saxegothaea conspicua* y *Prumnopytis andina* del Bosque Templado Austral (BTA). Para *P. parlatoresi* y para *P. nubigena*, se analizaron hipótesis históricas en relación a los desplazamientos de las especies a causa de los cambios climáticos ocurridos durante el Pleistoceno. Se estudiaron las características genéticas de las especies sobre un total de 46 poblaciones utilizando isoenzimas y secuencias de regiones no codificantes de ADN del cloroplasto en relación a la amplitud de su distribución geográfica y la continuidad de las poblaciones. En base a electroforesis isoenzimática se calcularon parámetros de diversidad poblacional, y a nivel de especie, la distribución jerárquica de la diversidad genética y los niveles de endogamia. Los resultados obtenidos a partir del análisis isoenzimático de *P. parlatoresi* utilizando 25 loci arrojó un polimorfismo del 57%. La evidencia apoya la hipótesis de refugios interglaciarios al sur de la distribución y hacia mayores alturas sobre los cordones montañosos, mientras que durante los períodos más fríos las poblaciones se habrían desplazado hacia el norte y el este, hacia las zonas más bajas en respuesta a la disminución global de la temperatura. Las secuencias de la región del espaciador intergénico del ADN del cloroplasto *trn* L-F revelaron ocho haplotipos y un sector genéticamente diferente al sur de la distribución. La evidencia isoenzimática en *P. nubigena* arrojó un polimorfismo del 92%. Los resultados sugieren divergencia genética entre las poblaciones al norte y al sur de la latitud 43° S, en respuesta a los cambios tectónicos del Neógeno. Además, las poblaciones habrían sobrevivido localmente a las últimas glaciaciones en poblaciones de relativamente baja

altura las cuales presentan mayor diversidad y alta divergencia en relación a las poblaciones de mayor altitud. Los resultados para *P. saligna*, especie de rango restringido y que presenta una distribución fragmentada en la cordillera de los Andes y la Costa, sugieren que mantiene limitado flujo génico y elevada variación genética lo que podría reflejar una distribución más amplia en el pasado. Los niveles de variación genética en *Prumnopytis andina* son los esperados para especies con distribución restringida. En cambio, los resultados isoenzimáticos obtenidos para *Saxegothea conspicua* indican relativamente baja diversidad genética que no reflejaría sus características de distribución geográfica ni de sistema reproductivo. Posiblemente esta especie se vio afectada por cuellos de botella y deriva génica durante las últimas glaciaciones, lo que empobreció su acervo genético.

Se realizaron análisis filogenéticos moleculares mediante dos marcadores del cloroplasto y uno nuclear y en base a caracteres morfológicos entre las especies de *Podocarpus* y se estimó la distancia genética mediante isoenzimas. Los análisis filogenéticos para datos moleculares apoyan el origen monofilético del género *Podocarpus*. Especies morfológicamente similares, como *P. parlatoresi* y *P. saligna*, y que ocupan ambientes con características ecológicas similares, presentaron mayor afinidad en el análisis cladístico morfológico y de distancias genéticas. Se puede afirmar a partir de los caracteres morfológicos que existió un ancestro común para las especies de *Podocarpus* tolerantes a climas templado-cálidos, que extendieron su distribución a los climas subtropicales montanos del sur de Sudamérica. En contraposición *P. nubigena*, con tolerancias ecológicas templado-frías, permaneció restringida al Bosque Templado Austral, pero pudo mantener altos niveles de variación genética más allá de los posibles cuellos de botella sufridos durante las glaciaciones.

Las características genéticas de las especies analizadas no sólo reflejan sus rangos de distribución geográfica y la continuidad de sus poblaciones, sino que junto con sus relaciones filogenéticas, sugieren posibles eventos de vicarianza y o dispersión relacionados con las características de tolerancia térmica de las especies.

# Abstract

The family Podocarpaceae, biogeographically disjunct in South America, allows the analyses of hypotheses about intra- and interspecific divergence patterns in response to climatic and tectonic changes that occurred in southern South America during the Neogene and Quaternary. This thesis assesses the genetic population, phylogenetic, and philogeographic characteristics of *Podocarpus parlatoresi* that inhabits the Yungas Montane Forests, and *P. nubigena*, *P. saligna*, *Saxegothaea conspicua*, and *Prumnopytis andina* from the Southern Temperate Forest. Historical scenarios of *P. parlatoresi* and *P. nubigena* were analyzed in relation to movements of the species due to climate changes that occurred during the Pleistocene. The genetic characteristics of the species were studied on a total of 46 populations using isozymes and sequences of non-coding regions of chloroplast DNA in relation to the length of their geographic distribution and the continuity of their populations. Based on isozyme electrophoresis parameters of population diversity were calculated, and at species level, the hierarchical distribution of genetic diversity and levels of inbreeding. The results obtained from analysis of *P. parlatoresi* using 25 isoenzymatic loci showed a polymorphism of 57%. The evidence supports the hypothesis of range contraction towards the south of its distribution and to higher elevations on mountain ranges during warming trends, and north and east expansions during episodes of cooling. The sequences of the region of the intergenic spacer of chloroplast DNA trn L-F revealed eight haplotypes, and one genetically different from the southern sector of the distribution. The isoenzyme evidence in *P. nubigena* showed a polymorphism of 92%. The results suggest genetic divergence among populations in the north and south of latitude 43 ° S, in response to tectonic changes in the Neogene. In addition, populations would have survived locally the latest glaciations in sites of relatively low altitude. These populations present a greater diversity and high divergence in relation to the populations of high altitude. The results of *P. saligna*, a species with a restricted

and fragmented distribution in the Andes and the Coastal cordillera, suggest limited gene flow and high genetic variation that may reflect a wider distribution in the past. The levels of genetic variation in *Prumnopytis andina* agree with those expected in species with restricted distribution. On the other hand, the isoenzymatic results of *Saxegothaea conspicua* show relatively low genetic diversity that does not reflect its geographic distribution and reproductive system. Possibly, this species was affected by bottlenecks and gene drift during the last ice ages, which reduced its genetic pool.

Molecular phylogenetic analyses from two markers of nuclear and chloroplast DNA and one based on morphological characters were performed among species of *Podocarpus*, and compared with the genetic distance estimated by isozymes data. The phylogenetic analyses from molecular data support the monophyletic origin of the genus *Podocarpus*. Morphologically similar species such as *P. parlatorei* and *P. saligna* that have similar ecological requirements, had a higher affinity in the cladistic analysis of morphological and genetic distances. The morphological data suggest a common ancestor for the species of *Podocarpus* tolerant of warm-temperate conditions that extended to the subtropical mountains of southern South America. In contrast *P. nubigena*, with ecological tolerances for temperate cold sites, remained restricted to the Southern Temperate Forest, but was able to maintain high levels of genetic variation beyond the potential bottlenecks suffered during the ice ages.

The genetic characteristics of the species tested not only reflect their geographical ranges and continuity of their populations, but together with their phylogenetic relationships, they suggest possible events of vicariance and/or dispersal related to the thermal tolerance characteristics of the species.

# Capítulo I

## Contribución para la conservación de Podocarpaceae del sur de Sudamérica a partir de patrones genéticos y biogeográficos

### I. 1. Introducción general

Los aspectos genéticos y biogeográficos son esenciales al momento de contribuir a las estrategias de protección y conservación de las especies. El estudio y la interpretación de los patrones de la variación genética intraespecífica se ha convertido en un objetivo prioritario en conservación, ya que de la existencia de variación genética depende el mantenimiento del potencial evolutivo de las especies y su permanencia en el largo plazo (Frankel y Soulé 1981; Matthies et al. 2004). En el caso de especies que representan linajes evolutivos únicos, como por ejemplo las especies de géneros monoespecíficos, los estudios genéticos pueden realizar un valioso aporte para el desarrollo de prácticas efectivas de conservación tendientes a proteger sus acervos genéticos (Premoli 1994). Para ello, el uso de marcadores moleculares se ha sugerido como una herramienta valiosa particularmente para especies endémicas de los bosques templados de Patagonia (Premoli 1998).

Los estudios de patrones de variación genética son relevantes en relación con características ecológicas de las especies, como la amplitud de su distribución geográfica, su sistema reproductivo, los tipos de ambientes que ocupan y su demografía, ya que el estudio combinado de estos aspectos permite conocer su dinámica poblacional, su adaptación y su evolución (Barret y Kohn 1991; Ellstrand y Elam 1993; Zawko et al. 2001). Además, los procesos históricos, como la expansión de la distribución geográfica, la fragmentación y los cuellos de botella en las poblaciones ocurridos en respuesta a cambios climáticos y geológicos, parecen haber influenciado

los patrones de diferenciación genética (Schaal et al. 1998). Estos eventos pueden detectarse en la estructura genética de muchas especies de árboles, especialmente por sus extendidos tiempos generacionales (Newton et al. 1999).

El objetivo de esta tesis es estudiar los patrones de variación genética en especies de Podocarpaceae con distintas amplitudes de distribución geográfica y tolerancias ecológicas que habitan el Bosque Templado Austral (BTA) y el Bosque Montano de Yungas (BMY). Se busca comprender los factores actuales e históricos que modelan los acervos genéticos y contribuir a la conservación de las especies, algunas de ellas amenazadas.

## I. 2. Factores que afectan a las características genéticas de las especies

### I. 2. 1. Efectos de la amplitud de la distribución geográfica

Los niveles de variación genética en especies de plantas, estimados mediante marcadores isoenzimáticos, dependen principalmente de la combinación de las características del sistema reproductivo y de la amplitud de su distribución geográfica, y de otras características de su historia de vida (Hamrick et al. 1992; Hamrick y Godt 1996). En general las especies arbóreas con polinización anemófila, dispersión de semillas por viento, amplia distribución geográfica y su presencia en ambientes de estadios sucesionales tardíos, tienen los mayores niveles de variación genética, tanto a nivel poblacional como a nivel de especie (Hamrick et al. 1992). La amplitud del rango geográfico es la variable que mayor porcentaje de variación explica en un modelo de regresión donde se combinan variables dependientes de diversidad genética y las características antes mencionadas (Hamrick et al. 1992). De esta forma se espera que las especies que tienen una amplia distribución geográfica y que consisten de poblaciones grandes y continuas mantengan un elevado flujo génico interpoblacional y por lo tanto podrán mantener elevados niveles de polimorfismo y diversidad genética. Por el contrario, las especies de distribución geográfica restringida y que generalmente consisten de tamaños poblacionales pequeños se verán afectadas por la

deriva génica, altos niveles de endogamia y fuerte selección unidireccional, que produce uniformidad genética debido al ambiente específico que habitan (Karron et al. 1988), obteniendo como resultado reducidos valores de diversidad genética. Sin embargo, la generalización que las especies de distribución geográfica restringida poseen bajos niveles de polimorfismo tiene excepciones, como por ejemplo *Fitzroya cupressoides* en Patagonia (Premoli et al. 2000a), y *Pinus longeva* (Hiebert y Hamrick 1983; Lee et al. 2002) y *Pinus radiata* (Moran et al. 1980) en el Hemisferio Norte, que mostraron tener mayor polimorfismo genético que especies emparentadas de amplia distribución geográfica.

### I. 2. 2. Efectos de la distribución geográfica y los factores históricos

La mayoría de las especies arbóreas generalmente poseen polinización y dispersión de semillas por viento, resultando en altas tasas de fecundación cruzada y por lo tanto en una elevada diversidad genética intrapoblacional y reducida divergencia interpoblacional (Hamrick et al. 1981; Austerlitz et al. 2000). No obstante, existen ejemplos en leñosas que a pesar de tratarse de especies con elevado flujo génico poseen reducida variabilidad genética intrapoblacional y relativamente elevada divergencia entre distintas poblaciones. Por ejemplo, *Pilgerodendron uviferum*, una especie rara y amenazada de los bosques templados de Sudamérica, mostró un reducido polimorfismo y marcada divergencia genética interpoblacional en comparación con la geográficamente restringida *Fitzroya cupressoides* (Premoli et al. 2001), ambas pertenecientes a la familia Cupressaceae, con polinización y dispersión anemófila. Los reducidos polimorfismos observados en especies arbóreas como *Pilgerodendron uviferum* podrían además reflejar eventos ocurridos en el pasado como las últimas glaciaciones (Premoli et al. 2001). Tal es el caso también de *Pinus resinosa*, que si bien posee una amplia distribución en el noreste de Estados Unidos, resultó uniforme tanto para isoenzimas como en su variación morfológica (Fowler y Morris 1977; Allendorf et al. 1982). Se ha postulado que este empobrecimiento sería el resultado de severos cuellos de botella ocurridos durante las glaciaciones del Pleistoceno (Davis 1976; Critchfield 1984, Hewit 1999), o durante períodos cálidos para

especies tolerantes al frío con distribución tropical, como el caso de *Picea chiuahuana* en México (Ledig et al. 1997). Además los patrones de distribución de la variación genética se relacionan con características autoecológicas de las especies (Premoli et al 2007). Así por ejemplo la baja diversidad intrapoblacional y relativamente alta divergencia interpoblacional de *Pilgerodendron uviferum* reflejaría el hecho que es una especie generalmente restringida a hábitats particulares como ambientes periglaciarios con elevada precipitación y suelos inundables que ocurren de manera discontinua a lo largo del paisaje. Por lo tanto, el grado y distribución de la variación genética en poblaciones de una especie dependería de la amplitud de su distribución geográfica, de la continuidad de sus poblaciones y de los factores históricos.

### I. 2. 3. Especies raras vs. de amplio rango

Las características genéticas de las especies están en general estrechamente asociadas a la amplitud de su distribución geográfica. En las especies de amplia distribución geográfica se espera que presenten elevados niveles de polimorfismo y variabilidad genética respecto de especies con una distribución geográfica reducida, las cuales son consideradas especies raras. Generalmente la amplitud de la distribución geográfica define el grado de rareza de las especies. Así, se considera especie rara a aquella que posee una amplitud geográfica limitada, reducido tamaño poblacional y alta especificidad de hábitat, y/o una combinación de éstas (véase Rabinowitz 1981).

Las especies raras en comparación con especies de distribución geográfica más amplia han sido objeto de numerosos estudios genéticos (Karron 1987; Hamrick y Godt 1989; Linhart y Premoli 1993; Gitzendanner y Soltis 2000). Muchas veces las especies raras presentan pequeños tamaños poblacionales y sufren los efectos de la deriva genética que resulta en la disminución de la variación genética. La reducción del tamaño poblacional produce un cuello de botella que resulta en una rápida eliminación de los alelos de baja frecuencia (Nei et al. 1975), mientras que la disminución de la heterocigosis se ve menos afectada y depende de la tasa de crecimiento de la población (Barret y Kohn 1991; Ellstrand y Elam 1993).

Los estudios en genética de la conservación, especialmente de planta raras, recibieron un tratamiento especial desde 1980. En general se ha observado que la distribución y los niveles de variación genética en las poblaciones de especies raras son muy variables (Bevill y Louda 1999). Debido a la complejidad del análisis de la diversidad en especies raras, una estrategia que se ha seguido es controlar por filogenia, es decir comparar especies raras y comunes que pertenezcan al mismo género, con distribuciones geográficas relativamente más amplias (Karron 1987; Hamrick y Godt 1989; Barrett y Kohn 1991; Ellstrand y Elam 1993; Gitzendanner y Soltis 2000, Premoli et al. 2007).

Las características ecológicas de las especies raras, con amplitud geográfica reducida y tamaños poblacionales pequeños, junto con las características de relativamente baja variabilidad genética, las convirtieron en relevantes dentro de la biología de la conservación, principalmente por ser vulnerables a la estocasticidad demográfica y genética (Lande 1988; Schemske et al. 1994; Lesica et al. 2006). Los procesos estocásticos afectan la demografía y la composición genética de las poblaciones principalmente cuando las poblaciones son pequeñas (Schemske et al. 1994). Esto se debe a que cuando las poblaciones son pequeñas la endogamia puede reducir la aptitud de los individuos y la pérdida de variabilidad genética puede disminuir su capacidad de respuesta a cambios ambientales (Lande 1988) haciéndolas también más susceptibles a enfermedades y plagas (Huenneke 1991). Sin embargo, existen especies raras localmente abundantes (Lesica et al. 2006) que pueden contrarrestar los efectos genéticos negativos de la estocasticidad demográfica. El estudio *per se* de las plantas raras junto con las especies de distribución geográfica amplia, nos permite entender los patrones de abundancia y distribución de las especies en la naturaleza. Además es importante conocer las causas y consecuencias, tanto ecológicas como evolutivas, de las rarezas, ya que estas pueden reflejar patrones y procesos de especiación reciente más que de tolerancia ecológica (Lesica et al. 2006).

En una recopilación bibliográfica publicada por Premoli y colaboradores (2007) se realizaron comparaciones entre especies raras que crecen en el sur de Sudamérica vs. especies congéneres de amplia distribución. En estas comparaciones pareadas, las

especies con rangos restringidos mostraron mayor polimorfismo *sensu stricto* (Pss) y diversidad genética ( $H_E$ ) que sus congéneres ampliamente distribuidas, excepto para las especies de la familia Myrtaceae. Esta tendencia, contraria a la tendencia publicada por Hamrick y Godt (1989) y Gitzendanner y Soltis (2000), puede ser explicada por los restringidos hábitats que ocupan las especies estudiadas, que en combinación con los procesos históricos como las glaciaciones ocurridas en Patagonia, probablemente resulten en poblaciones aisladas con restricciones al flujo génico aún en las especies ampliamente distribuidas que en algunos casos resulta en polimorfismo reducido (Premoli et al. 2007). Por otro lado, al comparar especies de Pinaceae del Hemisferio Norte de distinto rango de distribución se observa que las especies de *Picea* con distribución geográfica amplia poseen mayor número de alelos por locus, polimorfismo y heterocigosis esperada que sus congéneres de distribución geográfica restringida (Tabla 1). Sin embargo, para el grupo del género *Pinus* las diferencias entre las especies de distribución geográfica amplia vs. restringida no son estadísticamente significativas (Tabla 1). De esta manera el efecto de la amplitud del rango geográfico en las características de variación genética puede diferir de un género a otro, incluso dentro de un grupo con el mismo origen filogenético (e.g., Pinaceae).

### I. 3. Factores históricos y filogeografía

El sur de Sudamérica ha tenido una compleja historia geológica y climática que modeló los patrones de distribución de las especies (ver cap. II). La apertura del pasaje de Drake, en el Oligoceno, permitió el desarrollo de la actual circulación de las corrientes marinas. Este episodio provocó cambios climáticos que afectaron las condiciones climáticas globales, y en el Mioceno se estableció un pronunciado gradiente térmico norte-sur. Posteriormente, el levantamiento de la cordillera de los Andes ha tenido un rol determinante sobre el clima en toda la región, ya que interfirió en la circulación de los vientos del oeste, creando una sombra de lluvias que dio origen a los desiertos al este de la cordillera (Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006). El

Tabla I. 1: Características genéticas de especies de coníferas con distinta amplitud geográfica. A = especies con distribución geográfica amplia R = especies con distribución geográfica restringida. N<sub>A</sub>: número de alelos efectivos por locus, P: polimorfismo con el criterio del 95%, H<sub>E</sub>: Heterocigosis esperada. a y b indican diferencias estadísticamente significativas (p < 0.005) entre las especies con distribución geográfica amplia (A) y restringida (R) para un test *t* de diferencias de medias.

Familia	Especie	Rango	N <sub>A</sub>	P	H <sub>E</sub>	Referencia
Pinaceae	<i>Picea glauca</i>	A	1.88	66.2+	0.184	Rajora y Dancik (2000)
	<i>Picea mariana</i>	A	2.2	69.2	0.300	Isabel et al. (1995)
	<i>Picea asperata</i>	R	1.45	37.1	0.096	Luo et al. (2005)
	<i>Picea chihuahuana</i>	R	1.37	27	0.093	Ledig et al. (1997)
	<i>Picea rubens</i>	R	1.6	42.7	0.100	Rajora et al. (2000)
	Promedio A		2.04a	67.7a	0.424a	
	Promedio R		1.47b	35.6b	0.096b	
	<i>Pinus banksiana</i>	A	2.11	66.7	0.115	Godt et al. (2001)
	<i>Pinus echinata</i>	A	2.18	87.18	0.194	Raja et al. (1997)
	<i>Pinus longaeva</i>	R	-	78.6	0.327	Lee et al. (2002)
	<i>Pinus albicaulis</i>	R	3	85	0.102	Jorgensen y Hamrick (1997)
	<i>Pinus coulteri</i>	R	1.67	43	0.148	Ledig (2000)
	<i>Pinus sabiniana</i>	R	2	59.9	0.128	Ledig (1999)
	<i>Pinus palustris</i>	R	1.92	62.1	0.105	Schmidting y Hipkins (1998)
	<i>Pinus virginiana</i>	R	2.73	92	0.139	Parker et al. (1997)
	Promedio A		2.14	76.9	0.154	
Promedio R		2.26	70.1	0.158		

+ (criterio 99%);

descenso general de la temperatura, a finales del Eoceno, y las modificaciones en el régimen de precipitaciones, afectaron la distribución de las especies (ver capítulo II).

Además, la historia geológica del sur de Sudamérica está ligada a procesos magmáticos y tectónicos del Terciario los cuales fueron sustancialmente diferentes a distintas latitudes en Patagonia (Ramos y Kay 1992; Ramos 2005). Estructuralmente los Andes de Patagonia se dividen en dos sectores al norte y sur de los 46.30° S. A esta latitud ocurre la Triple Unión de las placas de Nazca, Sudamericana y Antártica donde además se confluyen la fosa con la dorsal de Chile (Ramos y Kay 1992). El segmento norte está caracterizado por un arco volcánico continuo llamado Zona Volcánica Sur (ZVS, 33–46.30°S) mientras que al sur se encuentra la Zona Volcánica Austral (ZVA, 49–54.7°S) (Stern 2004). Entre estos dos sectores existe una interrupción del arco volcánico caracterizado por una extensa planicie basáltica (Ramos y Kay 1992). Un

rasgo significativo de la actividad volcánica de estas dos zonas es que hacia el sur de la ZVS entre los 43° y 46°S la frecuencia de las erupciones durante el Holoceno fue cada 725 años aproximadamente (Naranjo y Stern 2004). Esta frecuencia es mucho mayor a la erupción por volcán medida en los últimos 8000 años para la ZVA (Stern 2008). Por lo tanto se espera que linajes antiguos cuya presencia desde el Terciario es reflejada por el registro fósil hayan sido afectados por procesos tectónicos ocurridos en Patagonia.

La colonización postglaciaria tiene lugar a través del establecimiento de poblaciones que sufren cuellos de botella genéticos y reducción de la diversidad genética (Hewitt 2004a). Entonces, las poblaciones que funcionaron como refugios tendrán, en comparación, mayor diversidad genética que poblaciones establecidas más recientemente (Widmer y Lexer 2001). Para loci neutrales, las reducciones en los tamaños poblacionales producen una fuerte disminución de la riqueza alélica más que en la diversidad genética, evaluada como la heterocigosis esperada, de manera que los alelos raros son rápidamente afectados por la deriva génica (Nei et al. 1975; Hewitt 2000; Widmer y Lexer 2001). Por lo tanto, la colonización por migración puede detectarse a partir del análisis de distribución de la diversidad genética y la variación gradual en las frecuencias alélicas.

Sin embargo, rutas migratorias pueden converger en un área particular dando como resultado una hibridación de los genomas provenientes de diferentes áreas de refugios (Hewitt 1999; Petit et al. 2003b). Así, se espera que estas áreas producto de la mezcla de linajes alberguen distintas variantes genéticas y por lo tanto presenten elevada diversidad genética (Wade y McCauley 1988; Hewitt 2000; Comps et al. 2001; Widmer y Lexer 2001; Petit et al. 2003a,b).

### I. 3. 1. Efecto climático del Neógeno en el Hemisferio Norte

Numerosos estudios han analizado las respuestas de la vegetación leñosa a las glaciaciones de las regiones templadas, tanto en el Hemisferio Norte como en el Hemisferio Sur. Para el Hemisferio Norte se sugirió que durante los períodos más fríos las especies habrían sobrevivido en bajas latitudes y posteriormente, con la

retracción de los hielos, habrían avanzado gradualmente hacia el norte (Hewitt 2000). En Europa las zonas de refugio para especies arbóreas se habrían ubicado al sur del hielo, en las penínsulas Ibérica, Itálica, Grecia, sur de los Balcanes, norte de Turquía, el Cáucaso y en las proximidades del mar Caspio (Bennett et al. 1991; Hewitt 1996, 2000; Petit et al. 2002a; Afzal-Rafii y Dodd 2007; Varga 2008).

Asimismo, se ha sugerido que zonas genéticamente diversas, con características microambientales favorables para la supervivencia de algunas especies y que habrían quedado dentro de los límites del hielo pueden representar refugios crípticos (Stewart y Lister 2001). Regiones costeras (refugios costeros) del norte de Europa o picos montañosos que sobresalen del glaciar (nunataks) también podrían haber funcionado como refugios crípticos en el norte de Europa (Cruzan y Templeton 2000; Parisod y Besnard 2007). Recientemente Bhagwat y Willis (2008) analizaron la posibilidad de que algunas especies de plantas y animales habrían sobrevivido en refugios múltiples al norte de Europa durante el último máximo glaciario. Además existen numerosos ejemplos para el Hemisferio Norte de convergencia de rutas migratorias que resultan en elevada diversidad genética para especies de plantas y animales (Soltis et al. 1997; Hewitt 2001, 2004b; Jaramillo-Correa et al. 2004).

### I. 3. 2. Efecto climático del Neógeno en el Neotrópico

Estudios polínicos muestran también que las latitudes tropicales y subtropicales de Sudamérica fueron afectadas por los cambios climáticos relacionados con las glaciaciones. Evidencia proveniente del macizo Amazónico sugiere que durante el Pleistoceno y Holoceno, la alta variación climática permitió el desarrollo de una flora tropical seca y bosques de tipo montanos en galería (Pennington et al. 2000). La principal respuesta de las especies a los cambios climáticos se detecta en las variaciones relativas de la abundancia polínica de las especies. Particularmente durante los períodos glaciarios las especies tolerantes al frío se desarrollaron favorablemente en zonas bajas, mientras que durante los interglaciarios se recluyeron a las zonas montañosas (Colinvaux y De Oliveira 2001). La evidencia polínica de estos movimientos llevó a proponer que durante el período frío del último máximo glacial,

las especies intolerantes al frío (mesotérmicas *sensu* Troncoso 1997) quedaron aisladas en las zonas bajas, desde donde se habrían diversificado, contribuyendo a la diversidad de especies actualmente observada en estas zonas (Pennington et al. 2004). Por el contrario las especies tolerantes al frío (microtérmicas *sensu* Troncoso 1997) se expandieron durante los períodos fríos, y quedaron confinadas en refugios de altura durante los períodos cálidos. Este es el caso de algunos géneros tanto de origen Holártico como Austral (*Alnus*, *Araucaria*, *Azara*, *Chusquea*, *Podocarpus*, *Prumnopytis*, *Coriaria*, *Crinodendron*, *Dasyphyllum*, *Desfontainia*, *Drymis*, *Escallonia*, *Lomatia* y *Ugni* entre otras) que se encuentran actualmente en las áreas montañosas subtropical y tropicales de Sudamérica. Similares escenarios se pueden plantear para las especies arbóreas distribuidas en áreas montañosas templadas que probablemente respondieron a estos factores históricos dependiendo de sus características autoecológicas. De igual forma, durante los períodos fríos en latitudes australes las especies mesotérmicas habrían reducido su área, mientras que las especies microtérmicas habrían podido expandir su área de distribución en caso de existir zonas libres de hielo.

### I. 3. 3. Efectos climáticos del Pleistoceno y Holoceno en Sudamérica austral

Los cambios climáticos asociados con las glaciaciones ocurridas desde el Neógeno han afectado especialmente a los patrones de distribución de la vegetación (Hewitt 2000). Tanto en el Hemisferio Sur como en el Hemisferio Norte las glaciaciones afectaron la distribución y los tamaños poblacionales de las especies, variando en intensidad y magnitud en distintas latitudes. Particularmente para Sudamérica austral, el registro de las glaciaciones ha sido estudiado a partir de registros geomorfológicos desde los 35° hasta el extremo austral de Patagonia (Fig. I. 1 A) (Hollin y Shilling 1981, Clapperton 1993; Glasser et al. 2004, 2008). La última gran glaciación en Patagonia está datada para el Pleistoceno temprano a medio, alcanzando su máximo (UMG) hacia 25000 y finalizando hacia 16000 años antes del presente, durante el Peistoceno tardío (Rabassa et al. 2005). Posteriormente, en el Tardiglacial

habrían ocurrido dos nuevos avances formando morenas de diferente antigüedad a distintas latitudes (McCulloch et al. 2000, Rabassa et al. 2005) (Fig. I. 1 B, C, D) evidencias que fueron revisadas por Glasser et al. (2008) (Fig. I. 1 E). Entre los 38° a 44°S la glaciación en el oeste fue dominada por grandes glaciares pedemontanos mientras que en el este tuvieron menor extensión y fueron de valle y de estilo alpino (Glasser et al. 2008). Hacia el sur se pueden determinar distintos lóbulos glaciares de descarga hacia el este mientras que hacia el oeste habrían finalizado sobre el océano Pacífico, por lo que las terminaciones son difíciles de estimar. Por otro lado, en base a geoformas de erosión glaciaria se ha sugerido que al sur de los 45°S existió una baja eficiencia de erosión glaciaria y/o placas de hielo moviéndose lentamente, mientras que hacia el norte el régimen de erosión glaciaria fue de tipo erosivo y con efectos destructivos sobre la topografía (Thompson et al. 2007).

#### I. 3. 4. Hipótesis glaciarias para el BTA

Las glaciaciones del Pleistoceno en la región del Bosque Templado Austral fueron analizadas con información proveniente de registros de polen fósil (Heusser 1990, 1993; Markgraf et al. 1995; Bennett et al. 2000; Villagrán 2001; Markgraf et al. 2002; Moreno y León 2003; Moreno 2004). Si bien estos registros son locales, permiten hacer inferencias sobre las características climáticas para un momento y una región dados, y postular hipótesis sobre la estructura y composición florística de la vegetación. También los registros de plantas fósiles y subfósiles de la región de los lagos en Chile, permiten estimar las longitudes que habrían tenido las lenguas de los glaciares, conocer el descenso aproximado del nivel del mar durante los períodos más fríos (Villagrán et al. 2004) y la localización de áreas de refugios glaciares.

Por un lado, Villagrán (2001) postula que durante el avance de los hielos en los períodos glaciares, las especies ocuparon sitios de menor altitud y baja latitud, de manera que la flora Austral y Andina del sur se habrían desplazado hacia el valle Longitudinal del centro-sur de Chile, mientras que durante el Tardiglacial (14600 – 10000 AP) y Holoceno (después de 10000 AP) el movimiento habría sido en sentido inverso. Es decir, los bosques norpatagónicos con coníferas se habrían expandido

rápidamente hacia el sur siguiendo la deglaciación, y también altitudinalmente, culminando con la recolonización de los sectores australes y las cimas de las cordilleras en la Región de los Lagos (Heusser 1993). Por lo tanto, durante la última glaciación, los elementos tolerantes al frío como las poblaciones de coníferas de las regiones bajas del sur de Chile habrían tenido una distribución más amplia y continua que en la actualidad, en contraste con los bosques templado lluviosos Valdivianos de angiospermas poco tolerantes al frío, que habrían contraído sus áreas y refugiado en sitios del litoral marítimo y en la Cordillera de la Costa (Villagrán 2001; Villagrán et al. 2004).

De esta forma, la actual disyunción entre los bosques con coníferas, aislados en las cordilleras de la Costa y de los Andes, sería la expresión postglaciaria de los ascensos altitudinales de la vegetación que durante los períodos glaciales ocupó los ámbitos de menor altitud. Como remanentes de esta paleo distribución de zonas bajas han quedado unas pocas y pequeñas poblaciones en el litoral y Depresión Intermedia, de las provincias de Llanquihue y Chiloé en Chile, las cuales deberían considerarse como relictos glaciales (Villagrán et al. 2004). Por otro lado, Markgraf et al. (1995) postulan que el hielo se habría depositado a lo largo de la cordillera de los Andes de Patagonia dejando áreas libres de hielo. Por lo tanto, si bien el registro de polen fósil indica la presencia parcial de especies de bosque en el área entre los 35° y 43°S, se planteó la hipótesis que la expansión de bosques habría ocurrido a partir de numerosas áreas microclimatológicamente favorables donde las especies habrían sobrevivido a las condiciones del máximo glaciario (Markgraf et al. 1995).

Para Sudamérica austral evidencias del registro de polen fósil (Bennet 1991; Hewitt 1999, 2000; Villagrán 2001; Markgraf et al. 2002, Heusser 1990, 1993), microfósiles (Stewart y Lister 2001, Villagrán 2004), geológicos (Clapperton 1993; Glasser 2008) y marcadores moleculares (por ej. Premoli 1998; Allnutt et al. 1999) permiten reconstruir la historia de la vegetación. Se predice que poblaciones que sobrevivieron a los períodos fríos en áreas libre de hielo (refugios glaciales) albergarán altos niveles de variación genética (Hewitt 1996; Widmer y Lexer 2001; Comps et al. 2001; Petit et al. 2002a; Bhagwat y Willis 2008). La combinación de la

información proveniente del registro fósil y geomorfológica con la distribución de polimorfismos moleculares, permite inferir la supervivencia en refugios y el movimiento de las especies asociados a los cambios climáticos. En particular, el uso de herramientas genéticas permitieron analizar la hipótesis de permanencia local (Markgraf 1993; Markgraf et al. 1995) en refugios múltiples en Patagonia (Premoli 1994, 1997, 1998). La detección de áreas con variantes genéticas únicas y elevada diversidad genética, a altas y moderadas latitudes, han sido interpretadas como posibles zonas de refugios glaciares durante el último máximo glacial para distintas especies arbóreas (Premoli 1998; Allnutt et al. 1999; Premoli et al. 2000a, 2001, 2002; Allnutt et al. 2003; Marchelli y Gallo 2006; Souto y Premoli 2007). Este patrón ha sido detectado independientemente de la tolerancia térmica de las especies (mesotérmicas y microtérmicas). Por ejemplo, para *Nothofagus nervosa* se han detectado múltiples refugios glaciares localizados en la cordillera de Nahuel Buta y los Andes (Marchelli y Gallo 2006). Más al sur, para *Fitzroya cupressoides* (Premoli et al. 2000a, b) se detectaron refugios glaciares a ambos lados de la cordillera de los Andes y para *Nothofagus pumilio* (Premoli 1998) y *Pilgerodendron uviferum* (Premoli et al. 2002) se describieron áreas de refugio a latitudes altas.

#### I. 4. Técnicas moleculares y su aplicación en conservación

La teoría neutral propuesta por Kimura en 1968 afirma que la gran mayoría de los cambios evolutivos a nivel molecular son causados aleatoriamente por la deriva génica. Esta teoría se aplicó originalmente a la variación observada en las proteínas y asume que solamente una fracción de los cambios en el ADN son adaptativos para la evolución (Moritz y Hillis 1996). La variación molecular neutral, junto con la teoría de la genética de poblaciones es una poderosa herramienta para la investigación en ecología y evolución (Moritz y Hillis 1996). Actualmente existen distintos marcadores moleculares neutrales entre los que se encuentran las enzimas, los mini y microsatélites, los fragmentos de restricción y las secuencias de ADN.

Los estudios de variación de isoenzimas en plantas ofrecen diversas ventajas sobre otras medidas de variación genética (Hamrick 1989, Schaal et al. 1991). Evolutivamente las enzimas, al ser analizadas en un campo eléctrico, reflejan cambios en la codificación de la secuencia de ADN (Murphy et al. 1993). Los loci de las isoenzimas tienen herencia mendeliana discreta, por lo que la interpretación genética de poblaciones naturales puede ser realizada sin tener en cuenta las características fenotípicas producidas por los efectos ambientales. Son un marcador de expresión codominante, lo que implica que las frecuencias de genotipos y alelos pueden ser calculadas directamente y que las diferencias tienen una base genética y son heredables. Una misma enzima puede ser analizada en todas las poblaciones y en especies emparentadas, pudiéndose estimar y comparar los niveles y distribución de la variación genética (Hamrick et al. 1991). Las isoenzimas están presentes en las células de las plantas y pueden detectarse mediante métodos relativamente sencillos de extracción y revelado. Además poseen relativamente bajo costo lo que permite analizar un gran número de individuos y poblaciones.

Los microsatélites nucleares al igual que las isoenzimas poseen herencia de tipo codominantes pero poseen la ventaja de ser marcadores hipervariables. Esto permite abordar preguntas por ejemplo en relación con el flujo génico y paternidad. Sin embargo, son especie-específicos, y si bien pueden transferirse de especies emparentadas generalmente se obtienen mejores resultados cuando son desarrollados para cada especie en particular. El costo de su desarrollo es elevado y también su análisis dado el alto número de individuos necesario para estudios poblacionales.

Los genomas de las organelas presentes en el cloroplasto y la mitocondria difieren en tipo de herencia y evolución de la contraparte genómica. La herencia tanto del cloroplasto como de la mitocondria es uniparental y no sufre recombinación. Además, por cada célula existe una copia de ADN genómico, mientras que hay múltiples organelas y por ende varias copias de su genoma circular. La tasa de mutación en las organelas es distinta en cada una de ellas. En plantas la tasa de sustitución del ADNcp es más rápida que en el ADNmt (Wolfe et al. 1987; Dumolin-Lapegue et al. 1997). La herencia de estas organelas es distinta entre ellas y difiere

según el grupo taxonómico al que pertenezcan. Así, en líneas generales, las angiospermas tienen herencia materna del cloroplasto y mitocondria, mientras que en las gimnospermas puede ser igual a las angiospermas, o el cloroplasto tener herencia paterna. En el caso particular del género *Podocarpus* el cloroplasto tiene herencia paterna, mientras que el ADN de la mitocondria la herencia puede ser tanto materna como paterna (Wilson y Owens 2003).

Dentro del genoma de las organelas, la tasa de mutación es mayor en sitios intergénicos (no codificantes) que en los sitios informativos (codificadores de genes). Por lo tanto, el análisis de regiones no codificantes del ADNcp puede ser útil a bajos niveles taxonómicos. Esto se debe a que estas zonas tienden a evolucionar más rápidamente que las secuencias codificantes, por la acumulación de inserciones/deleciones a una tasa por lo menos equivalente a la de las sustituciones de nucleótidos (Wolfe et al. 1987). Estas regiones pueden utilizarse para el estudio de poblaciones de una misma especie (filogeografía, ver mas abajo), mientras que las regiones codificantes son utilizadas para estudios interespecíficos (filogenias).

#### I. 4. 1 Filogeografía

Con el desarrollo de técnicas moleculares que estudian el ADN de mitocondria y de cloroplasto, se han construido filogenias de haplotipos, o genealogías de genes, en las que se examina la distribución geográfica de los haplotipos o variantes genéticas. Esta disciplina se conoce como filogeografía molecular (Avise et al. 1987). La genealogía de genes traza las relaciones evolutivas entre los haplotipos (alelos) con las poblaciones (Schaal y Olsen 2000). Procesos como la fluctuación en el tamaño de la población y la sub-estructuración de las poblaciones afectan a la distribución geográfica y las relaciones genealógicas entre estos haplotipos. Por lo tanto, el examen de estos datos genealógicos puede proporcionar conocimientos sobre la historia evolutiva de una especie (Schaal y Olsen 1998).

Así por ejemplo la filogeografía ha permitido dilucidar eventos como las expansiones del rango de distribución, la fragmentación y los cuellos de botella. Estos eventos parecen haber tenido una mayor influencia en los patrones de diferenciación

genética que lo que se había calculado previamente con modelos tradicionales de genética de poblaciones utilizando marcadores nucleares (Schaal et al. 1998). Sin embargo es primordial conocer el tipo de herencia de cada genoma para cada especie de plantas. En gimnospermas, la herencia del cloroplasto (paterna) y la mitocondria (materna) resultará en una mayor diferenciación entre poblaciones del ADNmt mientras que el ADNcp tenderá a mostrar un patrón más homogéneo de distribución de las variantes genéticas por el tipo de dispersión anemófila de las coníferas (Petit et al. 1993).

## I. 5. Sistema de estudio

### I. 5. 1. Historia biogeográfica de las Podocarpaceae de Sudamérica

La familia Podocarpaceae es de origen austral y su diversificación en el subtrópico de Sudamérica podría remontarse al Eoceno (van der Hammen y Hooghiemstra 2001). La familia Podocarpaceae al igual que otros elementos de la vegetación leñosa de Sudamérica se encuentra disyunta en al menos tres áreas boscosas: el Bosque Templado Austral (BTA), el Bosque Montano de Yungas (BMY), y la Mata Atlántica juntamente con la Selva Paranaense (Cabrera y Willink 1973) (Fig. I. 2). Las historias evolutivas particulares de las Podocarpaceae del cono sur de Sudamérica y los cambios climáticos y tectónicos del Terciario y Cuaternario proveen el marco natural para analizar los patrones de disyunción geográfica entre especies emparentadas y las amplitudes de los rangos de distribución de las especies en relación a la información genética.

### I. 5. 2 Objetivos e hipótesis

El objetivo general de esta tesis es estudiar los patrones de variación genética en especies arbóreas de Podocarpaceae que se encuentran en el Bosque Templado Austral (BTA) y en el Bosque Montano de Yungas (BMY), en relación a sus amplitudes de distribución geográfica y a sus distintas tolerancias ecológicas.

Este trabajo estudia las especies arbóreas de Podocarpaceae del sur de Sudamérica. Incluye dos especies de *Podocarpus* de amplia distribución endémicas del BTA y BMY (*Podocarpus nubigena* y *Podocarpus parlatorei*, respectivamente) y las especies de distribución restringida endémicas del BTA *Podocarpus saligna*, *Prumnopytis andina* y *Saxegothaea conspicua*). El género *Podocarpus* está dividido en dos subgéneros, *Foliolatus* y *Podocarpus* (De Laubenfels 1985). En Sudamérica se encuentran especies del subgénero *Podocarpus* distribuidas desde Centroamérica hasta el sur de Patagonia. Las especies de *Podocarpus* estudiadas en esta tesis pertenecen a dos secciones del subgénero *Podocarpus*: *Australis* y *Capitulatis*. *Podocarpus nubigena* es la única especie Sudamericana que pertenece de la sección *Australis* y se distribuye en el BTA alcanzando las latitudes más australes de distribución de las Podocarpaceae sudamericanas, mientras que *P. parlatorei* del BMY y *P. saligna* del norte del BTA, juntamente con *P. lambertii* de la Mata Atlántica y Selva Paranaense y *P. glomerulatus* Del BMY pertenecen a la sección *Capitulatis* (De Laubenfels 1985). *Prumnopytis* forma parte de un clado distinto al que contiene a *Podocarpus* y *Saxegothaea* (Sinclair et al. 2002). En este trabajo no se incluyó la única especie Sudamericana del género *Lepidothamnus* (*L. fonkii*) por tratarse de una especie arbustiva.

El registro polínico de la familia Podocarpaceae se remonta al Jurásico, presentando registros continuos durante el Mesozoico y Cenozoico (del Fueyo 1996). Durante el Cretácico la evidencia de polen fósil manifiesta que las Podocarpaceae eran un componente importante de la flora boscosa de Patagonia (del Fueyo 1996) mientras que durante el Eoceno temprano a medio los registros muestran la presencia de *Podocarpus* a menores latitudes en Sudamérica (Kershaw y McGlone 1995). La estructura con los dos sacos polínicos de las especies actuales tienen las mismas características que se reconocen en los granos de polen fósil (del Fueyo 1996). En particular, la morfología del polen de *Podocarpus nubigena*, *P. parlatorei* y *P. lambertii* es similar diferenciándose únicamente en la fenología. La especie austral *Podocarpus nubigena* posee una menor duración de la maduración del polen (del Fueyo 1996).

Los objetivos particulares son:

1. Estudiar la disyunción geográfica entre las masas boscosas del cono sur donde crecen las Podocarpaceae en base a la comparación de géneros de especies leñosas del Bosque Templado Austral y el Bosque Montano de Yungas, a fin de comprender su historia biogeográfica.

2. Analizar la relación entre los patrones de distribución de polimorfismos genéticos y las amplitudes de rango geográfico de las distintas especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica.

3. Comprender los factores actuales e históricos que modelan los acervos genéticos de las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica.

4. Evaluar las relaciones de parentesco de las Podocarpaceae del sur de Sudamérica en relación con los tipos de ambientes que ocupan y factores históricos.

Los conocimientos de este trabajo esperan contribuir al desarrollo de estrategias de conservación para la protección de los acervos genéticos de las Podocarpaceae del sur de Sudamérica, algunas de ellas amenazadas.

Las hipótesis y predicciones de este trabajo son:

1. Los eventos geoclimáticos del pasado ocurridos a distintas latitudes afectaron diferencialmente la flora de Sudamérica.

- Se espera que la distribución de géneros leñosos que durante el Paleógeno formaban una unidad vegetacional muestren disyunciones biogeográficas que reflejen sus características autoecológicas por los cambios climáticos ocurridos en Sudamérica. Por lo tanto se predice que los géneros asociados a climas más fríos (microtérminos) tendrán una mayor representación en el bosque templado austral, mientras que los asociados a climas tropicales y subtropicales (mesotérminos) serán relativamente más abundantes en el bosque montano de Yungas.

- Se postula además que las condiciones ambientales de latitudes subtropicales favorecieron la diversificación de especies de ambos tipos de géneros (micro y megatérminos), mientras que en el sur prevaleció la permanencia de elementos tolerantes al frío.

2. Existe una correlación positiva entre la amplitud del rango de distribución geográfica y las características genéticas poblacionales de las especies.

- Por lo tanto se predice que especies de distribución geográfica amplia y poblaciones relativamente continuas presentarán elevada diversidad genética intrapoblacional y una relativamente baja diferenciación interpoblacional. Por otro lado, especies de distribución geográfica restringida, con poblaciones aisladas y mayor efecto de la deriva génica resultarán en una baja diversidad genética dentro de las poblaciones y relativamente altos niveles de divergencia genética entre poblaciones.

3. La historia climática del Terciario y Cuaternario en los Andes australes y subtropicales afectó diferencialmente los niveles y distribución de la variación genética de las Podocarpaceae de amplia distribución presentes en el BTA y en el BMY.

- Por lo tanto se espera que el acervo genético de la especie de distribución subtropical *P. parlatoresi* refleje una historia evolutiva más prolongada en Sudamérica. Esto juntamente con los cambios climáticos sufridos durante el Cuaternario se verá reflejado en una mayor estructuración genética en el espacio. En particular se postula que *P. parlatoresi* sufrió sucesivas expansiones hacia zonas bajas y hacia el norte durante períodos fríos (glaciarios) y retracciones hacia las altas cumbres durante períodos desfavorables (interglaciarios cálidos).

- Por otro lado, se predice que a latitudes altas y habiendo existido áreas libres de hielo, *P. nubigena* habría sobrevivido en refugios múltiples a lo largo de su distribución en Patagonia.

- Se predice que poblaciones con mayor diversidad genéticas serán indicadoras de refugios glaciarios para la especie *P. nubigena* y las poblaciones que derivaron de éstas mostrarán una disminución gradual de la variabilidad genética, que se incrementará con la distancia geográfica a dichos refugios. En cambio, para *P. parlatoresi* los refugios serán asumidos como las áreas donde la especie sobrevivió

durante los interglaciarios. La variación en la distribución de la diversidad (clines) indicará posibles rutas de migración.

4. Especies con características morfológicas y afinidades ambientales similares estarán más emparentadas filogenéticamente que especies del mismo género que ocupan ambientes diferentes y difieren morfológicamente.

- Se predice que las especies montanas subtropicales y templado-cálidas (*P. parlatorei* y *P. saligna* estudiadas en esta tesis, juntamente con datos de las especies emparentadas tropicales *P. lambertii* y *P. glomerulatus*) presentarán mayor afinidad filogenética por un posible ancestro común entre ellas que con la especie templado-fría *P. nubigena*. Esta última es la más austral de las especies de *Podocarpus* (microtérmica) y posiblemente su distribución geográfica refleja una mayor divergencia respecto a las demás especies de *Podocarpus* consideradas mesotérmicas.

## I. 6. Área de distribución y caracterización de las especies en estudio

### I. 6. 1. Bosque Montano de Yungas

El Bosque Montano de Yungas (BMY) es un bosque templado de montaña con distribución tropical y subtropical que atraviesa Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y tiene su extremo sur en el noroeste de Argentina (aproximadamente a los 27° S) (Fig. I. 2). Se distribuye sobre las laderas orientales de los cordones montañosos ubicados al este y paralelos a la cordillera de los Andes. Las Yungas de Argentina y Bolivia limitan al oeste con las alturas andinas y altoandinas de la Prepuna y Puna respectivamente, mientras que al este lo hacen con las planicies bajas del dominio Chaqueño y Amazónico (Cabrera y Willink 1973, Cabrera 1994) (Fig. I. 2).

En Argentina las Yungas constituyen el extremo sur del bosque subtropical del Neotrópico, y se subdividen en tres pisos altitudinales. En el estrato altitudinal superior se encuentra el Bosque Montano y la presencia de *Podocarpus parlatorei* define

este tipo de formación boscosa. La Selva Montana ocupa los estratos intermedios, y en el piso altitudinal inferior se encuentra el Pedemonte. De norte a sur atraviesa las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán y Catamarca, distribuyéndose en un estrecho rango longitudinal de no más de 50 km de ancho (Brown et al. 2001). Los límites altitudinales del piso del bosque Montano se incrementan con la disminución de la latitud, distribuyéndose desde los 1000 m snm en el sur a más de 2000 m snm de elevación en el norte de Argentina y alcanzando hasta 3000 m snm en Bolivia (Cabrera 1994; Dimitri et al. 1997).

En Argentina existe una discontinuidad orográfica que fragmenta las Yungas en sectores aislados sobre las serranías del noroeste (Fig. I. 3. A). Las diferencias de las precipitaciones son tan marcadas con la altura y orientación que la vegetación cambia radicalmente, de manera que dos sitios próximos pueden diferir ampliamente en composición florística. Los vientos predominantes son del este y sobre cuyas laderas depositan mayoritariamente las precipitaciones estivales que pueden superar los 2500 mm anuales. El clima en general es cálido y húmedo, con estación seca en invierno, pero en las zonas más elevadas el clima es templado y húmedo, con inviernos fríos y nevadas ocasionales (Cabrera 1994; Brown et al. 2001). Mientras en los valles la vegetación es de tipo seco y la flora es Chaqueña, a medida que se incrementa la altura comienza el Pedemonte con elementos tropicales asociados a climas más húmedos. En el estrato superior de las serranías está el Bosque Montano donde crece *Podocarpus parlatorei* y que además presenta elementos arbóreos florísticos de distintas procedencias. Para dar un ejemplo la familia Podocarpaceae es de origen Austral, y suele crecer en asociación con otros géneros, como *Juglans* (Juglandaceae) y *Alnus* (Betulaceae), que pertenecen a familias de origen Holártico, y *Cedrela* (Meliaceae) que está en una familia de posible origen Neotropical. Esta coexistencia de especies con diferentes orígenes biogeográficos es el resultado de la historia climática y los marcados gradientes en precipitación y temperatura a lo largo de la distribución altitudinal y latitudinal de Yungas (Brown et al. 2001). Esto se refleja en una reducción de la diversidad de especies a medida que aumenta la latitud que sugiere que las distribuciones de las especies de Yungas fueron afectadas por factores climáticos y/o

históricos que determinaron que actualmente se encuentren fragmentadas por el aislamiento orográfico en distintos sectores. En Argentina, el sector norte de la Yungas, está considerado como una de las áreas de mayor biodiversidad. Se ha sugerido que este sector habría funcionado como refugio a largo plazo desde el Pleistoceno (Brown et al. 2001).

### *Podocarpus parlatorei*

*Podocarpus parlatorei* Pilg. (pino del cerro) (Fig. I. 3 B) es la única conífera nativa del Noroeste Argentino (Killeen et al. 1993), y es la especie que define al bosque Montano de Yungas en Argentina (Fig. I. 3 A). La asociación florística del Bosque Montano se restringe a las pendientes de orientación este, donde las precipitaciones son más abundantes por la intercepción de los vientos húmedos provenientes del océano Atlántico. Los límites del bosque Montano se incrementan en altitud con la disminución de la latitud (Cabrera 1994; Dimitri et al. 1997).

La distribución de *P. parlatorei* sigue las discontinuidades orográficas de las serranías del norte de Argentina y por lo tanto sus poblaciones están disyuntas y se subdividen en sur, centro este, centro oeste y norte (Brown 1995, Morales et al. 1995). En el extremo sur y centro de la distribución *P. parlatorei* forma bosques puros (Fig. I. 3 B, C), mientras que hacia el norte crece ocupando el dosel medio de la vegetación junto con *Alnus acuminata*, *Cedrela lilloi* y *Juglans australis* (Fig. I. 3 B, D) (Morales et al. 1995).

Los árboles adultos de *P. parlatorei* pueden alcanzar de 15 a 30 m de altura, con diámetros superiores a 1,5 m (A. Brown, Liey, Tucumán, Argentina, com. per.). *Podocarpus parlatorei* es una conífera dioica de polinización anemófila. Sus semillas poseen cubierta carnosa y son dispersadas por gravedad y en algunos casos por animales, como por ejemplo por *Columba fasciata* (paloma) Columbidae y *Conepatus chinga* (zorrino común) Mustelidae (R. Salinas, Secretaria de Medio Ambiente de la provincia de Catamarca, Argentina, com. pers.). En cuanto a los estados sucesionales de estos bosques, *P. parlatorei* está considerada como especie pionera ya que muestra abundante regeneración asociada a disturbios de gran escala de origen natural y /o antropogénicos (Arturi et al. 1998).

## I. 6. 2. Bosque Templado Austral

El Bosque Templado Austral (BTA) se desarrolla desde los 35° S hasta el Cabo de Hornos en el extremo sur a los 55° S (Fig. I. 2), y desde la costa del el océano Pacífico hasta las laderas este de la cordillera de los Andes. Presenta un alto porcentaje de endemismos particularmente a elevados niveles taxonómicos (Arroyo et al. 1996, Armesto et al. 1996) incluyendo familias, géneros y especies únicas. Este bosque está aislado de otras áreas boscosas continentales como las Yungas de los Andes subtropicales y con la Mata Atlántica del sudoeste de Brasil por mas de 2000 km (Fig. I. 2) (Armesto et al. 1996). El BTA presenta algunas familias y géneros comunes con otros bosques templados situados a la misma latitud de Nueva Zelanda y Tasmania (Wardle et al. 2001; Ezcurra et al. 2008) . Estas cualidades le otorgan al BTA la característica de isla biogeográfica (Armesto et al. 1996).

El BTA tiene un clima templado-frío, con frentes de lluvias originados en el cinturón de vientos del oeste provenientes del Pacífico. Esto resulta en abundantes lluvias durante todo el año sobre las laderas occidentales de los Andes mientras que sobre el este el clima es de tipo mediterráneo con veranos secos y lluvias concentradas en invierno. Por lo tanto las precipitaciones aumentan gradualmente de norte a sur y de este a oeste. La temperatura presenta poca variación estacional a lo largo de toda la distribución del bosque templado austral debido a la acentuada influencia marítima (Armesto et al 1996; Arroyo et al. 1996).

En el BTA en general existe un gradiente latitudinal en la riqueza de especies que sugiere la influencia de factores climáticos y/o históricos. El sector norte del BTA hasta la isla de Chiloé es el área de mayor diversidad de árboles (Veblen et al. 1996; Arroyo et al. 1996; Aizen y Ezcurra 2008) cuya riqueza de especies disminuye con la latitud hacia el sur.

Tres familias de coníferas habitan el BTA, Araucariaceae, Podocarpaceae y Cupressaceae. Las dos últimas presentan géneros monoespecíficos (*Saxegothaea*, *Lepidothamnus*, *Austrocedrus*, *Fitzroya* y *Pilgerodendron*) y junto con la familia Nothofagaceae constituyen los elementos arbóreos que caracterizan el BTA. La familia

Podocarpaceae está representada por cuatro géneros arbóreos, *Podocarpus*, *Prumnopytis* y *Saxegothaea*, y un arbusto del género *Lepidothamnus*. El género *Podocarpus* posee dos especies *P. nubigena* y *P. saligna*, mientras que los otros géneros consisten de una única especie *Prumnopytis andina*, *Saxegothaea conspicua* y *Lepidothamnus fonkii* (Marticorena y Rodríguez 1995). *Podocarpus nubigena* y *S. conspicua* son especies simpátricas. Si bien la distribución geográfica de *P. nubigena* (desde 39°50' hasta 50°23' S) (Fig. I. 4. A), es un poco mayor que la de *S. conspicua* (desde 36° S hasta 45°45' S) (Fig. I. 5. A), ambas ocupan sitios de condiciones ambientales similares. *Podocarpus saligna* y *Pr. andina* poseen menores rangos latitudinales de distribución, se encuentran restringidas a la VII, VIII y IX región de Chile (Fig. I. 6. A y I. 7. A) y están altamente amenazadas por el uso del suelo para el cultivo de especies exóticas.

### *Podocarpus nubigena*

*Podocarpus nubigena* Lindl. (mañío macho, mañío de hojas punzantes) (Fig. I. 4 B, C, D) posee en Chile un rango latitudinal relativamente amplio y se distribuye desde la provincia Cautín hasta la provincia Última Esperanza (desde 39°50' hasta 50°23' S) (Marticorena y Rodríguez 1995) (Fig. I. 4. A). Por otro lado en Argentina solamente se encuentra en áreas muy restringidas donde las precipitaciones son elevadas. Actualmente está citada para las ingresiones de selva Valdiviana en el Parque Nacional Nahuel Huapi y Parque Nacional Los Alerces (Dimitri 1972, Correa 1998), sin embargo se sabe de su existencia en otras áreas fuera de parques nacionales, como las nacientes del río Tigre en Chubut y Turbio I, II y III en Santa Cruz, donde el acceso es extremadamente dificultoso (Informes de guardaparques en la Delegación Regional Patagonia de APN).

Es una especie que crece exclusivamente en las condiciones de clima oceánico. En su rango septentrional ocurre bajo condiciones de alta humedad pero con temperaturas moderadas. Hacia el sur siempre se encuentra bajo clima oceánico húmedo, pero con condiciones de más bajas temperaturas. Deja de ocurrir hacia el este debido especialmente a la disminución de las precipitaciones totales y menor humedad ambiental (Donoso et al. 2006a).

Crece en suelos muy húmedos, pero con buenas condiciones de drenaje. *P. nubigena* pareciera no tener restricciones respecto a la elevación a la cual crece, ya que se la encuentra a orillas del mar y hasta los 850 m snm. En la cordillera de los Andes se la encuentra a altitudes bajas o intermedias en condiciones variables de macrotopografía mientras que en la Cordillera de la Costa, incluyendo Chiloé, se encuentra especialmente en las laderas occidentales ocupando altitudes medias a altas (sobre 100 a más de 700 m snm), en condiciones de alta humedad con buen drenaje. En las islas del sur de Chile se presenta a baja altitud (Donoso et al. 2006a).

Al llegar a la madurez estos árboles pueden alcanzar diámetros de 0.9 m y alturas entre 10 y 25 m, pero nunca son dominantes en el dosel. Usualmente coexiste con otras coníferas, como *Saxegothaea conspicua* (Podocarpaceae) y las Cupressaceae *Pilgerodendron uviferum* y *Fitzroya cupressoides*, y también con las siempreverdes *Embothrium coccineum*, *Laureliopsis philippiana*, *Drymis winteri* y *Nothofagus dombeyi*. En Chile, sobre las laderas oeste de los Andes, se lo encuentra asociado con *Nothofagus nitida*, y con *Nothofagus betuloides* hacia el sur. Florece generalmente entre diciembre y enero y su polinización es anemófila. Las semillas maduran entre mayo y agosto (Marticorena y Rodríguez 1995) y la dispersión es por gravedad o está mediada por animales, como por el zorzal patagónico *Turdus falcklandii* (Willson et al. 1996).

### *Podocarpus saligna*

*Podocarpus saligna*. D. Don (mañío de hojas largas) (Fig. I. 6 B, C, D) es una especie endémica de Chile, crece al sur del Río Maule, desde aproximadamente los 35° S hasta los 41° S (Marticorena y Rodríguez 1995) (Fig. I. 6 A). En la región mediterránea se encuentra en la Cordillera de los Andes, principalmente en quebradas y cerca de cursos de agua, y en exposiciones sur por debajo de los 1000 m snm. Por encima de los 1000 m snm, especialmente en áreas planas o de escasa pendiente, suele formar bosquetes. En la distribución sur suele encontrarse asociado a quebradas, pero no alcanza mayores altitudes y desciende a la depresión intermedia. El clima en el cual se desarrolla varía entre mediterráneo de altura, y templado húmedo con mucha influencia mediterránea hacia el sur, y normalmente está asociado a condiciones relativamente húmedas y frescas (Donoso y Utreras 2006c).

Esta condición se da habitualmente en las quebradas y exposiciones sur en el norte, mientras que más al sur las condiciones de mayor humedad por las elevadas precipitaciones permiten que *P. saligna* ocurra en las laderas norte (Donoso y Utreras 2006c).

Puede crecer en asociación con especies del bosque de tipo forestal roble - hualo (*Nothofagus obliqua* - *N. glauca*) y sobre laderas de exposición sur con otras Nothofagaceas. También puede crecer asociado con *Austrocedrus chilensis* y otras especies de ambientes más xéricos. Al sur puede crecer asociado al tipo forestal siempreverde (Donoso y Utreras 2006c).

### *Prumnopytis andina*

*Prumnopytis andina* (Poepp. ex Endl.) de Laud. (lleuque o uva de la cordillera) (Fig. I. 7 B, C, D) se distribuye entre los 35°52' S hasta los 39°30' S sobre la cordillera de los Andes en Chile y en una única población en la ladera este de la Cordillera de la Costa en Nahuel Buta (Hechenleitner et al. 2006) (Fig. I. 7. A). El clima en el que se desarrolla es mediterráneo montano y su altitud puede variar entre los 200 y 1300 m snm en la cordillera de los Andes.

Crece en sitios moderadamente húmedos generalmente asociados a cursos de agua en ambientes montañosos. Es resistente a climas con bajas temperaturas invernales, la topografía puede ser variable. Sobre la cordillera de los Andes habitualmente crece en los fondos de valles cercanos a grandes cursos de agua (Marticorena y Rodríguez 1995; Hechenleitner et al. 2006).

*Prumnopytis andina* es un árbol escaso, que raramente forma bosquetes puros. Esta asociado a *Austrocedrus chilensis*, en combinación con *Nothofagus obliqua* y *N. glauca*. A los 37° se lo encuentra asociado con el tipo forestal esclerófilo, mientras que en el sur de la distribución se asocia con los tipos forestales roble-raulí-coihue (*Nothofagus obliqua*-*N. nervosa*-*N. dombeyi*) y coihue-raulí-tepa (*N. dombeyi*-*N. nervosa*-*Laureliopsis philippiana*) (Hechenleitner et al. 2006).

## *Saxegothaea conspicua*

*Saxegothaea conspicua* Lindl. (mañío, mañío de hojas cortas, mañíu, mañío hembra) (Fig. I. 5 B, C, D) se distribuye en Argentina y Chile entre los 36° S y los 45°45' S sobre las cordilleras de la Costa y los Andes (Marticorena y Rodríguez 1995) (Fig. I. 5. A). Sobre la cordillera de los Andes esta especie suele ser escasa en la región mediterránea chilena, donde se la suele encontrar en quebradas o en zonas húmedas a altitudes medias a altas. Al sur del río Malleco en Chile se hace más abundante y forma bosques mixtos por encima de los 500 m snm (Donoso et al. 2006b). A medida que la distribución avanza hacia el sur disminuye el límite altitudinal inferior. Al igual que *P. nubigena*, *S. conspicua* tiene una distribución muy restringida en Argentina, limitándose a unas pocas áreas donde las precipitaciones son elevadas o próximas a cursos de agua. Sin embargo, es más frecuente que *P. nubigena* al este de la cordillera de los Andes, siendo muy abundante en el P.N. Lanín, en cercanías del Lago Queñi. Las condiciones climáticas bajo las cuales se desarrolla *S. conspicua* son muy similares a las de *P. nubigena*. Sin embargo crece bajo condiciones de suelo más fértiles y mejor drenados que en los que crece *P. nubigena*.

Aparentemente *S. conspicua* podría alcanzar una alta longevidad, llegando hasta 1000 años (Donoso et al. 2006b). Se ha detectado que dentro de troncos atacados por hongos pueden crecer y desarrollarse raíces adventicias que penetran el viejo tronco en descomposición y se despliegan hacia el suelo desarrollando un nuevo tronco sinuoso y hueco (Martínez y Muñoz 1988, Donoso 1995). Es una especie monoica, pudiendo alcanzar hasta 20 m de altura y 2 m de diámetro. A diferencia de las otras podocarpaceas, presenta conos leñosos a la madurez, con numerosas brácteas tectrices. Las semillas son muy pequeñas (3-4 mm de largo) y emergen del cono por pequeños orificios (Donoso 1974, Rodríguez et al. 1983).

## I. 7. Conservación de Podocarpaceae endémicas del BTA y BMY

Los bosques templados de Patagonia se caracterizan por el alto porcentaje de endemismos (Arroyo et al. 1996). En el BMY, *P. parlatorei* es la única conífera nativa del noroeste argentino. *P. parlatorei*, está listada en el Apéndice I de CITES (Convención sobre el Comercio Internacional de Especies Amenazadas de Fauna y Flora Silvestres 2007) que prohíbe su explotación maderera y comercialización internacional. Para la UICN (Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza y los Recursos Naturales) es una especie con datos deficientes (DD).

*Podocarpus saligna* ha sido clasificada como rara/en riesgo (Premoli 1994) y según la UICN es considerada Vulnerable (VU A1d + 2b). Esto implica que sus tamaños poblacionales están siendo reducidos, pero sus causas serían reversibles. Su área de distribución se ha visto afectada por cambios en el uso de la tierra y su reemplazo por monocultivos de especies forestales exóticas. Esto ha hecho muy difícil detectar poblaciones de *P. saligna* con suficiente cantidad de individuos para la realización de este trabajo.

*Prumnopytis andina* está catalogada como rara/en riesgo (Premoli 1994) y según la UICN como Vulnerable (VU B2ab(ii-v)). Esto implica que posee un área de ocupación estimada <2000km<sup>2</sup>, por lo tanto se encuentra severamente fragmentada y/o no tienen registros de la especie en más de 10 localidades. Además presenta una disminución proyectada en el área de ocupación y en el número de individuos maduros.

Las especies de Podocarpaceae de relativamente amplia distribución como *P. parlatorei* del BMY y como *P. nubigena* y *S. conspicua* del BTA, son especies de relativa importancia económica por su valor maderero. Si bien la explotación de *P. parlatorei* está regulada por CITES, parecería no existir consenso entre el estado de conservación de *P. nubigena* y *S. conspicua*. Mientras ambas especies están clasificadas como raras y en riesgo (Premoli 1994), según la UICN *P. nubigena* es solamente una especie amenazada, es decir posee un riesgo bajo de extinción. Por lo tanto más información es

necesaria para proteger estas especies, particularmente linajes únicos como el género monoespecífico *Saxegothaea*.

El potencial evolutivo y la resiliencia de las especies en el largo plazo, dependen de la cantidad y estructura de la variación genética (Millar y Libby 1991; Newton et al. 1999). Por lo tanto, los estudios genéticos pueden realizar un valioso aporte para el desarrollo de prácticas efectivas de conservación tendientes a proteger sus acervos genéticos (Premoli 1994). La conservación a largo plazo de las especies depende probablemente de la protección de las poblaciones genéticamente variables y de las que presentan características genéticas únicas. Inclusive, poblaciones marginales a la distribución de las especies son relevantes en conservación en relación con potenciales eventos de especiación (Lesica y Allendorf 1995). El concepto de unidades evolutivamente significativas (ESUs) se creó como una forma práctica de enfocar la conservación de los recursos genéticos ya que representan unidades poblacionales que merecen manejo propio y que tienen una alta prioridad de conservación (Ryder 1986). Estas unidades deben dar una idea acerca de los procesos evolutivos y la distribución de la diversidad genética para llevar a cabo estrategias de conservación. Las ESUs no tienen que coincidir forzosamente con la categoría de especie, ya que pueden tratarse de poblaciones distintas genéticamente del resto, o que han estado históricamente aisladas (Soltis y Gitzendanner 1995).

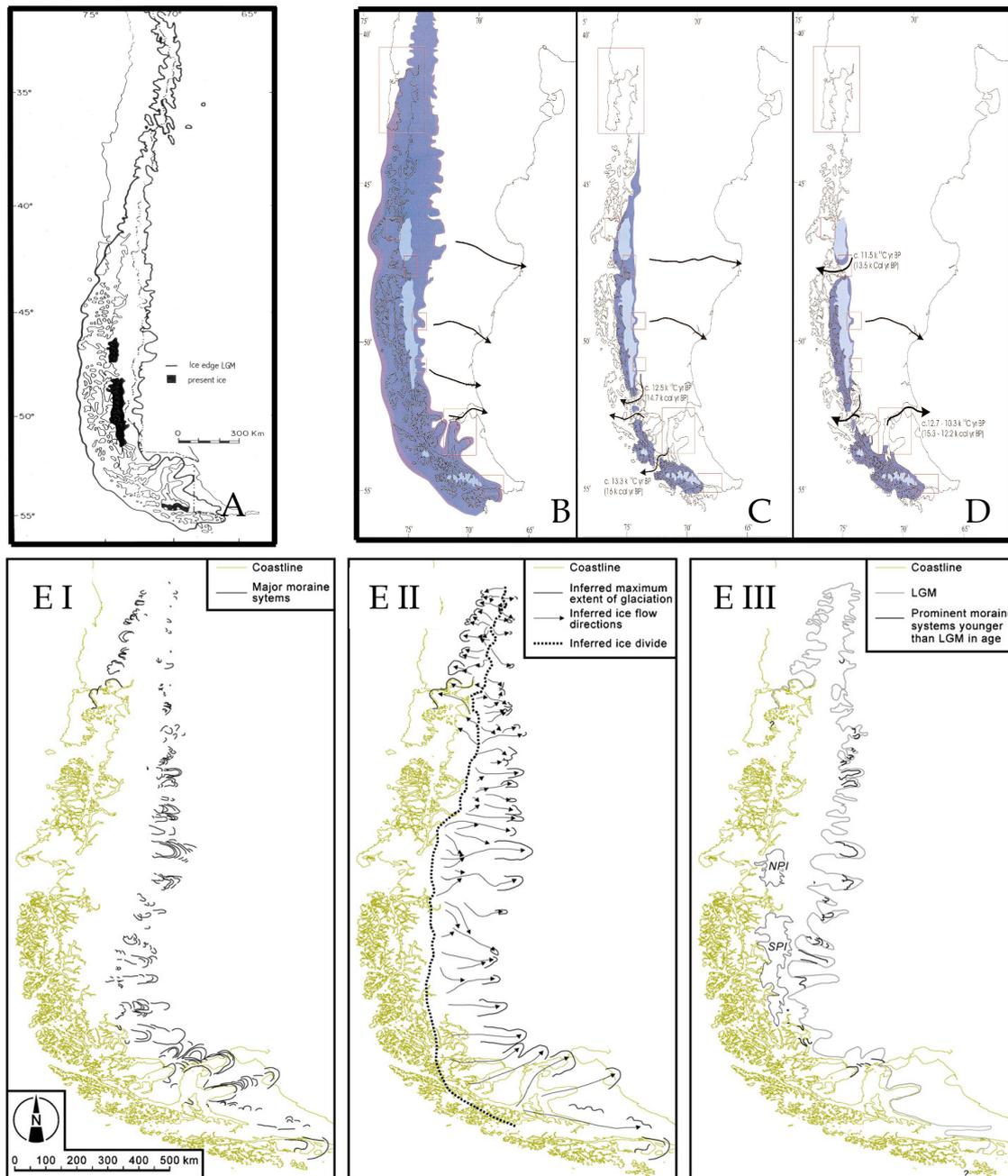


Figura I. 1: A: Límite de hielo para el último máximo glaciario (de Hollin y Shilling 1981). B: Limite del glaciar inmediatamente antes de la deglaciación ca. 14600-14000  $^{14}\text{C}$  AP. C: Límite del glaciar durante la deglaciación ca. 14 600-14 000  $^{14}\text{C}$  AP. D: Área de los glaciares para el período ca. 10 000  $^{14}\text{C}$  AP. (B a D de McCulloch et al. 2000). E: Reconstrucciones de los glaciares en la Patagonia medida sobre la base de la cartografía geomorfológica. (EI) Los principales sistemas de morenas de la Patagonia. (EII) Patrones de flujo de hielo y límites de hielo en la Patagonia, es posible que no todos los lóbulos alcanzado su máximo grado al mismo tiempo. (EIII) Reconstrucción de las extensiones del hielo durante el UMG en la Patagonia (EI a EIII de Glasser et al. 2008).

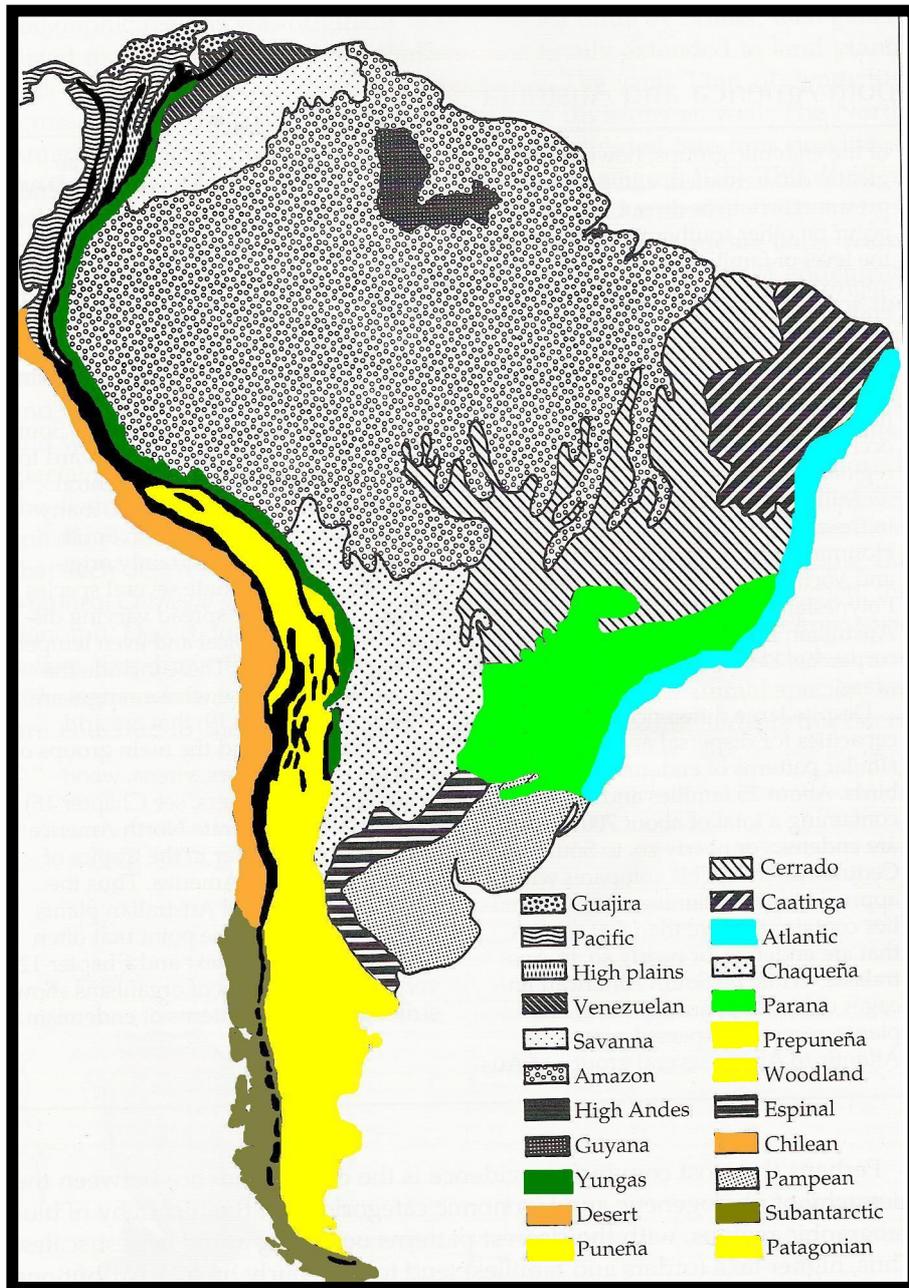


Figura I. 2: Regiones fitogeográficas de Sudamérica. (Modificado de Cabrera y Willik 1973). La diagonal árida se muestra en naranja y amarillo, los bosques del sur de Sudamérica en distintos tonos de verde (BTA, BMY, Mata Atlántica).

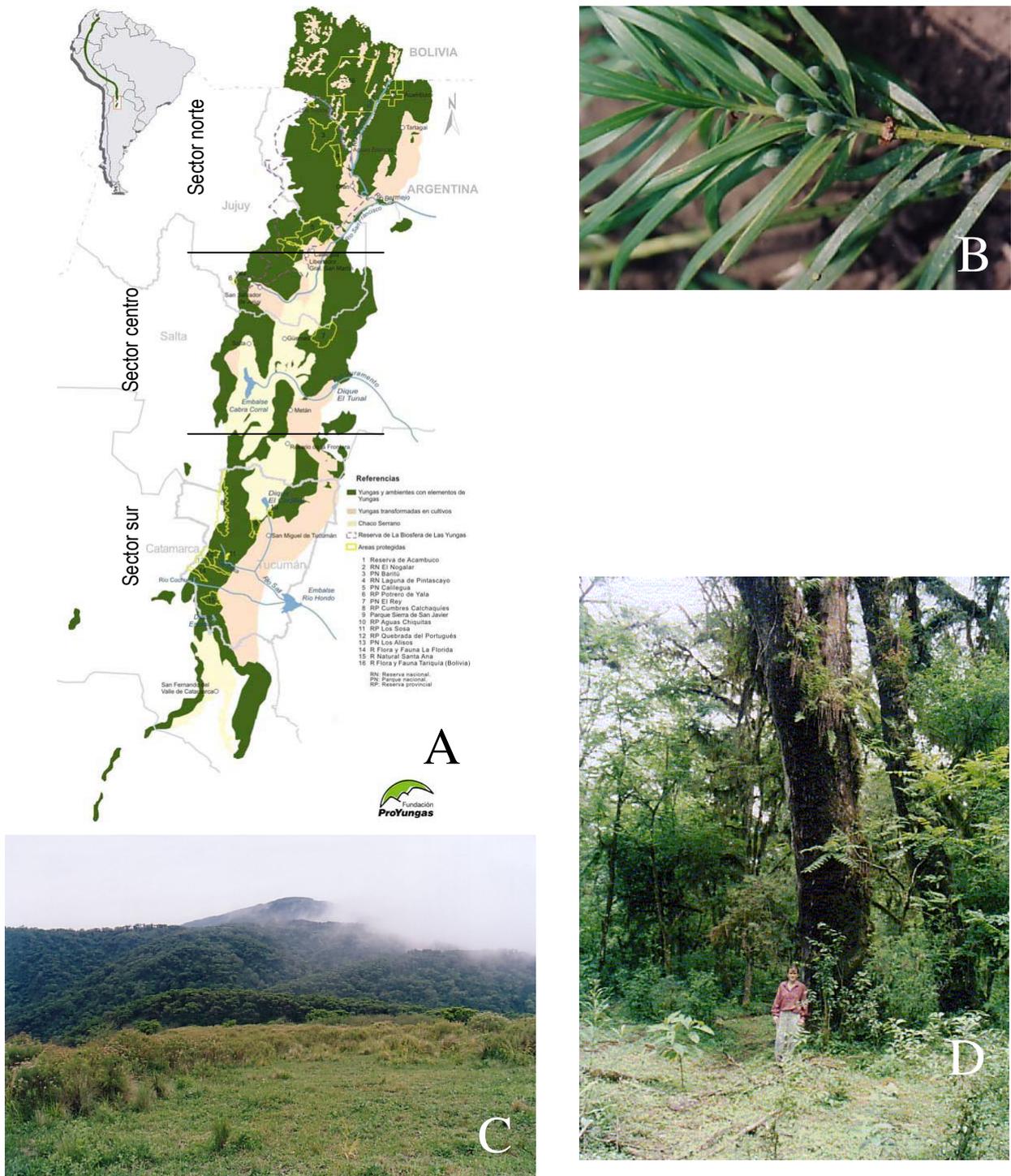


Figura I. 3: A. Área de distribución de las Yungas en el Noroeste de Argentina, B. Fruto y follaje de *Podocarpus parlatorei*; C. Bosque de *P. parlatorei* de la población Taficillo en la RP San Javier, Tucumán; D. Bosque Montano en RN El Nogalar, Salta.

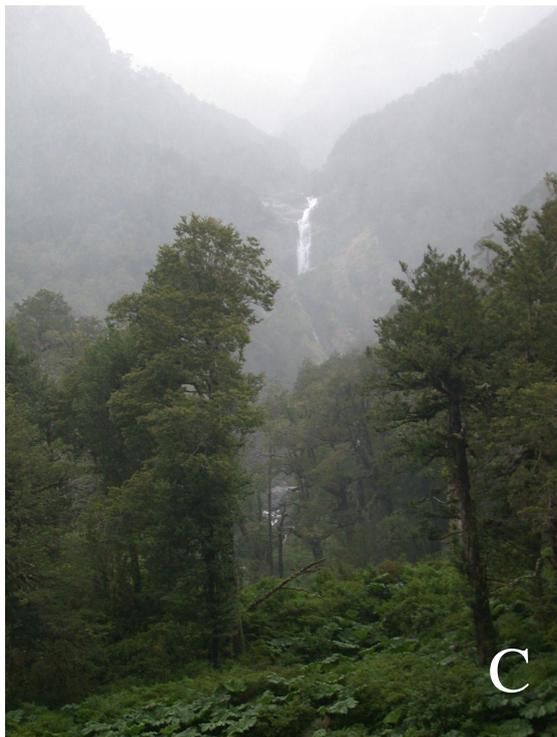
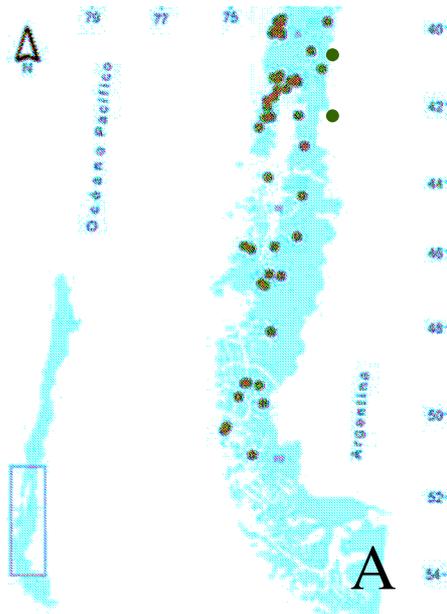


Figura I. 4: A. Área de distribución de *Podocarpus nubigena* (Hechenleitner et al. 2005), B. Fruto y follaje de *P. nubigena*; C. *Podocarpus nubigena* en Población Quelat del PN homónimo; D. *Podocarpus nubigena* en Población Puerto Blest del PN Nahuel Huapi.

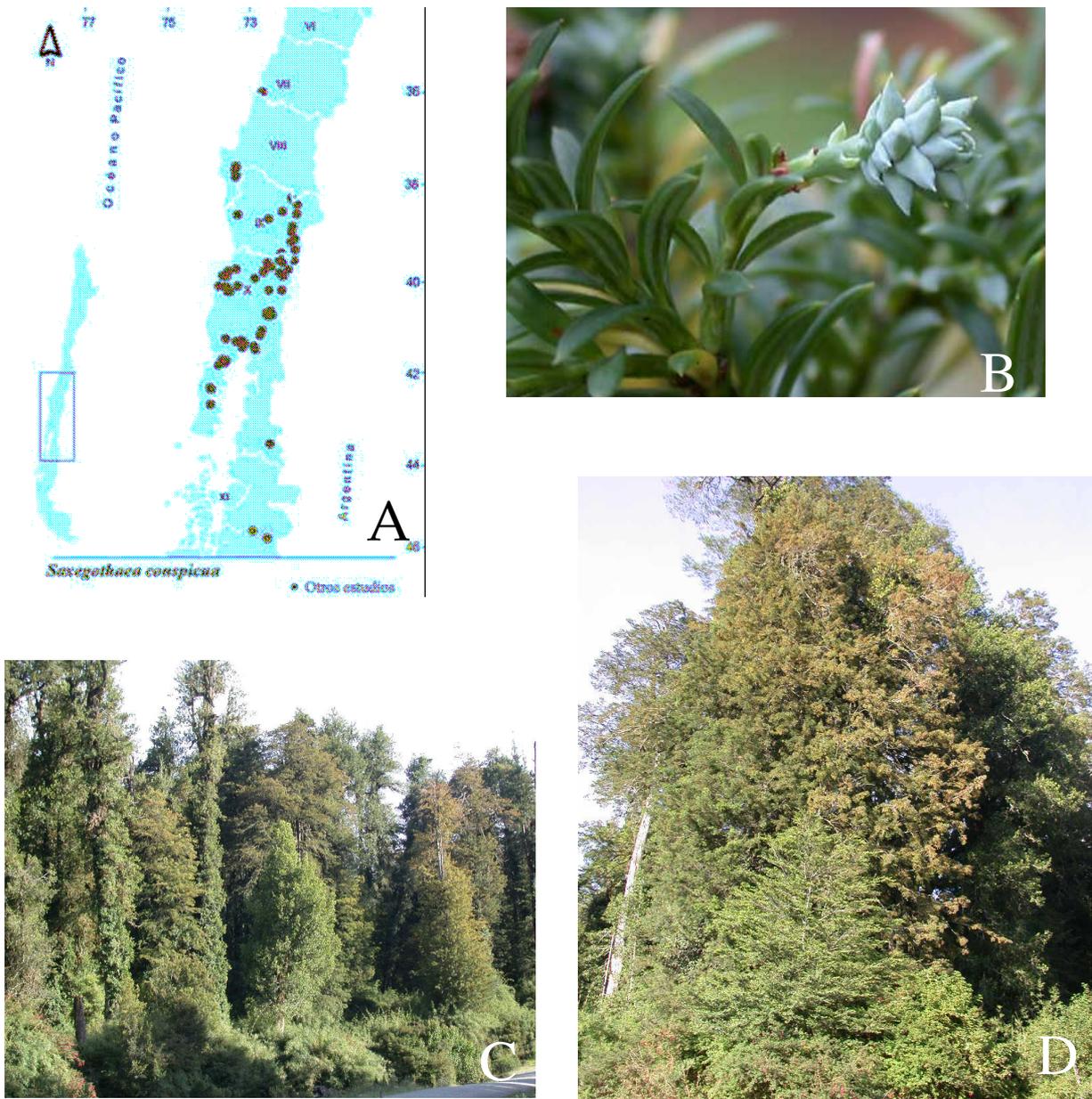


Figura I. 5: A. Área de distribución de *Saxegothaea conspicua* (Hechenleitner et al. 2005); B. Fruto y follaje de *S. conspicua*; C. Individuos de *S. conspicua* en la población Río Frío; D. Individuo adulto de *S. conspicua*

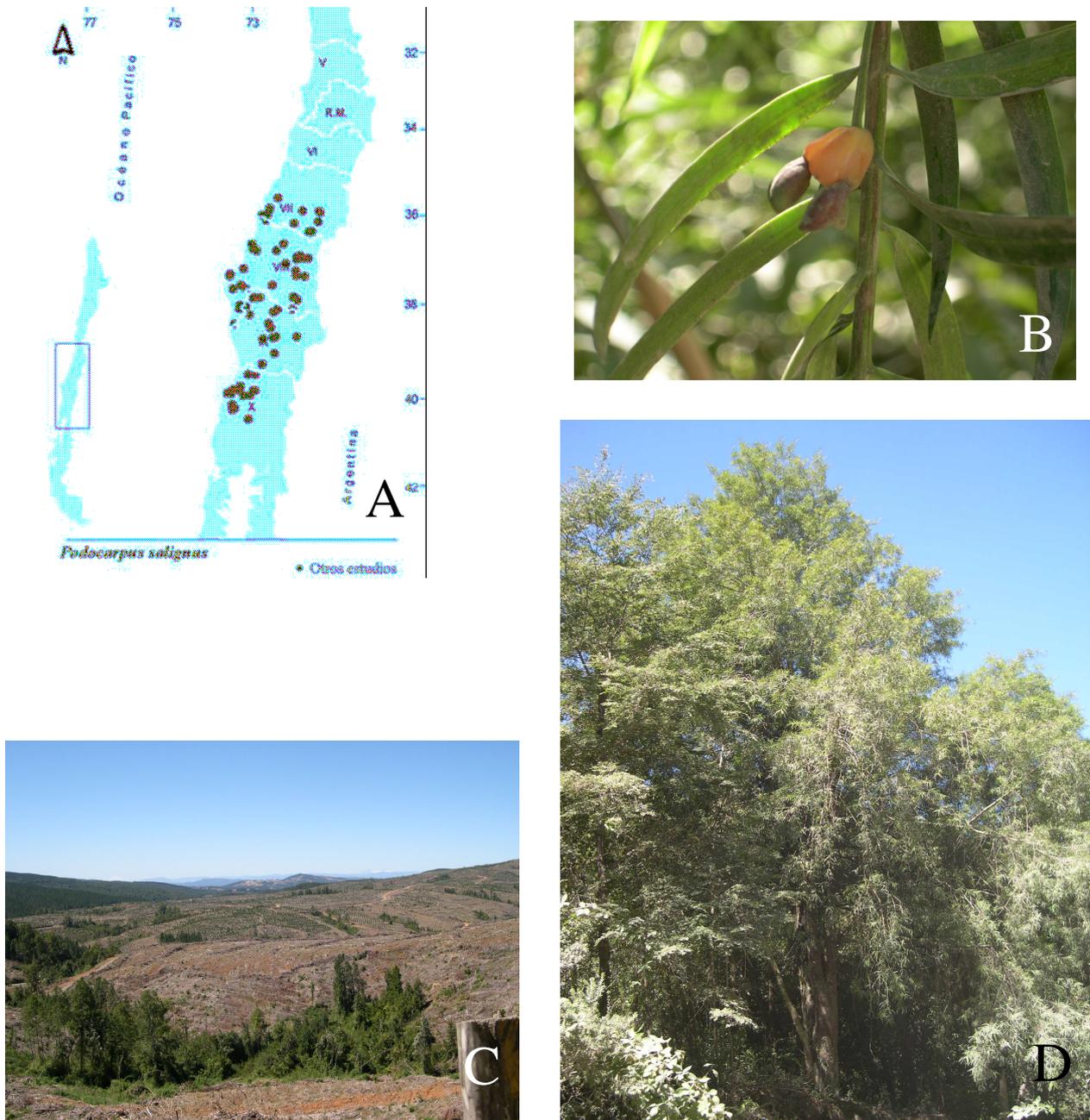


Figura I. 6: A. Área de distribución de *Podocarpus saligna* (Hechenleitner et al. 2005); B. Fruto y follaje de *P. saligna*; C. Pequeño parche de bosque nativo dentro de la matriz de tierras desforestadas para cultivo de especies forestales exóticas cerca de Valdivia; D. Árbol adulto de *P. saligna*.

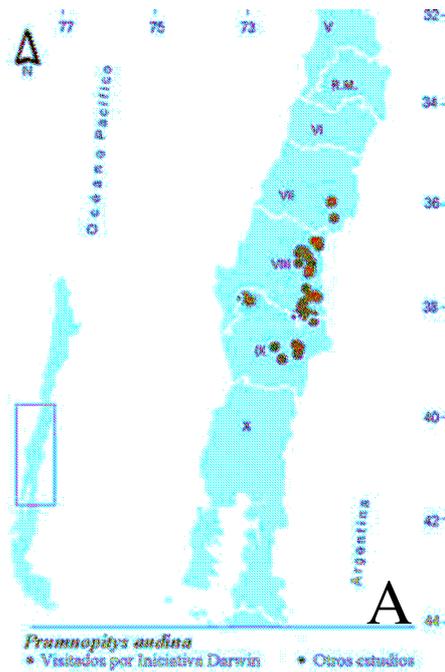


Figura I. 7: A. Área de distribución de *Prumnopitys andina* (Hechenleitner et al. 2005); B. Fruto y follaje de *Pr. andina*; C. plántula de *Pr. andina*; D. Individuo adulto de *Pr. andina*.

## Capítulo II

# El enfriamiento del Neógeno afectó en forma diferencial a los géneros arbóreos del Bosque Templado Austral y del Bosque Montano de las Yungas

### II. 1. Resumen

Las formaciones del Bosque Templado Austral (BTA) de Argentina y Chile y el Bosque Montano de Yungas (BMY) de Argentina y Bolivia están distanciadas por aproximadamente 2000 km. Sin embargo, comparten numerosos componentes florísticos. Esta disyunción refleja una continuidad florística que se habría mantenido hasta el inicio del cambio geoclimático que dio origen a la diagonal árida Sudamericana. Los objetivos de este capítulo son conocer cómo se distribuyen los géneros de especies arbóreas en relación a la historia biogeográfica de las dos unidades boscosas donde habitan las especies de Podocarpaceae estudiadas en esta tesis. Se pone a prueba la hipótesis de que los eventos geoclimáticos del pasado ocurridos a distintas latitudes, afectaron diferencialmente a la flora del sur de Sudamérica en la composición relativa de elementos biogeográficos a nivel de géneros. Los géneros se ordenaron según siete elementos biogeográficos según su distribución geográfica a nivel mundial. Se identificaron en total 315 géneros de especies arbóreas. El 85% de éstos se encuentran en el BMY, el 8% están restringidos al BTA, y los restantes 7% están compartidos entre ambos bosques. Los elementos más abundantes fueron el Neotropical y Pantropical, principalmente distribuidos en el BMY, mientras que los elementos Endémico del bosque templado y Austral, fueron menos numerosos y más frecuentes en el BTA. Los géneros que son comunes presentan una mayor abundancia de especies en el BMY. Las diferencias apoyan las teorías de extinciones en el sur y permanencia de géneros en el BTA, y de una importante diversificación de géneros a latitudes tropicales y subtropicales. Los géneros que presentan disyunciones en una o más estructuras boscosas sudamericanas pueden ser evidencia de eventos de vicarianza y/o de dispersión. Las afinidades florísticas entre el BMY y el BTA permiten afirmar que, a lo largo de la historia del Cenozoico, las especies respondieron según sus características ecológicas a los diferentes efectos de los eventos geológicos y climáticos durante el Paleógeno, Neógeno y Cuaternario. Los cambios climáticos en las regiones subtropicales aparentemente favorecieron un

mayor grado de diversificación y especiación que en el sur, tanto de elementos Austral-Antárticos como Neotropicales.

## II. 2. Introducción

El sur de Sudamérica tiene actualmente una alta diversidad de climas, ambientes, biomas y biotas. Este mosaico complejo es el resultado de la interacción a lo largo del tiempo de las plantas y animales con los diferentes paleoclimas que se sucedieron y con las fuerzas geológicas, tales como movimientos de placas tectónicas, cambios en el nivel del mar, orogénias de cadenas montañosas y glaciaciones, que moldearon la geografía del continente Sudamericano. Las distribuciones actuales de las familias, géneros y especies de plantas están mayormente asociadas a los eventos que ocurrieron desde el Cretácico tardío hasta fines del Cenozoico. Durante la era Cenozoica (o Terciaria) la tierra experimentó grandes cambios climáticos, desde temperaturas elevadas generalizadas con los polos libres de hielo en el período Paleógeno, hasta períodos fríos en los polos, mayor aridez y grandes glaciaciones sobre los continentes a fines del Neógeno, que culminaron con las grandes oscilaciones climáticas del Cuaternario.

Muchas familias y géneros de plantas se han originado, se han extinguido localmente, o han quedado disyuntos en Sudamérica a raíz de los eventos geológicos y climáticos ocurridos desde el Paleógeno. Por lo tanto, el primer objetivo de este capítulo es conocer cómo se distribuyen los géneros de especies arbóreas de las dos unidades boscosas donde habitan las especies de Podocarpaceae estudiadas en esta tesis, el Bosque Templado Austral (BTA) y el Bosque Montano de las Yungas (BMY) (Fig. I. 2), en relación a su distribución geográfica actual. El segundo objetivo es comparar las floras de los géneros de especies arbóreas en relación a la historia biogeográfica de cada uno de estos dos bosques que formaban una unidad durante el Paleógeno y quedaron separados a partir del levantamiento de los Andes y la formación de la diagonal árida de los desiertos de América del Sur (Fig. I. 2) en el Neógeno (Solbrig 1978, Hinojosa y Villagrán 1997, Ruggiero y Ezcurra 2003).

Estos dos aspectos surgen como marco para entender y poder establecer relaciones entre las características de distribución geográfica y genéticas asociadas a las Podocarpaceae del sur de Sudamérica que ocurren en estos dos bosques distintos, el Bosque Templado Austral y el Bosque Montano de las Yungas. A continuación se describen los principales eventos geológicos y climáticos que afectaron estos bosques durante la era Cenozoica siguiendo la clasificación de la International Commission on Stratigraphy (ICS), enumerando los períodos (y épocas) Paleógeno (Paleoceno, Eoceno y Oligoceno), Neógeno (Mioceno y Plioceno), y Cuaternario (Pleistoceno y Holoceno) (Fig. II. 1).

### II. 3. Historia de los bosques del sur de Sudamérica

La historia de la flora actual de Sudamérica se remonta al Cretácico inferior a medio (aproximadamente 100 Ma. AP), cuando América del Sur y los demás territorios australes formaban parte del continente de Gondwana. Aunque en el Cretácico tardío ya se había separado de África, el extremo sur del continente Sudamericano se mantuvo conectado con Australia, Nueva Zelanda y Tasmania a través de la Antártida que se encontró libre de hielo hasta el final del Eoceno (40 - 45 Ma. AP) (Axelrod et al. 1991; Poulin et al. 2002; Birkenmajer et al. 2005). Las actuales similitudes florísticas del sur de Sudamérica con Australia y Nueva Zelanda son en parte evidencia de esta unión (e.g., Markgraf et al. 1995; van der Hammen y Hooghiemstra 2001; Ezcurra et al. 2008), aunque en algunos casos también pueden ser resultado de dispersión transoceánica a larga distancia en épocas posteriores, (e.g. Wardle et al. 2001, Ezcurra et al. 2008). Pero en general, al estar libre de hielo durante el Cretácico y principios del Cenozoico, la Antártida funcionó como un centro importante para el origen y la dispersión de gran parte de la flora y la fauna que hoy en día están disyuntas en distintos continentes australes (Poole et al. 2003).

## II. 3. 1 Paleógeno

### II. 3. 1. 1. Paleoceno

A principios del Paleoceno (Fig. II. 2A), una trasgresión Atlántica (mar de Salamanca) cubrió gran parte del sur de Sudamérica, desde Patagonia hasta Bolivia y norte de Perú. El mar dividió el continente entero en dos grandes regiones, una al noreste y otra al sureste, y esta barrera duró hasta el Eoceno medio (ver Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006).

Durante la transición Paleoceno-Eoceno la temperatura media era muy superior a la actual, por lo que las características climáticas de la Antártida eran de tipo subtropical (Hinojosa y Villagrán 1997, Poole et al. 2003). Esta condición climática está reflejada por la presencia de fósiles en la Antártida de taxa subtropicales como *Annona*, *Phoebe*, *Nectandra*, y taxa de afinidad subantártica como *Lomatia* y *Laurelia* (Markgraf et al. 1996; Hinojosa y Villagrán 1997, Poole et al. 2000). Durante esta época, muchos géneros tropicales se originaron y diversificaron en el continente sudamericano (Jaramillo et al. 2006).

### II. 3. 1. 2. Eoceno

La evidencia fósil del Eoceno indica que habría habido una alta diversidad de especies de plantas en el sur de Sudamérica (Wilf et al. 2003; Barreda y Palazzesi 2007; Iglesias et al. 2007). Durante el Eoceno temprano habrían ocurrido las máximas temperaturas a nivel global y el mar habría tenido altos niveles, lo que permitió que plantas con afinidades tropicales crecieran a altas latitudes (Arroyo et al. 1996; Villagrán y Hinojosa 1997; Jaramillo et al. 2006), incluso en la Patagonia, actualmente dominada por la estepa (Barreda y Palazzesi 2007). En Patagonia, la presencia combinada de palmas, cycas, araucarias, diversas podocarpáceas, *Nothofagus* y *Gymnostomata sp.* proveen evidencia de un clima estable con temperaturas de invierno más cálidas que 10°C, y abundantes precipitaciones. Esto último habría sido posible por la baja altitud que todavía tendría la Cordillera de los Andes (Wilf et al. 2003;

2005), determinando una historia compartida para la flora austral sobre las distintas vertientes de los Andes hasta aproximadamente el Mioceno (Troncoso 1997). La expansión hacia el norte de la Patagonia de elementos arbóreos como *Nothofagus* y Podocarpaceae se habría mantenido hasta el Oligoceno temprano, restringiéndose a las áreas que hoy ocupan en el BTA desde el Oligoceno tardío - Mioceno temprano (Barreda y Palazzesi 2007).

Las regresiones marinas locales incrementaron el área tropical (Uliana y Biddle 1988; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006), y éste podría ser uno de los factores que favorecieron el incremento de la diversidad local en Sudamérica durante el Eoceno (Jaramillo et al. 2006). En contraste, los eventos más fríos de finales de Eoceno y comienzos de Oligoceno redujeron las áreas tropicales drásticamente y junto con ello posiblemente ocurrieron extinciones masivas locales de especies tropicales en el sur de Sudamérica (Jaramillo et al. 2006). En Patagonia la flora mesotérmica (palmeras, Junglandaceae y Casuarinaceae, Aquifoliaceae, Tiliaceae-Bombacaceae, Sapindaceae) fue reemplazada por una flora microtérmica (*Nothofagus* y Podocarpaceae) (Barreda y Palazzesi 2007) indicando un marcado enfriamiento. En esta época se inició la glaciación de la Antártida (Birkenmajer et al. 2005), y en Patagonia la mayor continentalidad inició una estacionalidad pronunciada (Simpson 1983, Markgraf et al. 1996).

### II. 3. 1. 3. Oligoceno

Entre el límite Eoceno-Oligoceno, hace ca. 34 Ma., comenzó la separación de Australia y Antártida en el sur de Gondwana, evento que tuvo importantes consecuencias climáticas y oceánicas a nivel mundial. Como resultado se originó la corriente circumpolar antártica que provocó el inicio de las glaciaciones en la Antártida, la caída de la temperatura de las superficies oceánicas de 11-12° a 4-5°C (Markgraf et al. 1996; Hinojosa y Villagrán 1997) y el desarrollo de un marcado gradiente térmico entre el polo sur y el ecuador (Simpson 1983). En el sur de Sudamérica, estos cambios, junto con el pronunciado descenso del nivel del mar (Markgraf et al. 1996), desencadenaron el desplazamiento hacia menores latitudes de

las paleofloras Antárticas, predominando en Patagonia y Magallanes Pteridofitas, Podocarpaceae, Araucariaceae y *Nothofagus*, con un clima de carácter templado-frío y lluvioso.

## II. 3. 2. Neógeno

### II. 3. 2. 1. Mioceno

A comienzos del Mioceno (aproximadamente 22 Ma. A.P.) Sudamérica comenzó a separarse de la Antártida y hubo grandes ingresiones marinas, especialmente en la región este de Sudamérica. En Patagonia se definió una estacionalidad climática marcada (Tauber 1997).

En el Mioceno medio (12-14 Ma. A.P.) se formó el estrecho de Drake, finalizando de esta manera la separación entre Sudamérica y la Antártida, completándose la corriente circumantártica, y así resultó glaciado el sector este de la Antártida. La caída de la temperatura oceánica coincidió con episodios de intenso vulcanismo en el cinturón del Pacífico (Ramos y Kay 1992; Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006). Los cambios en la temperatura y las nuevas corrientes circumpolares trajeron aparejados el incremento de la glaciación Antártica y la formación de placas de hielo también en el oeste del continente antártico. Esto inició un ciclo de aridez y bajas temperaturas que incrementaron la estacionalidad y desarrollaron un clima más seco a medianas latitudes.

En el extremo sur del continente se estableció la flora subantártica debido al descenso de la temperatura, al mismo tiempo que los Andes comenzaron a elevarse y los vientos del oeste se fortalecieron, produciendo sombra de lluvias hacia el este y dando lugar a la formación de la diagonal árida de los desiertos sudamericanos (Solbrig 1978, Simpson 1983). La formación de la diagonal árida fragmentó las áreas de distribución de diversos grupos taxonómicos (Simpson 1983; Markgraf et al. 1995) y separó los bosques del sur de Sudamérica de los bosques tropicales sudamericanos (Hinojosa y Villagrán 1997; Barreda et al. 2002) (Fig. I. 2). Las actuales relaciones florísticas del Bosque Templado Austral con los bosques tropicales de las provincias

fitogeográficas de Yungas, Atlántica y Paranaense sugieren que las vinculaciones entre estos bosques persistieron hasta el Mioceno superior bajo (Hinojosa y Villagrán 1997).

En consecuencia con estos eventos geoclimáticos de fines del Mioceno en los Andes de Sudamérica, la flora templada austral-antártica se desplazó hacia el norte por las zonas montañosas, diversificándose y mezclándose en distintos grados con elementos neotropicales (Markgraf et al. 1996; van der Hammen y Hooghiemstra 2001; Ezcurra 2002, Meudt y Simpson 2006).

### II. 3. 2. 2. Plioceno

Durante el Plioceno (5-3 Ma. A.P.) (Fig. II. 1B) la cordillera de los Andes llegó a elevarse a sus alturas máximas, especialmente en el sector norte. Este evento determinó la creación de zonas con climas marcadamente diferentes, tanto en el gradiente latitudinal como en el longitudinal y altitudinal, encontrándose las primeras evidencias de flora Altoandina en los Andes del norte (van der Hammen y Hooghiemstra 2001). Una de las consecuencias de la elevación de los Andes entre los 22° y 27° S, fue el establecimiento de una barrera topográfica a la humedad de los vientos predominantes del noreste, que resultó en la formación de sombra de lluvias sobre las laderas occidentales de la cordillera (Reguero et al. 2007). Por el contrario, la cordillera de los Andes en Patagonia ya interceptaba los vientos predominantes del oeste, depositando la mayor cantidad de lluvias en las pendientes oeste (Arroyo et al. 1996).

Los períodos glaciarios e interglaciarios de fines del Plioceno produjeron variaciones en la temperatura. Esto provocó el desplazamiento altitudinal en la distribución de las especies en el BTA (Villagrán 2001) y en el bosque montano subtropical (Colinvaux 1998, Pennington et al. 2004) y afectó los procesos de especiación en el Neotrópico (van der Hammen y Hooghiemstra 2001). Este efecto se habrían extendido a través del Pleistoceno hasta el Holoceno (Richardson et al. 2001; Jaramillo et al. 2006). Por otro lado, en el sector austral de Sudamérica, los sucesivos períodos de avance y retroceso glaciarios que formaron placas de hielo sobre la cordillera de los Andes, también afectaron la distribución de numerosas especies con

distintas tolerancias a las bajas temperaturas (Markgraf et al. 1995, 1996; Arroyo et al. 1996). Si bien el área neotropical se caracteriza por una importante diversificación de elementos arbóreos, a latitudes templado-cálidas se observa un gran número de extinciones, no se registra adaptación, y se fragmentan y reducen los rangos de distribución a causa de una estacionalidad más marcada y reducción significativa de las lluvias (Markgraf et al. 1995). Además, contrariamente a lo que sucede en el trópico, en el sur del continente sobre el extremo oeste más húmedo, el registro fósil revela una historia distinta. No se observan especiaciones ni extinciones de especies arbóreas y se evidencia una ausencia relativa de evolución morfológica de los elementos australes. Esto indicaría una tolerancia a los cambios climáticos como lo sugieren por ejemplo los registros fósiles de Cunoniaceae (Poole et al. 2000), la falta de evidencia de cambios evolutivos en los últimos 3.5 millones de años en *Podocarpus* (Kershaw y McGlone 1995) y la falta de variabilidad morfológica y polínica en *Nothofagus* (Hill y Dettmann 1996).

Elementos de la flora Holártica también están presentes en la flora de Sudamérica. En particular, si bien Norteamérica y Sudamérica pudieron presentar algún tipo de intercambio florístico durante el Cretácico mediante dispersión a través de cadenas de islas, en general estuvieron separadas durante la mayor parte del Cenozoico. Recién a partir del Plioceno (hace aproximadamente 5 Ma.) la formación del istmo de Panamá permitió el intercambio de especies entre ellas (Gran Intercambio Biológico Americano, GABI en inglés, Richardson et al. 2001; van der Hammen y Hooghiemstra 2001). La cordillera de los Andes, que llegó a sus máximas elevaciones en este período, sirvió de puente templado-frío, posibilitando la extensión de géneros adaptados a bajas temperaturas presentes en América del Norte hacia el sur, y de géneros australes tolerantes al frío hacia el norte (Simpson 1983). No hay duda que acontecimientos como el cierre del Istmo de Panamá y el levantamiento de los Andes desempeñaron un papel importante en la configuración de patrones de biodiversidad neotropical (Bush y Hooghiemstra 2005). Por lo tanto, los efectos de los cambios paleogeográficos del Mioceno y Plioceno están relacionados con la formación de puentes y obstáculos a lo largo de América del Sur, modificando así la migración y

los patrones de aislamiento, y favoreciendo la dispersión y vicarianza (Coyne y Orr 2004).

### II. 3. 3. Cuaternario

Durante el Pleistoceno (1.8 M años AP- 11000 años AP) y Holoceno (11000 años AP hasta el presente) los ciclos de avance y retroceso glaciario se intensificaron y produjeron cambios de temperatura y una marcada y reiterada expansión y retracción de biomas áridos (savanas y estepas) y húmedos (bosquestemplados, tropicales y subtropicales) (Ortiz-Jaureguizar y Cladera 2006). Por ejemplo, durante los períodos fríos y secos los biomas de bosques, especialmente los tropicales y subtropicales, se contrajeron, resultando en una concomitante expansión e interconexión de los biomas abiertos (Arroyo et al. 1988). Durante períodos fríos del Cuaternario, los géneros de árboles adaptados al frío (microtérminos) presentes en regiones subtropicales montañosas pudieron expandir sus áreas hacia el norte y hacia regiones más bajas (Quiroga y Premoli 2007). Por el contrario, en latitudes australes, los elementos tolerantes al frío habrían sobrevivido localmente en áreas microclimatológicamente favorables (Markgraf et al. 1995). Estas áreas libres de hielo en las que los elementos boscosos tolerantes al frío sobrevivieron localmente conformaron refugios múltiples (Premoli 1994, 1998, Premoli et al. 2000a). Por otro lado, durante los períodos fríos se redujo el área de los géneros menos adaptados al frío (mesotérminos), los que se habrían refugiado hacia el norte en Patagonia (Villagrán 2001, et al. 2004) a uno y otro lado de la cordillera de los Andes (Marchelli y Gallo 2006).

### II. 4. Objetivo e hipótesis

Este capítulo tiene por finalidad conocer las relaciones florísticas que existen entre dos extensiones boscosas próximas, pero aisladas, dentro de las cuales crecen las especies que se estudian en esta tesis. Así, se realiza un análisis comparativo entre los géneros que componen la flora arbórea del Bosque Montano de las Yungas (BMY) y

del Bosque Templado Austral (BTA) a través de sus distribuciones geográficas actuales, en relación con los eventos geoclimáticos históricos que afectaron su distribución y diversificación. Las descripciones de cada uno de estos bosques se detallaron en la introducción general.

La hipótesis testeada es que los eventos geoclimáticos del pasado ocurridos a distintas latitudes afectaron diferencialmente la flora de Sudamérica en la composición relativa de elementos biogeográficos a nivel de géneros. Se espera que los géneros leñosos asociados a climas más fríos tengan una mayor proporción en el BTA, mientras que los géneros asociados a climas tropicales sean relativamente más abundantes en el BMY. Esto principalmente debido a los procesos de extinciones locales de géneros tropicales en el BTA durante la aridización y enfriamiento del Neógeno.

Para las especies se postula que las condiciones climáticas del Pleistoceno en el BMY del trópico y subtrópico de Sudamérica resultaron en la diversificación de especies leñosas tolerantes a climas fríos en zonas montañosas, favorecida durante los períodos glaciarios, mientras que en el sur prevaleció la permanencia de elementos tolerantes al frío durante los mismos períodos. Esta hipótesis de diversificación de elementos tolerantes a climas fríos en el trópico ha sido propuesta por Colinvaux (1998) y Pennington et al. (2004), y la permanencia local de elementos fríos en el sur ha sido registrada por varios autores (por ej. Markgraf et al. 1995, Barreda y Palazzesi 2007).

## II. 5. Áreas estudiadas

Los bosques comprendidos en esta comparación corresponden al Bosque Montano de las Yungas (BMY), acotado en esta comparación al centro y sur de Bolivia y noroeste de Argentina entre los 14°S y 27°S, y al Bosque Templado Austral (BTA) del suroeste de Sudamérica, entre los 35°S y 55°S (Fig. A). De esta manera, la comparación fue realizada a través de rangos latitudinales similares (aprox. 15° lat.). Estos bosques distan aproximadamente 2000 km y actualmente están separados por la diagonal árida

formada por los desiertos del Monte, Prepuna, Puna, Matorral Chileno, Pacífico y Patagonia (Cabrera y Willink 1973) donde las precipitaciones anuales son generalmente menores de 500 mm (Fig. II. 3).

## II. 6. Materiales y métodos

Se elaboró una lista de géneros con especies arbóreas de la flora del BTA y del BMY mediante recopilación bibliográfica a partir de las publicaciones de Digilio y Legname (1966), Legname (1982), Killeen et al. (1993), Prado (1995), Dimitri et al. (1997), Hoffmann (1997), Zuloaga y Morrone (1999a y b), Ezcurra y Brion (2005), y Aizen y Ezcurra (2008). Cada género fue asignado a una de las categorías de distribución o elementos fitogeográficos (Ulloa-Ulloa y Møller-Jorgensen 1993, Arroyo et al. 1996, Aizen y Ezcurra 1998) de acuerdo con la distribución geográfica actual a nivel mundial de los géneros (Mabberley 1990; Arroyo et al. 1996; Aizen y Ezcurra 1998). Estas son:

- Austral (AU) presente en bosques templados de América del Sur y otros continentes del Hemisferio Sur, como por ejemplo Australia y Nueva Zelanda
- Andino (AD) presente en los Andes
- Cosmopolita (C) presente en la mayoría de los continentes
- Endémico (E) restringido al bosque templado del sur de Sudamérica
- Holártico o Boreal (H), la mayor diversidad de especies en áreas templadas del hemisferio norte, pero a veces se extienden a áreas montañosas frías y elevadas como los Andes en el Hemisferio Sur
- Neotropical (N) en áreas tropicales y subtropicales de América
- Pantropical (P) en los trópicos de América, y de Asia y/o África.

Se asume que estas categorías están relacionadas con la posible área de origen de un taxón dado (e.g., Simpson y Todzia 1990, Armesto y Vidiela 1993, Ulloa-Ulloa y Møller-Jorgensen 1993, Arroyo et al. 1996, Aizen y Ezcurra 1998). En general, una

distribución Austral está considerada como posible evidencia de un origen remoto en Gondwana, mientras que una distribución Holártica se toma como evidencia de origen en el Hemisferio Norte. Esta relación entre la distribución actual y el área de origen en varios casos se ha verificado con fósiles y/o filogenias a partir de datos moleculares, aunque puede haber excepciones (ver por ej. Morrone y Crisci 1995, Wardle et al. 2001). Las especies de géneros cosmopolitas, holárticos y australes en general tienden a tolerar climas más fríos característicos de su área de origen debido a conservación de nicho a través de la filogenia (concepto de "Phylogenetic niche conservatism", PNC: Wiens y Donoghue 2004, Wiens y Graham 2005).

## II. 6. 1. Análisis de los datos

Se analizaron las proporciones de las distintas categorías de distribución geográfica de los géneros en cada bosque mediante un test G de independencia (Sokal y Rohlf 1981) para determinar si las mismas proporciones entre categorías se mantienen entre los dos bosques. Además se analizó si hay diferencias entre las proporciones de los géneros "cálidos" (E, N, P) y los "templados" (AU, AD, C, H) entre los bosques mediante un test G, bajo la hipótesis de que el mayor enfriamiento en el sur habría filtrado y extinguido localmente a los géneros cálidos. Se considera a los géneros del elemento endémico del BTA como cálidos a pesar de tener algunos con especies tolerantes al frío como las Cupressaceae *Fitzroya* y *Pilgerodendron* (Premoli et al. 2000b y 2002), porque en su mayoría tienen una distribución limitada a las áreas del norte del BTA y a bajas altitudes.

## II. 7. Resultados

Se identificaron un total de 315 géneros con especies arbóreas, distribuyéndose 288 en el BMY, 48 en el BTA, y 21 que son compartidos por ambos bosques (Tabla II. 1, Apéndice I). Los elementos con mayor número de géneros en el BMY fueron los de distribución Neotropical y Pantropical, mientras que los géneros Endémicos del BTA y

Australes dominan en el BTA (Tabla II. 1). Las diferencias en las proporciones de géneros de diferentes elementos son estadísticamente significativas entre los dos bosques ( $G = 146$ ,  $p < 0.0001$ ).

Tabla II. 1: Cantidad de géneros según su distribución geográfica, que se encuentran en el sur del Bosque Montano de las Yungas y/o en el Bosque Templado Austral de América del Sur. BMY: Bosque Montano de las Yungas, BTA: Bosque Templado Austral, AU: Austral, AD: Andino, C: Cosmopolita, E: Endémico, H: Boreal u Holártico, N: Neotropical, P: Pantropical. Termofilia: T: templado, C: cálido.

Elementos	Termofilia	BMY	Comunes	BTA
AD	T	9	0	0
AU	T	2	3	12
C	T	1	0	0
E	C	0	0	13
H	T	10	3	0
N	C	190	11	2
P	C	54	4	0
S/D		3	0	0
Total		267	21	27

La mayor cantidad de géneros compartidos corresponden al elemento Neotropical, y estos 11 géneros representan el 5% del total de los géneros de este elemento (Tabla II. 1). En cantidad de géneros comunes le siguen los Pantropicales, estos cuatro géneros representan el 6% del total de los géneros Pantropicales y son el aporte total de este elemento al BTA. Lo mismo ocurre con los tres géneros Holárticos compartidos (30%). Los tres géneros Australes compartidos representan el 17% del total.

La diferencia en la proporción de especies de distintos elementos de los géneros que son comunes resultó estadísticamente significativa entre los dos bosques ( $G = 26$ ,  $p < 0.0001$ ) (Tabla II. 2). Los tres géneros Australes comunes están representados por 31 especies en total, 26 especies se distribuyen en el BMY y cinco en el BTA. Las especies de los géneros Holárticos compartidos son en total dos. Las especies de los géneros tropicales compartidos se encuentran mayoritariamente en el BMY, sin embargo, el 47% de las especies de géneros Neotropicales comunes y el 45% de especies de géneros Pantropicales comunes están en el BTA. Una especie Holártica

(*Salix humboldtiana*), una Neotropical (*Desfontainia spinosa*) y una Pantropical (*Maytenus boaria*) son comunes a ambos bosques dentro de las áreas comparadas.

Tabla II. 2: Cantidad de especies de géneros exclusivos y comunes a ambos bosques. BMY: Bosque Montano de las Yungas, BTA: Bosque Templado Austral, AU: Austral, H: Boreal u Holártico, N: Neotropical, P: Pantropical.

	BMY	Comunes	BTA
AU	26	0	5
H	0	1	1
N	34	1	16
P	21	1	6

En el BTA, un alto porcentaje de los géneros Endémicos pertenecen a familias con distribución exclusivamente presente en el Hemisferio Sur como *Aextoxicon* (Aextoxicaceae), *Embothrium* (Proteaceae), *Gomortega* (Gomortegaceae) y *Laureliopsis* (Monimiaceae), o Pantropicales, como las Myrtaceae. También hay especies que son endémicas y que pertenecen a géneros monoespecíficos, como el caso de *Austrocedrus* (Cupressaceae), *Fitzroya* (Cupressaceae), *Pilgerodendron* (Cupressaceae), *Saxegothaea* (Podocarpaceae), *Aextoxicon* (Aextoxicaceae) y *Gomortega* (Gomortegaceae).

Existen diferencias significativas entre las proporciones de géneros “templados” y “cálidos” entre bosques ( $G = 21.02$ ,  $p < 0.0001$ ). En el BMY hay un total de 28 géneros templados y 259 géneros cálidos, mientras que en el BTA hay 18 y 30, respectivamente.

## II. 8. Discusión

La comparación de géneros arbóreos entre dos áreas boscosas próximas dentro de Sudamérica, realizada en un rango latitudinal total similar (aprox. 15° lat.), evidencia un patrón claro para el BMY, donde se ha detectado un alto porcentaje de géneros Neotropicales y Pantropicales. La gran cantidad de géneros Neotropicales puede ser evidencia de la separación continental temprana de Sudamérica y África,

que favoreció la diversificación y especiación en aislamiento de una flora cálida propia de Sudamérica. Posiblemente esto se inició en las primeras etapas del Eoceno, donde los registros fósiles de la flora indican una alta diversidad de plantas en todo el continente sudamericano (Jaramillo et al. 2006), incluido el norte de Patagonia (Wilf et al. 2003, 2005; Hinojosa y Villagrán 1997 según registros a una latitud de 42°S). Además, las grandes regiones expuestas por las regresiones marinas del Eoceno, podrían haber soportado más especies, aumentando la diversidad local y regional, y reduciendo el riesgo de extinción por el incremento de las oportunidades de nicho (Leigh et al. 2004). Los procesos de diversificación y especiación de géneros tropicales en el BMY habrían continuado durante todo el Neogeno hasta el Pleistoceno (Rull 2008), cuando fueron favorecidos por la alternancia de períodos fríos y cálidos, resultando en radiaciones y especiación alopátrica/paratátrica (Colinvaux 1998; Pennington et al. 2004; Rull 2005).

En el BTA, se manifiesta un alto porcentaje de Endemismos y de elementos Australes. Sin embargo, dentro de los Endemismos hay algunos géneros (e.g. *Pilgerodendron*, *Austrocedrus*, *Fitzroya*, *Amomyrtus*, *Luma* y *Tepualia*) pertenecientes a familias Pantropicales (Cupressaceae y Myrtaceae) y/o con preferencia a climas templado-cálidos dentro del BTA (*Aextoxicon*, *Gomortega*, *Saxegothea* y *Orites*), los cuales podrían ser relictos de linajes con más especies y más extendidos en el Paleógeno, que fueron reducidos (Francois 2004) por el enfriamiento y aridización del Neógeno; o bien sus características de tolerancia ecológicas les permitieron resistir a los cambios climáticos del Neógeno sin sufrir profundos cambios morfológicos ni evolutivos. Por esta razón, muchos de los elementos Endémicos son monoespecíficos o están representados por pocas especies. Además, el no tener representantes en otros continentes, podría deberse a que Australia se desplazó relativamente más al norte que Sudamérica durante la separación de Gondwana, Nueva Zelanda sufrió grandes intrusiones marinas, y posteriormente la Antártida se cubrió de hielo por completo. Esto provocó la extinción, en los continentes australes no Sudamericanos, de muchos géneros que eran comunes (Markgraf et al. 1995). Sudamérica templada se mantuvo relativamente en la misma latitud durante los procesos de deriva continental (sólo se

desplazó 10° de latitud hacia el norte). Esto explicaría las bajas tasas de extinción y diversificación durante el Paleógeno sugeridas por el registro fósil (Markgraf et al. 1995), beneficiando el establecimiento de un elemento Endémico a nivel de géneros y familias (e.g. Aextoxicaceae, Gomortegaceae).

Ciertos géneros, tanto Australes como Neotropicales, podrían haberse distribuido ampliamente en el sur de Sudamérica (Hinojosa y Villagrán 1997). Estos se habrían favorecido por la estabilidad climática del Paleógeno, como lo evidencian fósiles de paleofloras tropicales de la región central de Chile. Allí se registra la presencia de *Nectandra*, *Cinnamomum* y *Persea* y algunos géneros de las familias Myrtaceae, Sapindaceae y Anacardiaceae, que también se encuentran en otras formaciones más australes con paleofloras mixtas (ver Gayó et al. 2005). Sin embargo, los eventos geológicos y climáticos del Neógeno, como las sucesivas intrusiones marinas, el levantamiento de la cordillera de los Andes, y la formación de la diagonal árida, determinaron su extinción en gran parte de la Patagonia y su distribución actual disyunta. Esto puede observarse en la distribución fragmentada de géneros compartidos entre el sur del BMY y el BTA como *Azara*, *Blepharocalyx*, *Buddleja*, *Crinodendron*, *Dasyphyllum*, *Desfontainia*, *Escallonia*, *Lepidothamnus*, *Myrteola*, *Prumnopitys* y *Podocarpus*. También existen géneros compartidos entre el BTA con la Mata Atlántica, como por ejemplo *Araucaria*, *Coriaria*, *Drymis*, *Griselinia*, *Lomatia*, *Myrceugenia*, *Podocarpus*, *Rhaphithamnus* y *Ugni* entre otros (Arroyo et al. 1996, Villagrán y Hinojosa 1997).

Los géneros que presentan disyunciones en una o más estructuras boscosas sudamericanas pueden ser evidencia de eventos de vicarianza, y/o de dispersión temprana. Esta última fue propuesta para el género *Podocarpus*, el cual habría utilizado las incipientes montañas de la actual Cordillera de los Andes para migrar desde el sur al norte de Sudamérica durante ciertos períodos del Eoceno (van der Hammen y Hooghiemstra 2001). Otros géneros Austral-Antárticos, que pudieron migrar hacia el norte a través de los Andes cuando éstos se elevaron (e.g., van der Hammen y Hooghiemstra 2001; Ezcurra 2002; Doan 2003; Meudt y Simpson 2006), también habrían tenido oportunidad de dispersarse y diversificarse por disponer de una

superficie relativamente extensa y condiciones ambientales heterogéneas en el subtropical en comparación con el extremo sur.

Las condiciones climáticas del Plioceno y Pleistoceno afectaron diferencialmente a las especies en cuanto a su distribución altitudinal. Los géneros Australes presentes en el BMY y en otras selvas de montaña tropicales, podrían haber permanecido a bajas latitudes durante el Plioceno y Pleistoceno sorteando los cambios climáticos, desplazándose en altitud según la alternancia de períodos cálidos y fríos. Así Pennington y colaboradores (2004) postulan que los desplazamientos altitudinales observados en elementos que actualmente se encuentran en zonas montañosas tropicales y subtropicales evidenciarían la diversificación de las especies tolerantes al frío en las zonas bajas durante períodos fríos. Esto juntamente al aislamiento en refugios de las especies cálidas durante dichos períodos, habría contribuido a la elevada diversidad actual observada a latitudes bajas. Por esta razón, bajo las condiciones cálidas actuales, las especies tolerantes al frío se encuentran en zonas elevadas y presentan distribuciones naturalmente fragmentadas por su afinidad a zonas montañosas. Este puede ser el caso de las Podocarpaceae, donde el género *Podocarpus* presenta relativamente mayor número de especies a latitudes subtropicales y tropicales respecto de las latitudes australes (7 y 2 especies, respectivamente). También, el género *Prumnopitys*, de la misma familia, presenta un mayor número de especies en las Yungas de Bolivia, Perú y Ecuador en comparación con la única especie presente en el BTA.

Muchos géneros tropicales también se habrían diversificado en el Neotrópico a fines del Neogeno, como el caso de las numerosas especies del género *Inga* (Richardson et al. 2001), y estas diversificaciones habrían ocurrido hace relativamente poco tiempo, entre 10 y 2 millones de años, favorecida por el tectonismo que dio lugar al levantamiento de la cordillera de los Andes, el intercambio de especies que permitió el istmo de Panamá, y la inestabilidad climática del Pleistoceno (Gentry 1982, Richardson et al. 2001).

De manera contraria, los géneros Neotropicales arbóreos presentes en latitudes altas no habrían sido capaces de sortear los cambios climáticos del Pleistoceno, y se

vieron imposibilitados de migrar hacia el sur o sobrevivir localmente (Gayó et al . 2005) debido al enfriamiento y a la aridización que aisló a las regiones boscosas australes.

La presencia de géneros Holárticos en el BMY y en el BTA parece tratarse de eventos de dispersión que habrían ocurrido a lo largo de la cordillera de los Andes que llegó a su máxima extensión y altitud a fines del Neógeno, luego de la unión de América del Norte y Central con América del Sur (Simpson 1983; Simpson y Todzia 1990). La existencia de un mayor número de géneros Holárticos en el BMY que en el BTA sugiere que la barrera de la diagonal árida filtró este elemento templado en su avance hacia el sur, o bien que el tiempo transcurrido no fue suficiente para sortear las barreras geológicas y climáticas y permitir que estos géneros se distribuyan a mayores latitudes.

Una especie perteneciente al elemento Holártico, una al Neotropical y una al Pantropical son comunes a ambos bosques dentro de las áreas comparadas. Evidentemente, las especies que son comunes a ambos bosques, deben haber tenido una distribución amplia previamente a la formación del desierto, un eficiente sistema de dispersión a larga distancia, o capacidad de utilizar posibles corredores sobre la cordillera de los Andes. Estas hipótesis pueden ser analizadas y testeadas en trabajos futuros mediante el uso de marcadores moleculares y estimaciones de los tiempos de divergencia de las poblaciones a ambos lados de la diagonal árida.

Las afinidades florísticas entre el BMY y el BTA analizadas en cuanto a sus géneros arbóreos compartidos, permiten afirmar que a lo largo de la historia las especies congéneres que tienen un origen filogenético común respondieron acorde a sus características ecológicas a los efectos de los eventos geológicos y climáticos durante el Neógeno y Cuaternario. Por ejemplo, los cambios climáticos en las regiones subtropicales favorecieron un mayor grado de diversificación y especiación, tanto de elementos Austral-antárticos como Neotropicales.

Los eventos geoclimáticos del pasado ocurridos a distintas latitudes también afectaron diferencialmente la diversidad de especies de la flora de Sudamérica en la composición relativa de elementos biogeográficos a nivel de géneros. Los géneros

leñosos asociados a climas más fríos tienen una mayor proporción en el BTA, mientras que los géneros asociados a climas tropicales son relativamente más abundantes en el BMY. Esto principalmente debido a los procesos de extinciones locales de géneros tropicales en el BTA durante la aridización y enfriamiento del Neógeno (Hinojosa y Villagrán 1997). La hipótesis de diversificación de elementos tolerantes a climas fríos en el trópico ha sido propuesta por Colinvaux (1998) y Pennington et al. (2004), y la permanencia local de elementos fríos en el sur ha sido registrada por varios autores (por ej. Markgraf et al. 1995, Barreda y Palazzesi 2007). En el capítulo V se analiza si las diferencias en la diversificación-permanencia que se observa entre los géneros de la flora también ocurre a nivel de variación y diversidad genética entre especies de *Podocarpus* presentes en ambos bosques.

**8. Apéndice II. 1:** Lista de familias y géneros de especies arbóreas del Bosque Montano de las Yungas (BMY) y del Bosque Templado Austral (BTA), donde se indica para cada uno el elemento al cual corresponde según su distribución geográfica actual a nivel mundial, y el bosque en el que se encuentra. BMY: Bosque Montano de las Yungas, BTA: Bosque Templado Austral, AU: Austral, AD: Andino, C: Cosmopolita, E: Endémico, H: Holártico o Boreal, N: Neotropical, P: Pantropical.

Familia	Género	Elemento biogeográfico	Distribución del género
Achatocarpaceae	<i>Achatocarpus</i>	N	BMY
Actinidaceae	<i>Saurauia</i>	N	BMY
Aextoxicaceae	<i>Aextoxicon</i>	E	BTA
Agavaceae	<i>Cordyline</i>	P	BMY
Agavaceae	<i>Furcraea</i>	N	BMY
Anacardiaceae	<i>Astronium</i>	N	BMY
Anacardiaceae	<i>Cardenasiodendron</i>	N	BMY
Anacardiaceae	<i>Lithrea</i>	N	Común
Anacardiaceae	<i>Loxopterygium</i>	N	BMY
Anacardiaceae	<i>Mauria</i>	AD	BMY
Anacardiaceae	<i>Schinopsis</i>	N	BMY
Anacardiaceae	<i>Schinus</i>	N	Común
Anacardiaceae	<i>Tapirira</i>	N	BMY
Anacardiaceae	<i>Toxicodendron</i> = <i>Rhus</i>	H	BMY
Annonaceae	<i>Annona</i>	P	BMY
Annonaceae	<i>Crematosperma</i>	N	BMY
Annonaceae	<i>Duguetia</i>	N	BMY
Annonaceae	<i>Guatteria</i>	N	BMY
Annonaceae	<i>Rollinia</i>	N	BMY
Annonaceae	<i>Unonopsis</i>	N	BMY
Apocynaceae	<i>Rauvolfia</i>	P	BMY
Apocynaceae	<i>Stemmadenia</i>	N	BMY
Aquifoliaceae	<i>Ilex</i>	P	BMY
Araliaceae	<i>Dendropanax</i>	P	BMY
Araliaceae	<i>Didymopanax</i>	N	BMY
Araliaceae	<i>Oreopanax</i>	N	BMY
Araliaceae	<i>Pseudopanax</i>	AU	BTA
Araliaceae	<i>Schefflera</i>	P	BMY
Araucariaceae	<i>Araucaria</i>	AU	BTA
Astereaceae	<i>Ageratina</i>	N	BMY
Astereaceae	<i>Cnicothamnus</i>	N	BMY
Astereaceae	<i>Dasyphyllum</i>	N	Común
Astereaceae	<i>Eupatorium</i>	P	BMY
Astereaceae	<i>Gynoxys</i>	N	BMY
Astereaceae	<i>Tessaria</i>	N	BMY
Betulaceae	<i>Alnus</i>	H	BMY

Bignoniaceae	<i>Jacaranda</i>	N	BMY
Bignoniaceae	<i>Tabebuia</i>	N	BMY
Bignoniaceae	<i>Tecoma</i>	N	BMY
Bixaceae	<i>Bixa</i>	N	BMY
Bombacaceae	<i>Bombacopsis</i>	N	BMY
Bombacaceae	<i>Cavanillesia</i>	N	BMY
Bombacaceae	<i>Ceiba</i>	P	BMY
Bombacaceae	<i>Eriotheca</i>	N	BMY
Bombacaceae	<i>Pseudobombax</i>	N	BMY
Boraginaceae	<i>Cordia</i>	N	BMY
Boraginaceae	<i>Patagonula</i>	N	BMY
Boraginaceae	<i>Saccolium</i>	N	BMY
Brunelliaceae	<i>Brunellia</i>	N	BMY
Buddlejaceae	<i>Buddleja</i>	P	Común
Burseraceae	<i>Dacryodes</i>	P	BMY
Burseraceae	<i>Protium</i>	P	BMY
Burseraceae	<i>Trattinnickia</i>	N	BMY
Buxaceae	<i>Styloceras</i>	N	BMY
Capparaceae	<i>Capparis</i>	P	BMY
Capparaceae	<i>Cleome</i>	P	BMY
Capparaceae	<i>Koeberlinia</i>	H	BMY
Caprifoliaceae	<i>Sambucus</i>	H	BMY
Caprifoliaceae	<i>Viburnum</i>	H	BMY
Caricaceae	<i>Carica</i>	N	BMY
Caricaceae	<i>Jacaratia</i>	N	BMY
Celastraceae	<i>Maytenus</i>	P	Común
Celastraceae	<i>Perottetia</i>	N	BMY
Chloranthaceae	<i>Hedyosmum</i>	N	BMY
Chrysobalanaceae	<i>Hirtella</i>	P	BMY
Chrysobalanaceae	<i>Licania</i>	N	BMY
Chrysobalanaceae	<i>Parinari</i>	P	BMY
Clethraceae	<i>Clethra</i>	P	BMY
Combretaceae	<i>Buchenavia</i>	N	BMY
Combretaceae	<i>Terminalia</i>	P	BMY
Cornaceae	<i>Cornus</i>	H	BMY
Cunoniaceae	<i>Caldcluvia</i>	AU	BTA
Cunoniaceae	<i>Weinmannia</i>	AU	Común
Cupresaceae	<i>Pilgerodendron</i>	E	BTA
Cupressaceae	<i>Austrocedrus</i>	E	BTA
Cupressaceae	<i>Fitzroya</i>	E	BTA
Desfontainiaceae*	<i>Desfontainia</i>	N	Común
Dichapetalaceae	<i>Tapura</i>	N	BMY
Elaeocarpaceae	<i>Aristotelia</i>	AU	BTA
Elaeocarpaceae	<i>Crinodendron</i>	N	Común
Elaeocarpaceae	<i>Mutingia</i>	N	BMY

Elaeocarpaceae	<i>Sloanea</i>	S/D	BMY
Elaeocarpaceae	<i>Vallea</i>	N	BMY
Ericaceae	<i>Agarista</i>	N	BMY
Ericaceae	<i>Befaria</i>	H	BMY
Ericaceae	<i>Cavendishia</i>	N	BMY
Ericaceae	<i>Diogenesia</i>	N	BMY
Ericaceae	<i>Psammisia</i>	N	BMY
Erythroxylaceae	<i>Erythroxylum</i>	N	BMY
Escalloniaceae	<i>Escallonia</i>	N	Común
Eucryphiaceae	<i>Eucryphia</i>	AU	BTA
Euphorbiaceae	<i>Acalypha</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Alchornea</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Chaetocarpus</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Cleidion</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Croton</i>	C	BMY
Euphorbiaceae	<i>Drypetes</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Hura</i>	N	BMY
Euphorbiaceae	<i>Hyeronima</i>	N	BMY
Euphorbiaceae	<i>Jatropha</i>	N	BMY
Euphorbiaceae	<i>Mabea</i>	N	BMY
Euphorbiaceae	<i>Manihot</i>	N	BMY
Euphorbiaceae	<i>Sapium</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Sebastiania</i>	P	BMY
Euphorbiaceae	<i>Stillingia</i>	N	BMY
Euphorbiaceae	<i>Tetrochidium</i>	N	BMY
Fabaceae	<i>Bauhinia</i>	P	BMY
Caesalpinioideae			
Fabaceae	<i>Pterogyne</i>	N	BMY
Caesalpinioideae			
Fabaceae	<i>Schizolobium</i>	N	BMY
Caesalpinioideae			
Fabaceae	<i>Senna</i>	P	Común
Caesalpinioideae			
Fabaceae Mimosoideae	<i>Acacia</i>	P	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Albizia</i>	P	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Anadenantera</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Calliandra</i>	AU	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Chloroleucon</i>	S/D	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Enterolobium</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Inga</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Mimosa</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Parapiptadenia</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Piptadenia</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Pithecellobium</i>	N	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Prosopis</i>	P	BMY
Fabaceae Mimosoideae	<i>Samanea = Albizia</i>	P	BMY

Fabaceae Papilionoideae	<i>Amburana</i>	N	BMY
Fabaceae Papilionoideae	<i>Erythrina</i>	P	BMY
Fabaceae Papilionoideae	<i>Lonchocarpus</i>	P	BMY
Fabaceae Papilionoideae	<i>Machaerium</i>	N	BMY
Fabaceae Papilionoideae	<i>Myroxylon</i>	N	BMY
Fabaceae Papilionoideae	<i>Ormosia</i>	AU	BMY
Fabaceae Papilionoideae	<i>Sophora</i>	AU	BTA
Fabaceae Papilionoideae	<i>Tipuana</i>	N	BMY
Fagaceae	<i>Nothofagus</i>	AU	BTA
Flacourtiaceae	<i>Azara</i>	N	Común
Flacourtiaceae	<i>Casearia</i>	P	BMY
Flacourtiaceae	<i>Hasseltia</i>	N	BMY
Flacourtiaceae	<i>Prockia</i>	N	BMY
Flacourtiaceae	<i>Xylosma</i>	P	BMY
Gomortegaceae	<i>Gomortega</i>	E	BTA
Guttiferaceae	<i>Chrysochlamys</i>	N	BMY
Guttiferaceae	<i>Clusia</i>	N	BMY
Guttiferaceae	<i>Havetiopsis</i>	N	BMY
Guttiferaceae	<i>Symphonia</i>	S/D	BMY
Guttiferaceae	<i>Tovomita</i>	N	BMY
Guttiferaceae	<i>Vismia</i>	N	BMY
Humiriaceae	<i>Humiriastrum</i>	N	BMY
Humiriaceae	<i>Vantanea</i>	N	BMY
Icacinaceae	<i>Citronella</i>	N	Común
Icacinaceae	<i>Dendrobangia</i>	N	BMY
Juglandaceae	<i>Juglans</i>	H	BMY
Lauraceae	<i>Aniba</i>	N	BMY
Lauraceae	<i>Cinnamomum</i>	P	BMY
Lauraceae	<i>Endlicheria</i>	N	BMY
Lauraceae	<i>Licaria</i>	N	BMY
Lauraceae	<i>Nectandra</i>	N	BMY
Lauraceae	<i>Ocotea</i>	N	BMY
Lauraceae	<i>Persea</i>	P	Común
Lauraceae	<i>Rhodostemonodaphne</i>	N	BMY
Lecythidaceae	<i>Cariniana</i>	N	BMY
Linaceae	<i>Roucheria</i>	N	BMY
Loganiaceae	<i>Peltanthera</i>	N	BMY
Lythraceae	<i>Lafoensia</i>	N	BMY
Malpighiaceae	<i>Byrsonima</i>	N	BMY
Malvaceae	<i>Tarasa</i>	AD	BMY
Melastomataceae	<i>Axinaea</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Bellucia</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Blakea</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Brachyotum</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Graffenrieda</i>	N	BMY

Melastomataceae	<i>Loreya</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Meriania</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Miconia</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Tococa</i>	N	BMY
Melastomataceae	<i>Topobea</i>	N	BMY
Meliaceae	<i>Cabrlea</i>	N	BMY
Meliaceae	<i>Cedrela</i>	N	BMY
Meliaceae	<i>Guarea</i>	N	BMY
Meliaceae	<i>Ruagea</i>	N	BMY
Meliaceae	<i>Trichilia</i>	P	BMY
Monimiaceae	<i>Laurelia</i>	AU	BTA
Monimiaceae	<i>Laureliopsis</i>	E	BTA
Monimiaceae	<i>Mollinedia</i>	N	BMY
Monimiaceae	<i>Siparuna</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Cecropia</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Clariasia</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Coussapoa</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Ficus</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Maclura</i>	P	BMY
Moraceae	<i>Morus</i>	P	BMY
Moraceae	<i>Perebea</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Poulsenia</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Pourouma</i>	N	BMY
Moraceae	<i>Pseudolmedia</i>	N	BMY
Myricaceae	<i>Myrica</i>	N	BMY
Myristicaceae	<i>Virola</i>	N	BMY
Myrsinaceae	<i>Ardisia</i>	P	BMY
Myrsinaceae	<i>Cybianthus</i>	N	BMY
Myrsinaceae	<i>Geissanthus</i>	AD	BMY
Myrsinaceae	<i>Myrsine</i>	N	BMY
Myrsinaceae	<i>Stylogyne</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Amomyrtella</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Amomyrtus</i>	E	BTA
Myrtaceae	<i>Blepharocalyx</i>	N	Común
Myrtaceae	<i>Calyptranthes</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Eugenia</i>	P	BMY
Myrtaceae	<i>Gomidesia</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Luma</i>	E	BTA
Myrtaceae	<i>Myrceugenia</i>	N	BTA
Myrtaceae	<i>Myrcianthes</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Myrciaria</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Myrteola</i>	N	Común
Myrtaceae	<i>Paramyrciaria</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Siphoneugenia</i>	N	BMY
Myrtaceae	<i>Tepualia</i>	E	BTA

Nyctaginaceae	<i>Bougainvillea</i>	N	BMY
Nyctaginaceae	<i>Neea</i>	N	BMY
Nyctaginaceae	<i>Pisonia</i>	N	BMY
Nyctaginaceae	<i>Reichenbachia</i>	N	BMY
Ochnaceae	<i>Cespedesia</i>	N	BMY
Ochnaceae	<i>Ouratea</i>	P	BMY
Olacaceae	<i>Ximenia</i>	P	BMY
Palmae	<i>Trithrinax</i>	N	BMY
Papaveraceae	<i>Bocconia</i>	N	BMY
Phytolaccaceae	<i>Gallesia</i>	N	BMY
Piperaceae	<i>Piper</i>	P	BMY
Podocarpaceae	<i>Lepidothamnus</i>	AU	BTA
Podocarpaceae	<i>Podocarpus</i>	AU	Común
Podocarpaceae	<i>Prumnopitys</i>	AU	Común
Podocarpaceae	<i>Saxe-gothaea</i>	E	BTA
Polygonaceae	<i>Coccoloba</i>	N	BMY
Polygonaceae	<i>Ruprechtia</i>	N	BMY
Polygonaceae	<i>Triplaris</i>	N	BMY
Proteaceae	<i>Embothrium</i>	E	BTA
Proteaceae	<i>Gevuina</i>	AU	BTA
Proteaceae	<i>Lomatia</i>	AU	BTA
Proteaceae	<i>Orites</i>	E	BTA
Proteaceae	<i>Panopsis</i>	N	BMY
Proteaceae	<i>Roupala</i>	N	BMY
Quiinaceae	<i>Quiina</i>	N	BMY
Rhamnaceae	<i>Condalia</i>	N	BMY
Rhamnaceae	<i>Discaria</i>	AU	BTA
Rhamnaceae	<i>Rhamnus</i>	H	BMY
Rhamnaceae	<i>Scutia</i>	N	BMY
Rosaceae	<i>Hesperomeles</i>	N	BMY
Rosaceae	<i>Kaganeckia</i>	AD	BMY
Rosaceae	<i>Polylepis</i>	AD	BMY
Rosaceae	<i>Prunus</i>	H	BMY
Rubiaceae	<i>Amaioua</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Bathysa</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Calycophyllum</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Chimarrhis</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Cinchona</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Cosmibuena</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Coussarea</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Coutarea</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Elaeagia</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Faramea</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Ferdinandusa</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Guettarda</i>	N	BMY

Rubiaceae	<i>Isertia</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Ladenbergia</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Macricnemum</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Palicourea</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Pogonopus</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Posoqueria</i>	N	BMY
Rubiaceae	<i>Psychotria</i>	P	BMY
Rubiaceae	<i>Randia</i>	P	BMY
Rutaceae	<i>Angostura</i>	N	BMY
Rutaceae	<i>Dictyloma</i>	N	BMY
Rutaceae	<i>Fagara</i>	P	BMY
Rutaceae	<i>Galipea</i>	N	BMY
Rutaceae	<i>Zanthoxylum</i>	P	BMY
Sabiaceae	<i>Meliosma</i>	P	BMY
Salicaceae	<i>Salix</i>	H	Común
Santalaceae	<i>Acanthosyris</i>	N	BMY
Santalaceae	<i>Cervantesia</i>	AD	BMY
Sapindaceae	<i>Allophylus</i>	P	BMY
Sapindaceae	<i>Cupania</i>	N	BMY
Sapotaceae	<i>Chrysophyllum</i>	P	BMY
Sapotaceae	<i>Micropholis</i>	N	BMY
Sapotaceae	<i>Pouteria</i>	P	BMY
Simaroubaceae	<i>Picraminia</i>	N	BMY
Simarubaceae	<i>Alvaradoa</i>	N	BMY
Solanaceae	<i>Dunalia</i>	N	BMY
Solanaceae	<i>Ichroma</i>	N	BMY
Solanaceae	<i>Sessea</i>	AD	BMY
Solanaceae	<i>Solanum</i>	N	Común
Solanaceae	<i>Vassobia</i>	N	BMY
Sterculiaceae	<i>Guazuma</i>	N	BMY
Sterculiaceae	<i>Helicteres</i>	P	BMY
Styracaceae	<i>Styrax</i>	N	BMY
Symplocaceae	<i>Symplocos</i>	N	BMY
Theaceae	<i>Freziera</i>	N	BMY
Theaceae	<i>Laplpea</i>	N	BMY
Theaceae	<i>Ternstroemia</i>	P	BMY
Theophrastaceae	<i>Clavija</i>	N	BMY
Thymelaceae	<i>Daphnopsis</i>	N	BMY
Thymelaceae	<i>Ovidia</i>	E	BTA
Tiliaceae	<i>Heliocarpus</i>	N	BMY
Tiliaceae	<i>Luehea</i>	N	BMY
Tiliaceae	<i>Mollina</i>	N	BMY
Ulmaceae	<i>Ampelocera</i>	N	BMY
Ulmaceae	<i>Lozanella</i>	N	BMY
Ulmaceae	<i>Phyllostylon</i>	N	BMY

Ulmaceae <sup>□</sup>	<i>Trema</i>	P	BMY
Ulmaceae <sup>□</sup>	<i>Celtis</i>	P	BMY
Urticaceae	<i>Myriocarpa</i>	N	BMY
Urticaceae	<i>Urera</i>	P	BMY
Verbenaceae	<i>Aegiphila</i>	N	BMY
Verbenaceae	<i>Citharexylum</i>	N	BMY
Verbenaceae	<i>Duranta</i>	N	BMY
Vochysiaceae	<i>Vichysia</i>	N	BMY
Winteraceae	<i>Drimys</i>	N	BTA
Zigofilaceae	<i>Porliera</i>	N	BMY

---

\* Desfontainiaceae = Loganiaceae

φ Ulmaceae = Celtidaceae

# Ulmaceae = Tiliaceae

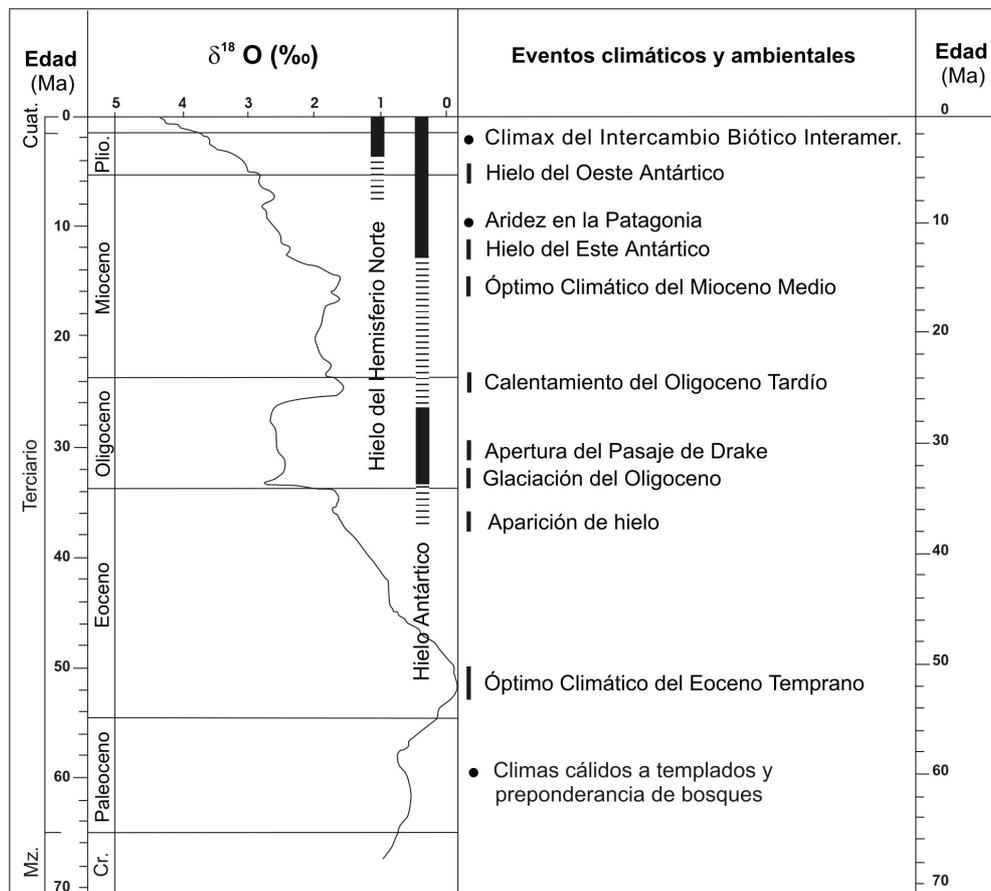
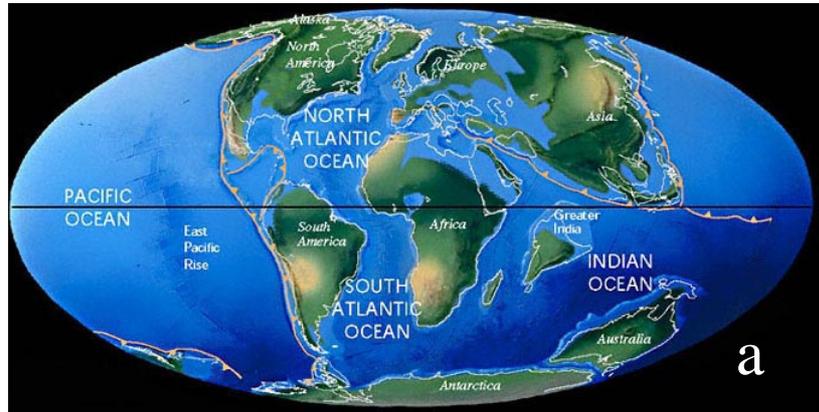
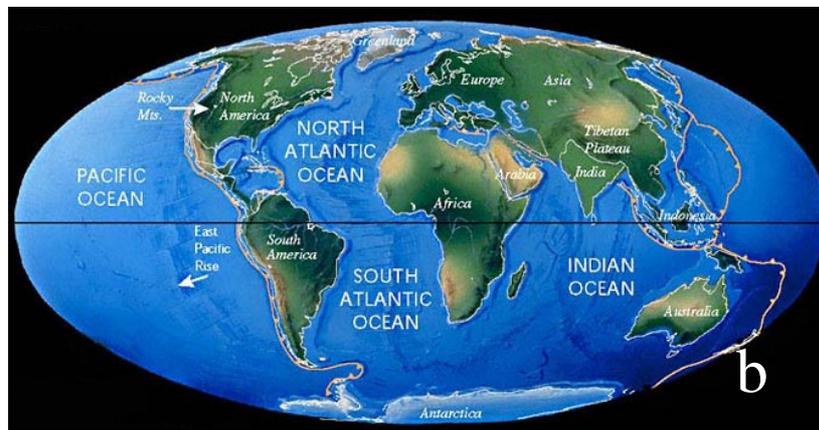


Figura II. 1: Principales eventos climáticos y ambientales durante el Paleógeno en América del Sur. Se indican las variaciones de la temperatura estimadas a partir del registro del isótopo de oxígeno ( $\delta^{18}\text{O}$ ) (de Poulin *et al.*, 2002) y los eventos climáticos y ambientales más destacados del hemisferio sur (de Ruggiero y Ezcurra 2003).



Paleoceno



Plioceno

Figura II. 2: Ubicaciones relativas de los continentes durante el Cenozoico. A Paleoceno (aprox.) B. Pleistoceno (Aprox). (de [www.avph.com.br](http://www.avph.com.br)). Se diferencia la glaciación de la Antártida.

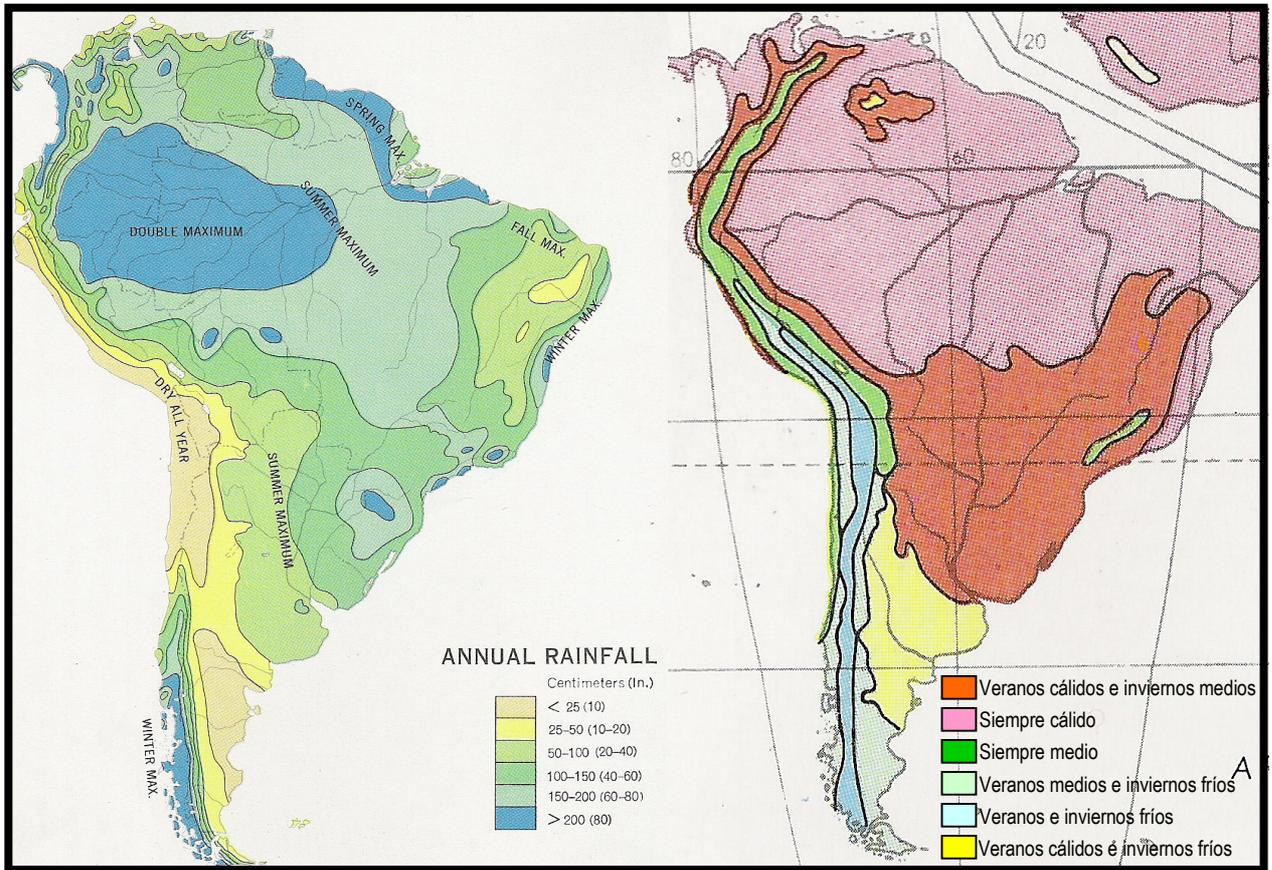


Figura II. 3: Gradiente de precipitación y temperatura media anual (de Espenshade y Morrison 1978).

## Capítulo III

# Patrones genéticos en *Podocarpus parlatorei* revelan persistencia a largo plazo de elementos tolerantes al frío en el sur de Yungas

### III. 1. Resumen

Se analizan las respuestas a los cambios climáticos en *Podocarpus parlatorei*, una especie arbórea subtropical tolerante al frío que caracteriza el bosque montano de Yungas del noroeste de Argentina y el sur de Bolivia, utilizando patrones de distribución de la variación genética de isoenzimas y ADN del cloroplasto. *Podocarpus parlatorei* presenta una distribución naturalmente fragmentada asociada a la discontinuidad orográfica, la cual está subdividida en los sectores norte, centro y sur, por lo que se predice que serán áreas genéticamente divergentes entre sí como resultado de un aislamiento histórico. Se recolectaron hojas frescas de un máximo de 30 individuos seleccionados al azar en 23 poblaciones. Se resolvieron 25 loci isoenzimáticos, de los cuales el 57% resultaron polimórficos. Se secuenciaron 208 individuos para la región del espaciador intergénico *trn* L-F del cloroplasto y se resolvieron ocho haplotipos. Se analizó patrones de variación geográfica mediante regresiones múltiples entre las frecuencias alélicas y diversidad haplotípica de las poblaciones y la latitud, longitud y altura. La estructura genética entre las poblaciones se investigó usando parámetros de diversidad en análisis de AMOVA. La relación entre las distancias genéticas y las geográficas se exploró mediante el coeficiente de correlación de Pearson.

Se observó un aumento del número efectivo de alelos y heterocigosis con la latitud. Las poblaciones del sur tienden a ser más variables y genéticamente distintas respecto de las demás poblaciones, y presentan un haplotipo único. Los resultados, sugieren que las poblaciones del sur podrían representar la ubicación de un refugio a largo plazo para *P. parlatorei*. El número medio de alelos por locus disminuye con la altitud. La diversidad genética total resultó de  $H_T = 0.163$ , 10% de la cual se distribuye entre las poblaciones. Esta divergencia poblacional resultó similar para ambos tipos de marcadores pero la señal histórica difiere temporalmente. Los análisis de estructuración geográfica resultaron significativos para ambos marcadores, el mayor porcentaje de variación se encuentra dentro de las poblaciones. Las reducciones en la diversidad genética hacia el norte y hacia las poblaciones de mayor altura evidencian los patrones de migración resultantes del cambio climático durante el Cuaternario

tardío, las poblaciones se habrían expandido hacia el norte durante los períodos más fríos, y se habrían contraído hacia las zonas montañosas durante los períodos cálidos.

### III. 2. Introducción

Las glaciaciones han tenido un rol importante en el ensamble de las comunidades y en la distribución de las poblaciones de las especies (Hewitt 2000). Los cambios climáticos relacionados con los sucesivos enfriamientos y calentamientos ocurridos desde el Plioceno (5 - 1.8 M años AP) hasta el Pleistoceno (25000 - 12000 años AP) y Holoceno (últimos 10000 años) afectaron la distribución y la estructura de los bosques tropicales y subtropicales (Colinvaux et al. 2000) y templados (Markgraf et al. 1995) de América del Sur. Estos cambios produjeron una disrupción en los rangos geográficos de las especies, eliminando poblaciones locales y modificando las presiones de selección (Premoli et al. 2000a). Por lo tanto se espera detectar dichos eventos en los acervos genéticos de las especies que habitan áreas que fueron afectadas por las glaciaciones y los cambios climáticos asociados. Numerosos trabajos documentan los efectos de las glaciaciones sobre las características genéticas de las especies de árboles de zonas templadas del Hemisferio Norte (Soltis et al. 1997, 2006; Petit et al. 2002a, b, 2008, Magri et al 2006; Afzal-Rafii y Dodd 2007, entre otros) y del hemisferio sur (Premoli 1998; Allnutt et al. 1999, 2003; Premoli et al. 2000a, 2001, 2002; Marchelli y Gallo 2006). Uno de los escenarios comúnmente analizados en zonas templadas del Hemisferio Norte es la migración postglaciaria a partir de refugios que habrían sobrevivido a las condiciones del último máximo glacial del Pleistoceno generalmente ubicados a latitudes medias. Sin embargo, para el Hemisferio Sur se planteó que la mayor influencia oceánica y menores amplitudes térmicas registradas habrían permitido la supervivencia local en zonas microclimatológicas favorables (Markgraf et al. 1995). Esto llevó a proponer la existencia de refugios múltiples en Patagonia de las especies resistentes al frío (Premoli 1998) y que las características genéticas de las poblaciones de taxones actuales como *Nothofagus* reflejan una historia pre-Pleistocénica (Premoli 1997; Mathiasen y Premoli 2007). Evidencia molecular reciente para Europa indica que la vegetación arbórea también respondió a sucesivos

episodios glaciarios e interglaciarios que produjeron repetidos avances y retrocesos de las especies y modelaron la diversidad genética moderna desde el Pleistoceno medio (Magri et al. 2006).

La respuesta de las especies de distribución tropical y subtropical durante periodos fríos y cálidos, proviene mayoritariamente del registro polínico. En particular, los estudios de polen para latitudes subtropicales, indican que elementos de origen austral actualmente restringidos a los bosques subtropicales de altura como los géneros *Podocarpus*, *Araucaria*, *Weinmania* y *Drymis*, descendieron en elevación respecto de su límite actual de distribución durante períodos fríos del Pleistoceno y Holoceno (Colinvaux et al. 1996, 2000; Pennington et al. 2004), llegando a formar bosques en galería en el sureste de Brasil (Behling y Lichte 1997). Así, se ha detectado la presencia de polen de estos taxones tolerantes al frío (microtérminos) en la base de los Andes y al sureste de Brasil, y son numerosas las evidencias de migración hacia el norte durante el último máximo glacial (Bush et al. 1990, Colinvaux et al. 1996, Pennington et al. 2000). Los importantes cambios en la composición polínica a lo largo del tiempo y a diferentes latitudes y longitudes en toda la región tropical y subtropical de Sudamérica han llevado a Pennington et al. (2004) a proponer que durante el último máximo glacial, la evolución de las especies asociadas a climas cálidos fue favorecida en las zonas tropicales y subtropicales más bajas. Durante períodos fríos estas especies habían sufrido retracciones en su rango quedando aisladas en refugios, contribuyendo a la diversidad actual observada en estas zonas. Contrariamente, las especies que se desarrollan en climas tropicales y subtropicales tolerantes al frío podrían haber expandido su área de distribución a menores latitudes durante los períodos glaciarios, y durante los interglaciarios se habrían recluido en poblaciones aisladas en las cumbres de las montañas. Estas poblaciones, aisladas durante los interglaciarios, podrían quedar expuestas a fuerzas estocásticas como la deriva génica y aumento de la endogamia que resultaría en la pérdida de variabilidad genética y potencial extinción local. Estas poblaciones de especies microtérminas podrían ser vistas como refugios interglaciarios desde los cuales se recolonizarían áreas más bajas durante los períodos glaciarios.

*Podocarpus parlatorei* (pino del cerro) es una especie actualmente restringida a los bosques montanos de altura y por lo tanto se espera que su distribución y abundancia en el pasado fueron afectadas por los cambios geológicos y climáticos ocurridos a latitudes subtropicales. *P. parlatorei* es la especie arbórea que ocupa los bosques de altura de la cordillera Oriental. En Argentina, esta cordillera se encuentra fragmentada naturalmente por valles de ríos que la atraviesan latitudinal y longitudinalmente y por lo tanto la distribución de las poblaciones de *P. parlatorei* también está fragmentada. Estos valles son los límites naturales para la subdivisión a partir de patrones de distribución de biodiversidad propuesta por Brown y Ramadori (1989) en norte, centro y sur de la Yunga del norte de Argentina (Fig. I. 3A). Así, se distinguen distintas serranías sobre las cuales hay bosques de pino del cerro en las laderas húmedas de exposición este. Estas son al sur la Sierra de Ambato en Catamarca, la Sierra de Aconquija entre Catamarca y Tucumán y la Sierra de Medina en Tucumán. La región central está longitudinalmente dividida por el Valle de Lerma que separa al este las Sierras de Metán, Luján, Santa Bárbara y Centinela, del oeste en el que continúa la Sierra de Aconquija y Curahuasi. En el norte de Argentina y sur de Bolivia *P. parlatorei* ocupa las áreas más elevadas de la cuenca del río Bermejo. En Bolivia continúa hacia el norte. El alto grado de disyunción geográfica sugiere que *P. parlatorei* podría ser propenso a la deriva génica y a la restricción del flujo génico.

### III. 3. Objetivos e hipótesis

El objetivo de este capítulo es conocer los patrones de distribución de la variación genética de *Podocarpus parlatorei* dentro y entre sus poblaciones, a lo largo de toda su distribución geográfica, utilizando electroforesis de isoenzimas y secuencias de ADN del cloroplasto (ADNcp) a fin de reconstruir su historia biogeográfica.

Los distintos marcadores moleculares reflejan tasas de mutación y efectos de las presiones de selección diferentes (Latta y Mitton 1997; Kremer et al. 2002) por lo que, la información que dan son distintas pero complementarias. Las isoenzimas se ven afectadas por el tipo de herencia biparental recombinante que tienen, mientras que el

ADN, tanto mitocondrial como cloroplástico, no recombinan y la herencia es uniparental. Por lo tanto, mientras las isoenzimas reflejan el flujo génico y deriva génica actual, el ADN no recombinante provee la señal histórica.

En este capítulo se analiza la hipótesis de que los cambios climáticos ocurridos a latitudes subtropicales permitieron la migración a las áreas más bajas y hacia el norte de la distribución durante los períodos fríos, y una reclusión a las zonas más altas y al sur de la distribución durante los períodos más cálidos. Por lo tanto se predice que los mayores niveles de variación genética se asociarán a posibles zonas de refugios. Dado que se trata de una especie tolerante al frío, los refugios habrían ocurrido durante los períodos interglaciarios. Por otro lado, se espera detectar variaciones clinales en las frecuencias alélicas, las cuales reflejarán posibles rutas migratorias desde refugios. Al tratarse de una especie con más de 10° de distribución latitudinal, con poblaciones relativamente continuas dentro de las serranías descritas, se espera encontrar una relación positiva y significativa entre los pares de distancias genéticas con los pares de distancias geográficas.

Se compararán los resultados obtenidos a partir de isoenzimas con los patrones de variación y distribución de haplotipos detectados mediante la secuenciación del espaciador intergénico del cloroplasto *trn* L-F. En las Podocarpaceae, al igual que en la mayoría de las coníferas, la herencia del cloroplasto es paterna (Wilson y Owens 2003). De manera que el estudio con marcadores del cloroplasto permite conocer cómo es el flujo génico histórico a partir del movimiento polínico entre las poblaciones, y estimar las tasas de divergencia entre ellas. Por lo tanto se espera que el patrón de diversidad y divergencia genéticas a partir de a secuencias de ADN del cloroplasto refleje el flujo génico histórico dentro y entre las poblaciones de *P. parlatorei*.

### III. 4. Materiales y métodos

#### III. 4. 1. Muestreo de poblaciones naturales

Entre septiembre y octubre de los años 2002 a 2004 se colectó follaje fresco para análisis isoenzimático y de ADN de un total de 17 poblaciones de *P. parlatoresi* abarcando todo su rango distribución en el Bosque Montano de Yungas del noroeste de Argentina y centro de Bolivia (poblaciones 2, 7-23 Tabla III. 1, Fig. I. 3 y III. 1).

Tabla III. 1: Ubicación de las poblaciones de *P. parlatoresi* analizadas en esta tesis. Localidades 1-7 corresponden a Bolivia y 7-23 a Argentina.

Nombre	Población	Provincia	Latitud (S)	Longitud (O)	Elevación (m s.n.m.)	Tamaño muestral ADN	Tamaño muestral Isoenzimas
1. IDP	Independencia	Cochabamba	16° 46'	66° 38'	Dato faltante	5	-
2. BO	Mizque	Cochabamba	17° 48'	65° 28'	3100	10	30
3. TQ	Tiraque	Cochabamba	17° 25'	65° 43'	Dato faltante	2	-
4. VS	Villa Serrano	Chuquisaca	19° 03'	64° 15'	Dato faltante	10	-
5. MTG	Monteagudo	Chuquisaca	20°	64°	1700	8	-
6. OC	Tarija*	O'Connor	21° 25'	64° 16'	2200	5	-
6'. AR	Tarija*	Arce	22° 07'	64° 27'	1700	5	-
7. EN	El Nogalar †	Salta	22° 10'	64° 44'	1650	10	30
8. LT	Los Toldos	Salta	22° 17'	64° 41'	1600	10	30
9. SA	San Andrés	Salta	23° 04'	64° 51'	1647	10	30
10. CA	Calilegua †	Jujuy	23° 40'	64° 54'	1700	10	22
11. TX	Tiraxi	Jujuy	23° 59'	65° 18'	1500	10	20
12. TA	Tiraxi arriba	Jujuy	24° 00'	65° 23'	1900	10	21
13. EF	El Fuerte	Jujuy	24° 15'	64° 24'	1445	10	30
14. SL	San Lorenzo	Salta	24° 42'	65° 42'	2047	10	26
15. ER	El Rey †	Salta	24° 45'	64° 42'	1648	10	29
16. VR	Valderrama	Salta	25° 25'	65° 07'	1580	10	30
17. LC	La Candelaria	Salta	25° 59'	65° 27'	1800	10	30
18. SM	Sierra Medina	Tucumán	26° 25'	65° 21'	1400	10	30
19. TF	Taficillo †	Tucumán	26° 43'	65° 21'	1700	10	30
20. LB	La Banderita	Tucumán	27° 19'	65° 56'	1712	10	10
21. PG	Pinar Grande	Catamarca	28° 07'	65° 54'	1616	10	26
22. TG	Tintigasta	Catamarca	28° 24'	65° 28'	1398	10	30
23. CC	Concepción	Catamarca	28° 37'	66° 02'	1040	10	12

\* Muestras de material de herbario procedentes de Herbarios BOLV y LPB.

† Poblaciones dentro de áreas protegidas Parque Nacional, Reserva Nacional, Parque Provincial.

Material seco para el análisis de ADN del cloroplasto fue obtenido de otras poblaciones del centro de Bolivia a través de colectores y material herborizado del herbario de Cochabamba (BOLV) y del Herbario Nacional de Bolivia en La Paz (LPB) (poblaciones 1, 3-5, Tabla III. 1).

### III. 4. 2. Electroforesis de Isoenzimas

En cada población se recolectaron aproximadamente 30 individuos seleccionados al azar. La distancia aproximada entre individuos muestreados siempre fue mayor a los 10 m, para evitar recolectar individuos cercanamente emparentados por efectos de la dispersión por gravedad de los frutos. En los casos que las poblaciones fueron pequeñas, todos los individuos fueron colectados, como por ejemplo en el caso de la población La Banderita de Tucumán, Argentina. En total se colectaron 476 individuos. Las muestras fueron acondicionadas en heladeras portátiles hasta su llegada al laboratorio para la extracción de las enzimas. La extracción de isoenzimas se realizó dentro de la semana posterior a la recolección. En el laboratorio se procedió a la ruptura mecánica del follaje fresco con nitrógeno líquido ( $-185^{\circ}\text{C}$ ) y luego se procedió a la extracción de las enzimas con buffer de extracción (según Mitton et al. 1979) mediante la utilización de morteros de porcelana. Los homogenatos fueron vertidos en dos tubos eppendorf de 1 mL, de manera de tener un original y un duplicado por individuo que posteriormente se almacenaron en freezer a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta realizar las corridas electroforéticas.

La electroforesis se realizó sobre geles horizontales de almidón al 12% P/V. Para los análisis se utilizaron tres sistemas buffer que permitieron resolver un total de 18 loci isoenzimáticos, de los cuales se utilizaron 14. Además se realizaron pruebas en otros sistemas y enzimas que no fueron analizadas por deficiencia en la lectura de las bandas (Tabla III. 2). Los sistemas buffer fueron elegidos en función de la calidad de la lectura de los patrones de bandas y de la relación cantidad de enzimas polimórficas por sistema. Los sistemas utilizados fueron, Sistema A (Clayton y Treliak 1972) a pH 6.1 se corrió a  $20\text{ m}\ddot{\text{A}}$  durante 6 horas y se resolvieron isocitrato deshidrogenasa (Idh), malato deshidrogenasa (Mdh1, Mdh2, Mdh3) y fosfoglucoisomerasa (Pgi1, Pgi2).

Sistema 16 (O'Malley et al. 1979) a pH 8.5 se corrió a 25 mÅ durante 6 horas y se resolvieron varios loci de peroxidasa anódica (Per<sub>A1</sub>, Per<sub>A2</sub>, Per<sub>A3</sub>, Per<sub>A4</sub>, Per<sub>A5</sub>, Per<sub>A6</sub>, Per<sub>A7</sub>). Sistema 26 (Poulik 1957) a pH 8.2 se corrió a 7 mÅ durante 17 horas y se resolvieron menadiona reductasa (Mnr1, Mnr2, Mnr3) y fosfoglucomutasa (Pgm1, Pgm2). Los locus Mdh1, Pgi1, Per<sub>A1</sub>, y Per<sub>A6</sub>, no se incluyen en los análisis porque no fueron resueltos satisfactoriamente para todas las poblaciones.

Tabla III. 2: Sistemas buffer y loci putativos utilizados para el estudio de variabilidad genética a partir de isoenzimas de *P. parlatorei*. Los loci analizados incluyen los que arrojaron resultados consistentes para todas las poblaciones.

	Sistema 13	Sistema 16	Sistema 26	Sistema 18	Sistema A	Sistema CB	Sistema MC
pH	7.5	8.5	8.2	8.5	6.1	8 - 8.8	7.5
Loci analizados		Per <sub>A</sub>	Mnr Pgm		Idh Mdh Pgi		
Loci probados	Adh Adl G2d Skdh	Adh Gdh Got Lap Mpi Skdh	6pgd Acph Adh Lap Got Me Mpi Per <sub>C</sub> Skdh	Aco Adh Skdh	Adh Adl G2d Me Mnr Pgm Skdh	Aco Adh G2d Idh Mdh Me Mnr Pgi Pgm Skdh	Aco Adh G2d Idh Mdh Me Mnr Pgi Pgm Skdh

Para cada sistema isoenzimático, los loci y alelos fueron numerados secuencialmente desde la porción anódica a la catódica y los patrones isozímicos fueron inferidos a partir de la composición y número de isoenzimas comúnmente observados en especies de plantas (Soltis y Soltis 1989; Murphy et al. 1996). Los genotipos se infirieron directamente de los fenotipos electroforéticos y por lo tanto los loci génicos fueron considerados putativos.

### III. 4. 3. Secuenciación de ADN del cloroplasto

Del total de individuos por población muestreados para análisis genéticos, 10 fueron seleccionados al azar para la realización de análisis de ADN de regiones no

codificantes. La extracción de ADN se realizó a partir de follaje de cinco individuos por población que fue conservado en silica gel al momento de la colecta para análisis isoenzimáticos. Dado que los análisis preliminares de ADN mostraron polimorfismo intraespecífico, otros cinco individuos de las mismas poblaciones fueron extraídos a partir de homogenatos de isoenzimas siguiendo el protocolo desarrollado por Arbetman (datos no publicados). Además, se extrajo ADN de material seco de los herbarios de Cochabamba y La Paz correspondiente a la población Tarija; en este caso las muestras procedentes de diferentes lugares de esta provincia fueron tratadas como una única población, ya que resultaron monomórficas para la región *trn* L-F del cloroplasto. También se utilizó material seco colectado por colaboradores bolivianos y material fresco de ejemplares cultivados, con procedencia conocida, del herboretum de la facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Simón Bolívar de Cochabamba. En total se extrajo ADN de 215 individuos. La extracción de ADN se realizó utilizando el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN). El producto de la extracción fue verificado en un gel horizontal de agarosa al 1% en buffer TAE. Posteriormente el producto de ADN fue conservado en freezer -20°C hasta la realización de las PCR reacciones en cadena de la polimerasa utilizando primers universales de la mitocondria y el cloroplasto.

Para analizar los patrones filogeográficos de *P. parlatoresi* se intentó optimizar reacciones de PCR utilizando sondas de 9 regiones del cloroplasto, 6 regiones de la mitocondria y la región ITS 1 y 2 del ADN nuclear utilizando primers universales (Tabla III. 3).

Se obtuvo polimorfismo para una región del cloroplasto de herencia paterna para Podocarpaceae (Wilson y Owens 2003). Por lo tanto las secuencias para el espaciador intergénico *trn* L-F) se utilizaron para calcular parámetros de variación genética dentro de las poblaciones y estimar la divergencia entre ellas.

Se secuenciaron un total de 215 individuos, 10 individuos por cada población, excepto para las poblaciones TQ, IDP y MTG. Las reacciones de PCR para la amplificación del espaciador intergénico *trn* L-F se realizaron con 1µl de producto de ADN de extracción, 2.5 µl de Buffer 10X, 0.25µM de cada dNTP, 0.1mM de cada primer, 1.5mM de Cl<sub>2</sub>Mg y 0.4u taq (Invitrogen) en un volumen final de 15 µl.

Los parámetros de reacciones de PCR fueron: 4 min. a 95°C, 35 ciclos de 1 mín. a 94°C, 1 min. a 57°C, 1.5 mín. a 72°C, 10 mín. a 72°C. Todos los productos de PCR fueron examinados en un gel de agarosa al 1% con Buffer TAE. Únicamente los fragmentos con una única banda visible fueron secuenciados. Los productos de PCR fueron purificados con 2.5u de exonucleasa (USB - Fermentas) y 0.25u de Shrimp Alkaline Phosphatase (USB) para 10 µl de producto de reacción. La reacción de purificación

Tabla III. 3: Regiones probadas y amplificadas en *P. parlatoresi* para detectar polimorfismo intraespecífico utilizando distintos marcadores universales. Temperatura de acoplamiento del iniciador a la secuencia de ADN de las PCR y resultado de las regiones amplificadas satisfactoriamente.

	Temperatura de acoplamiento	Tamaño del producto de PCR	Grado de variación	Cita del iniciador
Marcadores del cloroplasto				
trn L-F	57°C	370 pb	polimórfico	Taberlet et al. 1991
trn Le1-e2	57°C	500 pb	monomórfico	Taberlet et al. 1991
trn D-T	57°C	800 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
trn C-Dm	59°C	480 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
trn F-Vr		no amplifico		Dumolin-Lapegue et al. 1997
trn H-psbA		no amplifico		Hamilton 1999
psbB-H.		no amplifico		Hamilton 1999
trn S-Tm	58°C	1000 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
trn H-K	59°C	bandas múltiples		Demesure et al. 1995
Marcadores de la mitocondria				
nad 1	52°C	170 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
nad 4		no amplifico		Demesure et al. 1995
nad 5	48°C	620 pb	monomórfico	Jaramillo-Correa et al. 2003
nad 7	47°C	bandas múltiples		Jaramillo-Correa et al. 2004
cox 1	47°C	600 pb	monomórfico	Lu et al. 1998
cox 3		no amplifico		Duminil et al. 2002
Marcadores genómicos ITS				
Cy1-Cy3	49°C	3000 pb	monomórfico	Wright et al. 2006
Pod-JKf-JKr	49°C	regiones internas	monomórfico	Wright et al. 2006

tiene los siguientes parámetros: 15 min. a 37°C, y 15 min. a 85°C. Con 1 µl de este producto se realizó la reacción de BigDye Terminator v3.1 siguiendo los protocolos de Applied Biosystems. Finalmente este producto fue precipitado con una solución de EDTA 125mM y etanol 100% y centrifugado durante 30 min. y un enjuague con etanol

70% y centrifugado durante 15 minutos. Los fragmentos de ADN fueron resuspendidos en 10  $\mu$ l de Hi-Di-Formamida para su posterior secuenciación en un secuenciador ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) del Laboratorio Ecotono, Universidad Nacional del Comahue.

### III. 4. 4. Análisis de electroforesis de isoenzimas

Los niveles de variación isozímica dentro de las poblaciones y para la especie se calcularon utilizando el programa POPGENE v. 1.32 (Yeh et al. 1999). Éstos fueron: número medio de alelos por locus ( $N_A$ ), el número efectivo de alelos por locus ( $N_E$ ), el porcentaje de loci polimórficos *sensu stricto* ( $P_{SS}$ ), y la heterocigosis observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_E$ ) bajo la condición de equilibrio Hardy - Weinberg.

La presencia de centros de diversidad genética y variaciones clinales a lo largo de la distribución en los parámetros genéticos, que pudieran sugerir posibles rutas migratorias, se analizó midiendo la dependencia de las frecuencias alélicas y parámetros de variación genética de cada población respecto de variables geográficas (latitud, longitud y elevación) mediante regresiones lineares múltiples.

La endogamia para cada locus dentro de cada población fue estimada utilizando el índice de fijación  $F_{IS} = 1 - H_O/H_E$  (Wright 1931). La desviación de las frecuencias genotípicas de la condición de equilibrio Hardy-Weinberg y la significancia de los índices de fijación fueron analizadas por el test de  $\chi^2$  (Li y Horvitz 1953). El promedio de endogamia dentro de las poblaciones y el intervalo de confianza del 95% se calcularon haciendo remuestreos según Weir y Cockerham (1984) usando el programa FSTAT versión 2.9.3.2 (Goudet 2002).

La estructura genética de las poblaciones se analizó utilizando los parámetros de diversidad total ( $H_T$ ), dentro de poblaciones ( $H_S$ ), y el grado de divergencia entre poblaciones ( $F_{ST}$ ). El cálculo se realizó utilizando los loci polimórficos con el programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2002).

Para analizar las relaciones genéticas entre las poblaciones se realizó un análisis multivariado de cluster mediante el índice de distancias genéticas modificadas de Rogers (Wright 1978). La hipótesis de que existe aislamiento por distancia, es decir

que a mayor distancia geográfica entre poblaciones mayor distancia genética, fue analizada mediante la correlación entre los pares de distancias genéticas con los pares de distancias geográficas mediante la correlación parcial de Pearson. A cada variable se aplicó la función logaritmo en base 10 ( $\log_{10}$ ) para estandarizar los datos.

Para investigar la existencia de estructuración geográfica entre las poblaciones de *P. parlatorei* se realizaron contrastes independientes de las distancias genéticas de Rogers (Wright 1978) entre las poblaciones ubicadas en distintos sectores mediante tests de Kruskal-Wallis. Se definieron cuatro sectores (norte, centro-este, centro-oeste y sur) siguiendo una estructuración orográfica (Hipótesis Orográfica HO). Estos corresponden a una clasificación basada en los diferentes cordones montañosos (norte, centro y sur) sobre lo cuales se desarrollan los bosques montanos (Tabla III. 4). La población Bolivia no se incluyó en el sector norte por la gran distancia geográfica que la separa. Se espera que dentro de un sector la distancia genética promedio entre poblaciones sea menor que la distancia genética promedio entre poblaciones de dos sectores diferentes. La distancia genética promedio dentro de cada sector se calculó como la sumatoria de todos los posibles pares de distancias de las poblaciones de un sector, dividido por el total de pares. Lo mismo se realizó para las comparaciones entre sectores.

La estructuración geográfica de las variaciones en las frecuencias alélicas de las poblaciones también se analizó mediante AMOVA, donde se pusieron a prueba tres hipótesis. La hipótesis de biodiversidad de Brown y Ramadori (1989) (HB) contempla tres sectores (norte: al norte de 24° latitud S, centro entre 24-25° latitud S, y sur entre 25-28° latitud S) que varían en Biodiversidad, donde se aprecia una disminución de endemismos de norte a sur. La hipótesis orográfica (HO) está sustentada en la distribución de los cordones montañosos como fuera explicado previamente. La tercera, hipótesis geográfica (HG) está basada en el análisis de distancias euclídeas de las distancias geográficas entre las poblaciones muestreadas, así se obtuvo un agrupamiento (UPGMA) que se utilizó para distinguir tres sectores: norte (16-20° latitud S), centro (21-26° latitud S) y sur (27-28° latitud S) (Tabla III. 4; Fig. III. 2). Estos análisis fueron realizados con los loci *Mdh2*, *Mnr1*, *Mnr3*, *Per<sub>A</sub>5*, *Per<sub>A</sub>7*, *Pgi2* y *Pgm2*,

Tabla III. 4: Parámetros de variación genética dentro de poblaciones de *P. parlatoresi* analizadas mediante isoenzimas. Estos son: NA: número medio de alelos por locus, NE: número efectivo de alelos por locus, PSS: porcentaje de loci polimórficos sensu stricto, HO: heterocigosis observada, HE: heterocigosis esperada, FIS: índice de fijación. Los valores promedio para el nivel de población y especie se muestran en la base de la tabla. Los errores estándar están entre paréntesis. (\*) valor estadísticamente significativo distinto de cero. Las referencias de las poblaciones se indican en la tabla 1. Se indican a que sectores corresponden las poblaciones para los análisis de AMOVA. Las poblaciones fueron clasificadas en tres sectores norte (N), sur (S) y centro (Brown y Ramadori, 1989); que fue subdividido en este (E) y oeste (O) para análisis de estructuración geográfica (Hipótesis Orográfica).

Población	N <sub>A</sub>	N <sub>E</sub>	P <sub>SS</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>	Hipótesis biodiversidad	Hipótesis Orográfica	Hipótesis Geográfica
2. BO	1.43 (0.10)	1.18 (0.06)	36	0.116 (0.056)	0.101 (0.048)	-0.132 (0.040)	N	N (Bo)	N
7. EN	1.64 (0.11)	1.29 (0.06)	43	0.165 (0.057)	0.164 (0.059)	-0.035 (0.063)	N	N	C
8. LT	1.71 (0.12)	1.14 (0.03)	43	0.096 (0.038)	0.102 (0.039)	0.040 (0.100)	N	N	C
9. SA	1.64 (0.11)	1.23 (0.04)	43	0.133 (0.054)	0.142 (0.051)	0.148 (0.109)	N	N	C
10. CA	1.64 (0.13)	1.25 (0.06)	43	0.161 (0.063)	0.145 (0.056)	-0.107 (0.075)	N	N	C
11. TX	1.57 (0.10)	1.25 (0.07)	43	0.154 (0.064)	0.135 (0.056)	-0.120 (0.042)	N	O	C
12. TA	1.64 (0.15)	1.20 (0.05)	36	0.131 (0.061)	0.124 (0.050)	0.042 (0.179)	N	O	C
13. EF	1.79 (0.15)	1.27 (0.05)	43	0.194 (0.071)	0.163 (0.056)	-0.158 (0.096)	C	E	C
14. SL	1.71 (0.11)	1.24 (0.05)	50	0.142 (0.053)	0.147 (0.051)	0.127 (0.116)	C	O	C
15. ER	1.50 (0.10)	1.23 (0.05)	36	0.127 (0.060)	0.125 (0.056)	-0.026 (0.101)	C	E	C
16. VR	1.71 (0.10)	1.40 (0.08)	57	0.197 (0.070)	0.206 (0.065)	0.031 (0.100)	S	O	C
17. LC	1.64 (0.11)	1.31 (0.07)	50	0.203 (0.084)	0.162 (0.062)	-0.051 (0.195)	S	O	C
18. SM	1.71 (0.16)	1.32 (0.07)	36	0.180 (0.070)	0.165 (0.064)	-0.100 (0.068)	S	E	C
19. TF	1.50 (0.11)	1.27 (0.07)	29	0.134 (0.070)	0.127 (0.063)	-0.043 (0.141)	S	S	C
20. LB	1.43 (0.14)	1.17 (0.07)	36	0.114 (0.047)	0.113 (0.048)	-0.065 (0.079)	S	S	S
21. PG	1.79 (0.16)	1.31 (0.06)	43	0.228 (0.087)	0.173 (0.061)	-0.258 (0.136)	S	S	S
22. TG	1.64 (0.11)	1.35 (0.07)	43	0.239 (0.095)	0.171 (0.066)	-0.310 (0.095)	S	S	S
23. CC	1.64 (0.18)	1.28 (0.08)	43	0.232 (0.087)	0.206 (0.080)	-0.318 (0.141)	S	S	S
Promedio	1.63 (0.38)	1.26 (0.30)	42 (1.52)	0.164 (0.066)	0.148 (0.057)	-0.074 (0.104)			
<i>P. parlatoresi</i>	2.21 (0.04)	1.26 (0.01)	57	0.157 (0.006)	0.160 (0.006)	-0.104* (0.038)			

que resultaron polimórficos en al menos una población. Los análisis de AMOVA se realizaron con el programa Genalex (Peakall y Smouse 2006), en cada análisis se realizaron 1000 permutaciones.

Las relaciones filogenéticas entre los distintos haplotipos fueron estudiadas con análisis de parsimonia (MP) y se utilizaron como grupo externo *P. nubigena* y *P. saligna*. Las secuencias se alinearon con el programa Mega 4.0 (Tamura et al. 2007). Los análisis de máxima parsimonia consistieron en una búsqueda heurística utilizando el algoritmo de intercambio de ramas de bisección del árbol y reconexión (TBR del inglés "tree bisection and reconnection") usando el programa PAUP\* (Swofford 2002). El árbol de inicio para la búsqueda se obtuvo adicionando los taxones en forma secuencial aleatoriamente 1000 veces reteniendo 10 árboles en cada paso. Cuando la búsqueda resultaba en más de un árbol igualmente parsimonioso se realizó un consenso estricto de estos árboles. Los índices de consistencia (IC; Kluge y Faris 1969) y de retención (IR; Farris 1989) fueron calculados para el árbol más parsimonioso. Las inserciones / deleciones (gaps o indeles) fueron tratadas como datos faltantes y fueron recodificados al final de la matriz. El análisis de soporte de las ramas (BS del inglés "bootstrap") se obtuvo realizando 1000 remuestreos ("bootstrap replicates") de la matriz original. Estas nuevas matrices fueron analizadas de igual forma que la matriz original pero bajando el número de réplicas del árbol de inicio a 100.

Se realizó un test de Mantel entre las distancias genéticas y los pares de  $\phi_{pt}$  (índice análogo al  $F_{ST}$ ) de cada población con las distancias geográficas, utilizando el programa Genalex (Peakall y Smouse 2006). Se realizó un análisis de AMOVA para estimar la partición de la variabilidad genética a lo largo de toda la distribución geográfica de *P. parlatorei* en sus componentes dentro y entre poblaciones. Los análisis de AMOVA se realizaron a partir de la matriz de distancias genéticas entre los haplotipos, estimada bajo el modelo de evolución molecular de Kimura de dos parámetros (Kimura 1980). Los análisis se llevaron a cabo con el programa Arlequín v.3.11 (Excoffier et al. 2006), realizándose 1000 permutaciones para obtener la significación estadística. También se analizaron tres hipótesis de agrupamiento de la misma manera que con las isoenzimas. Asimismo, la asociación geográfica se estudió

mediante un análisis de clados anidados (del inglés “Nested Clade Phylogeographic Analysis” NCPA) (Panchal 2007) y también se analizaron los datos con el programa Permut (Pons y Petit 1996). Se incluyeron los datos de 21 poblaciones, y los análisis se realizaron con y sin gaps, y con gaps recodificados.

### III. 5. Resultados

#### III. 5. 1. Isoenzimas

Ocho de los 14 loci analizados consistentemente en todas las poblaciones (Apéndice III. 1), resultaron polimórficos en al menos una población (57%) y las poblaciones en promedio tuvieron un polimorfismo del 47% (Tabla III. 4). Estos valores fueron sensiblemente menores a los promedios publicados por Hamrick y Godt (1989) para gimnospermas (71%), pero similares a otras plantas de distribución geográfica regional (53%) a amplias (59%) (Hamrick y Godt 1996)

Las regresiones múltiples realizadas con los parámetros genéticos poblacionales indicaron que el número efectivo de alelos por locus y la heterocigosis observada incrementan gradualmente con la latitud. Es decir, las poblaciones del sur presentan mayor número efectivo de alelos por locus y heterocigosis observada. Por otro lado, el número medio de alelos por locus decrece significativamente con el aumento de la altura, de manera que aquellas poblaciones que crecen a menor altitud tienen en promedio un mayor número de alelos por locus que las de mayor altura (Tabla III. 5).

Tabla III. 5: Regresiones múltiples entre los parámetros genéticos (variables dependientes) y geográficos dados por latitud, longitud y elevación (variables independientes). Sólo se muestran las variables que arrojaron resultados estadísticamente significativos. NE: número efectivo de alelos por locus. HO: heterocigosis observada. NA: número medio de alelos por locus.

Variable dependiente	Variable independiente	r <sup>2</sup>	F	p	β
N <sub>E</sub>	Latitud	0.33	3.62	< 0.02	0.65
H <sub>O</sub>	Latitud	0.39	10.25	< 0.01	0.62
N <sub>A</sub>	Elevación	0.22	4.57	< 0.05	-0.47

Al estimar los niveles de endogamia por locus para cada población, no se detectaron deficiencias de heterocigotas en el 80% de los resultados posibles (83 resultados no significativos de un total de 105 contrastes, Tabla III. 6). De los 22 casos que resultaron distintos de cero y estadísticamente significativos, 12 mostraron desviaciones de la condición de equilibrio mostrando un defecto de heterocigotas, mientras que los 10 casos restantes mostraron defecto de homocigotas. Si bien en promedio las poblaciones mostraron un valor promedio de  $F_{IS}$  de  $-0.074$ , el valor promedio de endogamia dentro de las poblaciones de la especie fue de  $-0.104$  que resultó significativamente distinto de cero (Tabla III. 4).

La diversidad genética total resultó  $H_T = 0.163$ , la mayoría distribuida dentro de las poblaciones ( $H_S = 0.146$ ). El grado de divergencia entre las poblaciones ( $F_{ST}$ ) es de 10.9% significativamente distinto de cero (IC 95% 0.072 - 0.181).

Tabla III. 6: Índices de fijación (F) como medida de deficiencia o exceso de heterocigotas (Wright 1978) la significancia del índice de fijación [ $F = 1 - H_O / H_E$  (Wright 1931)] analizada mediante test de  $\chi^2$  (Li y Horvitz 1953) solamente para loci polimórficos. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$ .

Población	Mdh2	Mnr1	Mnr3	Per <sub>A</sub> 2	Per <sub>A</sub> 5	Per <sub>A</sub> 7	Pgi2	Pgm2
2. BO		-0.14	-0.07	-0.25	-0.18		-0.02	
7. EN		-0.04	-0.01	-0.05	-0.14	0.24	-0.21	
8. LT	-0.02	-0.07	0.50 *		-0.19	-0.08	0.10	
9. SA		0.27 *	0.09	0.47 *	0.36 *	-0.23	-0.07 **	
10. CA		-0.02	0.17	-0.08	-0.36	-0.24	-0.11	
11. TX		-0.04	-0.06	-0.04	-0.31	-0.13	-0.14	
12. TA		0.48 **	-0.19	0.46	-0.15	-0.39		
13. EF		0.27 **	-0.32	-0.23	-0.28	-0.05	-0.34	
14. SL	0.48 **	0.02	-0.08	0.65 *	-0.11	-0.08	0.01	
15. ER		0.26	0.07	-0.02	-0.08		-0.36 *	
16. VR	0.60 **	-0.35 *	-0.12	-0.02	0.12 *	-0.14	0.19	-0.03
17. LC	1.00 **	-0.33	0.03	-0.02	-0.06	-0.37		-0.61 **
18. SM		-0.19	0.10	-0.29	-0.01 **		-0.11	
19. TF		0.01 **	0.26		-0.42 *		-0.02	
20. LB		-0.05	0.25	-0.12	-0.2		-0.14	
21. PG		-0.84 **	0.06	0.05	-0.39	-0.24	-0.19	
22. TG		-0.46 **	-0.34	-0.60 **	-0.39 *		-0.08	0.01
23. CC		-0.13	-0.36	-1.00	-0.15	-0.17	-0.10	

Se detectó una asociación positiva y significativa entre el  $\log_{10}$  de los pares de distancias geográficas y genéticas ( $r = 0.39$   $p < 0.05$ ) (Fig. III. 3). En promedio la distancia genética de Rogers entre poblaciones fue de 0.136, con una variación entre 0.057 y 0.213. Las comparaciones entre sectores mostró que los promedios de distancias genéticas calculados dentro de cada sector son estadísticamente menores que los promedios entre sectores, a excepción del sector centro este (Tabla III. 7). La menor distancia promedio entre poblaciones para un sector dado la tienen las poblaciones del sector norte. El sector sur difiere estadísticamente del oeste y del norte, los sectores del centro no difieren entre si, entre el norte y el oeste hay cierto grado de similitud, y el sector centro-este no presenta diferencias estadísticamente significativas con ningún sector (Tabla III. 7).

Tabla III. 7: Distancia genética dentro de grupos de poblaciones de *P. parlatorei* y entre sectores a lo largo de la distribución de la especie en Argentina y una población de Bolivia. También se indican los resultados de los contrastes del test de K-W. Letras iguales indican que no hay diferencias entre grupos, letras distintas indican diferencias entre grupos.

Sector	Sur	Este	Oeste	Norte	Bolivia	KW (H)	p
Sur	S-S 0.0687a	S-E 0.1425ac	S-O 0.2012b	S-N 0.1914bc	S-B 0.1726abc	(4, N = 70) = 36.14	< 0.00001
Este	E-S 0.1425	E-E 0.1367	E-O 0.1229	E-N 0.1018	E-B 0.1107	(4, N = 48) = 3.38	< 0.4960
Oeste	O-S 0.2012b	O-E 0.1229ac	O-O 0.0970a	O-N 0.0735c	O-B 0.1108abc	(4, N = 75) = 39.80	< 0.00001
Norte	N-S 0.1914a	N-E 0.1018b	N-O 0.0735b	N-N 0.0475b	N-B 0.1000b	(4, N = 62) = 42.00	< 0.00001

Los análisis de estructuración geográfica resultaron estadísticamente significativos para las hipótesis de Brown y Ramadori y la de Orografía (Tabla III. 8). Tanto las poblaciones agrupadas según los sectores diferenciados por la diversidad y distribución de las especies de árboles (*sensu* Brown y Ramadori 1989), como los sectores correspondientes a los distintos cordones montañosos (Hipótesis orográfica) son genéticamente diferentes.

Tabla III. 8: Análisis de varianza molecular (AMOVA) para tres hipótesis.

Agrupamiento	Fuente de variación	g.l.	Suma cuadrados	Varianza	% de variación
Hipótesis de Biodiversidad	Entre sectores	2	65.454	0.158	8 **
	Dentro de los sectores	15	132.149	0.277	13 **
	Dentro de las poblaciones	453	743.155	1.641	79 **
	Total	470	940.758	2.076	
Hipótesis Orográfica	Entre sectores	3	51.440	0.053	3 **
	Dentro de los sectores	14	146.163	0.341	17 **
	Dentro de las poblaciones	453	743.155	1.641	81 **
	Total	470	940.758	2.034	
Hipótesis Geográfica	Entre sectores	2	25.617	0.011	1 ns
	Dentro de los sectores	15	171.986	0.378	19 **
	Dentro de las poblaciones	453	743.155	1.641	81 **
	Total	470	940.758	2.030	

### III. 5. 2. Secuenciación del espaciador intergénico *trn* L-F del cloroplasto

La secuenciación del fragmento *trn* L-F en los 208 individuos analizados provenientes de 21 poblaciones resultó en 330 pares de bases. Las poblaciones IDP y TQ fueron excluidas del análisis por presentar haplotipos más similares a *Podocarpus glomerulosa*, que a *P. parlatorei*. Los individuos provenientes de estas poblaciones se trataban de plántulas cultivadas en el herboretum de la Universidad de San Simón. En particular, estas poblaciones corresponden a un área en las que crecen en simpatria ambas especies y como la diferenciación morfológica de *P. parlatorei* en estadios jóvenes es dificultosa, se optó por no incluir estas secuencias en el análisis.

Seis sitios de 330 resultaron polimórficos. Los valores de diversidad genética (diversidad haplotídica  $h$ ) para la especie resultaron  $h = 0.5985$  y la diversidad nucleotídica  $\pi = 0.002461$  (Tabla III. 9, Fig. III. 4).

Tabla III. 9: Variabilidad y diversidad haplotídica (génica)  $h$  y nucleotídica  $\pi$  para 21 poblaciones de *P. parlatoresi*.

Población	Individuos	# Haplotipos	$h$	$\pi^*$
2. BO	10	2	0.2000	0.001208
4. VS	10	2	0.3556	0.001074
5. MTG	8	2	0.5714	0.003453
6. TJ (AR y OC)	10	1	0	0
7. EN	10	5	0.8667	0.004364
8. LT	10	3	0.5111	0.002484
9. SA	10	4	0.7111	0.003357
10. CA	10	4	0.6000	0.002014
11. TX	10	3	0.7111	0.002685
12. TA	10	2	0.5333	0.001611
13. EF	10	3	0.5111	0.001678
14. SL	10	3	0.6222	0.002685
15. ER	10	3	0.6000	0.002014
16. VR	10	3	0.6444	0.002216
17. LC	10	3	0.3778	0.001678
18. SM	10	3	0.7111	0.002685
19. TF	10	4	0.7111	0.002618
20. LB	10	3	0.3778	0.001678
21. PG	10	2	0.2000	0.001208
22. TG	10	3	0.7333	0.002820
23. CC	10	3	0.3778	0.001678
<i>P. parlatoresi</i>	208	8	0.5985	0.002461

\* Promediado por locus.

Se detectaron ocho haplotipos (Tabla III. 10). Dos haplotipos resultaron ser comunes. Mientras el haplotipo ii (rojo, Fig. III. 4) está presente en todas las poblaciones, el haplotipo iii (verde, Fig. III. 4) tiende a ser menos frecuente en los extremos de la distribución de *P. parlatoresi*. Los haplotipos iv, vi y vii (celeste, blanco y negro, Fig. III. 4) únicamente se distribuyen en las poblaciones del centro. Sólo las poblaciones del sur presentan el haplotipo i (naranja en la Fig. III. 4), mientras que el haplotipo viii (violeta, Fig. III. 4) es exclusivo de la población MTG. El haplotipo v (amarillo, Fig. III. 4) se encuentra en algunas poblaciones del centro y norte de la distribución. Las regresiones entre la diversidad nucleotídica y haplotídica no arrojaron resultados estadísticamente significativos con ninguna de las variables geográficas (Fig. III. 5).

Tabla III. 10: Sitios variables para el alineamiento de la región del espaciador intergénico trn L-F del cloroplasto para 8 haplotipos de *P. parlatorei*. Los números del 1 al 4 corresponden a inserciones (Ins.). Punto (.) nucleótidos iguales al haplotipo i. Guión (-) nucleótidos ausentes. Se indica cuantos individuos hubo para cada haplotipo.

Haplotipo	59	106	163	164	165	296	Cantidad de individuos	Color
i	-	C	2	-	-	A	6	Naranja
ii	-	A	-	-	-	.	122	Rojo
iii	-	A	2	-	-	.	52	Verde
iv	-	A	2	-	-	G	11	Celeste
v	-	A	2	3	-	.	8	Amarillo
vi	1	A	-	-	-	.	3	Blanco
vii	-	A	2	3	4	.	1	Negro
viii	1	A	2	-	-	.	4	Violeta

1 Ins. = T

2 Ins. = AGAAAGTAGAAGG

3 Ins. = AGAAAGTAGAAGGAGAAAGTAGAAGG

4 Ins. = AGAAAGTAGAAGGAGAAAGTAGAAGGAGAAAGTAGAAGG

La red de expansión mínima de haplotipos construida con los gaps recodificados (Tabla III. 10, Fig. III. 6) muestra que la distribución periférica de los haplotipos i, iv, v, vii sugiere que todas estas variantes derivaron de un ancestro común. Por otro lado, esta red de haplotipos no muestra una evolución simple por presentar relaciones no lineales entre los haplotipos ii, iii, vi y viii. Esta ambigüedad podría sugerir una relativamente reciente diversificación de las variantes haplotídicas para este marcador en esta especie.

El análisis de máxima parsimonia entre haplotipos se resolvió con 330 pares de bases, de las cuales 15 son caracteres parsimoniosamente informativos. El árbol más parsimonioso se obtuvo de un total de 5 árboles (Índice de Consistencia = 0.9; Índice de Retención = 0.1) y el árbol resultante no resolvió las relaciones evolutivas para los 8 haplotipos analizados (datos no mostrados).

El test de Mantel entre distancias genéticas a partir de pares de  $\phi_{pt}$  y distancias geográficas, mostró una relación marginalmente significativa  $r = 0.043$  y  $p < 0.07$  (Apéndice III). Al analizar los pares de  $\phi_{pt}$  entre las poblaciones dentro de cada sector (norte / centro / sur) definidos a partir del cluster de distancias geográficas (Fig. III. 2), la proporción de pares estadísticamente significativos es menor que los no significativos (1/3, 8/91 y 1/6, para los sectores norte, centro y sur, respectivamente)

(Apéndice III. 2). Mientras que entre el sector norte-centro el 43% de los pares de poblaciones tiene diferencias significativas (18/42), entre los sectores norte-sur y centro-sur, difieren el 26% de los pares (3/12 y 15/56, respectivamente) (Apéndice III).

El grado de diferenciación genética entre poblaciones para datos haploides fue  $\phi_{pt} = 0.10$  ( $p < 0.001$ ) y resultó similar al estimado con isoenzimas ( $F_{ST} = 0.109$   $p < 0.01$ ). El test de análisis de varianza molecular (AMOVA) para todas las poblaciones indica que la mayor diversidad se encuentra dentro de las poblaciones (Tabla III. 11). La geográfica es la única de las tres hipótesis probadas en la que la variación haplotípica entre los sectores es estadísticamente significativa. Para este escenario geográfico el porcentaje de variación encontrada entre sectores fue similar a la variación dentro de cada sector. Para todas las hipótesis geográficas probadas, la mayor variación siempre se encontró dentro de las poblaciones.

Tabla III. 11: Resultado de los análisis de varianza molecular (AMOVA) a partir de secuencias de la región del espaciador intergénico trn L-F del cloroplasto. \* =  $p < 0.05$ .

Agrupamiento	Fuente de variación	g.l.	Suma cuadrados	Varianza	% de variación
<i>P. parlatorei</i>	Entre poblaciones	20	11.336	0.03103	10.41*
	Dentro de las poblaciones	182	48.600	0.26703	89.59*
	Total	202	59.93	0.29806	
Hipótesis Biodiversidad	Entre sectores	2	1.131	-0.00370	-0.92 ns
	Dentro de sectores	18	14.127	0.04370	10.82*
	Dentro de las poblaciones	182	66.200	0.36374	90.09*
	Total	202	81.458	0.40374	
Hipótesis Orográfica	Entre sectores	3	3.968	0.01321	3.24 ns
	Dentro de sectores	17	11.29	0.03122	7.65*
	Dentro de las poblaciones	182	66.20	0.36374	89.11*
	Total	202	81.458	0.40817	
Hipótesis Geográfica	Entre sectores	2	2.856	0.01883	6.13*
	Dentro de sectores	18	8.480	0.02114	6.89*
	Dentro de las poblaciones	182	48.600	0.26703	86.98*
	Total	202	59.936	0.30701	

Los análisis filogeográficos de parsimonia mediante modelos anidados de clados no mostraron una estructuración geográfica significativa. Tanto el análisis

realizado con el programa NCPA y con el programa Permut no mostraron una asociación significativa entre la distribución de haplotipos y su ubicación geográfica.

### III. 6. Discusión

Las poblaciones de *P. parlatorei* estudiadas a partir de marcadores nucleares (isoenzimas) y citoplasmáticos (secuencias de ADN del cloroplasto) mostraron un grado significativo de asociación geográfica. Las poblaciones ubicadas al sur de la distribución mantienen una elevada diversidad genética isoenzimática y resultaron distintas genéticamente comparadas con cualquier otro grupo de poblaciones, tanto enzimáticamente como en cuanto a las características haplotídicas. Estos resultados pueden ser el reflejo de un gradiente ambiental, procesos históricos que afectaron los niveles de divergencia, o bien la combinación de ambos factores. La presencia de un haplotipo único en las poblaciones del sur posiblemente refleja una zona de cierta estabilidad a partir de la cual se produjo el desplazamiento hacia el norte que migró junto con el levantamiento de la cordillera durante el Eoceno (van der Hammen y Hooghiemstra 2001). Por otro lado, la alta diversidad isoenzimática en el sur podría sugerir que este sector habría funcionado como refugio a largo plazo para *P. parlatorei* (Quiroga y Premoli 2007). Similares resultados arrojó un estudio filogeográfico y filogenético realizado con la rana arborícola del género *Hypsoboas* muestra un patrón de estructuración geográfico similar al detectado para *P. parlatorei* en la misma área de estudio y mayor diversidad genética en las poblaciones del sector sur (Koscinski et al. 2008).

Estudios de biodiversidad de Yungas muestran evidencia de que el sector norte (según Morales et al. 1995) presenta una riqueza de 167 especies (98% del total de las especies recolectadas) 75 de las cuales se encuentran exclusivamente en este sector (Morales et al. 1995). Estos resultados proveen evidencia que el sector norte podría haber funcionado como un refugio de los taxones tropicales (Brown et al. 2001). Sin embargo, cálculos realizados a partir de los datos de Morales et al. (1995) basados exclusivamente en la distribución de las especies leñosas del bosque montano, indican

que de un total de 54 especies, tres se encuentran exclusivamente en el sector sur o centro. Aunque la mitad de las especies montanas están restringidas al sector norte, el hecho de que algunas se encuentren solamente en el centro y sur puede sugerir persistencia local de elementos montanos dentro de Yungas australes en períodos cálidos como el actual.

Los sectores centro y norte son los que presentan la mayor diversidad haplotídica. Evidentemente esta área ha tenido una importante función frente a los sucesivos cambios climáticos del Cuaternario. Los cambios climáticos históricos recientes podrían haber favorecido cierto grado de diversificación dentro del sector central que resultó en una mayor diversidad genética en las secuencias del cloroplasto (poblaciones TF, SM, LC, VR, ER, EF, SL, TA, TX, CA, SA, LT, EN, TJ). La heterogeneidad ambiental de este sector caracterizada por la presencia de numerosos cordones montañosos, habría sido la facilitadora de lo que actualmente es una zona de elevada riqueza de especies leñosas montanas (Morales et al 1995) y de alta diversidad haplotídica para *P. parlatoresi*. Por otro lado, los valles habrían sido potenciales zonas de contacto durante periodos fríos. Esto habría favorecido el flujo génico detectado con ambos marcadores, entre grupos provenientes de distintos cordones montañosos y por lo tanto disminuyendo la divergencia poblacional. Por otro lado, las poblaciones del sector central y particularmente las ubicadas hacia el este resultaron isoenzimáticamente similares a las de otros sectores, por lo que se estima que estarían manteniendo un alto flujo polínico y/o podrían representar un área de reciente colonización.

La divergencia entre poblaciones arrojó valores similares del 11% y 10%, para isoenzimas y ADN del cloroplasto, respectivamente. A pesar de que *P. parlatoresi* es dioica, tiene polinización anemófila y dispersión mediada por aves y pequeños mamíferos, presentó moderado nivel de divergencia poblacional detectado con ambos marcadores. Mientras las isoenzimas manifiestan una marcada estructuración geográfica que se relaciona con la orografía de las Yungas actual, el marcador *trn* L-F del cloroplasto posiblemente refleja el desplazamiento desde el sur con la presencia de un haplotipo único, junto con el levantamiento de la cordillera (van der Hammen y

Hooghiemstra 2001) dado por la presencia de dos haplotipos comunes a toda la distribución de *P. parlatorei*. La complementariedad de marcadores nucleares y citoplasmáticos ha sido documentada para las hayas y robles europeos (Kremer et al. 2002; Magri et al. 2006) y para coníferas norteamericanas (Latta y Mitton 1997). En estos trabajos la tasa de flujo génico resultó menor para los marcadores citoplasmáticos, pero arrojaron una estructuración geográfica similar. Por el contrario, en el caso de *P. parlatorei* ambos marcadores muestran similares tasa de flujo génico y difieren en el patrón de estructuración geográfica. De esta manera se evidencia que la señal histórica que cada uno está reflejando difiere temporalmente. El patrón haplotípico muestra una posible historia de migración ocurrida posiblemente durante el Eoceno (van der Hammen y Hooghiemstra 2001), y las isoenzimas hacen lo propio con una señal histórica más reciente, posiblemente del Pleistoceno y Holoceno.

La pérdida de variación genética ocurre como resultado de cuellos de botella durante los movimientos en los periodos de expansión de los bosques (Hewitt 1996, Newton et al. 1999, Jaramillo-Correa et al. 2008). La reducción de la variación genética isoenzimática hacia el norte y a mayor altura en las poblaciones de *P. parlatorei*, puede reflejar los eventos de migración de los bosques ocasionados por los cambios climáticos. La evidencia de polen y madera fósil sugiere un descenso altitudinal de las especies tolerantes a climas fríos del bosque montano del trópico y subtrópico, incluyendo a *Podocarpus*, a finales del Pleistoceno entre 26000-33000 años antes del presente (Colinvaux et al. 2000; Pennington et al. 2000, 2004). Durante los ciclos glaciarios, las especies intolerantes a las altas temperaturas habitaron las zonas bajas de las áreas tropicales formando poblaciones boscosas aisladas (Colinvaux et al. 2000). Así, la expansión hacia el norte habría ocurrido durante los períodos fríos (glaciarios) mientras que los eventos de contracción hacia las zonas más altas habrían ocurrido durante los períodos cálidos (interglaciarios). Estos cambios biogeográficos han sido sugeridos por los registros de polen fósil de coníferas asociadas a climas fríos, como *Podocarpus* creciendo en el Neotrópico y la evidencia del avance hacia el norte de *Araucaria* en los bosques del sureste de Brasil, sugiriendo un significativo descenso de la temperatura en períodos glaciarios (Pennington et al. 2000). De esta manera, las

características genéticas isoenzimáticas de *P. parlatorei* reflejan movimientos en latitud y altura, que junto con la evidencia polínica, pueden ser asociados a cambios climáticos que afectan directamente la ocurrencia y distribución de las especies.

*Podocarpus* es un buen bioindicador de los cambios climáticos pasados, estimados a partir de datos provenientes de macrofósiles de paleofloras, polen fósil y análisis moleculares que permiten reconstruir la evolución de ecosistemas tropicales (Ledru et al. 2007). Gentry (1986) notó la presencia actual de *Podocarpus* en las zonas bajas de los Andes tropicales pero bajo un régimen de altas precipitaciones. Dos explicaciones adicionales posibles para los movimientos neotropicales de *Podocarpus* y taxones montanos que descendieron durante períodos fríos son también un aumento de las precipitaciones o algún factor asociado a una disminución en la concentración de CO<sup>2</sup> en la atmósfera glacial (Hooghiemstra et al. en prensa). Esta evidencia de movimientos altitudinales también ha sido mostrada por Jaramillo-Correa et al. (2008, y sus referencias) para especies de coníferas de Mesoamérica.

Durante los sucesivos períodos de expansión, contracción y fragmentación donde los niveles de deriva génica y flujo génico varían, es frecuente que ocurra divergencia entre grupos aislados geográficamente, como lo detectó Ledig et al. 1997 con isoenzimas en *Abies* de Centroamérica. Similares cambios en latitud y altura se encontraron en especies del hemisferio norte como *Pinus longaeva* (Critchfield 1984) y *Picea mexicana* (Ledig et al. 2002). Así los cordones montañosos no son barreras geográficas, sino que facilitan la supervivencia y migración de las especies adaptadas al frío, como también se postula para los cordones montañosos europeos donde se habrían expandido las especies de *Fagus* (Magri et al. 2006).

La persistencia de elementos tolerantes al frío fue propuesta por Markgraf et al. (1995) en áreas que fueron glaciadas en la Patagonia, y se evidenció usando patrones de distribución de variación genética en los *Nothofagus* del sur (Premoli 1997, 1998; Marchelli et al. 1998) y en coníferas raras como las Cupressaceas (Premoli 1998; Allnutt et al. 1999, 2003; Premoli et al. 2000a; Premoli et al. 2002). En las Yungas se ha encontrado as través de análisis de polen del Cuaternario que elementos templados de origen austral y con amplia distribución (Van der Hammen y Hooghiemstra, 2001),

como *Azara*, *Podocarpus* y *Weinmania*, sus persistencias también han sido exitosas durante los períodos fríos. Estos resultados para las especies del BTA y los obtenidos para *P. parlatorei*, sugieren que las predicciones sobre el comportamiento de las especies en relación con los cambios climáticos deberían ser consideradas según la tolerancia ecológica particular de cada especie (Premoli et al. 2007).

*Podocarpus parlatorei* alberga elevada diversidad genética total medida por isoenzimas ( $H_T = 0.163$ ), lo cual puede explicarse en términos de su historia de vida y características ecológicas, tales como tamaños poblaciones considerables, alta fecundidad y longevidad. *P. parlatorei* es dioica y, por tanto, se espera altas tasas de fecundación cruzada. Asimismo, la diversidad génica ( $h=0.5985$ ) de *P. parlatorei* resultó similar a otras gimnospermas (por ejemplo *Juniperus przewalskii*  $h= 0.568$ , Zhang et al. 2005). Sin embargo, la diversidad haplotídica de *P. parlatorei* es baja. Esta combinación de elevado valor de  $h$  y bajo nivel de  $\pi$ , pueden estar indicando un rápido crecimiento poblacional a partir de un acervo genético histórico relativamente pequeño, con tiempo suficiente para recuperar la variación haplotídica por mutación pero poco tiempo para acumular mutaciones entre secuencias. El exceso de heterocigotas estimado en *P. parlatorei* ( $F_{IS} = -0.104$ ) es similar a lo encontrado en *Picea mexicana* ( $F_{IS} = -0.107$ ), que también crece en ambientes de altura de la Sierra Madre Oriental y Occidental (Ledig et al. 2002). Esto puede sugerir una ventaja selectiva de individuos heterocigotas o que debido a su sistema reproductivo alógamo la endogamia es extremadamente rara. Como resultado de esta elevada heterocigosis, las poblaciones de *P. parlatorei* probablemente mantienen una considerable carga genética. Esto se debe principalmente a la presencia de alelos recesivos deletéreos que se encuentran en heterocigosis, dado que la selección natural tiene pocas oportunidades, o ninguna, de purgar la mayoría de estos genes como ocurre en las poblaciones con una larga historia de endogamia (Lacy 1992). Bajo un escenario global de calentamiento climático, se puede predecir que las poblaciones de especies microtéricas como *P. parlatorei* sufrirán cuellos de botella demográficos y genéticos, que pueden ser vulnerables a los efectos a largo plazo de la endogamia debido a la expresión de alelos letales en homocigosis.

**8. Apéndice III. 1:** Frecuencias alélicas para *P. parlatorei*. En negrita alelos con frecuencia menor que 0.05. Subrayados alelos únicos.

	BO	EN	LT	SA	CA	TX	TA	EF	SL	ER	VR	LC	SM	TF	LB	PG	TG	CC
Idh1																		
Idh1-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mdh2																		
Mdh2-1									0.058			<u>0.034</u>						
Mdh2-2	1.000	1.000	0.983	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.923	1.000	0.433	0.966	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mdh2-3			<b>0.017</b>						<b>0.019</b>		0.567							
Mdh3																		
Mdh3-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mnr1																		
Mnr1-1	0.383	0.233	<b>0.033</b>	0.117			0.071	0.089	0.173	0.069	0.367	0.362	0.446	0.450	<b>0.050</b>	0.458	0.150	<b>0.045</b>
Mnr1-2	0.517	0.683	0.900	0.817	0.977	0.950	0.905	0.804	0.731	0.638	0.483	0.517	0.518	0.433	0.950	0.521	0.483	0.818
Mnr1-3	0.100	0.083	0.067	0.067	<b>0.023</b>	<b>0.050</b>	<b>0.024</b>	0.107	0.096	0.293	0.150	0.121	<b>0.036</b>	0.117		<b>0.021</b>	0.367	0.136
Mnr2																		
Mnr2-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mnr3																		
Mnr3-2	0.917	0.712	0.825	0.696	0.500	0.769	0.619	0.667	0.620	0.630	0.586	0.574	0.593	0.500	0.500	0.652	0.518	0.500
Mnr3-3	0.083	0.288	0.175	0.304	0.500	0.231	0.381	0.333	0.380	0.370	0.414	0.426	0.407	0.500	0.500	0.348	0.482	0.500
Per <sub>A</sub> 2																		
Per <sub>A</sub> 2-1							<b>0.036</b>	<b>0.042</b>										
Per <sub>A</sub> 2-2	0.773	0.917	1.000	0.909	0.905	0.964	0.833	0.778	0.942	0.966	0.978	0.980	0.750	1.000	0.850	0.950	0.619	0.500
Per <sub>A</sub> 2-3	0.227	0.083		0.091	0.095		0.125	0.222	0.058	<b>0.034</b>	<b>0.022</b>	<b>0.020</b>	0.250		0.150	0.050	0.381	0.500
Per <sub>A</sub> 3																		
Per <sub>A</sub> 3-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Per <sub>A</sub> 4																		
Per <sub>A</sub> 4-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Continuación

	BO	EN	LT	SA	CA	TX	TA	EF	SL	ER	VR	LC	SM	TF	LB	PG	TG	CC
Per <sub>A</sub> 5																		
Per <sub>A</sub> 5-1			<b>0.033</b>		<b>0.023</b>			0.214					0.143	0.167		0.100	0.117	0.083
Per <sub>A</sub> 5-2	0.133	0.138	0.167	0.083	0.273	0.250	0.143	0.036	0.115	0.086	0.117	0.069	0.196	0.233	0.200	0.260	0.250	0.125
Per <sub>A</sub> 5-3	0.867	0.862	0.800	0.917	0.705	0.750	0.833	0.714	0.885	0.914	0.633	0.931	0.589	0.600	0.800	0.640	0.633	0.792
Per <sub>A</sub> 5-4							0.024	<b>0.036</b>			0.250		0.071					
Per <sub>A</sub> 7																		
Per <sub>A</sub> 7-1		0.315	0.074	0.133	0.205	0.289	0.286	<b>0.020</b>			0.133	0.276				0.071		0.125
Per <sub>A</sub> 7-2		0.130	<b>0.037</b>	0.133	<b>0.023</b>	0.237	<b>0.048</b>	0.060	0.096			<b>0.034</b>				0.190		0.125
Per <sub>A</sub> 7-3	1.000	0.556	0.889	0.733	0.773	0.474	0.667	0.920	0.904	1.000	0.867	0.690	1.000	1.000	1.000	0.738	1.000	0.750
Pgi2																		
Pgi2-1													<b>0.020</b>			<b>0.023</b>		
Pgi2-2		0.117	0.119		0.114	0.068		0.130	0.154	0.143			<b>0.040</b>	<b>0.017</b>	<b>0.050</b>	<b>0.045</b>	<b>0.050</b>	0.125
Pgi2-3		0.133	0.095	0.278	0.205	0.114		0.217	0.173	0.214			0.100	<b>0.033</b>	0.150	0.159	0.067	
Pgi2-4	0.966	0.750	0.786	0.667	0.682	0.818	1.000	0.652	0.673	0.643	0.771	1.000	0.840	0.950	0.800	0.773	0.883	0.875
Pgi2-5	<b>0.034</b>			0.056							0.229							
Pgm1																		
Pgm1-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pgm2																		
Pgm2-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.950	0.615	1.000	1.000	1.000	1.000	0.983	1.000
Pgm2-3											<b>0.050</b>	0.385					<b>0.017</b>	

8.1 Apéndice III. 2: Pares de distancias geográficas (km) debajo de la diagonal y pares de  $\phi_{pt}$  (divergencia genética) arriba de la diagonal, para 21 poblaciones de *P. parlatorei*. En gris se muestran los pares de  $\phi_{pt}$  estadísticamente significativos ( $p < 0.05$ ) distintos de cero. En naranja se indican las poblaciones del sector norte, en verde las poblaciones del sector centro y en celeste las poblaciones del sector sur, según la hipótesis geográfica.

Población	BO	VS	MTG	TJ	EN	LT	SA	CA	TX	TA	EF	SL	ER	VR	LC	SM	TF	LB	PG	TG	CC
BO		0.220	0.080	0.350	0	0.222	0.135	0.075	0.158	0.278	0.533	0.106	0.075	0.295	0	0.278	0.348	0	0.366	0	0
VS	185		0.050	0.470	0	0.156	0.046	0	0	0.144	0.396	0.004	0	0.154	0	0.144	0.221	0	0.248	0	0
MTG	266	86		0.344	0.179	0.111	0.134	0.133	0.194	0.176	0.328	0.152	0.133	0.197	0.231	0.176	0.205	0.231	0.216	0.318	0.231
TJ	438	278	194		0.060	0.253	0.184	0.108	0.221	0.314	0.599	0.132	0.108	0.359	0	0.314	0.397	0	0.397	0	0
EN	502	354	279	105		0.260	0	0	0.005	0.096	0.307	0	0	0.072	0	0.096	0.127	0	0.179	0.042	0
LT	503	367	290	111	14		0	0.041	0.047	0	0.065	0	0.041	0	0.125	0	0	0.152	0.048	0.246	0.152
SA	582	455	378	194	100	88		0	0	0	0.099	0	0	0	0.056	0	0	0.056	0.041	0.162	0.056
CA	654	522	445	257	168	155	67		0	0.020	0.209	0	0	0.013	0	0.020	0.071	0	0.112	0.075	0
TX	686	563	471	306	209	198	111	54		0.290	0.150	0	0	0	0.025	0	0.023	0.025	0.081	0.158	0.025
TA	688	567	493	311	214	203	117	61	8		0	0	0.020	0	0.121	0	0	0.155	0.023	0.278	0.155
EF	724	583	501	308	234	220	139	82	97	103		0.171	0.209	0	0.388	0	0	0.399	0.052	0.533	0.399
SL	767	650	577	395	298	288	202	141	90	85	142		0	0.027	0	0	0.037	0.012	0.104	0.106	0.012
ER	774	640	582	368	286	273	187	121	104	117	63	101		0.013	0	0.020	0.071	0	0.112	0.075	0
VR	847	781	640	449	352	352	374	196	161	160	149	89	86		0.172	0	0	0.172	0.008	0.309	0.172
LC	909	785	708	519	419	419	330	263	223	220	220	143	157	71		0.121	0.216	0	0.249	0	0
SM	958	831	753	563	475	463	309	307	270	268	258	193	196	111	63		0	0.155	0.023	0.278	0.155
TF	989	864	786	595	508	496	408	340	303	301	289	225	227	145	81	33		0.230	0.001	0.359	0.230
LB	1059	939	863	675	585	573	485	419	377	373	375	292	311	226	156	117	89		0.210	0	0
PG	1147	1026	949	759	671	659	571	504	464	461	455	380	393	167	241	198	166	89		0.333	0.210
TG	1176	1051	972	780	695	683	595	528	490	488	472	410	412	357	267	221	187	127	51		0
CC	1202	1083	1006	816	728	716	628	561	520	517	498	436	450	366	297	254	222	144	57	59	

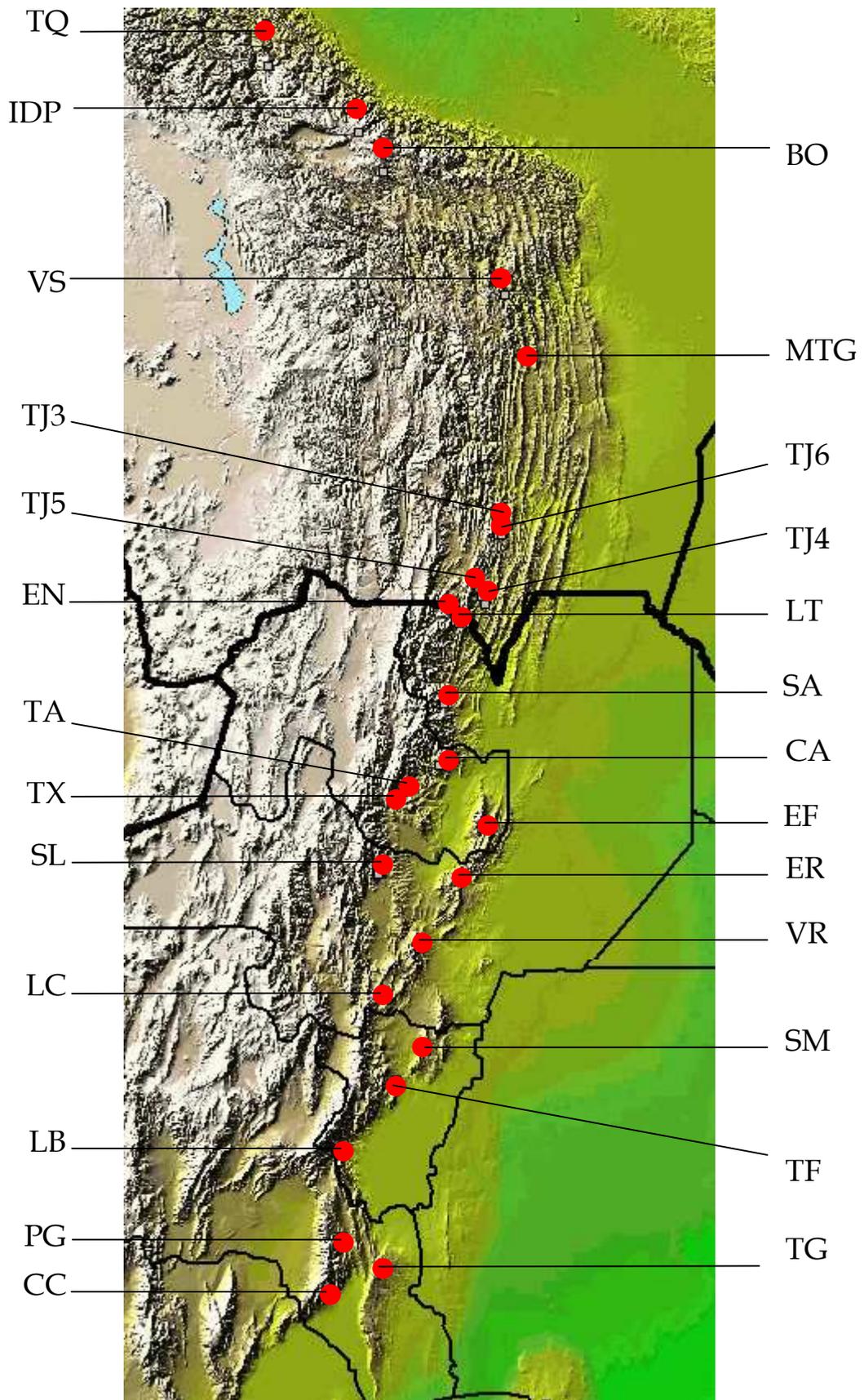


Figura III. 1: Ubicación geográfica de las poblaciones estudiadas de *Podocarpus parlatoarei* en el noroeste de Argentina y sur de Bolivia. Los nombres de las poblaciones están en la Tabla III. 1

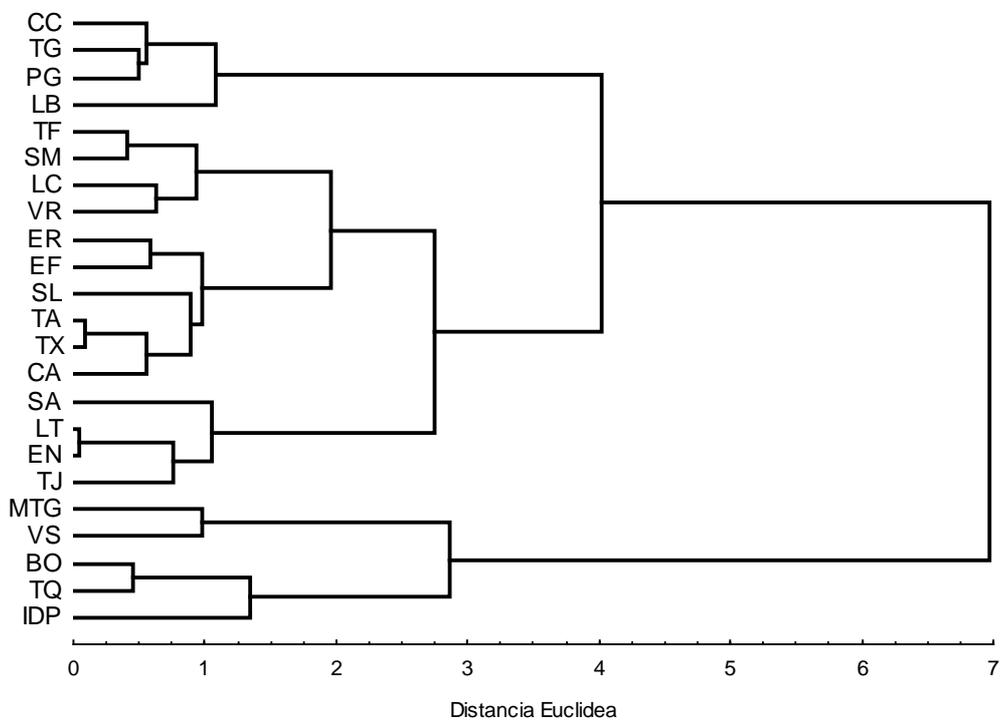


Figura III. 2: Cluster de distancia geográficas para todas las poblaciones analizadas con el espaciador intergénico del cloroplasto *trn* L-F. El cluster superior agrupa a las poblaciones del sector sur, el central a las del centro y el inferior a las del norte

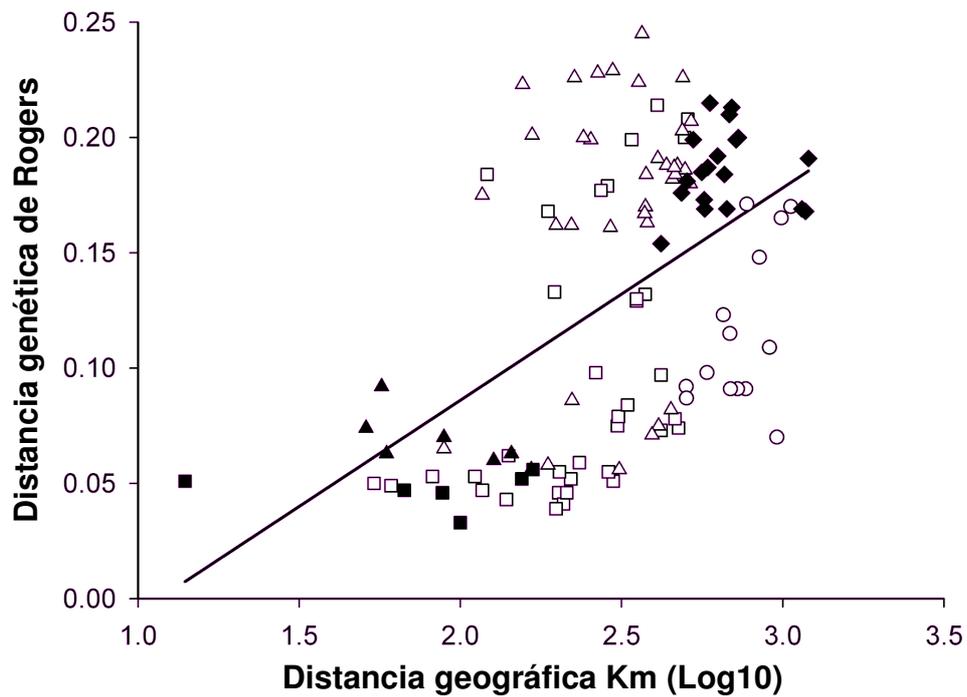


Figura III. 3: Relaciones entre la distancia geográfica y la distancia genética calculada con isoenzimas para las poblaciones de *P. parlatorei*. Se distinguen los sectores geográficos norte, sur y otros en los que se incluye el centro este y oeste según Brown y Ramadori (1989). También se incluyen las relaciones de la población BO. Las relaciones se muestran por sector (norte ■, sur ●) y entre sectores (norte-sur ◆, norte con otras □, sur con otras △, y BO con otras ○).

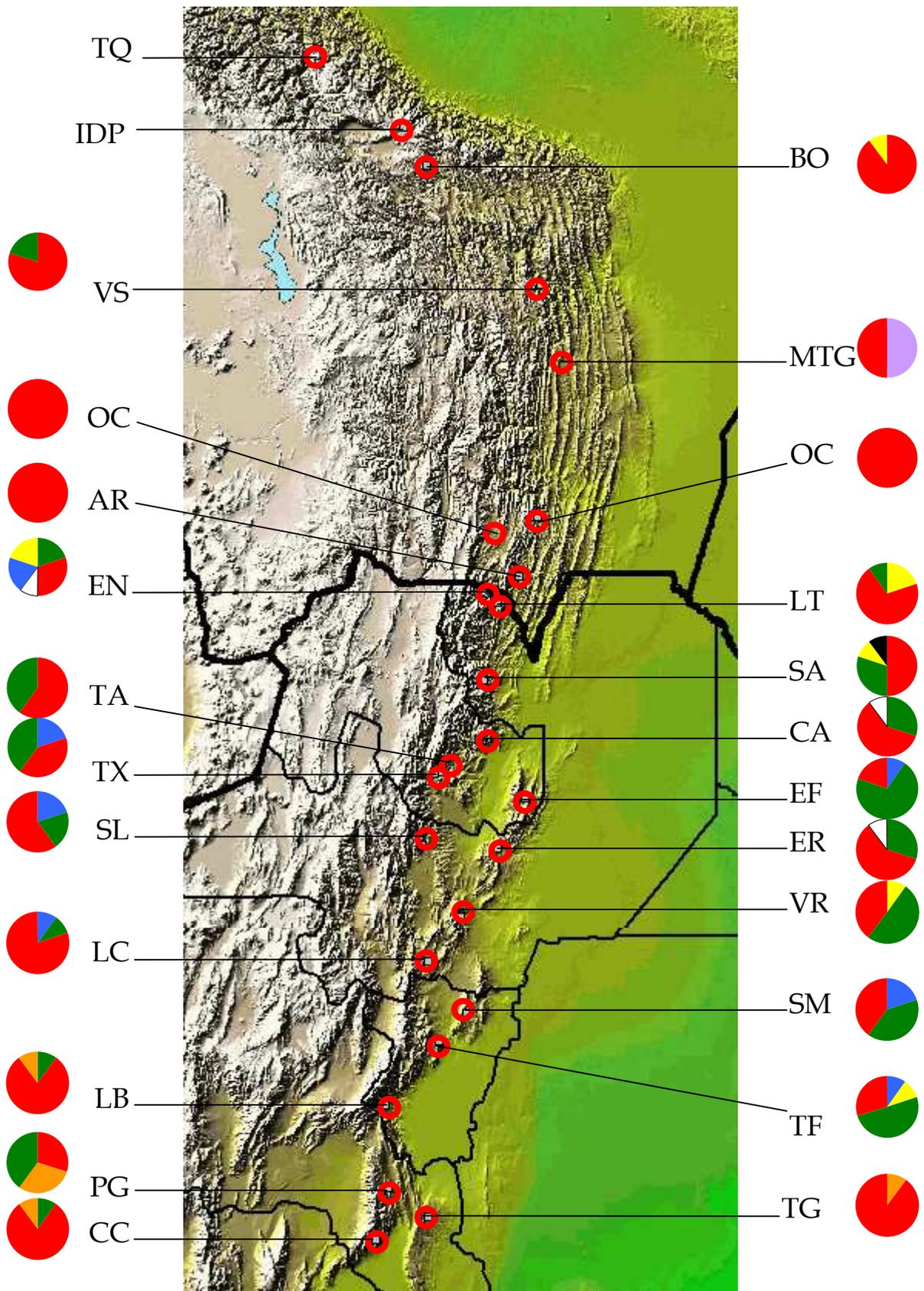


Figura III. 4: Distribución de los haplotipos del ADN del cloroplasto de la región *trn* L-F en 21 poblaciones de *Podocarpus parlatorei*. Los gráficos de círculos representan la frecuencia de los haplotipos en cada población. Haplotipo i: Naranja, ii: Rojo, iii: Verde, iv: Celeste, v: Amarillo, vi: Blanco, vii: Negro, viii: Violeta.

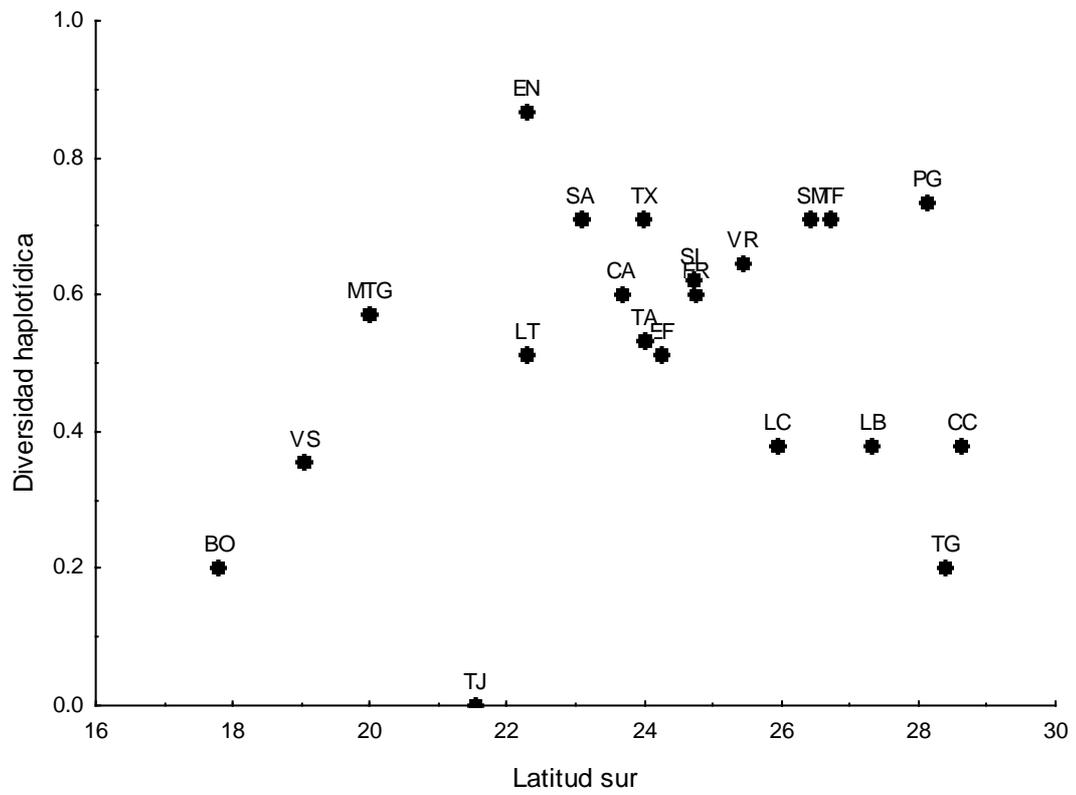


Figura III. 5: Distribución de la diversidad haplotídica con la latitud para las 21 poblaciones de *P. parlatorei*.

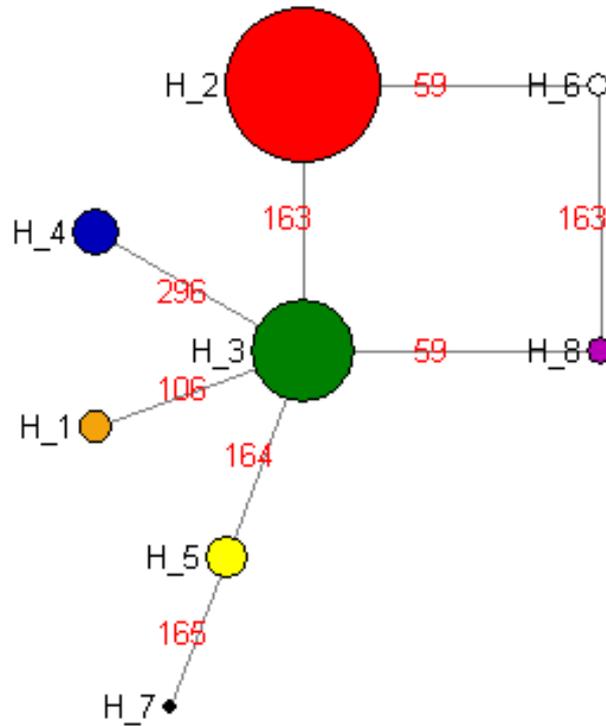


Figura III. 6: Red de haplotipos (H) de ADN del cloroplasto para la región *trn L - F* para 203 individuos correspondientes a 21 poblaciones de *P. parlatorei*. El tamaño del círculo es proporcional a la cantidad de individuos con ese haplotipo. Los números en rojo corresponden a la base donde está el cambio. H\_1: i, H\_2: ii, H\_3: iii, H\_4: iv, H\_5: v, H\_6: vi, H\_7: vii, H\_8: viii de la tabla 11.

## Capítulo IV

# La historia glaciaria y el vulcanismo en Patagonia modelaron los patrones genéticos de *Podocarpus nubigena*

### IV. 1. Resumen

En este estudio se analizan los patrones de variación genética de *Podocarpus nubigena* en respuesta a los cambios climáticos ocurridos durante los episodios glaciales en América del Sur austral. También se investigó el efecto del magmatismo desde mediados del Terciario en el pool génico de *P. nubigena* que difiere sustancialmente con la latitud. Dado que *P. nubigena* es tolerante al frío se predice que sobrevivió en diferentes poblaciones en las tierras bajas en todo el rango de distribución durante los períodos fríos, mientras que ascendió a las montañas durante las fases más cálidas. También se espera encontrar diferencias genéticas asociadas a una mayor actividad volcánica hacia el norte. Se recolectaron hojas frescas de 30 individuos seleccionados al azar en cada una de las 14 poblaciones visitadas. Se resolvieron consistentemente 12 loci isoenzimáticos de los cuales la mayoría (92%) fueron polimórficos. Se registró una elevada diversidad genética total  $H_T = 0.275$ , que fue igualmente alta en todas las poblaciones. No obstante, distintas poblaciones presentaron frecuencias alélicas distintas como se refleja en la divergencia entre poblaciones  $F_{ST} = 18\%$ , evidenciando cierto grado de aislamiento. El análisis multivariado de distancias genéticas indicó que las poblaciones al sur de  $43^\circ$  son genéticamente distintas. Las poblaciones del norte parecen haber tenido distintas historias biogeográficas. Poblaciones genéticamente diversas de áreas bajas pueden haber actuado como refugios locales, y las de mayor altitud tanto en la cordillera de la Costa como en los Andes, muestran señales de haber ascendido durante los períodos cálidos.

La elevada diversidad genética y la presencia de un alelo único en la población Lago Vargas del sur indicarían persistencia local a largo plazo. Esta población se encuentra dentro de la brecha volcánica y, por lo tanto, posiblemente haya estado menos afectada por el vulcanismo que las poblaciones en el sur de la zona volcánica. Se sugiere que los procesos magmáticos, además de las glaciaciones del Neógeno han contribuido a la estructura genética de antiguos linajes como *Podocarpus*.

## IV. 2. Introducción

Las especies de árboles de las regiones templadas han sido objeto de dramáticos cambios en sus rangos de distribución a medida que la extensión del hielo aumenta y por ende la fragmentación de poblaciones de bosque. Sin embargo, el impacto del clima sobre la vegetación dependerá de las características de historia de vida de las especies. Así, diferentes especies responderán a cambios climáticos según sus tolerancias ecológicas, reflejándolo en su constitución genética (Premoli et al. 2007). Por ejemplo, las zonas que permanecieron ocupadas por especies tolerantes al frío durante la última edad de hielo hasta el presente (es decir, en refugios), se espera que alberguen altos niveles de diversidad genética en comparación con aquellas que han sido recolonizadas después del retiro glacial (Hewitt 1996; Widmer y Lexer 2001). Sin embargo, poblaciones diversas también podrían reflejar la colonización a partir de áreas genéticamente divergentes, i.e. convergencia a partir de distintos refugios glaciarios (Petit et al. 2003). En las poblaciones que han estado sujetas a extinción y recolonización, como por ejemplo las poblaciones recién fundadas, se espera detectar una reducida diversidad genética y un incremento de los niveles de divergencia entre poblaciones (Wade y McCauley 1988). Esto se debe a los efectos de la deriva génica por los cuellos de botella que se producen cuando ocurre migración a distancia. Además, la reducción transitoria en el tamaño de la población puede producir un mayor impacto sobre la disminución de la riqueza alélica que sobre la diversidad genética analizada en loci neutrales, ya que los alelos raros serán más fácilmente perdidos por efecto de la deriva (Nei et al. 1975).

La persistencia local de las especies de coníferas tolerantes al frío durante los períodos glaciarios en Patagonia fue documentada con registros palinológicos (Markgraf et al. 1995; Villagrán 2001; Moreno y León de 2003; Moreno 2004), y estudios genéticos en *Fitzroya cupressoides* (Premoli 1998; Allnutt et al. 1999; Premoli et al. 2000a,b) y *Pilgerodendron uviferum* (Premoli et al. 2001, 2002; Allnutt et al. 2003). Estos estudios han aportado una nueva interpretación sobre la historia glaciaria de las latitudes australes, sugiriendo la existencia de áreas glaciadas discontinuas. Así, las

islas de vegetación resistente al frío habrían sido capaces de sobrevivir en zonas aisladas a lo largo de los rangos de distribución de las especies, incluso a altas latitudes. Esto contrasta con las pruebas genéticas de distintas especies del Hemisferio Norte, que muestran una menor diversidad genética en el norte respecto de las poblaciones que sobrevivieron en refugios ubicados en zonas más cálidas al sur del hielo (Hewitt 2000). Esto ha sido documentado mayoritariamente para las especies menos tolerantes a climas fríos (mesotérmicas). Sin embargo, recientemente se han detectado áreas de refugios al norte de Europa (Bhagwat y Willis 2008) y en el norte de Norteamérica (Rowe et al. 2004) para especies microtérmicas.

Los patrones magmáticos y tectónicos del Paleógeno y Neógeno fueron sustancialmente diferentes en distintas partes de la Patagonia (Ramos y Kay 1992; Ramos 2005). Como resultado los Andes de Patagonia pueden dividirse en dos sectores al norte y sur de los 46.30° S. A esta latitud ocurre la Triple Unión de la placa de Nazca con la Sudamericana y Antártica que se interceptan con la fosa dorsal Chilena (Ramos y Kay 1992). El segmento norte está caracterizado por un arco volcánico continuo llamado Zona Volcánica Sur (ZVS, 33–46.30° S) mientras que al sur se encuentra la Zona Volcánica Austral (ZVA, 49–54.7° S) (Stern 2004). Entre estos dos sectores existe un hiato en el arco volcánico y se encuentra una extensa planicie basáltica (Ramos y Kay 1992).

### IV. 3. Objetivo e hipótesis

En este capítulo se examina los niveles y la distribución de patrones de variación genética en poblaciones de *Podocarpus nubigena*, la Podocarpaceae arbórea más austral y tolerante al frío de los bosques templados de los Andes del sur. *Podocarpus* es un componente antiguo del Bosque Templado Austral (Kershaw y McGlone 1995). Dado que el tectonismo y magmatismo del Terciario fue sustancialmente diferente a distintas latitudes en Patagonia (Ramos y Kay 1992; Ramos 2005) también se analiza su efecto sobre el acervo genético de *P. nubigena*. Si bien latitudinalmente tiene una amplia distribución (ver capítulo I) ocurre en poblaciones relativamente pequeñas y

aisladas. Debido a su valiosa madera, *P. nubigena* se considera en situación de riesgo (Premoli 1994) a causa de la tala, del pastoreo por el ganado, y al uso de su hábitat para las plantaciones comerciales y agricultura (Hechenleitner et al. 2005).

La hipótesis que se analiza en este capítulo es que las poblaciones de la especie microtérmica *Podocarpus nubigena* sobrevivieron localmente en zonas de baja altitud durante los períodos glaciarios y luego del retiro de los hielos se desplazó a las regiones montañosas.

-Se espera encontrar evidencia de refugios múltiples, i.e. centros de elevada variación genética dentro de las poblaciones a lo largo de la distribución geográfica de la especie.

-Se espera detectar altos niveles de diversidad genética en poblaciones que funcionaron como refugios glaciarios.

-Se espera que poblaciones que resultaron de la recolonización postglaciaria muestren reducida diversidad genética producto de cuellos de botella genéticos por migración a distancia.

-Se espera que zonas producto de la convergencia de rutas migratorias desde distintos refugios alberguen elevada diversidad genética.

-Se analiza además la hipótesis de que en áreas hacia el sur de la distribución donde la actividad tectónica y magmática fue mayor, las características genéticas de las poblaciones fueron afectadas por estas actividades. Se espera encontrar divergencia genética producto de las disyunciones generadas por la actividad volcánica.

## IV. 4. Materiales y métodos

### IV. 4. 1. Poblaciones estudiadas de *Podocarpus nubigena*.

Entre diciembre y marzo de los años 2002 a 2008 se muestrearon 14 poblaciones de *P. nubigena* a lo largo de su distribución geográfica (Tabla IV. 1, Figs. I. 5 y IV. 1). Dos poblaciones se encuentran en Argentina, mientras que las restantes en Chile.

Tabla IV. 1: Ubicación de las poblaciones de *P. nubigena* muestreadas. PN: Parque Nacional, PP: Propiedad Privada, RP: Reserva Privada.

Nombre	Población	Estado de conservación	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m snm)	País	Tamaño muestral
1. ON	Oncol	RP	39° 45'	73° 20'	450	Chile	30
2. ANT	Antillanca	PN	40° 46'	72° 15'	800	Chile	11
3. PB	Puerto Blest	PN	41° 14'	71° 24'	750	Argentina	30
4. MU	Los Muermos	PP	41° 24'	73° 29'	110	Chile	30
5. LÑ	Lahuen Ñadi	PP	41° 26'	73° 06'	107	Chile	27
6. AST	Astillero	PP	41° 45'	73° 33'	10	Chile	30
7. SD	Senda Darwin	RP	41° 52'	73° 40'	38	Chile	35
8 HU	Huillinco	PP	42° 41'	73° 56'	22	Chile	21
9. LM	Lago Menéndez	PN	42° 44'	71° 59'	500	Argentina	14
10. FT	Futaleufú	PP	43° 25'	72° 05'	152	Chile	29
11. RF	Río Frío	PP	43° 40'	72° 20'	110	Chile	18
12. QLT	Queulat	PN	44° 38'	72° 26'	520	Chile	30
13. MÑH	Mañihuales	PP	44° 49'	72° 12'	200	Chile	20
14. LVG	Lago Vargas	PP	47° 39'	72° 59'	150	Chile	29

#### IV. 4. 2. Electroforesis de isoenzimas

En cada población se realizó un muestreo de follaje fresco de aproximadamente 30 individuos adultos seleccionados al azar distante uno de otro al menos 10 m para evitar muestrear individuos emparentados. Sin embargo, en poblaciones extremadamente pequeñas se muestrearon todos los individuos presentes (por ejemplo población Río Frío). En total se colectaron muestras de 354 individuos que fueron acondicionadas para su transporte al laboratorio y posterior extracción de isoenzimas siguiendo la metodología desarrollada para *P. parlatorei* como se indica en el capítulo III.

Los análisis isoenzimáticos se realizaron con tres sistemas buffer donde se resolvieron ocho sistemas isoenzimáticos que totalizaron 20 loci (Tabla IV. 2). De éstos, los 12 loci que resultaron consistentemente revelados en todas las poblaciones fueron utilizados para los análisis. Los sistemas utilizados fueron el Sistema A (Clayton y Treliak 1972) pH 6.1 se corrió a 20 mÅ y se resolvieron isocitrato deshidrogenasa (Idh1), malato deshidrogenasa (Mdh1, Mdh2) y fosfoglucoisomerasa (Pgi1, Pgi2); el Sistema 16 (O'Malley et al. 1979) pH 8.5 se corrió a 25 mÅ y se resolvieron distintos loci de peroxidasa anódica (Per<sub>A1</sub>, Per<sub>A2</sub>, Per<sub>A3</sub>, Per<sub>A4</sub>, Per<sub>A5</sub>) y el Sistema 26 (Poulik

1957) pH 8.2 se corrió a 25 mÅ y se resolvieron enzima málica (Me), menadiona reductasa (Mnr1, Mnr2), peroxidasa catódica (Per<sub>C1</sub>, Per<sub>C2</sub>, Per<sub>C3</sub>, Per<sub>C4</sub>, Per<sub>C5</sub>) y fosfoglucomutasa (Pgm1, Pgm2). De los análisis se excluyeron los loci Idh, Mdh1, Per<sub>A1</sub>, Per<sub>A2</sub>, Per<sub>C2</sub>, Pgm2, Pgi1 y Pgi2 por no haberse resuelto satisfactoriamente en todas las poblaciones. Todos los sistemas se corrieron durante 6 horas.

Tabla IV. 1: Ubicación de las poblaciones de *P. nubigena* muestreadas. PN: Parque Nacional, PP: Propiedad Privada, RP: Reserva Privada.

Nombre	Población	Estado de conservación	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m snm)	País	Tamaño muestral
1. ON	Oncol	RP	39° 45'	73° 20'	450	Chile	30
2. ANT	Antillanca	PN	40° 46'	72° 15'	800	Chile	11
3. PB	Puerto Blest	PN	41° 14'	71° 24'	750	Argentina	30
4. MU	Los Muermos	PP	41° 24'	73° 29'	110	Chile	30
5. LÑ	Lahuen Ñadi	PP	41° 26'	73° 06'	107	Chile	27
6. AST	Astillero	PP	41° 45'	73° 33'	10	Chile	30
7. SD	Senda Darwin	RP	41° 52'	73° 40'	38	Chile	35
8 HU	Huillinco	PP	42° 41'	73° 56'	22	Chile	21
9. LM	Lago Menéndez	PN	42° 44'	71° 59'	500	Argentina	14
10. FT	Futaleufú	PP	43° 25'	72° 05'	152	Chile	29
11. RF	Río Frío	PP	43° 40'	72° 20'	110	Chile	18
12. QLT	Queulat	PN	44° 38'	72° 26'	520	Chile	30
13. MÑH	Mañihuales	PP	44° 49'	72° 12'	200	Chile	20
14. LVG	Lago Vargas	PP	47° 39'	72° 59'	150	Chile	29

#### IV. 4. 3. Análisis de electroforesis de isoenzimas

Los niveles de variación isozímica dentro de las poblaciones y la especie se calcularon utilizando el programa POPGENE v. 1.32 (Yeh et al. 1999). Estos fueron: la cantidad de alelos totales ( $A_T$ ), número medio de alelos por locus ( $N_A$ ), la riqueza alélica ( $R_A$ ), el número efectivo de alelos por locus ( $N_E$ ), el número de alelos de baja frecuencia ( $A < 0.05$ ), el porcentaje de loci polimórficos sin criterio ( $P_{SS}$ ), y la heterocigosis observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_E$ ) bajo la condición de equilibrio Hardy - Weinberg. Para analizar posibles rutas migratorias en *P. nubigena* y la formación de clines en los parámetros de diversidad se realizaron regresiones lineares múltiples. Se utilizó como variables dependientes las frecuencias alélicas y los índices de variación genética de cada población, y como variables independientes la latitud, longitud y

altura que fueron introducidas en el modelo mediante el procedimiento de “forward stepwise”.

Para determinar si las poblaciones de *P. nubigena* experimentaron cuellos de botella se calculó la riqueza alélica para cada población, utilizando el método de rarefacción para muestras de tamaño variable (El Mousadik y Petit 1996). La riqueza alélica, al estandarizar el número de alelos por población, permite comparar este índice para un tamaño de muestra igual en todas las poblaciones (El Mousadik y Petit 1996). Concretamente el método de rarefacción fue desarrollado por Hurlbert (1971) que desarrolló una ecuación en la que se obtiene el número esperado de especies en una muestra de  $n$  individuos seleccionados aleatoriamente de una muestra conteniendo  $N$  individuos,  $S$  especies y  $N_i$  individuos de la  $i$ ésima especie. Los términos de la ecuación de rarefacción son los siguientes,  $R_A$  es el número de alelos diferentes para una muestra de  $g$  genes, especificado por el tamaño muestral, para un locus en cuestión. Si de un total de  $N$  ( $N > g$ ) copias de genes  $g$  son examinados para un locus dado, el número esperado de alelos diferentes en una muestra de tamaño  $g$  puede obtenerse a partir de la formula:

$$R_A = \sum_i \left[ 1 - \binom{N - N_i}{g} / \binom{N}{g} \right]$$

donde,  $N_i$  representa el numero de ocurrencias del  $i$ ésimo gen de una muestras de  $N$  copias de genes. La interpretación de la  $R_A$  debe realizarse sobre un número uniforme de muestras entre todas las poblaciones comparadas, de otra manera su interpretación puede ser errónea. Para el cálculo del índice de rarefacción o riqueza alélica para las poblaciones de *P. nubigena*, se utilizó el número mínimo de individuos muestreados en al menos una población ( $N = 8 = 16$  genes) y seis loci Mnr1, Mnr2, Mdh2, Per<sub>A</sub>4, Per<sub>A</sub>5 y Perc4. No se utilizaron ni más loci ni mas individuos por que el programa cuando hay un dato faltante elimina ese individuo de toda la matriz. Para los demás loci polimórficos, en las poblaciones con reducido número de individuos, la cantidad de

datos faltantes resultó elevada. Por estas razones se compensó entre la pérdida de loci y la disminución de individuos.

La endogamia para cada locus dentro de cada población fue estimada utilizando el índice de fijación  $F_{IS} = 1 - H_O/H_E$  (Wright 1931). La desviación de las frecuencias genotípicas de la condición de equilibrio Hardy-Weinberg y la significancia de los índices de fijación fueron analizadas por el test de  $\chi^2$  (Li y Horvitz 1953). La estructura genética dentro de las poblaciones se analizó mediante el índice de fijación  $F_{IS}$  (Wright 1922). El promedio de endogamia dentro de las poblaciones ( $F_{IS}$ ) y el grado de divergencia entre poblaciones ( $F_{ST}$ ) fueron estimados utilizando los loci polimórficos (Wright 1965) con el programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet 2002). Las medias y los intervalos de confianza del 99% (IC 99%) se calcularon mediante remuestreos según Weir y Cockerham (1984). Los pares de  $F_{ST}$  se calcularon para todos los pares de poblaciones. La asociación entre el  $\log_{10}$  de los pares de  $F_{ST}$  y  $\log_{10}$  de las distancias geográficas se analizó con un test de Mantel. Se estimó indirectamente el flujo génico como  $Nm = F_{ST} = 0.25(1 - F_{ST})/F_{ST}$ . La diversidad genética total ( $H_T$ ) y la diversidad dentro de las poblaciones ( $H_S$ ) se calculó con los loci polimórficos según Nei (1973). Las distancias genéticas entre las poblaciones se investigó mediante un análisis multivariado UPGMA utilizando las distancias genéticas no sesgada de Nei (1978)

#### IV. 4. 4. Secuenciación de ADN

Se extrajo ADN de al menos un individuo de cada población siguiendo la metodología desarrollada para *P. parlatorei* como se indica en el capítulo III, en total se tomaron muestras de 29 individuos. Se optimizaron y se secuenciaron seis regiones no codificantes del ADN del cloroplasto, dos regiones de la mitocondria y la región ITS 1y 2 nuclear (Tabla IV. 3).

Tabla IV. 3: Regiones probadas y amplificadas en *P. nubigena* para detectar polimorfismo intraespecífico utilizando distintos marcadores universales. Temperatura de acoplamiento del iniciador a la secuencia de ADN de las PCR y resultado de las regiones amplificadas satisfactoriamente.

	Temperatura de acoplamiento	Tamaño del producto de PCR	Grado de variación	Cita del iniciador
Marcadores del cloroplasto				
<i>trn</i> L-F	54°C	370 pb	monomórfico	Taberlet et al. 1991
<i>trn</i> Le1-e2	56°C	500 pb	monomórfico	Taberlet et al. 1991
<i>trn</i> D-T	54°C	700 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
<i>trn</i> C-Dm	58°C	no amplifico	monomórfico	Demesure et al. 1995
<i>trn</i> F-Vr		no amplifico		Dumolin-Lapegue et al. 1997
<i>trn</i> H - <i>psbA</i>		no amplifico		Hamilton 1999
<i>psb</i> B-H		no amplifico		Hamilton 1999
<i>trn</i> S-Tm	58°C	1000 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
<i>trn</i> H-K	58°C	bandas múltiples		Demesure et al. 1995
Marcadores de la mitocondria				
<i>nad</i> 1	52°C	170 pb	monomórfico	Demesure et al. 1995
<i>cox</i> 1	47°C	700 pb	monomórfico	Lu et al. 1998
Marcadores genómicos ITS				
Cy1-Cy3	49°C	3000 pb	monomórfico	Wright et al. 2006
Pod-JKf-JKr	49°C	regiones internas	monomórfico	Wright et al. 2006

## IV. 5. Resultados

Los loci analizados mostraron un polimorfismo elevado, 11 de un total de 12 loci resultaron polimórficos en al menos una población (91.7%, Tabla VI. 4; Apéndice IV.

1). El polimorfismo promedio para las poblaciones fue de 65%. Los índices de variación calculados para el nivel poblacional siempre resultaron sensiblemente menores que al nivel de especie (Tabla VI. 4). Los análisis de regresión múltiple en relación con la ubicación geográfica resultaron estadísticamente significativas para 12 frecuencias alélicas (Tabla IV. 5) mientras que con las variables de variación genética fueron no significativos.

Tabla IV. 4: Parámetros de variación genética en 14 poblaciones de *P. nubigena*. AT número alelos totales, NA número medio de alelos por locus, RA riqueza alélica, NE número efectivo de alelos por locus, A<0.05 alelos con frecuencia <0.05, Pss porcentaje de loci polimórficos sensu stricto, HO y HE heterocigosis observada y esperada respectivamente. Los errores estándar están entre paréntesis. (\*) Valor estadísticamente distinto de cero. Las referencias de las poblaciones se indican en la Tabla 14.

Población	A <sub>T</sub>	N <sub>A</sub>	R <sub>A</sub>	N <sub>E</sub>	A<0.05	P <sub>SS</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>
1. ON	21	1.75 (0.09)	1.66	1.32 (0.05)	2	66.67	0.122 (0.026)	0.203 (0.029)	0.415
2. ANT	22	1.83 (0.16)	1.67	1.35 (0.10)	2	66.67	0.122 (0.028)	0.217 (0.047)	0.325
3. PB	23	1.92 (0.09)	1.59	1.23 (0.04)	4	75	0.155 (0.031)	0.157 (0.022)	0.138
4. MU	29	2.42 (0.14)	2.05	1.61 (0.08)	6	83.33	0.203 (0.030)	0.312 (0.033)	0.374
5. LÑ	23	2.00 (0.14)	1.78	1.42 (0.06)	2	58.33	0.146 (0.023)	0.244 (0.032)	0.399
6. AST	26	2.27 (0.11)	1.85	1.50 (0.05)	3	75	0.221 (0.021)	0.294 (0.026)	0.183
7. SD	23	1.92 (0.13)	1.69	1.26 (0.05)	3	66.67	0.108 (0.025)	0.161 (0.026)	0.420
8. HU	25	2.08 (0.15)	1.74	1.43 (0.09)	4	75	0.146 (0.033)	0.230 (0.039)	0.278
9. LM	16	1.33 (0.10)	1.36	1.18 (0.07)	1	33.33	0.115 (0.059)	0.105 (0.039)	-0.005
10. FT	27	2.25 (0.15)	2.11	1.54 (0.07)	4	66.67	0.221 (0.034)	0.288 (0.035)	0.200
11. RF	19	1.58 (0.14)	1.72	1.31 (0.08)	1	41.67	0.231 (0.066)	0.175 (0.042)	-0.267
12. QTL	24	2.00 (0.14)	2.05	1.35 (0.07)	4	66.67	0.163 (0.039)	0.206 (0.036)	0.149
13. MÑH	20	1.67 (0.12)	1.78	1.34 (0.08)	2	58.33	0.175 (0.044)	0.197 (0.041)	0.194
14. LVG	26	2.17 (0.12)	2.18	1.42 (0.05)	2	75	0.180 (0.023)	0.260 (0.027)	0.277
Promedio	23.1 (0.9)	1.94 (1.76)	1.8 (0.06)	1.38 (0.05)	2.8 (0.4)	64.88 (3.62)	0.165 (0.019)	0.218 (0.006)	0.231(0.049)
<i>P. nubigena</i>	39	3.33 (0.05)	2.02	1.49 (0.02)	5	91.67	0.172 (0.006)	0.279 (0.008)	0.258*(0.087)

# R<sub>A</sub> calculada para 16 genes, 8 individuos por población, y 6 loci (Mnr1, Mnr2, Mdh, Per<sub>A</sub>4, Per<sub>A</sub>5 y Pe

Tabla IV. 5: Regresiones múltiples entre las frecuencias alélicas (variable dependiente) con la latitud, longitud y altura (variables independientes) para las 14 poblaciones analizadas de *P. nubigena*. Solamente se muestran las variables que resultaron estadísticamente significativas.

Variables independientes	Variable dependiente	r <sup>2</sup>	F	p	β
Longitud	Per <sub>A</sub> 3-1	0.77	22.84	0.001	0.68
Latitud					-0.48
Longitud	Per <sub>A</sub> 3-2	0.59	10.25	0.003	-0.61
Latitud					0.44
Latitud	Per <sub>C</sub> 4-2	0.40	8.05	0.01	0.63
Latitud	Per <sub>C</sub> 4-3	0.46	10.38	0.007	-0.68
Latitud	Per <sub>C</sub> 4-4	0.34	2.84	0.03	-0.68
Latitud	Mnr1-2	0.50	5.52	0.007	-0.69
Latitud	Mnr1-3	0.59	17.39	0.001	0.76
Altura	Me1-2	0.40	3.64	0.02	-0.67
Altura	Me1-3	0.41	8.45	0.01	0.64
Latitud	Mdh2-3	0.67	24.49	0.001	0.81
Latitud	Pgm1-3	0.45	4.58	0.01	0.78

El alelo Mdh2-4 está únicamente limitado a las poblaciones más australes FT, RF, QLT, MÑH, y LVG. También, el alelo Per<sub>C</sub>3-2 es el más común en las poblaciones del sur RF, QLT, MÑH, y LVG, mientras que el alelo Per<sub>C</sub>4-3 está en las poblaciones FT y en todas las del norte (Apéndice IV. 1). En particular, los alelos únicos se limitan a las poblaciones LÑ y MU del norte y a las poblaciones FT y LVG del sur (Apéndice IV. 1). Aproximadamente la mitad de todos los índices de fijación calculados dieron valores positivos y significativamente distintos de cero (49/109), mientras que 5/109 fueron negativos, y el resto (55/109) no difirió significativamente de cero (Tabla IV. 6). Esto resultó en una media general de endogamia dentro de las poblaciones de  $F_{IS} = 0.258$  (99% IC = 0.084 - 0.497).

Tabla IV. 6: Índice de fijación por locus en poblaciones de *P. nubigena* como medida de deficiencia (valores positivos) o exceso (valores negativos) de heterocigotas. La significancia analizada mediante test de  $\chi^2$  para loci polimórficos \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .

	ON	ANT	PTB	MU	LÑ	AST	SD	HU	LM	FT	RF	QLT	MÑH	LVG
Mdh2	0.275	0.790**	0.648**	-0.018	0.544**	0.262	0.652**	0.638**	-0.037	0.099	-0.135	-0.08	-0.04	0.336*
Me	-0.148	0.525	0.605**	-0.011	0.372	-0.055		0.486	-1 **	0.281*	0.297	0.680**		-0.143
Mnr1		-0.158		0.287*	0.600**	-0.17	1**	1**		0.169	-0.895**	-0.128	-0.02	0.053
Mnr2	1**	-0.048	-0.318	0.411**	-0.103	-0.01	-0.198*	-0.024		-0.281*	-0.9 **	-0.419	-0.29	0.363**
Per <sub>A</sub> 3	1*	0.389	-0.143	0.727**	0.645**	0.662**	0.456*	0.704**		0.747**		-0.037		-0.111
Per <sub>A</sub> 4				0.838**		0.374*	-0.014	-0.024						
Per <sub>A</sub> 5	0.021**	0.224	-0.411	0.065	0.503*	-0.039	0.124	-0.336	0.035	0.448*	0.299	0.336*	-0.29	0.212
Per <sub>C</sub> 1			-0.03	0.627**			0.648**							
Per <sub>C</sub> 3	-0.043	1**	-0.026	0.530**		0.418		0.188**	1 **	0.470**		0.862**	0.438*	0.490*
Per <sub>C</sub> 4	0.708 *	-0.119	0.273*	0.28	0.234	0.206*	0.691*	-0.127		-0.086			0.550*	0.397**
Pgm1	0.505**		0.648**									-0.023	1**	0.897**

La diversidad genética total fue  $H_T = 0.275$ , la mayor cantidad se distribuye dentro de las poblaciones ( $H_S = 0.222$ ). En promedio la divergencia entre poblaciones de *P. nubigena* fue  $F_{ST} = 0.181$  (99% IC = 0.078 - 0.301) que refleja un restringido flujo génico entre todas las poblaciones  $Nm = 0.8$  migrantes por generación. El mayor número de pares de  $F_{ST}$  significativos (29/45), fue obtenido para las poblaciones situadas en las latitudes opuestas, es decir, al norte y al sur de latitud 43° S (Tabla IV. 7, área gris). Las poblaciones de latitudes similares presentaron un menor número de pares de  $F_{ST}$  estadísticamente significativos (14/36 y 3/10 para el norte y el sur de la distribución, respectivamente). La correlación entre el  $\log_{10}$  de la distancia geográfica y  $\log_{10}$  de los pares de  $F_{ST}$  entre todos los posibles pares de poblaciones resultó no significativa.

El análisis multivariado de distancias genéticas distingue dos grupos de poblaciones. Un grupo abarca a las poblaciones del sur de la distribución (RF, QLT, MÑH, y LVG) y las separa del resto de las poblaciones a una distancia genética de alrededor del 14%, mientras que las distancias dentro de cada grupo son inferiores al 5% (Fig. IV. 2).

Los análisis de secuenciación de las nueve regiones no codificantes del ADN del cloroplasto, la mitocondria y el genoma nuclear no arrojaron secuencias polimórficas en *P. nubigena* por lo que no se realizaron análisis filogeográficos con esta especie.

Tabla IV. 7: Matriz de pares de FST (sobre la diagonal) y distancias geográficas en km (bajo la diagonal) entre las poblaciones de *P. nubigena*. En negrita se indican los pares de FST estadísticamente significativos para el intervalo de confianza del 99%. El área gris muestra las comparaciones entre las poblaciones al norte y sur de la latitud 43°S.

Poblaciones	ON	ANT	PB	MU	LÑ	AST	SD	HU	LM	FT	RF	QLT	MÑH	LVG
ON		0.109	<b>0.073</b>	0.134	0.136	0.097	0.034	0.069	<b>0.071</b>	<b>0.087</b>	<b>0.424</b>	<b>0.434</b>	<b>0.329</b>	<b>0.271</b>
ANT	145		0.206	0.093	0.006	<b>0.144</b>	0.129	0.040	0.127	0.087	<b>0.424</b>	<b>0.368</b>	<b>0.306</b>	0.265
PB	231	87		<b>0.135</b>	<b>0.193</b>	<b>0.134</b>	0.007	<b>0.125</b>	0.082	0.071	0.423	<b>0.399</b>	0.325	0.278
MU	182	124	174		0.070	<b>0.108</b>	0.085	0.056	<b>0.140</b>	0.038	<b>0.215</b>	<b>0.225</b>	<b>0.193</b>	<b>0.180</b>
LÑ	218	121	142	53		<b>0.188</b>	0.201	0.037	<b>0.130</b>	0.086	<b>0.342</b>	<b>0.313</b>	<b>0.320</b>	<b>0.272</b>
AST	221	149	188	35	46		0.054	<b>0.127</b>	<b>0.173</b>	<b>0.102</b>	<b>0.360</b>	<b>0.359</b>	<b>0.242</b>	<b>0.234</b>
SD	236	170	200	55	49	17		0.055	<b>0.176</b>	0.036	0.366	0.306	<b>0.284</b>	0.230
HU	328	253	263	147	141	108	92		0.100	0.068	<b>0.355</b>	<b>0.324</b>	<b>0.288</b>	<b>0.236</b>
LM	349	219	173	193	183	169	167	158		0.101	<b>0.524</b>	<b>0.496</b>	0.417	0.328
FT	419	294	248	252	246	221	214	171	76		<b>0.267</b>	<b>0.300</b>	<b>0.239</b>	0.209
RF	442	321	280	269	263	235	226	170	106	33		0.103	0.152	0.077
QLT	545	429	387	370	364	333	322	248	214	138	108		0.093	0.070
MÑH	569	449	402	393	387	357	347	274	231	155	131	26		0.041
LVG	878	767	724	697	691	658	644	558	552	476	446	338	321	

## IV. 6. Discusión

Las poblaciones de *Podocarpus nubigena* mantienen elevados niveles de variación genética a lo largo de su área de distribución que sugieren persistencia local a largo plazo. El polimorfismo de la especie resultó especialmente alto (92%) comparado con las otras Podocarpaceae *Podocarpus parlatorei* 57% (Cap. III) y *Podocarpus saligna* 72% (Cap. V). Además, es elevado respecto de otras especies de coníferas del bosque templado austral, como *Fitzroya cupressoides* 52% (Premoli et al. 2000a), y *Pilgerodendron uviferum* 78% (Premoli et al. 2001). La diversidad genética en *P. nubigena* ( $H_T = 0.275$ ) es similar a la que se midió en otras gimnospermas y especies leñosas de distribución templada (0.287 y 0.281, respectivamente) la mayoría de la cual se distribuye dentro de las poblaciones (Hamrick et al. 1992).

*Podocarpus nubigena* usualmente ocurre en bosques mixtos con una densidad reducida, aproximadamente <10% del total de especies de árboles presentes por rodal y un con un área basal de 6-11% / ha (Donoso et al. 2006a). Como resultado, la mayoría de las poblaciones muestreadas consistieron de un número reducido de individuos, a menudo agrupados espacialmente. Aunque dioica, la dispersión de semillas es local mediada por gravedad (PQ pers. obs.) y/o aves (Willson et al. 1996). Esto juntamente con la potencial propagación vegetativa (Donoso et al. 2006a; PQ pers. obs.) y su dependencia a condiciones edáficas de alta humedad, puede dar lugar a la formación de grupos familiares. Esto explicaría los índices de fijación positivos en promedio y dentro de la mayoría de las poblaciones debido a la endogamia biparental.

Se detectó una divergencia latitudinal en el acervo génico de *P. nubigena*. Particularmente al norte de los 43°S, las poblaciones ubicadas en los lugares más bajos (Los Muermos MU, Lahuen Ñadi LÑ, Astillero AST, Senda Darwin SD, y Huillinco HU) muestran una historia biogeográfica distinta a las poblaciones ubicadas a mayores altitudes localizadas tanto sobre la cordillera de la Costa como en los Andes (Antillanca ANT, Puerto Blest PB, y Lago Menéndez LM). Villagrán (2001) sugirió que durante el último máximo glaciario (UMG), hace aproximadamente 22000 <sup>14</sup>C años AP, las especies tolerantes a climas fríos sobrevivieron en los lugares más bajos. Este

podría ser el caso de las poblaciones genéticamente más diversas como Los Muermos MU, Huillinco HU, y Astillero AST las que podrían considerarse áreas de refugio. En particular, la poblaciones Los Muermos MU podría ser la posible fuente de Lahuen Ñadi LÑ mientras que Huillinco HU y Astillero AST podrían serlo de Senda Darwin SD. Esto se confirma por los reducidos y estadísticamente no significativos pares de valores de  $F_{ST}$  ( $F_{ST}$  MU-LÑ = 0.07,  $F_{ST}$  HU-SD = 0.055, y  $F_{ST}$  AST-SD = 0.054). Las poblaciones Lahuen Ñadi LÑ y Senda Darwin SD están próximas a donde estuvo el límite de hielo, y su comparativamente reducida diversidad genética refleja posibles episodios de evento fundador.

Las poblaciones más elevadas Oncol ON, Antillanca ANT, Puerto Blest PB, y Lago Menéndez LM, pero localizadas en distintas cordilleras (ON en la Cordillera de la Costa Pacífica, ANT sobre las pendientes oeste de los Andes y PB y LM en los Andes orientales, Fig. IV. 1) tienen similares y reducidos niveles de variación genética. Una calibración climática de polen sugiere tendencias similares del clima a ambos lados de la cordillera de los Andes durante los últimos 21000 años AP (Markgraf et al. 2002). Frecuentemente, los reducidos niveles de diversidad genética en regiones montañosas pueden ser el resultado de la deriva génica que actúa a lo largo de los movimientos altitudinales de poblaciones que sobrevivieron a la última glaciación en lugares bajos y que ascendieron durante períodos más cálidos del tardiglacial (14600 – 10000  $^{14}C$  años AP) y el Holoceno (10000  $^{14}C$  años AP) (Villagrán 2001). Por lo tanto, las poblaciones de especies tolerantes al frío como *P. nubigena* del norte de la Patagonia que actualmente se encuentran a mayores alturas pueden ser consideradas refugios durante períodos cálidos como el presente. Un escenario similar es el propuesto en esta tesis para *P. parlatoresi* que actualmente se encuentra en el Bosque Montano de Yungas (Quiroga y Premoli 2007, capítulo III).

Las poblaciones al sur de los 43° S se localizan dentro del límite del hielo del UMG (Fig. IV. 1). Se podría proponer que estas poblaciones fueron afectadas similarmente durante las glaciaciones. En particular, se sugirió que el clima frío en el sur de la Patagonia favoreció un régimen de glaciaciones que protegió la superficie de la erosión de los sucesivos ciclos glaciarios del Cenozoico tardío (Thomson et al. 2007).

Esto fue probablemente acompañado de la persistencia local de las poblaciones de especies tolerantes al frío en zonas libres de hielo como lo evidencian datos genéticos para *Nothofagus pumilio* (Premoli 1998) y la Cupressaceae *Pilgerodendron uviferum* (Premoli et al. 2002).

Por otro lado, el área al sur de los 43° S está sujeta a un activo vulcanismo. En particular, el sur de la región de la Zona Volcánica Sur (ZVS), entre los 43° y 46° S la frecuencia de las erupciones durante el Holoceno fue cada 725 años aproximadamente (Naranjo y Stern 2004). Esto corresponde a 1.4 erupciones por volcán, lo que es mucho mayor a la frecuencia de erupciones medidas para la Zona Volcánica Austral (ZVA) al sur de los 49°S durante los últimos 8000 años (Stern 2008). La mayor producción de magma en el sur de la ZVS está posiblemente asociada con la alta tasa de convergencia entre las placas de Nazca y Sudamericana (9cm/año) y el norte de la fosa dorsal chilena (Stern 2008). Por lo tanto se propone que la población Lago Vargas LVG, la cual está ubicada en el hiato volcánico, fue menos afectada por el vulcanismo que las poblaciones al sur de la ZVS. Como resultado, la población Lago Vargas LVG posiblemente haya sido la fuente para otras poblaciones al sur de los 43° S como lo sugiere el análisis multivariado de distancias genéticas, que diferencia a las poblaciones más australes Río Frío RF Queulat QLT, Mañihuales MÑH y Lago Vargas LVG de las del norte (Fig. IV. 1). Esto lo refuerzan los reducidos valores no significativos de los pares de  $F_{ST} < 0.08$  entre Lago Vargas LVG y las otras poblaciones al sur de los 43° S (Tabla IV. 7). Secuencias de ADN del cloroplasto de las regiones de los espaciadores intergénicos *psbB-H*, *trnL-F* y *trnH-psbA* en *Nothofagus pumilio* también muestran una disyunción norte - sur en la latitud 43° S (Mathiasen y Premoli 2007). Sorprendentemente, la población Futaleufú FT, distante sólo 33 km de Río Frío, no se asocia en el análisis multivariado de cluster con las poblaciones del sur. Esto, junto con el incremento de la diversidad genética en la población Futaleufú FT sugiere un origen múltiple, probablemente como resultado de convergencia de rutas migratorias a partir de distintos refugios.

Además de los factores tectónicos, a la latitud que se encuentra la población Lago Vargas LVG, la apertura entre los hielos continentales habría ocurrido hace

aproximadamente 13500 años (McCulloch et al. 2000) este corredor podría haber permitido cierto grado de flujo génico si hubieran existido poblaciones de *P. nubigena* a esa latitud y al este de la cordillera (Fig. IV. 2).

*Podocarpus* es un antiguo linaje que está bien representado en el registro fósil de Patagonia desde el Terciario. Sin embargo, las secuencias no codificantes de ADN del cloroplasto de *P. nubigena* resultaron monomórficas (Tabla IV. 2). Distinto fue el caso de la variación detectada en *P. parlatoresi* con ocho haplotipos que resultaron estar geográficamente estructurados, además de las diferencias isoenzimáticas latitudinales encontradas (Quiroga y Premoli 2007, capítulo III). Por lo tanto, la presencia de alelos únicos y la elevada diversidad genética en la población Lago Vargas LVG podría indicar que el clima templado ha favorecido la persistencia local de *P. nubigena*, incluso a latitudes elevadas, y que otros procesos además de los eventos glaciares pueden haber modelado las características genéticas de *P. nubigena*.

**8. Apéndice IV. 1:** Frecuencias alélicas para 14 poblaciones de *P. nubigena*. Los alelos de baja frecuencia (< 0.05) y los alelos únicos se indican en negrita e itálica, respectivamente.

Loci	ON	ANT	PTB	MU	LÑ	AST	SD	HU	LM	FT	RF	QLT	MÑH	LVG
Mdh2														
Mdh2-1					<b>0.020</b>									
Mdh2-2	0.172	0.318	0.054	<b>0.018</b>	0.200	0.097	<b>0.043</b>	0.079	<b>0.036</b>	0.278	0.094	0.068	<b>0.025</b>	0.167
Mdh2-3	0.828	0.682	0.946	0.982	0.780	0.903	0.957	0.921	0.964	0.685	0.844	0.909	0.95	0.759
Mdh2-4										<b>0.037</b>	0.063	<b>0.023</b>	<b>0.025</b>	0.074
Me														
Me1-1		0.500		0.342	0.467	0.125		0.389				0.375		
Me1-2	0.633	0.143	0.845	0.474	<b>0.033</b>	0.750	1.000	0.389	0.500	0.646	0.853	0.625	1.000	0.875
Me1-3	0.367	0.357	0.155	0.184	0.500	0.125		0.222	0.500	0.229	0.147			0.125
Me1-4										<b>0.042</b>				
Mnr1														
Mnr1-1				0.283	0.167	0.242		0.211		0.278				
Mnr1-2	1.000	0.864	1.000	0.522	0.833	0.726	0.939	0.789	1.000	0.722	0.528	0.591	0.438	0.429
Mnr1-3		0.136		0.196		<b>0.032</b>	0.061				0.472	0.409	0.563	0.536
Mnr1-4														<b>0.036</b>
Mnr2														
Mnr2-1				0.431	0.200		0.057			0.269	0.472	0.091		
Mnr2-2	0.967	0.955	0.759	0.534	0.720	0.810	0.671	0.976	1.000	0.538	0.500	0.636	0.647	0.845
Mnr2-3	<b>0.033</b>	<b>0.045</b>	0.241	<b>0.034</b>	0.080	0.190	0.200	<b>0.024</b>		0.192	<b>0.028</b>	0.273	0.353	0.121
Mnr2-4							0.071							<b>0.034</b>
Per <sub>A</sub> 3														
Per <sub>A</sub> 3-1	0.400	0.182	0.125	0.268	0.296	0.339	0.321	0.405		0.208		<b>0.036</b>		0.100
Per <sub>A</sub> 3-2	0.600	0.818	0.875	0.732	0.704	0.548	0.661	0.595	1.000	0.792	1.000	0.964	1.000	0.900
Per <sub>A</sub> 3-3						0.113	<b>0.018</b>							
Per <sub>A</sub> 4														
Per <sub>A</sub> 4-1				0.117		0.290	<b>0.014</b>	<b>0.024</b>						
Per <sub>A</sub> 4-2	1.000	1.000	1.000	0.883	1.000	0.710	0.986	0.976	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

Continuación

Loci	ON	ANT	PTB	MU	LÑ	AST	SD	HU	LM	FT	RF	QLT	MÑH	LVG
Per <sub>A</sub> 5														
Per <sub>A</sub> 5-1	0.052					<b>0.016</b>								
Per <sub>A</sub> 5-2	0.724	0.773	0.617	0.611	0.583	0.952	0.816	0.476	0.615	0.571	0.389	0.136	0.658	0.577
Per <sub>A</sub> 5-3			<b>0.033</b>		<b>0.021</b>					<b>0.036</b>		<b>0.023</b>		
Per <sub>A</sub> 5-4	0.224	0.227	0.350	0.389	0.396	<b>0.032</b>	0.184	0.524	0.385	0.393	0.611	0.841	0.342	0.423
Per <sub>C</sub> 1														
Per <sub>C</sub> 1-1			<b>0.029</b>	0.107			0.052							
Per <sub>C</sub> 1-2	1.000	1.000	0.971	0.893	1.000	1.000	0.948	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Per <sub>C</sub> 3														
Per <sub>C</sub> 3-1				<b>0.037</b>										
Per <sub>C</sub> 3-2				0.056		0.313		<b>0.028</b>				0.053	0.111	
Per <sub>C</sub> 3-3	0.958	0.875	0.975	0.870	1.000	0.688	1.000	0.889	0.909	0.786	1.000	0.763	0.889	0.841
Per <sub>C</sub> 3-4	<b>0.042</b>	0.125	<b>0.025</b>	<b>0.037</b>				<b>0.028</b>	0.091	0.095		0.184		0.159
Per <sub>C</sub> 3-5								0.056		0.119				
Per <sub>C</sub> 4														
Per <sub>C</sub> 4-1		<b>0.045</b>		<b>0.019</b>	0.058			0.075		<b>0.042</b>			0.444	0.083
Per <sub>C</sub> 4-2		0.091	0.071	0.185	0.154	0.107	0.190	0.075		0.063	1.000	1.000	0.556	0.778
Per <sub>C</sub> 4-3	0.857	0.864	0.893	0.778	0.788	0.786	0.810	0.85	1.000	0.896				0.139
Per <sub>C</sub> 4-4	0.143		<b>0.036</b>	<b>0.019</b>		0.107								
Per <sub>C</sub> 5														
Per <sub>C</sub> 5-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pgm1														
Pgm1-1	0.192												0.059	0.103
Pgm1-2	0.808	1.000	0.948	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.977	0.941	0.810
Pgm1-3			0.052									<b>0.023</b>		0.086
Alelos únicos				1	1					1				1

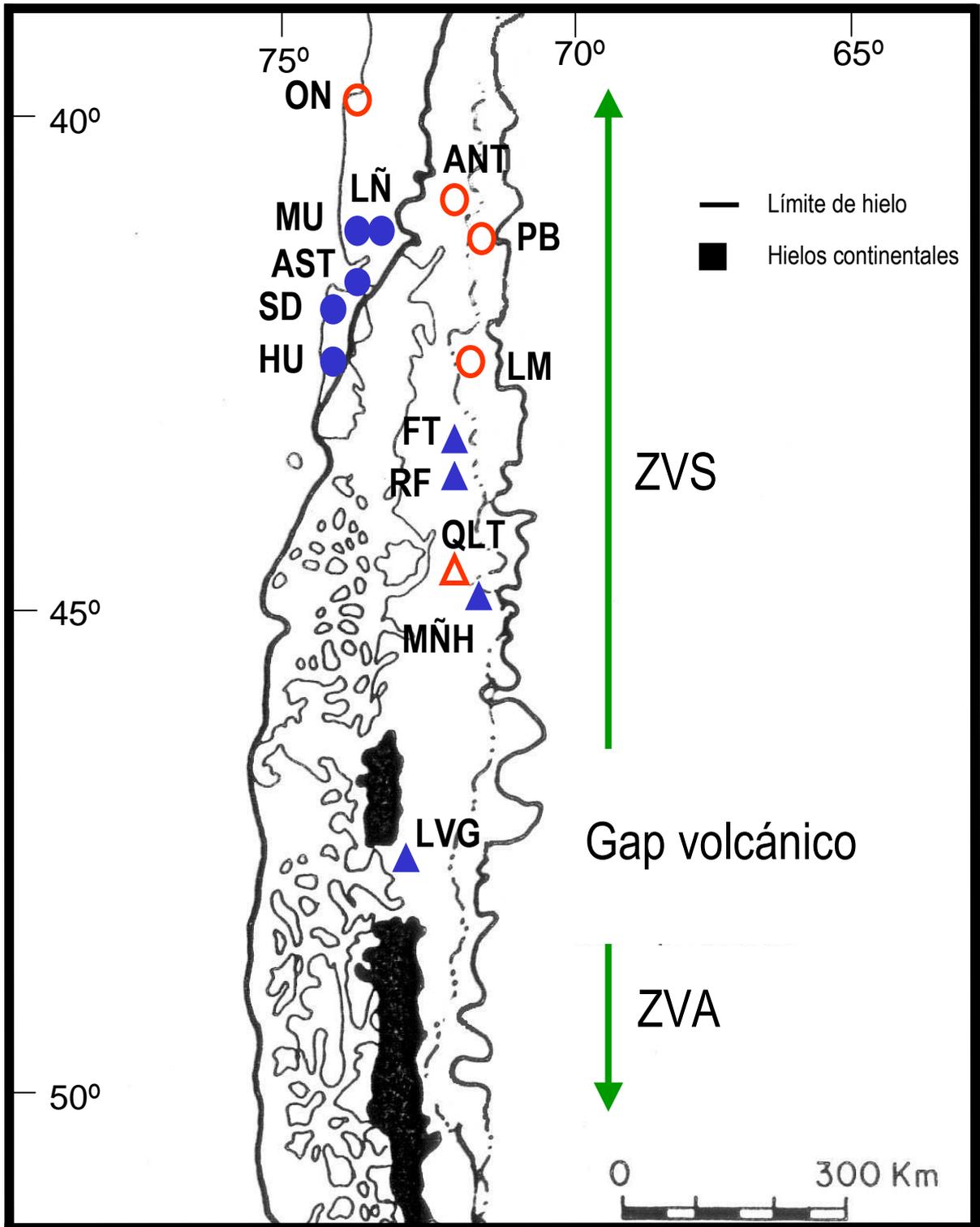


Figura IV. 1: Ubicación geográfica de las 14 poblaciones analizadas para *P. nubigena*. Se indica el límite máximo de hielo durante el UMG (de Hollin y Shiling 1981), los hielos continentales y las zonas volcánicas Sur (ZVS) y Austral (ZVA) (de Stern 2004). Las poblaciones al norte y sur de los 43° S se indican con círculos y triángulos, respectivamente. Los símbolos llenos y vacíos representan poblaciones de baja elevación y de altura, respectivamente.

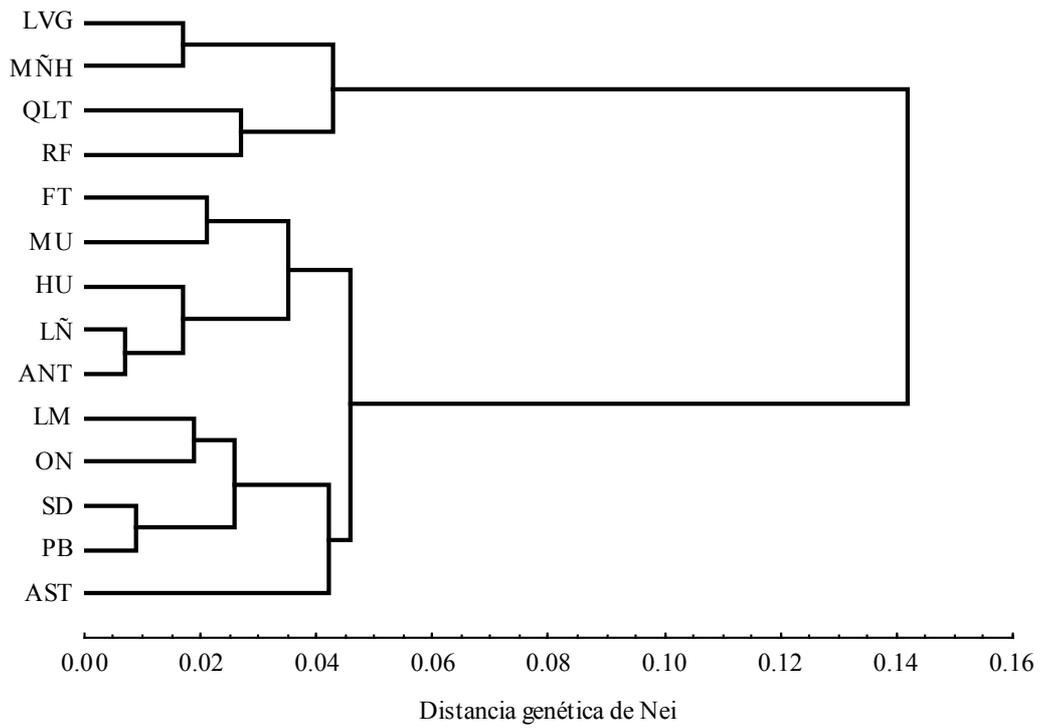


Figura IV. 2: Cluster de distancia genética para las 14 poblaciones de *P. nubigena*. El cluster superior corresponde a las poblaciones localizadas al sur de los 43°S, el inferior a las del norte.

## Capítulo V

# Diversidad, divergencia genética y relaciones filogenéticas de las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica

### V. 1. Resumen

En este capítulo se analizan los niveles de variación genética isoenzimática de las cinco especies de Podocarpaceae estudiadas en esta tesis en relación a su amplitud de distribución geográfica y continuidad de sus poblaciones. Asimismo se examinan las relaciones filogenéticas de las especies del género *Podocarpus* del Sur de Sudamérica en relación a la disyunción geográfica del bosque templado austral y montano de Yungas.

Las especies fueron comparadas a través de los niveles de variación genética calculados mediante electroforesis de isoenzimas. En total se analizaron 46 poblaciones. Para cada especie se calcularon los promedios poblacionales y el valor para la especie de distintos parámetros de variación genética ( $N_A$ ,  $N_E$ ,  $P_{SS}$ ,  $H_O$  y  $H_E$ ). Se estimó además la diversidad genética total y dentro de cada especie ( $H_T$  y  $H_S$ , respectivamente) y se realizó una análisis jerárquico de la endogamia dentro y entre las poblaciones y total mediante  $F_{IS}$ ,  $F_{ST}$  y  $F_{IT}$ . Para cada especie se midió su rango geográfico latitudinal real y el muestreo. El grado de continuidad de las poblaciones se calculó según la distancia promedio entre todas las poblaciones estudiadas y entre las poblaciones más cercanas. Se calculó la distancia genética entre pares de poblaciones de cada especie y entre las especies utilizando 5 loci que resultaron polimórficos compartidos entre las especies y se realizó un análisis multivariado de cluster mediante el método de agrupamiento de la media aritmética no ponderada (UPGMA). Se analizaron las relaciones filogenéticas de 12 especies de *Podocarpus*. Para ello se utilizaron secuencias de regiones no codificantes del cloroplasto (*trn* L-F y *rbcL*) y una región nuclear (ITS 2) para realizar análisis cladísticos de parsimonia y máxima verosimilitud, y datos de 12 caracteres morfológicos que fueron analizados mediante parsimonia. Como outgroup se utilizó *Saxegothaea conspicua* y *Prumnopytis andina*.

Las especies con amplia distribución geográfica presentan a nivel poblacional en promedio mayor heterocigosis observada y número de alelos por locus que las especies con distribución geográfica restringida. Asimismo, la

continuidad de las poblaciones explica el número promedio y efectivo de alelos ( $N_A$  y  $N_E$ ) tanto para los valores poblacionales como para el valor de las especies. No se detectó ninguna relación significativa entre las variables de diversidad genética y las variables geográficas de rango de distribución real ni muestreado. El análisis de cluster de distancias genéticas entre especies mostró una menor distancia de la especie norpatagónica *P. saligna* con la subtropical *P. parlatorei* que con la especie más austral de las podocarpaceas sudamericanas *P. nubigena*.

Los análisis filogenéticos para datos moleculares apoyan el origen monofilético del género *Podocarpus*. Las secuencias para el marcador *trn* L-F muestran que *P. parlatorei* se diversificó comparativamente más que *P. nubigena* y *P. saligna*. A partir de la evidencia se sugiere una cercana relación entre las especies con tolerancias ecológicas similares, afines a climas templado-cálidos y subtropicales montañosos las cuales probablemente evolucionaron y se diversificaron al migrar hacia el norte aprovechando la elevación de la cordillera de los Andes. Esto en contraposición a *P. nubigena*, con tolerancias ecológicas templado-frías que permaneció restringida al Bosque Templado Austral, pero pudo mantener altos niveles de variación genética más allá de los posibles cuellos de botella sufridos durante las glaciaciones.

## V. 2. Introducción

### V. 2. 1. Efectos de la amplitud de la distribución geográfica

Los estudios de variación genética de plantas analizados en relación a la amplitud de la distribución geográfica en general muestran una alta asociación de estas dos características (Hamrick et al. 1992). Cuando las especies tienen una distribución geográfica amplia y poblaciones grandes y continuas, presentan generalmente alta diversidad genética en comparación con especies emparentadas que tienen poblaciones pequeñas que sufren relativamente más los efectos de la deriva y del restringido flujo génico interpoblacional (Karron et al. 1988, Hamrick et al. 1992). Además, las especies de distribución geográfica restringida generalmente poseen altos niveles de endogamia y fuerte selección unidireccional, que produce uniformidad genética debido al ambiente específico que habitan (Karron et al. 1988; Ellstrand y Elam 1993), obteniéndose como resultado reducidos valores de diversidad genética.

Los procesos estocásticos afectan la demografía y la composición genética de las especies principalmente cuando las poblaciones son pequeñas (Lande 1988; Huenneke 1991; Schemske et al. 1994). Sin embargo, existen especies raras localmente abundantes en relación con sus congéneres ampliamente distribuidas (Lesica et al. 2006), y que pueden contrarrestar los efectos genéticos negativos de la estocasticidad demográfica. El estudio de las plantas raras, junto con las especies de distribución geográfica amplia, nos lleva a entender los patrones de abundancia y distribución de las especies en la naturaleza. Por esta razón es importante conocer las causas y consecuencias, tanto ecológicas como evolutivas, de las rarezas, ya que éstas pueden reflejar tanto patrones y procesos de especiación como de tolerancia ecológica (Gitzendaner y Soltis 2000; Lesica et al. 2006; Premoli et al. 2007).

## V. 2. 2. Filogenia

La familia Podocarpaceae es la más diversa ecológica y morfológicamente dentro de las coníferas del Hemisferio Sur. Está ampliamente distribuida en todo el Hemisferio Sur, predominantemente en regiones de clima templado méxico y áreas tropicales montañosas. El registro fósil de las Podocarpaceae se extiende desde el Triásico, y los registros durante el Cenozoico son extensos, especialmente en el sur este de Australia. Algunos géneros ahora extintos se han reportado en altas latitudes del hemisferio sur, confirmando una gran diversidad y amplitud de distribución durante el Cenozoico en toda la región sur (Hill y Brodribb 1999).

Actualmente, la familia está compuesta por 19 géneros, de los que el más grande es *Podocarpus*, con cerca de 125 especies (Conran et al. 2000). La variación morfológica en *Podocarpus* es muy grande, pero su amplitud ambiental es menor que para las Araucariaceae y Cupressaceae, ya que está restringido a bosques lluviosos o ambientes montañosos húmedos (Hill y Brodribb 1999).

Las reconstrucciones filogenéticas permiten plantear hipótesis sobre la evolución y adaptación de las especies (Pagel 1999). Para la familia Podocarpaceae se han resuelto filogenias morfológicas (Kelch 1997) y filogenias con datos moleculares (Chaw et al. 1995; Kelch 1998; Conran et al. 2000; Sinclair et al. 2002; Wagstaff 2004). La posición filogenética de la familia Podocarpaceae las ubica como grupo hermano de las Araucariaceae (Stefanovic et al 1998; Gugerli et al. 2001), y juntas son hermanas con el clado de las Taxaceae y Cupressaceae (Gugerli et al. 2001).

Dentro de la familia Podocarpaceae, *Podocarpus* es el grupo hermano de *Afrocarpus*, *Retrophyllum* y *Nageia*, y éstos a su vez están cercanamente relacionados con *Dacrycarpus*, *Dacrydium* y *Falcatifolium*. *Saxegothaea* es basal en este clado, mientras que *Prumnopitys* pertenece al clado hermano (Sinclair et al. 2002).

El género *Podocarpus* está compuesto por dos subgéneros, *Podocarpus* y *Foliolatus*. El primero se distribuye en todos los continentes australes, mientras

que el segundo no está presente en Sudamérica. El subgénero *Foliolatus* está representado en este trabajo por *P. longefoliolatus*, *P. macrophyllus*, *P. neriifolius* y *P. sylvestris*. El subgénero *Podocarpus* está compuesto por nueve secciones (De Laubenfels 1985). Las especies estudiadas en esta tesis pertenecen a las secciones *Australis* (*P. nubigena*) y *Capitulatis* (*P. parlatorei*, *P. saligna*, *P. glomerulatus* y *P. lambertii*). La sección *Australis* está conformada por siete especies de las cuales solamente *P. nubigena* está en Sudamérica, mientras que las restantes se encuentran distribuidas en Australia, Nueva Zelanda y Nueva Caledonia. A diferencia de la sección *Australis*, la sección *Capitulatis* posee todas las especies distribuidas en Sudamérica.

En este capítulo también se incluyen en los análisis filogenéticos a las especies *P. guatemelensis* perteneciente a la sección *Nemoralis*, *P. henkelii* de la sección *Scytopodium* y *P. latifolius* de la sección *Podocarpus*. Las especies de *Nemoralis* también se distribuyen únicamente en Centro y Suramérica, mientras que *Scytopodiu* y *Podocarpus* se distribuyen en África y Madagascar.

### V. 3. Objetivos e hipótesis

El objetivo general de este capítulo es comparar los patrones de variación genética y las relaciones filogenéticas de especies de Podocarpaceae que se encuentran disjuntas en el BTA y en el BMY, en relación a sus amplitudes de distribución geográfica y a sus tolerancias ecológicas.

Los objetivos particulares de este capítulo son:

1. Analizar la relación entre los patrones de variación genética isoenzimática y las amplitudes de distribución geográfica de las cinco especies Sudamericanas estudiadas en esta tesis.

2. Evaluar las relaciones de parentesco de las Podocarpaceae del sur de Sudamérica en relación con los tipos de ambientes que ocupan y factores históricos.

Las hipótesis que se analizan se enumeran a continuación

1. Existe una correlación positiva entre la amplitud del rango de distribución geográfica y las características genéticas poblacionales de las especies.

- Por lo tanto se predice que especies de distribución geográfica amplia y poblaciones relativamente continuas presentarán elevada diversidad genética intrapoblacional y una relativamente baja diferenciación interpoblacional.

- Por otro lado, especies de distribución geográfica restringida, con poblaciones aisladas y mayor efecto de la deriva génica, resultarán en una baja diversidad genética dentro de las poblaciones y niveles considerables de divergencia genética entre poblaciones.

2. La historia climática del Cenozoico y Cuaternario de los Andes australes y subtropicales afectó diferencialmente los niveles y distribución de la variación genética de las Podocarpaceae de amplia distribución presentes en el BTA y en el BMY.

- Por lo tanto se espera que el acervo genético de la especie de distribución subtropical *P. parlatorei* refleje una historia evolutiva más prolongada en Sudamérica. Esto, juntamente con los cambios climáticos sufridos durante el Cuaternario se verá reflejado en una mayor estructuración genética en el espacio. En particular se postula que el ancestro de *P. parlatorei* durante el Paleógeno migró hacia el norte y se diversificó, dando origen a *P. parlatorei*. Durante el Cuaternario esta especie sufrió sucesivas expansiones hacia zonas bajas y hacia el norte durante períodos fríos (glaciaros) y retracciones hacia las altas cumbres durante períodos desfavorables (interglaciaros cálidos). En cambio la especie de distribución templada *P. nubigena* quedó restringida al BTA durante el Cuaternario.

3. Especies de un género con características morfológicas y afinidades ambientales similares estarán más emparentadas filogenéticamente, debido a

la tendencia evolutiva de conservación de nicho (Wiens y Graham 2005), que especies del mismo género que ocupan ambientes distintos y difieren morfológicamente.

- Se predice que las especies montanas subtropicales y templado-cálidas *P. parlatorei* y *P. saligna* estudiadas en esta tesis, juntamente con datos de las especies emparentadas tropicales *P. lambertii* y *P. glomerulatus* presentarán mayor afinidad filogenética entre ellas que con la especie templado-fría *P. nubigena*. Esta última es la más austral y microtémica de las especies de *Podocarpus* sudamericanas, y su distribución geográfica podría reflejar una mayor tolerancia a condiciones frías y diferentes a las de las demás especies de *Podocarpus*, de latitudes más bajas consideradas mesotérmicas.

## V. 4. Materiales y Métodos

### V. 4. 1. Análisis isoenzimáticos para *Podocarpus saligna*, *Prumnopytis andina* y *Saxegothaea conspicua*

Entre diciembre de 2002 a marzo de 2004 se muestrearon cuatro poblaciones de *P. saligna*, tres de *Pr. andina* y ocho de *S. conspicua* a lo largo de sus distribuciones geográficas (Tabla VI. 1, Fig I. 7, I. 8. y I. 6, respectivamente). *Podocarpus saligna* y *Pr. andina* se distribuyen únicamente en Chile sobre la cordillera de los Andes y la Costa, en un estrecho rango latitudinal de no más de cinco grados. Los tamaños muestrales de cada población son reducidos porque estas especies sólo se encuentran en pequeños parches de bosque nativo dentro de matrices de forestaciones de especies exóticas, como las poblaciones Curacautín de *Pr. andina*, y Las Ventanas, Nahuel Buta y San Pablo de *P. saligna*. Estas dos últimas poblaciones no fueron incluidas en el análisis por el reducido número de individuos recolectados. *Saxegothaea conspicua* se distribuye tanto en Chile como en las regiones más húmedas del BTA en Argentina.

Tabla V. 1: Ubicación de las poblaciones de *P. saligna*, *S. conspicua* y *Pr. andina* muestreadas

Nombre	Población	Especie	País	Latitud (S)	Longitud (O)	Altitud (m snm)	Tamaño muestral
1. SP	San Pablo	<i>P. saligna</i>	Chile	36° 13'	71° 21'	620	3
2. LR	Los Ruiles	<i>P. saligna</i>	Chile	35° 55'	72° 20'	Dato faltante	3
3. NB	Nahuel Buta	<i>P. saligna</i>	Chile	37° 48'	72° 53'	630	12
4. VV	Valdivia	<i>P. saligna</i>	Chile	39° 45'	73° 20'	50	30
5. LV	Las Ventanas	<i>P. saligna</i>	Chile	40° 05'	73° 04'	350	13
1. CR	Curacautin	<i>Pr. andina</i>	Chile	38° 27'	71° 56'	500	15
2. CG	Conguillo	<i>Pr. andina</i>	Chile	38° 37'	71° 44'	600	19
3. MP	Melipeuco	<i>Pr. andina</i>	Chile	38° 41'	71° 37'	600	21
1. ON	Oncol	<i>S. conspicua</i>	Chile	39° 45'	73° 20'	450	30
2. ESP	Lago Espejo	<i>S. conspicua</i>	Argentina	40° 33'	71° 48'	850	10
3. CT	Cántaros	<i>S. conspicua</i>	Argentina	41° 00'	71° 49'	800	30
4. PB	Puerto Blest	<i>S. conspicua</i>	Argentina	41° 01'	71° 49'	750	30
5. FR	Frías	<i>S. conspicua</i>	Argentina	41° 02'	71° 48'	770	30
6. MI	Manso Inferior	<i>S. conspicua</i>	Argentina	41° 37'	71° 48'	700	30
7. RP	Río Palena	<i>S. conspicua</i>	Chile	43° 40'	72° 20'	110	30
8. MÑH	Mañihuales	<i>S. conspicua</i>	Chile	44° 49'	72° 12'	200	30

En cada población se realizó un muestreo de los individuos adultos seleccionados al azar y distantes unos de otros al menos 10 m para evitar muestrear individuos estrechamente emparentados. Sin embargo, en algunas poblaciones resultó imposible recolectar 30 individuos debido al tamaño reducido de las poblaciones. En total se recolectaron 161 individuos de *P. saligna*, 55 individuos de *Pr. andina*, y 219 individuos de *S. conspicua*. Las muestras fueron acondicionadas en heladeras portátiles hasta su llegada al laboratorio donde se procedió a la extracción de las enzimas siguiendo los protocolos que se indican en el capítulo III.

Los sistemas electroforéticos utilizados para *P. saligna* fueron: Sistema A (Clayton y Treliak 1972) pH 6.1 corrido a 20 mÅ y mediante el cual se resolvieron isocitrato deshidrogenasa (Idh1, Idh2) y malato deshidrogenasa (Mdh1, Mdh2), Sistema 16 (O'Malley et al. 1979) pH 8.5 corrido a 25 mÅ y que permitió resolver la enzima málica (Me1); Sistema 13 (Mitton et al. 1979) pH 7.6 corrido a 25 mÅ y se resolvieron varios loci de peroxidasa anódica (Per<sub>A1</sub>, Per<sub>A2</sub>, Per<sub>A3</sub>), fosfoglucomutasa (Pgm1, Pgm2) y glicerato-2-deshidrogenasa (G2d1) (Apéndice VI. 1).

Para *Pr. andina* se utilizó: Sistema A (Clayton y Treliak 1972) pH 6.1 corrido a 20 mÅ y que resolvió isocitrato deshidrogenasa (Idh1), malato deshidrogenasa (Mdh1, Mdh2) y menadiona reductasa (Mnr1); Sistema 16 (O'Malley et al. 1979) pH 8.5 corrido a 25 mÅ y que resolvió peroxidasa anódica (Per<sub>A1</sub>); Sistema 13 (Mitton et al. 1979) pH 7.6 corrido a 25 mÅ y que resolvió fosfoglucoisomerasa (Pgi) y la enzima málica (Me) (Apéndice V. 2).

Para *S. conspicua* se utilizaron 6 sistemas enzimáticos, Sistema 18 (King y Dancik 1983) pH 8.5 corrido a 35 mÅ y con el que se resolvieron isocitrato deshidrogenasa (Idh), malato deshidrogenasa (Mdh1, Mdh2), menadiona reductasa (Mnr), fosfoglucomutasa (Pgm1, Pgm2) y el Sistema 26 (Poulik 1957) pH 8.2 corrido a 25 mÅ y con el que se resolvieron peroxidasa anódica (Per<sub>A1</sub>, Per<sub>A2</sub>, Per<sub>A4</sub>) y fosfoglucoisomerasa (Pgi1, Pgi2). (Apéndice V. 3).

Para todas las especies y sistemas las corridas electroforéticas fueron de 6 horas. Los sistemas isoenzimáticos resueltos para cada especie fueron seleccionados de numerosos ensayos realizados probando distintas combinaciones de sistemas buffer y tinciones enzimáticas (Tabla VI. 2). Para las poblaciones y especies se calcularon las variables de variación y estructura genética de la misma manera que en los capítulos III y IV.

#### V. 4. 2. Comparación de los niveles de variación genética entre las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica

Se comparó la diversidad genética de las cinco especies de Podocarpaceae estudiadas en relación a las características de la amplitud de la distribución geográfica y la continuidad de las poblaciones. La amplitud de la distribución geográfica de cada especie se obtuvo de fuentes bibliográficas que describen el rango latitudinal real (RLR) (Killeen et al. 1993; Marticorena y Rodríguez 1995) y observaciones propias sobre el rango latitudinal muestreado (RLM) (Tabla VI. 3). La continuidad de las poblaciones se evaluó como el valor de distancias promedio entre todas las poblaciones estudiadas (DPP) y el promedio de las distancias entre todos los pares de poblaciones más cercanas (PDPC) (Tabla V. 3).

Tabla V. 2: Sistemas buffer probados y utilizados para el estudio de variabilidad genética de *P. saligna*, *Pr. andina* y *S. conspicua*.

	Sistema 13	Sistema 16	Sistema 26	Sistema 18	Sistema A	Sistema MC
pH	7.5	8.5	8.2	8.5	6.1	7.5
Loci analizados en <i>P. saligna</i>	G2d Per <sub>A</sub> Pgm	Me			Idh Mdh	
Loci probados en <i>P. saligna</i>	Adh G2d Me Mdh Mnr Per <sub>C</sub> Pgi Skdh	Adh Idh Mdh Mnr Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Pgm Skdh	Adh Idh Mdh Me Mnr Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Pgm Skdh	Idh Mdh Per <sub>C</sub> Pgi Pgm	Adh Me Mnr Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Skdh	Adh Mdh Me Mnr Per <sub>C</sub> Pgi Skdh
Loci analizados en <i>Pr. andina</i>	Me Per <sub>A</sub> Pgi				Idh Mdh Mnr	
Loci probados en <i>Pr. andina</i>	Adh G2d Mdh Mnr Per <sub>C</sub> Skdh	Adh Idh Mdh Mnr Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Pgm Skdh	Adh Idh Mdh Me Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Pgm Skdh	Idh Mdh Per <sub>C</sub> Pgi Pgm	Adh Me Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Skdh	Adh Mdh Me Mnr Per <sub>C</sub> Pgi Skdh
Loci analizados en <i>S. conspicua</i>		Per <sub>A</sub> Pgi		Idh Mdh Mnr Pgm		
Loci probados en <i>S. conspicua</i>	Adh G2d Mdh Mnr Per <sub>C</sub> Skdh	Adh Idh Mdh Mnr Per <sub>C</sub> Pgm	Adh Idh Mdh Me Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Pgm Skdh	Per <sub>C</sub> Pgi	Adh Me Per <sub>A</sub> Per <sub>C</sub> Pgi Skdh	Adh Mdh Me Mnr Per <sub>C</sub> Pgi Skdh

Las variables de variación genética poblacional comparadas fueron:  
número promedio de alelos por locus ( $N_A$ ), número efectivo de alelos por locus

( $N_E$ ), porcentaje de loci polimórficos sin criterio ( $P_{SS}$ ), y heterocigosis observada ( $H_O$ ) y esperada ( $H_E$ ) bajo la condición de equilibrio Hardy-Weinberg (Tabla VI. 5). Las comparaciones pareadas por especie de los valores de variación genética poblacional promedio de cada una de las especies estudiadas se analizaron mediante tests de Kruskal-Wallis.

Los valores a nivel de especie de variación genética y los índices jerárquicos de diversidad, la diversidad genética total ( $H_T$ ) y dentro de poblaciones ( $H_S$ ), el grado de divergencia ( $F_{ST}$ ), y los niveles de endogamia total ( $F_{IT}$ ) y dentro de las poblaciones ( $F_{IS}$ ), se analizaron mediante regresiones simples con las variables de amplitud de la distribución geográfica (RLR, RLM) y las distancias promedio entre las poblaciones (DPP, PDPC) como variables independientes. Se calculó para cada especie el flujo génico ( $Nm$ ), estimado indirectamente a partir de  $F_{ST} = 1 / (4Nm + 1)$  (Wright 1931). Para la especie *P. parlatorei* no se incluyó la única población de Bolivia para la que se contaba con datos isoenzimáticos, ya que se encuentra geográficamente muy distante de las de Argentina y que sesgaría el promedio de distancias entre poblaciones. Todas las especies estudiadas fueron analizadas en base a cinco loci: *Idh*, *Mdh1*, *Mdh2*, *Per<sub>A</sub>4* y *Pgi1*, que resultaron relativamente consistentes en todas las especies. La alineación de los alelos de cada locus utilizado se realizó a partir de la comparación de corridas electroforéticas realizadas sembrando seis individuos de cada una de las cinco especies en un mismo gel (Fig. VI. 1). Con esta alineación se codificaron los loci para cada especie a partir de las corridas realizadas previamente para cada especie. Así se obtuvo para cada especie por población la distribución de frecuencias y también la frecuencia alélica total para cada especie (Apéndice V. 4 y V. 5). Dependiendo de cada especie, estos loci no fueron utilizados para los análisis particulares de cada una, porque para distintas poblaciones no se pudieron resolver consistentemente algunos individuos o estuvieron ausentes. Para *P. parlatorei* no se incluyen en los análisis del capítulo III los loci *Mdh1*, *Pgi1*; para *P. nubigena* no se incluyeron en los análisis del capítulo IV los loci *Idh*, *Mdh1*; para *P. saligna* los loci *Per<sub>A</sub>4*, *Pgi1* no se utilizaron para calcular las variables de

variación genética; mientras que para *Pr. andina* no se utilizó Per<sub>A</sub>4. Otros sitios no fueron utilizados por no haberse podido resolver en al menos una de las cinco especies (e. g. Me, Mnr, Pgm, entre otros).

Se calcularon las distancias genéticas de Rogers modificada (Wright 1978) y de Nei no sesgada (Nei 1978) entre todas las poblaciones de todas las especies, y entre todas las especies. En total se analizaron 1151 individuos. En todos los casos se generó un árbol mediante el método de agrupamiento de la media aritmética no ponderada (UPGMA) (Sneath y Sokal 1973) utilizando el programa Statistica 6.1.

#### V. 4. 3. Estudio filogenético de las especies del género *Podocarpus*

Las especies de *Podocarpus* estudiadas en esta tesis *P. parlatorei*, *P. nubigena* y *P. saligna* y *P. lambertii* de la selva misionera y mata atlántica, y *P. glomerulatus* de las Yungas en Bolivia fueron utilizadas para extraer su ADN genómico y secuenciar la región nuclear ITS 2 y el espaciador intergénico *trn* L - F del cloroplasto. Esto fue analizado junto con secuencias publicadas en NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para las especies *P. cunninghamii*, *P. guatemalensis*, *P. henkelii*, *P. latifolius*, *P. longefoliolatus*, *P. macrophyllus*, *P. neriifolius*, *P. sylvestris*, *Retrophyllum minus*, *Afrocarpus falcata*, *A. gracilior*, *Nageia nagi*, *Dacridium balansae*, *Dacriparpus imbricatus*, *Saxegothaea conspicua*, *Prumnopytis andina* y *Lepidothamnus fonkii*. La metodología y condiciones de PCR son las mismas que se describen en el capítulo III. Solamente se cambiaron las temperaturas de acoplamiento del iniciador para las especies *P. glomerulatus*, *P. lambertii*, *P. nubigena*, *P. saligna*, *Saxegothaea conspicua* y *Prumnopytis andina* las cuales fueron de 55° y 49°C para el marcador *trn* L-F y para el ITS 2, respectivamente. Las secuencias para el gen *rbcL* y para los marcadores *trn* L-F e ITS 2 para las otras especies fueron obtenidas del banco de datos moleculares NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabla VI. 4). Estas secuencias fueron alineadas manualmente con el programa BioEdit 7.0 (Hall 1999) y utilizadas para elucidar las relaciones filogenéticas dentro del subgénero *Podocarpus*.

Tabla V. 3: Características geográficas y autoecológicas para *Podocarpus parlatorei*, *P. nubigena*, *P. saligna*, *Prumnopytis andina* y *Saxegothaea conspicua*.

N: cantidad de poblaciones muestreadas, RLR: Rango latitudinal real en grados, RLM: Rango latitudinal muestreado, RGR: rango geográfico real, RGM: rango geográfico muestreado en Km, DPP: Distancia promedio entre todos los pares de poblaciones muestreadas, PDPC: promedio de las distancias entre las poblaciones más cercanas. \* *P. parlatorei* no incluye a la población Bolivia  
Sexualidad D: dioico, M: monoico.

Especie	N	RLR	RLM	RGR	RGM	DPP	PDPC	Sexualidad	Cono	Dispersión de semilla
<i>P. parlatorei</i> *	17	17 - 28 = 11°	6° 12'	1203	695	279	78	D/M?	Carnoso	Gravitatoria / animal
<i>P. nubigena</i>	13	39° 50' - 50° 23' = 11° 30'	8° 56'	1172	878	276	102	D	Carnoso	Gravitatoria / animal
<i>P. saligna</i>	3	35° 50' - 40° 35' = 5°	3° 52'	528	284	169.26	100	D	Carnoso	Gravitatoria / animal
<i>Pr. andina</i>	3	35° 50' - 39° 30' = 4°	0° 27'	407	23	18.53	16	D?	Carnoso	Gravitatoria / animal
<i>S. conspicua</i>	8	36° - 45° 45' = 9° 45'	5° 10'	1083	583	225.79	95	M	Leñoso	Anemófila / gravitatoria

Se realizaron análisis de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML del inglés “maximun likelihood”) para cada gen por separado. Como las topologías encontradas para cada gen individual eran congruentes también se realizaron los análisis agrupando los tres genes. En todos los casos se utilizó *Saxegothaea* y *Prumnopitys* como outgroup, tal como han sido utilizados en análisis previos (Sinclair 2002). Los análisis de máxima parsimonia consistieron en una búsqueda heurística utilizando el algoritmo de intercambio de ramas de bisección del árbol y reconexión (TBR del inglés “tree bisection and reconnection”) del programa PAUP\* (Swofford 2002). El árbol de inicio para la búsqueda se obtuvo adicionando los taxones en forma secuencial aleatoriamente 1000 veces y reteniendo 10 árboles en cada paso. Cuando la búsqueda resultaba en más de un árbol igualmente parsimonioso se realizó un consenso estricto de estos árboles. Los índices de consistencia (IC; Kluge y Farris 1969) y de retención (IR; Farris 1989) fueron calculados para el árbol más parsimonioso. Las inserciones / deleciones (gaps o indeles) fueron tratadas como datos faltantes y fueron recodificados. El análisis de soporte de las ramas (BS del inglés “bootstrap”) se obtuvo realizando 100 remuestreos (“bootstrap replicates”) de la matriz original. Estas nuevas matrices fueron analizadas de igual forma que la matriz original pero bajando el número de réplicas del árbol de inicio a 100.

Para los análisis de ML se utilizaron los modelos de evolución molecular seleccionados por el “likelihood ratio test” o el criterio de información de Akaike utilizando el programa ModelTest 3.0.8 (Posada y Crandall 1998) (Tabla V. 5). Los modelos se seleccionaron para cada gen individual y para la matriz con los genes combinados.

Tabla V. 4: Lista de especies utilizada para en análisis filogenético y código de acceso a la base de datos de NCBI.

Taxón	Subgénero	Nº de acceso por gen bank		
		trn L-F	rbc L	ITS 2
<i>Podocarpus cunninghamii</i>	Podocarpus	-	AF249603	DQ499127
<i>P. glomerulatus</i>	Podocarpus	Este estudio	-	Este estudio
<i>P. guatemalensis</i>	Podocarpus	AY83107	-	AY83067
<i>P. henkelii</i>	Podocarpus	AY678113	AF249610	AY845209
<i>P. lambertii</i>	Podocarpus	Este estudio	-	Este estudio
<i>P. latifolius</i>	Podocarpus	-	AF249612	AY845215
<i>P. longefoliolatus</i>	Foliolatus	AY83105	AF249614	AY83065
<i>P. macrophyllus</i>	Foliolatus	AY83106	AF249616	AY83066
<i>P. neriifolius</i>	Foliolatus	AJ441092	AF249618	-
<i>P. nubigena</i>	Podocarpus	Este estudio	AF249621	Este estudio
<i>P. parlatorei</i>	Podocarpus	Este estudio	AF249623	Este estudio
<i>P. sylvestris</i>	Foliolatus	AY83108	-	AY83068
<i>P. saligna</i>	Podocarpus	Este estudio	AF249628	Este estudio
<i>Retrophyllum minus</i>		AY83109	AF249661	-
<i>Afrocarpus falcata</i>		AY678115	AF249589	-
<i>Afrocarpus gracilior</i>		-	-	AY83062
<i>Nageia nagi</i>		AJ441091	AF249648	AY83063
<i>Dacrydium balansae</i>		AY83093	AF249633	AY83053
<i>Dacrycarpus imbricatus</i>		AY83096	AB027313	AY83056
<i>Saxegothaea conspicua</i>		Este estudio	AF249662	AY83037
<i>Prumnopytis andina</i>		Este estudio	AF249655	AY83040
<i>Lepidothamnus fonkii</i>		AY83075	AF249642	AY83035

Tabla V. 5 : Índices de consistencia y retención para los análisis de máxima parcimonia y modelos utilizados para los análisis de máxima verosimilitud.

	Caracteres totales	Caracteres variables parsimoniosamente informativos	Árboles totales retenidos	Longitud del árbol	Índice de consistencia (IC)	Índice de retención (IR)	Modelos utilizado para ML
<i>rbcL</i> , <i>trn</i> L-F, ITS 2	1971	209	2	774	0.7868	0.7090	TrN+I+G
<i>trn</i> L-F, ITS 2	636	164	2	485	0.7794	0.8391	HKY+G
ITS 2	218	67	49	216	0.6898	0.7491	HKY+G
<i>rbcL</i>	1352	87	33	348	0.7471	0.5165	TrN+I+G
<i>trn</i> L-F	418	89	90	293	0.8430	0.9073	HKY+G

Los caracteres morfológicos vegetativos y reproductivos utilizados se obtuvieron a partir de la revisión taxonómica de De Laubenfels (1985) (Tabla V. 6). Para las mismas especies del género *Podocarpus* analizadas con los datos

moleculares se confeccionó una matriz de presencia-ausencia de datos morfológicos (Tabla V. 7). Para los caracteres no descritos en algunas especies del trabajo de De Laubenfels (1985) se consultó una base de datos de gimnospermas de acceso público ([www.conifers.org](http://www.conifers.org)).

Se corrió un análisis de máxima parsimonia realizando una búsqueda heurística para árboles no enraizados utilizando la opción TBR del programa PAUP. De los 12 caracteres codificados, 11 resultaron parsimoniosamente informativos. Se realizaron 100 réplicas de las que se retuvieron cinco árboles de todos los evaluados.

Tabla V. 6: Caracteres morfológicos utilizados para el análisis cladístico.

Carácter	Estado Presente/Ausente
1. Escamas de las yemas más largas que su diámetro (hojas lanceoladas)	1/0
2. Escamas de las yemas acuminadas	1/0
3. Canales resiníferos en el margen de la hoja	1/0
4. Canales resiníferos no marginales, de a tres	1/0
5. Hojas mayores a 6 cm longitud	1/0
6. Estomas con anillo	1/0
7. Cono polínico > 3 cm	1/0
8. Cono polínico <15mm	1/0
9. Conos masculinos solitarios y sésiles	1/0
10. Conos masculinos + de tres por pedúnculo	1/0
11. Frutos mucho más largos que anchos	1/0
12. Receptáculo carnoso	1/0

Tabla V. 7: Matriz de datos de especies de *Podocarpus* codificadas según caracteres morfológicos

Especie	Distribución	Subgénero	Sección	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<i>P. cunninghamii</i>	Nueva Zelanda	<i>Podocarpus</i>	<i>Australis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
<i>P. nubigena</i>	BTA	<i>Podocarpus</i>	<i>Australis</i>	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
<i>P. glomerulatus</i>	Yungas	<i>Podocarpus</i>	<i>Capitulatis</i>	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>P. lambertii</i>	Mata Atlántica	<i>Podocarpus</i>	<i>Capitulatis</i>	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
<i>P. parlatorei</i>	Sur de Yungas	<i>Podocarpus</i>	<i>Capitulatis</i>	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>P. saligna</i>	Norte del BTA	<i>Podocarpus</i>	<i>Capitulatis</i>	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
<i>P. guatemalensis</i>	Centroamérica	<i>Podocarpus</i>	<i>Nemoralis</i>	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1
<i>P. latifolius</i>	Sur de África	<i>Podocarpus</i>	<i>Podocarpus</i>	0	0	1	0	1	1	?	?	1	0	1	0
<i>P. henkelii</i>	Sur de África	<i>Podocarpus</i>	<i>Scytopodium</i>	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0
<i>P. nerifolius</i>	Asia y Oceanía	<i>Foliolatus</i>	<i>Foliolatus</i>	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	?	1
<i>P. longifoliolatus</i>	Nueva Caledonia	<i>Foliolatus</i>	<i>Longifoliolatus</i>	1	1	0	1	1	0	1	?	0	0	?	?
<i>P. sylvestris</i>	Nueva Caledonia	<i>Foliolatus</i>	<i>Globulus</i>	0	0	0	0	?	1	1	?	0	0	?	?

## V. 5. Resultados

### V. 5. 1. Comparación de los niveles de variación genética isoenzimática entre las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica

Los niveles de variación genética para las poblaciones de *P. saligna*, *Pr. andina* y *S. conspicua* se indican en la tabla VI. 8 (Apéndice V. 1, V. 2, V. 3).

Tabla V. 8: Parámetros de variación genética para las poblaciones de *P. saligna*, *Pr. andina* y *S. conspicua*. \* valor estadísticamente significativos distinto de cero  $p < 0.05$ .

Población	N <sub>A</sub>	N <sub>E</sub>	P <sub>SS</sub>	H <sub>O</sub>	H <sub>E</sub>	F <sub>IS</sub>
1. NB	1.91 (0.20)	1.52 (0.15)	54.5	0.218 (0.067)	0.251 (0.059)	0.139
2. VV	1.55 (0.10)	1.22 (0.05)	45.5	0.068 (0.017)	0.129 (0.027)	0.478
3. LV	1.55 (0.15)	1.24 (0.08)	45.5	0.108 (0.042)	0.147 (0.046)	0.274
Promedio <i>P. saligna</i>	1.67 (0.96) 2.45 (0.12)	1.33 (0.77) 1.44 (0.06)	48.5 (3.0) 72.7	0.176 (0.102) 0.229 (0.024)	0.131 (0.076) 0.112 (0.016)	0.297 (0.171) 0.309* (0.131)
1. CG	1.37 (0.08)	1.07 (0.02)	37.5	0.053 (0.034)	0.061 (0.031)	0.143
2. CR	1.62 (0.43)	1.27 (0.17)	50	0.142 (0.060)	0.183 (0.070)	0.232
3. MP	1.62 (0.08)	1.19 (0.06)	62.5	0.082 (0.036)	0.118 (0.063)	0.318
Promedio <i>Pr. andina</i>	0.96 (0.08) 1.87 (0.08)	0.73 (0.06) 1.17 (0.02)	50 (7.2) 62.5	0.092 (0.026) 0.088 (0.010)	0.121 (0.035) 0.126 (0.014)	0.231 (0.051) 0.243ns (0.177)
1. ON	1.55 (0.13)	1.28 (0.09)	36.36	0.149 (0.040)	0.136 (0.037)	0.176
2. ESP	1.36 (0.15)	1.20 (0.09)	27.27	0.109 (0.068)	0.114 (0.048)	0.064
3. CT	1.55 (0.09)	1.20 (0.06)	45.45	0.084 (0.016)	0.103 (0.024)	0.185
4. PB	1.45 (0.09)	1.24 (0.05)	36.36	0.090 (0.025)	0.141 (0.028)	0.437
5. FR	1.64 (0.12)	1.41 (0.09)	45.45	0.172 (0.042)	0.203 (0.037)	0.103
6. MI	1.82 (0.12)	1.28 (0.06)	54.55	0.100 (0.019)	0.161 (0.029)	0.426
7. RP	1.55 (0.09)	1.28 (0.08)	45.45	0.119 (0.027)	0.140 (0.029)	0.218
8. MÑH	1.45 (0.10)	1.24 (0.07)	36.36	0.056 (0.013)	0.123 (0.032)	0.474
Promedio <i>S. conspicua</i>	1.54 (0.05) 2.18 (0.04)	1.27 (0.02) 1.28 (0.02)	40.91 (2.98) 72.73	0.110 (0.013) 0.110 (0.009)	0.140 (0.011) 0.156 (0.010)	0.260 (0.057) 0.212* (0.115)

Los mayores niveles de variación genética isoenzimática se detectaron en la especie *Podocarpus nubigena* (Tabla V. 9, 10). Excepto para la heterocigosis observada, *P. nubigena* siempre mostró valores distintos y estadísticamente

significativos de *P. parlatorei* (Tabla VI. 10). Las diferencias entre *P. nubigena* y *P. parlatorei* con *P. saligna* nunca resultaron estadísticamente significativas, posiblemente a causa del reducido tamaño muestral para *P. saligna* (Tabla V. 10).

Tabla V. 9: Valores de los promedios poblacionales y valores para cada especie de las variables de variación genética. # *P. parlatorei* no incluye a la población Bolivia. Entre paréntesis están los errores. \* valor significativamente distinto de cero, para un  $p < 0.05$ . N: cantidad de poblaciones analizadas,  $N_A$ : número medio de alelos por locus,  $N_E$ : el número efectivo de alelos por locus,  $P_{SS}$ : el porcentaje de loci polimórficos sin criterio,  $H_O$ : heterocigosis observada y  $H_E$ : heterocigosis esperada.

Especies	N	Loci	$N_A$	$N_E$	% $P_{SS}$	$H_O$	$H_E$	$F_{IS}$
Poblaciones <i>P. parlatorei</i> #	17	14	1.64 (0.03)	1.26 (0.02)	42	0.166 (0.014)	0.151 (0.008)	-0.071 (0.104)
Especie <i>P. parlatorei</i> #			2.21 (0.05)	1.26 (0.01)	57	0.161 (0.007)	0.163 (0.007)	-0.104* (0.038)
Poblaciones <i>P. nubigena</i>	14	11	1.94 (1.76)	1.38 (0.05)	64.88	0.165 (0.019)	0.218 (0.006)	0.231(0.049)
Especie <i>P. nubigena</i>			3.33 (0.05)	1.49 (0.02)	91.67	0.172 (0.006)	0.279 (0.008)	0.258 (0.087)
Poblaciones <i>P. saligna</i>	3	11	1.67 (0.96)	1.33 (0.77)	48.5	0.131 (0.076)	0.176 (0.102)	0.297 (0.171)
Especie <i>P. saligna</i>			2.45 (0.12)	1.44 (0.06)	72.7	0.112 (0.016)	0.229 (0.024)	0.309* (0.131)
Poblaciones <i>Pr. andina</i>	3	8	0.96 (0.08)	0.73 (0.06)	50	0.092 (0.026)	0.121 (0.035)	0.231 (0.051)
Especie <i>Pr. andina</i>			1.87 (0.08)	1.17 (0.02)	62.5	0.088 (0.010)	0.126 (0.014)	0.243 (0.177)
Poblaciones <i>S. conspicua</i>	8	12	1.58 (0.03)	1.29 (0.02)	46	0.119 (0.016)	0.158 (0.012)	0.260 (0.057)
Especie <i>S. conspicua</i>			2.50 (0.03)	1.29 (0.02)	92	0.112 (0.008)	0.191 (0.010)	0.244 (0.053)

Tabla V. 10: Variables de variación genética para los promedios poblacionales de cinco especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica. Dentro de cada celda se indica el valor de p para cada test de KW. En gris se indican las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Pp: *P. parlatorei*, Pn: *P. nubigena*, Ps: *P. saligna*, Sc: *S. conspicua*, Pra: *Pr. andina*. N<sub>A</sub>: número medio de alelos por locus, N<sub>E</sub>: el número efectivo de alelos por locus, P<sub>SS</sub>: el porcentaje de loci polimórficos sin criterio, H<sub>O</sub>: heterocigosis observada y H<sub>E</sub>: heterocigosis esperada.

N<sub>A</sub>

	N <sub>A</sub>	Pn 1.94	Ps 1.67	Sc 1.58	Pra 1.54
Pp 1.64		0.0013	0.7858	0.2587	0.0639
Pn 1.94			0.0907	0.0071	0.0042
Ps 1.67				0.4011	0.8222
Sc 1.58					0.6746

N<sub>E</sub>

		Pn 1.38	Ps 1.33	Sc 1.29	Pra 1.18
Pp 1.27		0.0062	0.9578	0.4844	0.1530
Pn 1.38			0.4192	0.0548	0.0322
Ps 1.33				0.8379	0.2752
Sc 1.29					0.1521

P<sub>SS</sub>

		Pn 64.88	Ps 48.50	Sc 45.85	Pra 50
Pp 42.17		0.0003	0.0502	0.4692	0.1993
Pn 64.88			0.0642	0.0033	0.0644
Ps 48.50				0.3906	0.8248
Sc 45.85					0.6604

H<sub>O</sub>

		Pn 0.165	Ps 0.131	Sc 0.119	Pra 0.092
Pp 0.166		0.8017	0.2664	0.0198	0.0442
Pn 0.165			0.2012	0.0247	0.0370
Ps 0.131				1.000	0.5127
Sc 0.119					0.4099

H<sub>E</sub>

		Pn 0.218	Ps 0.176	Sc 0.158	Pra 0.121
Pp 0.151		0.0015	0.5964	0.7707	0.3681
Pn 0.218			0.2256	0.0156	0.0438
Ps 0.176				1.0000	0.2752
Sc 0.158					0.3074

Los análisis de regresiones entre las variables genéticas para el nivel de especie y variables geográficas mostraron una relación positiva y significativa entre la heterocigosis observada y la amplitud de la distribución geográfica muestreada, y la distancia promedio entre todos los pares de poblaciones muestreadas (Tabla V. 11). Por otro lado, el número de alelos efectivos por

locus y la heterocigosis esperada se correlacionaron positiva y significativamente con la distancia promedio de las poblaciones más cercanas (Tabla V. 11).

Tabla V. 11: Análisis de regresión entre los valores de las variables de variación genética a nivel de especie y las variables geográficas. RGM: rango geográfico muestreado (Km), RGR: rango geográfico real (Km), DPP: Distancia promedio entre todos los pares de poblaciones muestreadas (Km), DPDM: Distancia promedio de las poblaciones más cercanas (Km). Para los valores de  $p < 0.1$  se indican los valores de  $R^2$ .

Variable	RGM	RGR	DPP	DPDM
$N_A$	$p=0.125$	$p=0.321$	$p=0.219$	$p=0.149$
$N_E$	$p=0.352$	$p=0.668$	$p=0.337$	$p=0.093$ $R^2=0.66$
$P_{SS}$	$p=0.408$	$p=0.535$	$p=0.532$	$p=0.280$
$H_O$	$p=0.031$ $R^2=0.82$	$p=0.087$ $R^2=0.67$	$p=0.059$ $R^2=0.74$	$p=0.322$
$H_E$	$p=0.251$	$p=0.529$	$p=0.283$	$p=0.090$ $R^2=0.67$

Para los promedios poblacionales, el número de alelos por locus y la heterocigosis observada mostraron una relación positiva y significativa con el rango geográfico muestreado. El número de alelos por locus, el número de alelos efectivos por locus y la heterocigosis observada se correlacionan positiva y significativamente con la distancia promedio entre todas las poblaciones (Tabla V. 12). Únicamente con las distancias promedio a la población más cercana se explican la variación del número de alelos por locus y el número de alelos efectivos por locus.

Tabla V. 12: Análisis de regresión entre los valores de las variables de variación genética para los valores promedios poblacionales y las variables geográficas. RGM: rango geográfico muestreado (Km), RGR: rango geográfico real (Km), DPP: Distancia promedio entre todos los pares de poblaciones muestreadas (Km), DPDM: Distancia promedio de las poblaciones más cercanas (Km). Para los valores de  $p < 0.10$  se indican los valores de  $R^2$ .

Variable	RGM	RGR	DPP	PDPC
$N_A$	$p=0.06$ $R^2=0.74$	$p=0.185$	$p=0.03$ $R^2=0.82$	$p=0.015$ $R^2=0.88$
$N_E$	$p=0.113$	$p=0.220$	$p=0.03$ $R^2=0.80$	$p=0.001$ $R^2=0.97$
$P_{SS}$	$p=0.183$	$p=0.425$	$p=0.292$	$p=0.153$
$H_O$	$p=0.054$ $R^2=0.75$	$p=0.123$	$p=0.03$ $R^2=0.80$	$p=0.222$
$H_E$	$p=0.162$	$p=0.402$	$p=0.210$	$p=0.103$

Las regresiones entre las variables de diversidad genética (Tabla V. 13) y las variables geográficas no mostraron relaciones estadísticamente significativas con ninguna de las variables geográficas (datos no mostrados).

Tabla V. 13: Valores de diversidad genética para cada especie. # *P. parlatoresi* no incluye a la población Bolivia. \* valor estadísticamente distinto de cero.

Especies	H <sub>S</sub>	H <sub>T</sub>	F <sub>IT</sub>	F <sub>ST</sub>	F <sub>IS</sub>	Nm
<i>P. parlatoresi</i> #	0.146	0.163	0.010	0.103*	-0.103*	1.8
<i>P. nubigena</i>	0.275	0.222	0.392*	0.181*	0.258*	0.8
<i>P. saligna</i>	0.178	0.246	0.620*	0.448*	0.309*	0.5
<i>Pr. andina</i>	0.122	0.132	0.360	0.140	0.243	2.1
<i>S. conspicua</i>	0.154	0.141	0.282*	0.082*	0.212*	1.7

## V. 5. 2. Análisis de distancia genética entre especies

El análisis de distancia genética de Rogers modificada (Wright 1978) para los datos isoenzimáticos poblacionales (Apéndice V. 4), agrupó a las poblaciones de cada especie, excepto para las poblaciones de *P. saligna*, que resultaron incluidas dentro de las poblaciones de *P. parlatoresi* (Fig. V. 2 A). En el análisis agrupando a todas las poblaciones de una misma especie (Apéndice V. 5), *P. nubigena* quedó como grupo hermano de *P. parlatoresi* y *P. saligna* (Fig. V. 2 B). Esta topología fue similar en el mismo análisis realizado con las distancias genéticas de Nei no sesgadas (datos no mostrados).

## V. 5. 3. Análisis filogenético

### V. 5. 3. 1. Reconstrucción filogenética para datos de secuencias de ADN

Los análisis de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) obtenidos para las regiones *rbc-L* y *trn L-F* del cloroplasto e ITS 2 del ADN nuclear para las especies analizadas muestran topologías similares y por lo tanto se muestra el de máxima verosimilitud (Fig. VI. 3). El género *Podocarpus* aparece monofilético (bootstrap MP = 100, ML = 100) y hermano del clado que contiene a *Retrophyllum*, *Afrocarpus* y *Nageia*. De estos tres géneros, únicamente

*Retrophyllum* tiene especies en Brasil y Venezuela, además de Malasia y Nueva Caledonia. *Afrocarpus* y *Nageia* de distribuyen en África, Madagascar, India, China y Japón.

El clado A está representado por *Podocarpus* subgénero *Foliolatus* y el clado B por el subgénero *Podocarpus*, el primero con un alto soporte (bootstrap MP = 100, ML = 100). Este primer subgénero no tiene especies distribuidas en Sudamérica (Fig. V. 3). Los dos subgéneros resultaron monofiléticos. La sección *Australis* que contiene a *P. nubigena* y a *P. cunninghamii* aparece no resuelta, sin embargo no están muestreadas todas las especies de esta sección (Fig. V. 3).

La sección *Capitulatis*, que para este análisis no está representada por todas las especies, resultó monofilética (bootstrap MP = 98, ML = 98), excluyendo a *P. saligna* que se encuentra en una politomía en la base del subgénero o en una posición no resuelta. Este clado incluye a las tres especies de Sudamérica tropical (*P. lambertii*, *P. glomerulatus* y *P. parlatoresi*). La posición no resuelta de *P. saligna* no permite dilucidar si se une a este grupo o no, y por lo tanto pone en duda la monofilia de la sección (Fig. V. 3).

### V. 5. 3. 2. Reconstrucción filogenética a partir de datos morfológicos

El análisis de parsimonia para caracteres morfológicos indica que *P. parlatoresi* tiene un ancestro común con *P. saligna*, mientras que *P. glomerulatus* comparte el ancestro común con *P. lambertii* (Fig. V. 4). Estos dos clados de especies Sudamericanas mesotérmicas se unen en un grupo hermano de la especie microtérmica *P. nubigena* del BTA. *P. cunninghamii* de Nueva Zelanda se une por fuera formando entre todos un grupo monofilético. El clado descrito se encuentra en una posición no resuelta junto con *P. sylvestris*, *P. guatemalensis*, *P. henkelii* y *P. latifolius*. Todas estas se unen a *P. nerifolius* y *P. logefoliolatus*. Este análisis muestra a la sección *Australis* como parafilética, y apoya un origen único para los *Podocarpus* de Sudamérica.

## V. 6. Discusión

### V. 6. 1. Efectos de la amplitud de la distribución geográfica

*Podocarpus parlatoresi*, *P. nubigena* y *Saxegothaea conspicua* tienen amplia distribución geográfica respecto de *Podocarpus saligna* y *Prumnopitys andina*. El efecto de la amplitud de la distribución geográfica sobre los niveles de diversidad genética para el nivel de especie y promedios poblacionales puede explicar la variación de la heterocigosis observada (Tabla V. 11), mientras que para el nivel de promedios poblacionales también el número de alelos por locus puede ser explicado por la misma variable geográfica (Tabla V. 12). La evidencia es similar a la reportada de Karron et al. (1988) y por Hamrick et al. (1992). Esto también fue encontrado para las especies siempreverdes de *Nothofagus* de amplia distribución en el BTA, *N. dombeyi* y *N. betuloides* que presentaron mayor número de alelos, polimorfismo y heterocigosis que *N. nitida* restringida geográficamente a las laderas oeste de los Andes (Premoli 1997). Si bien no se detectó relación alguna entre el rango de distribución y el polimorfismo, todas las especies estudiadas poseen elevada diversidad genética, incluso aquellas con reducida amplitud geográfica (Tabla V. 9). Esto parecería reflejar cierta inercia filogenética como fuera demostrado para especies de otra familia de origen austral como las Proteaceae (Souto y Premoli 2007). Los altos valores de variación genética detectados en las dos especies con distribución restringida podrían ser herencia de una mayor distribución en el pasado, por lo tanto la falta de correlación con el rango geográfico se debe posiblemente a cuestiones de distribución históricas. Por ejemplo en *P. saligna*, se aprecian valores de variación genética similares a los de *P. parlatoresi* y una mayor divergencia poblacional que la detectada en *P. nubigena*. Las diferencias entre los sistemas reproductivos y en la continuidad de las poblaciones de *S. conspicua* con las demás especies (Tabla V. 4) serían una de las posibles causas de baja divergencia entre las poblaciones y elevados valores de variación genética.

Las variables genéticas también resultaron estar asociadas con la continuidad de las poblaciones, tanto para el nivel de especie como para los promedios poblacionales (Tabla V. 11 y 12). Cuando la distancia entre poblaciones se incrementa también lo hacen el número de alelos y la heterocigosis observada. Este comportamiento puede estar asociado a que las poblaciones pudieron haber estado aisladas en el pasado, pero no se vieron afectadas por el efecto de cuellos de botella ni deriva génica. En ninguna de las especies se detectó evidencia genética de estos procesos. El aislamiento puede favorecer al mantenimiento general de la variación genética de la especie por presiones selectivas locales sobre de un conjunto determinado de características genéticas diferentes en cada una de las poblaciones. De esta manera la variación genética total de cada especie analizada puede mantener valores similares a elevados comparados con otras gimnospermas (Hamrick et al. 1989, 1992).

En los trabajos de comparación entre especies raras y comunes, se ha encontrado que el polimorfismo está significativamente asociado con el rango geográfico (Karron et al. 1988; Hamrick et al. 1989, 1992; Gitzendanner y Soltis 2000; Cole 2003); sin embargo en estos trabajos no se distingue entre especies raras y comunes de angiospermas vs. de gimnospermas. Según los trabajo de Hamrick et al. (1989, 1992) las gimnospermas tienen mayor variación y polimorfismo genético que las angiospermas. Sin embargo, las especies de coníferas raras no siempre presentan menor polimorfismo respecto de las especies congéneres ampliamente distribuidas.

Una de las posibles explicaciones a esta característica genética en coníferas puede ser debido a eventos históricos. Los cambios climáticos del Pleistoceno afectaron sus poblaciones reduciendo considerablemente sus tamaños poblacionales y sobreviviendo localmente. Esto aísla a las poblaciones y como consecuencia puede producir cuellos de botellas y deriva génica. De esta manera, puede haber especies con amplia distribución y reducido polimorfismo como por ejemplo *Pilgerodendron uviferum* (Premoli et al 2001), *Pinus resinosa* (Fowler y Morris, 1977) y *Tsuga canadensis* (Zabinski, 1992).

Alternativamente, especies con menor rango de distribución, generalmente con poblaciones grandes y continuas pueden mantener moderado a elevado polimorfismo y flujo génico, como por ejemplo *Austrocedrus* ( $P = 72\%$ ,  $F_{ST} = 0.12$  Souto per. com. datos aun no publicados), *Fitzroya* ( $P = 33\%$   $F_{ST} = 0.078$ , Premoli et al. 2000) y *Podocarpus parlatorei*. ( $P = 42\%$ ,  $F_{ST} = 0.10$ , Quiroga y Premoli 2007) Otra posibilidad es la que se da en *P. nubigena* que tiene amplia distribución pero poblaciones aisladas, con restringido flujo génico pero el mayor polimorfismo detectado entre las especies analizadas. El elevado polimorfismo y la alta divergencia interpoblacional de *P. nubigena* podrían ser reflejo de una amplia distribución en el pasado, o bien de períodos de aislamiento donde cada población mantuvo moderados niveles de variación genética. *Podocarpus nubigena* ( $F_{ST} = 18\%$ ) presenta mayor divergencia poblacional que *P. parlatorei* ( $F_{ST} = 10\%$ ), sugiriendo que el posible aislamiento de *P. nubigena* en múltiples refugios durante los períodos fríos del Pleistoceno, junto con la actividad volcánica, haya producido mayor restricción al flujo génico y cuellos de botella genéticos que sobre el acervo genético de *P. parlatorei* en regiones subtropicales durante los períodos cálidos.

Los elevados niveles de polimorfismo y variación genética medios de *P. saligna* en relación a *P. nubigena* y *P. parlatorei*, junto con su reducida distribución geográfica y sus poblaciones actualmente fragmentadas, pueden ser causados por diversos factores. Entre ellos la historia glaciaria del BTA, la cual podría haber modificado el área de distribución de las especies dependiendo de los períodos glaciarios – interglaciarios. Allnutt et al. (2001) sugiere que *P. saligna* no sufrió cuellos de botella genéticos o severas pérdidas de variación genética como resultado de la reducción del rango o del tamaño de las poblaciones. Los niveles detectados mediante RAPDs de baja divergencia entre las poblaciones localizadas en la cordillera de los Andes y en la de la Costa, indican que no habría restricciones al flujo génico (Allnutt et al. 2001). Sin embargo los resultados obtenidos con isoenzimas indican lo contrario ( $F_{ST} = 0.44$ ) sugiriendo que las poblaciones de ambas cordilleras presentarían restricciones al flujo génico ( $Nm = 0.5$  la menor tasa de flujo

génico de las cinco especies) (Tabla V. 13). Las diferencias genéticas entre ambas cordilleras también han sido registradas para especies de *Nothofagus* mediante distintos marcadores moleculares (Marchelli y Gallo 2006). En particular, las diferencias encontradas para marcadores de regiones no codificantes del ADNcp en *Nothofagus pumilio* indicaría que esta disyunción es anterior a las posibles fragmentaciones ocurridas por los cambios climáticos del Pleistoceno (com. per. P. Mathiasen). En términos poblacionales de variabilidad genética de *P. saligna* (Tabla V. 8), la población Nahuel Buta presenta los mayores valores de la especie, lo que podría indicar una posible zona de refugio durante el Pleistoceno. Mientras que las poblaciones ubicadas sobre la cordillera de los Andes posiblemente hayan sido eliminadas durante los períodos fríos y consecuentemente los menores valores poblacionales detectados aquí sean efecto de la migración y efecto fundador postglaciarios. Entonces conocer los eventos históricos y las características autoecológicas de las especies, en combinación con el rango geográfico y la continuidad de las poblaciones, es fundamental para entender e interpretar los patrones de variación genética de las especies.

*Saxegothaea conspicua* presenta una distribución geográfica similar, en extensión, ambiente y continuidad a *P. nubigena*. Sin embargo, *S. conspicua* presenta valores menores en los parámetros genéticos respecto de *P. nubigena*, difiriendo estadísticamente en casi la totalidad de las variables analizadas para los promedios poblacionales (Tabla V. 10). Las diferencias pueden estar dadas por la distancia filogenética entre ellas, y por las características disímiles en los sistemas reproductivos. El sistema reproductivo de *S. conspicua* determinaría mayores niveles de polimorfismo (Tabla V. 4), sin embargo los valores detectados pueden ser reflejo de los cambios climáticos del Pleistoceno. Durante este período, *S. conspicua* habría tenido un comportamiento alterno al de *P. nubigena*, es decir los períodos fríos no la habrían favorecido, según los registros polínicos publicados por Moreno (2004) y Villagrán (2001).

*Prumnopytis andina* presenta reducidos niveles de variación genética en comparación con las especies de *Podocarpus* y *Saxegothaea* analizadas, y estas

características son las esperadas para especies con distribución restringida y raras. Si bien las distancias entre las poblaciones muestreadas es la menor de todas las especies analizadas, su divergencia poblacional es alta ( $F_{ST} = 14\%$ ). Este valor y los niveles de variación genética posiblemente se modifiquen si se incrementa el tamaño muestral y se abarca todo el rango de distribución de la especie.

Mas allá de las relaciones filogenéticas, no se detectaron diferencias notorias entre las especies en la distribución de la diversidad genética. Esto sugiere que la diversidad genética en especies de distinto rango no parece repartirse dentro y entre poblaciones de manera diferente como lo documentaron Gitzendanner y Soltis (2000) para especies congéneres. Por lo tanto factores históricos juntamente con sus características autoecológicas explicarían la distribución de polimorfismos en Podocarpaceae de Sudamérica.

## V. 6. 2. Factores históricos

Los análisis de distancias genéticas entre especies mediante isoenzimas indican que *P. saligna* presenta una menor distancia con *P. parlatorei* que con *P. nubigena* (Fig. V. 2). Este mismo resultado se detectó en el análisis cladístico con datos morfológicos (Fig. V. 4). Esta congruencia entre los resultados de distancia genética calculados con isoenzimas y el análisis cladístico morfológico estarían indicando una señal histórica. Juntamente con los datos morfológicos las isoenzimas evidenciarían una divergencia más reciente entre la especie templado cálida y las subtropicales. Sin embargo, la evidencia obtenida del análisis filogenético realizado con tres marcadores moleculares (dos del ADN del cloroplasto y uno nuclear) indica que las relaciones entre *P. saligna*, *P. nubigena* y el clado que contiene a *P. parlatorei*, no pueden ser resueltas con los genes considerados. No obstante los resultados del análisis a partir de datos moleculares no contradicen los resultados del cladograma a partir de datos morfológicos. Por lo tanto, se puede afirmar que pudo existir un ancestro común para las especies de *Podocarpus* tolerantes a climas cálidos del sur de Sudamérica

Los análisis filogenéticos para datos moleculares apoyan el origen monofilético del género *Podocarpus* (Conran et al. 2000; Sinclair et al. 2002). También muestra que *Podocarpus parlatoresi* se diversificó comparativamente más que *P. nubigena* y *P. saligna*. Esta aseveración está basada para el marcador, *trn* L-F, donde no se detectaron diferencias intraespecíficas ni en *P. nubigena* (17 individuos analizados, capítulo V) ni *P. saligna* (cinco individuos analizados, datos no mostrados). El cladograma a partir de los datos morfológicos sugiere, a partir de un linaje austral, un evento de vicarianza o dispersión, donde se separó el ancestro de *P. cunninghamii* (de Nueva Zelanda) del ancestro de los *Podocarpus* sudamericanos. Este ancestro, a su vez, dio origen a la especie microtérmica *P. nubigena* y al ancestro que se diversificó en el clado que actualmente se ubica más al norte. Éste grupo actualmente contiene a las especies mesotérmicas estudiadas *P. saligna*, *P. parlatorei* y *P. glomerulosa*. Como muestran las evidencias polínicas, las especies géneros australes como *Podocarpus* migraron de sur a norte a partir del Eoceno (van der Hammen y Hooghiemstra 2001). A partir de ese momento la gran extensión disponible en el subtrópico y trópico habría posibilitado la diversificación de *Podocarpus* y *Prumnopytis*. En cambio, las condiciones de cambios tectónicos y climáticos desde el Oligoceno ocurridas en Patagonia fueron restringiendo los ambientes habitables por las Podocarpaceae al Bosque Templado Austral en el oeste del continente, limitando así eventos de diversificación y especiación. De esta manera, *P. nubigena*, tolerante a climas fríos, permaneció circunscrita al BTA desde su origen en Sudamérica y/o el oeste de la Antártida.

Especies morfológicamente similares, como *P. parlatorei* y *P. saligna*, (Tabla V. 9 y 10), ocupan ambientes con características ecológicas similares. Así, las especies de requerimientos climáticos más cálidos como los del norte de la Patagonia y ambientes subtropicales de montaña presentan similitudes morfológicas que se reflejan en el cladograma a partir de datos morfológicos. Según Hinojosa y Villagrán (2005) las floras subtropicales del este de los Andes, representadas por las formaciones de bosque de Yungas y Montanos del este de Bolivia tuvieron condiciones hídricas y de temperaturas análogas a

las de las floras de los bosques de la costa pacífica de Chile central-sur imperantes durante el Paleógeno. Estas dos áreas coinciden con las distribuciones actuales de *P. parlatoresi* y *P. saligna*, que son las especies con menor distancia genética y más relacionadas morfológicamente, por lo que posiblemente puedan presentar afinidades filogenéticas que se podrían resolver si son analizadas con otros marcadores moleculares. Sería interesante incorporar las especies de *Podocarpus* distribuidas en el este de Sudamérica (Brasil) y que pertenecen a otras secciones a análisis filogenéticos futuros, lo que podría completar la historia de su origen y evolución en el continente sudamericano.

7. **Apéndice V. 1:** Frecuencias alélicas para tres poblaciones de *P. saligna*. En negrita se indican alelos que se han detectada en una única población.

Locus	VV	LV	NB
G2d1			
G2d1-2	0.967	0.700	0.727
G2d1-3	0.033	0.300	0.182
G2d1-4	0.000	0.000	<b>0.091</b>
Idh1			
Idh1-1	1.000	1.000	0.000
Idh1-2	0.000	0.000	<b>1.000</b>
Idh2			
Idh2-1	0.100	0.000	0.045
Idh2-2	0.900	1.000	0.909
Idh2-3	0.000	0.000	<b>0.045</b>
Mdh1			
Mdh1-1	0.000	<b>0.042</b>	0.000
Mdh1-2	1.000	0.958	1.000
Mdh2			
Mdh2-1	1.000	0.923	0.545
Mdh2-2	0.000	0.077	0.318
Mdh2-3	0.000	0.000	<b>0.136</b>
Me1			
Me1 -2	1.000	1.000	1.000
Per <sub>A</sub> 1			
Per <sub>A</sub> 1-2	1.000	1.000	1.000
Per <sub>A</sub> 2			
Per <sub>A</sub> 2-1	0.000	<b>0.038</b>	0.000
Per <sub>A</sub> 2-2	0.320	0.000	0.591
Per <sub>A</sub> 2-3	0.680	0.731	0.000
Per <sub>A</sub> 2-4	0.000	0.000	<b>0.409</b>
Per <sub>A</sub> 2-5	0.000	<b>0.231</b>	0.000
Per <sub>A</sub> 3			
Per <sub>A</sub> 3-2	0.897	1.000	0.818
Per <sub>A</sub> 3-3	<b>0.103</b>	0.000	0.000
Per <sub>A</sub> 3-4	0.000	0.000	<b>0.182</b>
Pgm1			
Pgm1-2	1.000	1.000	1.000
Pgm2			
Pgm2-2	0.365	0.458	0.333
Pgm2-3	0.577	0.542	0.333
Pgm2-4	0.058	0.000	0.333

**8. Apéndice V. 2:** Frecuencias alélicas para tres poblaciones de *Pr. andina*.

Locus	CG	CR	MP
Idh1			
Idh1-2	1.000	1.000	0.976
Idh1-3	0.000	0.000	0.024
Mdh1			
Mdh1-2	0.895	0.800	0.976
Mdh1-3	0.105	0.200	0.024
Mdh2			
Mdh2-1	0.053	0.267	0.000
Mdh2-2	0.947	0.733	0.952
Mdh2-3	0.000	0.000	0.048
Mdh2			
Mdh2-2	1.000	1.000	1.000
Mnr1			
Mnr1-2	1.000	1.000	1.000
Me1			
Me1-1	0.000	0.100	0.441
Me1-2	1.000	0.767	0.559
Me1-3	0.000	0.133	0.000
Pgi1			
Pgi1-2	0.895	0.800	0.857
Pgi1-3	0.105	0.200	0.143
Per <sub>A</sub> 1			
Per <sub>A</sub> 1-2	1.000	1.000	1.000

**9. Apéndice V. 3:** Frecuencias alélicas para ocho poblaciones de *S. conspicua*.

Locus	ON	ESP	CT	PB	FR	MI	RP	MÑH
Ihd1								
Ihd1-2	1.000	1.000	1.000	1.000	0.883	1.000	1.000	1.000
Ihd1-3					0.117			
Mdh1								
Mdh1-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mdh2								
Mdh2-3	0.133	0.150	0.033		0.150	0.107		0.017
Mdh2-4	0.800	0.850	0.967	1.000	0.767	0.875	0.966	0.983
Mdh2-5	0.067				0.083	0.018	0.034	
Mnr1								
Mnr1-1			0.121			0.121	0.155	
Mnr1-2	1.000	1.000	0.879	1.000	1.000	0.879	0.845	1.000
Per <sub>A</sub> 1								
Per <sub>A</sub> 1-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Per <sub>A</sub> 2								
Per <sub>A</sub> 2-1	0.275				0.328		0.105	0.341
Per <sub>A</sub> 2-2	0.725	0.750	0.948	0.833	0.672	0.540	0.895	0.659
Per <sub>A</sub> 2-3		0.250	0.052	0.167		0.460		
Per <sub>A</sub> 4								
Per <sub>A</sub> 4-2	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pgi1								
Pgi1-2	0.962	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pgi1-3	0.038							
Pgi2								
Pgi2-1	0.214	0.500	0.172	0.086	0.263	0.103	0.315	0.143
Pgi2-2	0.357	0.063	0.328	0.293	0.342	0.293	0.278	0.357
Pgi2-3	0.429	0.438	0.500	0.621	0.395	0.603	0.407	0.500
Pgm1								
Pgm1-1				0.300		0.019		
Pgm1-2	1.000	1.000	1.000	0.700	1.000	0.981	0.788	1.000
Pgm1-3							0.212	
Pgm2								
Pgm2-1					0.433	0.054		
Pgm2-2	1.000	1.000	0.931	0.816	0.567	0.875	1.000	0.860
Pgm2-3			0.069	0.184		0.071		0.140



Continuación

Locus	Psa1	Psa2	Psa3	Scon1	Scon2	Scon3	Prand1
Idh1							
Idh1-1				1	1	1	
Idh1-2	0.1	0.1			0		1
Idh1-3	0.9	0.9	1		0		0
Mdh1							
Mdh1-1							
Mdh1-2							0.9
Mdh1-3							0.1
Mdh1-4	1	1	1				
Mdh1-5				1	1	1	
Mdh2							
Mdh2-1							
Mdh2-2							
Mdh2-3							
Mdh2-4	1	1	1	0.8	0.9	1	0.1
Mdh2-5				0.2	0.1	0	0.9
Mdh2-6							
Per <sub>A</sub> 4							
Per <sub>A</sub> 4-1				1	1	1	
Per <sub>A</sub> 4-2	1	1	1				
Per <sub>A</sub> 4-3							
Per <sub>A</sub> 4-4							1
Pgi1							
Pgi1-1							
Pgi1-2							
Pgi1-3	1	1	1	1	1	1	
Pgi1-4							0.9
Pgi1-5							0.1

**11. Apéndice V. 5:** Frecuencias alélicas para cinco loci de las cinco especies estudiadas.

Locus	Ppar	Pnub	Psal	Scon	Pand
Idh1					
Idh1-1				0.984	
Idh1-2			0.095	0.007	0.991
Idh1-3	1	1	0.905	0.009	0.009
Mdh1					
Mdh1-1	0	0.034			0.9
Mdh1-2	0.688	0.402	1		0.1
Mdh1-3	0.313	0.308			
Mdh1-4		0.237		1	
Mdh1-5		0.019			
Mdh2					
Mdh2-1	0.006	0.002			
Mdh2-2	0.955	0.113		0.014	
Mdh2-3	0.04	0.87	0.009	0.002	
Mdh2-4		0.015	0.991	0.906	0.091
Mdh2-5				0.078	0.891
Mdh2-6					0.018
Per <sub>A</sub> 4					
Per <sub>A</sub> 4-1				1	
Per <sub>A</sub> 4-2	1	0.039	1		
Per <sub>A</sub> 4-3		0.961			
Per <sub>A</sub> 4-4					1
Pgi1					
Pgi1-1	0.022			0.997	
Pgi1-2	0.666	0.002	1	0.003	
Pgi1-3	0.292	0.634			
Pgi1-4	0.02	0.316			0.855
Pgi1-5		0.048			0.145

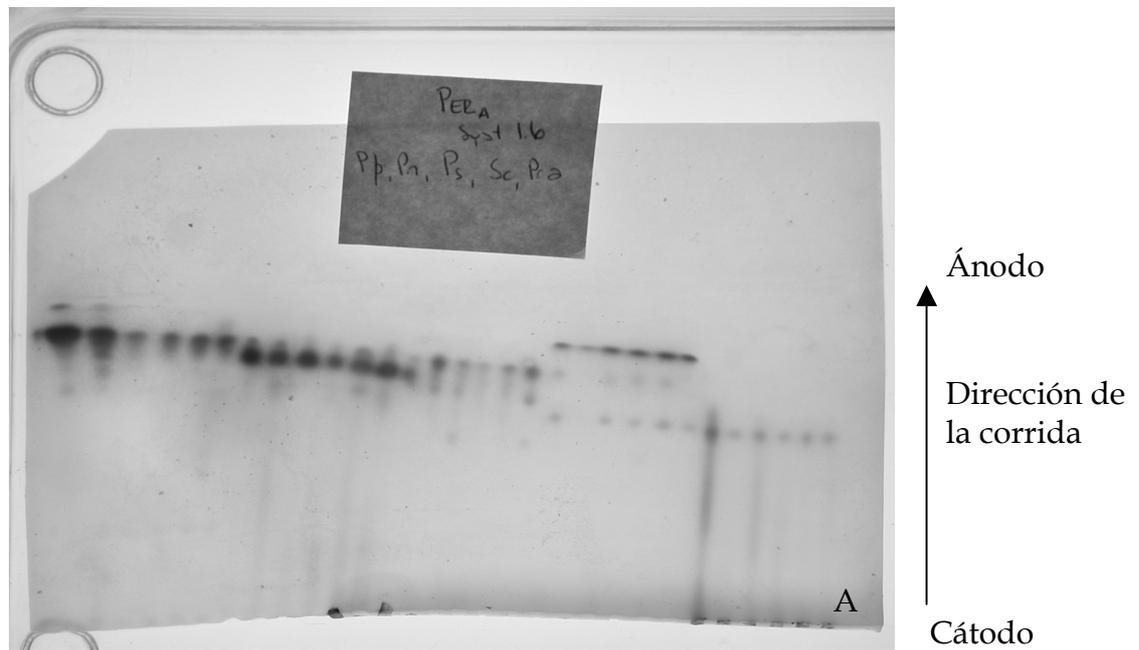


Figura V. 1: A. Gel de almidón con tinción para la enzima Per Anódica. El sitio de mayor intensidad para cada especie se tomo como homólogo.  
 B. Gel de almidón con tinción para la enzima Mdh.  
 Individuos de 1 a 6 *P. parlatorei*, 7 a 12 *P. nubigena*, 13 a 18 *P. saligna*, 19 a 24 *S. conspicua*, 25 a 30 *Pr. andina*.

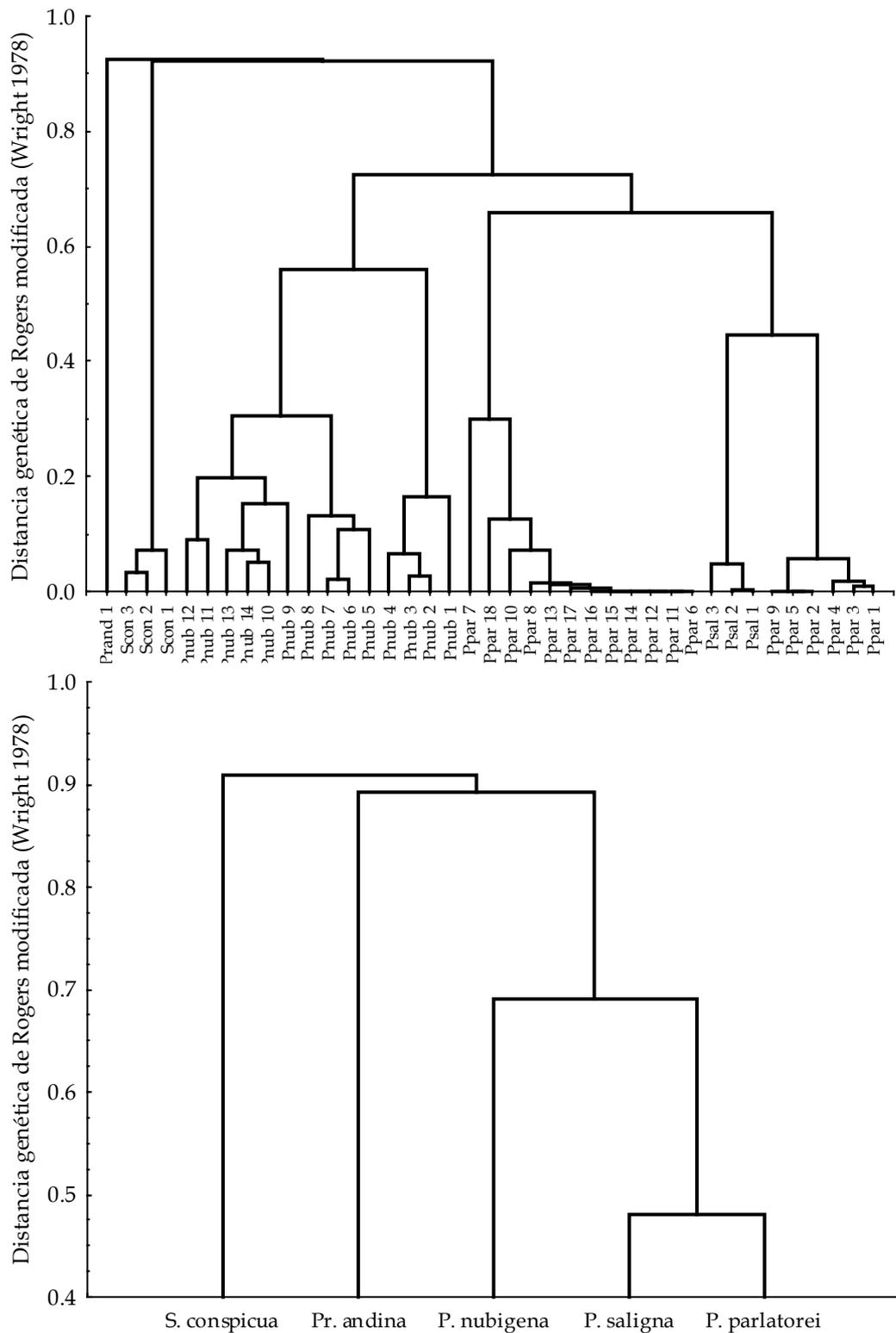


Figura V. 2: A. Árbol fenético elaborado con el método UPGMA de las distancias genéticas de Rogers modificadas (Wright 1978) para las poblaciones de las cinco especies analizadas.  
 B. Árbol fenético elaborado con el método UPGMA de las distancias genéticas de Rogers modificada (Wright 1978) para las cinco especies analizadas con las poblaciones pooleadas para cada especie.

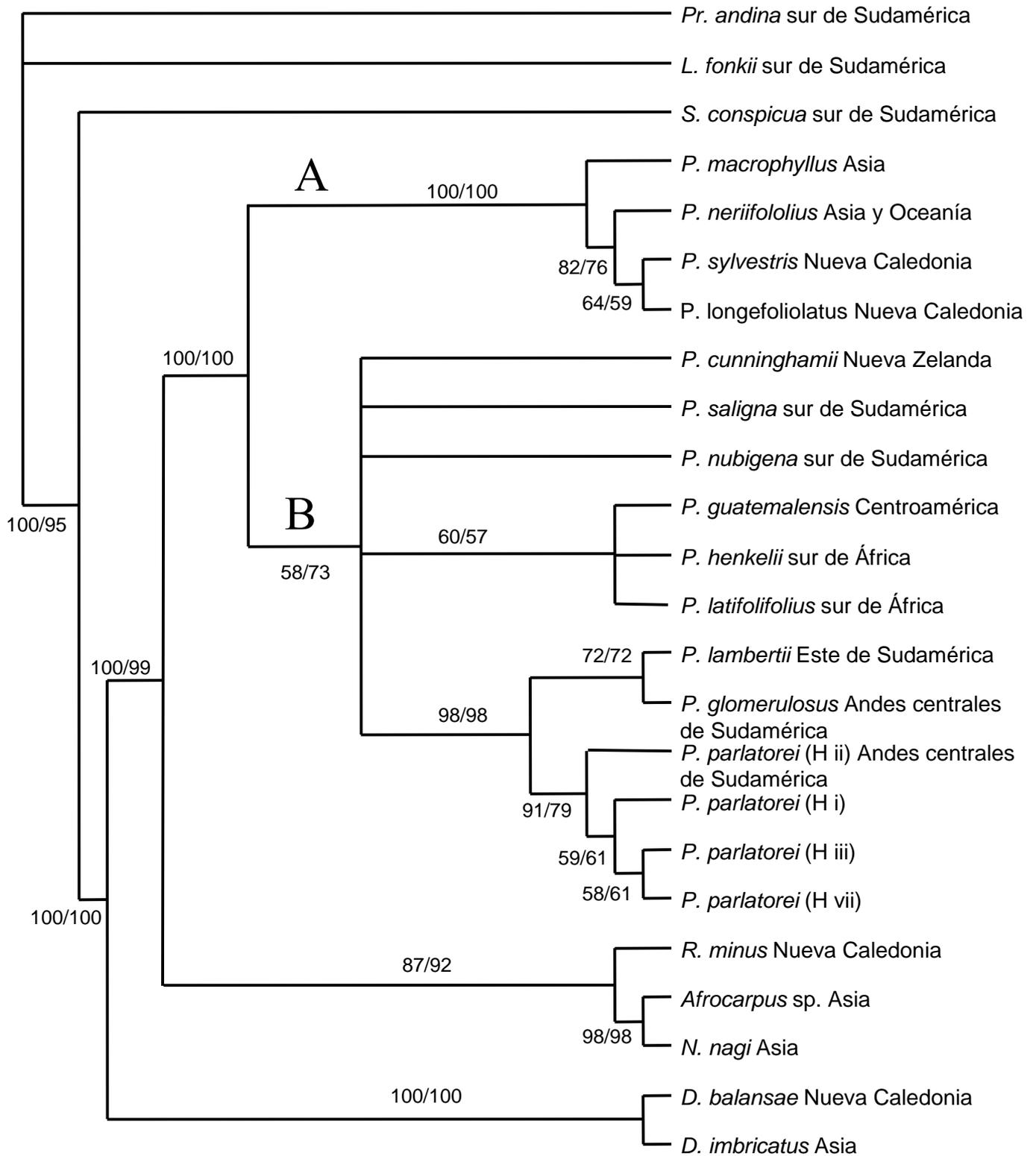


Figura V. 3: Árbol de consenso estricto para los marcadores trnL-F y rbcL del cloroplasto e ITS nuclear. *Pr. Andina* y *S. conspicua* se tomaron como outgroup. Los números indican el soporte de las ramas para el método de máxima parsimonia y máxima verosimilitud (MP/ML respectivamente).

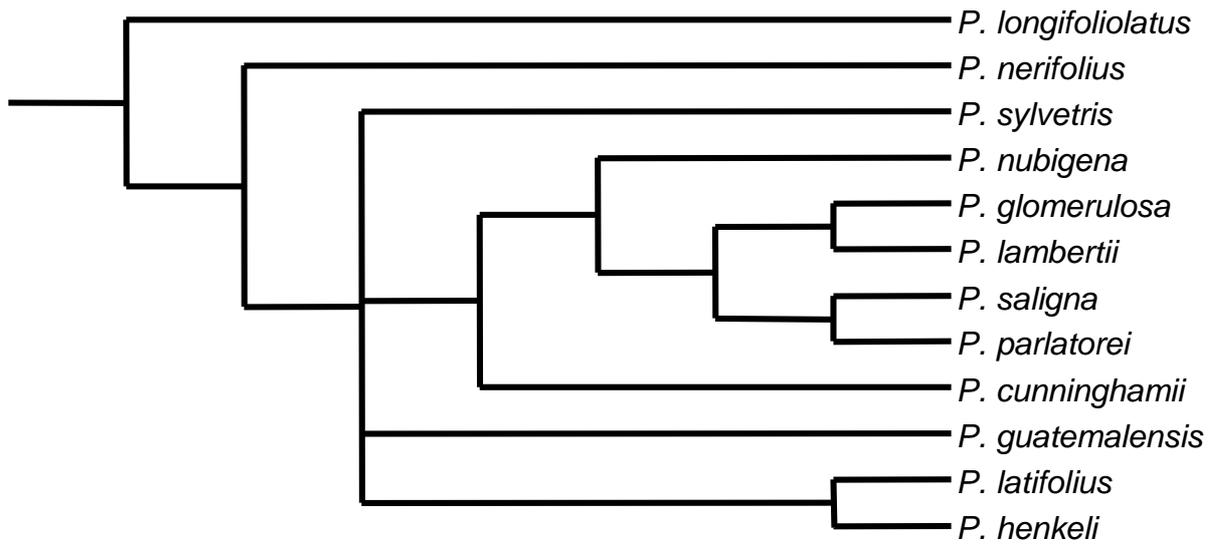


Figura V. 4: Árbol filogenético de caracteres morfológicos

# Capítulo VI

## Conclusiones generales

En esta tesis se evalúan las características genéticas poblacionales y filogeográficas de cinco especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica y sus relaciones filogenéticas, en relación a la amplitud de su distribución geográfica y la continuidad de sus poblaciones, a lo largo de distintos ambientes boscosos del sur de Sudamérica: el Bosque Templado Austral y el Bosque Montano de las Yungas.

El estudio de las diferencias en la composición florística a nivel de géneros entre el BMY y el BTA sugiere que:

- ❖ La historia climática del Cenozoico en Sudamérica afectó diferencialmente a las floras arbóreas que habitan el BMY y BTA.
- ❖ Numerosos linajes se habrían diversificado en los Andes tropicales durante el Neogeno, produciendo la gran riqueza actual de géneros y especies.
- ❖ En el BTA se manifiesta un alto porcentaje de Endemismos y de elementos Australes, que no sufrieron grandes cambios morfológicos ni evolutivos.

El estudio de variación genética de la especie de amplio rango *Podocarpus parlatorei* del BMY sugiere que:

- ❖ Es una especie geográficamente estructurada cuyas poblaciones posiblemente sufrieron aislamientos durante períodos cálidos del Neógeno, los cuales pueden ser observados tanto con isoenzimas como con ADN del cloroplasto.
- ❖ Los patrones de mayor variación genética isoenzimática en las poblaciones del sur de la distribución sugieren que este sector habría funcionado como refugio durante períodos cálidos.

- ❖ Las reducciones en la diversidad genética hacia el norte y hacia las poblaciones de mayor altura evidencian posibles migraciones resultantes de las oscilaciones climáticas durante el Cuaternario. Las poblaciones se habrían expandido hacia el norte durante los períodos más fríos, y se habrían contraído hacia las zonas montañosas durante los períodos cálidos.
- ❖ El sector central es el más diverso haplotídicamente para el ADN del cloroplasto, mientras que el sector sur presenta un haplotipo único. El patrón detectado sugiere que *P. parlatoresi* se habría diversificado durante los períodos cálidos.
- ❖ La presencia de un haplotipo único en las poblaciones del sur posiblemente refleja una zona de cierta estabilidad a partir de la cual se produjo el desplazamiento hacia el norte que migró junto con el levantamiento de la cordillera.
- ❖ Los análisis conjuntos con dos marcadores (isoenzimas y ADN del cloroplasto) muestran similares tasas de flujo génico y difieren en el patrón de estructuración geográfica. De esta manera se evidencia que la señal histórica que cada uno refleja difiere temporalmente. El patrón haplotípico muestra una posible historia de migración ocurrida posiblemente a partir del Eoceno, y las isoenzimas hacen lo propio con una señal histórica más reciente, posiblemente del Pleistoceno y Holoceno.

El estudio de variación genética en la especie *Podocarpus nubigena* ampliamente distribuida en el BTA sugiere que:

- ❖ Es una especie geográficamente estructurada al norte y sur de los 43°S, lo que apoya historias biogeográficas diferentes para las distintas poblaciones.
- ❖ Los niveles de riqueza alélica y polimorfismo, en combinación con los pares de  $F_{ST}$ , permiten sugerir que poblaciones cercanas se diferencian en zonas genéticamente diversas consideradas de refugio

glaciaros y las que poseen reducida diversidad producto de cuellos de botella genéticos las cuales fueron colonizadas luego del retiro de los hielos.

- ❖ Todas las poblaciones presentaron una elevada diversidad genética lo que sugiere que las poblaciones habrían sobrevivido localmente en múltiples refugios durante períodos climáticos adversos en áreas libres de hielo durante las glaciaciones.
- ❖ Los procesos magmáticos, además de las glaciaciones del Neógeno, han contribuido a la estructura genética de antiguos linajes como *Podocarpus*. En particular, la población Lago Vargas LVG, la cual está ubicada en el hiato volcánico y por lo tanto se sugiere que fue menos afectada por el vulcanismo que las poblaciones al sur de la ZVS. Como resultado, la población Lago Vargas LVG posiblemente haya sido la fuente para otras poblaciones al sur de los 43° S.
- ❖ El incremento de la diversidad genética en la población Futaleufú FT ubicada a los 43° S sugiere un origen múltiple, probablemente como resultado de convergencia de rutas migratorias a partir de distintos refugios.
- ❖ La falta de variación haplotídica sugiere que es una especie altamente adaptada a las condiciones ambientales desde Paleógeno.

Los análisis comparativos entre especies de Podocarpaceae sugieren que:

Para los efectos de la amplitud geográfica

- ❖ *Podocarpus parlatoei*, *P. nubigena* y *Saxegothaea conspicua* tienen amplia distribución geográfica respecto de *Podocarpus saligna* y *Prumnopitys andina*.
- ❖ No se detectó relación alguna entre el rango de distribución y el polimorfismo.
- ❖ Si bien en promedio las especies ampliamente distribuidas y con poblaciones continuas tienen mayor heterocigosis observada y alelos

por locus, la especie *P. saligna* con restringida distribución geográfica no presenta reducidos niveles de variación genética.

- ❖ *Saxegothaea conspicua* presentó menores valores de diversidad genética en comparación a lo esperado para especies con amplia distribución geográfica y polinización y dispersión anemófila, probablemente reflejo de cuellos de botella sufridos durante períodos fríos debido a su condición mesotérmica.
- ❖ No se detectaron diferencias entre las especies en la distribución de la diversidad genética en sus componentes dentro y entre poblaciones.

Para las relaciones filogenéticas

- ❖ Las distancias genéticas medidas en base a marcadores neutros nucleares isoenzimáticos y la filogenia morfológica presentan el mismo patrón de relación entre las especies, mostrando un ancestro común para las especies de *Podocarpus* analizadas en esta tesis. Las secuencias para el marcador *trn* L-F muestran que *P. parlatoarei* se diversificó comparativamente más que *P. nubigena* y *P. saligna*.
- ❖ Especies morfológicamente similares, como *P. parlatoarei* y *P. saligna*, y que ocupan ambientes con características ecológicas similares, presentaron mayor afinidad en el análisis cladístico morfológico y de distancias genéticas.
- ❖ El origen de *Podocarpus* en el sur de Sudamérica pudo deberse a un único evento de dispersión.
- ❖ Las especies de *Podocarpus* tolerantes a climas cálidos del sur de Sudamérica tuvieron un ancestro común.
- ❖ La relaciones filogenéticas moleculares indica que las relaciones entre *P. saligna*, *P. nubigena* y el clado que contiene a las especies subtropicales de América del Sur, no pueden ser resueltas con los datos moleculares utilizados. Sin embargo, una solución posible a la topología molecular es la obtenida para los datos morfológicos.

- ❖ A partir de la evidencia de los análisis filogenéticos se sugiere que las relaciones entre las especies con tolerancias ecológicas cálidas similares evolucionaron y se diversificaron al migrar hacia el norte, aprovechando la elevación de la cordillera de los Andes. En contraposición *P. nubigena*, con tolerancias ecológicas templado-frías, permaneció restringida al Bosque Templado Austral, pero pudo mantener altos niveles de variación genética mediante la supervivencia local en áreas microclimatológicamente favorables libres de hielo durante las glaciaciones.

## VI. 2. Implicancias para la conservación de Podocarpaceae Sudamericanas

### *Podocarpus parlatorei*

La elevada variación genética y la existencia de un haplotipo único en el sur de la distribución ponen de manifiesto la importancia de estas poblaciones como reservorio de diversidad genética. *Podocarpus parlatorei* está internacionalmente protegida en el Apéndice I de CITES. Esto significa que su explotación y comercialización está prohibida. Algunas poblaciones se encuentran dentro de áreas protegidas de Argentina y Bolivia. Sin embargo, las poblaciones del sector sur se encuentran fuera de las áreas protegidas (Tabla 4), lo que las expone a una situación vulnerable frente a posibles daños. Por otro lado, la reducida diversidad haplotídica detectada para los individuos de Tarija, pueden ser reflejo de una fuerte presión demográfica de los bosques interandinos bolivianos (Muñoz 2001). Particularmente, las poblaciones El Nogalar, El Rey, Taficillo y Caliegua, se encuentran dentro de áreas protegidas, las cuales, junto con otras áreas de reserva no muestreadas, contemplan aproximadamente 251.770ha de bosques y selvas de montaña (Brown et al. 2002). Además, toda el área del sector norte de Yungas en Argentina se encuentra dentro de la reserva biosfera. La variación intraespecífica es cada vez más aceptada como una herramienta valiosa

para orientar los esfuerzos de conservación (Premoli 1998). En particular, la detección de centros de diversidad genética podría ser útil para el diseño de estrategias de conservación de especies longevas, como el caso de *P. parlatorei*. Por otra parte, ya que *P. parlatorei* es un buen colonizador (Arturi 1998), nuestros resultados sugieren que las poblaciones locales pueden utilizarse para la restauración de hábitats degradados.

### *Podocarpus nubigena*

Debido a su valiosa madera, las poblaciones de *P. nubigena* del BTA se encuentran ante la necesidad de desarrollo de estrategias de conservación. Se debe dar prioridad a las poblaciones genéticamente diversas, en particular a aquellas amenazadas por las actividades de tala y/o intenso uso humano situadas fuera de áreas protegidas. De manera que todo el patrimonio genético de *P. nubigena* y, por tanto, su potencial adaptativo a largo plazo este protegido dentro de toda el área de distribución. La mayoría (8 de 14) de las poblaciones estudiadas se encuentran en propiedades privadas (Tabla IV. 1). Las poblaciones estudiadas de Argentina se encuentran dentro de Parque Nacionales, sin embargo, se sabe de otras regiones donde crece esta especie pero que no se encuentran dentro de ningún régimen de protección. En Chile, de las poblaciones del sur de la distribución, sólo la población Queulat QLT está dentro del Parque Nacional homónimo. Más al norte existen poblaciones dentro de parques nacionales, pero lamentablemente las poblaciones genéticamente diversas Huilenco HU, Astillero AST y Los Muermos LM, están altamente amenazadas ya que se encuentran próximas a zonas residenciales o áreas que fueron modificadas para el pastoreo o extracción de madera (HU), o bien están restringidas a márgenes de arroyos (LM) o zonas anegadizas (AST). Gran parte de la X región de los Lagos en Chile y la Isla de Chiloé han sido modificadas, drenando los “ñadis” y alterando las condiciones naturales de estos ambientes. Sin embargo, la población Lahuen Ñadi LÑ de donde fueron tomadas las muestras para este trabajo está en una zona residencial pero se encuentra próxima a una reserva.

Respecto de las poblaciones del norte, la población Oncol ON está ubicada dentro de una reserva privada, la empresa explota la parte inferior de la cordillera de la costa, mientras que la parte más elevada está destinada a una reserva forestal de especies nativas. La población Antillanca ANT se ubica sobre los faldeos del volcán que lleva el mismo nombre y dentro del Parque Nacional Puyehue.

Sobre la base de los resultados obtenidos se sugiere implementar pautas de uso y manejo de la tierra en zonas afectadas por el uso antrópico, ya que las características genéticas de las poblaciones son de un alto valor en cuanto a que presentan características únicas para la especie. Se necesita además de estudios que analicen posibles diferencias adaptativas entre las poblaciones.

### *Podocarpus saligna*

Es una especie que era relativamente abundante en el pasado (Hechenleitner et al 2005). Las grandes extensiones de las forestaciones han reducido enormemente las poblaciones de esta especie, por lo que encontrar bosque nativo con *P. saligna* ha sido de gran dificultad.

En cuanto a sus características genéticas parecería mantener un reducido flujo génico entre poblaciones localizadas sobre ambas cordilleras, lo que podría ser reflejo de una diyunción previa a las glaciaciones del Pleistoceno. Por lo tanto, conocer la identidad genética de las poblaciones remanentes puede facilitar futuras tareas de restauración de la zona afectada por forestaciones y los efectos devastadores de los incendios forestales.

### *Prumnopitys andina*

Al igual que *P. saligna*, el área de distribución de esta especie está fuertemente amenazada por el uso de la tierra con cultivos de especies forestales exóticas. Como crece también en las nacientes de los ríos, también la amenazan los embalses de las represas destinadas a usinas hidroeléctricas, como ocurre en las nacientes del río Bio Bio, al norte del PN Conguillio.

En un estudio preliminar a lo largo de la distribución de esta especie (Marínez 2005), se estudiaron mediante secuenciación de ADN del cloroplasto seis poblaciones sobre la cordillera de los Andes y una en Nahuel Buta. Los análisis realizados por Martínez (2005) indican que si bien existe un haplotipo común que se distribuye en todas las poblaciones, la mayoría presentan al menos un haplotipo único independientemente del reducido tamaño de las poblaciones. Estos resultados de alta variación genética son datos fundamentales para fomentar la protección de los restos de bosque de la región andina del centro-sur de Chile, que coinciden con las nacientes de numerosos ríos, y no perder la información genética de estas poblaciones ni de la especie, que podría ser utilizada para elucidar la historia biogeográfica y la filogenia de este género con características únicas.

### *Saxegothaea conspicua*

La evidencia para los registros polínicos a las latitudes de 41°45'S (Moreno 2004) y 40° 57' (Villagrán 2001) evidencian picos en la abundancia polínica de *P. nubigena* y *S. conspicua* que alternan en el tiempo. Si bien actualmente son especies que coexisten en la mayor parte de su distribución, *P. nubigena* (39°50' - 50°23' S) llega más al sur que la de *S. conspicua* (36° - 45°45'S), mientras que *S. conspicua* se extiende más al norte. Estas diferencias reflejan que *S. conspicua* (36° - 45°45'S) es más tolerante a climas templado-cálidos que *P. nubigena*, por lo que las respuestas a los cambios climáticos de estas dos especies pueden haber sido distintas y que estarían siendo reflejadas por una menor diversidad genética en *Saxegothaea* reflejando cuellos de botella genéticos.

Proteger y conservar poblaciones de estos antiguos linajes aseguran la preservación en el largo plazo de estos acervos genéticos algunos de los cuales de gran valor comercial. Además su estudio permite analizar hipótesis sobre la diversificación y distribución de las especies. Los bosque de coníferas de el BTA son extremadamente antiguos y han permanecido en esta región posiblemente desde antes de la separación de Sudamérica con la Antártida, y desde esta región

han migrado hacia el norte bajas donde se han diversificado aprovechando los nuevos nichos ofrecidos durante el levantamiento de la cordillera de los Andes.

### VI. 3. Aporte a la conservación de las Podocarpaceae del sur de Sudamérica

Las revisiones de conservación en Podocarpaceae del sur de Sudamérica han sido publicadas por Farjon et al. (1993) y Premoli (1994). Asimismo, los datos publicados en la lista roja de especies amenazadas (IUCN) son en su mayoría del año 1998. Los resultados obtenidos en esta tesis pueden aportar a la falta de información que existía para varias de las especies estudiadas que están en listas de especies amenazadas.

En primer término, *Podocarpus parlatorei* aparece en la UICN como una especie vulnerable (Walter y Gillett 1998) y es una especie listada en el Apéndice I de CITES. Las causas por las que esta especie aparece como vulnerable son pérdida de hábitat y por ser fuente de una importante madera de uso comercial. Las 18 poblaciones que visité presentaron una buena regeneración natural de plántulas y numerosos ejemplares de posiblemente más de 80 o 100 años. La información genética no muestra evidencia de reducción de los niveles del acervo genético, excepto para la población Tarija, como se mencionó anteriormente. A partir de las características genéticas encontradas podrían sugerirse planes de manejo para el uso sustentable y explotación controlada de esta especie de valor económico.

Para las especies del BTA, en el caso de *P. nubigena* la UICN la ha catalogado como en riesgo bajo y posiblemente amenazada. Si bien es una especie que presenta elevados niveles de polimorfismo y variación genética, más de la mitad de las poblaciones analizadas se encuentran fuera de áreas protegidas por lo que están permanentemente amenazadas de extinguirse localmente. Por estas razones, recomiendo elevar el estatus de conservación a una especie en peligro.

*Podocarpus saligna* es una especie catalogada como vulnerable. El efecto de las forestaciones comerciales en toda su área de distribución, sumado a sus importantes diferencias genéticas entre poblaciones disyuntas y el reducido tamaño poblacional, considero pueden ser elementos suficientes para elevar su estatus de conservación a una especie en peligro. Asimismo, se sugiere tomar las mismas acciones con la especie *Prumnopytis andina*.

Los resultados obtenidos para *Saxegothaea conspicua* no la muestran como una especie que se encuentre bajo riesgo, sin embargo es una especie que se encuentra amenazada por habitar en los suelos productivos del sur de Chile e Isla de Chiloé. Por estas razones continúa siendo una especie vulnerable.

Como contribución final de este trabajo se sugiere una nueva categorización para las especies de Podocarpaceae del sur de Sudamérica (Tabla IV. 1)

Tabla VI. 1 los posibles cambios de estado de conservación a partir de la información previamente publicada.

Especie	Distribución	Estatus de conservación según Premoli (1994)	Estado de conservación
<i>Prumnopytis andina</i>	VII a IX región de Chile.	Vulnerable	En peligro
<i>Podocarpus saligna</i>	VII a X región de Chile.	Rara, restringida y en riesgo	En peligro
<i>Podocarpus nubigena</i>	X a la XII región de Chile, e ingresiones valdivianas de Río Negro y Chubut en Argentina	Rara, restringida y en riesgo	En peligro
<i>Saxegothaea conspicua</i>	De la VIII a la XI región de Chile e ingresiones valdivianas de Neuquen, Río Negro y Chubut en Argentina	Rara, restringida y en riesgo	Vulnerable
<i>Podocarpus parlatorei</i>	Noroeste de Argentina, centro y sur de Bolivia	Datos deficientes (UICN). Vulnerable (Walter y Gillett 1998). Apéndice I de CITES	Con datos, excluirla del Apéndice I de CITES

# Bibliografía

- Afzal-Rafii Z, Dodd RS (2007) Chloroplast DNA supports a hypothesis of glacial refugia over postglacial recolonization in disjunct populations of black pine (*Pinus nigra*) in western Europe. *Molecular Ecology* 16:723–736.
- Aizen MA, Ezcurra C (1998) High incidence of plant-animal mutualism in the woody flora of the temperate forest of southern South America: biogeographical origin and present ecological significance. *Ecología Austral (Argentina)* 8:217-236..
- Aizen M, Ezcurra C (2008) Do leaf margins of the flora of the temperate forest of southern South America reflect a warmer past? *Global Ecology and Biogeography* 17:164–174.
- Allendorf FW, Knudsen KL, Blake GM (1982) Frequencies of null alleles at enzymes loci in natural population of ponderosa and red pine. *Genetics* 100:497-504.
- Allnutt TR, Newton AC, Lara A, Premoli AC, Armesto JJ, Vergara R, Gardner M (1999) Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Molecular Ecology* 8:975-987.
- Allnutt TR, JR Curtis, M Gardner, AC Newton (2001) Genetic variation in wild Chilean and cultivated British populations of *Podocarpus salignus* D. Don (Podocarpaceae). *Edinburgh Journal of Botany* 58: 459-473.
- Allnutt TR, Newton AC, Premoli A, Lara A (2003) Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. *Biological Conservation* 114:245-253.
- Armesto J, Vidiela PE (1993) Plant life-forms and biogeographic relations of the flora of Lagunillas in the fog-free Pacific Coastal Desert. *Ann Missouri Bot. Gard.* 80:499-511.
- Armesto JJ, Lobos PL, Arroyo MK (1996) Bosques templados del sur de Chile y Argentina: una isla biogeográfica. En: JJ Armesto, C Villagrán y MK Arroyo. *Ecología de los bosques nativos de Chile: 23-27*. Editorial Universitaria. Chile.
- Arroyo MTK, Squeo FA, Armesto JJ, Villagrán C (1988) Effects of aridity on plant diversity in the northern Chilean Andes: results of a natural experiment. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 75:55–78.
- Arroyo MTK, Cavieres L, Peñalosa A, Riveros M, Faggi AM (1996) Relaciones fitogeográficas y patrones regionales de riqueza de especies en la flora del bosque lluvioso templado de Sudamérica. En: Armesto JJ, C Villagrán y MK Arroyo. *Ecología de los bosques nativos de Chile: 71-92*. Editorial Universitaria. Chile.
- Arturi MF, Grau HR, Aceñolaza PG, AD Brown (1998) Estructura y sucesión en bosques montanos del Noroeste de Argentina. *Revista de Biología Tropical*. 46:525–532.
- Avise JC, Arnold J, Ball Jr. RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC (1987) Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:489-522.
- Axelrod DI, Arroyo MTK, Raven P (1991) Historical development of temperate vegetation in the Americas. *Revista Chilena de Historia Natural* 64:413-446.
- Barreda V, Anzóategui LM, Prieto A, et al. (2002) Diversificación y cambios de las angiospermas durante el Neógeno en Argentina. *Asociación paleontológica argentina* 11:173-191.
- Barreda V, Palazzesi L (2007) Patagonian Vegetation Turnovers during the Paleogene-Early Neogene: Origin of Arid-Adapted Floras. *The Botanical Review* 73:31-50.

- Barrett SCH, Kohn JR (1991) Genetic and evolutionary consequences of small population size plants: implications for conservation. En: Falk, DA y KE Holsinger. Genetics and conservation of rare plants. Oxford University Press. New York.
- Behling H, Lichte M (1997) Evidence of Dry and Cold Climatic Conditions at Glacial Times in Tropical Southeastern Brazil *Quaternary Research* 48: 348–358.
- Bennett KD, Tzedakis PC, Willis KJ (1991) Quaternary refugia of north European trees. *Journal of Biogeography* 18:103–115.
- Bennett KD, Haberle SG, Lumley SH (2000) The Last Glacial-Holocene Transition in Southern Chile. *Science* 290:325–328.
- Bevill RL, Louda SM (1999) Comparisons of related rare and common species in the study of plant rarity. *Conservation Biology* 13:493–498.
- Bhagwat SA, Willis KJ (2008) Species persistence in northerly glacial refugia of Europe: a matter of chance or biogeographical traits?. *Journal of Biogeography* 35:464–482.
- Birkenmajer K, Gazdzicki A, Krajewski KP, Przybycin A, Solecki A, Tatur A, Yoon HI (2005) First Cenozoic glaciers in West Antarctica. *Polish Polar Research* 26:3–12.
- Brown AD, Ramadori ED (1989) Patrón de distribución, diversidad y características ecológicas de especies arbóreas de las selvas y bosques montanos del noroeste de la Argentina, pp. 177–181. *Anales VI Congreso Forestal Argentino*.
- Brown AD (1995) Las selvas de montaña del noroeste de Argentina: problemas ambientales e importancia de su conservación. En: AD Brown y HR Grau. Investigación, Conservación y desarrollo en las selvas subtropicales de montaña. Laboratorio de Investigaciones Ecológicas de las Yungas. Tucumán, Argentina.
- Brown AD, Grau HR, Malizia LR, Grau A (2001) Argentina. En: Bosques Nublados del Neotropico. M Kappelle, AD Brown (Dds), pp. 623–659. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica.
- Brown AD, Grau A, Lomáscolo T, Gasparri NI (2002) Una estrategia de conservación para las selvas subtropicales de montaña (yungas de Argentina). *Ecotropicos* 15:147–159
- Bush MB, Colinvaux PA, Weinmann MC, Piperno DR, Liu KB (1990) Late Pleistocene temperature depression and vegetation change in Ecuadorian Amazon. *Quaternary Research*, 34:330–345.
- Bush MB, Hooghiemstra H (2005) Tropical biotic responses to climate change. En Lovejoy TE, Hannah L. *Climate Change and Biodiversity*, pp. 125–137. Yale University Press, New Haven.
- Cabrera AL (1994) *Regiones fitogeográficas argentinas*, 2nd edn. ACME, Buenos Aires.
- Cabrera AL, Willink A (1973) *Biogeografía de América Latina*. Biology Series, Monography 13. General Secretariat of the Organization of American States, Washington, D.C.
- CITES (2007) *Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. <http://www.cites.org>
- Clapperton C (1993) *Quaternary geology and geomorphology of South America*. Esvier.
- Clayton J, y Treliak D (1972) Amine-citrate buffers for pH control in starch gel electrophoresis. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 29:1169–1172.
- Cole CT (2003) Genetic variation in rare and common plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 34:213–237.
- Colinvaux PA, KB Liu, P Oliveira, MB Bush, MC Miller, Steinitz Kannan M (1996) Temperature depression in the lowland tropics in glacial times. *Climatic Change* 32:19–33.
- Colinvaux PA (1998) A new vicariance model for Amazon endemics. *Global Ecology and Biogeography Letters* 7: 95–96.

- Colinvaux PA, De Oliveira PE, Bush MB (2000) Amazonian and neotropical plant communities on glacial time-scale: The failure of the aridity and refuge hypotheses. *Quaternary Science Reviews*, 19, 141-169.
- Colinvaux PA, De Oliveira PE (2001) Amazon plant diversity and climate through the Cenozoic. *PALAEO* 166:51-63.
- Comps B, Gömöry D, Letouzey J, Thiébaud B, Petit RJ (2001) Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics* 157:389-397.
- Conran JG, Wood GM, Martín PG, Dowd JM, Quinn CJ, Gadek PA, Price RA (2000) Generic relationships within and between the gymnosperm families Podocarpaceae and Phyllocladaceae based on an analysis of the chloroplast gene *rbc-L*. *Australian Journal of Botany* 48:715-724.
- Correa M (1998) Flora Patagónica. Tomo VIII. Parte I. Colección científica del INTA. Buenos Aires.
- Coyne JA, Orr HA (2004) *Speciation*. Sinauer, Sunderland.
- Critchfield WB (1984) Impact of Plesitocene on the genetic structure of North American conifers. En: *Proceedings of the Eight North American Forest Biology Workshop*. Lanner RM (Ed) pp. 70-118. Department Forest Resources, Utah State University, Logan, UT, USA.
- Cruzan MB, Templeton AR (2000) Paleogeography and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *TREE* 15:491-496.
- Chaw (1995) The Phylogenetic Positions of the conifer genera *Amentotaxus*, *Phyllocladus*, and *Nageia* inferred from 18S rRNA sequences. *Journal of Molecular Evolution* 41:224-230.
- Davis MB (1976) Pleistocene biogeography of temperate deciduous forest. *Geoscience and man*. 13:173-112.
- De Laubenfels DJ (1985) A taxonomic revision of the genus *Podocarpus*. *Blumea* 30:251-278.
- del Fueyo G (1996) Microsporogenesis and microgametogenesis of the Argentinian species of *Podocarpus* (Podocarpaceae). *Bot J Linn Soc* 122: 171-182.
- Demesure B, Sodzi N, Petit RJ (1995) A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4:129-131.
- Digilio APL, Legname PR (1966) Los árboles indígenas de la Provincia de Tucumán. *Opera Lilloana* XV. Tucumán, Argentina.
- Dimitri MJ (1972) La región de los bosques andino-patagónicos. Sinopsis general. Colección científica del INTA. Buenos Aires.
- Dimitri MJ, Leonardis J, Biloni JS (1997) El nuevo libro árbol: especies forestales de la Argentina occidental, Vol. 1, 1º Ed., pp. 78-79. El Ateneo, Buenos Aires.
- Doan TM. 2003. A south-to-north biogeographic hypothesis for Andean speciation: evidence from the lizard genus *Proctoporus* (Reptilia, Gymnophthalmidae). *Journal of Biogeography* 30:361-374.
- Donoso C (1974) *Dendrología, árboles y arbustos chilenos*. Manual N°2. Facultad de Ciencias Forestales, Universidad de Chile. Santiago, Chile. 142 p.
- Donoso C (1995) *Bosques templados de Chile y Argentina*. Variación, estructura y dinámica. Tercera Edición, Editorial Universitaria S.A. Santiago, Chile. 484 p.
- Donoso C, Escobar B, Donoso P (2006b) *Saxegothea conspicua* Lindl. En: Donoso Zegers (ed) *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina*. Marisa Cuneo, Valdivia. Chile.

- Donoso C, Utreras F (2006c) *Podocarpus saligna* D.Don. En: Donoso Zegers (ed) Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Marisa Cuneo, Valdivia. Chile.
- Donoso C, Utreras F, Zuñiga A (2006a) *Podocarpus nubigena* Lindl. En: Donoso Zegers (ed) Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Marisa Cuneo, Valdivia. Chile.
- Duminil J, Pemonge M-H, Petit RJ (2002) A set of 35 consensus primer pairs amplifying genes and introns of plant mitochondrial DNA. *Molecular Ecology Notes* 2:428-430.
- Dumolin-Lapegue S, Pemonge MH, Petit RJ (1997) An enlarged set of consensus primers for the study of organelle DNA in plants. *Molecular Ecology* 6:393-397.
- Espenshade EB, Morrison JL (1978) *Goode's world atlas*. 15 Ed. Rand McNally y Company. Chicago.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree (*Argania spinosa* L.Skeels) endemic to Morocco. *TAG* 92:832-839.
- Ellstrand NC, DR Elam (1993) Populations genetic consequences of small populations size: implications for plant conservation. *Annual Review Ecology and Systematic* 24: 217-242.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) Arlequin ver. 3.11: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.
- Ezcurra C, (2002) Phylogeny, morphology and biogeography of Chuquiraga, an Andean-Patagonian genus of Asteraceae-Barnadesioideae. En: KRYoung, C Ulloa Ulloa, JL Luteyn y S Knapp. Plant evolution and endemism in Andean South America. *Botanical Review* 68:153-170.
- 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.
- Ezcurra C, Baccalá N, Wardle P (2008) Floristic relationships among plant communities of the southern Andes and New Zealand: similarities and biogeographic implications. En prensa en *Annals of Botany*.
- Farjon, A, Page CN, Schellevis N (1993) A preliminary world list of threatened conifer taxa. *Biodiversity and Conservation* 2:304-326.
- Farris JS (1989) The retention index and homoplasy excess. *Syst. Zool.* 38:406-407.
- Fowler DP, Morris RW (1977) Genetic diversity in red pine: evidence for low genetic heterogeneity. *Canadian Journal Forest Research* 7:343-347.
- Francois JP (2004) Eslabones de una cadena rota: el caso del bosque relicto de Santa Inés. En: Squeo FA, Gutiérrez JR, Hernández IR. *Historia Natural del Parque Nacional Bosque Fray Jorge*. Pp 205-218. Ediciones Universidad de La Serena, La Serena, Chile.
- Frankel O H, Soulé ME (1981) *Conservation and evolution*. Cambridge University Press, UK.
- Gayó E, Hinojosa LP, Villagrán C (2005) On the persistence of Tropical Paleofloras in central Chile during the Early Eocene. *Review of Palaeobotany and Palynology* 137:41- 50.
- Gentry, A.H. (1982). Neotropical floristic diversity: phytogeographical connections between central and South America, Pleistocene climatic fluctuations, or an accident of Andean orogeny? *Ann. Missouri Bot. Gard.* 69: 557-593.
- Gentry AH (1986) Species richness and floristic composition of Chocó region plant communities. *Caldasia* 15:71-91.

- Gitzendanner MA, PS Soltis (2000) Patterns of genetic variation in rare and widespread plant congeners. *American Journal of Botany* 87: 783-792.
- Glasser NF, Harrison S, Winchester V, Aniya M (2004) Late Pleistocene and Holocene palaeoclimate and glacier fluctuations in Patagonia. *Global and Planetary Change* 43:79-101.
- Glasser NF, Jansson KN, 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
- Godt MJW, Hamrick JL, Edwards-Burke MA, Williams JH (2001) Comparisons of genetic diversity in white spruce (*Picea glauca*) and jack pine (*Pinus banksiana*) seed orchards with natural populations. *Can. J. For. Res.* 31:943-949.
- Goudet J (2002) FSTAT A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Université de Lausanne, Dorigny, Switzerland.  
www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm
- Gugerli F, Sperisen C, Büchler U, Brunner I, Brodbeck S, Palmer JD, Qiu Y-L (2001) The evolutionary split of Pinaceae from other conifers: evidence from an intron loss and a multigene phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 21:167-175.
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology Notes* 8:521-523.
- Hamrick JL, Mitton JB, Linhart YB (1981) Levels of genetic variation in trees: influence of life history characteristics. En: Conkle MT. *Isozymes of North America forest trees and forest insects*. Pps. 35-41. U. S. Dep Agric.: Berkeley. California.
- Hamrick JL (1989) Isozymes and analysis of genetic structure of plant populations. En: D. Soltis y P. Soltis. *Isozymes in plant biology*. Pp 87-105. Dioscorides Press, Washington.
- Hamrick JL, MJW Godt (1989) Allozyme diversity in plant species. En: Brown HD, MTClegg, AL Kahler y BS Weir. *Plant populations genetics, and genetic resources*. Pp. 43-63. Massachusetts.
- Hamrick JL, MJW Godt, DA Murawski, MD Loveless (1991) Correlations between species traits and allozyme diversity: implications for conservation biology. En: Falk DA y KE Holsinger. *Genetics and conservation of rare plants*. Pp 75-86. Oxford University Press. New York.
- Hamrick JL, Godt MJW, Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetics diversity in woody plant species. *New Forests* 6:95-124
- Hamrick JL, MJW Godt (1996) Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transaction of the Royal Society of London B.* 351:1291-1298.
- Hechenleitner P, Gardner MF, Thomas PI, Echeverría C, Esconar B, Brownless P, Martínez C (2005) Plantas amenazadas del Centro-Sur de Chile. Distribución, conservación y propagación. Primera edición. Universidad Austral de Chile y Real Jardín Botánico de Edingurgo. 188 pp.
- Heusser CJ (1990) Ice age vegetation and climate of subtropical Chile. *PALAEO* 80:107-127.
- Heusser CJ (1993) Late-glacial of southern South America. *Quaternary Science Reviews* 12: 345-350.
- Hewitt G (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58:247-276.
- Hewitt G (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*. 405:907-913.

- Hewitt G (2001) Speciation, hybrid zones and phylogeography-or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10:537-549.
- Hewitt G (2004a) A climate for colonization. *Heredity* 92:1-2.
- Hewitt GM (2004b) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359:183-195.
- Hiebert RD, Hamrick JL (1983) Patterns and levels of genetics variation in Great Basin bristlecone pine, *Pinus longaeva*. *Evolution* 37: 302 - 310.
- Hill RS, Dettmann ME (1996) Origin and diversification of the genus *Nothofagus*. En: *The ecology and biogeography of Nothofagus forests*. Pp 11-24. Veblen TT, Hill RS, Read J. Eds. Yale University Press, London.
- Hill RS, Brodribb TJ (1999) Southern conifers in time and space. *Australian Journal of Botany* 47:639-696.
- Hinojosa LF, C Villagrán (1997) Historia de los bosques del sur de Sudamérica, I: antecedentes paleobotánicos, geológicos y climáticos del Terciario del cono sur de América. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 225-239.
- Hinojosa LF, Villagrán C (2005) Did South American Mixed Paleofloras evolve under thermal equability or in the absence of an effective Andean barrier during the Cenozoic?. *Palaeo* 217:1-23.
- Hoffmann JAE (1997) Flora silvestre de Chile. Zona araucana. Cuarta edición revisada. Ediciones Fundación Claudio Gay. Chile.
- Hollin JT, Schilling DH (1981) Late Wisconsin-Weichselian mountain glaciers and small ice cape. En: Denton G & Hughes TJ (ed) *The last great ice sheets*. Wiley. New York
- Hooghiemstra H, Van der Hammen T, Cleef A. Evolution of forests in the northern Andes and Amazonian lowlands during the Tertiary and Quaternary. En: *Ecology of Neotropical Rain Forests*. Gariguata MR (ed). En Prensa.
- Huenneke LF (1991) Ecological implications of genetic variation in plant populations. En: *En Genetics and conservation of rare plant*. En: Falk DA y Holsinger KE. Pp 31-44. Oxford University Press.
- Hurlbert SH (1971) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology* 52:577-586
- Iglesias A, Wilf P, Jonson KR, Zamuner AB, Cúneo NR, Mateos SD (2007) A Paleocene lowland macroflora from Patagonia reveals significantly greater richness than North America analogs. *Geology* 35: 947-950.
- Isabel N, Beaulieu J, Bousquet J (1995) Complete congruence between gene diversity estimates derived from genotypic data at enzyme and random amplified polymorphic DNA loci in black spruce *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92:6369-6373.
- Jaramillo C, Rueda MJ, Mora G (2006) Cenozoic Plant Diversity in the Neotropics. *Science* 311:1893-1896.
- Jaramillo-Correa JP, Bousquet J, Beaulieu J, Isabel N, Perron M, Bouillé M (2003) Cross-species amplification of mitochondrial DNA sequence-tagged-site markers in conifers: the nature of polymorphism and variation within and among species in *Picea*. *Theoretical and Applied Genetics* 106:1353-1367.
- Jaramillo-Correa JP, Beaulieu J, Bousquet J (2004) Variation in mitochondrial DNA reveals multiple distant glacial refugia in black spruce (*Picea mariana*), a transcontinental North American conifer. *Molecular ecology* 13:2735-2747.
- Jaramillo-Correa JP, Aguirre-Planter E, Khasa DP, Eguiarte LE, Piñero D, Furnier GR, Bousquet J (2008) Ancestry and divergence of subtropical montane forest isolates: molecular biogeography of the genus *Abies* (Pinaceae) in southern México and Guatemala. *Molecular Ecology* 17:2476-2490.
- Jorgensen SM, Hamrick JL (1997) Biogeography and population genetics of whitebark pine, *Pinus albicaulis*. *Can. J. For. Res.* 27:1574-1585

- Karron JD (1987) A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1:47-58.
- Karron JD, Linhart YB, Chaulk CA, Robertson CA (1988) Genetic structure of population of geographically restricted and widespread species of *Astragalus* (Fabaceae). *American Journal of Botany* 75:1114-1119.
- Kelch DG (1997) The phylogeny of the Podocarpaceae bases on morphological evidence. *Systematic Botany* 22:113-131.
- Kelch DG (1998) Phylogeny of Podocarpaceae: comparison of evidence from morphology and 18S. *American Journal of Botany* 85:986-996.
- Kershaw AP, McGlone MS (1995) The Quaternary history of the Southern conifers. En: Enright NJ & Hill RS. *Ecology of the Southern conifers*. Melbourne University Press.
- Killeen TJ, Garcia E, Beck SG (1993) *Guía de árboles de Bolivia*. Herbario Nacional de Bolivia, Missouri Botanical Garden.
- Kimura M (1968) Evolutionary rate and the molecular level. *Nature* 217:624-626.
- Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of bases substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *J. Mol. Evol.* 16:111-120.
- King JN, Dancik BP (1983) Inheritance and linkage of isozymes in white spruce (*Picea glauca*). *Can. J. Genet. Cytol.* 5:430-436.
- Kluge AG, Farris JS (1969) Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Systematic Zoology* 18:1-32.
- Koscinski D, Handford P, Tubaro PL, Sharp S, Loughheed SC (2008) Pleistocene climatic cycling and diversification of the Andean treefrog, *Hypsiboas andinus*. *Molecular Ecology* 17:2012-2025.
- Kremer A, Kleinschmit J, Cottrell J, Cundall EP, Deans JD, Ducouso A, König AO, Lowe AJ, Munro RC, Petit RJ, Stephan BR (2002) Is there a correlation between chloroplastic and nuclear divergence, or what are the roles of history and selection on genetic diversity in European oaks?. *Forest Ecology and Management* 156:75-87.
- Lacy RC (1992) The effects of inbreeding of isolated populations: are minimum viable population sizes predictable? *Conservation Biology: The Theory and Practice of Nature Conservation Preservation and Management*. pp. 277-296. (eds. by P.L. Fiedler and S.K. Jain) Chapman and Hall, New York, USA.
- Lande R (1988) Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241: 1455-1460.
- Latta RG, Mitton JB (1997) A Comparison of Population Differentiation Across Four Classes of Gene Marker in Limber Pine (*Pinus flexilis* James). *Genetics* 146: 1153-1163.
- Ledig ET, Jacob-Cervantes V, Hodgskiss PD, Eguiluz-Piedra T (1997) Recent evolution and divergence among populations of rare Mexican endemic, Chihuahua spruce, following holocene climatic warming. *Evolution* 51:1851-1827.
- Ledig FT (1999) Genetic diversity, genetic structure, and biogeography of *Pinus sabiniana* Dougl. *Diversity and Distribution* 5:77-90.
- Ledig FT (2000) Founded effects and the genetic structure of coulter pine. *Genetic* 91:307-315.
- Ledig FT, Hodgskiss PD, Jacob-Cervantes V (2002) Genetic diversity, mating system, and conservation of a Mexican subalpine relict, *Picea mexicana* Martínez. *Conservation Genetics* 3:113-122.

- Ledru MP, Ferraz Salatino ML, Ceccantini G, Salatino A, Pinheiro F, Pintaud JC (2007) Regional assessment of the impact of climatic change on the distribution of a tropical conifer in the lowlands of South America. *Diversity and Distributions* 13:761–771.
- Lee S-W, Ledig FT, Johnson DR (2002) Genetic variation at allozyme and RAPD markers in *Pinus Longaeva* (Pinaceae) of the mountains, California. *American Journal of Botany* 89:566–577.
- Legname PR (1982) Árboles indígenas del noroeste Argentino. Opera Lilloana XXXIV. Ministerio de Cultura y Educación, Fundación Miguel Lillo. Argentina.
- Leigh Jr. EG, Davidar P, Dick CW, Puyravaud J-P, Terborgh J, Wright SJ (2004) Why Do Some Tropical Forests Have So Many Species of Trees? *Biotropica* 36: 447-473 2004.
- Lesica P, Allendorf FW (1995) When Are Peripheral Populations Valuable for Conservation? *Conservation Biology* 9:753-760.
- Lesica P, Yurkewycz R, Crone EE (2006) Rare plants are common where you find them. *American Journal of Botany* 93:454–459.
- Li CC, Horvitz DG (1953) Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics* 5:107-117.
- Linhart YB, Premoli AC (1993) Comparison of genetic variability in *Aletes humilis*, a rare plant species, and its common relative *Aletes acaulis* in Colorado. *American Journal of Botany* 80: 598-605.
- Lu M-Z, Szmidt AE, Wang X-R (1998) RNA-editing in gymnosperms and its impact on the evolution of the mitochondrial *coxI* gene. *Plant Molecular Biology* 37:225–234.
- Luo J, Wang Y, Korpelainen H, Li C (2005) Allozyme variation in natural populations of *Picea asperata*. *Silva Fennica* 39:167–176.
- Mabberley DJ (1990) The plant-book. A portable dictionary of the higher plants. Cambridge University Press.
- Magri D, Vendramin GG, Comps B, Dupanloup I, Geburek T, Gömöry D, Latatowa M, Litt T, Paule L, Roure JM, Tantau I, van der Knaap WO, Petit RJ, de Beaulieu J-L (2006) A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171:199–221.
- Marchelli P, Gallo L, Scholz F, Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theoretical and Applied Genetics* 97:642–646.
- Marchelli P, Gallo L (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics* 7:591–603.
- Markgraf V (1993) Paleoenvironments and paleoclimates in Tierra del Fuego and southernmost Patagonia, South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 102:53–68
- Markgraf V, McGlone M, Hope G (1995) Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic changes in southern temperate ecosystem - a southern perspective. *TREE* 10:143-147
- Markgraf V, Romero E, Villagrán C (1996) History and paleoecology of South American *Nothofagus* Forests. En: Veblen TT, RS Hill, J Read. *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*, pp. 354-386. Yale University Press, New Haven.
- Markgraf VM, Webb RS, Anderson KH, Anderson L (2002) Modern pollen/climate calibration for southern South America. *PALAEO* 181:375-397
- Martcorena C, Rodríguez R (1995) Flora de Chile. Vol I. Universidad de Concepción, Chile
- Martínez MO, Muñoz AN (1988) Aspectos conservativos de las coníferas chilenas. *Bosque* 9:77-81.

- Martínez C (2005) Análisis de ADN de cloroplasto en la especie *Prumnopitys andina*. Reunión de trabajo en genética de especies nativas de los bosques templados de Argentina y Chile. Bariloche. Argentina.
- Mathiasen P, Premoli AC (2007) Variación genética en *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente latitudinal. III Reunión Binacional de Ecología Argentina-Chile. La Serena, Chile
- Matthies D, Bräuer I, Maibom W, Twcharntke T (2004) Population size and the risk of local extinction: empirical evidence from rare plants. *Oikos* 105:481–488.
- McCulloch RD, Bentley MJ, Purves RS, Hulton NRJ, Sugden DE, Clapperton CM (2000) Climatic inferences from glacial and palaeoecological evidence at the last glacial termination, southern South America. *Journal of Quaternary Science* 15:409–417.
- Meudt HM, Simpson BB (2005) The biogeography of the austral, subalpine genus *Ourisia* (Plantaginaceae) based on molecular phylogenetic evidence: South American origin and dispersal to New Zealand and Tasmania. *Biological Journal of Linnean Society* 87:479 - 513
- Millar CI, Libby WJ (1991) Strategies for conservation clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. En Falk DA y KE Holsinger. *Genetics and conservation of rare plants*. Pp 149-170. Oxford University Press. New York.
- Mitton JB, Linhart YB, Sturgeon KB, y Hamrick L (1979) Allozyme polymorphisms detected in mature needle of ponderosa pine. *Journal of Heredity* 70:86-89.
- Morales JM, Sirombra M, Brown AD (1995) Riqueza de árboles en las yungas argentinas. En: *Investigación, conservación y desarrollo en selvas subtropicales de montañas*. Brown AD, HR Grau (eds.) pp. 163-174. Proyecto de desarrollo agroforestal, LIEY, Tucumán, Argentina.
- Moran GF, Bell JC, Matheson AC (1980) The genetic structure and levels of inbreeding in a *Pinus radiata* D. Don seed orchard. *Silvae genetica* 29:190-193.
- Moreno PI, León AL (2003) Abrupt vegetation changes during the last glacial to Holocene transition in mid-latitude South America. *JQS* 18:787-800
- Moreno PI (2004) Millennial-scale climate variability in northwest Patagonia over the last 15000 yr. *JQS* 19(1):35-47
- Moritz C, Hillis DM (1996) Molecular systematics: context and controversies. En: Hillis DM, C Moritz, BK Mable. *Molecular systematics*. 2º ed. Sinauer Associates, Massachussets USA. Pp1-13.
- Morrone JJ, Crisci JV (1995) Historical biogeography: introduction to methods. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 26:373-401.
- Muñoz T (2001) I. Estado actual de la información sobre árboles fuera del bosque. En *Estado de información forestal en Bolivia*. Depósito de documentos de la FAO.
- Murphy RW (1993) The phylogenetic analysis of allozyme data: invalidity of coding alleles by presence/absence and recommended procedures. *Biochemical Systematics and Ecology* 21:25–38.
- Murphy RW, Sites JW Jr, Buth DG, y Haufler CH (1996) Proteins: isozymes electrophoresis. *Molecular Systematics*. Hillis DM, C Moritz, BK Mable (eds.), pp 51-120. Sinauer Associates, Sunderland, MA, USA.
- Naranjo JA, CR Stern (2004) Holocene tephrochronology of the southernmost part (42°30'-45°S) of the Andean Southern Volcanic Zone. *Rev Geol Chile* 31: 225-240
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70:3321–3323.
- Nei M, Maruyama T, Charabarty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1-10
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small numbers of individuals. *Genetics* 89:583-590

- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA (1999) Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in Ecology and Evolution* 14:140-145.
- O'Malley DM, Allendorf FW, Blake GM (1979) Inheritance of isozyme variation and heterozygosity in ponderosa pine. *Biochemical Genetics* 17:233-250
- Ortiz-Jaureguizar E, Cladera GA (2006) Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments* 66: 498-532
- Pagel M (1999) The Maximum Likelihood Approach to Reconstructing Ancestral Character States of Discrete Characters on Phylogenies. *Syst. Biol.* 48(3):612-622.
- Panchal M (2007) The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, 23:509-510.
- Parisod C, Besnard G (2007) Glacial *in situ* survival in the Western Alps and polytopic autopolyploidy in *Biscutella laevigata* L. (Brassicaceae) *Molecular Ecology* 16:2755-2767.
- Parker KC, Hamrick JL, Parker AJ, Stacy EA (1997). Allozyme diversity in *Pinus virginiana* (Pinaceae): intraspecific and interspecific comparisons *American Journal of Botany* 84:1372-1382.
- Peakall R, Smouse PE (2006) Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6:288-295.
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA (2000) Neotropical seasonally dry forest and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27:261-273.
- Pennington RT, Lavin M, Prado DE, Pendry CA, Pell SK, Butterworth CA (2004) Historical climate change and speciation: neotropical seasonally dry forest plants show patterns of both Tertiary and Quaternary diversification. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 359:515-537.
- Petit RJ, Kremer A, Wagner DB (1993) Finite island model for organelle and nuclear genes in plants. *Heredity* 71:630-641.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csakl UM, van Dam B, Deans JD, Espinel S, Fineschi S, Finkeldey R, Glaz I, Goicoechea PG, Jensen JS, König AO, Lowe AJ, Madsen SF, Mátyás G, Munro RC, Popescu F, Slade D, Tabbener H, de Vries SGM, Ziegenhagen B, de Beaulieu JL, Kremer A (2002) Identification of refugia and post-glacial colonization routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. *Forest Ecology and Management* 156:49-74.
- Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, et al. (2002b) Phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156:5-26.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu J-L, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Ennos R, Fineschi S, Grivet S, Lascoux M, Mohanty A, Müller-Starck G, Demesure-Musch B, Palmé A, Martín JP, Rendell S, Vendramin GG (2003a) Glacial Refugia: Hotspots But Not Melting Pots of Genetic Diversity. *Science* 300:1563-1565.
- Petit RJ, Bodénès C, Ducouso A, Roussel G, Kremer A (2003b) Hybridization as a mechanism of invasion in oaks. *New Phytologist* 161:151-164.
- Petit RJ, Hu FS, Dick CW (2008) Forests of the past: A window to future changes. *Science* 320:1450-1452.
- Pons O, Petit RJ (1996) Measuring and testing genetic differentiation with ordered *versus* unordered alleles. *Genetics* 144:1237-1245.
- Poole I, Cantrill DJ, Hayes P, Francis J (2000) The fossil record of Cunoniaceae: new evidence from Late Cretaceous wood of Antarctica?. *Review of Palaeobotany and Palynology* 111:127-144.

- Poole I, Mennega AMW, Cantrill DJ (2003) Valdivian ecosystems in the late Cretaceous and early Tertiary of Antarctica as evidenced from fossil wood. *Review of Palaeobotany and Palynology*. 124: 9-27.
- Posada D, Crandall KA (1998) ModelTest: testing the model of DNA substitution. *Bioinformatics* 14:817-818.
- Poulik MD (1957) Starch gel electrophoresis in a discontinuous system of buffers. *Nature (London)* 180:1477-1479.
- Poulin E, Palma AT, Féral JP (2002). Evolutionary versus ecological success in Antarctic benthic invertebrates. *Trends Ecol. Evol.*, 17:218-222.
- Prado DE (1995) Selva pedemontana: contexto regional y lista de un ecosistema en peligro. En: Brown AD, R Grau. *Investigación y desarrollo en selvas subtropicales de montaña*, pp 19-52.
- Premoli AC (1994) South American temperate conifer species: a larger list. *Biodiversity and Conservation* 3:295-297.
- Premoli AC (1997) Genetic variation in two widespread and a geographically restricted species of *Nothofagus*. *Journal of Biogeography* 24:883-892.
- Premoli AC (1998) The use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas of more widespread species. En: *Proceedings of an International Workshop on Recent advances in biotechnology for tree conservation and management*. International Foundation for Science (ed. by). pp. 157-171. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina, Brazil.
- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen TT (2000a) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27:251-260.
- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen TT (2000b) Conservation genetics of the endangered conifer *Fitzroya cupressoides* in Chile and Argentina. *Conservation Genetics* 1:57-66.
- Premoli AC, Souto CP, Allnut TR, Newton AC (2001) Effects of population disjunction on isozyme variation in the widespread *Pilgerodendron uviferum*. *Heredity* 87:337-343.
- Premoli AC, Souto CP, Rovere AR, Allnut TR, Newton AC (2002) Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florin. *Diversity and Distributions* 8:57-66.
- Premoli AC, Del Castillo RF, Newton AC, Bekessy S, Caldiz M, Martínez-Araneda C, Mathiasen P, Núñez-Avila MC, Quiroga P, Souto C, Trujillo-Argueta S (2007) Patterns of genetic variation in tree species and their implications for conservation. En: Newton AC (ed) *Biodiversity Loss and Conservation in Fragmented Forest Landscapes: The Forests of Montane Mexico and Temperate South America*. CAB International
- Quiroga MP, Premoli A (2007) Genetic patterns in *Podocarpus parlatorei* reveal the long-term persistence of coldtolerant elements in the southern Yungas. *J Biogeog* 34:447-455
- Rabassa J, Coronato AM, 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.
- Rabinowitz D (1981) Seven forms of rarity. En: Synge H. *The biological aspects of rare plants conservation*. John Wiley y Sons Ltd.
- Raja R, Rajiv G, Tauer CG, Wittwer F, Huang Y (1997) Isozymes variation and genetic structure in natural populations of shortleaf pine (*Pinus echinata*). *Can. J. For. Res.* 27:740-749.

- Rajora OP, Dancik BP (2000) Population genetic variation, structure, and evolution in Engelmann spruce, white spruce, and their natural hybrid complex in Alberta. *Can. J. Bot.* 78:768–780.
- Rajora OP, Mosseler A, John E. (2000) Major Indicators of population viability in red spruce, *Picea rubens*. II. Genetic diversity, population structure, and mating behavior *Can. J. Bot.* 78: 941–956.
- Ramos VA, Kay SM (1992) Southern Patagonian plateau basalts and deformation: backarc testimony of ridge collisions. *Tectonophysics* 205:261-282.
- Ramos VA (2005) Seismic ridge subduction and topography: Foreland deformation in the Patagonian Andes. *Tectonophysics* 399:73-86.
- Reguero MA, Candela AM, Alonso RN (2007) Biochronology and biostratigraphy of the Uquía Formation (Pliocene–early Pleistocene, NW Argentina) and its significance in the Great American Biotic Interchange. *Journal of South American Earth Sciences* 23:1–16.
- Richardson JE, Pennington TR, Pennington TD, Hollingsworth PM (2001) Rapid diversification of a species-rich genus of Neotropical rain forest trees. *Science* 293:2242-2245.
- Rodríguez R, Matthei O, Quezada M (1983) Flora arbórea de Chile: 317-319. 408 p Editorial de la Universidad de Concepción, Chile.
- Rowe KC, Heske EJ, Brown PW, Paige KN (2004) Surviving the ice: Northern refugia and postglacial colonization. *PNAS* 101:10355-10359.
- Ruggiero A, Ezcurra C (2003) Regiones y transiciones biogeográficas. En J. J. Morrone y J. Llorente (eds.), *Biogeografía en Latinoamérica 2*: 141-154. Facultad de Ciencias UNAM, México.
- Rull V (2005) Biotic diversification in the Guayana highlands: a proposal. *Journal of Biogeography* 32:921–927.
- Rull V (2008) Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. *Molecular Ecology* 17:2722–2729.
- Ryder OA (1986) Species conservation and systematics: The dilemma of subspecies. *TREE*. 1:9–10.
- Schaal BA, Leverich WJ, Rogstad SH (1991) A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation biology. En: Falk DA y KE Holsinger. *Genetics and conservation of rare plants*. Pp 123-134. Oxford University Press. New York.
- Schaal BA, Haywordth DA, Olsen KM, Rauscher TJ (1998) Phylogeographic studies in plants: problems and prospects, *Molecular Ecology* 7:465–474 .
- Schaal BA, Olsen KM (2000) Gene genealogies and population variation in plants. *PNAS* 97:7024–7029.
- Schemske DW, Husband BC, Ruckelshaus MH, Goodwillie C, Parker IM, Bishop JG (1994) Evaluating approaches to the conservation and endangered plants. *Ecology* 75:584-606.
- Schmidtling RC, Hipkins V (1998) Genetic diversity in longleaf pine (*Pinus palustris*): influence of historical and prehistorical events. *Can. J. For. Res.* 28:1135–1145.
- Simpson BB (1983) A historical phytogeography of the high Andean flora. *Revista Chilena de Historia natural* 56:109-122.
- Simpson BB, Todzia CA (1990) Patterns and processes in the development of the high Andean flora. *American Journal of Botany* 77:1419-1432.
- Sinclair WT, Mill RR, Gardner MF, Woltz P, Jaffré T, Preston J, Hollingsworth ML, Ponge A, Möller M (2002) Evolutionary relationships of the New Caledonian heterotrophic conifer, *Parasitaxus usta* (Podocarpaceae), inferred from chloroplast

- trnL-F intron/spacer and nuclear rDNAITS2 sequences. *Plant Systematic and Evolution* 233:79–104.
- Sneath PHA, Sokal RR (1973) *Numerical taxonomy*. Freedman & Company, San Francisco, USA.
- Sokal RR, Rohlf FJ (1981) *Biometry*. 2<sup>o</sup> ed. New York: Freeman.
- Solbrig OT (1978) The origin and floristic affinities of the South American temperate desert and semidesert regions. En: Goodall DD. *Biodiversity and conservation of neotropical montane forest*. The New York Botanical Garden. Bronx.
- Soltis DE, Soltis PS (1989) *Isozymes in Plant Biology*, Discorides Press, Portland, OR, USA.
- Soltis PS, Gitzendanner MA (1995) Molecular Systematics and the Conservation of Rare Species. *Conservation Biology* 13:471–483.
- Soltis DE, Gitzendanner MA, Strenge DD, Soltis PS (1997) Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Pl. Syst. Evol.* 206:353-373.
- Soltis DE, Morris AB, McLachlan JS, Manos PS, Soltis PS (2006) Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology* 15:4261–4293.
- Souto CP, Premoli AC (2007) Genetic variation in the widespread *Embothrium coccineum* (Proteaceae) endemic to Patagonia: effects of phylogeny and historical events. *Australian Journal of Botany* 55:809–817.
- Stefanovic S, Jager M, Deutsch J, Broutin J, Masselot M (1998) Phylogenetic relationships of conifers inferred from partial 28S rRNA gene sequences. *American Journal of Botany* 85:688–697.
- Stern CR (2004) Active Andean volcanism: its geologic and tectonic setting. *Rev Geol Chile* 31: 161-206.
- Stern CR (2008) Holocene tephrochronology record of large explosive eruptions in the southernmost Patagonian Andes. *Bull Volcanol* 70:435–454.
- Stewart JR, Lister AM (2001) Cryptic northern refugia and the origins of the modern biota. *TREE* 16:608-612.
- Swofford DL (2002) PAUP\*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods)*. Version 4. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology*. 17:1105-1109
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution* 24:1596-1599.
- Tauber AA (1997) Paleoecología de la Formación Santa Cruz (Mioceno Inferior) en el extremo sudeste de la Patagonia. *Ameghiniana* 34:517–529.
- Thomson SN, Brandon MT, Reiners PW, Tomkin JH, Vásquez C, Wilson N (2007) Apoleward transition from destructive to constructive glacio/cliatic control on mountainbuilding. AGU Fall Meeting, San Fransisco, USA.
- Troncoso A (1997) El registro paleobotánico del Terciario de Chile central y sur y su relación con la flora actual. X Simposio Argentino de Paelobotánica y Palinología. Mendoza.
- Uliana MA. KT Biddle (1988) Mesozoic–Cenozoic paleogeographic and geodynamic evolution of southern South America. *Revista Brasileira de Geociencias* 18:172–190.
- Ulloa-Ulloa C, Møller-Jorgensen P (1993) Arboles y arbustos de los Andes del Ecuador. AAU Reports 30. Aarhus University Press, Aarhus. 264 pp.

- Van der Hammen T, Hooghiemstra H (2001) Historia y paleoecología de los bosques montanos andinos neotropicales. En: Bosque nublados del neotropico. Kappelle M, AD Brown (eds.). pp. 63-84. Instituto Nacional de Biodiversidad, Costa Rica.
- Varga Z (2008) Mountain coniferous forests, refugia and butterflies. *Molecular Ecology* 17:2101-2106.
- Veblen TT, Donoso C, Kitzberger T, Rebertus AJ (1996) Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. En: Veblen TT, RS Hill y J Read. *The Ecology and Biogeography of Nothofagus forests*. Pp. 293-353. Yale Univ. Press, New Haven.
- Villagrán C (2001) Un modelo de la historia de la vegetación de la Cordillera de la Costa de Chile central-sur: la hipótesis glacial de Darwin. *Rev Chil Hist Nat* 74:793-803
- Villagrán C, Hinojosa LF (1997) Historia de los bosques del sur de Sudamérica, II análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural* 70:225-239.
- Villagrán C, León A, Roig FA (2004) Paleodistribución del alerce y ciprés de las Guaitecas durante períodos interestadiales de la Glaciación Llanquihue: provincias de Llanquihue y Chiloé, Región de Los Lagos, Chile. *Revista Geológica de Chile* 31:133-151.
- Wade MJ, McCauley DE (1988) Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. *Evolution* 42:995-1005
- Wagstaff SJ (2004) Evolution and biogeography of the austral genus *Phyllocladus* (Podocarpaceae). *Journal of Biogeography* 31:1569-1577.
- Wardle P, Ezcurra C, Ramírez C, Wagstaff S (2001) Comparison of the flora and vegetation of the southern Andes and New Zealand. *New Zealand Journal of Botany* 39:69-108.
- Walter KS, Gillett HJ (1998) UICN red list of threatened plants. Cambridge UK.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.
- Widmer A, Lexer C (2001) Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *TREE* 16:267-269.
- Wiens JJ, Donoghue MJ (2004) Historical biogeography, ecology and species richness. *TREE*
- Wiens JJ, Graham CH (2005) Niche Conservatism: integrating evolution, ecology, and conservation biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:519-39
- Wilf P, Cúneo NR, Jonson KR, Hicks JF, Wing SL, Obradovich JD (2003) High Plant Diversity in Eocene South America: Evidence from Patagonia. *Science* 300:122-125.
- Wilson VR, JN Owens (2003) Cytoplasmatic inheritance in *Podocarpus totara* (Podocarpaceae). *Acta Hort. (ISHS)* 615:171-172  
[http://www.actahort.org/books/615/615\\_15.htm](http://www.actahort.org/books/615/615_15.htm)
- Willson MF, Sabag C, Figueroa J (1996) Frugivory and seed dispersal of *Podocarpus nubigena* in Chiloé, Chile. *Rev Chil Hist Nat* 69:343-349
- Wolfe, K.H., W-H Li & P.M. Sharp. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84:9054-9058.
- Wright S (1922) Coefficients of inbreeding and relationship. *Am Nat* 56: 330-338
- Wright S (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics* 16:97-159.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution* 19:358-420.
- Wright S (1978) *Evolution and the Genetics of Populations*. University of Chicago Press, Chicago, IL, USA.
- Wright S, Keeling J, Gillman L, (2006) The road from Santa Rosalia: A faster tempo of evolution in tropical climates. *PNAS* 103: 7718-7722

- Yeh FC, Yang RC, Boyle TJB, Ye Z-H, Mao JX (1999) POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis. Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, Canada. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/>.
- Zabinski, C. (1992) Isozyme variation in eastern hemlock. Canadian Journal of Forest Research 22, 1838-1842.
- Zawko G, Krauss L, Dixon KW, Sivasithamparam K (2001) Conservation genetics of the rare endangered *Leucopogon obtectus* (Ericaceae). Molecular Ecology 10:2389-2396.
- Zhang Q, Chiang TY, George M, Liu JQ, Abbott RJ (2005) Phylogeography of the Qinghai-Tibetan Plateau endemic *Juniperus przewalskii* (Cupressaceae) inferred from chloroplast DNA sequence variation. Molecular Ecology 14:3513-3524
- Zuloaga OF, Morrone O (1999a) Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina I. Missouri Botanical Garden Press.
- Zuloaga OF, Morrone O (1999b) Catálogo de las plantas vasculares de la República Argentina II. Missouri Botanical Garden Press.

# Agradecimientos

A mis directoras Dra. Andrea Premoli y Dra. Cecilia Ezcurra

A Fernando y Santiago Sánchez

A mi Familia, los Quiroga

A mis amigos

A mis compañeras de laboratorio Pau M., Cintia S., Marina A., Romina V.,  
Cristina A., Martina M., Romina D., Guille A.

A mis compañeros de Ecotono, especialmente a Norlan, Yami, Caro, Laura.

A Camila Martínez, Ricardo Vilariño, Lic. Edgar Gareca, Lic Saúl Altamirano,  
Ricardo Salinas

AL LIEY, especialmente a Dr. Alejandro Brown, Dr. Alfredo Grau, Ing. Forestal  
David, Julieta Carilla, Gustavo Namen, Cecilia Blundo

A Parques Nacionales Delegación Regional Patagonia (Guarparque Hansen) y  
NOA (Ricardo Guerra, Guarparque Constantino Alzogaray)

A CONAF

Al Herbario Nacional de La Paz, Bolivia

Al Herbario de Cochabamba, Bolivia

Al Proyecto BIOCORES de la Comunidad Económica Europea

A la Fundación Proyungas

A la Red Latinoamérica de Botánica

A CONICET