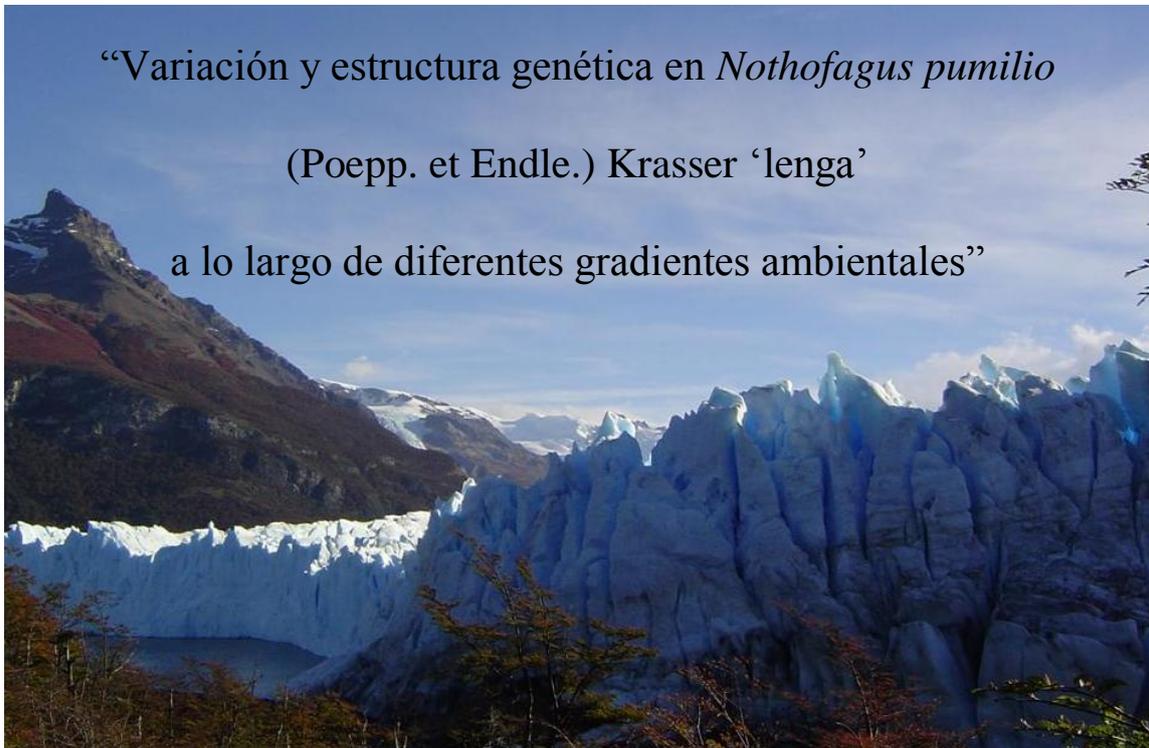




Centro Regional Universitario Bariloche

Trabajo de Tesis para optar por el grado de Doctora en Ciencias Biológicas



Por: Lic. Paula Mathiasen

Directora: Dra. Andrea C. Premoli

*Uno suele hallar su destino
en el sendero que toma para evitarlo...*

M. Oogway

Índice

Resumen	5
Abstract	8
1. Capítulo I: Introducción General	10
1.1. Historia de Patagonia.....	12
1.2. Evidencia fósil.....	15
1.3. Reconstrucción histórica en base a marcadores moleculares	17
1.4. Respuestas adaptativas en ambientes heterogéneos	19
1.5. Estructura y dinámica poblacional.....	22
1.6. Especie en estudio	23
1.7. Objetivos e hipótesis generales.....	26
1.8. Objetivos específicos e hipótesis particulares	27
1.9. Tablas y Figuras	30
2. Capítulo II: “Filogeografía de <i>Nothofagus pumilio</i> basada en secuencias no codificantes de ADN del cloroplasto evidencia una historia biogeográfica antigua”	38
2.1. Resumen	39
2.2. Introducción	40
2.3. Objetivos particulares	45
2.4. Hipótesis general e hipótesis particulares	46
2.5. Materiales y Métodos	48
2.6. Resultados	53
2.7. Discusión.....	57
2.8. Tablas y Figuras	65
3. Capítulo III: “Variación genética isoenzimática en <i>Nothofagus pumilio</i> a lo largo del gradiente latitudinal muestra los efectos de las glaciaciones en Patagonia”	89
3.1. Resumen.....	90
3.2. Introducción	91
3.3. Objetivos particulares	94
3.4. Hipótesis general e hipótesis particulares	94
3.5. Materiales y Métodos	96
3.6. Resultados	100
3.7. Discusión.....	104
3.8. Tablas y Figuras	108
4. Capítulo IV: “Estructura genética a escala espacial reducida en <i>Nothofagus pumilio</i> refleja el modo de regeneración predominante en el gradiente altitudinal”	125

4.1.	Resumen.....	126
4.2.	Introducción	127
4.3.	Objetivos particulares	130
4.4.	Hipótesis particulares	130
4.5.	Materiales y Métodos	132
4.6.	Resultados	137
4.7.	Discusión.....	139
4.8.	Tablas y figuras	144
5.	Capítulo V: “Variación en caracteres cuantitativos de <i>Nothofagus pumilio</i> sugiere respuestas adaptativas a condiciones contrastantes del gradiente altitudinal”	164
5.1.	Resumen.....	165
5.2.	Introducción	166
5.3.	Objetivos particulares	170
5.4.	Hipótesis particulares	170
5.5.	Materiales y Métodos	171
5.6.	Resultados	177
5.7.	Discusión.....	183
5.8.	Tablas y Figuras	187
6.	Capítulo VI: Discusión General	213
7.	Conclusiones Generales	220
8.	Apéndices	222
	Apéndice 1. Protocolo de extracción de ADN para muestras con alto contenido de polisacáridos.	223
	Apéndice 2. Parámetros de diversidad genética calculados para marcadores moleculares de ADN del cloroplasto e isoenzimas.	225
9.	Bibliografía	234
10.	Agradecimientos	252

Resumen

La región Patagónica ha sufrido el impacto de eventos antiguos tales como tectónica de placas, cambios en el nivel del mar, y más recientemente los cambios climáticos que ocurrieron durante el Cuaternario que afectaron la distribución de las poblaciones de plantas y sus patrones de diversidad genética. La hipótesis planteada es que los factores históricos se verán reflejados en la estructura genética de las poblaciones de plantas de linajes antiguos que habitan las latitudes australes. Este es el caso de *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae, lenga), especie arbórea que caracteriza los ambientes montañosos y altoandinos del Bosque Templado Austral. Esta especie de amplio rango altitudinal y latitudinal presenta una marcada variación en las formas de crecimiento y demografía a lo largo de su distribución. El objetivo general de este estudio es evaluar los niveles y la distribución de la variabilidad genética en *N. pumilio* a distintas escalas espaciales, utilizando distintos tipos de marcadores moleculares y caracteres cuantitativos. A escala de paisaje, se utilizaron polimorfismos genéticos de tres regiones no codificantes del ADN del cloroplasto para evaluar el rol que tuvieron los eventos paleogeológicos en modelar el acervo genético de *N. pumilio*. También se exploraron los efectos regionales de las oscilaciones climáticas del Cuaternario sobre el acervo genético de esta especie tolerante al frío utilizando ocho loci isoenzimáticos. A escala local, se analizaron las consecuencias genéticas del modo de regeneración en base a muestreos espacialmente explícitos en alturas contrastantes de tres pares de sitios utilizando marcadores isoenzimáticos y microsatélites. Además, se analizaron los efectos de la selección natural sobre caracteres adaptativos mediante experimentos de trasplantes recíprocos con plantas de distintos orígenes cultivadas en alturas contrastantes.

Los análisis a escala de paisaje mediante análisis filogeográficos muestran que los patrones de variación genética en *N. pumilio* están estructurados geográficamente y son consistentes con la paleogeografía del Paleógeno de Patagonia. A escala regional, los patrones isoenzimáticos reflejan las oscilaciones climáticas del Cuaternario que también difieren latitudinalmente. Niveles similares de variación genética distribuidos en el gradiente latitudinal, sugieren expansión local desde múltiples áreas libres de hielo. Las poblaciones de latitudes intermedias presentaron mayor diversidad intrapoblacional y mayor diferenciación genética inter-poblacional reflejando establecimiento relativamente reciente a partir de acervos genéticos divergentes. A escala local, la marcada estructura genética fina a escala espacial reducida en sitios de baja altitud en los Cerros Challhuaco y López indicaría un establecimiento agrupado de plántulas en claros abiertos bajo el dosel. La ausencia de estructura genética fina en el Cerro Otto y en sitios de mayor altitud podría estar reflejando disturbios recurrentes. Los trasplantes recíprocos muestran que las diferencias genéticas medidas en plantas de *N. pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal se traducen en una mayor plasticidad y una mayor respuesta aclimatativa en las plantas provenientes de menor altitud. En este estudio se encontró que la estructura genética actual de *N. pumilio* es el resultado complejo de la combinación de procesos históricos que ocurrieron a distintas escalas espaciales y en distintos tiempos geológicos y de adaptación a condiciones actuales cambiantes del gradiente altitudinal. *Nothofagus pumilio* ha conservado su identidad como especie desde el Paleógeno y ha respondido localmente a los cambios climáticos del Neógeno. Sin embargo, a pesar de ser un linaje antiguo *N. pumilio* ha mantenido la capacidad de responder vigorosamente a las presiones selectivas adaptándose al gradiente altitudinal. Por lo tanto los cambios climáticos ocurridos durante el

Cuaternario probablemente han tenido efectos sinérgicos sobre la estructura genética antigua a escalas locales.

Abstract

The Patagonic Region has suffered the impact of ancient events such as plate tectonics, sea-level changes, and more recently the climatic oscillations that occurred during the Quaternary which have affected the distribution of plant populations and their patterns of genetic diversity. The hypothesis postulated here is that historical factors will be reflected in the genetic structure of plant populations of ancient lineages which inhabit austral latitudes. This is the case of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae, lenga), a tree species that characterizes high-Andean mountainous environments from the Austral Temperate Forests. This species of wide-altitude and wide-latitude range presents a marked variation in growth forms and demography along its distribution. The general objective of this study is to evaluate the levels and distribution of genetic variation in *N. pumilio* at different spatial scales, using different molecular markers and quantitative traits. At landscape scale, genetic polymorphisms from three non-coding regions of chloroplast DNA were used to evaluate the role that palaeogeological events had on *N. pumilio*'s gene pool. Also, the regional effects of climatic oscillations from the Quaternary over this cold-tolerant species' gene pool were investigated using eight isozyme loci. At the local scale, the genetic consequences of regeneration mode were analyzed by means of a spatially explicit sampling design in contrasting elevations from three pairs of sites using isozyme markers and microsatellites. Moreover, the effects of natural selection over adaptive traits were tested using reciprocal transplant experiments of plants with different origins cultivated in contrasting elevations.

Landscape phylogeographic analyses show that the patterns of genetic variation in *N. pumilio* are geographically structured and are consistent with the Paleogene paleogeography of Patagonia. At regional scale, the isozyme patterns reflect the climatic

oscillations of the Quaternary which in turn also differ latitudinally. Similar levels of genetic variation distributed along the latitudinal gradient, suggest local expansion from multiple ice-free areas. Populations from intermediate latitudes presented greater intra-population diversity and larger inter-population genetic differentiation reflecting the relatively recent establishment of those populations from divergent gene pools. At local scale, the marked fine scale genetic structure in low altitude sites from Challhuaco and Lopez may indicate a spatially clustered establishment of seedlings in gaps generated beneath the canopy. The absence of significant genetic structuring at reduced spatial scales in Otto and high-altitude sites may be reflecting repeated disturbances. Reciprocal transplants show that the genetic differences measured in *N. pumilio* along the altitudinal gradient are translated in an enhanced plasticity and a greater acclimative response of plants from lower altitudes. This study shows that current genetic structure of *N. pumilio* is the result from a complex combination of historical processes that occurred at distinct spatial scales and in different geological times, and of adaptation to changing conditions of the altitudinal gradient. *Nothofagus pumilio* has conserved its species identity since the Paleogene and has responded locally to Neogene climatic changes. Nevertheless, in spite of being an ancestral lineage *N. pumilio* has conserved the ability to respond vigorously to selective pressures and thus adapting to the altitudinal gradient. Therefore, climatic changes that occurred during the Quaternary probably have had synergistic effects over the ancient genetic structure at local scales.

1. Capítulo I: Introducción General



Las variaciones en el medio físico imponen condiciones heterogéneas sobre las especies de plantas que las habitan. En especies con amplias distribuciones geográficas de cientos a miles de kilómetros, se puede predecir que dicha variabilidad ambiental podría resultar en una marcada diferenciación genética inter-poblacional (Millar & Libby 1992). Esta se generaría en respuesta a variadas presiones de selección y/o restricciones al flujo génico actual y/o histórico debido al aislamiento de las poblaciones a escala regional. Por otro lado, los procesos que ocurren a escalas espaciales reducidas pueden afectar la demografía y en consecuencia las características genéticas dentro de las poblaciones. Por ejemplo, las condiciones particulares de determinados micrositios, junto con patrones locales de polinización y/o de establecimiento de semillas pueden generar una estructuración genética a escalas de cientos de metros (Hamrick & Nason 1996). Además del componente espacial, las diferencias fenológicas que ocurren a lo largo de gradientes ambientales pueden resultar en el aislamiento temporal de las poblaciones, restringiendo el flujo genético entre ellas (Premoli 2003). Por lo tanto, los procesos históricos y contemporáneos de deriva genética y flujo génico determinarán la distribución de la variación genética entre las poblaciones (Cruzan & Templeton 2000).

Se ha postulado que la combinación de las condiciones físicas que caracterizan a la región Patagónica, *e. g.* gradiente de precipitación oeste-este generado por la Cordillera de los Andes, numerosos cordones montañosos y valles, juntamente con la influencia del océano Pacífico, generan un ambiente extremadamente variado para especies con amplias distribuciones geográficas (Donoso 1987). Particularmente, las marcadas diferencias ambientales que existen a lo largo de los gradientes altitudinal y latitudinal generan distintas presiones de selección sobre las poblaciones de plantas que las habitan. Esta selección diferencial, juntamente con un restringido flujo génico actual y/o histórico dentro y entre poblaciones provocaría un incremento en la diferenciación

genética resultando en una estructura genética compleja en especies de amplio rango como *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endle.) Krasser, especie que caracteriza los ambientes montanos y altoandinos del Bosque Templado Austral (Fig. I.1).

1.1. Historia de Patagonia

La historia geológica de la región Patagónica en el sur de Sudamérica muestra una evolución compleja, como resultado de diferentes procesos que comenzaron a lo largo del margen occidental de Gondwana durante los estadios principales de la separación de Pangea (Tabla I.1). La región Patagónica originalmente formaba parte del supercontinente de Gondwana (Fig. I.2) y estaba unida a la Antártida (Fig. I.3). La forma exacta en que ocurrió la separación de Sudamérica y la Antártida aún se encuentra en discusión (Hervé *et al.* 2006, Pankhurst *et al.* 2006, Miller 2007, Upchurch 2008). Algunos modelos proponen que el inicio de la ruptura de Gondwana comenzó hace unos 165 millones de años (Ma) durante el período Jurásico. Hace aprox. 130 Ma comienza la separación de África (Cretácico Inferior) dando lugar a la apertura del Océano Atlántico; posteriormente Nueva Zelanda (durante el Cretácico superior, hace 130 a 85 Ma) se separó del resto de los continentes que formaban el Oeste de Gondwana (Australia, Península Antártica y Sudamérica). Durante el Eoceno (40 Ma antes del presente) Australia se separó de la Antártida y posteriormente (hace aprox. 30 Ma) comenzó la separación de la Península Antártica del sur de Sudamérica, junto con la apertura del Mar de Scotia y del Pasaje de Drake (Oligoceno), dando origen a la Corriente Circumpolar Antártica. A su vez, en el límite entre el Eoceno/Oligoceno ocurrió un gran cambio climático, los regímenes cálidos o de “invernadero”

(greenhouse) pasaron a un régimen frío o de “iglú” (icehouse) (Huber & Nof 2006). De esta manera, hacia fines del Oligoceno, la Antártida quedó aislada de las aguas más cálidas, se produjo un enfriamiento generalizado y se formaron glaciares sobre el continente que anteriormente se encontraba cubierto por bosques (Poole *et al.* 2003). Como consecuencia, la flora que habitaba dichos lugares tuvo que migrar hacia el norte a las áreas libres de hielo y donde los climas eran más templados (Cantrill & Poole 2005).

Por otro lado, el escenario geológico en tiempos de Gondwana, desde hace aprox. 60 Ma hasta el levantamiento final de la cordillera de los Andes (Mioceno), estaba caracterizada por la formación de un sistema de grandes cuencas sedimentarias, algunas de las cuales representan las mayores cuencas preservadas en Antártida, África, India, Australia y Sudamérica (Lisker *et al.* 2006). Esto, juntamente con el hecho de que el nivel del mar era más alto que el actual (Miller *et al.* 2005) hicieron que el paisaje estuviera conformado por extensiones de tierra rodeadas por mar, limitando así los ambientes favorables para la dispersión por tierra. La topografía de Patagonia durante este período (Fig. I.4) era muy inestable debido a la subducción de la placa oceánica de Nazca por debajo del margen oeste del continente Sudamericano que ocurrió durante el Mesozoico y Cenozoico (Mpodzis & Ramos 2008). El sector norte de la Patagonia, que incluye el margen continental en la Cordillera de la Costa y el Macizo Nor-Patagónico, estaban constituidos por numerosas unidades geológicas emergentes relativamente pequeñas de origen antiguo, anterior a la era Mesozoica (Giacosa & Heredia 2004, Pankhurst *et al.* 2006, Glodny *et al.* 2008, Duhart & Adriasola 2008), mientras que más hacia el sur existían grandes extensiones de tierra como el Macizo del Deseado y el Batolito Patagónico Sur (Pankhurst *et al.* 1999, Pankhurst *et al.* 2006). Estas tierras se encontraban rodeadas por cuencas marinas que se formaron desde el

período Jurásico hasta el Neógeno (leRoux & Elgueta 2000, Suárez & Márquez 2007). Particularmente a los 43° de latitud S, durante el período Jurásico, se encontró una sucesión de depósitos sedimentarios de origen marino sugiriendo la existencia de paleocuevas que mantenían conexión con el Océano Pacífico. Más tarde, durante el Mioceno, se depositaron sedimentos marinos en la región costera sobre el margen oeste del continente, entre los 37 y los 42° de latitud S. También durante esta época gran parte de la Patagonia fue invadida por transgresiones marinas de los océanos Atlántico y Pacífico en ambos lados del continente (leRoux & Elgueta 2000, Folguera & Ramos 2002, Suárez y Márquez 2007). Durante el Mioceno tuvo lugar el levantamiento final de los Andes Patagónicos, lo que generó una gran barrera para la circulación atmosférica de los vientos húmedos provenientes del Océano Pacífico. Como consecuencia, se incrementaron las diferencias oeste-este en el gradiente de precipitación produciéndose un gran cambio climático y ecológico al este de la Cordillera de los Andes (Blisniuk *et al.* 2005). Juntamente con el levantamiento de los Andes Patagónicos, retrocedieron los océanos, se drenaron las cuencas de origen marino, y los bosques desaparecieron de la región extra-Andina siendo reemplazados por la estepa Patagónica (Barreda & Palazzessi 2007). En el Plioceno tardío, culmina la retracción de las zonas climáticas con sus floras asociadas, y en Sudamérica los bosques templados quedaron restringidos al margen suroeste del continente. El clima se fue enfriando progresivamente y hacia fines del Mioceno-Plioceno temprano hace aproximadamente 7 y 5 Ma antes del presente, tuvieron lugar las más antiguas glaciaciones cuaternarias conocidas para Patagonia (Rabassa *et al.* 2005). A continuación ocurrieron varios eventos glaciares fríos, con sus respectivos períodos interglaciares cálidos. Las mayores glaciaciones Patagónicas fueron registradas entre 1,17 y 1,02 Ma atrás, y el último máximo glacial (UMG) comenzó hace unos 25.000 años y culminó hace 16.000 años (Rabassa *et al.*

2005). Finalmente durante el Tardiglacial entre los 15.000 y 10.000 años antes del presente ocurrieron dos avances glaciares (Rabassa *et al.* 2005). Por lo tanto, los eventos glaciares ocurridos durante los últimos cinco millones de años, determinaron cambios climáticos y ambientales que influenciaron el paisaje y el desarrollo de los ecosistemas patagónicos/pampeanos.

1.2. Evidencia fósil

La información generada por el registro fósil es utilizada para reconstruir las condiciones climáticas pasadas que afectaron a la historia biogeográfica de las especies para tratar de explicar el patrón de distribución geográfica de la flora actual. El registro fósil de *Nothofagus* es muy rico y casi completo. Está compuesto por macro- y microfósiles: los primeros corresponden a restos de hojas, madera, o estructuras reproductivas, y los segundos corresponden a depósitos de polen. Mientras que los macrofósiles son más raros y se encuentran en condiciones de sitio particulares, los registros de polen fósil son abundantes y se considera que sólo su ausencia es evidencia de que el género nunca ha estado en ese lugar (Hill 1992). El polen *Nothofagus* es claramente identificable por lo que se ha utilizado para agrupar a las especies actuales según cuatro morfotipos de polen diferentes que comprenden los tipos: *brassii*, *fusca* (a), *fusca* (b), y *menziesii* (Dettmann *et al.* 1990). Estos tipos de polen delimitan cuatro subgéneros distintos dentro del género *Nothofagus*: *Brassospora*, *Fuscospora*, *Lophozonia*, y *Nothofagus* (Hill & Read 1991). Un estudio molecular y morfológico realizado para evaluar las relaciones filogenéticas que existen entre especies dentro de la familia Nothofagaceae muestra que los cuatro subgéneros son monofiléticos y que el

subgénero *Lophozonia* se sitúa en la base de la filogenia. Además, el grupo que contiene a los demás subgéneros muestra que el subgénero *Fuscospora* se separó primero y que los *Nothofagus* tropicales (subgénero *Brassospora*) serían el grupo hermano de las especies del bosque templado de Sudamérica (subgénero *Nothofagus*) (Manos 1997). El registro fósil de *Nothofagus* muestra que los cuatro subgéneros actuales se habrían diferenciado tempranamente en su historia evolutiva durante el Campaniano-Mastrichtiano en la región de la Península Antártica-sur de Sudamérica (Hill *et al.* 1996) y habrían permanecido como entidades diferenciadas por muchas decenas de millones de años (Hill & Dettmann 1996). Por otro lado, la gran estabilidad en la evolución morfológica evidenciada en el registro fósil de *Nothofagus* sugiere que desde que se diferenciaron los cuatro subgéneros el cambio evolutivo ha sido lento (Hill 2001), por lo menos durante los últimos 35 millones de años (Hill *et al.* 1996). Los trabajos realizados en base a la evidencia fósil junto con estimaciones de tiempos de divergencia utilizando el reloj molecular permitieron concluir que la familia Nothofagaceae se diferenció durante el Cretácico superior y se diversificó principalmente desde el Eoceno hasta el Oligoceno, durante la separación del supercontinente de Gondwana (Cook & Crisp 2005). Según el registro polínico, la máxima diversidad del género *Nothofagus* a nivel global ocurrió durante el Oligoceno-Mioceno temprano en altas latitudes del Hemisferio Sur que coincide con el momento de su máxima distribución espacial (Hill 2001). El registro de polen fósil da cuenta de la presencia del subgénero *Nothofagus* en la Patagonia desde el Eoceno (Romero 1977). Particularmente en el Eoceno medio-Oligoceno, ocurrió una expansión de los bosques de *Nothofagus* en Sudamérica que posteriormente quedaron restringidos a la región húmeda, occidental de los Andes (Barreda & Palazzesi 2007) y allí habrían persistido durante el Mioceno y el Cuaternario hasta el presente. Especialmente durante el

Cuaternario, habrían sobrevivido a las oscilaciones climáticas de dicho período en múltiples áreas ubicadas en distintas latitudes (Villagrán & Hinojosa 2005, Villa Martínez & Moreno 2007, Mancini 2009), incluso en las regiones más australes como en Tierra del Fuego (Markgraf 1993, Heusser 1993).

1.3. Reconstrucción histórica en base a marcadores moleculares

Las características genéticas de una especie a lo largo de su distribución están determinadas, además de otros factores, por los procesos históricos y contemporáneos que han afectado la distribución de las poblaciones y por lo tanto los patrones de flujo génico entre ellas (Sork *et al.* 1999). En las plantas, la dispersión de genes ocurre por el movimiento de polen y semillas (McCauley 1995). Tradicionalmente las tasas de flujo génico histórico han sido estimadas en base al índice de diferenciación genética inter-poblacional (Sork *et al.* 1999). Este índice propuesto por Wright (1965) da idea de qué proporción de la variación genética total se encuentra distribuida entre las poblaciones, mientras mayor sea este índice indicaría que las poblaciones han sufrido restricciones al flujo génico histórico. Los marcadores moleculares isoenzimáticos han sido ampliamente utilizados para determinar los niveles y la estructura de la diversidad genética y han ayudado a entender los distintos procesos que ocurren en muchas especies de plantas. Poseen herencia mendeliana y son co-dominantes, por lo tanto el flujo génico es relativamente mayor que en marcadores de herencia uniparental, ya que sufren los procesos involucrados en la reproducción sexual como la recombinación y segregación independiente y pasan a la siguiente generación a través de dos vectores, por medio del polen y las semillas. Estos análisis isoenzimáticos han sido utilizados

para determinar la estructura genética de varias especies de plantas, los que permitieron realizar generalizaciones sobre los niveles de variación genética existentes y de cómo pueden ser influenciados por otros factores, *e. g.* historia de vida, amplitud de la distribución geográfica, y sistema reproductivo (Hamrick *et al.* 1992).

Recientemente se ha incrementado el número de estudios que utilizan técnicas de ADN, lo que permite realizar comparaciones entre distintas especies de plantas. Las relaciones evolutivas entre las especies son detectadas por la similitud en las secuencias de nucleótidos entre especies cercanas. Por esto, el análisis de las secuencias de ADN puede ser una herramienta muy poderosa ya que posee información histórica y permite determinar las afinidades filogenéticas entre los organismos (Templeton 1983). La filogeografía es una rama de la biogeografía que estudia la distribución geográfica de la variación genética teniendo en cuenta las relaciones filogenéticas a nivel intra-específico (Avice 1987). Este tipo de estudios permiten, entre otros aspectos, detectar los patrones de migración/dispersión de las poblaciones de una especie desde un área determinada. El uso de marcadores genéticos de ADN, principalmente del cloroplasto, nos permite reconstruir las relaciones genealógicas entre distintos linajes, ya que poseen una baja tasa de mutación y herencia uniparental, que en el caso de las especies latifoliadas como *Nothofagus* son heredados maternalmente. Esto implica que no sufren recombinación y además no están sujetos al flujo génico en especies con restringida dispersión de semillas. Por ello, con altos niveles de filopatría (asociación geográfica), los patrones de variación de haplotipos, deberían reflejar los patrones de dispersión en el pasado. Varios estudios han demostrado que la combinación de distintos tipos de marcadores moleculares permite diferenciar entre los patrones históricos y contemporáneos de flujo génico. En esta tesis se realizará un estudio en poblaciones de *Nothofagus pumilio* ubicadas a lo largo de su rango total de distribución en los bosques

de Patagonia utilizando distintos tipos de marcadores moleculares para evaluar los distintos procesos que han modelado el acervo genético de esta especie antigua. Dado que las isoenzimas son marcadores que reflejan patrones relativamente actuales de flujo génico entre poblaciones, en este estudio fueron utilizados para evaluar los patrones de flujo génico contemporáneos, que ocurrieron posteriormente a las últimas glaciaciones, mientras que las secuencias de ADN del cloroplasto son más conservadas temporalmente y por lo tanto serán utilizadas para evaluar los procesos históricos que ocurrieron en Patagonia previos al Pleistoceno.

1.4. Respuestas adaptativas en ambientes heterogéneos

La heterogeneidad ambiental se encuentra estrechamente relacionada con la heterogeneidad genética (Linhart & Grant 1996). Diferentes ambientes generan presiones de selección diferenciales, y estas, a su vez, conducen a una heterogeneidad genética. Uno de los principales objetivos de la biología evolutiva es el de comprender las fuerzas evolutivas que modelan a los caracteres de importancia ecológica entre poblaciones de una misma especie (Merilä & Crnokrak 2001). La principal fuerza que actúa es la selección, la cuál puede homogeneizar genotipos entre poblaciones o, por el contrario, diferenciarlos debido a adaptaciones locales (Goudet & Buchi 2006). Sin embargo hay otras fuerzas microevolutivas que afectan a los caracteres cuantitativos, como mutaciones, migración y deriva genética aleatoria. En ausencia de selección, estas tres últimas fuerzas son las únicas que estarían actuando sobre caracteres que están asociados al menos parcialmente al componente genético (Lande 1992; Whitlock 1999; Hendry 2002). Los experimentos de genética ecológica pueden estimar directamente la

variación genética sobre caracteres que afectan la aptitud y por lo tanto a la demografía de poblaciones de plantas. Este tipo de experimentos incluyen: experimentos de jardín común, *i. e.* plantas o semillas que son trasladadas de su ambiente natural a un ambiente común con condiciones ambientales controladas; o de trasplantes recíprocos, *i. e.* plantas o semillas en ambientes contrastantes son retiradas de su ambiente natural para ser traslocadas recíprocamente a un ambiente distinto al de origen. La información generada por este tipo de estudios es muy valiosa y no puede ser inferida a partir de marcadores genéticos. Sin embargo, recientemente se han desarrollado métodos que permiten comparar las estimaciones de la variabilidad genética realizadas mediante marcadores moleculares con la variación en caracteres adaptativos. Esta comparación de estructuración poblacional es posible mediante la medición del Q_{ST} , el cuál particiona la variación genética cuantitativa de una manera similar al F_{ST} para marcadores moleculares a nivel de genes. Las diferencias adaptativas entre poblaciones se desarrollan independientemente del flujo génico (Endler 1973, Galen et al. 1991, King & Lawson 1995), y fuertes presiones de selección pueden remover rápidamente la carga genética impuesta por inmigrantes, manteniendo las diferencias entre poblaciones (Jordan 1991, Nagy 1997). Para caracteres neutros aditivos, F_{ST} y Q_{ST} deberían ser iguales (McKay & Latta 2002). Por lo tanto, la magnitud de las diferencias entre Q_{ST} y F_{ST} puede ser usada para inferir el grado de adaptación local (Spitze 1993; Merilä & Crnokrak 2001). De tales comparaciones se pueden obtener tres resultados posibles: (i) $Q_{ST} > F_{ST}$, esto es comúnmente interpretado como evidencia de selección diversificadora y adaptación local; (ii) $Q_{ST} = F_{ST}$, la deriva genética como única fuerza evolutiva es suficiente para explicar los patrones de diferenciación; y cuando (iii) $Q_{ST} < F_{ST}$, se asume que la selección estabilizadora favorece a un mismo fenotipo en distintos ambientes (Volis *et al.* 2005, y referencias). Por esto, el Q_{ST} es particularmente

importante ya que da una idea de la capacidad de las poblaciones de evolucionar en respuesta a los cambios ambientales (Reed & Frankham 2001), que es uno de los principales intereses de la genética evolutiva y de la conservación.

La variación morfológica puede ser reflejo de diferenciación local en respuesta a distintas condiciones ambientales, variación ecotípica o variación genotípica. En las plantas es común encontrar una plasticidad fenotípica (aspecto morfológico) la cual no implica cambios en el genotipo. Frecuentemente, los caracteres fenotípicos a menudo son ecológicamente adaptativos y pueden implicar cambios en el genotipo. Otra aproximación morfológica para medir la variación genética es el análisis de caracteres cuantitativos (caracteres mensurables: *e. g.* longitud, número de ramas y área foliar). Se ha documentado una base genética en la diferenciación morfológica o fenotípica para varios tipos de especies de plantas que ha sido determinada a partir de experimentos de jardín común mediante el análisis de caracteres cuantitativos. Estos análisis no sólo indican en qué medida un carácter fenotípico está bajo control genético o ambiental, sino también determinan otros parámetros como la heredabilidad (h) y la variación genética entre caracteres (Q_{ST}), los cuales son importantes para estimar el potencial evolutivo dentro de las poblaciones. Entonces, un análisis cuantitativo de la variación genotípica nos provee información sobre cómo responderá una población a un cambio bajo un régimen de selección que puede estar asociado a una modificación en el medioambiente (Schaal *et al.* 1991). En este trabajo se utilizará esta técnica para evaluar el potencial adaptativo de distintos caracteres cuantitativos que difieren a lo largo del gradiente altitudinal en *N. pumilio*.

1.5. Estructura y dinámica poblacional

La estructura genética de las poblaciones naturales está determinada por los distintos procesos que han ocurrido a lo largo de su historia evolutiva, y por los caracteres ecológicos y de historia de vida particulares de cada especie (Hamrick *et al.* 1992). Para entender los patrones y procesos de flujo génico es necesario tener un conocimiento detallado de cómo las características del paisaje estructuran a las poblaciones naturales (Manel *et al.* 2003). Estudios realizados en las últimas décadas han ido acumulando información sobre cómo se distribuye la variación genética en distintas especies de plantas, llegando a la conclusión de que la mayor parte de la variación genética se encuentra dentro de las poblaciones (Hamrick *et al.* 1992). Sin embargo, en muchas especies de plantas se desconoce como se distribuye dicha variación dentro de las poblaciones. La estructura genética espacial en las poblaciones naturales, *i. e.* la distribución genotipos en el espacio, puede resultar de diferentes procesos, incluidas presiones de selección diferenciales o incluso eventos históricos (Vekemans & Hardy 2004). Sin embargo, a escalas espaciales reducidas, *i. e.* menores a los 100 metros, la causa predominante de la agrupación espacial de genotipos estaría dada por una combinación de varios procesos microevolutivos, que incluyen la dispersión de genes limitada, ya sea vía polen o semillas o presiones de selección diferenciales (Levin & Kerster 1974, Loveless & Hamrick 1984, Epperson 1993, Linhart & Grant 1996). Bajo estos escenarios, los individuos más cercanos geográficamente serían más similares genéticamente. En los últimos años se han realizado varios estudios que analizan la distribución espacial de los genotipos utilizando métodos de autocorrelación espacial (Epperson & Allard 1989, Knowles *et al.* 1992), muchos de ellos basados en análisis de isoenzimas a escalas espaciales reducidas (Geburek 1993; Leonardi & Menozzi 1996). Además, otros factores, como la dinámica de los disturbios que han afectado a un sitio,

han tenido marcadas consecuencias sobre la estructuración poblacional. En particular, estudios realizados en especies de *Nothofagus* muestran una estructuración genética significativa a escalas espaciales a los 100 m que depende principalmente del modo de regeneración predominante y de la capacidad de respuesta frente a un disturbio (Premoli & Kitzberger 2005, Premoli & Steinke 2008). En particular, la especie a ser estudiada posee una limitada dispersión de semillas y diferentes modos de regeneración a lo largo del gradiente altitudinal y además muestra reducido polimorfismo isoenzimático (Premoli 2004). En esta tesis se realizará un análisis de autocorrelación espacial de los genotipos en *N. pumilio*, utilizando marcadores isoenzimáticos y de microsatélites, los cuales presentan mayor diversidad, en distintos cerros con diferentes regímenes de disturbio dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi.

1.6. Especie en estudio

Nothofagus pumilio (Nothofagaceae, lenga) es una especie latifoliada, decidua, de amplia distribución en los Bosques Templados de Sudamérica Austral (Fig. I.5). Su distribución latitudinal abarca desde aproximadamente los 35° de latitud S hasta Tierra del Fuego (55° latitud S). Altitudinalmente se la encuentra desde el nivel del mar hasta el límite altitudinal superior del bosque, que varía desde los 2.000 m s.n.m. disminuyendo hacia el sur de la distribución (Fig. I.6). *N. pumilio* es el principal componente de los bosques altoandinos de Patagonia.

Nothofagus pumilio, junto con *N. antarctica*, es una de las especies de *Nothofagus* más ampliamente distribuida en Patagonia, que habita a lo largo de casi

3.000 km sobre la Cordillera de los Andes en Sudamérica austral. Así como otras especies de *Nothofagus*, ésta especie es monoica, anemófila, auto-incompatible (Riveros *et al.* 1995), y posee altas tasas de fecundación cruzada (Premoli 1997). Sin embargo, la dispersión de semillas ocurre principalmente por gravedad y la mayoría poseen escasa dispersión (Barrera *et al.* 2000, Cuevas 2000). A pesar de tener una amplia distribución latitudinal, *N. pumilio* está restringida localmente a comunidades de altura. Hacia el sur de la distribución mayormente forma bosques puros o mixtos con *N. antarctica* o *N. betuloides*; mientras que hacia el norte también aparece asociado a la conífera *Araucaria araucana*.

A lo largo de toda su distribución *N. pumilio* presenta numerosas variaciones morfológicas a lo largo del gradiente altitudinal. Un árbol adulto puede alcanzar hasta 30 m de altura y va decreciendo paulatinamente hasta transformarse en un arbusto en el límite altitudinal superior del bosque. El tamaño de las hojas también decrece con la altura. Muchas de estas variaciones morfológicas podrían estar determinadas por la combinación de plasticidad fenotípica (potencial para desarrollarse bajo distintas condiciones ambientales) y diferencias genéticas de la especie. Sin embargo las marcadas variaciones en caracteres autoecológicos que existen en los extremos del gradiente altitudinal han demostrado tener una base genética (Premoli 2004, Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007). Se ha descrito un alto grado de asociación fenológica con la altitud, habiendo un desfase de 2 semanas entre la apertura de las yemas (y por lo tanto en la floración) en sitios de los límites altitudinal inferior y superior (Rusch 1993). *N. pumilio* alcanza la madurez reproductiva a partir de los 20-30 años. La producción de semillas ocurre en ciclos de alta y baja producción, siendo estos últimos cada 8 años (Cuevas 1999, 2000). Se ha demostrado que la viabilidad y el porcentaje de germinación de las semillas son mayores en años de alta producción

(*mastings*). Hacia el límite altitudinal superior del bosque la producción de semillas es menor, y la regeneración ocurre principalmente por una abundante producción de rebrotes (y escasa de renuevos) (Martínez-Pastur *et al.* 1997, Cuevas 2000, Daniels 2000, Premoli 2004). En cambio, en el límite inferior del bosque la regeneración de *N. pumilio* ocurre principalmente gracias a la apertura de claros bajo el dosel, ya sea por la caída de árboles (Heinemann *et al.* 2000) u otros disturbios a mayor escala (*e. g.* avalanchas, incendios, volcanismo).

Se han descrito patrones de variación en las características fenotípicas y genotípicas de *N. pumilio* a lo largo de su distribución altitudinal y latitudinal (Premoli 2004). A escala regional, estudios realizados con isoenzimas evidencian una divergencia genética en el gradiente latitudinal. Estos estudios sugieren la existencia de refugios glaciarios ubicados al norte y al sur de la distribución actual de la especie, donde las poblaciones sobrevivieron durante las últimas glaciaciones y a partir de allí habrían recolonizado recientemente las áreas intermedias de su distribución (Premoli 1998). Dado que las isoenzimas son marcadores que también reflejan patrones actuales de flujo génico, es necesario analizar hipótesis históricas mediante marcadores conservados de ADN no recombinante del cloroplasto. De esta manera se podrán dilucidar patrones genéticos debido a otros factores ocurridos en Patagonia previos a las oscilaciones climáticas del Cuaternario.

A escala local, estudios realizados anteriormente evidencian la existencia de variación en condiciones naturales a escalas espaciales reducidas de cientos de metros a lo largo del gradiente altitudinal en características fisiológicas (Premoli & Brewer 2007), seminales (Premoli 2004), fenológicas (Rusch 1993, Barrera *et al.* 2000), morfológicas (Rusch 1993) y estructurales (Barrera *et al.* 2000, Cuevas 2000).

Experimentos de invernadero demuestran que dicha variación en caracteres ecofisiológicos, de crecimiento de los individuos, morfología foliar y fenológicos posee una base genética (Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007). Además, estudios genéticos realizados en *N. pumilio* mediante el uso de marcadores nucleares muestran diferencias isoenzimáticas a lo largo del gradiente altitudinal. Se encontró una disminución de la variación genética con la altura en respuesta a un mayor éxito reproductivo y flujo génico en poblaciones ubicadas a baja altitud (Premoli 2003). Sin embargo, hasta la fecha no se ha evaluado el tipo de establecimiento en relación con la dinámica poblacional y con la estructura genética a escalas espaciales reducidas de cientos de metros.

1.7. Objetivos e hipótesis generales

El **objetivo general** del trabajo es evaluar la estructura y diversidad genética a distintas escalas espaciales en *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal y latitudinal respectivamente.

La **hipótesis general** del trabajo es que la limitada dispersión de semillas, la selección por micrositios y el efecto de factores históricos restringen el flujo génico dentro y entre poblaciones de *N. pumilio*, lo que resultará en una estructuración genética a distintas escalas espaciales.

1.8. Objetivos específicos e hipótesis particulares

Objetivo 1: Analizar los efectos de la deriva y el aislamiento genético a lo largo del rango total de *N. pumilio*, una especie con restringida dispersión de semillas, a distintas escalas temporales (señal molecular histórica y contemporánea) mediante análisis filogeográfico de polimorfismos de ADN del cloroplasto y estudios poblacionales en base a marcadores nucleares isoenzimáticos.

Hipótesis 1: Los eventos históricos afectaron el acervo genético de especies de amplia distribución geográfica nativas de Patagonia.

Predicción 1.1: La distribución geográfica de los polimorfismos genéticos de marcadores conservados de ADN del cloroplasto en *N. pumilio* reflejarán los eventos de vicarianza y dispersión a distancia ocurridos en Patagonia durante el Terciario tardío.

Predicción 1.2: Los patrones de la variación isoenzimática regional en la especie tolerante al frío *N. pumilio* reflejarán la persistencia local en refugios múltiples durante los eventos climáticos del Cuaternario ocurridos en Patagonia.

Objetivo 2: Analizar los efectos de la dinámica de rodales de *N. pumilio* a

alturas contrastantes en el norte de la Patagonia sobre la distribución de genotipos a escalas espaciales reducidas (1 ha) (escala local) utilizando marcadores nucleares isoenzimáticos e hipervariables de microsátélites en base a muestreos espacialmente explícitos en tres cerros dentro del Parque Nacional Nahuel Huapí.

Hipótesis 2: El modo de regeneración y características de historia de vida afectan la disposición espacial de genotipos de *N. pumilio*.

Predicción 2.1: En bosques de baja altitud de *N. pumilio*, se obtendrán patrones continuos de establecimiento en claros a partir de semillas provenientes de madres genéticamente diversas generando una distribución agregada de genotipos a escalas espaciales reducidas.

Predicción 2.2: Bosques coetáneos posfuego regeneran a partir de número reducido de individuos remanentes sobrevivientes del disturbio y por lo tanto serán homogéneos genéticamente y dispuestos aleatoriamente en el espacio.

Predicción 2.3: En bosques de altura y debido a una mayor incidencia de propagación vegetativa particularmente de ciertos genotipos seleccionados bajo condiciones ambientales extremas, se espera encontrar una estructuración genética aleatoria.

Objetivo 3: Analizar el efecto de la selección natural sobre caracteres

cuantitativos en poblaciones experimentales con un diseño de trasplantes recíprocos de plantas con distintos orígenes para analizar respuestas adaptativas a condiciones de altura contrastantes.

Hipótesis 3: Ambientes de altura extremos generan presiones de selección diferenciales sobre *N. pumilio*.

Predicción 3.1: En experimentos de trasplantes recíprocos se espera detectar mayores ventajas adaptativas (*e. g.* mayor crecimiento y supervivencia) para individuos cultivados en su sitio de origen respecto de individuos cultivados bajo una condición ambiental diferente.

Predicción 3.2: Se espera encontrar que las plantas de menor altura posean una mayor plasticidad en caracteres de crecimiento y que las de arriba se encuentren fijadas por selección diferencial de genotipos adaptados a las condiciones de vida en altura.

La información generada en esta tesis permitirá entender los factores que han modelado la distribución de la variación genética y su organización a distintas escalas espaciales (paisaje, regional y local) y temporales (flujo génico histórico y contemporáneo). A su vez, dicha información será de utilidad para generar estrategias de conservación y manejo en una especie de interés forestal como *N. pumilio*.

1.9. Tablas y Figuras

Tabla I.1. Cuadro geológico del tiempo en el cuál se indican los eventos geológicos ocurridos en Patagonia de los cuáles se hace mención en el texto.

Era	Sistema	Período	Serie	Edad Ma	Eventos
Cenozoico	Neógeno	Cuaternario	Holoceno	0,0115	Período interglacial, aumento del nivel del mar
			Pleistoceno		Tardiglacial
				1,806	Último máximo glacial Mayores glaciaciones Patagónicas
		Plioceno	2,588	Retracción de las zonas climáticas y floras a los Andes	
			5,322	Glaciaciones más antiguas de Patagonia	
	Paleógeno	Terciario	Mioceno		Formación de las cuencas Valdivia y Osorno (37-42° S)
				23,03	Transgresiones marinas en Patagonia Máxima diversidad y distribución espacial de <i>Nothofagus</i>
			Oligoceno		Glaciaciones de la Antártida
				33,9±0,1	Desarrollo de la Corriente Circumpolar Antártica Separación de Sudamérica y Antártida
				Eoceno	
55,8±0,2	Australia se separa de Antártida Comienza la diversificación del género <i>Nothofagus</i>				
	Paleoceno	65,5±0,3	Grandes extinciones del límite Cretácico/Terciario		
Mesozoico	Cretácico	Superior		Separación de Nueva Zelanda del resto de Gondwana	
		99,6±0,9	Origen del género <i>Nothofagus</i>		
	Inferior		África se separa del resto de Gondwana (Océano Atlántico)		
	145,5±4,0	Aparición de las Angiospermas			
	Jurásico	Superior	161,2±4,0	Comienzo de la ruptura de Gondwana	
Medio		175,6±2,0	Inicio de la separación de Pangea en Laurasia y Gondwana		
Inferior		199,6±0,6	Comienzo de la apertura de la Cuenca del Chubut (43° S)		

Figura I.1. Mapa del sur de Sudamérica donde se muestra la distribución del Bosque Templado Austral.

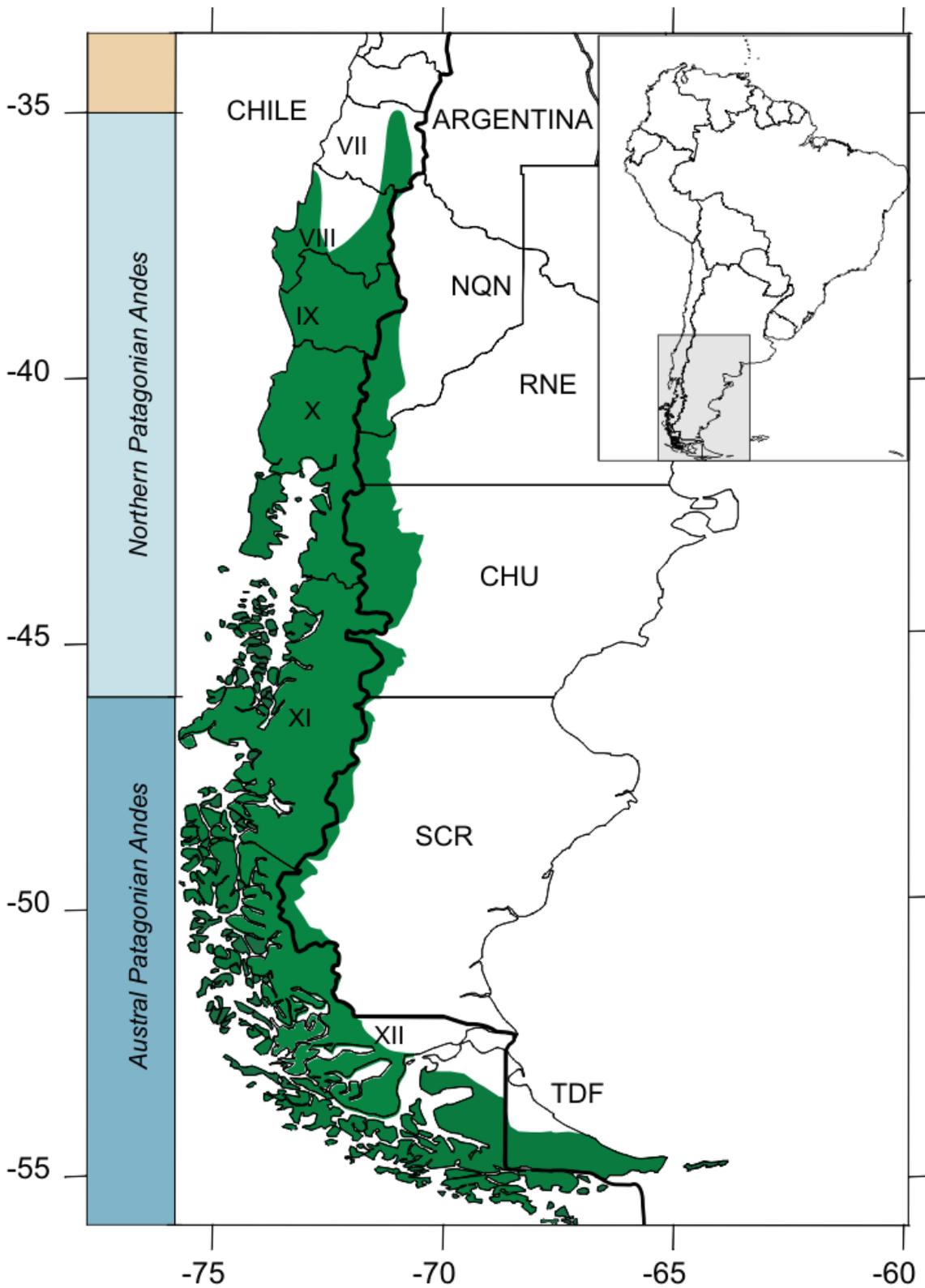


Figura I.2. Reconstrucción paleogeográfica de la ruptura de Pangea (a) en Laurasia y Gondwana (b) y de la separación de Gondwana (c), extraído de Mpodozis y Ramos (2008).

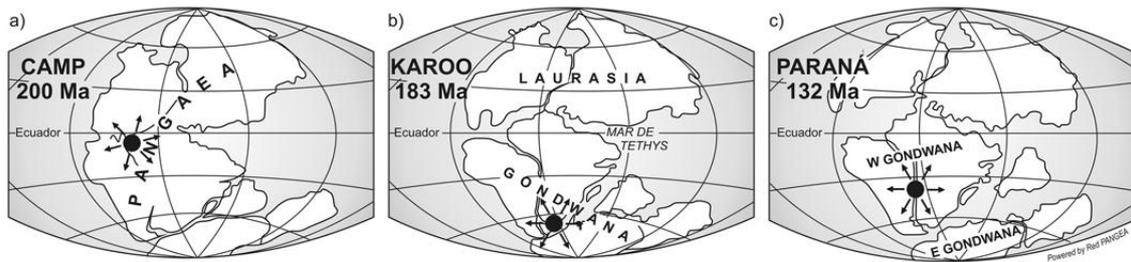


Figura I.3. Reconstrucción paleogeográfica de la posición relativa de la Península Antártica con respecto a Sudamérica, extraído de Hervé *et al.* (2006).

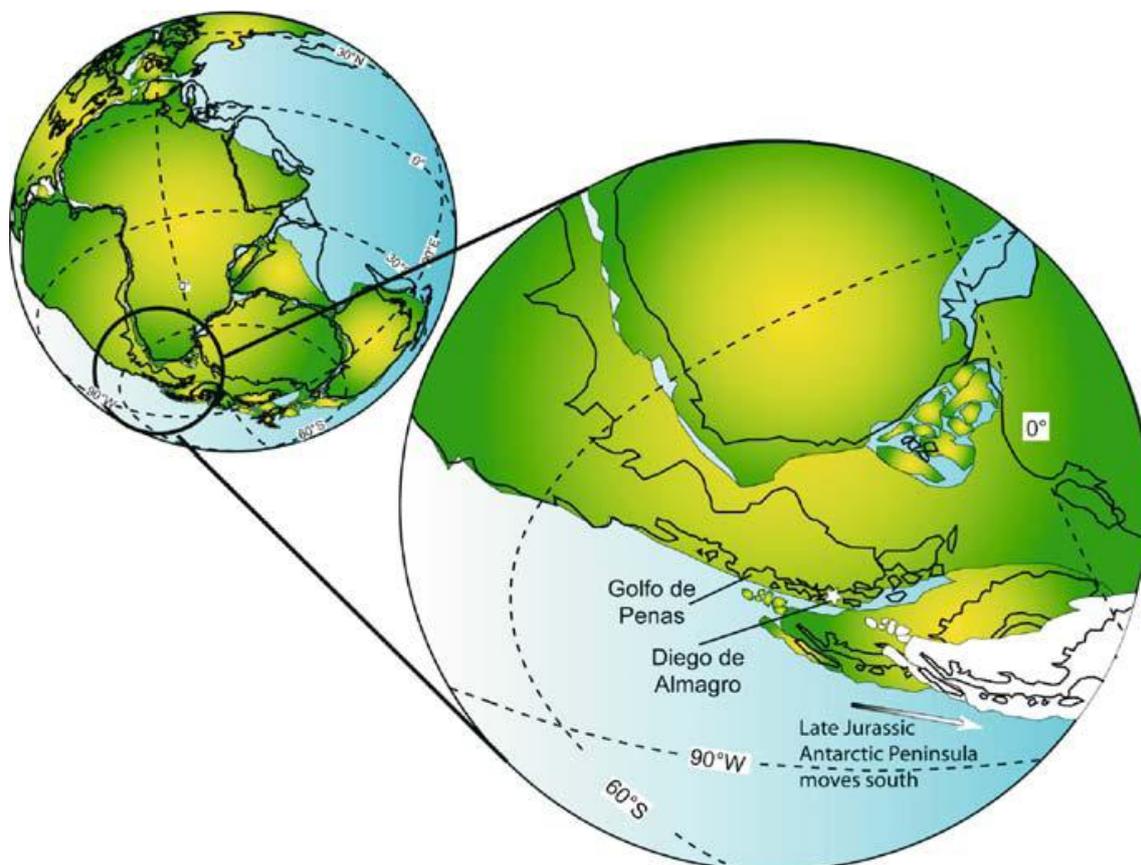


Figura I.4. Mapa del sur de Sudamérica indicando la ubicación geográfica de rocas de origen pre-Mesozoico y de las principales cuencas sedimentarias depositadas en distintos períodos geológicos, reconstruido de diversas fuentes citadas en el texto.

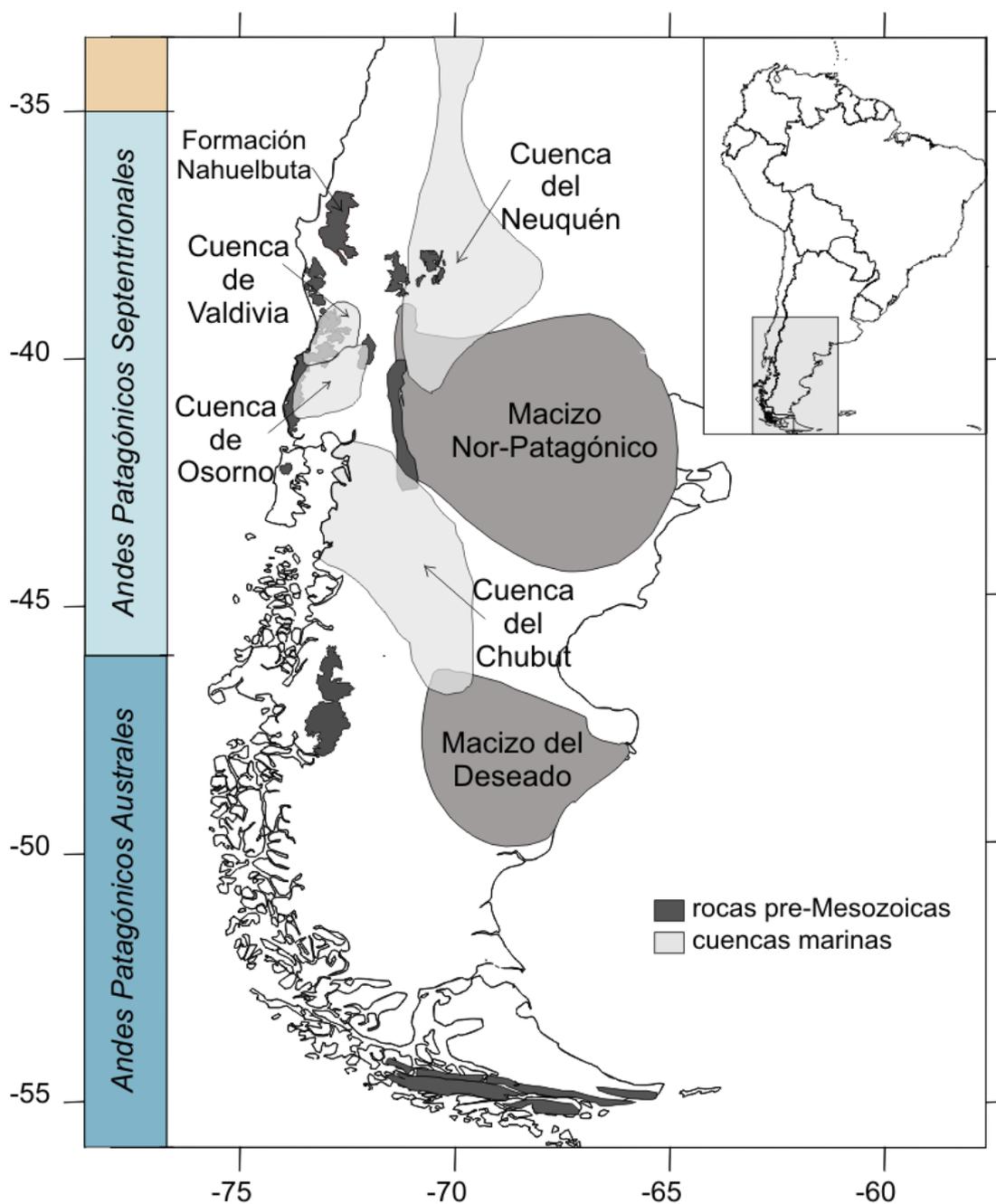


Figura I.5. Mapa de la distribución de *Nothofagus pumilio* en el sur de Sudamérica.

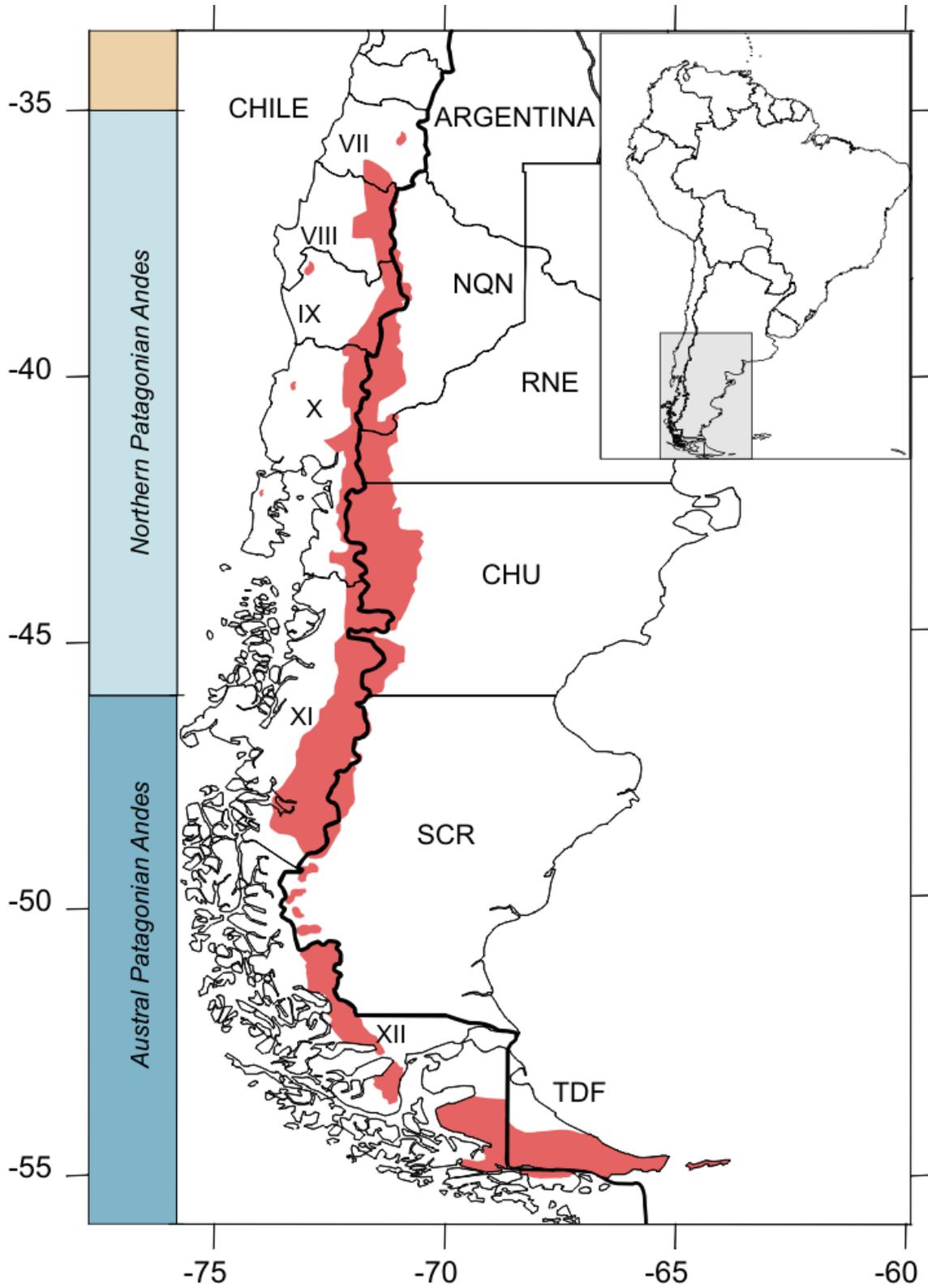
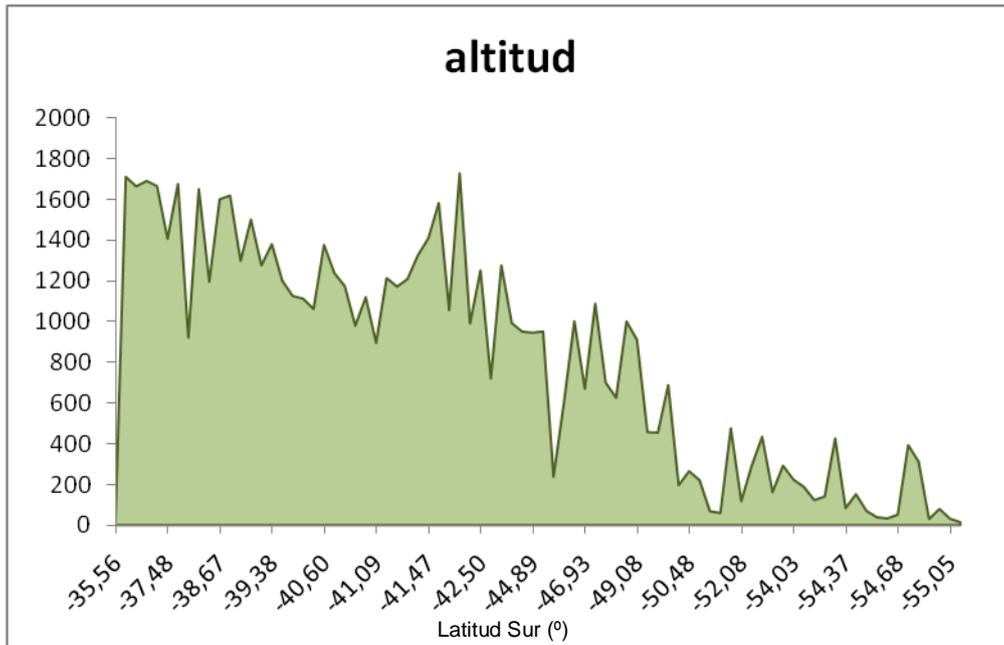


Figura I.6. Gráfico de los 85 sitios muestreados de *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal, donde se muestra que el límite altitudinal inferior del bosque decrece hacia latitudes mayores.



2. Capítulo II: “Filogeografía de *Nothofagus pumilio* basada en secuencias no codificantes de ADN del cloroplasto evidencia una historia biogeográfica antigua”



2.1. Resumen

Los eventos geológicos ocurridos en el pasado han afectado la geografía de los continentes australes así como también la distribución de las poblaciones y los patrones de diversidad genética de distintas especies de plantas. En especial, la región Patagónica ha sufrido el impacto de eventos antiguos tales como tectónica de placas, cambios en el nivel del mar, y de eventos más recientes como los cambios climáticos ocurridos durante el Cuaternario. Estos eventos históricos se verán reflejados en la estructura filogeográfica de las poblaciones de linajes antiguos de plantas que habitan las latitudes australes. *Nothofagus pumilio* es la especie arbórea dominante en ambientes montañosos de los bosques templados de Sudamérica. En este trabajo se utilizaron marcadores moleculares del ADN del cloroplasto para evaluar los efectos que tuvieron los eventos paleogeológicos sobre el acervo genético de *N. pumilio*. Los análisis filogeográficos realizados en 1-5 individuos de 85 poblaciones de *N. pumilio* dieron como resultado dos grupos monofiléticos separados latitudinalmente al norte y al sur de los 42° S que contienen 11 y 3 haplotipos, respectivamente. Esto estaría indicando un evento de vicarianza debido a la presencia de una paleo-cuenca de gran extensión en latitudes intermedias de Patagonia. Además, los patrones de distribución de los haplotipos únicos de ADN del cloroplasto sugieren una expansión regional de la especie utilizando las montañas antiguas como corredores. La mayor diversidad genética encontrada en las poblaciones del norte sería el resultado de mayores fragmentaciones y recolonizaciones debido a una paleogeografía compleja. Las poblaciones del sur presentaron una gran homogeneidad genética, lo que indica una supervivencia en grandes poblaciones a lo largo del tiempo. En este trabajo se encontró que los patrones de variación genética mediante ADN del cloroplasto se encuentran estructurados geográficamente y son consistentes con la paleogeografía del Terciario de Patagonia.

2.2. Introducción

Las características del paisaje y los procesos históricos relacionados con sus modificaciones han sido el foco de estudio de numerosos análisis biogeográficos y filogeográficos. En particular, en ambientes montañosos los eventos que ocurrieron en el Neógeno, como las últimas glaciaciones, han sido considerados los principales modeladores de los patrones biogeográficos para muchas especies de plantas leñosas que habitan zonas templadas (Markgraf *et al.* 1995; Villagrán *et al.* 1996, Hewitt 2004). Para linajes que se originaron hace millones de años en latitudes australes, se podrían plantear nuevos escenarios donde los patrones de diversidad genética serían el reflejo de procesos aún más antiguos. Sin embargo, aún queda sin responder la pregunta acerca de las condiciones y en qué lugares estos linajes fueron capaces de persistir a lo largo del tiempo. Los patrones de distribución de los linajes de árboles australes, incluido el género *Nothofagus*, son el reflejo de la separación y dispersión desde el Paleógeno, cuando los continentes australes formaban parte del supercontinente de Gondwana. Sin embargo, mientras que Australasia se desplazó hacia el norte y entró en la zona climática templado-cálida promoviendo una rápida radiación de las especies, Sudamérica solamente se trasladó 10° de latitud hacia el Ecuador, lo que resultó en una baja diversificación y extinción (Markgraf *et al.* 1995). Esto se ve reflejado en la gran estabilidad morfológica que presenta el registro fósil de distintos géneros de plantas leñosas, incluido *Nothofagus* (Markgraf *et al.* 1995) y coníferas (Del Fueyo 1996; Villagrán *et al.* 1996) de Patagonia. Desde el Neógeno en adelante, la influencia de las tormentas del oeste sobre las latitudes australes determinó una menor amplitud de los ciclos glaciarios-interglaciarios. Esto llevó a que las especies que habitan los bosques

templados australes hayan tenido que sobrevivir en áreas restringidas por períodos prolongados (Markgraf *et al.* 1995). Además, el escenario geológico de los continentes australes y la heterogeneidad física del paisaje, incluyendo áreas libre de hielo costeras como la Cordillera de la Costa en el oeste del sur de Chile, proporcionaron una gran diversidad de hábitats para la persistencia de árboles. Como resultado, las especies de *Nothofagus* tolerantes al frío de Sudamérica austral proveen una oportunidad única para testear hipótesis sobre la divergencia temprana y adaptación de las plantas, que han sufrido pocos cambios evolutivos, bajo los distintos escenarios geográficos, geológicos y climáticos, desde su origen en el oeste de Gondwana.

El registro fósil ha dado cuenta de la presencia del género *Nothofagus* en el sur de Sudamérica desde el Cretácico superior (70 Ma) (Hill 1992, Troncoso & Romero 1998). En esa misma época ya existían los linajes pertenecientes a los cuatro subgéneros actuales ampliamente distribuidos en Antártida y Sudamérica (Hill & Dettmann 1996). Los subgéneros actuales: *Brassospora*, *Fuscospora*, *Lophozonia*, y *Nothofagus*, han sido determinados en base al tipo de polen que poseen (Hill & Read 1991), los cuáles son monofiléticos y se relacionan de la siguiente manera: (*Lophozonia* (*Fuscospora* (*Nothofagus*, *Brassospora*))) (Manos 1997). En particular, el registro microfósil del subgénero *Nothofagus* que pertenece al tipo de polen *fusca* (b), muestra la presencia del subgénero en distintas partes del sur de Gondwana en distintas épocas. La primera aparición ocurrió en Antártida y luego en Sudamérica durante el período Cretácico superior (83-65 Ma). Posteriormente se han encontrado registros en el Paleoceno (65-53 Ma) de Australia, Tasmania y Nueva Zelanda. Durante el Eoceno y Oligoceno este tipo de polen se volvió dominante en los registros de polen fósil de Sudamérica (Romero 1977). Por otro lado, los macrofósiles de hojas y cúpulas pertenecientes al subgénero *Nothofagus* encontrados en depósitos del Oligoceno (33-23 Ma) de Tasmania, indican la

presencia y posterior extinción del subgénero en Australasia. Actualmente las especies del subgénero *Nothofagus* se encuentran restringidas al sur de Sudamérica. A pesar que el registro fósil en Sudamérica muestra una presencia latitudinal continua del género *Nothofagus*, las distintas especies que componen al subgénero *Nothofagus* comparten el mismo polen de tipo *fusca* (b) (Hill 2001). Por lo tanto, los registros polínicos agrupan distintas especies como ocurre con el tipo *Nothofagus-dombeyi* representado por polen de *N. dombeyi*, *N. antártica* y *N. pumilio* (Heusser 1971). Esto dificulta realizar reconstrucciones biogeográficas basadas en polen para una determinada especie.

En el Cenozoico temprano (hace 60-70 Ma) la paleogeografía del margen oeste de Gondwana, que incluye la Patagonia y la península Antártica, era muy diferente a la configuración espacial actual de océanos y tierra. El paisaje en el sur de Sudamérica y la Península Antártica se encontraba caracterizado por la presencia de numerosas paleocuevas de origen marino (Romero 1986, leRoux & Elgueta 2000, Lisker *et al.* 2006, Suárez & Márquez 2007) que fragmentaban el paisaje. Antes del levantamiento de los Andes, los terrenos emergentes consistían, en el norte, de pequeñas unidades geológicas de origen pre-Cenozoico (Giacosa & Heredia 2004; Rosello *et al.* 2004; Duhart & Adriasola 2008; Glodny *et al.* 2008; Cembrano & Lara 2009) y, en el sur, de grandes macizos de tierra (Drewry 1976; Pankhurst *et al.* 1999, 2006; Rosello *et al.* 2004). Posteriormente, durante el Mioceno, tuvo lugar el levantamiento de la Cordillera principal de los Andes y al mismo tiempo se drenaron las paleocuevas. Gradualmente el clima se fue volviendo cada vez más frío y hace aproximadamente 7 y 5 Ma atrás ocurrieron las mayores glaciaciones registradas en Patagonia (Rabassa *et al.* 2005). En los años posteriores se desarrolló una marcada ciclicidad climática cada aproximadamente 100.000 años con una alternancia de períodos glaciarios fríos con cortos períodos interglaciarios de climas más cálidos (Hewitt 1999). Sin embargo, la

tierra no estaba completamente cubierta por hielo. Como muestra el registro de polen fósil existieron numerosas áreas libres de hielo en regiones templadas a lo largo de los Andes australes como en latitudes australes en Tierra del Fuego (Markgraf 1993, Heusser 1993).

La flora que habita en regiones templadas del hemisferio sur ha sido el foco de varios estudios biogeográficos y para resolver hipótesis sobre como ocurrió la separación de Gondwana debido al gran número de especies disyuntas que viven actualmente en Australasia y Sudamérica. Se han realizado varios estudios en los que se utilizan secuencias de ADN para tratar de resolver la historia biogeográfica de estas especies. En estos trabajos se discuten hipótesis opuestas de dispersión transoceánica de un continente a otro después de la separación de Gondwana, y de vicarianza en donde la separación habría ocurrido juntamente con la fragmentación del supercontinente de Gondwana donde los océanos habrían actuado como barreras contra la dispersión de las plantas. En particular, el género *Nothofagus* ha sido considerado clave para el estudio de la evolución y biogeografía de plantas del Hemisferio Sur (van Steenis 1971; Dettmann *et al.* 1990; Hill 1992). Esto se debe a que generalmente son árboles prominentes que dominan la vegetación en varios continentes australes, posee un registro fósil amplio y casi completo. Además, los frutos no están adaptados a la dispersión a distancia (Hill 1992; Hill & Dettmann 1996; Hill 2001) a pesar de recientes discusiones sobre la posibilidad de dispersión de *Nothofagus* a través del océano (Knapp *et al.* 2005). Por todas estas características, históricamente se ha intentado explicar la distribución transoceánica del género *Nothofagus* considerando hipótesis de vicarianza concordantes con la separación del supercontinente de Gondwana. Se han realizado varios estudios que tratan de reconstruir la historia de este género, algunos de los cuales han hecho aportes muy valorables, mientras que otros han introducido incertidumbres (Hill & Dettmann,

1996). Los datos obtenidos por estudios de datación molecular utilizando ADN del cloroplasto evidencian una divergencia reciente entre las especies de *Nothofagus*, especialmente dentro del subgénero *Lophozonia* y *Fuscospora*, que soportan la hipótesis de dispersión transoceánica a través del mar de Tasmania (Cook & Crisp 2005, Knapp *et al.* 2005). Por el contrario, el tiempo de divergencia estimado entre los taxones de Sudamérica y Australasia son consistentes con la separación de Australia y Sudamérica de Antártida. Por otro lado, un estudio filogenético de las especies del subgénero *Nothofagus* mostró que mientras que el ADN nuclear resuelve las relaciones filogenéticas entre las especies del subgénero, el ADN del cloroplasto arrojó una filogenia estructurada geográficamente independiente de las especies que sería el resultado de una larga historia de hibridación y captura del cloroplasto por parte de estas especies (Acosta & Premoli 2010). Por lo tanto, los análisis filogenéticos basados en polimorfismos intraespecíficos de ADN del cloroplasto podrían contribuir a elucidar hipótesis biogeográficas en taxones antiguos como *Nothofagus*.

Hasta la fecha, los patrones de distribución de los polimorfismos genéticos encontrados con ADN del cloroplasto en especies de *Nothofagus* de Sudamérica han sido explicados como resultado de las oscilaciones climáticas del Cuaternario. En particular, áreas genéticamente diversas por medio de PCR-RFLP en *Nothofagus* han sido interpretados como refugios glaciarios en el sur de Sudamérica (Marchelli *et al.* 1998; Marchelli & Gallo 2006; Azpilicueta *et al.* 2009; Pastorino *et al.* 2009). Sin embargo, estudios recientes en especies vegetales sugieren escenarios más antiguos que las últimas glaciaciones para explicar los patrones de distribución de polimorfismos de ADN del cloroplasto en plantas del Hemisferio Sur. Un estudio filogeográfico basado en secuencias de ADN del cloroplasto de 922 individuos ampliamente distribuidos del género *Hordeum* junto con el modelado del nicho ecológico bajo el Último Máximo

Glaciar muestra que las condiciones climáticas en el sur de Sudamérica durante el Pleistoceno habrían permitido la supervivencia de la especie en Patagonia austral sin sufrir restricciones geográficas. Esto sugiere que Patagonia podría consistir de una flora antigua que ha estado presente en el sur de Sudamérica al menos desde los últimos 4,5 Ma (Jakob *et al.* 2009). Sin embargo, la evidencia de regiones boscosas sobre todo a latitudes altas es fragmentada. Los miembros siempreverdes del subgénero *Nothofagus* fueron interpretados como un caso de diversificación reciente (Romero 1986). Por otro lado, datos genéticos de un estudio realizado en las tres especies siempreverdes de *Nothofagus* sugiere que serían miembros de una flora pre-Pleistocénica y que la estructura genética de estos taxones estaría reflejando una historia evolutiva más antigua que la que se ha sugerido hasta ahora (Premoli 1997). Similarmente, trabajos realizados en *N. pumilio* sugieren que sus características genéticas reflejan eventos antiguos de dispersión y vicarianza en relación con su origen en latitudes australes (Premoli 1998).

2.3. Objetivos particulares

El objetivo de este capítulo es evaluar cómo los eventos históricos antiguos ocurridos principalmente durante el Terciario en Patagonia han modelado los niveles y la distribución de los polimorfismos genéticos de *N. pumilio* a lo largo del gradiente latitudinal mediante el uso de marcadores conservados de regiones no codificantes de ADN del cloroplasto (ADNc). El ADNc posee una forma de herencia citoplasmática materna y por lo tanto no recombinante. Esto implica que las mutaciones que surjan en distintos individuos no recombinarán durante la reproducción sexual. Por lo tanto, las filogenias intraespecíficas inferidas en base a ADNc representan secuencias históricas

de eventos mutacionales. Este tipo de marcador permitirá reconstruir las relaciones genealógicas entre los haplotipos y reflejará los patrones de dispersión y vicarianza que ocurrieron durante migraciones y asilamientos históricos.

2.4. Hipótesis general e hipótesis particulares

Las hipótesis generales y particulares planteadas en este capítulo fueron las siguientes:

Hipótesis general:

H1) El acervo genético de *Nothofagus pumilio* refleja los procesos paleogeológicos que ocurrieron a escala de paisaje en Sudamérica austral.

P1) Se espera encontrar que las filogenias intraespecíficas en base a polimorfismos de ADNc resulten estructuradas espacialmente.

Hipótesis particulares:

H1.1) Las paleocuecas presentes en el sur de Sudamérica actuaron como barreras impidiendo el flujo génico entre poblaciones de *N. pumilio* y produciendo eventos de vicarianza a lo largo de su distribución latitudinal.

P1.1.1) Se espera encontrar linajes divergentes donde existieron barreras al flujo génico.

P1.1.2) Las poblaciones que permanecieron aisladas durante la existencia de la barrera no habrían sufrido intercambio genético produciéndose una divergencia genética entre ellas.

P1.1.3) Posteriormente a la extinción de la barrera las poblaciones aisladas podrían haber entrado en contacto produciendo zonas de sutura entre linajes genéticos divergentes.

H1.2) Los terrenos emergentes de origen pre-Cenozoico sirvieron como corredores durante la dispersión regional y supervivencia a largo plazo de *N. pumilio*.

P1.2) Se espera encontrar que los haplotipos de baja frecuencia estén asociados a formaciones rocosas de origen antiguo reflejando los efectos de la deriva por efecto del aislamiento y migración a distancia.

H1.3) La dispersión de *N. pumilio* dentro de Sudamérica ocurrió por medio de avances de pequeñas poblaciones siguiendo un modelo de piedra en paso y produciéndose cuellos de botella genéticos.

P1.3) Se espera encontrar que la distribución espacial de los polimorfismos genéticos del ADN del cloroplasto refleje las posibles rutas de dispersión de *N. pumilio* en Sudamérica.

2.5. Materiales y Métodos

Colección de muestras y procesamiento: se colectaron muestras de follaje fresco de 5 individuos por sitio en un total de 85 sitios a lo largo del rango total de distribución de *N. pumilio* en Argentina y Chile (Tabla II.1). Las hojas frescas fueron congeladas con nitrógeno líquido en el laboratorio y luego fueron almacenadas en freezer a -70° C hasta su posterior extracción y análisis. La extracción de ADN se realizó utilizando el kit DNeasy Plant-Mini-Kit (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del fabricante, y el método de CTAB (Doyle & Doyle 1990) modificado para plantas con alta concentración de polisacáridos (ver Apéndice 1). Las concentraciones de ADN y el tamaño de los fragmentos fueron estimados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y comparados con marcadores de peso molecular de 1 kb (Fermentas). Se amplificaron regiones no codificantes de ADNc mediante la reacción de la polimerasa en cadena (PCR) utilizando 15 pares de iniciadores universales descritos en Taberlet *et al.* (1991), Demesure *et al.* (1995), Dumolin-Lapègue *et al.* (1997), y Hamilton (1999). Las regiones de los espaciadores intergénicos entre *psbB-psbH* (**BH**), *trnL-trnF* (**LF**) y *trnH-psbA* (**HA**) fueron las más variables y por lo tanto fueron seleccionadas para los posteriores análisis (Tabla II.2).

Amplificación por PCR, purificación y secuenciación del ADN: previo a la reacción de PCR se realizó una reacción para facilitar la liberación del ADN con 2 µL (10 ng) de extracto de DNA y 6 µL de GeneReleaser® (BioVentures); luego se colocó en el termociclador bajo las condiciones: 15' a 85 ° C y luego se mantuvo a 32° C. La mezcla de reacción de la PCR contenía 2 µL (~10 ng) de extracto de ADN, 5 µL de buffer de reacción 5× Green GoTaq® (Promega), 0,25 mM de cada dNTP, 0,3 µM de

cada iniciador, y 1,25 U de GoTaq® ADN polimerasa (Promega), en un volumen total de 25 µL. Las condiciones de amplificación de la PCR fueron las siguientes: desnaturalización inicial por 4 min a 95° C; luego 35 ciclos (desnaturalización por 1 min a 94° C; anclaje por 1 min a 57° C para **BH**, 54° C para **LF** y 56° C para **HA**; extensión por 1,5 min a 72° C), y una extensión final por 6 min a 72° C. Los productos de PCR fueron purificados mediante una reacción usando 2,5 U de Exonucleasa I (USB) y 0,25 U de Fosfatasa Alcalina (USB) cada 10 µL de producto de PCR, luego fue colocado en un termociclador (Eppendorf) bajo las condiciones: 15 min a 37° C, y 15 min a 85° C. El ADN purificado obtenido fue secuenciado mediante el secuenciador ABI PRISM 3100 *Avant* Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando el kit de secuenciación ABI PRISM® BigDye® Terminator v3.1 Cycle sequencing kit (Applied Biosystems) en el Laboratorio Ecotono (Bariloche, U. N. del Comahue). Las reacciones de secuenciación fueron realizadas siguiendo las instrucciones del fabricante (BigDye® Terminator v1.1 Cycle sequencing kit, Protocol, Applied Biosystems). Las tres regiones analizadas fueron secuenciadas en ambas direcciones para al menos un individuo de cada población. Se secuenciaron dos individuos por población de cada sitio ubicado al sur de los 47° de latitud S. Un solo individuo fue secuenciado de cada sitio de Tierra del Fuego ya que estudios previos indicaron la ausencia de polimorfismos de ADNc en poblaciones de la Isla (A. Premoli, Comunicación Personal) y por lo tanto se priorizó el aumento del número de poblaciones analizadas. Además, se secuenció un individuo por especie de las especies *Nothofagus glauca*, *N. nervosa*, y *N. obliqua* pertenecientes al subgénero *Lophozonia*, para ser utilizadas como grupo externo. Las secuencias de cada haplotipo encontrado fueron depositadas en GeneBank (números de acceso: **BH**: GU152886-GU152893 y GQ863397-GQ863405; **LF**: GU152870-GU152877 y GQ863379-GQ863387; **HA**: GU125878-GU152885 y GQ863388-GQ863396).

Análisis de las secuencias de ADN: las secuencias obtenidas (Fig. II.1) para las tres regiones amplificadas por PCR fueron alineadas con el programa MEGA4 (Tamura *et al.* 2007) y fueron concatenadas manualmente en una única base de datos combinada para los análisis posteriores. Los distintos haplotipos de ADNc fueron determinados en base a las sustituciones nucleotídicas y a las inserciones-delecciones (indels). Se calcularon distintos parámetros de diversidad (ver Apéndice 2) incluyendo el tamaño de alineamiento, número de haplotipos (H), contenido de C/G (%CG), número de sitios variables, número de transiciones (Ts), número de transversiones (Tv), número de inserciones/delecciones o indels (I), y la diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π) con el programa ARLEQUIN v2.0 (Schneider *et al.* 2000). Se realizaron análisis demográficos (ver Apéndice 2) para evaluar si el tamaño poblacional aumentó, se redujo o se mantuvo constante a lo largo del tiempo mediante el cálculo del parámetro *D* de Tajima (Tajima 1989), el *F* de Fu & Li (Fu & Li 1993) y los gráficos de distribución no correspondida de las diferencias entre pares de haplotipos (mismatch distribution, MMD) de las diferencias observadas y esperadas, utilizando el programa DNAsp v4.10.9 (Rozas *et al.* 2003).

Análisis filogenéticos: las relaciones filogenéticas entre los haplotipos fueron inferidas mediante los métodos de máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (MV) utilizando el programa PAUP 4.0b10 (Swofford 2002) y mediante análisis de inferencia Bayesiana (IB) con el programa MRBAYES v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003). Los indels de más de un par de bases (pb) fueron tratados como un único carácter resultado de un único evento mutacional. Además, los indels fueron codificados como presencia/ausencia para el análisis de MP. Los análisis de MP y MV fueron realizados mediante una búsqueda heurística con 100 réplicas aleatorias, basado en intercambio de ramas con disección-reconexión de árboles (TBR). Los estados de los caracteres fueron

considerados desordenados y se les asignaron pesos iguales. El análisis de IB fue realizado mediante cuatro réplicas con cuatro cadenas (tres frías y una caliente) que fueron corridas por un millón de generaciones, muestreando cada 100 generaciones y con un período de quemado equivalente al 10% de los árboles muestreados. El soporte de los nodos fue determinado para MP y MV mediante un análisis de permutaciones (Felsenstein 1985) de 1000 réplicas realizado con el programa PAUP*. Además, para IB se calcularon las probabilidades posteriores bayesianas de cada nodo con MRBAYES. Para realizar los análisis filogenéticos de MV e IB es necesario usar rigurosas pruebas estadísticas para seleccionar el modelo de sustitución nucleotídica y el valor de sus parámetros que mejor se ajusten a la matriz de datos a analizar. Los modelos más apropiados de sustitución nucleotídica fueron identificados mediante el uso del programa MODELTEST v3.7 (Posada & Crandall 1998) y MRMODELTEST v2.3 (Nylander 2004) bajo el criterio de información de Akaike (AIC) y luego fueron implementados en los análisis de MV e IB, respectivamente. El programa MODELTEST examina el ajuste de los modelos de MV desde el más simple al más complejo. Este método incrementa el número de parámetros en el modelo de MV gradualmente hasta que la incorporación de un nuevo parámetro no produce un mejor ajuste entre el modelo y los datos. En cambio, el programa MRMODELTEST comienza desde el modelo más complejo hasta el más simple. El modelo de mejor ajuste para MV fue K81uf+I, y GTR+I para IB. Las secuencias de *Nothofagus obliqua*, *N. nervosa*, y *N. glauca* pertenecientes al subgénero *Lophozonia* fueron utilizadas como grupo externo. Para visualizar las relaciones entre los haplotipos, se realizó una red de Median-Joining (Bandelt *et al.* 1999) con el programa NETWORK v4.201 (<http://www.fluxus-engineering.com>).

Análisis de Paisaje: los patrones de divergencia genética entre las áreas muestreadas a lo largo del rango de distribución de *N. pumilio* fueron investigados

mediante análisis de varianza molecular (AMOVA) de los haplotipos de ADNc utilizando la distancia genética entre sitios utilizando el programa GenAlEx versión 6.2 (Peakall & Somouse 2006). Además, para analizar la estructuración genética a diferentes escalas geográficas se realizó un análisis de AMOVA jerárquico: entre regiones, que fueron delimitadas según los dos clados principales arrojados por el análisis filogenético (norte, entre 36-42° S y sur, entre 42-55° S), entre poblaciones dentro de cada región y dentro de las poblaciones. La significancia de los valores globales y jerárquicos así como de los pares de Φ_{ST} fue calculada mediante permutaciones con 999 réplicas. Además, para identificar grupos de sitios de máxima diferenciación genética ubicados en áreas de muestreo contiguas se realizó un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) utilizando el programa SAMOVA v. 1.0 (<http://web.unife.it/progetti/genetica/Isabelle/samova.html>, Dupanloup *et al.* 2002). Este análisis es utilizado para detectar posibles barreras biogeográficas que impiden el flujo génico entre las poblaciones muestreadas. Maximiza el valor de F_{CT} (variabilidad entre grupos) agrupando las poblaciones más similares genéticamente que estén geográficamente adyacentes. El análisis se basó en 100 simulaciones de pasos de anidamiento e indicadores de máxima diferenciación del ADNcp (valores de F_{CT}) fijando el número de grupos desde $K = 2$ hasta $K = 14$ (siendo 14 el número total de haplotipos muestreados). Por último, se utilizó el programa Alleles in Space (Miller 2005) para realizar gráficos de superficie tridimensionales (Gráficos de Paisaje Genético) que representan la distribución de áreas con elevada distancia genética (eje de coordenadas Z) a lo largo del total del paisaje analizado en este estudio (ejes de coordenadas X e Y). El análisis se repitió utilizando distintos tamaños de grilla (20 x 20, 50 x 50, 100 x 100) y distintos valores de peso ($a = 0,5$ hasta $a = 2$) para evitar interpretaciones erróneas de los datos.

Análisis filogeográfico de clados anidados: para evaluar las relaciones entre los haplotipos y su distribución geográfica, se realizó un análisis filogeográfico de clados anidados (NCPA, Templeton *et al.* 1995) mediante el programa GeoDis v2.2 (Posada *et al.* 2000). Además se construyó una red de parsimonia estadística utilizando el algoritmo descrito por Templeton *et al.* (1992) con el programa TCS v.1.18 (Clement *et al.* 2000). Se utilizó el programa ANeCa v1.1 (Panchal 2007) para automatizar el algoritmo de anidamiento y la clave de inferencia de Templeton *et al.* (1995).

2.6. Resultados

Distribución geográfica de la variación genética: el análisis de 194 secuencias de 1-5 individuos/sitio pertenecientes a 85 sitios muestreados para *N. pumilio* dió como resultado 14 haplotipos diferentes (Tabla II.1; Fig. II.2). El tamaño del alineamiento de las secuencias de ADNc varió entre 776-791 pb (**BH**), 416-437 pb (**LF**), y 419-445 pb (**HA**). Todas las secuencias fueron concatenadas resultando en una matriz alineada de 1673 caracteres con un promedio de 33,4% de contenido de C/G. Se identificaron 25 sitios variables, de los cuáles 14 fueron indels y los otros 11 correspondían a transiciones, no se encontraron transversiones (Tabla II.3). Para cada una de las regiones analizadas se encontraron indels de más de 10 pares de bases: una duplicación de 15 pb en **BH**, una delección de 17 pb en **LF**, y una duplicación de 19 pb en **HA**, el resto de los indels correspondieron a regiones de repeticiones poli-A/T. La distribución de los cuatro haplotipos más frecuentes (H2, H8, H12 y H14) se encontró en regiones contiguas de Argentina y Chile y latitudinalmente disyuntas (Fig II.2). El haplotipo H2 fue encontrado entre los 37 a los 40° S, el H8 entre 40-42° S, H12 se encontró restringido entre los 42-46° S, y finalmente el H14 se encontraba ampliamente

distribuido entre 47-55° S en los Andes Patagónicos Australes. Sólo se detectó variación intra-poblacional en cuatro sitios del norte. Los haplotipos H1 y H5 ocurren en Nahuelbuta (NHB) en la Cordillera de la Costa a los 38° S. El resto se encontraban en la Cordillera de los Andes: a los 39° S coexisten los haplotipos H2 y H7 en Moquehue (MOQ) y en la cercanías coexisten los haplotipos H2 y H8 en Rucachoroi (RCH) mientras que a los 41° S se encuentran los haplotipos H8 y H10 en el Paso Puyehue (PUY) (Tabla II.1, Fig. II.2). Mientras que los sitios polimórficos NHB, MOQ, y PUY contienen haplotipos que pertenecen a un linaje determinado, el sitio RCH contiene haplotipos que pertenecen a distintos linajes.

Análisis poblacionales: los test de neutralidad realizados mediante el D de Tajima (2,57; $P < 0,05$) y el F de Fu & Li (2,17; $P < 0,02$) mostraron valores positivos y significativamente distintos de cero en el clado del norte, indicando una disminución en el tamaño poblacional o de un aislamiento poblacional generando una estructuración espacial de haplotipos significativa. El análisis de MMD mostró una distribución bimodal, lo que indica que existen dos grupos en las poblaciones muestreadas a lo largo del rango geográfico total que han estado aislados históricamente en el espacio, produciendo una divergencia alopátrica (Fig. II.3.a). El mismo análisis realizado sólo para el clado del norte dio como resultado una distribución unimodal del número de diferencias entre pares de secuencias, indicando que las poblaciones han sufrido un cuello de botella seguido de una expansión poblacional (Fig. II.3.b).

Análisis filogenéticos: el análisis de MP arrojó dos árboles más parsimoniosos los cuales requirieron 74 pasos (CI = 0.9189, RI = 0.9589). La topología del árbol de consenso estricto de parsimonia (Fig. II.4.a) resultó idéntica a uno de los dos árboles más parsimoniosos. El análisis de MV arrojó un árbol más probable ($-\ln L = 2543,1$)

similar al árbol de MP (Fig. II.4.b). El árbol obtenido por IB fue congruente con los árboles de MP y MV, las topologías sólo difirieron en los nodos con bajo soporte (Fig. II.4.c). En los tres análisis se identificaron los mismos dos grandes clados diferenciados latitudinalmente (Fig. II.4). El clado del norte (al norte de los 41° 59' S) contiene 11 haplotipos (H1-H11) ubicados en el norte de la Patagonia en Argentina y Chile (Fig. II.2). El clado del sur (al sur de los 42° 30' S) está representado por solamente tres haplotipos (H12-H14) que se encuentran ampliamente distribuidos en los Andes Patagónicos Australes de ambos países (Fig. II.2). El clado del norte presentó en promedio mayor diversidad nucleotídica y haplotídica que el clado del sur (Tabla II.4). Los resultados de la red de Median-Joining (Fig. II.5.a) y la red de parsimonia estadística (Fig. II.5.b) arrojaron la misma y única red que incluía los 14 haplotipos sin reticulaciones internas. Se identificaron cuatro grupos de haplotipos que sugieren una distribución con una alta estructuración geográfica (Fig. II.2). Los haplotipos de la posición más interna en la red (considerados ancestrales) formaron un grupo que consiste de los sitios muestreados en el límite norte de la distribución de *N. pumilio* en la Cordillera de los Andes y del sitio muestreado en la Cordillera de la Costa. Los otros tres grupos, que contienen los haplotipos de mayor frecuencia, no se superponen a lo largo del rango de distribución geográfica latitudinal de *N. pumilio*. En particular, los haplotipos de distribución más austral se separaron claramente del resto por 11 eventos mutacionales (Fig. II.5).

Análisis de paisaje: los resultados del análisis de AMOVA mostraron una estructura genética significativa en *N. pumilio* (Tabla II.5). La mayor parte de la estructuración genética se debe a las diferencias entre- poblaciones ($\Phi_{ST} = 0,978$; $P = 0,001$). Los pares de Φ_{ST} variaron entre 0,000 y 0,997 y 188 de los 1431 valores totales resultaron significativamente distintos de cero. También, el AMOVA jerárquico arrojó

una estructuración significativa ($P = 0,001$) de la variabilidad genética en todos los niveles jerárquicos (Tabla II.6), i. e. entre las regiones norte y sur ($\Phi_{RT} = 0,737$), entre poblaciones ($\Phi_{SR} = 0,947$), y entre poblaciones ($\Phi_{ST} = 0,986$). Los análisis de SAMOVA sugieren la existencia de grupos diferenciados genéticamente (Tabla II.7). El número total de grupos se determinó en base a los valores de F_{CT} , a partir de $K = 4$ el incremento en el valor de F_{CT} alcanzó una meseta (Fig. II.6). El análisis realizado con $K = 2$ identificó 2 grupos separados latitudinalmente a los 42° S (grupos: VIL-PQN vs. RTI-NAV; $F_{CT} = 0,741$; $P < 0,001$) los cuales se corresponden con los linajes norte y sur del análisis filogenético (ver Fig. II.4). En los análisis realizados para $K = 3$ y $K = 4$ se identificaron además otros grupos dentro del área que corresponde al norte de la distribución. Tres grupos consistieron de los sitios VIL-TRO y RCH-PQN ubicados al norte y al sur de los 40° S, y el resto de los sitios RTI-NAV al sur de los 42° S ($F_{CT} = 0,921$; $P < 0,001$). En los análisis realizados para $K = 5$ hasta $K = 14$, los valores de F_{CT} no fueron substancialmente mayores que para el análisis de $K = 4$ (Tabla II.7).

Los resultados de los análisis de interpolación de las distancias genéticas en el paisaje mediante gráficos de superficie (Fig. II.7) soportaron los resultados arrojados por el análisis de SAMOVA. Se identificó una zona de mayor diferenciación genética a latitudes intermedias ($42-43^\circ$ L S) de la distribución de *N. pumilio* indicando una probable importante barrera al flujo génico (Fig. II.7). Además se encontraron otras grandes discontinuidades genéticas a los 38 y 40° L S y otras menores a los 46 y 48° L S (Fig. II.7). Otras características adicionales del gráfico de superficies muestran que las distancias genéticas de ADNc disminuyen a medida que incrementa la latitud. Se obtuvieron gráficos similares utilizando distintos tamaños de grilla y distintos valores de peso.

Análisis filogeográfico de clados anidados: El análisis anidado de clados conectó los clados norte y sur por 10 eventos mutacionales, sin ambigüedades internas (Fig. II.8). El test de contingencia (Tabla II.8) mostró que sólo los clados de un paso 1-1, 1-2 y 1-4 poseían variación genética y una estructuración geográfica significativa. Lo mismo sucedía con los clados de mayor nivel 2-1, 2-2, 2-5, 3-1, 3-3 y el cladograma total. Para los clados del norte 2-1 y 3-1, el NCPA infirió un escenario de flujo génico restringido con aislamiento por distancia. Por otro lado, para el clado 2-2 y el cladograma total se infirieron eventos de fragmentación alopátrica (Tabla II.9).

2.7. Discusión

Los análisis filogeográficos realizados en *N. pumilio* muestran una estructuración que sugiere distintas trayectorias evolutivas significativamente controladas por la latitud. La marcada estructura latitudinal en los polimorfismos de ADNc se corresponde con la monofilia recíproca de los linajes norte y sur de *N. pumilio* que sugieren una divergencia temprana. Si bien hoy en día las poblaciones de *N. pumilio* habitan los ambientes alto andinos de manera continua a lo largo de toda la extensión del bosque templado austral de Argentina y Chile, su acervo genético refleja disyunciones alopátricas históricas debido a barreras al flujo génico.

Varios estudios filogeográficos utilizando marcadores de ADNc, particularmente en especies que habitan en el Hemisferio Norte, evidencian una estructuración genética significativa. Estos estudios muestran que la mayoría de los linajes que habitan las áreas frías septentrionales derivaron de áreas de refugio en regiones más cálidas ubicadas

hacia el sur que han sido interpretadas como resultado de la historia glaciaria (Petit *et al.* 2002; Soltis *et al.* 2006). Bajo esos escenarios glaciarios y dado que la extensión de los hielos fue mayor en la porción mas austral de Sudamérica, se esperaría que los patrones filogeográficos de *N. pumilio* reflejen migraciones a escala regional. En este caso los refugios se habrían ubicado en áreas templado-cálidas hacia el norte donde se propuso que existió mayor probabilidad para la supervivencia de bosques (Villagrán & Hinojosa 2005) a partir de las cuales las poblaciones del sur deberían haber derivado. Los análisis filogenéticos muestran claramente que los dos grupos identificados en el norte y sur son clados hermanos y que ninguno de los dos ha derivado del otro. Además, la ausencia de haplotipos comunes a lo largo de toda la distribución de la especie y/o de haplotipos del clado norte en el sur y viceversa junto con los análisis demográficos que indican una estructuración espacial de los haplotipos, proveen evidencia inequívoca de que los grupos norte y sur han estado aislados históricamente. Por otro lado, la hipótesis ya sea de extinción de haplotipos comunes y/o la pérdida de haplotipos del norte en el sur y viceversa resulta poco parsimoniosa dado que se tomaron muestras de 85 poblaciones a lo largo de toda la distribución latitudinal y longitudinal en Argentina y Chile y se secuenciaron 196 individuos de *N. pumilio*. Este resultado cuestiona la posibilidad de que la historia glaciaria de la región haya sido la posible causa de la estructuración observada en el ADNc. Esto es particularmente relevante en el caso de *N. pumilio*, una especie con relativamente baja fecundidad y que posee dificultades para el establecimiento y por lo tanto baja capacidad de dispersión. Por lo tanto, las diferencias genéticas acumuladas entre las poblaciones distantes de los linajes norte y sur son sumamente difíciles de explicar en base a mutaciones ocurridas durante los últimos 20.000 años (ver estimación de las tasas de migración en Capítulo III, pág. 97).

Durante varios años las repetidas glaciaciones que ocurrieron durante el Pleistoceno han sido consideradas globalmente como modeladores de la variación genética en varias especies de plantas y animales (Ferris *et al.* 1999), y varios investigadores han considerado a estos eventos, relativamente recientes, como las principales fuerzas que actuaron sobre los patrones y la distribución de la variación genética en especies de árboles de Patagonia (Allnutt *et al.* 1999, Premoli *et al.* 2000a, 2000b, 2001, Bekessy *et al.* 2002, Premoli *et al.* 2002, Allnutt *et al.* 2003, Premoli *et al.* 2003, Marchelli & Gallo 2006; Núñez-Ávila & Armesto 2006, Premoli *et al.* 2007; Azpilicueta *et al.* 2009). Hay pocos estudios realizados que presenten evidencias de que otras fuerzas, además de los ciclos climáticos del Cuaternario, explican los patrones genéticos para especies de plantas. Análisis moleculares realizados en *Quercus suber* (Magri *et al.* 2007) y *Pinus pinaster* (Burban & Petit 2003) en la región del Mediterráneo sugieren que la estructuración geográfica encontrada concuerda con la historia del Terciario de esos taxones (Hampe & Petit 2007). Para otras especies de *Nothofagus*, estudios realizados utilizando PCR-RFLP de ADNc han sugerido a la historia glaciaria como el evento histórico que ha modelado la estructura geográfica de *N. nervosa*, *N. obliqua* y *N. antarctica* (Marchelli & Gallo 2006, Azpilicueta *et al.* 2009, Pastorino *et al.* 2009). En estos trabajos grupos de poblaciones con haplotipos diferentes fueron interpretados como un aislamiento a largo plazo en distintos refugios glaciarios desde donde las especies se habrían dispersado después del retroceso de los hielos. En particular para *N. antártica*, que al igual que *N. pumilio* pertenece al subgénero *Nothofagus*, se ha sugerido la presencia de dos refugios glaciarios al norte y al sur de los c. 42 °S (Pastorino *et al.* 2009). Por el contrario, un estudio realizado con secuencias de tres regiones de ADNc pertenecientes a 87 poblaciones sugiere que los polimorfismos genéticos de *N. antarctica* reflejan eventos de vicarianza y dispersión durante el

Terciario que resultaron en una marcada estructuración genética conservada hasta el presente. Además, las poblaciones del norte sufrieron mayores restricciones al flujo génico histórico causadas por una paleogeografía compleja (Acosta *et al.* 2009). Las diferencias encontradas entre ambos estudios podrían deberse a que un estudio sin incluir la distribución total y analizando una sola región del ADNc probablemente mostró evidencia parcial de una estructura filogeográfica compleja como la de *N. antarctica*. Por otro lado, estudios de secuenciación de ADNc utilizando los mismos tres marcadores de esta tesis en las otras cuatro especies del subgénero *Nothofagus* (*N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi* y *N. nitida*) a lo largo de sus rangos completos de distribución muestran concordancia geográfica en los patrones filogeográficos reflejando una estructura geográfica antigua (Mathiasen *et al.* 2008; Acosta *et al.* 2009; Acosta & Premoli 2010). Por lo tanto, los patrones de ADNc sugieren que el acervo genético de *N. pumilio* ha sido modelado por procesos antiguos como fuera sugerido anteriormente (Premoli 1998).

En particular, las características paleo-geográficas de Patagonia podrían explicar los patrones genéticos encontrados. Aquí se presenta una nueva hipótesis en donde se postula que la presencia de la cuenca pacífica del Chubut en latitudes intermedias de Patagonia alrededor de los 42-43° S (Suárez & Márquez 2007) produjo un evento de vicarianza entre las poblaciones de *N. pumilio* ubicadas al norte y al sur de dicha latitud. Análogamente, se ha encontrado una disyunción intra-específica a los 43° S para la conífera austral *Podocarpus nubigena* utilizando 14 loci isoenzimáticos (Quiroga 2009). Además, la ubicación de una paleo-cuenca Pacífica a los 40° S que se abrió durante el Terciario superior (leRoux & Elgueta 2000) concuerda con la subdivisión en la distribución geográfica de los dos linajes que conforman el grupo Norte. Esto es soportado por el análisis de SAMOVA con $K = 3$, grupos denominados de aquí en más

como costa-norte, que incluye los haplotipos ancestrales de este grupo (H1, H3, H4 y H5), y centro-norte (Figs. II.2 y II.4). Además, los análisis de distribución no correspondida de diferencias entre pares de secuencias (MMD) mostraron que las poblaciones del norte habrían sufrido un cuello de botella genético seguido de una expansión de rango siguiendo un modelo de piedra-en-paso (o de aislamiento por distancia) como sugiere el NCPA (Fig. II.8) probablemente a través de dos rutas: una a lo largo de la Cordillera de la Costa en el oeste, y la otra por el Macizo Nor-Patagónico en el este (Figs. II.2 y II.5). La presencia de los haplotipos ancestrales para el clado del norte a lo largo de toda la Cordillera de la Costa en *N. antártica* y en *N. dombeyi* (Acosta *et al.* 2009, 2010) sugieren que los haplotipos del clado Costa-norte habrían migrado hacia el norte (Fig. II.2, ruta 1) por las montañas existentes en la Cordillera de la Costa antes de la apertura de la paleo-cuenca de Valdivia hasta alcanzar las latitudes más bajas donde las condiciones climáticas y topográficas favorables lo permitieron. A partir de ese punto la colonización continuó hacia el sur, i. e. grupo Andes-norte (Fig. II.2, ruta 2), bordeando el margen oeste de la paleo-cuenca interna del Neuquén (Suárez & Márquez 2007). Por otro lado, el linaje centro-norte se habría dispersado hacia el norte rodeando el margen este (Fig. II.2, ruta 3) de la paleo-cuenca interna de Osorno (leRoux & Elgueta 2000). En ese tiempo, la tierra disponible para dispersarse era escasa debido a que el escenario geológico en el oeste de Gondwana estaba compuesto de numerosas cuencas que fragmentaban el paisaje (Lisker *et al.* 2006) y el nivel del mar era más alto que en el presente (Miller *et al.* 2005). Probablemente el único ambiente favorable para el establecimiento de las plantas consistió de las numerosas unidades geológicas aisladas de origen pre-Mesozoico distribuidas a lo largo de la Patagonia (Giacosa & Heredia 2004, Duhart & Adriasola 2008, Glodny *et al.* 2008, Cembrano & Lara 2009). Al reconstruir la paleogeografía de la región Patagónica previa al

levantamiento de los Andes, se vió que la distribución de haplotipos no-comunes estaba asociada a la existencia de rocas de origen antiguo (Fig. II.2). En particular, la formación Nahuelbuta en la Cordillera de la Costa, la cual consiste de rocas del Paleozoico, contiene el haplotipo único H5 (ver Fig. II.2). Del mismo modo la distribución de los haplotipos H6, H7, H9, H10 y H11 se superpone con la presencia de unidades geológicas antiguas que han sido reportadas en distintas partes de la región Patagónica (Giacosa & Heredia 2004, Glodny *et al.* 2008, Cembrano & Lara 2009). Por el contrario, las poblaciones genéticamente homogéneas presentes en las latitudes más australes sugieren una evolución *in situ* en grandes extensiones de superficie emergente (Drewry 1976, Pankhurst *et al.* 1999, Rosello *et al.* 2004, Pankhurst *et al.* 2006) permitiendo la persistencia a largo plazo. Además, el hecho de que el haplotipo H12 es derivado del haplotipo de distribución más austral H14, sugiere que la colonización de las latitudes intermedias probablemente ocurrió en dirección sur-norte (Fig. II.2, ruta 4) luego de que se drenó la paleo-cuenca del Chubut después del levantamiento de los Andes en el Mioceno. Por lo tanto, la presencia de grandes macisos en el sur facilitó el establecimiento y la persistencia a largo plazo de poblaciones grandes y relativamente continuas lo cual se ve reflejado en la baja diferenciación en el ADN del cloroplasto en comparación con las poblaciones del norte. En cambio, en áreas más templadas ubicadas hacia el norte, *N. pumilio* se encontraba probablemente restringida a ambientes montañosos como un elemento marginal del bosque. La existencia de numerosas paleo-cuencas en esta área actuando como barreras geográficas, ha producido fragmentaciones poblacionales en el pasado y restricciones al flujo génico histórico llevando a la diferenciación poblacional lo cual es gráficamente representado por la superficie tridimensional de las distancias genéticas (Fig. II.7). Los análisis demográficos muestran que las poblaciones del Norte han sufrido procesos de endogamia y severos

cuellos de botella genéticos durante su historia evolutiva que se relacionarían con una paleogeografía compleja. Similarmente, en un estudio realizado con secuencias de ADN del cloroplasto en distintas especies del género *Hordeum* encontraron un gran número de haplotipos compartidos entre las especies que habita en distintas áreas de la región Patagónica lo que indica eventos de especiación por vicarianza (Jakob *et al.* 2009).

Los análisis de paisaje para *N. pumilio* muestran la existencia de tres zonas genéticamente discontinuas latitudinalmente a 38, 40, y 43° S (Fig. II.7) que podrían ser interpretadas como zonas de sutura entre linajes divergentes antiguos separados históricamente por la presencia de las paleocuecas de Neuquén, Valdivia y Chubut, respectivamente. En este estudio se propone que los patrones de variación del ADN del cloroplasto de *N. pumilio* fueron controlados principalmente por la paleogeografía de Patagonia en lugar de reflejar eventos más recientes como el levantamiento de los Andes en el Mioceno y las glaciaciones del Pleistoceno. Esto es reforzado por la concordancia encontrada en los patrones geográficos en todas las especies del subgénero *Nothofagus* utilizando las mismas regiones del ADN del cloroplasto analizadas en esta tesis que reflejarían eventos de captura del cloroplasto como resultado de flujo génico histórico a través de hibridación/introgresión (Acosta & Premoli 2010). Además, en un estudio de datación mediante el uso del reloj molecular relajado para las cinco especies del subgénero *Nothofagus*, encontró que la divergencia haplotídica entre las poblaciones al norte y al sur de los 43° de latitud S es de *c.* 37 Ma, mientras que la divergencia entre los linajes del norte a 40° de latitud S es más reciente y fue datada en *c.* 15 Ma (Premoli *et al.*, en revisión). Como resultado, las áreas con alta diversidad haplotídica a los 40 y 43° S representan zonas de sutura entre linajes que han divergido en una etapa temprana de su historia evolutiva. Aquí se plantea un nuevo escenario para las discusiones en la filogeografía y biogeografía de plantas leñosas

pertenecientes a linajes basales como las especies del subgénero *Nothofagus* (Premoli *et al.*, en revisión) que componen los bosques en regiones templadas australes. La mayor diferenciación genética a escala regional reflejada en los polimorfismos de ADNc ocurrió principalmente debido a fuerzas Paleógenas controladas por la geología. No obstante, los taxones antiguos tolerantes al frío han mostrado una respuesta vigorosa a las oscilaciones climáticas del Cuaternario (Markgraf *et al.* 1995) conservando su identidad como especie a lo largo de grandes áreas geográficas como *Podocarpus* y *Nothofagus*. Particularmente *N. pumilio* se ha adaptado a los gradientes de altitud y ha respondido a las fluctuaciones climáticas a través de movimientos locales altitudinales (Premoli 2003, Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007). Por lo tanto, los ciclos climáticos del Cuaternario probablemente han tenido efectos sinérgicos sobre la estructura genética antigua y deberían ser estudiados localmente utilizando marcadores genéticos más variables. Los resultados de este trabajo muestran que se necesita mayor información para determinar la localización de refugios glaciarios para *Nothofagus* basados en el ADN del cloroplasto. Es necesario realizar estudios a escala local utilizando distintos tipos de marcadores genéticos en combinación con la información proporcionada por el registro fósil, datos geológicos y modelación de nichos ecológicos. En el Capítulo III de esta tesis se realizó un estudio a escala regional sobre los efectos que tuvieron las últimas glaciaciones sobre el acervo genético de *N. pumilio*, mediante el uso de marcadores nucleares isoenzimáticos menos conservados en la evolución que el ADNc.

2.8. Tablas y Figuras

Tabla II.1. Ubicación geográfica de los sitios muestreados de *Nothofagus pumilio* y número total de individuos analizados de cada haplotipo identificado para las regiones: *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA*.

N°	ID	Nombre del Sitio	Coordenadas (Lat S, Long O)	Altitud (m a.s.l.)	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	N
1	VIL	R Altos de Lircay, R-VII, CL	35° 34', 70° 60'	1710	3														3
2	EPU	L Epulafquen, NQN, AR	36° 52', 71° 04'	1663		4													4
3	CLN	Vn Chillan, R-VIII, CL	36° 53', 71° 30'	1664				3											3
4	CHL	Termas de Chillán, R-VIII, CL	36° 54', 71° 25'	1690				3											3
5	LAJ	Vn Antuco, R-VIII, CL	37° 28', 71° 19'	1406		2													2
6	PIC	P Pichachen, R-VIII, CL	37° 29', 71° 08'	1675				1											1
7	NHB	PN Nahuelbuta, R-IX, CL	37° 49', 73° 02'	921	1				2										3
8	CAV	L Caviahue, NQN, AR	37° 51', 71° 04'	1650		5													5
9	CON	PN Conguillio, R-IX, CL	38° 38', 71° 36'	1195		3													3
10	PHL	P Pino Hachado, R-IX, CL	38° 39', 70° 57'	1618						2									2
11	PHC	P Pino Hachado, NQN, AR	38° 40', 70° 51'	1600						5									5
12	ICA	P Icalma, NQN, AR	38° 48', 71° 16'	1298								1							1

Tabla II.1. (Continuación...)

Nº	ID	Nombre del Sitio	Coordenadas (Lat S, Long O)	Altitud (m a.s.l.)	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	N
13	BMH	Vn Batea Mahuida, NQN, AR	38° 50', 71° 13'	1500								5							5
14	MOQ	L Moquehue, NQN, AR	39° 00', 71° 23'	1275		3						2							5
15	RCH	L Rucachoroi, NQN, AR	39° 14', 71° 13'	1380		1						2							3
16	VRC	Vn Villarica, R-IX, CL	39° 23', 71° 56'	1200		3													3
17	TRO	P Tromen, NQN, AR	39° 35', 71° 26'	1125		5													5
18	CAR	P Carririñe hito, R-IX, CL	39° 47', 71° 41'	1112								2							2
19	MCH	Mocho Choshuenco, R-IX, CL	39° 56', 72° 06'	1061								2							2
20	CHP	C Chapelco, NQN, AR	40° 12', 71° 19'	1375									5						5
21	CBA	P Cordoba, NQN, AR	40° 36', 71° 09'	1237										5					5
22	PUY	P Puyehue, NQN, AR	40° 44', 71° 55'	1173								5		1					6
23	ANT	R Antillanca, R-X, CL	40° 47', 72° 13'	979								3							3
24	EAL	El Alerzal, P Blest, RNE, AR	40° 60', 71° 50'	1119								3							3
25	LHE	La Heladera, P Blest, RNE, AR	41° 00', 71° 50'	895								3							3

Tabla II.1. (Continuación...)

N°	ID	Nombre del Sitio	Coordenadas (Lat S, Long O)	Altitud (m a.s.l.)	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	N
26	OSN	Vn Osorno, R-X, CL	41° 08', 72° 32'	1171								3							3
27	OTO	C Otto, RNE, AR	41° 10', 71° 22'	1102								2							2
28	CHB	C Challhuaco, RNE, AR	41° 15', 71° 17'	1325											5				5
29	PLF	Pichi Leufu, RNE, AR	41° 20', 71° 09'	1100											2				2
30	LW	El Foyel, RNE, AR	41° 28', 71° 06'	1581											3				3
31	CMA	Cnd de la Mosca, RNE, AR	41° 31', 71° 28'	1056											3				3
32	LSE	La Serrucha, RNE, AR	41° 37', 71° 03'	1727								3							3
33	PMO	C Perito Moreno, RNE, AR	41° 48', 71° 34'	990								5							5
34	PQN	C Piltriquitrón, RNE, AR	41° 58', 71° 29'	1250								5							5
35	RTI	Rio Tigre, CHU, AR	42° 30', 71° 57'	720												3			3
36	LHY	C La Hoya, CHU, AR	42° 50', 71° 16'	1275												3			3
37	SDA	Sa Colorada, CHU, AR	43° 12', 71° 21'	992												3			3
38	VIN	L Vintter, CHU, AR	43° 58', 71° 31'	950												3			3

Tabla II.1. (Continuación...)

N°	ID	Nombre del Sitio	Coordenadas (Lat S, Long O)	Altitud (m a.s.l.)	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7	H8	H9	H10	H11	H12	H13	H14	N	
78	LA	Los Alamos, TDF, AR	54° 36', 67° 24'	52															1	1
79	PG	P Garibaldi, TDF, AR	54° 41', 67° 50'	393															1	1
80	CS	C Salvamento, TDF, AR	54° 44', 63° 53'	30															1	1
81	VM	Glaciar Martial, TDF, AR	54° 47', 68° 22'	312															1	1
82	LR	L Roca, TDF, AR	54° 49', 68° 36'	30															1	1
83	BB	Bahía Brown, TDF, AR	54° 52', 67° 26'	80															1	1
84	RC	Río Cambaceres, TDF, AR	54° 53', 67° 12'	32															1	1
85	NAV	Wulaia, Navarino, R-XII, CL	55° 03', 68° 09'	15															1	1
Total					4	26	6	1	2	7	8	41	5	6	10	24	9	47	196	

Las abreviaturas NQN, RNE, CHU, SCR y TDF indican las provincias Argentinas (AR) de Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz, y Tierra del Fuego, respectivamente; R-VII, R-VIII, R-IX, R-X, R-XI, y R-XII indican las regiones administrativas de Chile (CL) del Maule, Bío-Bío, Araucanía, Los Lagos, Aysén y Magallanes, respectivamente.

Tabla II.2. Selección y optimización de protocolos de amplificación por PCR utilizando distintos iniciadores universales de ADN del cloroplasto para detectar polimorfismo intra-específico en *Nothofagus pumilio*.

Iniciador	Temperatura de anclaje (°C)	Tamaño del producto de PCR (pb)	Grado de variación	Referencia
psbB-psbH	57	791	bajo	Hamilton 1999
psbM-trnD	52	367	bajo	Shaw <i>et al.</i> 2007
rpl32-trnL	56	739	moderado	Shaw <i>et al.</i> 2007
rps16	56	680	bajo	Nishizawa & Watano 2000
rps16-trnK	50-60	no amplificó		Shaw <i>et al.</i> 2007
trnC-trnD	50-60	no amplificó		Demesure <i>et al.</i> 1995
trnD-trnT	52	no amplificó		Demesure <i>et al.</i> 1995
trnF-trnVr	58	no amplificó		Dumolin-Lapegue <i>et al.</i> 1997
trnH-psbA	56	445	alto	Hamilton 1999
trnH-trnK	50-60	bandas múltiples		Demesure <i>et al.</i> 1995
trnK _{e1} -trnK _{e2}	50-60	no amplificó		Demesure <i>et al.</i> 1995
trnL _{e1} -trnL _{e2}	57	491	muy bajo	Taberlet <i>et al.</i> 1991
trnL-trnF	54	437	moderado	Taberlet <i>et al.</i> 1991
trnS-trnFm	50-60	no amplificó		Demesure <i>et al.</i> 1995
trnT-trnL	50-60	no amplificó		Taberlet <i>et al.</i> 1991

Tabla II.3. Sitios variables de las secuencias alineadas de ADN del cloroplasto de las regiones *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA* para los 14 haplotipos de *Nothofagus pumilio*.

	Frecuencia (DS)	<i>psbB-psbH</i>				<i>trnL-trnF</i>			<i>trnH-psbA</i>											
		43	150	203	218	922	1097	1120	1279	1292	1293	1365	1378	1379	1385	1386	1387	1433	1457	1501
H1	0.024 (0.012)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₈	(T) ₁₂	A	A	G	T	A	T	A	(A) ₅	-	A	G
H2	0.156 (0.028)	C	T	*	A	(T) ₈	**	(T) ₈	(T) ₁₂	A	A	G	T	A	T	A	(A) ₅	-	A	G
H3	0.036 (0.014)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₉	(T) ₁₂	A	A	G	T	A	T	A	(A) ₅	-	A	G
H4	0.006 (0.006)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₈	(T) ₁₃	A	-	G	T	A	T	A	(A) ₅	-	A	G
H5	0.012 (0.008)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₈	(T) ₁₂	A	A	G	T	A	T	C	(A) ₅	-	A	G
H6	0.042 (0.016)	C	T	*	A	(T) ₈	**	(T) ₈	(T) ₁₃	A	-	G	T	A	T	A	(A) ₅	-	A	G
H7	0.048 (0.017)	C	T	*	A	(T) ₈	**	(T) ₈	(T) ₁₃	A	A	G	T	A	T	A	(A) ₅	-	A	G
H8	0.168 (0.029)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₈	(T) ₁₃	A	A	G	T	A	T	A	(A) ₅	***	A	T
H9	0.030 (0.013)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₈	(T) ₁₃	A	A	G	T	A	A	A	(A) ₆	***	A	T
H10	0.036 (0.014)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₇	(T) ₁₃	A	A	G	A	A	A	A	(A) ₆	***	C	T
H11	0.042 (0.016)	C	T	*	A	(T) ₈	-	(T) ₈	(T) ₁₂	A	A	G	T	A	T	A	(A) ₅	***	A	T
H12	0.108 (0.024)	A	A	-	C	(T) ₉	-	(T) ₁₀	(T) ₁₁	C	A	T	T	C	A	A	(A) ₃	-	A	G
H13	0.048 (0.017)	A	A	-	C	(T) ₉	-	(T) ₉	(T) ₁₁	C	A	T	T	C	A	A	(A) ₂	-	A	G
H14	0.246 (0.033)	A	A	-	C	(T) ₉	-	(T) ₉	(T) ₁₁	C	A	T	T	C	A	A	(A) ₃	-	A	G

* duplicación 15-pb “TTTTTGTGATTTGGC”; ** delección 17-pb “GCCTGAATAAGACTTTG”; *** duplicación 19-pb “GATTAAGAAGAACGTATAT”.

Tabla II.4. Parámetros de diversidad genética de ADN del cloroplasto calculados para las regiones *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA* y para los dos grandes clados (Norte y Sur) identificados para *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente latitudinal.

Región/grupo	P	N	Tamaño del alineamiento (bp)	Rango (bp)	H	CG%	Ps	Ts	Tv	I	h	π
BH	85	196	791	776-791	2	36.9	4	0	3	1	0.4834 (0.0155)	0.0110 (0.0056)
LF	85	196	437	416-437	6	33.9	5	0	0	5	0.7648 (0.0127)	0.0173 (0.0090)
HA	85	196	445	419-445	11	26.5	16	0	8	8	0.7949 (0.0194)	0.0277 (0.0139)
HB-LF-HA	85	196	1673	1611-1673	14	33.4	25	0	11	14	0.8686 (0.0127)	0.0171 (0.0083)
Norte	34	116	1671	1630-1671	11	33.4	12	0	5	7	0.8343 (0.0216)	0.0119 (0.0059)
Sur	51	80	1634	1632-1634	3	33.6	2	0	0	2	0.5473 (0.0483)	0.0004 (0.0003)

Número de poblaciones analizadas (P) y de individuos (N), el tamaño del alineamiento y el rango son indicados en pares de bases (pb), número de haplotipos (H), contenido de CG (%CG), número de sitios polimórficos (Ps), número de transiciones (Ts), número de transversiones (Tv), número de indels (I), diversidad haplotídica (h) y nucleotídica (π). Los errores estándar se muestran entre paréntesis.

Tabla II.5. Resumen del análisis de AMOVA para 85 localidades de *Nothofagus pumilio* muestreadas. El valor de *P* fue calculado mediante un análisis de permutaciones con 999 réplicas y resultó significativo ($P < 0,001$) para todos los parámetros calculados.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza Estimada	%
Entre-Poblaciones	53	2657,344	50,139	14,258	98%
Dentro-Poblaciones	136	43,867	0,323	0,323	2%
Total	189	2701,211		14,580	100%

Tabla II.6. Resumen del análisis de AMOVA jerárquico entre las dos regiones (norte y sur) de *Nothofagus pumilio* muestreadas. El valor de *P* fue calculado mediante un análisis de permutaciones con 999 réplicas y resultó significativo ($P < 0,001$) para todos los parámetros calculados.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza Estimada	%
Entre Regiones	1	1603,814	1603,814	17,053	74%
Entre Poblaciones dentro de Regiones	52	1053,529	20,260	5,758	25%
Entre Poblaciones	136	43,867	0,323	0,323	1%
Total	189	2701,211		23,133	100%

Tabla II.7. Valores de F_{CT} entre grupos ($K = 2$ a $K = 14$) calculados por el análisis de SAMOVA para *Nothofagus pumilio*. Se muestran los valores de P basados en 100 simulaciones.

K	F_{CT}	P	Grupos
2	0,741	<0,001	VIL-PQN; RTI-NAV
3	0,921	<0,001	VIL-TRO; RCH-PQN; RTI-NAV
4	0,967	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; RCH-PQN; RTI-NAV
5	0,972	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; RCH-PQN; RTI-NAV; CBA
6	0,974	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-NAV; CBA; RCH
7	0,977	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-NAV; CHP-CBA; RCH;
8	0,980	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; COI-NAV; CHP-CBA; RCH; PHL-BMH; RTI-PTZ
9	0,982	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; COI-NAV; CHP; CBA; RCH; PHL-BMH; RTI-PTZ
10	0,984	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-PTZ; COI-NAV; CHP; CBA; RCH; PHL-BMH; CHB-PLF
11	0,986	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-PTZ; CAN-NAV; CHP; CBA; RCH; PHL-BMH; CHB-PLF; COI-COC
12	0,988	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-PTZ; CAN-NAV; CHP; CBA; RCH; PHL-PHC; ICA-BMH; CHB-PLF; COI-COC
13	0,989	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-PTZ; CAN-NAV; PIC; CHP; CBA; RCH; PHL-PHC; ICA-BMH; CHB-PLF; COI-COC
14	0,990	<0,001	VIL-NHB; EPU-TRO; MCH-PQN; RTI-PTZ; CAN-NAV; PIC; CHP; CBA; RCH; PHL-PHC; ICA-BMH; CHB-PLF; COI-COC; CHL-CLN

Tabla II.8. Test de contingencia y probabilidades chi-cuadrado para la estructuración geográfica de los clados identificados en la Fig. II.7 en el análisis filogeográfico de clados anidados utilizando el programa ANeCa (Panchal *et al.* 2007). Los clados con una probabilidad menor a 0,05 sugieren una asociación geográfica significativa de los haplotipos o sub-clados. *P* es la probabilidad de que el estadístico chi-cuadrado generado al azar sea mayor o igual al chi-cuadrado observado. Los clados sin estructura genética (ej. 1-3, 1-5, 2-3) fueron excluidos. ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$

Clado (haplotipos o sub-clados involucrados)	Chi-cuadrado
<i>1-1</i> (PHL, ICA)	15,000***
<i>1-2</i> (NHB, PIC, VIL, EPU)	82,500***
<i>1-4</i> (COY, LHY, CAN)	134,000***
<i>2-1</i> (1-1/1-2)	42,415***
<i>2-2</i> (1-3/1-7)	11,000**
<i>2-5</i> (1-6/1-9)	35,000***
<i>3-1</i> (2-2/2-5)	41,419***
<i>3-3</i> (2-1/2-4)	54,000***
<i>Total</i> (3-1/3-2/3-3)	329,518***

Tabla II.9. Cadena de inferencia del análisis filogeográfico de clados anidados (Fig. II.7) utilizando el programa ANeCa (Panchal *et al.* 2007). Solamente se analizaron los clados que mostraron una estructura geográfica significativa en el análisis de contingencia (Tabla II.8).

Clado	Cadena de inferencia	Proceso inferido
<i>1-1</i>	1-19 NO	Fragmentación alopátrica
<i>1-2</i>	1-2-3-5-6*-7 YES	Flujo génico/dispersión restringidos pero con dispersión a larga distancia.
<i>1-4</i>	1-19 NO	Fragmentación alopátrica
<i>2-1</i>	1-2-3-4 NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
<i>2-2</i>	1-19 NO	Fragmentación alopátrica
<i>2-5</i>	1-19-20-2 IO	Resultado inconcluso
<i>3-1</i>	1-2-3-4 NO	Flujo génico restringido con aislamiento por distancia
<i>3-3</i>	1-2 IO	Resultado inconcluso
<i>Total</i>	1-19 NO	Fragmentación alopátrica

Figura II.1. Electroferograma de dos secuencias del espaciador intergénico *trnL-trnF* del ADNc de *Nothofagus pumilio* obtenidas con un secuenciador ABI-PRISM 3100-avant. Las barras sobre las bases indican la calidad de la secuencia (Azul: buena, Amarilla: regular, Roja: mala). Las flechas indican un segmento de 17 pb en la secuencia b) que esta ausente en la secuencia a).

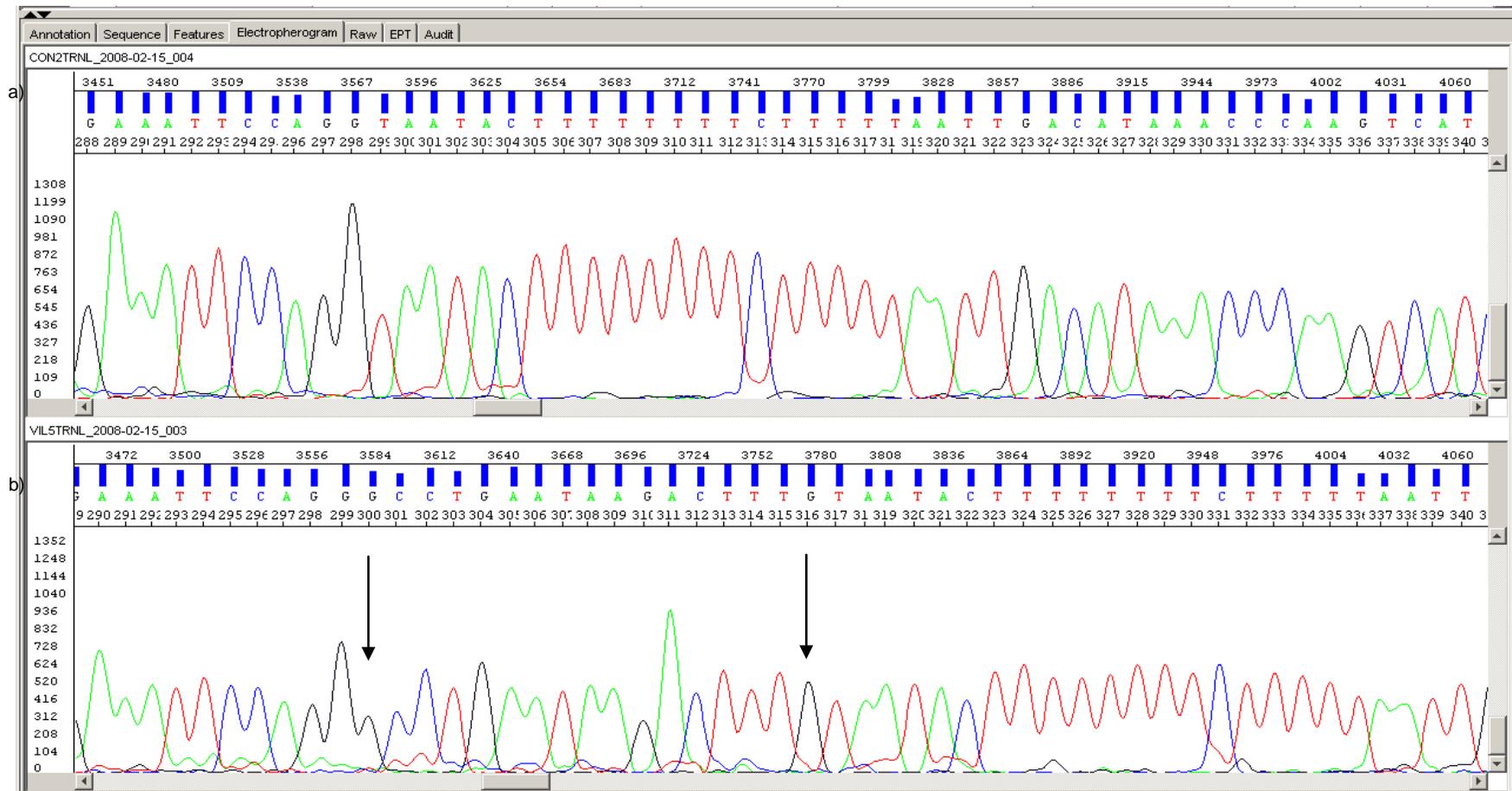


Figura II.2. Mapa de Sudamérica Austral mostrando la ubicación de los 85 sitios muestreados de *Nothofagus pumilio* y la distribución de los haplotipos de ADNc para las regiones concatenadas *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA*. También se muestra la subdivisión de los Andes Patagónicos en Septentrionales y Australes, las paleo-cuencas, macizos y rocas pre-Cenozoicas presentes durante el Terciario en Patagonia. Las flechas negras indican las rutas hipotéticas de dispersión. La ubicación de las poblaciones se corresponden con los de la Tabla II.1.

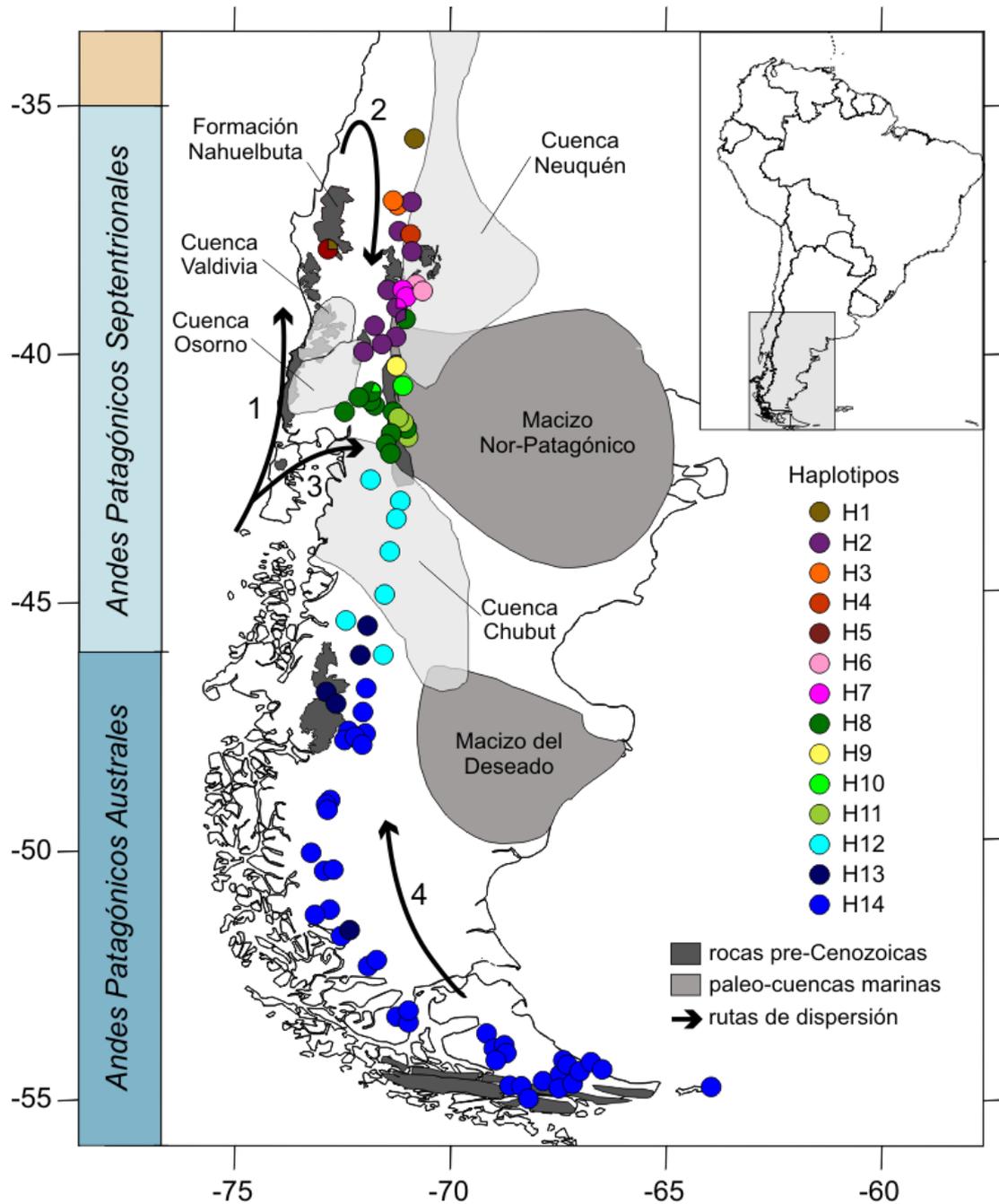


Figura II.3. Análisis de distribución no correspondida de pares de los 14 haplotipos de ADN del cloroplasto de *Nothofagus pumilio* para todos los sitios (a) y para los sitios del Norte (b). La línea continua indica las frecuencias esperadas de las diferencias entre pares de secuencias bajo un modelo de crecimiento/declinación poblacional. La línea punteada muestra las frecuencias observadas de las diferencias entre pares de secuencias entre haplotipos.

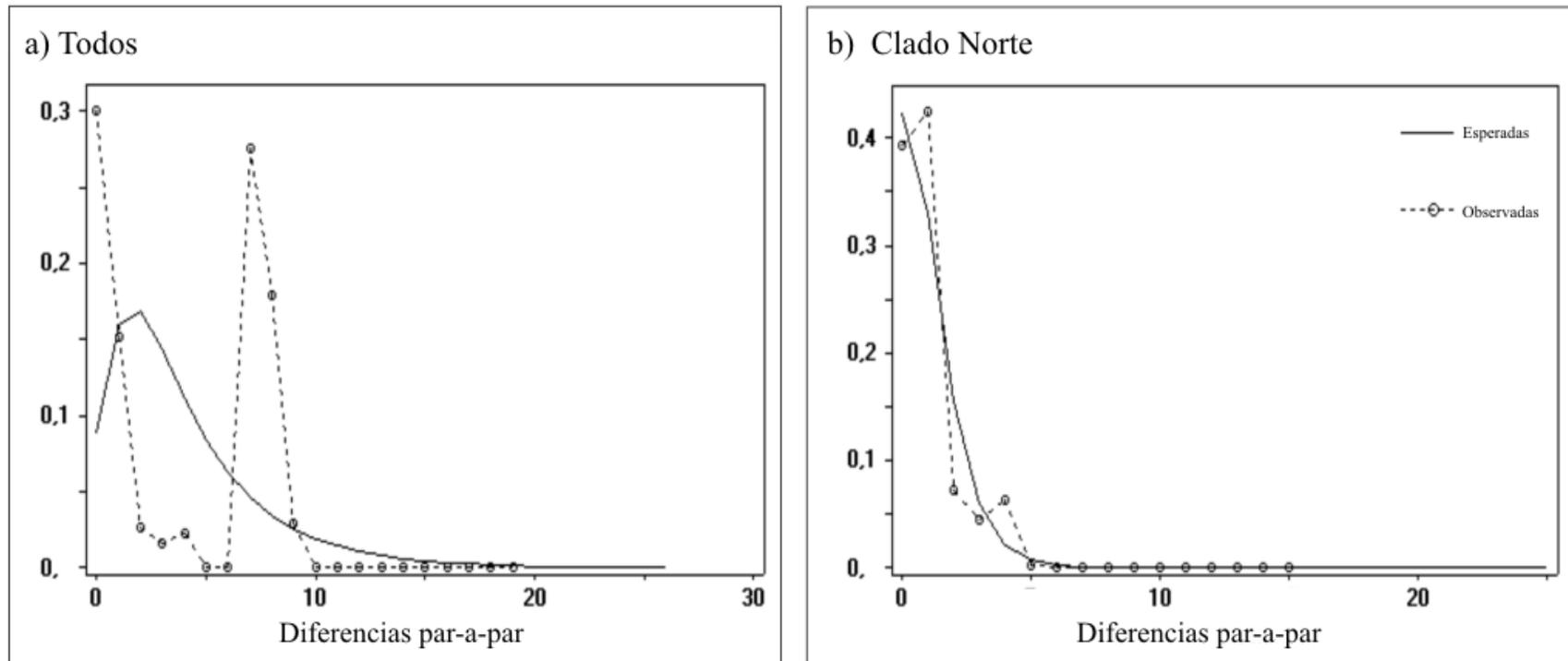


Figura II.4. Árboles filogenéticos mostrando las relaciones entre los 14 haplotipos de ADNc para las regiones concatenadas *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA* de *Nothofagus pumilio*: a) máxima parsimonia (MP), b) máxima verosimilitud (MV) y c) inferencia Bayesiana (IB). Los números sobre las ramas indican los valores de bootstrap para MP y MV, y de probabilidades posteriores para IB. Se muestran los cuatro grupos mencionados en el texto.

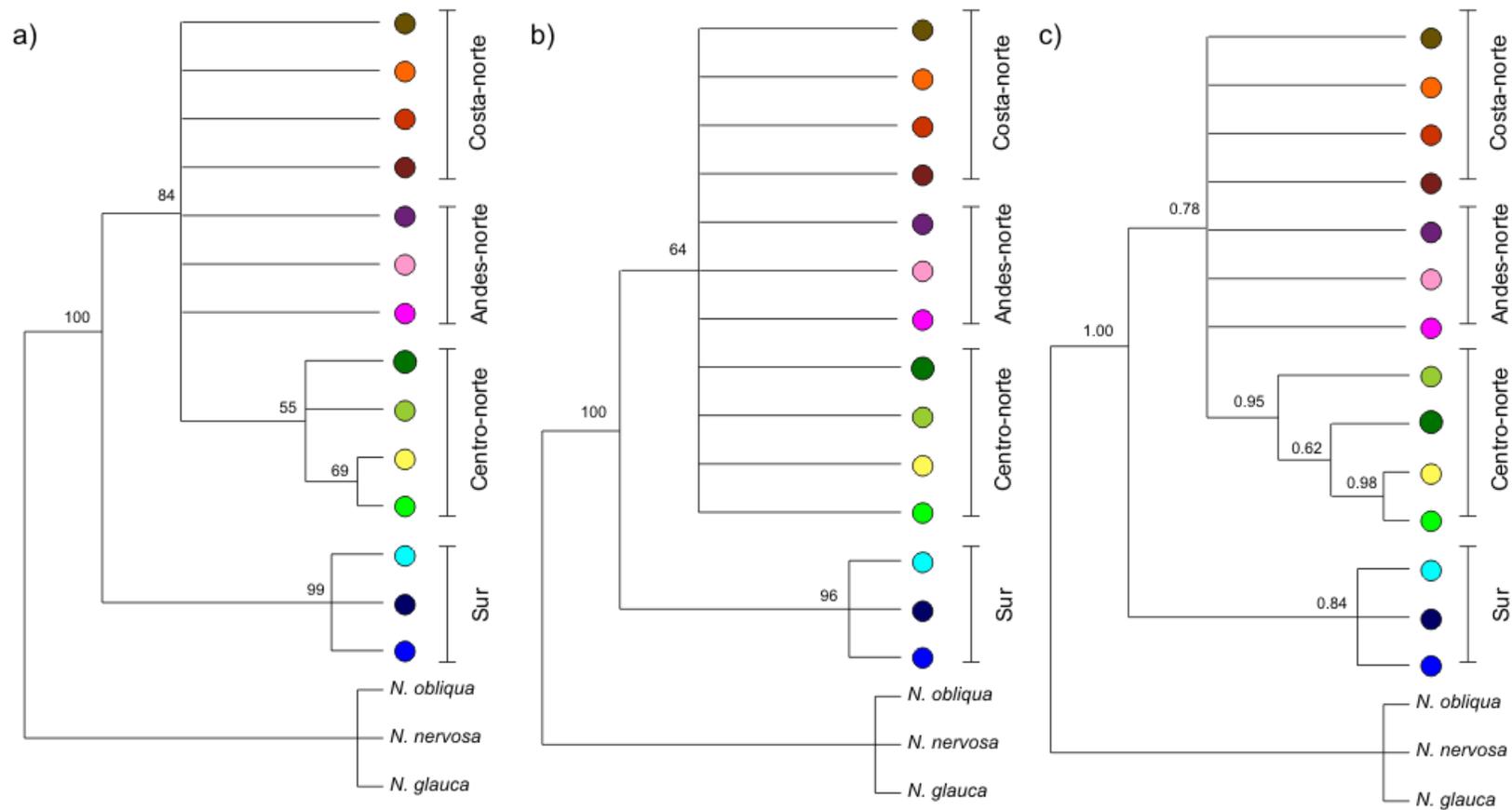


Figura II.5. Redes de haplotipos mostrando las conexiones entre los 14 haplotipos de ADN del cloroplasto identificados en *Nothofagus pumilio* para las regiones *psbB-psbH*, *trnL-trnF* y *trnH-psbA* obtenidas con los métodos de median-joining (a) y parsimonia estadística (b). El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo correspondiente. Los números indican los sitios donde ocurrieron los cambios en las secuencias de ADN.

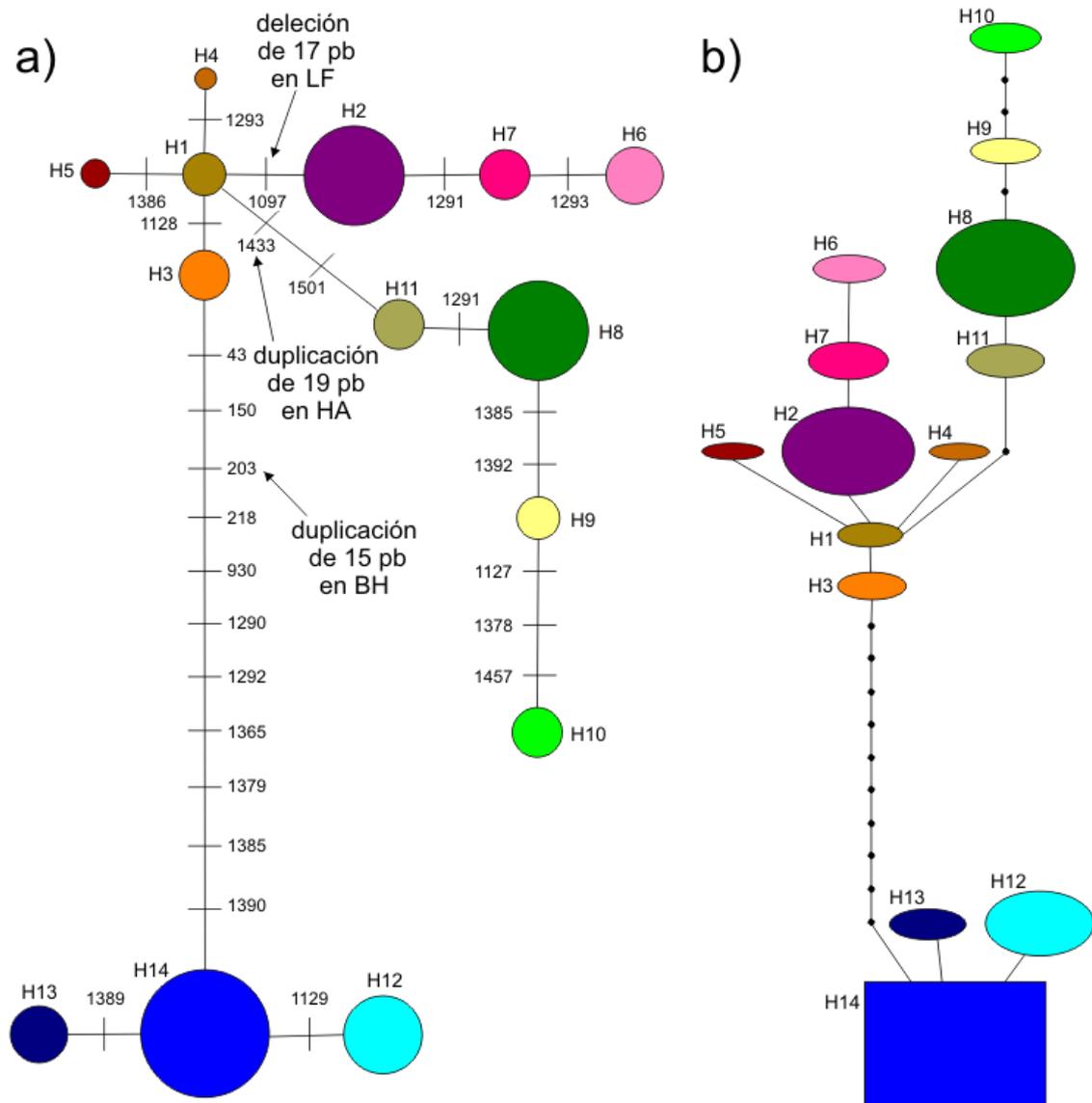


Figura II.6. Valores de F_{CT} calculados para K grupos de *Nothofagus pumilio* obtenidos por el análisis de SAMOVA.

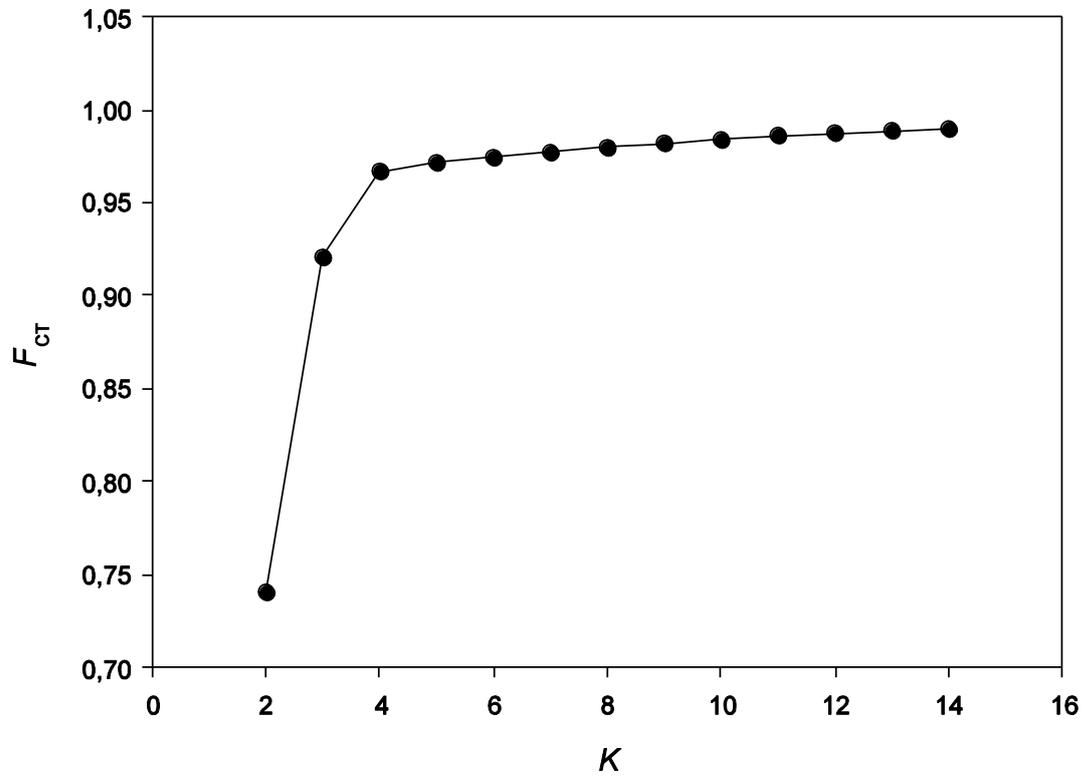


Figura II.7. Gráfico de superficie tridimensional de las distancias genéticas de ADNc (eje Z) entre sitios a lo largo del paisaje estudiado (ejes X e Y) para *Nothofagus pumilio*. Los números sobre los picos indican la latitud (grados Sur).

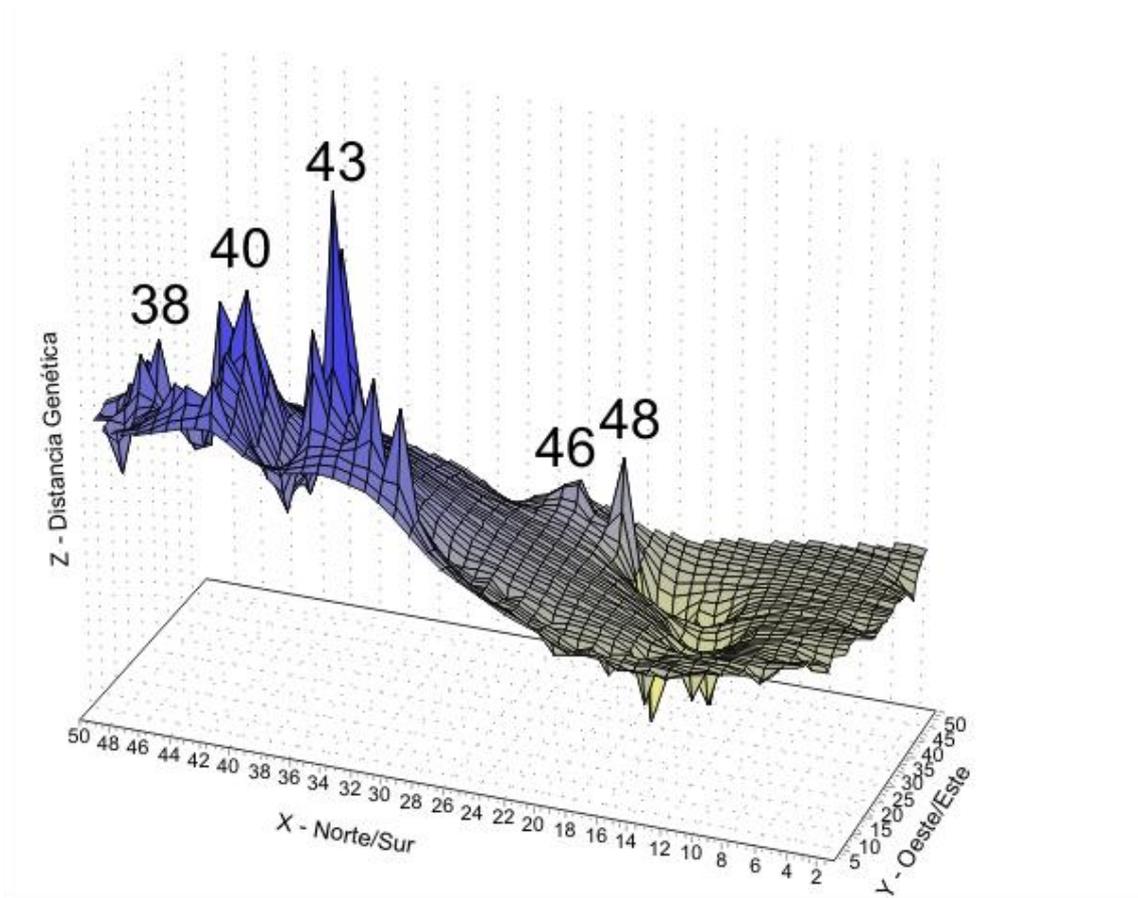
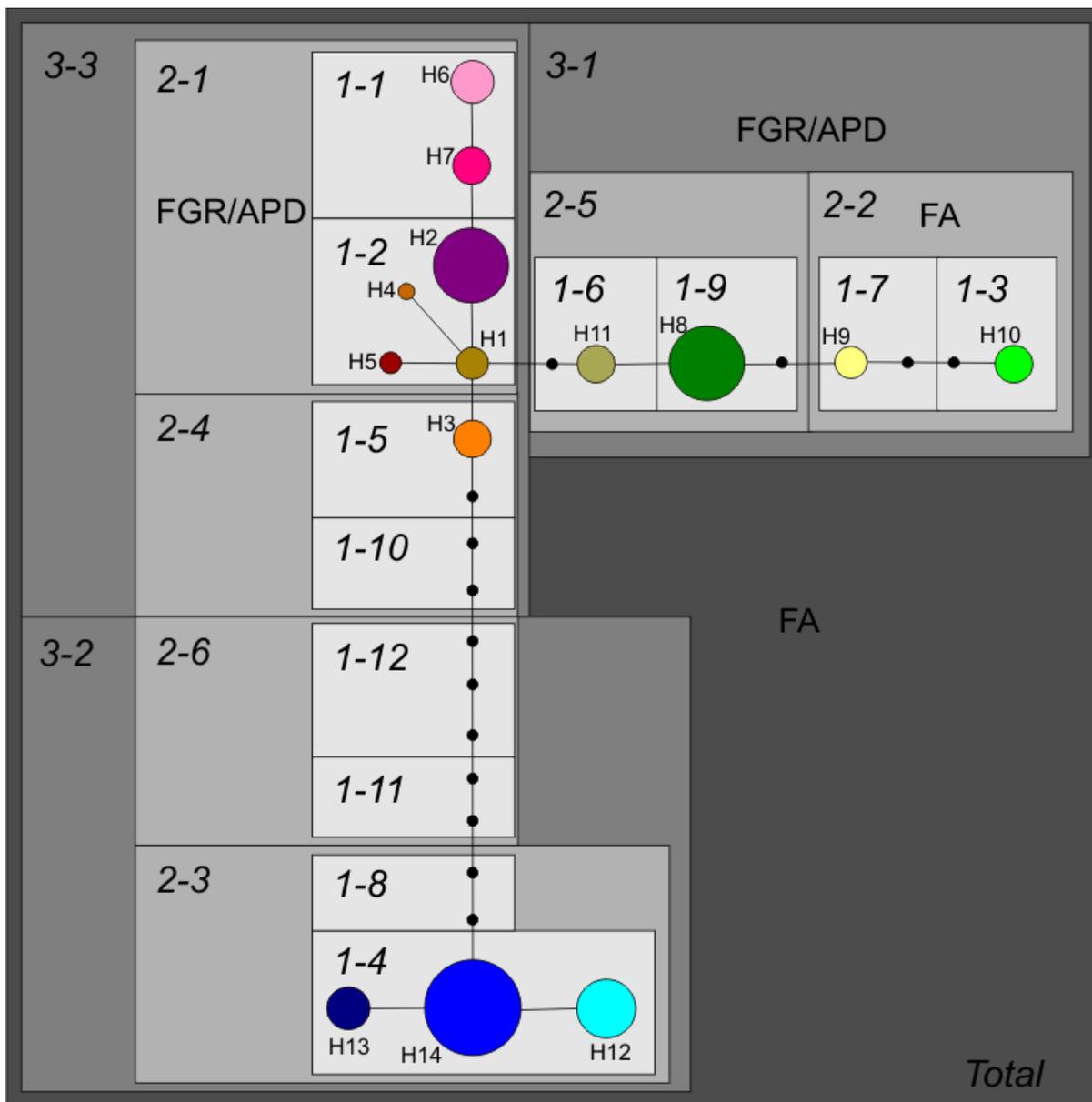


Figura II.8. Cladograma anidado de los haplotipos de ADN del cloroplasto (H1-H14) encontrados para *Nothofagus pumilio*. Cada conexión representa un paso mutacional, los puntos negros representan los haplotipos intermedios no muestreados. Los rectángulos de diferentes colores y los números indican los distintos niveles de agrupación de los haplotipos/clados.



3. Capítulo III: “Variación genética isoenzimática en *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente latitudinal muestra los efectos de las glaciaciones en Patagonia”



3.1. Resumen

Nothofagus pumilio es la especie dominante en ambientes montañosos de Patagonia. En este capítulo se testeó la hipótesis que, a escala regional, esta especie tolerante al frío y ampliamente distribuida habría sobrevivido y respondido localmente a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno. Se utilizaron polimorfismos isoenzimáticos de ocho loci para analizar los patrones de variación latitudinal mediante parámetros de diversidad y divergencia genética en 41 poblaciones de *N. pumilio*. Los resultados muestran que las poblaciones más australes presentan niveles similares de variación genética que las poblaciones del norte; mientras que las poblaciones de latitudes intermedias presentan los mayores niveles de diversidad genética. El incremento de la distancia genética en poblaciones de latitudes intermedias puede deberse a un contacto secundario entre dos acervos genéticos ya diferenciados previamente al Pleistoceno. Esta hipótesis es también soportada por la evidencia filogeográfica evaluada mediante el ADNc. A escala regional, los patrones genéticos reflejan niveles similares de diversidad genética en distintas latitudes que sugieren una dispersión local desde múltiples áreas libres de hielo, ubicadas incluso a altas latitudes. La menor divergencia entre poblaciones del norte indica un elevado flujo génico entre ellas mientras que las del sur probablemente han consistido de poblaciones relativamente grandes y panmícticas significativamente aisladas entre sí. La mayor endogamia encontrada en las poblaciones del norte provee evidencia de fragmentación poblacional debido al ascenso altitudinal bajo debido a oscilaciones climáticas. Como resultado, la selección natural en las poblaciones del norte habría tenido mayor oportunidad de purgar variantes genéticas perjudiciales pudiendo ser más resilientes a los disturbios, mientras que las poblaciones australes serían más propensas a sufrir de las modificaciones en las tasas de flujo génico y tamaño poblacional.

3.2. Introducción

La distribución espacial de la variación genética dentro y entre las poblaciones está determinada por los procesos históricos y contemporáneos de deriva y flujo génico (Cruzan & Templeton 2000). Por esto, el grado y la distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales puede utilizarse como evidencia de eventos ocurridos en el pasado, dado que dejarán una huella en las características de las poblaciones afectadas (Wheeler & Guries 1982). Además, el acervo genético de las especies puede ser resultado de presiones diferenciales de selección en ambientes bajo condiciones contrastantes o que varían a lo largo de gradientes (Linhart & Grant 1996). En particular, la biota de Sudamérica austral incluyendo *Nothofagus*, es el resultado de la separación y dispersión de linajes durante el Cretácico tardío y posterior deterioro del clima y enfriamiento ocurrido a mediados del Terciario y el Cuaternario. Por lo tanto, los elementos de origen Gondwanico que habitan las áreas montañosas en regiones templadas de Sudamérica probablemente sean el resultado de procesos tectónicos y climáticos complejos que han afectado sus acervos genéticos a lo largo del tiempo geológico.

El clima tropical-subtropical que prevalecía en la región Patagónica desde el Cretácico tardío se fue enfriando progresivamente a partir del límite Eoceno/Oligoceno, y durante el Mioceno tardío- Plioceno temprano, hace aproximadamente 7 y 5 Ma, ocurrió la más antigua glaciación conocida en Patagonia (Rabassa *et al.* 2005). Además, a principios del Cuaternario hace 1,8 millones de años se establecieron las oscilaciones glaciario-interglaciario que incrementaron la estacionalidad y aridez en latitudes australes intermedias (Markgraff *et al.* 1995). Los regímenes glaciares en regiones templadas de

Sudamérica a largo plazo difirieron latitudinalmente. Mientras que en el norte han sido dominantes los glaciares Alpinos erosivos que llevaron a una supresión o destrucción de la topografía, en el sur los glaciares de base fría con poca eficiencia erosiva y/o la presencia de grandes masas de hielo de movimiento lento resultaron en una glaciación no-destructiva de la topografía (Thomson *et al.* 2007). Los diagramas de polen que cubren el último período glacial-interglacial (25.000 años antes del presente) sugieren que existieron considerables áreas libres de hielo a lo largo de los Andes australes donde las especies habrían sobrevivido localmente durante las glaciaciones. Como resultado, las especies que habitaban los bosques fueron capaces de dispersarse desde un gran número de localidades micro-climatológicamente favorables (Markgraf *et al.* 1995) incluso en sitios tan australes como Tierra del Fuego (Heusser 1989, Markgraf 1993).

En regiones templadas, las áreas que permanecieron libres de hielo durante las últimas glaciaciones se espera que contengan mayores niveles de diversidad genética que las áreas que fueron recolonizadas después del retroceso de los hielos (Hewitt 1996, 2000, Comps *et al.* 2001). Estas diferencias podrían haber surgido como resultado de cuellos de botella genéticos producidos por eventos de migración a larga distancia, selección durante el establecimiento de las poblaciones, y al contacto secundario de distintas rutas migratorias de linajes divergentes desde refugios separados (Comps *et al.* 2001, Petit *et al.* 2003). Por lo tanto se pueden utilizar marcadores moleculares para la reconstrucción biogeográfica. En Sudamérica austral se han realizado numerosos estudios genéticos utilizando marcadores isoenzimáticos para analizar la historia de la vegetación. En ellos se presenta por primera vez la hipótesis de refugios múltiples en áreas libres de hielo (Premoli 1998, Premoli *et al.* 2000b) algunos de los cuales estuvieron ubicados en ambos lados de los Andes (Premoli 1997, Premoli *et al.* 2000b, 2007) y en altas latitudes, *i. e.* áreas de mayor cobertura de hielo, para especies

tolerantes al frío, *i. e.* microtérmicas (Premoli 1998, Premoli *et al.* 2002, Souto & Premoli 2007). Otros estudios confirmaron estas hipótesis utilizando isoenzimas y/o marcadores de ADNc-RFLPs en especies de *Nothofagus* (Marchelli & Gallo 2006, Azpilicueta *et al.* 2009, Pastorino *et al.* 2009) y mediante marcadores RAPDs en distintos taxa arbóreos (Allnutt *et al.* 1999, 2003, Bekessy *et al.* 2002). Esta evidencia junto con información del registro fósil sugiere un nuevo escenario para las plantas del Hemisferio Sur que refleja una historia evolutiva pre-pleistocénica (Premoli 1997, Moore 2000). Sin embargo, estudios moleculares realizados mediante el uso de marcadores conservados de PCR-RFLP de ADN del cloroplasto revelaron la existencia de áreas genéticamente diversas las cuales fueron interpretadas como evidencia de refugios múltiples en Patagonia (Marchelli *et al.* 1998, Marchelli & Gallo 2006, Azpilicueta *et al.* 2009, Pastorino *et al.* 2009). Por el contrario, un estudio de ADN del cloroplasto en base a la secuenciación de tres regiones no codificantes para las cinco especies pertenecientes al subgénero *Nothofagus* indicó que los patrones de variación de polimorfismos concordaban geográficamente (Acosta & Premoli 2010). Esta evidencia sugiere que han ocurrido fenómenos de captura del cloroplasto debido a repetidos eventos de hibridación/introgresión, lo que sugiere un pasado histórico pre-Pleistocénico común para las especies pertenecientes al subgénero *Nothofagus*. Si bien la hibridación en el subgénero *Nothofagus* bajo condiciones naturales en sitios particulares ha sido confirmada utilizando marcadores genéticos y morfológicos (Donoso & Atienza 1983, 1984, Premoli 1996, Stecconi *et al.* 2004, Quiroga *et al.* 2005), las especies poseen distintos requerimientos ecológicos y ocurren como especies claramente identificables, aún cuando crecen en simpatría. Además, un estudio de datación mediante el uso del reloj molecular para las cinco especies del subgénero *Nothofagus* ha mostrado una estructuración geográfica significativa con secuencias de ADNc que data del Paleógeno sugiriendo que las especies actuales consisten de linajes

muy antiguos (Premoli *et al.*, en revisión). Por ende, los patrones del ADNc al menos en especies del subgénero *Nothofagus* podrían estar reflejando eventos evolutivos anteriores al Pleistoceno.

3.3. Objetivos particulares

El objetivo de este capítulo es evaluar los niveles y la distribución de los polimorfismos genéticos en *N. pumilio* como resultado de los patrones de flujo génico contemporáneo ocurridos probablemente durante el Cuaternario a lo largo del gradiente latitudinal mediante el uso de marcadores nucleares isoenzimáticos.

3.4. Hipótesis general e hipótesis particulares

La hipótesis general y las hipótesis particulares planteadas en este capítulo fueron las siguientes:

Hipótesis general:

H2) El acervo genético de especies tolerantes al frío (microtérminos) con amplios rangos de distribución como *Nothofagus pumilio* refleja los procesos que ocurrieron durante el Neógeno a escala espacial regional en Sudamérica austral.

Hipótesis particulares:

H2.1) Las respuestas relativamente recientes a las variaciones climáticas ocurridas desde el Plioceno de esta especie microtémica son el resultado de una dispersión local desde numerosas aéreas libres de hielo a lo largo de su rango de distribución durante los períodos de enfriamiento.

P2.1) Se espera encontrar zonas de alta diversidad genética o con variantes genéticas únicas en múltiples áreas a lo largo de la distribución de la especie.

H2.2) La acción glaciaria tuvo efectos diferenciales sobre las especies a lo largo de la latitud.

P2.2.1) Se espera encontrar que patrones regionales de distribución de la variación genética estén estructurados geográficamente.

P2.2.2) Se espera encontrar que en zonas templado-cálidas hacia el norte hayan existido numerosas áreas para la supervivencia local en pequeñas poblaciones, resultando en menor diversidad genética y mayor flujo génico entre ellas.

P2.2.3) Los patrones de glaciaciones no-destructivas en el sur habrían favorecido la persistencia de *N. pumilio* incluso en áreas cercanas al límite del hielo.

3.5. Materiales y Métodos

Colección de muestras: Se colectaron muestras de follaje fresco de 30 individuos seleccionados al azar por población (Tabla III.1) en un total de 41 sitios ubicados a lo largo del rango de distribución latitudinal de la especie (Fig. III.1) que fueron mantenidas en heladeras portátiles hasta su posterior procesamiento en el laboratorio. Los protocolos de extracción de enzimas, electroforesis y tinción isoenzimática utilizados fueron los descritos anteriormente por Premoli (1996, 1998, 2003). Se analizaron seis sistemas enzimáticos que codificaron para 8 loci putativos que se resolvieron de la siguiente manera: alcohol deshidrogenasa (*Adh1*), aldolasa (*Ald1*), isocítrico deshidrogenasa (*Idh1*, *Idh2*), y malato deshidrogenasa (*Mdh1*, *Mdh2*, *Mdh3*) en el buffer morfolina-citrato de Ranker *et al.* (1989), mientras que la enzima fosfoglucoisomerasa (*Pgi2*) fue analizada en el sistema B modificado de Conkle *et al.* (1982) (Tabla III.2). Se rebanó horizontalmente la porción anódica de cada gel sobre las que se vertieron las tinciones suspendidas en agarosa 1% p/v según Mitton *et al.* (1979) y Soltis *et al.* (1983). Para obtener los genotipos para cada sistema enzimático, se numeraron los loci y los alelos consecutivamente desde el más anódico hasta el más catódico, de manera que el locus y/o alelo más anódico fue designado con el número más bajo (Fig. III.2). Los loci fueron considerados putativos, ya que no se llevaron a cabo análisis genéticos cuantitativos en individuos segregantes de esta especie. Sin embargo, los patrones de bandas observados fueron los típicos encontrados en los mismos sistemas enzimáticos estudiados en otras especies y fueron consistentes con los patrones de bandeo esperados para aquellas especies en las cuales sí se han llevado a cabo análisis formales (Murphy *et al.* 1996).

Análisis de datos: Se calcularon las frecuencias alélicas para todos los loci analizados en cada una de las poblaciones utilizando el programa POPGENE v1.32 (Yeh *et al.* 1999). La heterogeneidad en las frecuencias alélicas entre las poblaciones fue evaluada mediante test de chi-cuadrado según Workman & Niswander (1970). Para distinguir las poblaciones que poseían una composición alélica inusual se indicó la presencia de alelos únicos (aquellos presentes en una única población, A_{UP}). Las poblaciones fueron caracterizadas en base a distintos parámetros de diversidad genética (ver Apéndice 2). Estos fueron el número promedio de alelos por locus (A), número de alelos por locus polimórfico (A_P), número efectivo de alelos (A_E), número de alelos totales (A_T), porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto* (P), y heterocigosis observada y esperada bajo la condición de equilibrio Hardy Weinmebrg (H_O y H_E , respectivamente) utilizando el programa POPGENE v1.32 (Yeh *et al.* 1999). Además, se calculó la riqueza alélica total (A_R) utilizando el método de rarefacción (ver Apéndice 2) sugerido por El Mousadik & Petit (1996) y siguiendo a Comps *et al.* (2001) con el programa CONTRIB v1.02 (Petit *et al.* 1998). Dado que el tamaño muestral más pequeño consistió de 20 individuos por sitio (40 copias génicas), comparamos la riqueza alélica después de una rarefacción a un tamaño muestral común de $g = 40$ (g es el número de copias génicas). Las poblaciones con menos de 20 individuos no fueron utilizadas en los cálculos de riqueza alélica. La riqueza alélica puede ser más útil que otros parámetros (como la diversidad genética) para identificar procesos históricos como cuellos de botella o introgresión poblacional (Comps *et al.* 2001, y referencias), ya que la deriva genética afectará más rápidamente a los alelos raros que a los alelos más frecuentes (Nei *et al.* 1975) resultando en una pérdida de alelos y posteriormente en pérdida de heterocigosis (Nei *et al.* 1975, Ellstrand & Ellam 1993, Comps *et al.* 2001). Para evaluar la ocurrencia de cuellos de botella genéticos se realizó una regresión entre la riqueza alélica (A_R) y la heterocigosis esperada (H_E)

(Comps *et al.* 2001, Quiroga & Premoli 2010). Además, Para investigar la relación que existe entre la latitud y los distintos parámetros de diversidad genética intra-poblacional se realizó un análisis de regresión múltiple utilizando el programa STATISTICA v.7.0 StatSoft, Inc. (2004). El índice de fijación ($F = 1 - [H_O/H_E]$) de Wright (1931) fue calculado para cada sitio, y las desviaciones al equilibrio Hardy-Weinberg fueron testeadas mediante test de chi-cuadrado para cada locus polimórfico. Además, para estimar la tasa de dispersión de *N. pumilio* mediante polen/semillas se realizaron estimaciones de la relación entre flujo polínico/flujo de semillas siguiendo el método propuesto por Ennos (1994), en el cual la relación flujo polínico/flujo seminal = $(A - 2C) / C$; siendo $A = (1 / \Phi_{ST \text{ biparental}} - 1)$, y $C = (1 / \Phi_{ST \text{ materno}} - 1)$. Éste método compara el grado de diferenciación genética entre poblaciones (Φ_{ST}) calculado para marcadores con distinto tipo de herencia. En este trabajo se utilizaron marcadores nucleares de herencia biparental (isoenzimas) y de herencia materna (ADNc). En base a los resultados obtenidos, se estimó la tasa de colonización postglacial (metros/año) que habría sido capaz de recorrer *N. pumilio* desde potenciales refugios ubicados al norte de su distribución latitudinal hacia las áreas más australes en condiciones óptimas de regeneración y establecimiento. Se consideró que el UMG ocurrió hace aproximadamente 20.000 años, y que la distancia a recorrer fue de aproximadamente 1.000 km. Además, se consideró una distancia de dispersión de semillas de 100 m desde el árbol materno, un tiempo generacional de 50 años y ciclos de producción abundante de semillas (semillazón) cada cinco años.

Para analizar posibles respuestas diferenciales con la latitud a las glaciaciones y asumiendo que los grupos arrojados por el análisis filogenético determinan que las poblaciones de *N. pumilio* a distintas latitudes tuvieron historias evolutivas diferentes, las poblaciones fueron clasificadas *a priori* en dos grupos. Estos correspondieron a los

dos grandes clados encontrados en el análisis filogenético realizado en base al análisis de secuencias de regiones no codificantes de ADN del cloroplasto (ver Fig. II.3). El grupo Norte incluyó a todas las poblaciones ubicadas entre los 36 y 42 ° de latitud S, mientras que el grupo Sur consistió en las poblaciones situadas entre los 42 y los 55° S. Las características genéticas fueron comparadas entre grupos mediante test no paramétricos de Mann-Whitney debido a que los datos no ajustaban una distribución normal.

El análisis jerárquico de la estructura genética en las poblaciones fue realizado mediante el cálculo de los estadísticos F (ver Apéndice 2) con el programa FSTAT (Goudet 2001) el cual computa estimaciones no sesgadas para el F_{ST} que mide la divergencia inter-poblacional entre todos los pares de poblaciones (Wright 1965). El grado de significancia de las estimaciones fue analizado mediante los intervalos de confianza del 95 y 99% que fueron calculados por permutaciones sobre todos los loci según Weir & Cockerham (1984). La diversidad genética total (H_T), la diversidad media intra-poblacional (H_S) y la diferenciación inter-poblacional (G_{ST}) fueron calculadas de acuerdo a Nei (1973).

Análisis a escala de paisaje: se realizaron análisis a escala de paisaje para comparar los patrones de la distribución de la variación genética mediante análisis de isoenzimas y de ADNc. Los patrones de estructuración genética isoenzimática en *N. pumilio* fueron investigados mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando la distancia genética entre individuos de los distintos sitios con el programa GenAlEx versión 6.2 (Peakall & Smouse 2006). Además, para analizar la estructuración genética a diferentes escalas geográficas se realizó un análisis de AMOVA jerárquico: entre regiones, que fueron delimitadas según los dos clados principales arrojados por el

análisis filogenético (norte, entre 36-42° S y sur, entre 42-55° S), entre poblaciones dentro de cada región y dentro de las poblaciones. La significancia de los valores globales y jerárquicos así como de los pares de Φ_{ST} fue calculada mediante permutaciones con 999 réplicas. Por otro lado, se realizó un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) utilizando el programa SAMOVA v. 1.0 (<http://web.unife.it/progetti/genetica/Isabelle/samova.html>, Dupanloup *et al.* 2002). Este análisis es utilizado para detectar posibles barreras biogeográficas que impiden el flujo génico entre las poblaciones muestreadas. Maximiza el valor de F_{CT} (variabilidad entre grupos) agrupando las poblaciones más similares genéticamente que estén geográficamente adyacentes. El análisis se basó en 100 simulaciones de pasos de anidamiento e indicadores de máxima diferenciación genética (valores de F_{CT}) fijando el número de grupos desde $K = 2$ hasta $K = 41$ (siendo 41 el número total de sitios muestreados). Por último, se utilizó el programa Alleles in Space (Miller 2005) para realizar gráficos de superficie tridimensionales que representan los patrones de distribución de las distancias genéticas (eje de coordenadas Z) a lo largo del total del paisaje analizado en el estudio (ejes de coordenadas X e Y). El análisis se repitió utilizando distintos tamaños de grilla (20 x 20, 50 x 50, 100 x 100) y utilizando distintos valores de peso ($a = 0,5$ hasta $a = 2$) para evitar interpretaciones erróneas de los datos.

3.6. Resultados

Frecuencias alélicas y distribución de alelos raros: Se determinó el genotipo de un total de 1183 individuos pertenecientes a 41 poblaciones distribuidas a lo largo del rango de distribución latitudinal de *N. pumilio* (Fig. III.1). Siete de los ocho loci analizados resultaron polimórficos en al menos una de las poblaciones, incluyendo:

Adh1, *Ald1*, *Idh1*, *Idh2*, *Mdh2*, *Mdh3*, y *Pgi2*. Las poblaciones analizadas resultaron altamente heterogéneas en sus frecuencias alélicas, las cuáles difirieron significativamente ($P < 0.05$) entre las poblaciones de ambos grupos para cinco de los seis test posibles en el grupo Norte, y para todos los siete loci en el grupo Sur (Tabla III.3). Hubieron dos alelos únicos (*Idh1-3* y *Idh1-4*) que sólo estaban presentes en una población del Sur en Tierra del Fuego (población LA). Dos alelos (*Adh1-1* y *Idh2-1*) son compartidos únicamente por dos poblaciones del grupo Sur. Otros dos alelos de baja frecuencia (*Adh1-3* y *Mdh2-3*) estuvieron presentes en una única población del Norte (BMH) y dos poblaciones del Sur (ARE y MAL), mientras que al alelo *Ald1-1* se lo encontró ampliamente distribuido en las poblaciones del Norte, pero estaba presente sólo en dos poblaciones del sur (TOL y DES). Por el contrario, tres alelos (*Idh2-3*, *Idh2-4*, y *Mdh2-1*) se encontraban ampliamente distribuidos en las poblaciones del Sur, pero sólo estaban presentes en una única población del Norte (EPU). Llamativamente, el alelo *Pgi2-3* es compartido por solo seis poblaciones localizadas hacia el este: cuatro pertenecen al grupo Sur (RIV, CTS, TN y SP) y dos al grupo Norte (CHP y CHB).

Diversidad genética y endogamia: los patrones de diversidad genética fueron heterogéneos a lo largo del gradiente latitudinal. Las poblaciones del Sur presentaron mayor diversidad genética que las poblaciones del Norte para todos los parámetros de diversidad genética calculados (Tabla III.4). Sin embargo, estas diferencias solamente resultaron significativas para los parámetros A_R y H_O (test de Mann-Whitney: $Z_{(11,30)} = -2,31$; $P = 0,019$ y $Z_{(11,30)} = -2,25$; $P = 0.023$ respectivamente). Los análisis de regresión múltiple dieron como resultado un incremento significativo ($P < 0,01$) del número efectivo de alelos (A_E , $r^2 = 0,46$), riqueza alélica (A_R , $r^2 = 0,61$) y heterocigosis observada (H_O , $r^2 = 0,40$ y H_E $r^2 = 0,43$) con la latitud (Tabla III.5; Fig. III.3). El análisis para inferir si las poblaciones analizadas han sufrido cuellos de botella arrojó una

relación significativa ($r^2 = 0,25$; $F_{(1,39)} = 13,157$; $P < 0,001$) entre la riqueza alélica y la heterocigosis esperada. Sin embargo, algunas poblaciones del sur mostraron un exeso de alelos para una dada heterocigosis, mientras que en la mayoría de las poblaciones del norte la riqueza alélica se encontraba por debajo de la media, indicando cuellos de botella en dichas poblaciones (Fig. III.4). En promedio los índices de fijación (F) arrojaron estimaciones significativas positivas (Tabla III.6). La desviación del equilibrio Hardy-Weinberg fue rechazado en un 40% de los 108 test realizados. Las poblaciones del Sur fueron las que presentaron menor proporción de loci con índices de fijación no-significativos en relación a las poblaciones del Norte (65 y 58%, respectivamente), lo que indica un exceso de heterocigotas para los loci analizados en esos sitios. Las estimaciones de los niveles de dispersión del polen y semillas de *N. pumilio* resultaron en que el flujo génico por polen es 100 veces mayor que el flujo génico por semillas (flujo polínico/ flujo seminal = 96). Además, la tasa de migración por semillas en condiciones óptimas de regeneración y establecimiento resultó en 0,4 m por año, mientras que la migración anual vía polen fue de 40 m. En base a estos resultados, y considerando que el UMG ocurrió hace aproximadamente 20.000 años, *N. pumilio* habría sido capaz de recorrer como máximo unos 800 km (vía polen) siendo la dispersión por semillas 100 veces menor.

Estructura genética poblacional: el análisis jerárquico de la estructuración poblacional mediante los estadísticos F (Tabla III.7) dio como resultado en promedio una divergencia inter-poblacional significativa y positiva ($F_{ST} \pm DS = 0,20 \pm 0,03$; intervalo de confianza (IC) del 95% = 0,138 – 0,232). También se encontraron valores significativos de F_{ST} dentro de cada grupo. Las poblaciones del Sur alcanzaron valores promedio significativamente mayores ($F_{ST} = 0,217 \pm 0,02$; IC 95% = 0,166 – 0,243) que las poblaciones del Norte ($F_{ST} = 0,059 \pm 0,04$; IC 95% = 0,019 – 0,159) lo que fue

confirmado por las diferencias significativas encontradas para los pares de F_{ST} entre las poblaciones de los distintos grupos (Mann-Whitney: $Z = -3,83$; $P < 0,001$). La diversidad genética total medida con los estadísticos de Nei (Tabla III.7) fue baja ($H_T = 0,089$), que en su mayoría se encontraba distribuida dentro de las poblaciones ($H_S = 0,072$). Las poblaciones del Sur presentaron una mayor diversidad genética total ($H_T = 0,103$) que las poblaciones del Norte ($H_T = 0,047$) (N-S: $t_7 = 0,46$; $P = 0,662$; test t pareado por locus).

Análisis a escala de Paisaje: los resultados de AMOVA para los análisis isoenzimáticos muestran una estructuración genética significativa (Tabla III.8). El valor global de Φ_{ST} fue para isoenzimas de 0,338 ($P = 0,001$) y los valores de los pares de Φ_{ST} variaron entre 0,000 y 0,733, siendo el 82 % de esos valores significativamente diferentes de cero. El análisis de AMOVA jerárquico fue significativo ($P = 0,001$) para todos los niveles analizados (Tabla III.8). Sin embargo, la estructuración genética entre las regiones norte y sur ($\Phi_{RT} = 0,021$) fue un orden de magnitud menor que el encontrado para los otros niveles jerárquicos, los cuales representan la subdivisión entre poblaciones dentro de regiones ($\Phi_{SR} = 0,331$) y entre poblaciones ($\Phi_{ST} = 0,346$). Los estadísticos F arrojaron resultados similares de una diferenciación poblacional de aproximadamente 20 – 30 % ($F_{ST} = 0,197$; $\Phi_{ST} = 0,346$). El análisis de SAMOVA no pudo identificar grupos de máxima diferenciación isoenzimática entre los sitios de *N. pumilio*. Probablemente las mayores tasas de flujo génico isoenzimático (herencia biparental, polinización por viento) en comparación con el ADNc (herencia materna, dispersión restringida de semillas) en *N. pumilio* (ver discusión general, Capítulo VI) han desdibujado la potencial estructura genética a ser detectada mediante análisis de SAMOVA. Este tipo de análisis requiere que las tasas de flujo génico dentro de los

grupos sea al menos 1000 veces mayor que la tasa de flujo génico entre grupos (Dupanloup *et al.* 2002), y esto no se cumple en el caso de las isoenzimas en *N. pumilio*.

Los resultados de los análisis de interpolación de las distancias genéticas en el paisaje mediante gráficos de superficie muestran una zona de mayor diferenciación genética a latitudes intermedias (42 – 43° S) de la distribución de *N. pumilio* indicando una probable barrera al flujo génico (Fig. III.5). Además se encontraron otras discontinuidades genéticas a los 46 y 50° S, respectivamente (Fig. III.5). Además, el gráfico de superficies muestra que las distancias genéticas mediadas por marcadores isoenzimáticos fueron mayores hacia el centro de la distribución, y decrecían gradualmente hacia los extremos norte y sur. Se obtuvieron gráficos similares utilizando distintos tamaños de grilla y distintos valores de peso.

3.7. Discusión

Nothofagus pumilio presenta una baja diversidad genética estructurada latitudinalmente. La marcada heterogeneidad en las frecuencias alélicas evidencia una divergencia a largo plazo que permitió la acumulación de mutaciones entre poblaciones distantes latitudinalmente. Los parámetros de diversidad genética intra-poblacional aumentan hacia las latitudes australes más frías, inclusive la riqueza alélica resultó ser mayor que la heterocigosis esperada, la cual se hubiera esperado que se viera afectada por cuellos de botella genéticos en áreas de mayor influencia glaciaria. En latitudes templado-cálidas de la Patagonia norte, la presencia de glaciares alpinos erosivos (Thompson *et al.* 2007) probablemente haya limitado la supervivencia de esta especie de montaña durante los períodos glaciarios. Sin embargo, *N. pumilio* habría podido

persistir como bosques aislados en pequeñas poblaciones. Además, la competencia con otras especies leñosas habitando zonas bajas, incluyendo otros *Nothofagus* mesotérmicos, podría haber restringido la migración local de *N. pumilio* durante las edades de hielo. Por lo tanto, las poblaciones relativamente empobrecidas genéticamente del norte sufrieron los efectos de la deriva genética debido a disminución de los tamaños poblacionales y migraciones altitudinales.

La mayor diversidad genética en términos de riqueza alélica y heterocigosis en el Sur sugiere que las poblaciones de *N. pumilio* habrían persistido localmente a lo largo del tiempo. Dada la limitada dispersión de semillas de *N. pumilio*, es poco probable pensar que la elevada diversidad genética encontrada en el Sur podría ser el resultado de una migración a larga distancia después del último máximo glacial (UMG) en el Pleistoceno a partir de poblaciones fuente ubicadas más al norte. La estimación de la tasa de migración postglaciaria basada en el flujo polínico resultó en que *N. pumilio* habría avanzado solamente unos 800 km desde el UMG, lo cual es mucho menor al rango ocupado actualmente por la especie. Por lo tanto los datos obtenidos para *N. pumilio* no apoyarían la hipótesis de que las poblaciones australes se habrían extinguido por la gran extensión de las superficies cubiertas de hielo y que estas áreas habrían sido recolonizadas posteriormente a partir de poblaciones ubicadas más al norte. Por el contrario los datos presentados sugieren que las poblaciones de *N. pumilio* habrían sobrevivido a los períodos glaciarios en múltiples áreas libres de hielo ubicados en distintos puntos a lo largo del rango de distribución. Sin embargo, es probable que el uso de marcadores moleculares hipervariables en estudios a escala local permita una reconstrucción más precisa y ubicación de refugios de *N. pumilio* en Patagonia. De la misma manera, alta diversidad genética fue encontrada en poblaciones australes de coníferas endémicas de los bosques Magallánicos como la Cupresaceae *Pilgerodendron*

uviferum (Premoli *et al.* 2002) y la Podocarpaceae *Podocarpus nubigena* (Quiroga 2009) lo que fue interpretado como evidencia de persistencia local en múltiples refugios, algunos de los cuales se habrían ubicado hacia los límites sur de distribución de estas especies (Premoli *et al.* 2000b).

Los análisis de interpolación de las distancias genéticas en el paisaje evidenciaron la ausencia de barreras geográficas entre las poblaciones del norte. Esto podría estar sugiriendo que se ha mantenido un elevado flujo génico entre dichas poblaciones o que las barreras son tan recientes que no han podido ser detectadas por los patrones isoenzimáticos (Latta 2006). Por el contrario, se encontraron barreras hacia el sur a los 43, 46 y 50° S. En latitudes australes, se cree que la actividad glaciaria tuvo poca eficiencia erosiva, e incluso se sugiere la presencia de suelo congelado (permafrost) libre de hielo (Thomson *et al.* 2007). Además, el registro polínico muestra la presencia continua de polen de *Nothofagus* en latitudes australes, entre 50 y 51° S, en áreas cercanas a los límites del hielo (Villa-Martínez & Moreno 2007, Mancini 2009). Por esta causa, podemos especular que las poblaciones del sur probablemente han consistido de poblaciones relativamente grandes y panmícticas, que han permanecido aisladas unas de otras a lo largo del tiempo las cuales habrían entrado en contacto más recientemente. Un modelo del nicho ecológico de la distribución de *N. pumilio* durante el UMG muestra la existencia de áreas libres de hielo en el Este que son apropiadas para la ocurrencia de la especie hacia el norte y al sur de los 43° S (A.C. Premoli & T. Kitzberger, en revisión) lo cual confirmaría que se trata de un área de contacto secundario. Además, la discontinuidad genética encontrada a los 43° S podría estar reflejando la estructura genética antigua evidenciada mediante ADNc (ver Capítulo II, Fig. II.7). Por el contrario, en un estudio realizado en otra especie ampliamente distribuida del subgénero *Nothofagus* las áreas de alta diversidad genética en áreas

cercanas a los 42° S han sido interpretadas como refugios glaciares (Pastorino *et al.* 2009). Por otro lado, los picos de divergencia genética encontrados a los 46 y a los 50° S podrían estar relacionados con las características topográficas de estas áreas. Los campos de hielo actuales se encuentran entre los 46 y los 50 grados, presentando una discontinuidad entre el campo de hielo norte y el campo de hielo sur aproximadamente a los 48° S. Por lo tanto, los picos de divergencia genética mostrados en el análisis de paisaje (AIS) estarían indicando zonas de sutura entre poblaciones que han permanecido aisladas temporalmente y que en el presente representan áreas boscosas continuas. En consecuencia, se podría postular la existencia de al menos tres grandes áreas de refugio ubicadas al norte de los 46° S, cerca de los 48° S y al sur de los 50° S.

El acervo genético empobrecido de *N. pumilio* es el resultado de una persistencia a largo plazo en ambientes de altura y a altas latitudes y que ha sufrido los efectos de la deriva genética y el aislamiento a lo largo de su historia evolutiva (Premoli 1998, 2003). Sin embargo, *N. pumilio* ha mostrado la capacidad de adaptarse a los gradientes de altura y por lo tanto ha podido acompañar las fluctuaciones climáticas. Por lo tanto, las diferencias genéticas medidas en caracteres cuantitativos en el jardín común (Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007) probablemente son reflejo de adaptaciones relativamente recientes a los cambios climáticos ocurridos en los Andes australes desde el Mioceno que involucraron el desarrollo de gradientes abruptos de temperatura y precipitación con la altitud y longitud, respectivamente (Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006). En el Capítulo IV de esta tesis se realizó un estudio a escala local sobre los efectos que tuvieron los distintos modos de regeneración a lo largo del gradiente altitudinal sobre la estructura genética fina de *N. pumilio*, mediante el uso de marcadores nucleares isoenzimáticos e hipervariables de microsatélites.

3.8. Tablas y Figuras

Tabla III.1. Características geográficas de los 41 sitios muestreados de *Nothofagus pumilio* en Patagonia y número total de individuos analizados.

<i>No.</i>	<i>Sitio</i>	<i>ID</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Altitud</i>	<i>N</i>
1	Lagunas de Epulafquen, NQN	EPU	36° 51' S, 71° 04' W	1663	30
2	Paso Icalma, NQN	ICA	38° 48' S, 71° 16' W	1298	31
3	Volcán Batea Mahuida, NQN	BMH	38° 50' S, 71° 13' W	1500	31
4	Lago Moquehue, NQN	MOQ	39° 00' S, 71° 22' W	1275	31
5	Lago Rucachoroi, NQN	RCH	39° 14' S, 71° 13' W	1380	32
6	Paso Tromen, NQN	TRO	39° 35' S, 71° 25' W	1125	32
7	Cerro Chapelco, NQN	CHP	40° 11' S, 71° 18' W	1375	33
8	Paso Cordoba, NQN	CBA	40° 35' S, 71° 09' W	1237	31
9	Cerro Challhuaco, RNE	CHB	41° 15' S, 71° 16' W	1325	30
10	Cerro Perito Moreno, RNE	PMO	41° 47' S, 71° 33' W	990	30
11	Cerro Piltriquitrón, RNE	PQN	41° 58' S, 71° 28' W	1250	30
12	Cerro La Hoya, CHU	LHY	42° 50' S, 71° 15' W	1275	30
13	Lago Vintter, CHU	VIN	43° 58' S, 71° 31' W	950	29
14	El Portezuelo, SCR	PTZ	46° 04' S, 71° 41' W	1001	30
15	Arroyo Canalele, SCR	CAN	46° 55' S, 71° 51' W	1087	30
16	Monte San Lorenzo, SCR	SLZ	47° 45' S, 72° 21' W	1100	24
17	Cerro León, SCR	LEO	47° 47' S, 72° 07' W	890	30
18	Lago Azara, SCR	AZA	47° 50' S, 72° 16' W	900	19
19	Rivera, SCR	RIV	47° 56' S, 72° 22' W	850	13
20	Lago Burmeister, SCR	BUR	47° 57' S, 72° 07' W	910	35
21	Lago del Desierto, SCR	DES	49° 04' S, 72° 53' W	457	29
22	Chaltén Seco, SCR	CTS	49° 12' S, 72° 57' W	454	30
23	El Chaltén, SCR	CTN	49° 16' S, 72° 57' W	687	11
24	Lago Onelli, SCR	ONI	50° 06' S, 73° 18' W	196	21
25	Lago Grey, RXII	GRE	51° 08' S, 73° 07' W	60	23
26	Monte Alto, RXII	MAL	52° 05' S, 71° 51' W	292	30
27	Punta Arenas, RXII	ARE	53° 17' S, 71° 03' W	162	27

Tabla III.1. (Continuación...)

<i>No.</i>	<i>Sitio</i>	<i>ID</i>	<i>Coordenadas</i>	<i>Altitud</i>	<i>N</i>
28	Paso Radman, TDF	PR	54° 02' S, 68° 45' W	188	30
29	Lago Blanco, TDF	LB	54° 03' S, 68° 57' W	123	30
30	Sector Vicuña, TDF	SV	54° 19' S, 68° 48' W	426	30
31	San Pablo, TDF	SP	54° 20' S, 66° 40' W	84	30
32	Tolhuin Norte, TDF	TN	54° 22' S, 67° 14' W	152	30
33	Tolhuin, TDF	TO	54° 24' S, 67° 14' W	70	31
34	Estancia María Luisa, TDF	ML	54° 29' S, 66° 27' W	39	30
35	Estancia La Correntina, TDF	LC	54° 31' S, 66° 56' W	33	30
36	Estancia Los Alamos, TDF	LA	54° 36' S, 67° 23' W	52	30
37	Paso Garibaldi, TDF	PG	54° 41' S, 67° 49' W	393	32
38	Glaciar Martial, TDF	VM	54° 47' S, 68° 22' W	312	32
39	Lago Roca, TDF	LR	54° 48' S, 68° 35' W	30	32
40	Bahía Brown, TDF	BB	54° 52' S, 67° 26' W	80	30
41	Río Cambaceres, TDF	RC	54° 53' S, 67° 12' W	32	32

Las abreviaturas NQN, RNE, CHU, SCR y TDF corresponden a las provincias Argentinas de Neuquén, Río Negro, Chubut, Santa Cruz, y Tierra del Fuego, respectivamente; RXII indica la Región de Magallanes en Chile.

Tabla III.2. Sistemas buffer, condiciones de electroforesis y enzimas reveladas en *Nothofagus pumilio*. P y M representan el número de loci putativos polimórficos y monomórficos, respectivamente.

Sistema	Buffer		Corriente (mA)	Tiempo de corrida (h)	Enzimas	P	M
	Gel	Electrodo					
MC	Ac. Cítrico -	Ac. Cítrico -	20	6	<i>Adh</i>	1	0
	Morfolina,	Morfolina,			<i>Ald</i>	1	0
	pH~8	pH~8			<i>Idh</i>	2	0
					<i>Mdh</i>	2	1
CB	Tris - Ac. Cítrico, pH~8,8	Ac. Bórico - NaOH, pH~8	35	5	<i>Pgi</i>	1	0

Tabla III.3. Frecuencias alélicas para todos los loci analizados de *Nothofagus pumilio* en 11 sitios del Norte (a) y 30 sitios del Sur (b) en Patagonia. * indica diferencias significativas ($P < 0,05$, test de chi-cuadrado) en las frecuencias alélicas para los loci polimórficos.

a) Sitio	<i>Adh1</i>			<i>Ald1</i>			<i>Idh1</i>			<i>Idh2</i>				<i>Mdh1</i>		<i>Mdh2</i>			<i>Mdh3</i>		<i>Pgi2</i>		
	1	2	3	1	2	3	2	3	4	1	2	3	4	2	1	2	3	2	3	1	2	3	
EPU	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,667	0,183	0,150	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
ICA	0,000	1,000	0,000	0,040	0,960	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,984	0,016	0,081	0,919	0,000	
BMH	0,000	1,000	0,000	0,161	0,839	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,032	0,952	0,016	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	
MOQ	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,903	0,097	0,081	0,919	0,000	
RCH	0,000	1,000	0,000	0,000	0,859	0,141	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,984	0,016	0,141	0,859	0,000	
TRO	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,875	0,125	0,063	0,938	0,000	
CHP	0,000	1,000	0,000	0,030	0,924	0,045	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,909	0,091	0,083	0,883	0,033	
CBA	0,000	1,000	0,000	0,065	0,935	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,952	0,048	0,065	0,935	0,000	
CHB	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,967	0,033	0,033	0,950	0,017	
PMO	0,000	1,000	0,000	0,033	0,967	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,883	0,117	0,050	0,950	0,000	
PQN	0,000	0,967	0,033	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,967	0,033	0,000	1,000	0,000	
X²	20,794*			106,088*			213,597*				30,133		27,055*		38,902*								

Tabla III.3. (Continuación ...)

b) Sitio	<i>Adh1</i>			<i>Ald1</i>			<i>Idh1</i>			<i>Idh2</i>				<i>Mdh1</i>	<i>Mdh2</i>			<i>Mdh3</i>		<i>Pgi2</i>		
	1	2	3	1	2	3	2	3	4	1	2	3	4	2	1	2	3	2	3	1	2	3
LHY	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,633	0,267	0,100	1,000	0,117	0,883	0,000	0,933	0,067	0,000	1,000	0,000
VIN	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,862	0,069	0,069	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,017	0,983	0,000
PTZ	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,983	0,017	0,000	1,000	0,350	0,650	0,000	0,617	0,383	0,000	1,000	0,000
CAN	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,983	0,017	0,000	1,000	0,483	0,517	0,000	0,567	0,433	0,000	1,000	0,000
SLZ	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,021	0,979	0,000
LEO	0,000	1,000	0,000	0,000	0,712	0,288	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000
AZA	0,000	1,000	0,000	0,211	0,789	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,026	0,974	0,000
RIV	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,962	0,038
BUR	0,000	1,000	0,000	0,000	0,875	0,125	1,000	0,000	0,000	0,000	0,803	0,121	0,076	1,000	0,300	0,700	0,000	0,971	0,029	0,014	0,986	0,000
DES	0,172	0,828	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,138	0,724	0,138	0,000	1,000	0,448	0,552	0,000	0,655	0,345	0,034	0,966	0,000
CTS	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,333	0,667	0,000	0,519	0,481	0,409	0,273	0,318
CTN	0,000	0,955	0,045	0,000	0,750	0,250	1,000	0,000	0,000	0,091	0,591	0,318	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,682	0,318	0,045	0,955	0,000
ONI	0,000	0,833	0,167	0,000	0,706	0,294	1,000	0,000	0,000	0,190	0,810	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,405	0,595	0,000	1,000	0,000
GRE	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,196	0,196	0,609	0,000	1,000	0,130	0,870	0,000	1,000	0,000	0,022	0,978	0,000
MAL	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,217	0,667	0,117	0,000	1,000	0,083	0,750	0,167	1,000	0,000	0,050	0,950	0,000
ARE	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,037	0,833	0,130	0,000	1,000	0,019	0,852	0,130	1,000	0,000	0,037	0,963	0,000

Tabla III.3. (Continuación ...)

b) Sitio	<i>Adh1</i>			<i>Ald1</i>			<i>Idh1</i>			<i>Idh2</i>				<i>Mdh1</i>		<i>Mdh2</i>			<i>Mdh3</i>		<i>Pgi2</i>		
	1	2	3	1	2	3	2	3	4	1	2	3	4	2	1	2	3	2	3	1	2	3	
PR	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	0,917	0,017	0,067	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,117	0,883	0,000	
LB	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,100	0,900	0,000	
SV	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,117	0,883	0,000	
SP	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,067	0,917	0,017	
TN	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,167	0,817	0,017	
TO	0,067	0,933	0,000	0,000	0,983	0,017	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,017	0,983	0,000	0,933	0,067	0,016	0,984	0,000	
ML	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,017	0,983	0,000	1,000	0,000	0,100	0,900	0,000	
LC	0,000	1,000	0,000	0,000	0,983	0,017	1,000	0,000	0,000	0,000	0,867	0,050	0,083	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,083	0,917	0,000	
LA	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,817	0,050	0,133	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,050	0,950	0,000	
PG	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,875	0,125	0,063	0,938	0,000	
VM	0,000	1,000	0,000	0,047	0,953	0,000	1,000	0,000	0,000	0,078	0,922	0,000	0,000	1,000	0,031	0,969	0,000	0,922	0,078	0,078	0,922	0,000	
LR	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,048	0,952	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,790	0,210	0,094	0,906	0,000	
BB	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,017	0,983	0,000	0,000	1,000	0,033	0,967	0,000	0,983	0,017	0,050	0,950	0,000	
RC	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,000	1,000	0,000	0,000	0,000	1,000	0,000	0,000	1,000	0,109	0,891	0,000	0,906	0,094	0,067	0,933	0,000	
X²	379,171*			379,617*			190,758*			722,977*				618,462*		407,694*			587,828*				

Tabla III.4. Parámetros de diversidad genética calculados para los dos grupos (Norte y Sur) analizados de *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente latitudinal en Patagonia.

Grupo	P	N	A	A_P	A_e	A_T	A_R^*	P	H_O^*	H_E
Norte	11	342	1,35 (0,11)	1,40 (0,12)	1,06 (0,03)	10,8 (0,9)	0,43 (0,14)	29,6 (8,4)	0,032 (0,015)	0,044 (0,017)
Sur	30	841	1,41 (0,19)	1,46 (0,22)	1,13 (0,12)	10,2 (1,5)	1,06 (0,74)	34,2 (17,0)	0,055 (0,033)	0,080 (0,061)
Población	41	28,9	1,40 (0,18)	1,45 (0,20)	1,11 (0,11)	11,1 (1,4)	0,89 (0,70)	32,9 (15,3)	0,049 (0,031)	0,070 (0,055)
Especie	41	1183	2,75 (0,89)	3	1,11 (0,08)	22	2	87,5	0,052 (0,044)	0,091 (0,070)

P , número de sitios/grupo; N , número de individuos/sitio; A , número promedio de alelos por locus; A_P , número de alelos por locus polimórfico; A_e , número efectivo de alelos; A_R , riqueza alélica corregida con el método de rarefacción; P , proporción de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto*; H_O y H_E , heterocigosis observada y esperada, respectivamente. Las desviaciones estándar se muestran entre paréntesis.* $P < 0.05$, test de Mann-Whitney.

Tabla III.5. Regresiones múltiples entre la latitud y los distintos parámetros de diversidad genética calculados para *Nothofagus pumilio*. Solo se muestran las regresiones significativas ($P < 0,05$).

Variable dependiente	r^2	P	β	t	P
A_E	0,46	< 0,001	-0,54	-3,66	< 0,001
A_R	0,42	< 0,001	-0,55	-3,53	< 0,001
H_O	0,40	< 0,001	-0,61	-3,88	0,001
H_E	0,43	< 0,001	-0,55	-3,56	0,001

A_E , número de alelos efectivos; A_R , riqueza alélica;
 H_O , heterocigosis observada; H_E , heterocigosis esperada.

Tabla III.6. Índices de fijación (F) para los grupos (Norte y Sur) de sitios de *Nothofagus pumilio* en Sudamérica austral. Se muestran los valores promedio de F (\pm DS), el número de test significativos positivos (+), significativos negativos (-) y no significativos (*n.s.*), y el número total de test realizados para cada locus. Los porcentajes por locus se muestran entre paréntesis.

Grupo	F	+	-	<i>n.s.</i>	Total
Norte	0,255 (0,194)	11 (42%)	0 (0%)	15 (58%)	26
Sur	0,170 (0,230)	29 (35%)	0 (0%)	53 (65%)	82
Total	0,193 (0,222)	40 (37%)	0 (0%)	68 (63%)	108

Tabla III.7. Endogamia total (F_{IT}), dentro (F_{IS}) y entre (F_{ST}) los sitios de *Nothofagus pumilio* para cada grupo y el total de los sitios muestreados en Patagonia. Se presentan los valores promedio (DS) sobre todos los loci y los intervalos de confianza (IC) del 95 y 99%, calculados según Weir & Cockerham (1984) mediante el programa FSTAT. En negrita se indican los valores promedio de los estadísticos F que resultaron significativamente distintos de cero. La diversidad genética se analiza mediante la diversidad total (H_T), dentro (H_S) y entre (G_{ST}) los sitios.

Grupo	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	H_T	H_S	G_{ST}
Norte	0,322 (0,113)	0,280 (0,120)	0,059 (0,036)	0,047	0,044	0,055
<i>IC 95%</i>	<i>0,155-0,527</i>	<i>0,089-0,483</i>	<i>0,019-0,159</i>			
<i>IC 99%</i>	<i>0,114-0,622</i>	<i>0,060-0,605</i>	<i>0,014-0,213</i>			
Sur	0,454 (0,066)	0,303 (0,077)	0,217 (0,021)	0,103	0,083	0,200
<i>IC 95%</i>	<i>0,334-0,570</i>	<i>0,178-0,453</i>	<i>0,166-0,243</i>			
<i>IC 99%</i>	<i>0,301-0,611</i>	<i>0,149-0,508</i>	<i>0,142-0,251</i>			
Total	0,435 (0,060)	0,296 (0,068)	0,197 (0,027)	0,089	0,072	0,189
<i>IC 95%</i>	<i>0,340-0,559</i>	<i>0,197-0,449</i>	<i>0,139-0,232</i>			
<i>IC 99%</i>	<i>0,314-0,611</i>	<i>0,173-0,516</i>	<i>0,114-0,237</i>			

Tabla III.8. Resumen del análisis de AMOVA general y jerárquico para los 41 sitios y para las dos regiones (norte y sur) identificadas por el análisis filogenético de *Nothofagus pumilio*. El valor de *P* fue calculado mediante un análisis de permutaciones con 999 réplicas y resultó significativo ($P < 0,01$) para todos los índices calculados.

Fuente	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrado Medio	Varianza Estimada	%
Entre-Poblaciones	40	593,774	14,844	0,482	34%
Dentro-Poblaciones	1142	1080,416	0,946	0,946	66%
Total	1182	1674,190		1,428	100%
Entre Regiones	1	30,300	30,300	0,031	2
Entre Poblaciones dentro de Regiones	39	563,475	14,448	0,469	32
Entre Poblaciones	1142	1080,416	0,946	0,946	65
Total	1182	1674,190		1,446	100

Figura III.1. Ubicación geográfica de los sitios de *Nothofagus pumilio* en los bosques templados de Sudamérica. Para los nombres de los sitios ver Tabla III.1. La línea roja indica la reconstrucción del último máximo glaciario (UMG) según Hollin & Schilling (1981).

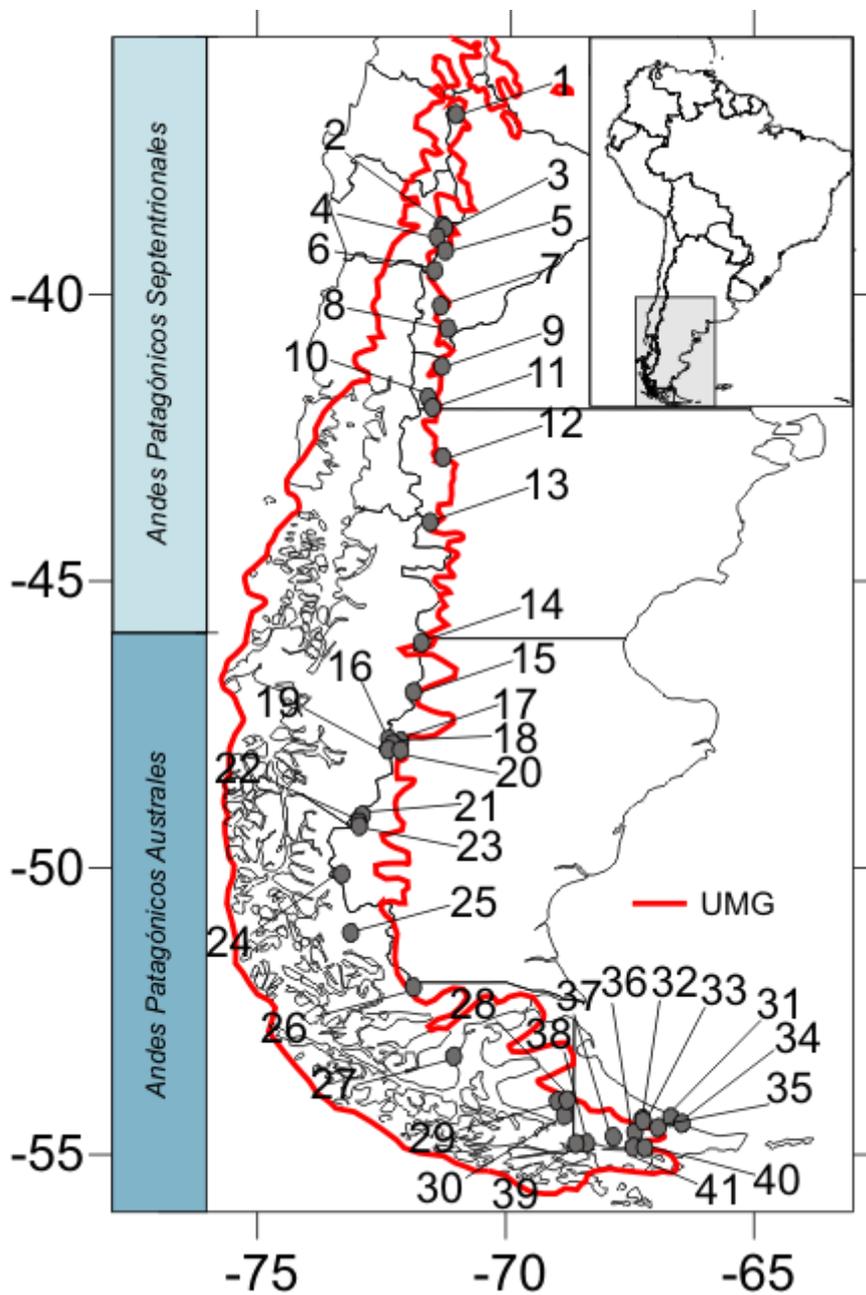


Figura III.2. Gel de almidón con tinción para las enzimas *Mdh* y *Pgi* en las cuáles se muestra la codificación de los loci y alelos para *Nothofagus pumilio*.

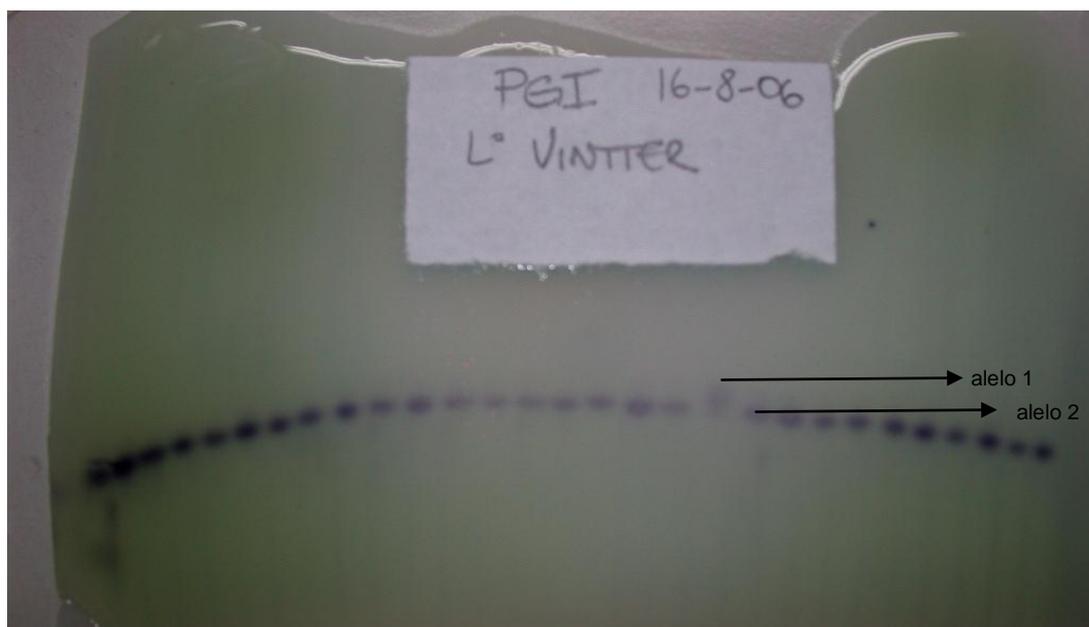
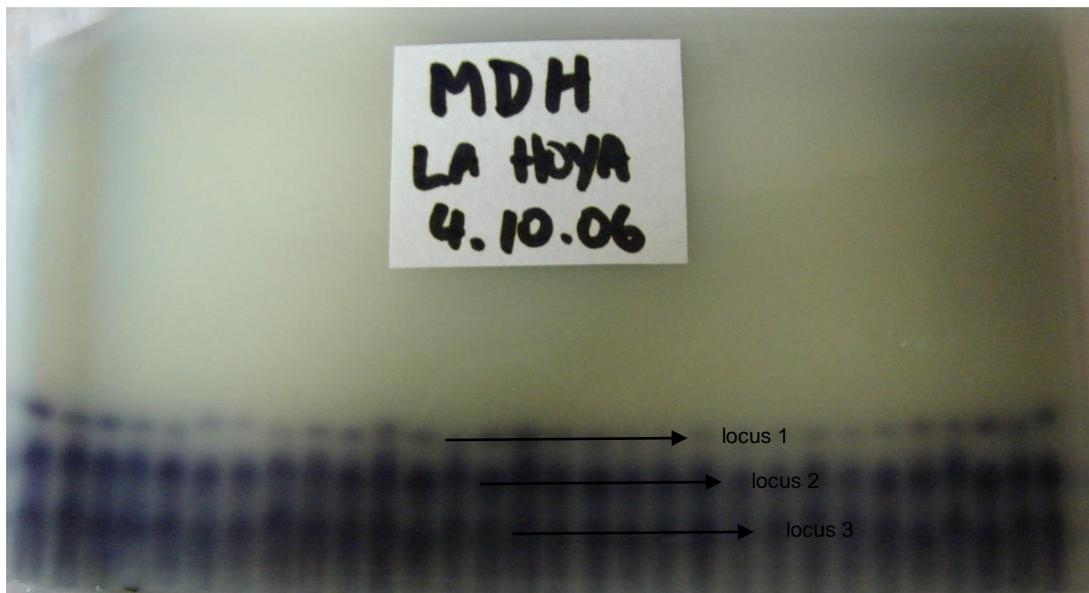


Figura III.3. Riqueza alélica promedio (a) y heterocigosis observada (b) con respecto a la latitud en 41 sitios analizados de *Nothofagus pumilio* en Patagonia. El color de los círculos representan los distintos haplotipos de ADN del cloroplasto encontrados (ver Cap. I) Los sitios de la isla de Tierra del Fuego (TDF) son diferenciados de los sitios del continente.

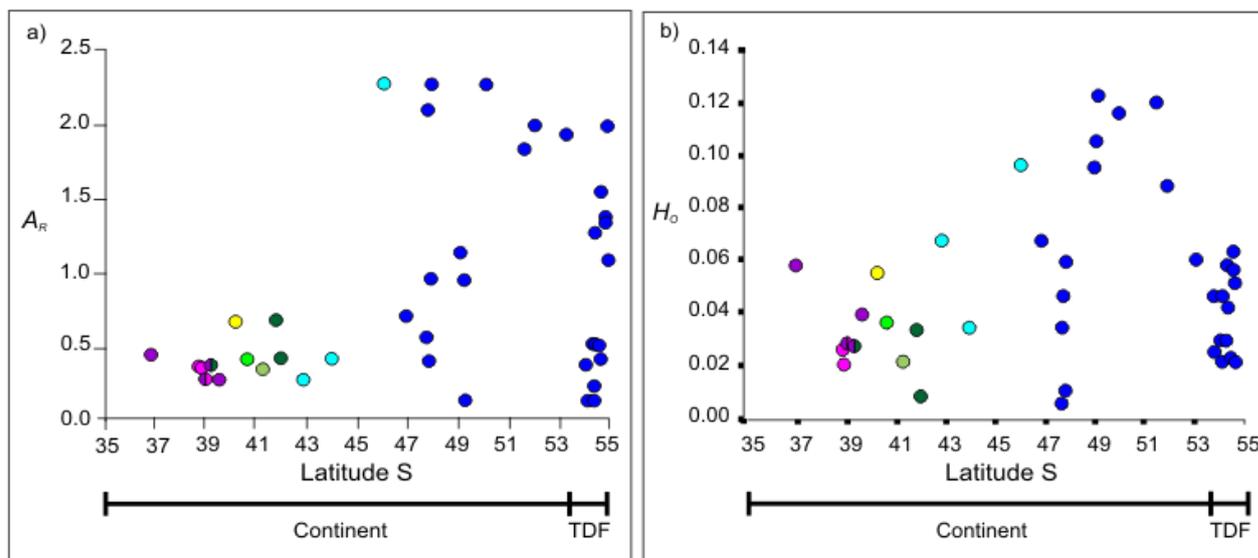


Figura III.4. Riqueza alélica promedio (A_R) en relación a la heterocigosis esperada (H_E) para 41 sitios analizados de *Nothofagus pumilio* en Patagonia. Las líneas punteadas indican el intervalo de confianza del 95%. El círculo azul indica las poblaciones del sur y centro, y el círculo rojo la mayoría de las poblaciones norte y centro.

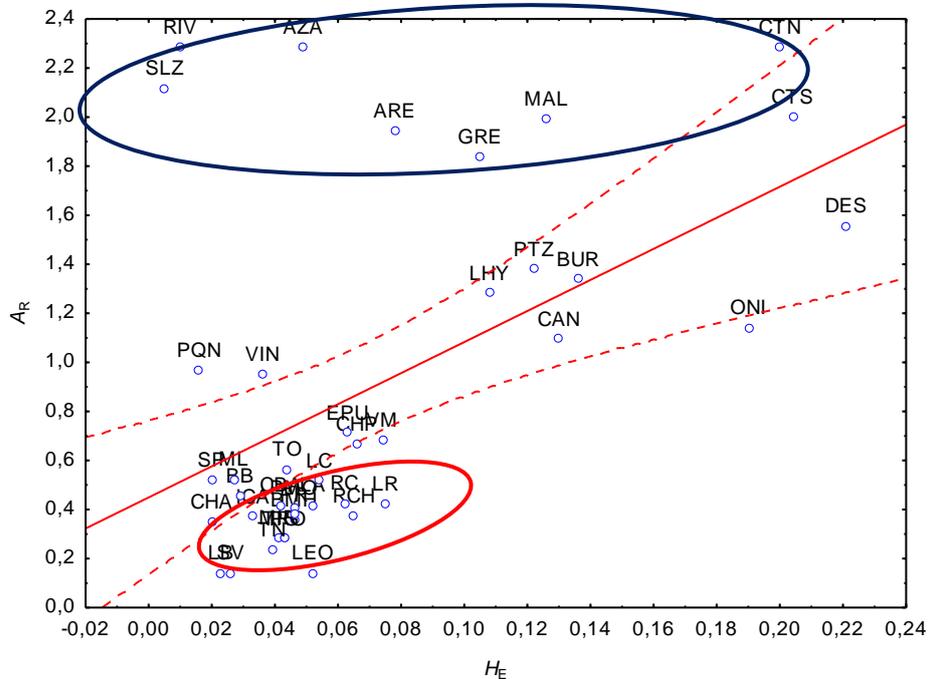
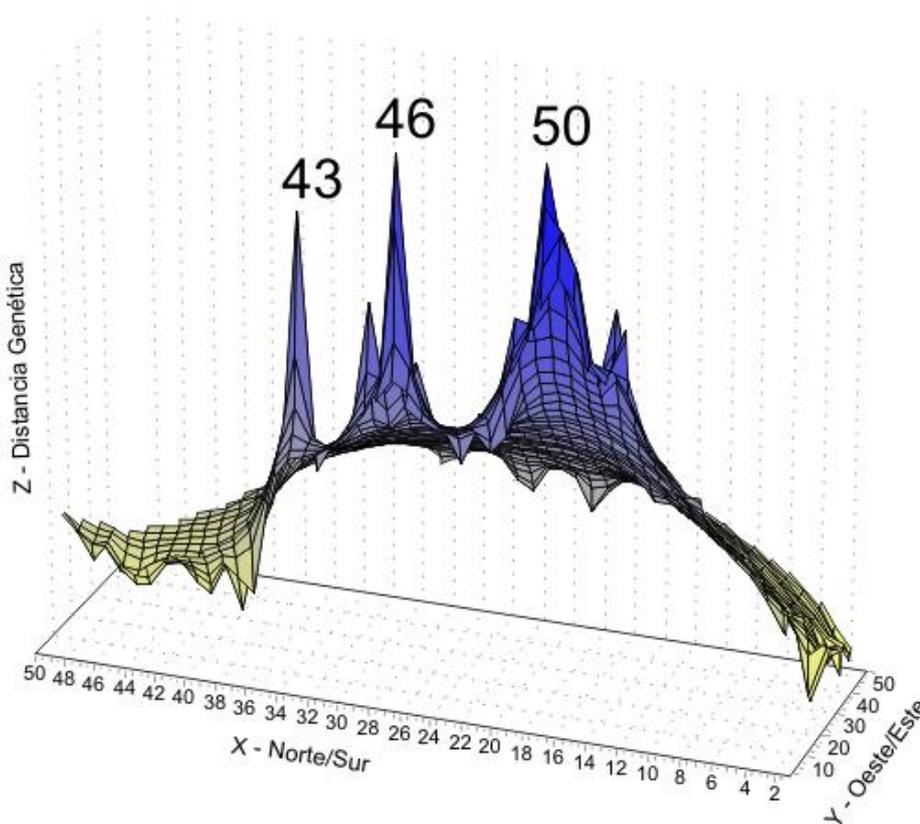


Figura III.5. Gráfico de superficie tridimensional de las distancias genéticas (eje Z) entre sitios en el paisaje estudiado (ejes X e Y) para *Nothofagus pumilio*. Los números sobre los picos indican la latitud en que se encuentran (grados Sur).



4. Capítulo IV: “Estructura genética a escala espacial reducida en *Nothofagus pumilio* refleja el modo de regeneración predominante en el gradiente altitudinal”



4.1. Resumen

La distribución de la variabilidad genética dentro de las poblaciones de plantas está determinada por la combinación de las características de historia de vida de las especies y por la historia ecológica del sitio. En particular, *Nothofagus pumilio*, considerada especie dominante de ambientes montañosos de Patagonia, presenta distintos modos de regeneración. En este capítulo se analizó la estructura demográfica y genética a escala espacial reducida en pares de sitios ubicados a alturas contrastantes en tres cerros dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi. Se realizó un muestreo espacialmente explícito de follaje fresco de 90 y 50 ind/sitio para ser analizados utilizando dos tipos de marcadores moleculares neutros nucleares, isoenzimas y microsatélites. En cada sitio se midieron diámetros y se tomaron muestras de tarugos para estimar la edad de los individuos. Los análisis de autocorrelación espacial, realizados en base a la combinación de ambos marcadores genéticos sugieren que la disposición espacial de los genotipos está determinada principalmente por el modo de regeneración y por la historia de cada sitio. En sitios de menor altura, predomina la regeneración por semillas y el principal limitante para su establecimiento sería la existencia de micrositos favorables. Esto, junto con la limitada dispersión de las semillas, produce que los individuos se establezcan en claros abiertos bajo el dosel en sitios cercanos al árbol semillero, generando grupos familiares estructurados espacialmente. En sitios de mayor altura la regeneración es predominantemente vegetativa, debido a la escasa producción de semillas lo que produce una mayor homogeneización genética y ausencia de estructura espacial fina. Sin embargo, en sitios que han sido disturbados recurrentemente, *e. g.* sitios postfuego, el establecimiento de semillas ocurrirá de manera aleatoria en el espacio a partir de individuos adultos remanentes borrando así la estructura genética preexistente.

4.2. Introducción

La combinación de distintos procesos ecológicos y evolutivos determina el desarrollo de la estructura genética dentro de las poblaciones de plantas. Estos están relacionados principalmente con la selección por distintos micrositios, el movimiento restringido de genes por medio de una reducida dispersión del polen y/o semillas, o a diferencias en los parámetros genéticos entre las poblaciones locales (Hamrick & Nason 1996). Debido a la condición sésil de las plantas, estas son más susceptibles a sufrir los efectos de los cambios climáticos y responden mediante modificaciones en sus rangos de distribución. Para estudiar los patrones genéticos en las poblaciones naturales de plantas, es necesario no sólo realizar estudios a gran escala, sino también a escala local. Esto es particularmente relevante para entender los procesos que ocurren en las poblaciones marginales que son las más expuestas a las presiones de selección (Stern & Roche 1974, Rogers *et al.* 1999). Distintos ambientes generan distintas presiones de selección y estos, a su vez, determinan de manera directa una marcada heterogeneidad genética. Muchas veces la heterogeneidad ambiental que ocurre en los gradientes altitudinales, de precipitación, y/o temperatura, actúa de tal manera que genera barreras contra el flujo génico, e. g. vía efectos sobre la fenología, incrementando la diferenciación genética entre poblaciones aisladas o semi-aisladas (Linhart & Grant 1996). Sin embargo, existen excepciones a estas reglas, por ejemplo en especies que han sufrido eventos históricos o que poseen baja variabilidad genética (Linhart & Grant 1996). La selección natural es la fuerza principal que actúa sobre el acervo genético, a distintas escalas espaciales, favoreciendo el establecimiento de uno u otro genotipo en determinado ambiente. En presencia de presiones de selección fuertes, se puede

encontrar una marcada diferenciación genética, incluso cuando los niveles de flujo génico son elevados (Hirao & Kudo 2004). Además, la limitada dispersión del polen y/o semillas, generará a una agrupación espacial de individuos relacionados a escalas espaciales de unos pocos cientos de metros, produciendo una marcada estructura genética.

El NO de la Patagonia se caracteriza por poseer marcados gradientes ambientales generados por la presencia de la Cordillera de los Andes. En particular las marcadas diferencias ambientales como las que ocurren a lo largo del gradiente altitudinal, restringen severamente la reproducción y el establecimiento de las especies de plantas debido a un acortamiento del período de crecimiento, a las bajas temperaturas, y la persistencia prolongada de la cobertura de nieve. Esto juntamente con un restringido flujo génico dentro y entre poblaciones provocaría un incremento en la diferenciación genética resultando en una compleja estructura genética. Este es el caso de *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endle.) Krasser, especie que caracteriza los bosques montanos y altoandinos de Patagonia. Esta especie presenta una marcada variación en las formas de crecimiento a lo largo del gradiente altitudinal. En el extremo inferior del gradiente altitudinal, la especie crece como árboles erectos formando básicamente bosques puros, mientras que en el límite altitudinal superior las plantas presentan una forma achaparrada o de “*krummholz*” principalmente debido a las condiciones extremas que presentan dichos sitios (Premoli 2004). La dispersión del polen y semillas en esta especie es anemófila. Sin embargo, la mayoría de las semillas de *N. pumilio* caen bajo la copa del árbol semillero (Rusch 1987), aún en años de alta producción la dispersión de semillas no supera los 110 m en el límite superior del bosque (Cuevas 2000). Además, se pudo documentar que las poblaciones ubicadas a menor altitud producen semillas más pesadas y con mayor capacidad germinativa que las poblaciones ubicadas cerca del

límite altitudinal superior del bosque (Premoli 2004). Por otro lado, se encontró que en esta especie existe regeneración en claros, principalmente en poblaciones ubicadas hacia el límite altitudinal inferior. El establecimiento de las plántulas ocurre principalmente en micrositios con altos niveles de humedad (Heinemann *et al.* 2000), lo que podría contribuir a una marcada estructuración genética poblacional a escalas espaciales reducidas. Sin embargo, *N. pumilio* tendría cierta capacidad de formar banco de plántulas (K. Heinemann, Comunicación Personal) pudiendo ser considerada relativamente sombra-tolerante y podría tener un establecimiento mas continuo bajo el dosel cuando las condiciones son favorables pudiendo disminuir el grado de estructuración genética. Por el contrario, hacia el límite altitudinal superior, el establecimiento por semillas sucede ocasionalmente (Martínez-Pastur *et al.* 1997, Barrera *et al.* 2000, Cuevas 2000, Premoli 2004), siendo predominante la regeneración en forma vegetativa (Martínez-Pastur *et al.* 1997) en respuesta a disturbios a gran escala, lo que podría producir una mayor homogeneidad genética entre los individuos en estas poblaciones.

La estructura espacial fina analizada en otras dos especies de *Nothofagus* sudamericanas ha demostrado las consecuencias genéticas en relación a la historia del disturbio. Se analizó la estructuración espacial de la diversidad genética a escalas menores a los 100 m en respuesta distintos tipos de regeneración y/o hábitat. *N. dombeyi*, que es una especie sombra-intolerante, presenta una estructura genética significativa a escalas menores a los 100 m como resultado del establecimiento local de semillas provenientes de un mismo árbol semillero en pequeños claros abiertos bajo el dosel de bosques maduros (Premoli & Kitzberger 2005). Por el contrario, el establecimiento posfuego de *N. dombeyi* produce rodales empobrecidos y homogéneos genéticamente (Premoli & Kitzberger 2005). En cambio, *N. antarctica*, que es una

especie rebrotante, ha revelado una marcada estructura genética compleja a distancias menores a los 50 m que se mantiene a largo plazo por rebrote y un establecimiento ocasional de semillas (Premoli & Steinke 2008).

Estudios realizados en *N. pumilio* mediante el análisis de marcadores isoenzimáticos muestran la existencia de diferencias genéticas a lo largo del gradiente altitudinal. Se encontró una disminución de la variación genética con la altura reflejando un mayor éxito reproductivo y flujo génico en poblaciones ubicadas a baja altitud (Premoli 2003). Sin embargo, no se ha evaluado hasta la fecha el tipo de establecimiento en relación con la dinámica poblacional y con la estructura genética a escalas espaciales reducidas para *N. pumilio*.

4.3. Objetivos particulares

El objetivo de este capítulo es evaluar cómo el modo de establecimiento afecta la estructura genética fina (distribución espacial de los genotipos) de *N. pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal mediante el uso de marcadores isoenzimáticos y microsatélites.

4.4. Hipótesis particulares

Las hipótesis y predicciones planteadas en este capítulo fueron las siguientes:

H4.1) El régimen de disturbios afecta los patrones de establecimiento de *N. pumilio*.

P4.1.1) Rodales que posean evidencias de disturbios a gran escala como fuego mostrarán una estructura etaria y distribución de diámetros homogénea que reflejen la existencia de individuos establecidos a partir de escasos árboles remanentes que regeneraron el sitio.

P4.1.2) Rodales maduros mostrarán una estructura de edades y diámetros correspondientes a bosques con regeneración en claros y/o micrositos favorables para el establecimiento.

H4.2) El modo de regeneración y la historia del disturbio se reflejará en la estructura genética a escalas espaciales reducidas.

P4.2.1) En rodales donde predomina la regeneración en claros producidos bajo el dosel por medio del establecimiento local de semillas, se generará una marcada estructura poblacional.

P4.2.2) En el límite altitudinal superior, predomina la regeneración vegetativa en respuesta a disturbios a gran escala resultando en una mayor homogeneidad genética y una escasa estructuración espacial.

4.5. Materiales y Métodos

Sitios de estudio: Para estudiar la estructura genética a escala local, se realizó un muestreo espacialmente explícito en pares de sitios ubicados en condiciones contrastantes del gradiente altitudinal en distintos cerros dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi (Fig. IV.1). Dichos sitios son: el Cerro Challhuaco ($41^{\circ} 15' S$; $71^{\circ} 18' O$), el Cerro López ($41^{\circ} 06' S$; $71^{\circ} 33' O$) y el Cerro Otto ($41^{\circ} 08' S$; $71^{\circ} 21' O$), donde anteriormente se han realizado estudios de variación altitudinal en los patrones de distribución de los polimorfismos genéticos para *N. pumilio* (Premoli 2003). Los sitios fueron elegidos en los extremos del gradiente altitudinal (Tabla IV.1): para el Cerro Challhuaco a 1684 m s.n.m. (CHA) y 1042 m s.n.m. (CHB); para el Cerro López a 1563 m s.n.m. (LOA) y 1213 m s.n.m. (LOB); y para el Cerro Otto a 1406 m s.n.m. (OTA) y 1208 m s.n.m. (OTB).

Diseño de muestreo espacialmente explícito: Este tipo de muestreo permite determinar el grado de agrupamiento, si es que existiera, entre organismos a escalas espaciales reducidas, es decir a escalas de cientos de metros. En cada sitio, se trabajó en parcelas de 1 ha. Los árboles fueron muestreados en 10 sub-parcelas de aproximadamente 10 x 10 m ubicadas al azar dentro de un área total de 1 ha (Fig. IV.2). Dentro de cada sub-parcela se tomaron muestras de follaje fresco de nueve individuos adultos para el análisis mediante isoenzimas, $N = 90$ individuos/sitio. De estos nueve individuos colectados por subparcela, cinco fueron analizados con microsatélites. Las muestras fueron mantenidas refrigeradas hasta ser procesadas en el laboratorio. La extracción de enzimas a partir de follaje fresco siguió el mismo protocolo del Capítulo III (ver a continuación). Luego las hojas frescas fueron congeladas con nitrógeno líquido y luego fueron almacenadas en freezer a $-70^{\circ} C$ hasta su posterior extracción de

ADN y análisis de microsatélites. La combinación de ambos tipos de marcadores nos permitió obtener suficiente variación para testear hipótesis a escala espacial fina, debido a que *N. pumilio* posee un polimorfismo isoenzimático limitado (Premoli 1998, 2003).

Para determinar la dinámica de cada rodal se extrajeron muestras con barreno de incremento (tarugos) de 1-3 individuos por sub-parcela. Dado que muchos de los individuos presentaron centros degradados, en este trabajo las edades informadas son edades mínimas. En el laboratorio, los tarugos fueron montados sobre varillas de madera, lijados con lijas de densidad creciente de 360 a 520 grs, y se contó el número de anillos de crecimiento (Schweingruber 1988) bajo lupa bifocal de 40 aumentos (Leica). Adicionalmente se midió el diámetro a la altura del pecho (DAP) de cada individuo, y se registró su posición en los ejes de coordenadas XY dentro de la parcela de 1 ha con una precisión estimada de 1 m.

Análisis de isoenzimas: se utilizó la técnica de electroforesis isoenzimática sobre geles de almidón 12% p/v (Starch Art Corporation). La extracción se realizó según la metodología de Premoli (1996) con el buffer de extracción de Mitton *et al.* (1979) y los homogenatos fueron almacenados en freezer a -70° C hasta el momento de la realización de las corridas electroforéticas. El protocolo de isoenzimas para *N. pumilio* ha sido optimizado oportunamente y utilizado en estudios previos de la especie (Premoli 1998, 2003) y ya han sido explicado además en el Cap. II. Se analizaron cuatro sistemas enzimáticos que codificaron para 6 loci putativos que se resolvieron de la siguiente manera: isocítrico deshidrogenasa (*Idh2*), malato deshidrogenasa (*Mdh1*, *Mdh2*, *Mdh3*) y shikimato deshidrogenasa (*Skdh1*) en el buffer morfolina-citrato de Ranker *et al.* (1989), mientras que la enzima fosfoglucoisomerasa (*Pgi2*) fue analizada en el sistema B modificado de Conkle *et al.* (1982) (Tabla IV.2). Para cada sistema enzimático, los

loci y los alelos fueron numerados sucesivamente del más anódico al más catódico (Fig. IV.3).

Análisis de microsatélites: la extracción de ADN se realizó utilizando el método de CTAB (Doyle & Doyle 1990) modificado para plantas con alta concentración de polisacáridos (ver Apéndice II.1). Las concentraciones de ADN y el tamaño de los fragmentos fueron estimados por electroforesis en gel de agarosa al 1% y comparados con marcadores de peso molecular de 1 kb (Fermentas). Se probaron distintos loci de microsatélites que han sido desarrollados anteriormente para otras especies de *Nothofagus* (Jones *et al.* 2004, Azpilicueta *et al.* 2004, Marchelli *et al.* 2008). La transferencia de iniciadores y optimización de la técnica de PCR para microsatélites en *N. pumilio* ya ha sido desarrollada por M. Arbetman en el Laboratorio Ecotono (Comunicación Personal). Los loci *ncutas04* (Jones *et al.* 2004) y NnBIO111 (Marchelli *et al.* 2008) fueron seleccionados para los posteriores análisis en *N. pumilio*, ya que dieron productos de amplificación confiables y mostraron un número de alelos considerable (entre 4 y 6 alelos). Las reacciones de amplificación de ADN se realizaron mediante la técnica de reacción de polimerasa en cadena (PCR). La mezcla de reacción de la PCR contenía en cada tubo: 1,5 μ L de extracto de ADN, 1 μ L de buffer de reacción 10 \times (Invitrogen), 0,4 μ L de solución de MgCl₂ 50 mM, 0,25 mM de cada dNTP, 0,5 μ M de cada iniciador, y 1 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), en un volumen total de 10 μ L. Los tubos fueron incubados en un termociclador (Applied Biosystems) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial por 5 min a 94° C; luego 35 ciclos (desnaturalización por 30 seg. a 94° C; anclaje del iniciador por 30 seg. a 57° C; extensión por 1,5 min a 72° C), una extensión final por 30 min a 72° C. La determinación del genotipo de cada individuo (genotipado) se realizó mediante el análisis de los fragmentos obtenidos por PCR con el secuenciador automático ABI-

PRISM 3100-*avant* en el Laboratorio Ecotono (Fig. IV.4). Esta técnica consiste de electroforesis capilar y detección por fluorescencia de los fragmentos de ADN amplificados mediante el uso de iniciadores marcados con fluorocromos. Las muestras amplificadas con los iniciadores marcados fueron preparadas para su secuenciación realizando una mezcla que contenía: 0,5 μL de producto de PCR, 8 μL de formamida (Hi-DiTM Formamide, Genetic Analysis Grade, Applied Biosystems), y 0,08 μL de marcador de tamaño (Gene ScanTM-500LIZTM Size Standard, Applied Biosystems). La visión y lectura de los datos se realizó mediante el uso del programa GeneMapper® v3.7 (Applied Biosystems) y la determinación de los genotipos se realizó manualmente (Fig. IV.3).

Análisis de datos: La estructura etaria y diamétrica para cada sitio fue evaluada en clases de 10 años/cm. Además, para evaluar la relación entre el diámetro y la edad en las plantas de arriba y de abajo se realizó una regresión lineal simple con el programa STATISTICA v7.0 StatSoft, Inc. (2004). Para evaluar los niveles de diversidad genética para isoenzimas ($N = 90$) y microsatélites ($N = 50$) los distintos sitios (arriba y abajo) dentro de cada cerro fueron analizados por separado. En base a los genotipos obtenidos se calcularon distintos índices de variación genética para describir las características genéticas de cada sitio utilizando el programa PopGene versión 1.32 (Yeh *et al.* 1999). Estos incluyen: el número promedio de alelos por locus (A); número efectivo de alelos, que es una medida de la equitatividad de las frecuencias alélicas ($A_E = [1/\sum p_i^2] = 1/[1 - H_E]$, $1 < A_E < \infty$); número de alelos totales (A_T); el porcentaje de loci polimórficos bajo el criterio *sensu stricto* (P); la heterocigosis observada (H_O) y la heterocigosis esperada bajo condiciones de equilibrio Hardy-Weinberg (H_E). El ajuste a la condición de equilibrio Hardy-Weinberg (HW) fue descripto utilizando el índice de fijación de Wright (1931) ($F=1-[H_o/H_e]$) y mediante test de chi-cuadrado (Li & Horvitz 1953).

Para evaluar una posible divergencia genética entre los sitios con la altura, se analizó la heterogeneidad en las frecuencias alélicas mediante test de chi-cuadrado según Workman y Niswander (1970).

La estructura genética poblacional fue analizada mediante los estadísticos F de Wright (1965) utilizando el programa FSTAT v 2.9.3 (Goudet 2001), donde F_{IT} y F_{IS} son los coeficientes de endogamia total e intra-poblacional, respectivamente; y F_{ST} representa el grado de divergencia entre poblaciones. Los parámetros de estructuración genética fueron calculados para distintos niveles de agrupación de las poblaciones: sitios dentro de cada cerro (CH1042 vs CH1684; LO1213 vs LO1563; y OT1208 vs OT1406), entre sitios de una misma altitud (CH1042 vs LO1213 vs OT1208; y CH1684 vs LO1563 vs OT1406) y entre cerros (Challhuaco vs Otto vs López). Los valores promedio y los intervalos de confianza del 95 y 99% fueron calculados por permutaciones sobre todos los loci según Weir & Cockerham (1984). Los valores promedio de los estadísticos F fueron considerados significativos cuando los intervalos de confianza no incluían al cero. La diversidad genética de las poblaciones fue analizada en base a los parámetros de Nei (1973) de diversidad genética total (H_T) y dentro (H_S) de las poblaciones, y el coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones (G_{ST}) calculados mediante el programa FSTAT v 2.9.3 (Goudet 2001).

Los análisis de estructura genética espacial fina se realizaron combinando las bases de datos obtenidas mediante isoenzimas (sólo se utilizaron los loci isoenzimáticos que presentaron mayor polimorfismo: *Mdh-2* y *Pgi-2*) y microsatélites (*ncutas04* y *NnBIO111*) resultando en un total de 50 individuos analizados por sitio (Fig. IV.5). Para cada sitio y altura se calcularon coeficientes de autocorrelación espacial entre todos los pares de individuos dentro de cada clase de distancia: el índice I de Moran (Moran

1950, Sokal & Oden 1978) y el número de alelos en común (NAC) que permiten analizar genotipos y genes, respectivamente (ver Apéndice 2). La estructuración espacial fue evaluada para 10 clases continuas de distancia en intervalos cada 8 m. Las desviaciones significativas de una distribución al azar para cada valor calculado se analizaron mediante el cálculo de los intervalos de confianza del 95% utilizando simulaciones Monte Carlo con 1000 permutaciones. Los índices I de Moran y el número de alelos en común fueron calculados mediante estimaciones multiloci utilizando el programa SGS versión 1.0c (Degen *et al.* 2001).

4.6. Resultados

Análisis demográficos: La mayoría de los individuos analizados mostraron centros en estado de putrefacción que dificultó la estimación de edades absolutas de los mismos por medio del conteo de anillos. Por lo tanto, las edades informadas en esta tesis se consideran mínimas. Sin embargo, la relación entre el diámetro y la edad de los individuos de los cuales se pudo estimar la edad total mediante el conteo de anillos arrojó una relación positiva y significativa para el sitio de abajo ($P < 0,05$). Por lo tanto, el diámetro sería un buen estimador de la edad para individuos creciendo a menor altitud (Fig. IV.6.a). Por otro lado, para las plantas de arriba la relación resultó marginalmente significativa ($P \leq 0,05$). Así por ejemplo, plantas con un diámetro pequeño pueden ser muy longevas (Fig. IV.6.b). Esto puede deberse a una supresión del crecimiento en las plantas de altura por las condiciones extremas de los ambientes que habitan. Para el sitio OT1406 no se pudieron obtener muestras para la determinación de su edad debido a que la mayoría de los troncos eran inaccesibles y muchos de estos

presentaban nudos, lo cuál impide la lectura de los anillos de crecimiento. La estructura etaria y diamétrica de los rodales de baja altitud contuvo individuos de edades y diámetros mayores que los rodales de mayor altura (Tabla IV.1). La distribución de las frecuencias de las edades y diámetros de los arboles difirió entre los distintos sitios (Figs. IV.7 y 8). En particular, los sitios CH1042 y LO1213 fueron los que presentaron individuos con mayor edad promedio, mientras que en OT1208 la mayoría de los individuos se distribuía en las clases menores de edades (Tabla IV.1). Por otro lado, las especies que conformaban el sotobosque fueron similares en todos los sitios, a excepción del Cerro López que presentaba un sotobosque denso compuesto por *Chusquea coleou* (Tabla IV.1).

Diversidad genética y endogamia: Las frecuencias alélicas resultaron heterogéneas para la mayoría de los loci estudiados con ambos tipos de marcadores (Tabla IV.3). La diversidad genética resultó mayor en bosques de menor altitud en dos de los tres sitios estudiados (Challhuaco y López; Tablas IV.4 y 5). La diversidad genética total (H_T) muestra que los sitios de abajo mantienen mayor diversidad isoenzimática que los sitios de altura (Tabla IV.6). A pesar del bajo número de microsatélites analizados los parámetros de diversidad resultaron más altos que los calculados para isoenzimas (Tabla IV.7). El análisis jerárquico de los coeficientes de endogamia arrojó valores promedio significativos sugiriendo un déficit de heterocigotas en la mayoría de los loci y sitios analizados (Tablas IV.6 y 7). La estructuración genética interpoblacional fue significativa en López ($F_{ST} = 0,035$) y Challhuaco ($F_{ST} = 0,128$) sugiriendo una divergencia moderada a alta entre rodales para los sitios estudiados (Tabla IV.6). Los índices de fijación F fueron positivos e indicaron

desviaciones significativas al equilibrio Hardy-Weinberg en el 58% de los tests realizados (Tabla IV.8).

Estructura genética espacial: las estimaciones del índice I de Moran arrojaron coeficientes de autocorrelación significativos ($P < 0,05$) en los sitios de abajo CH1042, LO1213 entre 16 – 32 m y para el sitio de arriba OT1406 a escala espacial fina < 24 m mientras que el sitio CH1684 mostró una estructuración genética marginalmente significativa < 16 m (Fig. IV.9). Por el contrario, los análisis de autocorrelación espacial sugieren una distribución al azar de los genotipos en los sitios LO1563 y OT1208. El sitio OT1406 fue el que presentó mayores valores del índice de Moran (Fig. IV.9). El número de alelos en común sólo presentó una agrupación significativa a distancias < 24 m para los sitios CH1042 y OT1406 (Fig. IV.10).

4.7. Discusión

Los resultados presentados en este capítulo muestran que la estructura genética a escalas espaciales reducidas fue diferente entre sitios dentro de un mismo cerro y entre cerros. Estos resultados sugieren que para *N. pumilio* el tamaño de los parches estaría determinado no sólo por el modo de regeneración, sino también estaría asociado a la historia ecológica de cada sitio. Mientras que la estructura etaria y diamétrica de los sitios de baja altitud en Challhuaco y López presentan características de un bosque maduro con dinámica de claros, la estructura observada en el Cerro Otto es típica de un bosque postfuego (T Kitzberger, Comunicación Personal) con una gran frecuencia de individuos más jóvenes. Esto se ve reflejado en la estructuración genética significativa observada en CH1042 y LO1213, donde el establecimiento de nuevos individuos

depende principalmente de la apertura de claros bajo el dosel en sitios donde no ha habido incendios por lo menos en los últimos 100-200 años (N. Tercero-Bucardo, Comunicación Personal). En cambio, en OT1208 han ocurrido incendios recurrentemente, y unos pocos individuos remanentes habrían recolonizado el ambiente con un establecimiento sincrónico de genotipos agrupados espacialmente por la limitada dispersión de semillas de *N. pumilio*. Estudios realizados en rodales maduros de *N. dombeyi* demuestran la existencia de una estructura genética significativa a escalas espaciales de aproximadamente 20 m y es similar a la estructura encontrada en CH1042 y LO1213 de *N. pumilio*. Dicha estructuración poblacional surge como resultado del establecimiento local de semillas provenientes de un mismo árbol en pequeños claros abiertos bajo el dosel (Premoli & Kitzberger 2005). Se ha sugerido que *N. pumilio* tendría cierta capacidad de formar banco de plántulas (Heinemann 2007) pudiendo ser considerada relativamente sombra-tolerante teniendo un establecimiento más continuo bajo el dosel (Heinemann *et al.* 2000) que resultaría en un menor grado de estructuración genética que *N. dombeyi*. Sin embargo, los datos acá presentados indican que rodales maduros de ambas especies poseen similar estructura espacial y sería necesario el análisis genético de renuevos para poder analizar esta hipótesis.

Por otro lado, la ausencia de una estructuración genética significativa en los sitios de altura CH1684 y LO1563 estaría reflejando la estructura demográfica coetánea de estos rodales. La menor diversidad genética encontrada en CH1684 y LO1563 en comparación con sus respectivos sitios de baja altitud con estructuras etarias más complejas, confirma el efecto de una escasa y esporádica producción y establecimiento de semillas principalmente en ambientes de altura (Martínez-Pastur *et al.* 1997; Cuevas 2002; Premoli 2004). Luego de disturbios masivos *N. pumilio* se extingue localmente y

debe recolonizar las áreas afectadas a partir de unos pocos individuos remanentes. En el límite altitudinal superior, donde la lenga puede propagarse vegetativamente (Martínez-Pastur *et al.* 1997; Premoli 2004), los nuevos ramets, *definido como todo vástago o conjunto de vástagos derivados por multiplicación vegetativa de un mismo genet* (Perreta & Vegetti 2005), serán genéticamente similares a los parentales remanentes, produciendo un empobrecimiento genético y escasa estructuración genética espacial. Por el contrario, especies rebrotantes como *N. antarctica* mantienen la estructura genética antigua frente a un disturbio (Premoli & Steinke 2008). Además, las poblaciones de altura, poseen una distribución marginal. Por lo tanto, estarían sujetas a fuertes presiones de selección y experimentarían mayores ciclos de extinción y recolonización los cuales producen cuellos de botella genéticos y efectos fundadores generando un empobrecimiento genético (Eckert *et al.* 2008). A su vez el efecto del aislamiento por restricciones en el flujo génico entre diferentes altitudes y un mayor flujo génico entre poblaciones a una misma altitud refuerzan la selección por determinados genotipos en ambientes de altura (Premoli 2003). En cambio, el sitio de altura OT1406 presentó una agrupación espacial de los genotipos significativa. En OT1406 las condiciones eran diferentes a los otros sitios de altura. Los árboles presentaron mayores diámetros y estaban más agrupados en el espacio, lo que dificultaba determinar los límites espaciales de cada genet, *definido como el conjunto de partes desarrolladas a partir del cigoto, producto de la germinación y posterior crecimiento* (Harper 1977, Perreta y Vegetti 2005). En este caso la estructuración genética espacial encontrada en distancias < 16 m podría estar reflejando un mayor tamaño de los genets, mientras que en CH1684 y LO1563 los genets tendrían un menor tamaño ya que principalmente predomina el suelo desnudo en estos dos sitios. Además, los distintos parámetros de diversidad genética resultaron mayores en el sitio OT1406

en comparación con su correspondiente de baja altitud (OT1208), lo que podría estar reflejando que el sitio de baja altitud habría sufrido repetidos cuellos de botella genéticos, por causa de los incendios recurrentes, produciendo un empobrecimiento genético en dicho sitio. Estudios realizados en la especie rebrotante *Nothofagus antártica*, la cual domina los matorrales postfuego del norte de la Patagonia, indican que especies con tales características presentan una marcada estructuración genética a escalas menores a los 50 m (Premoli & Steinke 2008). Esto se debe a que tienen la capacidad de rebrotar después de un disturbio y no dependen de la reproducción por semillas para mantener la diversidad genética a lo largo del tiempo ya que sólo producen semillas ocasionalmente. *Nothofagus pumilio* a pesar de poder propagarse vegetativamente, no tiene la capacidad de rebrotar vigorosamente y colonizar el ambiente después de un disturbio, ya que depende principalmente de la producción y establecimiento a partir de semillas. Por lo tanto, en sitios de mayores disturbios, como son los sitios de altura o sitios que han sido incendiados, *N. pumilio* presentará una estructuración genética débil o nula.

Al comparar los sitios en una misma altitud en distintos cerros se vio que los sitios de mayor altitud no presentaron una diferenciación genética significativa ($F_{ST} = 0,028$), a diferencia de la estructuración significativa encontrada a baja altitud ($F_{ST} = 0,072$). Esto puede deberse a una mayor homogeneidad en las condiciones climáticas y de sitio a mayor altura, y también a una mayor sincronización temporal en los tiempos de polinización entre dichos sitios (Rathcke & Lacey 1985; Premoli 2003). Estos resultados concuerdan con los presentados anteriormente para *N. pumilio* que muestran que la divergencia interpoblacional entre sitios de una montaña era reducida, pero que era mayor que la diferenciación entre las distintas montañas (Premoli 2003). Estas

diferencias las atribuyen a la existencia de barreras que previenen el flujo génico entre altitudes dentro de un mismo cerro ocasionadas por las diferencias fenológicas a lo largo del gradiente altitudinal (Premoli 2003). En cambio, en los sitios de menor altitud las condiciones serían más heterogéneas, siendo particulares para cada sitio; mientras que Challhuaco y Otto son bosques secos, López es un bosque húmedo con sotobosque de caña. Estas características afectarían el establecimiento de las semillas en distintos micrositios. Mientras que en Challhuaco la regeneración estaría afectada por la disponibilidad de humedad, en López el principal limitante sería la disponibilidad de micrositios por competencia con otras especies.

Los resultados encontrados en este capítulo indican que las características de historia de vida de *Nothofagus pumilio*, incluido su modo de regeneración, en sitios con distintos escenarios ecológicos históricos serían los principales factores que determinan la disposición de los genotipos en el espacio. Bajo escenarios de cambio climático las distintas especies de *Nothofagus* que poseen una amplia distribución en los Bosques Templados de Sudamérica Austral van a responder diferencialmente. Frente a disturbios a gran escala como fuego, especies rebrotantes como *N. antarctica* serían capaces de mantener una estructura genética compleja conservando un acervo genético diverso establecido en el pasado (Premoli & Steinke 2008). Por otro lado, especies como *N. pumilio* y *N. dombeyi*, que dependen de la producción y establecimiento de semillas, sufrirían una mayor homogeneización genética en bosques posfuego o bajo condiciones extremas en ambientes de altura.

4.8. Tablas y figuras

Tabla IV.1. Descripción de los sitios muestreados de *Nothofagus pumilio* en tres cerros dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi. Se indica la ubicación geográfica, altitud, composición de especies, diámetro y edad promedio (DS) y el rango de edad mínima y máxima de los árboles.

Sitio	ID	Coordenadas (Lat S, Long O)	Altitud (m s.n.m.)	Composición de especies	Diámetro (cm)	Edad (años)	Rango edad
Cerro Challhuaco	CH1042	41° 16' 10'', 71° 18' 04''	1042	<i>Alstroemeria aurea</i> , <i>Berberis serratodentata</i> , <i>Carex</i> sp., gramíneas y herbáceas.	33,6 (28,5)	92,7 (52,1)	21 – 232
	CH1684	41° 15' 08'', 71° 16' 56''	1684	Gramíneas y herbáceas.	6,3 (3,9)	61,8 (28,2)	27 – 88
Cerro López	LO1213	41° 05' 40'', 71° 32' 54''	1213	<i>Berberis serratodentata</i> , <i>Chusquea coleou</i> , <i>Carex</i> sp, gramíneas y herbáceas.	50,4 (24,0)	88,3 (44,4)	38 – 193
	LO1563	41° 06' 07'', 71° 33' 25''	1563	<i>Gaultheria</i> , <i>Senecio</i> , <i>Berberis</i> , <i>Quinchamalium</i> , <i>Mioschilos</i> , <i>Ribes magellanicum</i>	7,7 (4,0)	57,9 (28,0)	25 – 119
Cerro Otto	OT1208	41° 08' 47'', 71° 21' 42''	1208	<i>Berberis serratodentata</i> , <i>Carex</i> sp, gramíneas y herbáceas.	37,0 (30,1)	56,2 (41,3)	28 – 206
	OT1406	41° 08' 50'', 71° 22' 48''	1406	Gramíneas y herbáceas.	15,4 (10,5)	--	--

Tabla IV.2. Sistemas buffer, condiciones de electroforesis y enzimas reveladas en *Nothofagus pumilio*. P y M representan el número de loci putativos polimórficos y monomórficos, respectivamente.

Sistema	Buffer		Corriente (mA)	Tiempo de corrida (h)	Enzimas	P	M
	Gel	Electrodo					
MC	Ac. Cítrico -	Ac. Cítrico -	20	6	<i>Idh</i>	1	0
	Morfolina, pH~8	Morfolina, pH~8			<i>Mdh</i>	2	1
					<i>Skdh</i>	1	0
CB	Tris - Ac. Cítrico, pH~8,8	Ac. Bórico - NaOH, pH~8	35	5	<i>Pgi</i>	1	0

Tabla IV.3. Frecuencias alélicas para todos los loci analizados de *Nothofagus pumilio* en tres cerros en el Norte de la Patagonia. Los números en negrita indican diferencias significativas ($P < 0,05$, test de chi-cuadrado) en las frecuencias alélicas para los loci polimórficos.

Loci	Alelo	CH1042	CH1684	LO1213	LO1563	OT1204	OT1406	χ^2
<i>Idh2</i>	2	0,011	0,139	0,000	0,030	0,028	0,006	116,918
	3	0,967	0,844	0,972	0,818	0,972	0,978	
	4	0,022	0,017	0,028	0,152	0,000	0,017	
<i>Mdh1</i>	2	0,000	0,044	0,000	0,000	0,000	0,000	65,792
	3	1,000	0,928	1,000	1,000	1,000	1,000	
	4	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	
<i>Mdh2</i>	2	0,000	0,000	0,067	0,117	0,178	0,067	110,776
	3	1,000	1,000	0,900	0,794	0,789	0,933	
	4	0,000	0,000	0,033	0,089	0,033	0,000	
<i>Mdh3</i>	2	0,000	0,011	0,000	0,000	0,000	0,000	10,019
	3	1,000	0,989	1,000	1,000	1,000	1,000	
<i>Skdh</i>	1	0,000	0,017	0,000	0,000	0,000	0,000	187,468
	2	0,073	0,683	0,000	0,000	0,000	0,000	
	3	0,916	0,244	1,000	1,000	1,000	1,000	
	4	0,011	0,056	0,000	0,000	0,000	0,000	
<i>Pgi2</i>	1	0,011	0,022	0,044	0,017	0,033	0,017	71,211
	2	0,000	0,000	0,056	0,117	0,000	0,017	
	3	0,989	0,978	0,900	0,867	0,967	0,967	
<i>ncutas04</i>	308	0,929	0,859	0,843	0,705	0,588	0,076	63,772
	310	0,048	0,064	0,029	0,154	0,294	0,294	
	312	0,024	0,000	0,100	0,115	0,118	0,000	
	314	0,000	0,077	0,029	0,026	0,000	0,000	
NnBIO111	116	0,154	0,000	0,000	0,047	0,000	0,026	91,853
	118	0,692	0,756	0,756	0,581	0,568	0,658	
	120	0,135	0,167	0,133	0,372	0,364	0,092	
	122	0,000	0,000	0,078	0,000	0,68	0,079	
	124	0,019	0,077	0,033	0,000	0,000	0,145	

Tabla IV.4. Parámetros de diversidad genética isoenzimática calculados para los seis sitios analizados de *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal y a nivel de especie en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina.

Grupo	A	A_E	A_T	P	H_O	H_E
CH1042	2,50 (0,40)	1,25 (0,34)	15	83,3	0,122 (0,061)	0,157 (0,075)
CH1684	1,83 (0,40)	1,05 (0,07)	11	50,0	0,024 (0,013)	0,041 (0,025)
LO1213	2,0 (0,40)	1,21 (0,24)	12	50,0	0,080 (0,042)	0,150 (0,068)
LO1565	1,83 (0,40)	1,09 (0,11)	11	50,0	0,037 (0,023)	0,071 (0,037)
OT1208	1,83 (0,40)	1,04 (0,06)	11	50,0	0,026 (0,012)	0,039 (0,021)
OT1406	1,70 (0,30)	1,11 (0,21)	10	50,0	0,039 (0,022)	0,078 (0,055)
Especie	3,00 (0,63)	1,25 (0,38)	18	100	0,076 (0,078)	0,156 (0,182)

A , es el número promedio de alelos por sitio; A_e , es el número efectivo de alelos; A_T , es el número total de alelos por sitio; P , es el polimorfismo sensu stricto; H_O , es la heterocigosis observada; y H_E , es la heterocigosis esperada. La desviación estándar (DS) se muestra entre paréntesis.

Tabla IV.5. Parámetros de diversidad genética calculados mediante dos loci de microsatélites para los seis sitios analizados de *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal y a nivel de especie en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina.

Grupo	A	A_E	A_T	P	H_O	H_E
CH1042	4,00 (0,00)	1,54 (0,54)	8	100	0,238 (0,012)	0,408 (0,171)
CH1684	3,00 (0,00)	1,49 (0,22)	7	100	0,192 (0,013)	0,327 (0,072)
LO1213	4,00 (0,00)	1,53 (0,21)	8	100	0,292 (0,063)	0,345 (0,063)
LO1565	3,50 (0,50)	1,98 (0,16)	7	100	0,393 (0,090)	0,480 (0,010)
OT1208	3,00 (0,00)	1,21 (0,05)	6	100	0,365 (0,047)	0,562 (0,009)
OT1406	3,50 (1,50)	1,92 (0,30)	7	100	0,396 (0,133)	0,480 (0,058)
Especie	4,50 (0,71)	1,79 (0,28)	9	100	0,306 (0,041)	0,435 (0,089)

A , es el número promedio de alelos por sitio; A_e , es el número efectivo de alelos; A_T , es el número total de alelos por sitio; P , es el polimorfismo sensu stricto; H_O , es la heterocigosis observada; y H_E , es la heterocigosis esperada. La desviación estándar (DS) se muestra entre paréntesis.

Tabla IV.6. Endogamia total (F_{IT}), dentro (F_{IS}) y entre (F_{ST}) los individuos de *Nothofagus pumilio* muestreados en el P. N. Nahuel Huapi, Patagonia. Se presentan los valores promedio (DS) sobre todos los loci isoenzimáticos dentro de cada cerro, entre sitios de una misma altitud (Bajo y Alto) y entre cerros (Montaña). En negrita se indican los valores que resultaron significativamente distintos de cero. La diversidad genética se analiza mediante la diversidad total (H_T), dentro (H_S) y entre (G_{ST}) los sitios.

Sitio	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	H_T	H_S	G_{ST}
Challhuaco	0,356 (0,036)	0,262 (0,026)	0,128 (0,046)	0,105	0,099	0,058
López	0,482 (0,144)	0,463 (0,150)	0,035 (0,031)	0,113	0,110	0,018
Otto	0,674 (0,362)	0,633 (0,343)	0,063 (0,038)	0,060	0,059	0,021
Bajo	0,313 (0,082)	0,259 (0,008)	0,072 (0,005)	0,127	0,120	0,060
Alto	0,499 (0,039)	0,484 (0,025)	0,028 (0,057)	0,067	0,065	0,026
Montaña	0,397 (0,052)	0,371 (0,050)	0,041 (0,008)	0,094	0,091	0,036

Tabla IV.7. Endogamia total (F_{IT}), dentro (F_{IS}) y entre (F_{ST}) los individuos de *Nothofagus pumilio* muestreados en el P. N. Nahuel Huapi, Patagonia. Se presentan los valores promedio (DS) sobre todos los loci de microsatélites dentro de cada cerro, entre sitios de una misma altitud y entre cerros. La diversidad genética se analiza mediante la diversidad total (H_T), dentro (H_S) y entre (G_{ST}) los sitios. El programa no realizó las permutaciones correspondientes a los intervalos de confianza por tratarse de dos loci solamente.

Sitio	F_{IT}	F_{IS}	F_{ST}	H_T	H_S	G_{ST}
Challhuaco	0,396	0,390	0,010	0,324	0,322	0,005
López	0,259	0,213	0,059	0,437	0,423	0,030
Otto	0,270	0,061	0,039	0,533	0,523	0,019
Abajo	0,234	0,221	0,016	0,338	0,331	0,008
Arriba	0,313	0,273	0,054	0,453	0,437	0,036
Montaña	0,304	0,289	0,033	0,439	0,429	0,024

Tabla IV.8. Índices de fijación (F) isoenzimáticos para los seis sitios de *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina. Se muestran los valores promedio de F ($\pm DS$), el número de test significativos positivos (+), significativos negativos (-) y no significativos (*n.s.*), y el número total de test realizados para cada locus. Los porcentajes por locus se muestran entre paréntesis.

Grupo	F (DS)	<i>s.</i> +	<i>s.</i> -	<i>n.s.</i>	Total
CH1042	0,164 (0,190)	2 (40%)	0 (0%)	3 (60%)	5
CH1684	0,267 (0,257)	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)	3
LO1213	0,484 (0,205)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3
LO1563	0,550 (0,260)	3 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	3
OT1208	0,200 (0,384)	1 (33%)	0 (0%)	2 (67%)	3
OT1406	0,321 (0,328)	2 (67%)	0 (0%)	1 (33%)	3
<i>Total</i>	<i>0,314 (0,273)</i>	13 (65%)	0 (0%)	7 (35%)	20

Tabla IV.9. Índices de fijación (F) en loci de microsatélites para los seis sitios de *Nothofagus pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina. Se muestran los valores promedio de F ($\pm DS$), el número de test significativos positivos (+), significativos negativos (-) y no significativos (*n.s.*), y el número total de test realizados para cada locus. Los porcentajes por locus se muestran entre paréntesis.

Grupo	F (DS)	<i>s.</i> +	<i>s.</i> -	<i>n.s.</i>	Total
CH1042	0,298 (0,374)	2 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	2
CH1684	0,366 (0,254)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	2
LO1213	0,149 (0,041)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	2
LO1563	0,171 (0,247)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	2
OT1208	0,333 (0,110)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	2
OT1406	0,115 (0,551)	1 (50%)	0 (0%)	1 (50%)	2
<i>Total</i>	<i>0,239 (0,106)</i>	<i>7 (58%)</i>	<i>0 (0%)</i>	<i>5 (42%)</i>	<i>12</i>

Figura IV.1. a) Mapa de Sud América donde se muestra la ubicación de Argentina; b), mapa de Argentina con la ubicación de la provincia de Río Negro y del Parque Nacional Nahuel Huapi; y c) mapa del Parque Nacional Nahuel Huapi mostrando la ubicación de los seis sitios muestreados de *Nothofagus pumilio* en los cerros: Challhuaco (CHA y CHB), López (LOA y LOB), y Otto (OTA y OTB).

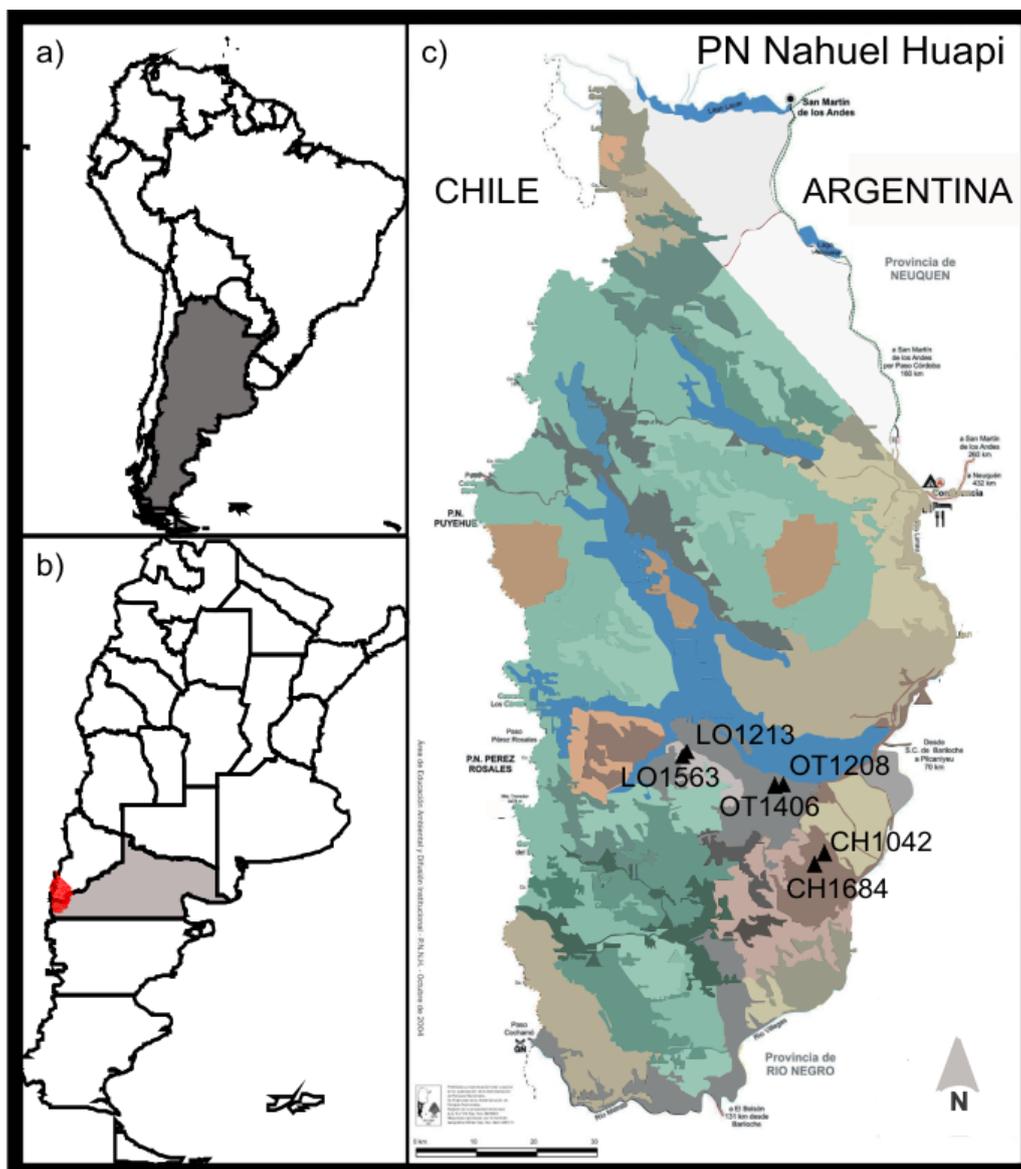


Figura IV.2. Diseño de muestreo espacialmente explícito implementado en los seis sitios de *Nothofagus pumilio* en condiciones contrastantes del gradiente altitudinal en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Patagonia, Argentina.

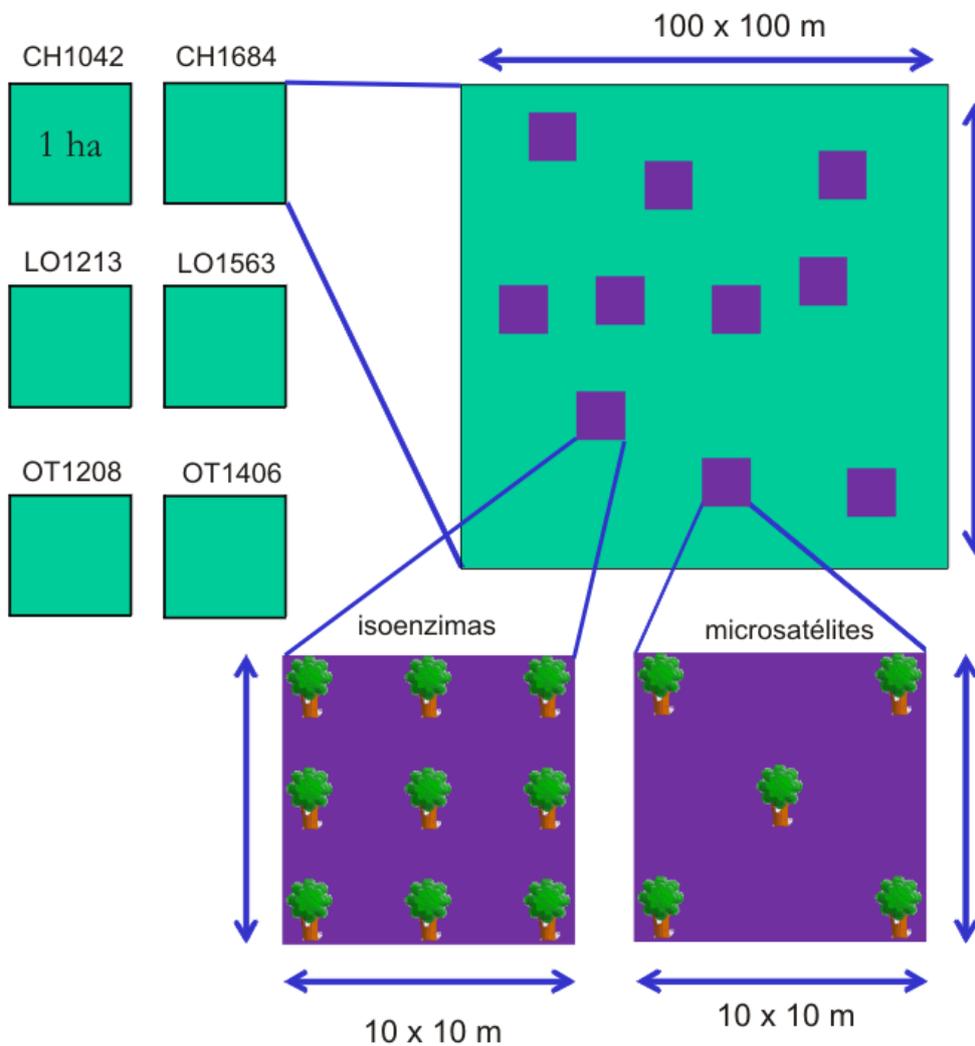


Figura IV.3. Gel de almidón con tinción para las enzimas *Mdh* y *Pgi* en las cuáles se muestra la codificación de los loci y alelos para *Nothofagus pumilio*.

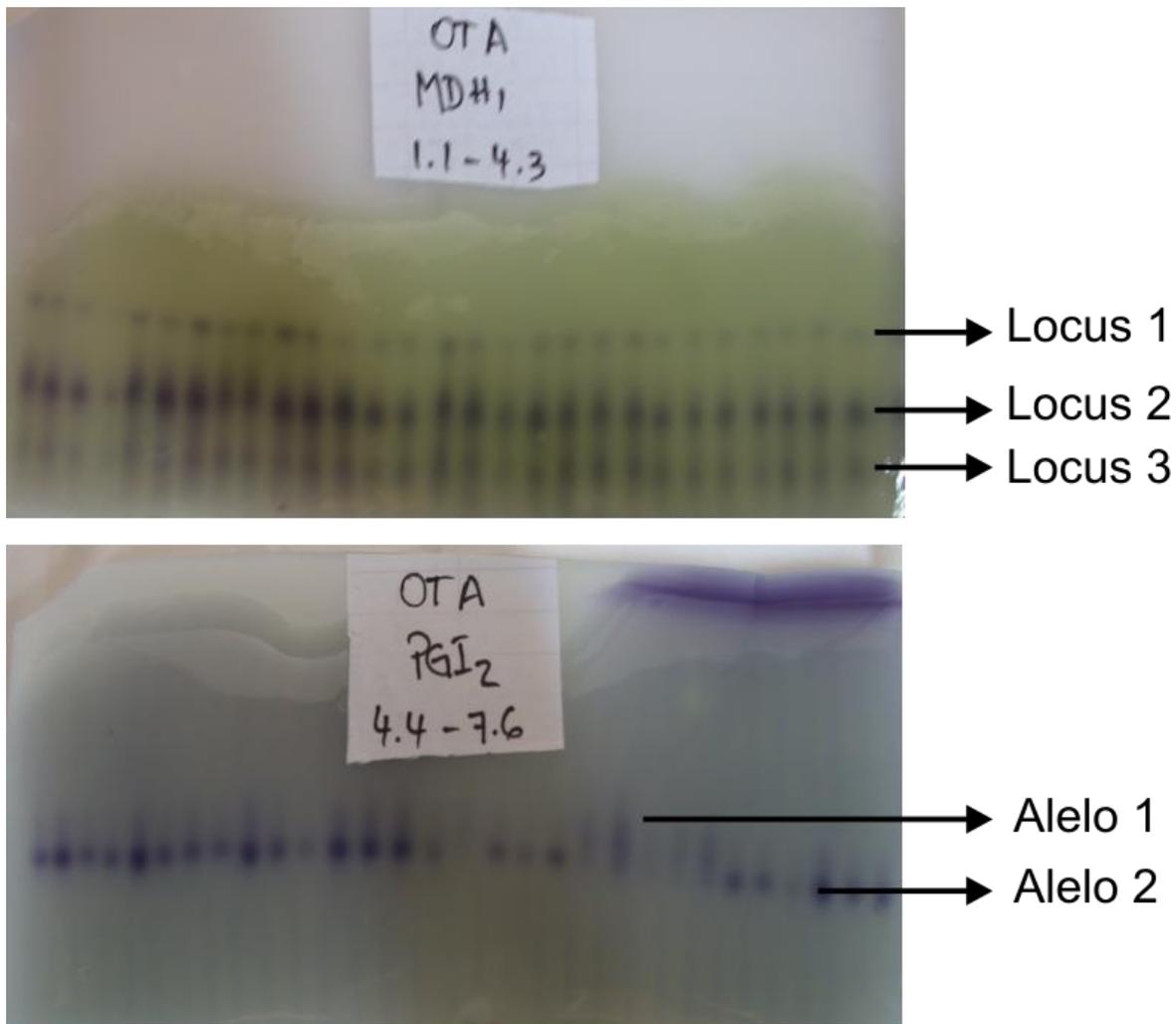


Figura IV.4. Gráfico mostrando la salida del secuenciador de ADN donde se muestran distintos alelos para los dos loci de microsatélites (*ncutas04* y NnBIO111) analizados en *Nothofagus pumilio*.

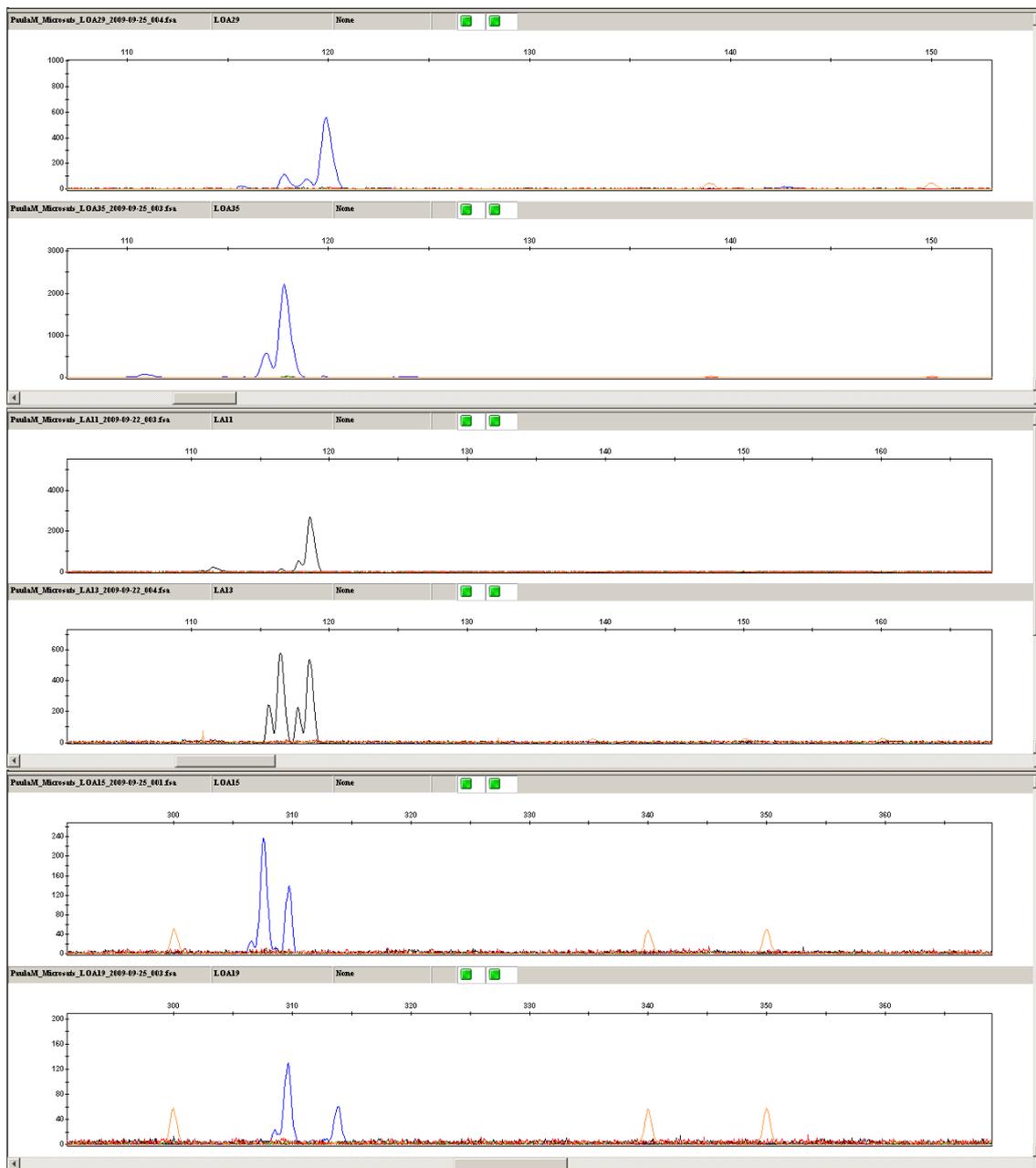


Figura IV.5. Distribución en los ejes de coordenadas XY dentro de la parcela de 1 ha de los 50 individuos de *Nothofagus pumilio* en los cerros: Challhuaco (CH1042, CH1684), López (LO1213, LO1563), y Otto (OT1208, OT1406).

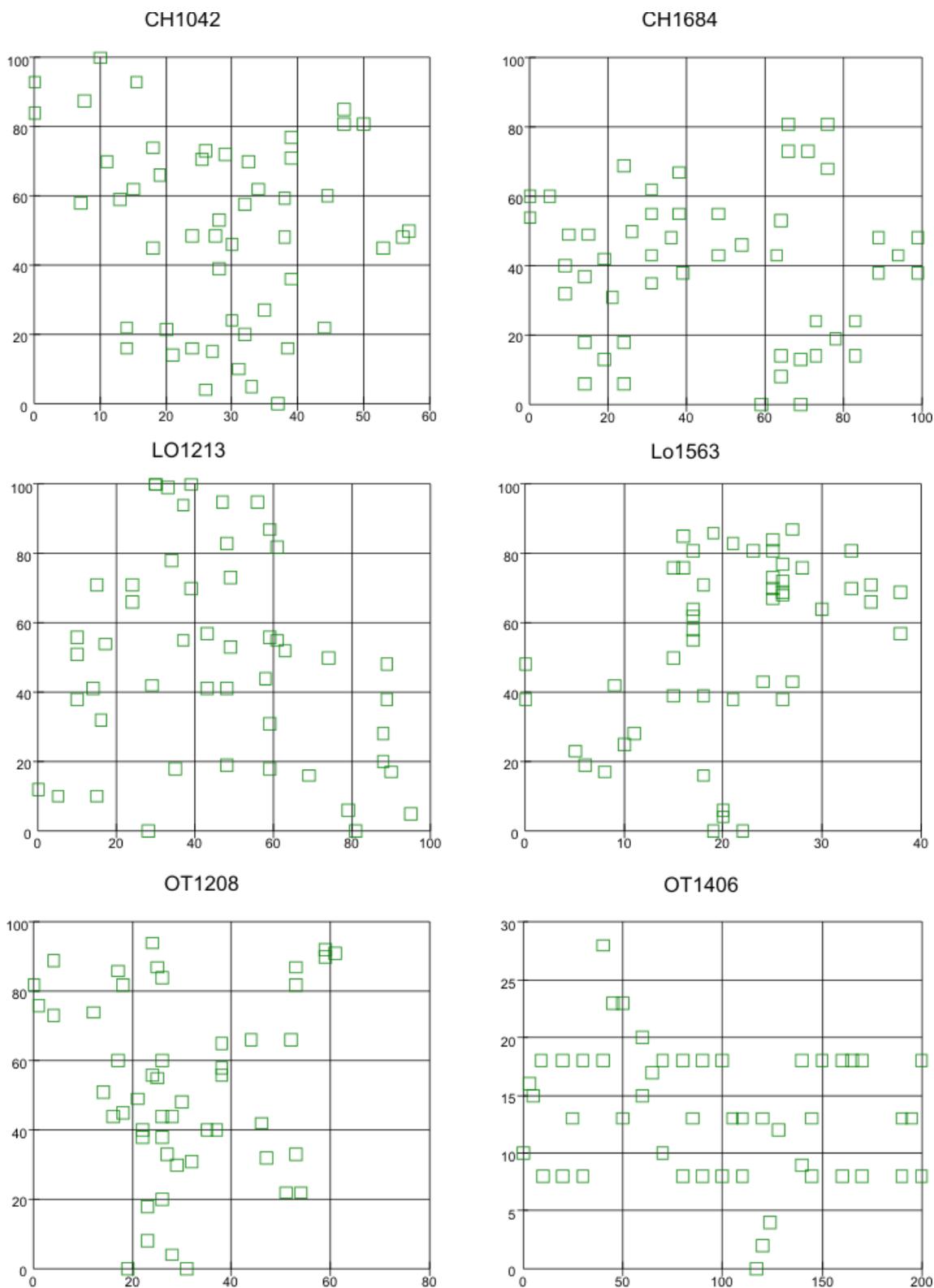


Figura IV.6. Regresión lineal simple entre el diámetro (DAP) y la edad de los árboles de *Nothofagus pumilio* para los sitios de arriba (a) y de abajo (b). r^2 es el porcentaje de la variación en la variable dependiente explicada por la variable independiente, y P es la significancia. Las líneas punteadas indican los intervalos de confianza del 95%.

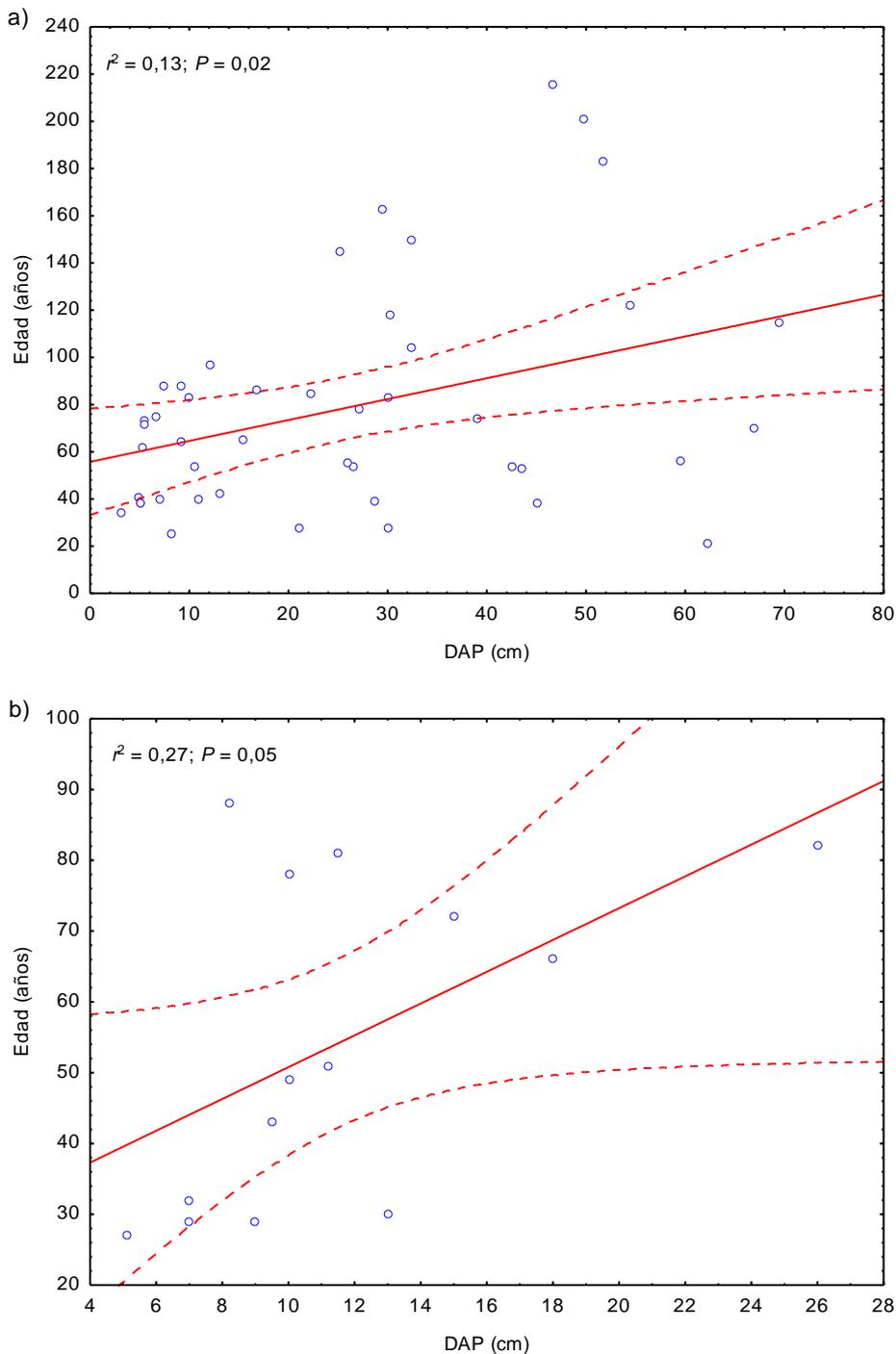


Figura IV.8. Distribución de las frecuencias de diámetros de los árboles en clases cada 10 cm para los sitios del límite altitudinal inferior y sus correspondientes del límite altitudinal superior en *Nothofagus pumilio* en los tres cerros estudiados. CH, Cerro Challhuaco; LO, Cerro López; y OT, Cerro Otto.

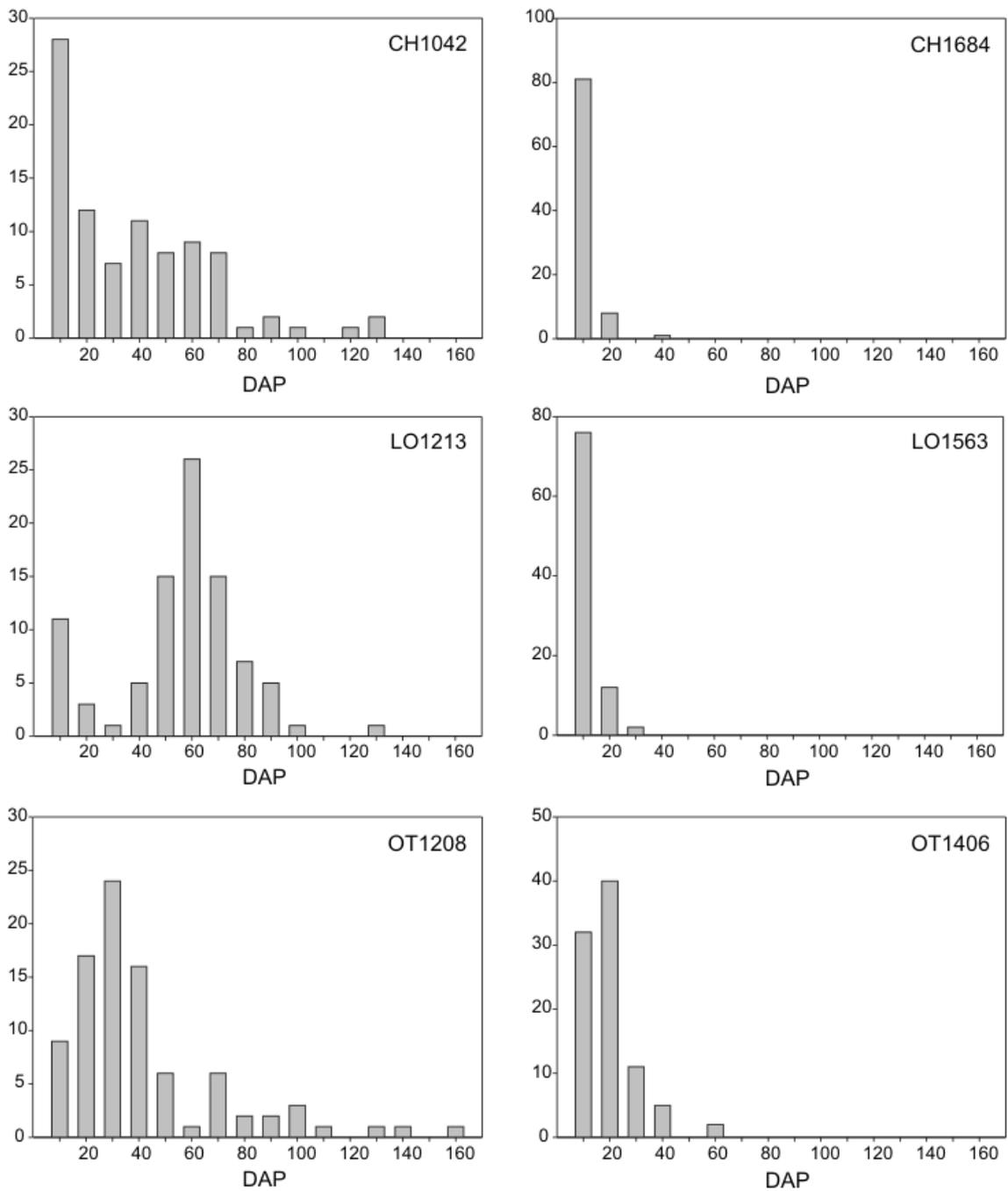


Figura IV.9. Correlogramas de los índices promedio I de Moran para cada sitio de *Nothofagus pumilio* en condiciones contrastantes del gradiente altitudinal. Se definieron 10 clases de distancia en intervalos de 8 m. las líneas celestes y verdes representan los intervalos de confianza del 95% superior e inferior, respectivamente, obtenidos por simulaciones de Monte Carlo con 1000 permutaciones.

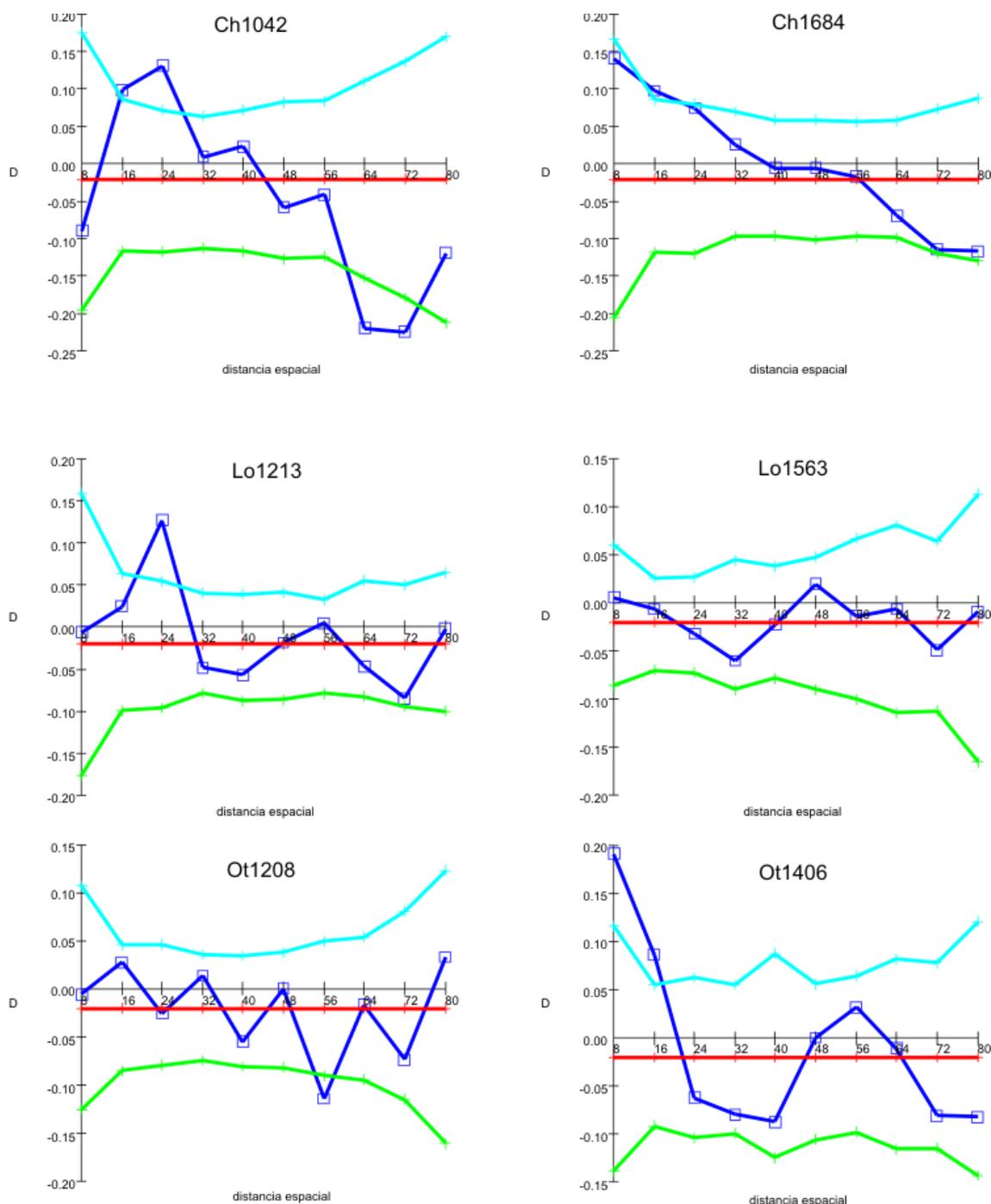
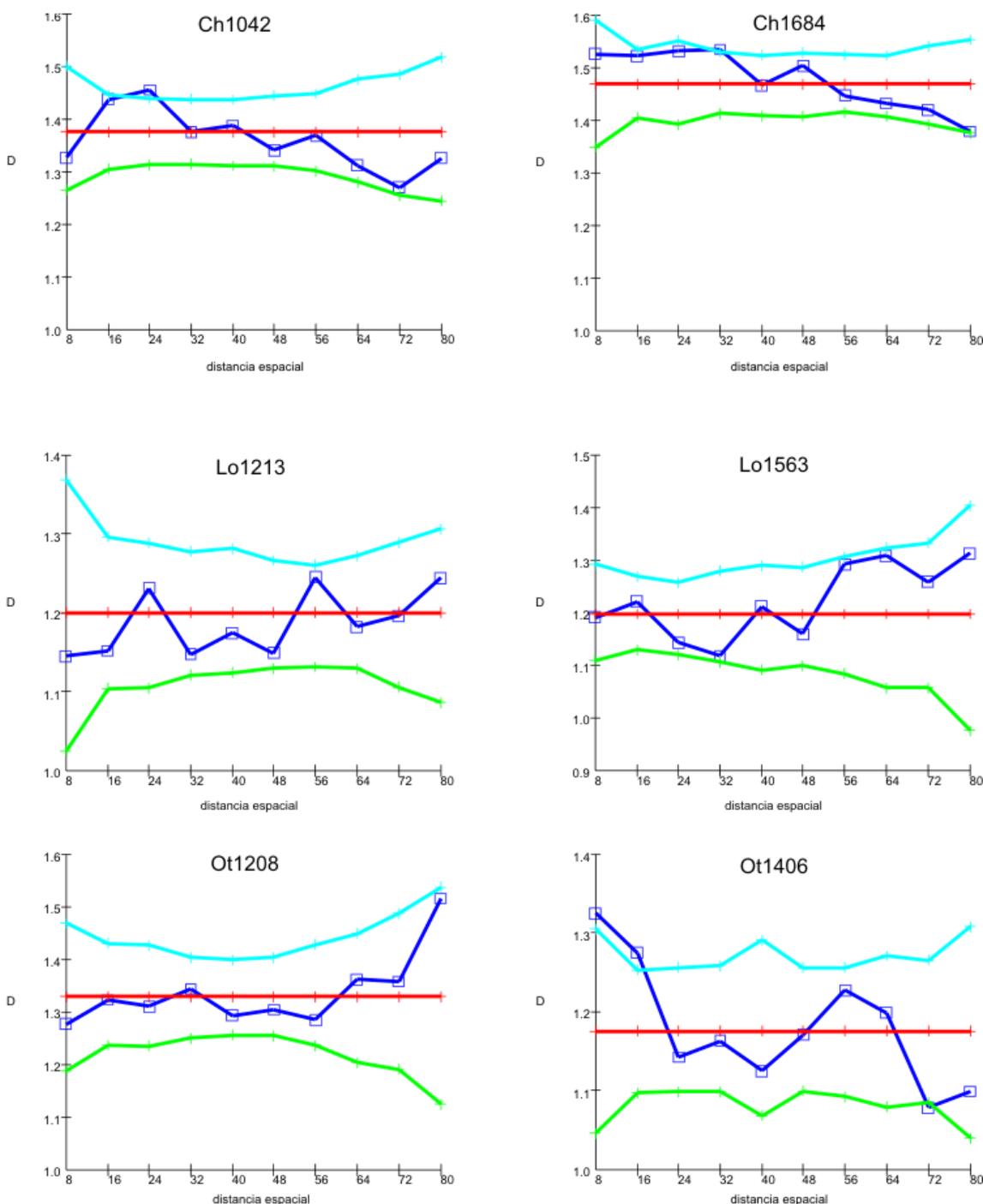


Figura IV.10. Número de alelos en común para cada sitio de *Nothofagus pumilio* en condiciones contrastantes del gradiente altitudinal. Se definieron 10 clases de distancia en intervalos de 8 m. Las líneas celestes y verdes representan los intervalos de confianza del 95% superior e inferior, respectivamente, obtenidos por simulaciones de Monte Carlo con 1000 permutaciones.



5. Capítulo V: “Variación en caracteres cuantitativos de *Nothofagus pumilio* sugiere respuestas adaptativas a condiciones contrastantes del gradiente altitudinal”



5.1. Resumen

Las condiciones contrastantes que existen a lo largo del gradiente altitudinal generan presiones diferenciales de selección sobre las plantas que habitan en dichos sitios. En respuesta a esto, se encontrará una gran variación morfológica en especies que poseen un amplio rango de distribución geográfica o amplitud ecológica. En particular, en *N. pumilio*, muchas de las diferencias morfológicas encontradas en alturas contrastantes del gradiente altitudinal mostraron tener una base genética. En este capítulo se evaluó el valor adaptativo de las diferencias encontradas en condiciones contrastantes del gradiente altitudinal, mediante un experimento de trasplantes recíprocos establecido en el Valle del Challhuaco. En el año 2005 220 plantas de distintos orígenes (arriba y abajo) fueron trasplantadas recíprocamente y posteriormente monitoreadas a lo largo de tres períodos de crecimiento. Se realizaron mediciones de crecimiento, mortalidad, morfología foliar y fenológicas. Los resultados encontrados en este estudio muestran que el origen de las plantas determina el crecimiento de las mismas. Si bien el crecimiento de las plantas de arriba es mayor en sitios de menor altitud, éste no supera al de las plantas originarias de abajo, sugiriendo adaptación a presiones de selección extremas que estarían fijadas genéticamente. Por el contrario, las plantas que habitan en menores altitudes cuando son trasplantadas a sitios con condiciones más extremas, superan en crecimiento a las plantas originarias de arriba, lo que muestra una mayor plasticidad sugiriendo una relativa ventaja competitiva de las plantas de abajo creciendo en ambientes de altura. Esta plasticidad también se vio en caracteres foliares y fenológicos. Los resultados de este capítulo muestran respuestas adaptativas y plásticas que han permitido la supervivencia local de *N. pumilio* a lo largo del tiempo en Patagonia.

5.2. Introducción

Las variaciones en el medio físico imponen condiciones heterogéneas para las especies de plantas que lo habitan. Especialmente en ambientes montañosos, las condiciones ambientales, tales como la temperatura, la radiación solar, la exposición al viento y las características del suelo varían marcadamente a lo largo del gradiente altitudinal en distancias de unos pocos cientos de metros. En el extremo superior de un marcado gradiente altitudinal, los ambientes de altura imponen restricciones severas para la reproducción y establecimiento de las plantas, debido a un acortamiento de la estación de crecimiento, a las bajas temperaturas y a la persistencia de la cobertura de nieve (Jones 1992, Larcher 1995, Premoli 2004). En respuesta a esto, se encontrará una gran variación morfológica en especies que poseen un amplio rango de distribución geográfica o amplitud ecológica. Esta variación puede estar explicada no sólo por la capacidad de adaptación de dichas especies a distintos ambientes (plasticidad fenotípica) sino también por la selección diferencial de genotipos bajo distintas condiciones de un gradiente ambiental (Cordell *et al.* 1998; Oleksyn *et al.* 1998). Se han realizado varios estudios sobre la variación que presentan algunas especies de plantas a lo largo de gradientes altitudinales en las características genéticas y fenotípicas (Ohsawa & Ide 2007, y referencias). Los experimentos de traslocación, ya sean de trasplantes recíprocos o a un jardín común, pueden revelar las ventajas selectivas de las diferencias genéticas entre las poblaciones (Huenneke 1991). En particular, el establecimiento de jardines comunes, i.e. condiciones de crecimiento homogéneas para las plantas de distintas procedencias, permite evaluar el efecto genético sobre la variación en caracteres fenotípicos (Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007). Experimentos realizados en numerosos estudios (Turesson 1922, Clausen *et al.* 1940, 1948)

demonstraron que en varios casos estas diferencias persistían aún cuando plantas provenientes de distintas poblaciones crecían bajo condiciones uniformes, indicando que estas diferencias se deben a diferencias genéticas y no a respuestas de plasticidad fenotípica. Sin embargo, esto por sí mismo no provee información del valor adaptativo de tales diferencias. Por otro lado, los trasplantes recíprocos, *i. e.* experimentos en donde plantas o semillas en ambientes contrastantes son retiradas de su ambiente natural para ser traslocadas recíprocamente a un ambiente distinto al de origen, permiten comparar la capacidad de adaptación de los individuos en condiciones diferentes a las de origen. En general, especies con altos niveles de plasticidad fenotípica contienen una baja diferenciación genética (Linhart & Grant 1996). Las respuestas genéticas de las plantas en muchos casos se estudian mediante marcadores genéticos neutros. A diferencia de los estudios de jardines comunes y trasplantes recíprocos que requieren un esfuerzo de colecta, germinación, cultivo y monitoreo, estos permiten analizar un gran número de individuos y poblaciones con relativamente mayor facilidad. Para este tipo de estudios poblacionales los marcadores co-dominantes neutros comúnmente utilizados pueden consistir de isoenzimas, las cuales son enzimas que catalizan una reacción particular en el ciclo metabólico de las plantas. Las enzimas que difieren en su movilidad electroforética como resultado de diferencias alélicas en un gen particular, son llamadas aloenzimas. Más recientemente se han desarrollado técnicas de microsatélites, éstos últimos son secuencias de ADN en las que un fragmento se repite de manera consecutiva. La variación en el número de repeticiones crea diferentes alelos los cuales se distinguen entre sí por la longitud total del fragmento. Generalmente se encuentran en zonas no codificantes del ADN y por lo tanto poseen una alta tasa de mutación, lo que los hace muy polimórficos. Sin embargo, por tratarse de marcadores neutros, no permiten analizar el valor adaptativo de las diferencias encontradas.

Recientemente se han desarrollado métodos en los que se compara la variación observada en caracteres cuantitativos (Q_{ST}) con la variación genética calculada mediante marcadores moleculares (F_{ST}). En poblaciones creciendo bajo diferentes condiciones ambientales, las presiones de selección pueden favorecer a un genotipo en particular para cada ambiente lo que produciría una diferenciación poblacional (Jordan 1991, Nagy 1997). Para caracteres neutros, *i. e.* que no están bajo selección, la variación genética tendería a ser similar en los distintos ambientes, consecuentemente los valores de Q_{ST} y F_{ST} deberían ser iguales (McKay & Latta 2002). Por lo tanto la relación que existe entre los valores de Q_{ST} y F_{ST} puede ser utilizada para inferir el grado de adaptación local (Spitze 1993; Merilä & Crnokrak 2001). Cuando $Q_{ST} = F_{ST}$, las diferencias observadas en los distintos ambientes sólo podrían ser explicadas por procesos de deriva genética en ausencia de selección. Por otro lado, cuando $Q_{ST} > F_{ST}$, la variación genética cuantitativa es mayor que la variación molecular, esto es comúnmente interpretado como evidencia de selección diversificadora y adaptación local; mientras que si $Q_{ST} < F_{ST}$, se asume que la selección estabilizadora estaría favoreciendo a un mismo fenotipo en distintos ambientes (Volis *et al.* 2005, y referencias). Por esto, el Q_{ST} es particularmente importante ya que da una idea de la capacidad de las poblaciones de evolucionar en respuesta a los cambios ambientales (Reed & Frankham 2001).

El NO de la Patagonia se caracteriza por poseer marcados gradientes ambientales generados por la presencia de la Cordillera de los Andes. En particular las marcadas diferencias ambientales, como las diferencias de precipitación, temperatura y persistencia de la cobertura de nieve, que ocurren a lo largo del gradiente altitudinal, restringen severamente la reproducción y el establecimiento de las especies de plantas debido a un acortamiento del período de crecimiento, a las bajas temperaturas, y la

persistencia prolongada de la cobertura de nieve. Esto juntamente con un restringido flujo génico dentro y entre poblaciones provocaría un incremento en la diferenciación genética resultando en una compleja estructura genética. En particular, dichas restricciones al flujo génico dentro de las poblaciones pueden ocurrir por restringida dispersión de semillas y establecimiento local de propágulas emparentadas generando una estructura genética significativa (ver Capítulo IV). También, el flujo génico limitado, puede ocurrir a lo largo de gradientes ambientales, debido a diferencias fenológicas que aíslan reproductivamente aún a poblaciones contiguas (Premoli *et al.* 2007). Este es el caso de *Nothofagus pumilio*, especie que caracteriza los bosques montanos y altoandinos de Patagonia. Esta especie presenta una marcada variación en las formas de crecimiento a lo largo del gradiente altitudinal. En el extremo inferior del gradiente altitudinal, la especie crece como árboles erectos formando básicamente bosques puros, mientras que en el límite altitudinal superior las plantas presentan una forma achaparrada o de “*krummholz*” principalmente debido a las condiciones extremas que presentan dichos sitios (Premoli 2004).

N. pumilio es una especie que posee una enorme amplitud ecológica (Donoso 1995) que habita un rango amplio de distribución tanto latitudinal como altitudinal dentro del Bosque Templado Austral y para la cual se han descrito patrones de variación en distintas características fenotípicas en condiciones naturales a lo largo del gradiente altitudinal. Dichos estudios evidencian la existencia de variación altitudinal en características fisiológicas (Premoli & Brewer 2007), seminales (Premoli 2004), fenológicas (Rusch 1993, Barrera *et al.* 2000), morfológicas (Rusch 1993), estructurales (Barrera *et al.* 2000, Cuevas 2000) y genéticas (Premoli 2003). Además, experimentos realizados en jardín común bajo condiciones homogéneas demuestran que la variación

en caracteres ecofisiológicos, de crecimiento de los individuos, de morfología foliar y fenológicos posee una base genética (Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007).

5.3.Objetivos particulares

El objetivo de este capítulo es evaluar el valor adaptativo de las diferencias genéticas encontradas en *N. pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal mediante el análisis de caracteres cuantitativos en un diseño de trasplantes recíprocos.

5.4.Hipótesis particulares

Las hipótesis y predicciones planteadas en este capítulo fueron las siguientes:

H5.1) Las diferencias genéticas de *N. pumilio* en el gradiente altitudinal se traducen en diferencias morfológicas en caracteres con valor adaptativo.

P5.1) Las plantas trasplantadas mantendrán características de crecimiento (arquitectura de los individuos, morfología de las hojas, tasa de crecimiento) de su sitio de origen (respuesta genética).

H5.2) Las condiciones extremas de temperatura y humedad relativa limitan el crecimiento de *N. pumilio* en sitios de altura.

P5.2.1) Las plantas de arriba creciendo en condiciones climáticas menos estresantes liberarán su crecimiento.

P5.2.2) En años donde las condiciones climáticas sean extremas habrá mayor mortalidad de plántulas, especialmente en el sitio de arriba.

H5.3) El retraso en el inicio y la menor duración del período de crecimiento en altura producirá cambios en la fenología de las plantas de *N. pumilio*.

P5.3) Las plantas de altura mostrarán un retraso en la apertura de las hojas con respecto a las plantas de abajo y además los tiempos fenológicos serán más cortos.

5.5. Materiales y Métodos

Sitio de estudio y colección de las plántulas: el estudio se realizó en el Valle del Challhuaco (41° 15' S; 71° 18' O) dentro del Parque Nacional Nahuel Huapi (Fig. V.1), donde anteriormente se han realizado estudios a escalas espaciales reducidas de cientos de metros a lo largo del gradiente altitudinal en características fisiológicas (Premoli & Brewer 2007), seminales (Premoli 2004), morfológicas (Premoli *et al.* 2007) y de diversidad genética para esta especie (Premoli 2003). Durante el mes de Noviembre de 1999 se colectaron 250 plántulas seleccionadas al azar que habían germinado en condiciones naturales provenientes de dos sitios ubicados en alturas contrastantes del gradiente altitudinal. El sitio de altura está ubicado por debajo del límite altitudinal

superior del bosque. Debido a que las tasas de germinación de *N. pumilio* bajo condiciones experimentales son muy reducidas (Premoli 2004) las plántulas fueron colectadas en el campo en dos sitios a 1100 y 1540 m s.n.m. en el Valle del Challhuaco y fueron colocadas en bandejas plásticas con el suelo de origen para evitar el estrés del trasplante. Una vez en el invernadero, las plántulas fueron separadas del suelo, se lavaron las raíces, se rotularon y se plantaron en macetas individuales, que variaron de 1 a 3 L durante su crecimiento, utilizando una mezcla comercial de 80% tierra negra / 20% humus. Luego fueron cultivadas durante 4 años bajo condiciones homogéneas de riego y fertilizante en un invernadero con luz natural en el Laboratorio Ecotono (Universidad Nacional del Comahue, Bariloche), ubicado a 876 m s.n.m. y a 10 km del sitio de colecta. Las plántulas fueron ubicadas en forma aleatoria dentro del invernadero y fueron rotadas periódicamente para minimizar las diferencias debido a los efectos micro-ambientales (Fig. V.2).

Diseño de trasplante recíproco: Durante el año 2005, 220 de las plántulas cultivadas en invernadero fueron trasplantadas al Valle del Challhuaco mediante un diseño de trasplante recíproco en dos sitios ubicados en los extremos del gradiente altitudinal a 1258 y 1549 m s.n.m. Esta ubicación corresponde a las alturas contrastantes de destino, DB y DA para destino de baja altitud y de arriba, respectivamente. En cada sitio se plantaron un total de 110 plántulas, 55 cuyo origen era el sitio de baja altitud y 55 originarias del sitio de altura. Las mismas se distribuyeron al azar dentro de clausuras contra liebre u otros mamíferos (Fig. V.3). El origen por lo tanto se indicó como OB y OA, para las plántulas cuyo origen era de baja y alta altitud, respectivamente. Durante los cuatro años subsiguientes (períodos de crecimiento, 2006-2007, 2007-2008, 2008-2009) se midió el crecimiento, se colectaron hojas para mediciones de morfología foliar, y se registró el estado fenológico de cada plántula. Las

mediciones de crecimiento, colecta de hojas y mortalidad se realizaron al final de cada estación de crecimiento. Además, se instalaron dispositivos electrónicos (*data loggers*, HOBO, Onset) que fueron programados para registrar mediciones de temperatura (T) y humedad relativa (RH) cada tres horas durante los cuatro años.

Mediciones de crecimiento: las características morfológicas de las plántulas de *N. pumilio* fueron cuantificadas siguiendo la metodología descrita por Premoli *et al.* (2007) mediante la altura total de la plántula, medida sobre el eje de mayor longitud, y el número total de ramas mayores a 1 cm presentes sobre ese eje durante cada período de crecimiento. Todas las plántulas fueron medidas en el invernadero antes de ser trasplantadas al campo a fin de considerar posibles efectos del tamaño inicial sobre el crecimiento. La mortalidad de las plántulas entre cada período de crecimiento se cuantificó como el porcentaje de plantas que murieron respecto del total de plántulas trasplantadas vivas al inicio del experimento y de plantas sobrevivientes para cada año.

Mediciones de caracteres foliares: la morfología foliar fue evaluada mediante mediciones realizadas sobre 10 hojas colectadas al azar en cada plántula durante el mes de Marzo de 2008 las que fueron escaneadas con un escáner Epson (Epson CX 5600). Las imágenes digitales fueron utilizadas para medir el tamaño y la forma de las hojas utilizando el programa SigmaScan Pro 5.0. El tamaño de las hojas se evaluó mediante el área foliar total, el perímetro, el ancho y largo máximo de la hoja. La forma de la hoja se describió mediante la relación entre el ancho y el largo de la hoja (de aquí en más ancho/largo), la relación entre el largo desde la inserción del pecíolo hasta el ancho máximo y el ancho de la hoja (de aquí en más forma), y la relación entre perímetro y la raíz cuadrada del área (patrón de dentición).

Diferenciación de caracteres morfológicos: la estimación de las diferencias en caracteres cuantitativos entre los distintos tratamientos del trasplante recíproco se analizó mediante el cálculo de los índices Q_{ST} entre pares de tratamientos. Estos índices fueron calculados para los caracteres de crecimiento y de morfología foliar como la relación entre la varianza entre y dentro de cada tratamiento ($Q_{ST} = V_E / 2 V_D + V_E$; donde V_E representa la varianza entre poblaciones, y V_D la varianza dentro de las poblaciones) según Merilä & Crnokrak (2001). La varianza entre tratamientos se calculó entre las hojas de todos los tratamientos ($N = 99$) y la varianza dentro de tratamientos se calculó para cada tratamiento por separado (DA-OA: $N = 29$; DA-OB: $N = 26$; DB-OA: $N = 14$; DB-OB: $N = 29$).

Mediciones de fenología foliar: las observaciones fenológicas se realizaron a lo largo del proceso de foliación desde la apertura de las yemas hasta la expansión foliar total durante los meses de Septiembre a Noviembre en los años 2005 y 2006. Se registró el estado fenológico de cada plántula cada 7 días durante 2 meses y medio según la metodología utilizada por Premoli *et al.* (2007). Las categorías analizadas fueron según las establecidas por Rusch (1993): yemas en reposo, yemas hinchadas, hojas recién abiertas, y hojas expandidas. Cada plántula fue asignada a una determinada categoría cuando al menos una yema y/o hoja había alcanzado alguna de las fases fenológicas. No se realizaron mediciones en los años subsiguientes debido a que las plántulas del sitio de arriba ya habían brotado debajo de la capa de nieve y no fue posible registrar el estado fenológico antes de que se retire la nieve.

Mediciones de variables climáticas: las mediciones de temperatura (T) y humedad relativa (RH) registradas por los *data loggers* fueron utilizadas para obtener variables climáticas biológicamente relevantes (variables bioclimáticas), basados en las

variables bioclimáticas propuestas en la base de datos de WORLDCLIM (<http://www.worldclim.org/bioclimate.htm>). Estas variables derivan de los valores mensuales de temperatura humedad y precipitación que representan tendencias anuales (*e. g.*, temperatura media anual, precipitación media anual), estacionalidad (*e. g.*, rango anual de temperatura y estacionalidad de la precipitación) y valores extremos o límites de los factores medioambientales (*e. g.*, temperatura de los meses más frío y más cálido, y precipitación de los meses más seco y más húmedo). En este estudio se calcularon variables bioclimáticas para distintos períodos de tiempo: período anual, el tercio más cálido y seco (entre los meses de Diciembre a Febrero), el tercio más frío y húmedo (entre los meses de Junio a Agosto), y para la estación de crecimiento (entre los meses de Octubre a Mayo). Las variables bioclimáticas consideradas en este estudio para cada período incluyen: la temperatura promedio (T_{MED}), la temperatura máxima (T_{MAX}) y mínima (T_{MIN}), el porcentaje de días en que la temperatura era inferior a $0^{\circ}C$ ($T_{<0^{\circ}C}$, lo que da idea del número de días en que hubo heladas), la humedad relativa por ciento (HR) y el porcentaje de días en que la humedad relativa fue menor al 50% ($HR_{<50\%}$, lo que da una idea del número de días en que hubo déficit hídrico). Además, se realizó una correlación de Pearson entre la temperatura y la humedad relativa durante los períodos anual, de crecimiento y cálido/seco con el programa STATISTICA v.7.0. Para evaluar el balance hídrico en cada sitio experimental se realizó un test de homogeneidad de pendientes de la relación entre la temperatura y humedad con el programa STATISTICA v.7.0.

Análisis de datos: los análisis morfológicos de cada individuo fueron realizados sobre tres períodos de crecimiento (2006-2007, 2007-2008, 2008-2009), lo que permite

la comparación de los patrones de crecimiento de cada sitio de origen a lo largo del tiempo. Las variables dependientes fueron el largo total y el número de ramas. Los efectos combinados de los distintos tratamientos (sitio de origen) y el período de crecimiento (tiempo) sobre las variables dependientes fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de mediciones repetidas (Gurevitch & Chester 1986), los cuáles determinan si las diferencias en las variables respuesta entre los sitios de origen varían a lo largo del tiempo. La normalidad de los residuales entre los valores observados y esperados de las variables dependientes fue evaluada mediante gráficos de normalidad (Sokal & Rohlf 1981). Para analizar el efecto del crecimiento para cada período se realizaron comparaciones (independent planned comparisons, Mead 1988) para cada uno de los siguientes contrastes: 2006-2007, 2007-2008, y 2008-2009. Para controlar por el efecto potencial de la altura inicial (A_i) de las plantas en el momento del trasplante sobre el largo total (A_f), se calculó la tasa de crecimiento relativa como $RGR = \ln(A_f/A_i)$ y se realizó una regresión de este valor contra el $\ln(A_i)$ para las plantas con los distintos tratamientos. La altura inicial fue medida en el invernadero previo al trasplante de las plántulas. Para analizar la dependencia diferencial de la RGR con la altura total para las plantas de los distintos orígenes durante los 4 años del experimento a campo, se compararon las pendientes de las rectas de regresión mediante un test de homogeneidad de pendientes. Las diferencias en el RGR de las plántulas de los distintos orígenes se analizaron testeando la intercepción, es decir la posición vertical en el gráfico de la relación entre RGR y el $\ln(A_i)$, mediante un test de homogeneidad de pendientes. Las diferencias entre los distintos orígenes y tratamientos en las variables de crecimiento (altura y número de ramas) y de morfología foliar (área, ancho, largo/ancho, forma) fueron analizados mediante análisis de varianza (ANOVA) de una vía. Luego se realizaron análisis *a posteriori* de comparaciones múltiples o test de

Tukey para identificar diferencias significativas entre la media de cada tratamiento e identificar los distintos grupos homogéneos. La relación entre las variables climáticas y el crecimiento de las plantas se analizó mediante análisis de regresión múltiple. Las diferencias fenológicas entre las plantas de los distintos orígenes en cada fecha fueron analizadas mediante test de chi-cuadrado, comparando la frecuencia de plantas en cada fase fenológica. El retraso fenológico de las plantas originarias del sitio de arriba fueron analizadas mediante test de chi-cuadrado entre la frecuencia de individuos en cada fase fenológica del sitio de arriba en un tiempo $T_{(i)}$ versus la frecuencia de individuos en esa misma fenofase del sitio de abajo en un tiempo $T_{(i-1)}$. Todos los análisis estadísticos fueron realizados utilizando el programa STATISTICA v.7.0.

5.6.Resultados

Crecimiento de las plántulas bajo los distintos tratamientos: Los resultados del monitoreo del crecimiento de las plántulas a nivel individual mediante análisis de ANOVA de mediciones repetidas indican que el número de ramas por planta varió significativamente a lo largo del tiempo bajo los distintos tratamientos (Tabla V.1). Sin embargo, las plantas bajo los distintos tratamientos produjeron en total, al final del tratamiento, un similar número de ramas (Fig. V.4). El incremento en altura de las plantas bajo los distintos tratamientos no mostró diferencias significativas a lo largo del tiempo ni entre tratamientos (Tabla V.1; Fig. V.4). Asimismo, el análisis de contrastes muestra que el incremento en altura promedio de cada planta varió en los distintos periodos de crecimiento a lo largo de la duración del experimento del trasplante recíproco (Tabla V.2). Las plantas con destino y origen de abajo (DB-OB) presentaron

en promedio mayor incremento en el número de ramas (ramificación) que las plantas bajo los otros tratamientos durante los períodos de crecimiento 2007-2008 y 2008-2009 (Tabla V.2). No se encontraron diferencias significativas para los distintos períodos de crecimiento en el incremento en la altura de las plantas bajo los distintos tratamientos.

En cuanto a la tasa de crecimiento relativo (RGR), las plantas en el sitio experimental de baja altitud presentaron valores significativamente ($P < 0,05$) mayores de $RGR \pm 1SD$ (DB-OA: $0,20 \pm 0,37$; DB-OB: $0,30 \pm 0,45$) que las plantas del sitio experimental de altura (DA-OA: $0,07 \pm 0,05$; DA-OB: $0,09 \pm 0,13$). El test de pendientes de las tasas de crecimiento relativo de las plántulas arrojó diferencias significativas entre los distintos tratamientos del trasplante recíproco desde el inicio hasta el final del experimento (Fig. V.5).

Las variables de crecimiento mostraron diferencias significativas entre las plantas en el jardín común y las sometidas a los distintos tratamientos en el campo en los distintos años (Tabla V.3). La altura inicial, medida en condiciones de jardín común, fue significativamente mayor en las plantas originarias de abajo (Fig. V.6.a), mientras que el diámetro a la altura del cuello no mostró diferencias significativas entre las diferentes alturas (Fig. V.6.b). La altura de las plantas en el campo mostró diferencias significativas entre tratamientos en el sitio experimental de arriba para los años 2006, 2007 y 2009 y entre tratamientos en el sitio experimental de abajo para el año 2006 (Fig. V.7). En todos los casos la mayor altura fue alcanzada por las plantas cuyo origen es de menor altitud. En cambio, el número de ramas no presentó diferencias significativas entre tratamientos dentro de los dos sitios experimentales (dentro arriba y dentro abajo), pero sí entre los tratamientos entre los sitios experimentales de arriba y abajo (arriba vs abajo) para los años 2006, 2007 y 2008 (Fig. V.8). En particular, las

diferencias significativas para esos tres años fueron 2006: DA-OA y DA-OB > DB-OA, 2007: DA-OA y DA-OB > DB-OB y 2008: DA-OA > DB-OA. Es decir, en todos los casos el destino de arriba presentó el mayor número de ramas.

Caracterización climática de los sitios experimentales: en general el sitio experimental de mayor altitud presentó valores más bajos de temperatura y humedad relativa que el sitio experimental de baja altitud para los distintos períodos durante los años en que se realizaron las mediciones en el trasplante recíproco (Tabla V.4). El sitio experimental de altura ocurre en un rango de temperatura promedio anual de 3,6 a 5,1° C, mientras que la temperatura promedio anual en el sitio experimental de baja altitud osciló entre 4,4 y 6° C. De la misma forma, el sitio experimental de mayor altitud presentó mayor porcentaje de días durante el año con heladas o dicho de otra manera con menor porcentaje de días libres de heladas ($T_{<0^{\circ}\text{C}}$) y con déficit hídrico ($\text{HR}_{<50\%}$). La temperatura promedio durante la estación de crecimiento fue similar en ambos sitios experimentales así como también los días libres de heladas (Tabla V.4). La humedad relativa durante este período fue levemente mayor en el sitio experimental de abajo y además el sitio experimental de altura fue el que presentó mayor déficit hídrico durante el período de crecimiento en los tres años medidos (Tabla V.4). Los valores encontrados para las variables T_{MED} , T_{MAX} , T_{MIN} y $T_{<0^{\circ}\text{C}}$ para los períodos cálido/seco y frío/húmedo fueron similares entre los sitios experimentales de abajo y arriba, mientras que los valores de déficit hídrico fueron mayores en el sitio experimental de altura. Además, la humedad relativa está correlacionada significativamente con la temperatura promedio durante los distintos períodos (Tabla V.5). El test de homogeneidad de pendientes dio que la relación entre la humedad y la temperatura fue significativamente ($F_{(1,998)} = 141,01$, $P < 0,001$) mayor en el sitio de arriba para todos los períodos de tiempo analizados (Fig. V.9).

Los análisis de regresión múltiple arrojaron resultados significativos entre las variables bioclimáticas y las variables de crecimiento medidas en los distintos períodos (Tabla V.6). La tasa de crecimiento relativo (RGR) de las plantas con destino de arriba (DA-OA y DA-OB) arrojaron una relación significativa con la humedad en los períodos de crecimiento y cálido-seco (Fig. V.10). Las plantas con destino y origen de arriba (DA-OA) presentaron una relación significativa con la ramificación (se entiende ramificación como la diferencia en el número de ramas producidas entre un período de crecimiento determinado y el período anterior) a lo largo de los años, que fue positiva con el déficit hídrico durante el período de crecimiento (Fig. V.11.a), y negativa con la humedad relativa del período más cálido (Fig. V.11.b). La altura de las plantas con destino de arriba y origen de abajo (DA-OB) mostró una relación significativa negativa con la temperatura promedio anual de los distintos años (Fig. V.11.c). Las plantas con destino de abajo y origen de arriba (DB-OA) mostraron una relación significativa negativa entre la ramificación y la temperatura mínima durante el período de crecimiento (Fig. V.11.d). El número de ramas de las plantas con destino y origen de abajo (Ramas DB-OB) mostró una relación positiva significativa con la temperatura máxima de los períodos: anual (Fig. V.11.e), de crecimiento (Fig. V.11.f) y cálido/seco (Fig. V.11.g), y con el déficit hídrico del tercio más cálido/seco (Fig. V.11.h). Por otro lado, la ramificación de las plantas con destino y origen de abajo (DB-OB) presentó una relación significativa positiva con el déficit hídrico de los períodos anual (Fig. V.11.i) y de crecimiento (Fig. V.11.j). En cuanto a la mortalidad de las plántulas esta fue similar en los dos sitios experimentales (mortalidad arriba = 52%, mortalidad abajo = 47%). Las plantas con destino de arriba (DA-OA y DA-OB) fueron las únicas que arrojaron una relación significativa con las variables bioclimáticas (Tabla V.6). La mortalidad de las plantas con destino y origen de arriba (DA-OA) mostró una relación significativa

negativa con el número de días libres de heladas durante el año y con la temperatura media del período de crecimiento (Fig. V.12.a y b). La mortalidad de las plántulas con destino de arriba y origen de abajo (DA-OB) arrojaron una relación significativa negativa con T_{MED} , T_{MAX} y $T_{<0^{\circ}C}$ del período anual (Figs. V.12.c, d y e); y con T_{MED} y T_{MAX} del período de crecimiento y cálido/seco, respectivamente (Fig. V.12.f y g).

Mediciones de morfología foliar: Las distintas variables de morfología foliar medidas en *N. pumilio* en los dos sitios experimentales del trasplante recíproco presentaron diferencias significativas entre tratamientos (Tabla V.7). Las plantas con destino en el sitio experimental de arriba produjeron hojas significativamente más pequeñas ($P < 0,001$; Figs. V.13.a, b y c), más alargadas ($P < 0,001$; Figs. V.13.d y e) y fueron menos dentadas que las hojas en el sitio experimental de abajo ($P < 0,001$; Fig. V.13.f). Las variables de morfología foliar medidas en el sitio experimental de arriba no mostraron diferencias significativas entre tratamientos ($P > 0,05$; Fig. V.13). En el sitio experimental de abajo se encontraron diferencias significativas entre tratamientos para las variables de tamaño foliar ($P < 0,05$; Figs. V.13.a, b, y c), mientras que las variables de forma de las hojas no presentaron diferencias significativas ($P > 0,05$; Fig. V.13.d,e).

Diferenciación poblacional en caracteres cuantitativos: Las diferencias en el crecimiento de las plántulas arrojó en promedio un valor de $Q_{ST} = 0,35$ (rango 0,27 – 0,45). La altura de las plántulas presentó mayor variación en el sitio experimental de arriba, mientras que la variación en el número de ramas fue mayor en el sitio experimental de abajo (Tabla V.8). En cuanto a los distintos tratamientos, las plantas traslocadas (DA-OB y DB-OA) fueron las que presentaron mayor variación en la altura y número de ramas con respecto a las no traslocadas dentro de cada sitio experimental. La diferenciación poblacional medida por medio de la variación en caracteres de

morfología foliar fue en promedio $Q_{ST} = 0.52$ (rango 0,33 – 0,87). En general las plantas destinadas al sitio experimental de arriba fueron las que presentaron mayor variación en la forma y el tamaño de las hojas, mientras que las plantas de abajo creciendo en su lugar de origen presentaron menor diferenciación (Tabla V.8). Las comparaciones entre tratamientos dieron como resultado que las mayores diferencias entre orígenes ocurren dentro del sitio experimental de arriba para la altura de las plántulas y las características foliares, mientras que la diferencia en el número de ramas fue menor (Tabla V.9). Las plantas que presentaron valores menores de Q_{ST} entre tratamientos fueron las plantadas en su lugar de origen (DA-OA y DB-OB). Además, las plantas traslocadas (DA-OB y DB-OA) presentaron mayor variación que las no traslocadas (DA-OA y DB-OB).

Mediciones fenológicas: Las plantas con distintos orígenes presentaron diferencias fenológicas entre tratamientos en los sitios experimentales de baja y alta altitud. Durante las observaciones realizadas el primer año (2005) el experimento de abajo no arrojó diferencias entre orígenes (Fig. V.14.a), mientras que en el experimento de altura las plántulas con origen de altura mostraron un inicio más tardío de la expansión foliar, mientras que las de abajo expandieron sus hojas más tempranamente. Durante el segundo año de observación (2006) se encontró un retardo en la fenología particularmente de los estadíos BU y FE del experimento a baja altitud (Fig. V.14.b) y un mayor acoplamiento en las respuestas fenológicas de ambos orígenes en altura.

5.7. Discusión

Los resultados de este estudio demuestran que las plantas originarias de arriba y abajo poseen respuestas adaptativas y plásticas al crecer en alturas contrastantes. El incremento significativo de las plantas de abajo en ambas condiciones experimentales, particularmente en el sitio de altura, como así también el reducido crecimiento de las plantas provenientes de ambientes de altura al ser trasplantadas en sitios de menor altitud, sugiere que el crecimiento de las plantas de *N. pumilio* estaría fijado genéticamente. Esto a pesar que las plantas de arriba al ser introducidas en ambientes supuestamente más benignos de baja altitud (DB-OA) casi triplicaron la tasa de crecimiento que la que tuvieron las plantas de arriba creciendo en ambientes de altura (DA-OA). Es decir, el origen de las mismas determina su patrón de incremento del crecimiento. Por el contrario, en el tratamiento de altura las plantas tanto de arriba como de abajo, produjeron mayor cantidad de ramas durante los tres primeros años del experimento. Además las plantas con destino y origen de abajo (DB-OB) son las que presentaron mayores diferencias en la ramificación a lo largo de los distintos períodos de crecimiento y las que alcanzaron el mayor número de ramas al final del tratamiento. Esto sugiere que las plantas de *N. pumilio* tendrían una respuesta más plástica en cuanto a la ramificación.

Las variaciones anuales en el crecimiento y la ramificación observados en *N. pumilio* estarían estrechamente relacionadas con las variables bioclimáticas. En particular las plantas originarias de abajo se verían mayormente afectadas por la temperatura ya sea anual, del período de crecimiento o del período cálido/seco. En cambio las plantas de arriba se ven mayormente afectadas por el número de días libres de heladas durante el año y por la temperatura media de la estación de crecimiento. El

principal factor limitante del crecimiento en altura de las plántulas es la temperatura, mientras que la producción de ramas estaría además relacionada con el déficit hídrico. En años más secos y con temperaturas mayores las plántulas de *N. pumilio* crecerían menos en altura y producirían mayor número de ramas. Las diferencias significativas encontradas entre tratamientos de las plantas creciendo en el sitio experimental de arriba se relacionan a los efectos de la selección diversificadora que actúa en ambientes de mayor estrés favoreciendo a las plantas que están adaptadas a dichos ambientes. Por otro lado, la ausencia de diferencias en el sitio experimental de menor altitud se relaciona con respuestas fijadas genéticamente que limitan el crecimiento por ejemplo de las plantas provenientes de ambientes de altura en ambientes de baja altitud. Por el contrario los resultados sugieren una relativa ventaja competitiva de las plantas de abajo creciendo en ambientes de altura. Se encontró una tendencia de una mayor ramificación en las plantas creciendo en ambientes de altura independiente del origen aunque los patrones de ramificación podrían sugerir respuestas complejas ya que al final del tratamiento resultaron similares entre orígenes y tratamientos. Se encontraron diferencias significativas en distintas características foliares tanto de forma como de tamaño que demuestran respuestas adaptativas de *N. pumilio* a condiciones contrastantes de los ambientes que habita. Estos resultados confirman los resultados previos los cuales predicen que las diferencias encontradas en ambientes contrastantes donde habita *N. pumilio* habrían surgido en respuesta a condiciones ambientales extremas (Premoli *et al.* 2007).

El análisis de la diferenciación poblacional en caracteres cuantitativos mediante el Q_{ST} mostró que mientras que las plantas originarias de arriba presentan una mayor plasticidad en cuanto al tamaño de las hojas, pudiendo producir hojas más grandes cuando las condiciones son favorables, las plantas originarias de abajo producen hojas

de mayor tamaño independientemente del ambiente donde se encuentren. Sin embargo, el carácter de la forma de las hojas estaría fijado, ya que las plantas de arriba siempre producen hojas más alargadas y las de abajo más redondeadas lo cual estaría estrechamente relacionado con la irradiación (Givnish 1987, Premoli *et al.* 2007). Esto sería particularmente importante, dado que la forma de las hojas sería una ventaja adaptativa en sitios donde las condiciones de crecimiento son extremas ya que, junto con la forma de crecimiento de estas plantas (crecimiento lateral o achaparrado), y la iniciación más tardía de la foliación, estarían proporcionando un hábito de crecimiento favorable para ese tipo de ambientes. Los resultados presentados en el Capítulo IV muestran una diferenciación genética significativa ($F_{ST} = 0,128$ y $F_{ST} = 0,010$, para isoenzimas y microsatélites, respectivamente) entre los sitios del Challhuaco arriba y abajo. Este valor es menor que el valor de Q_{ST} encontrado para caracteres de crecimiento ($Q_{ST} = 0,35$) y morfología foliar ($Q_{ST} = 0,52$), lo que confirma que las presiones de selección estarían favoreciendo a distintos fenotipos en distintos ambientes y por lo tanto las poblaciones de *N. pumilio* estarían localmente adaptadas (Latta 2006). Por lo tanto, las diferencias genéticas de *N. pumilio* encontradas en marcadores neutros bajo condiciones contrastantes del gradiente altitudinal (Premoli 2003), que a su vez se traducen en diferencias entre caracteres cuantitativos (Rusch 1993, Barrera *et al.* 2000, Premoli & Brewer 2007, Premoli *et al.* 2007), han mostrado poseer valor adaptativo. Las plantas de *N. pumilio* que habitan en ambientes ubicados a mayor altitud han mostrado estar localmente adaptadas a ambientes de altura, pero a su vez poseen una relativamente limitada capacidad de respuesta cuando las condiciones climáticas son favorables tanto en el crecimiento como fenológicas. En cambio las plantas de menor altitud parecerían tener mayor plasticidad para responder a ambientes cambiantes. Esto se podría relacionar con el mayor polimorfismo genético medido en poblaciones de

menor altitud (Premoli 2003, Capítulo IV). En escenarios donde los cambios climáticos que están ocurriendo actualmente producen cambios en el rango de distribución de numerosas especies, comunidades y ecosistemas a nivel mundial (Parmesan & Yohe 2003), las plantas de bajas altitudes serían más propensas a sufrir las consecuencias negativas de estos cambios. Sin embargo, los datos acá presentados sugieren que *N. pumilio* tendría la posibilidad de ascender en el gradiente altitudinal y responder así a las condiciones adversas para el crecimiento bajo escenarios de calentamiento que sufrirían las poblaciones de menor altura.

Varios estudios han propuesto que las diferencias morfológicas observadas a lo largo de gradientes altitudinales también se ven reflejadas en diferencias genéticas. En particular, experimentos de jardín común realizados en *N. pumilio* han demostrado que diferencias en características arquitecturales, fenológicas y de morfología foliar poseen una base genética (Rusch 1993; Barrera *et al.* 2000; Premoli & Brewer 2007; Premoli *et al.* 2007). Sin embargo, no se ha demostrado el valor adaptativo de tales diferencias. En este capítulo se evaluó el valor adaptativo de caracteres cuantitativos (crecimiento de las plántulas, morfología foliar y fenología) medidos en *N. pumilio* mediante un diseño de trasplantes recíprocos durante tres períodos de crecimiento. Los resultados muestran respuestas adaptativas y plásticas que han permitido la supervivencia local de *N. pumilio* a lo largo del tiempo en Patagonia.

5.8. Tablas y Figuras

Tabla V.1. Resumen de los estadísticos del análisis de ANOVA de mediciones repetidas para los efectos de los distintos tratamientos con cuatro niveles (destino x origen) y el tiempo con tres niveles (períodos de crecimiento 2006-2009) sobre la altura y el número de ramas de las plántulas de *Nothofagus pumilio*.

Fuente de variación	Altura			Número de ramas		
	g. l. efecto	g. l. error	<i>F</i>	g. l. efecto	g. l. error	<i>F</i>
Tratamiento (Tr)	3	96	2,69	3	96	1,95
Tiempo (Ti)	2	192	2,61	2	192	8,38***
Tr x Ti	6	192	0,27	6	192	2,42*

* $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$. g. l. grados de libertad.

Tabla V.2. Diferencias en los valores promedio de las variables de crecimiento medidas en los distintos tratamientos del trasplante recíproco de las plántulas de *Nothofagus pumilio* durante los períodos de crecimiento comprendidos entre los años 2006 y 2009.

Período de crecimiento	Altura					Número de ramas				
	DA-OA	DA-OB	DB-OA	DB-OB	<i>F</i>	DA-OA	DA-OB	DB-OA	DB-OB	<i>F</i>
2006-2007	1,57	1,76	1,39	2,76	0,84	1,89	2,88	1,93	1,30	1,48
2007-2008	0,63	1,24	1,50	2,52	2,30	1,14	1,24	-0,71	1,39	2,70*
2008-2009	0,67	0,96	0,79	1,61	1,29	1,50	2,12	2,86	3,58	2,83*

Los contrastes fueron realizados entre las plantas con distintos tratamientos sobre la altura y el número de ramas. DA-OA: destino arriba, origen arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. Los números en negrita indican los valores significativamente mayores. * $P < 0,05$.

Tabla V.3. Variables de crecimiento promedio (\pm 1DS) y resultados del análisis de ANOVA de una vía entre plántulas de *Nothofagus pumilio* para los distintos tratamientos del trasplante recíproco (destino x origen) en el Valle del Challhuaco, medidas en el jardín común (*inicial*) y durante los períodos de crecimiento entre los años 2006 y 2009.

Variable	Año	DA-OA	DA-OB	DB-OA	DB-OB	F
Altura	<i>Inicial</i>	48,19 (1,84)			56,38 (1,55)	11,57***
	2006	40,39 (12,33)	49,81 (14,48)	30,91 (22,29)	42,15 (24,20)	7,07***
	2007	40,95 (15,66)	52,22 (14,85)	35,95 (21,68)	46,24 (24,07)	3,87*
	2008	40,20 (15,72)	48,92 (16,17)	37,32 (19,15)	46,51 (19,22)	2,30
	2009	39,74 (14,47)	50,51 (13,65)	40,44 (18,47)	48,47 (19,36)	3,71*
Número de ramas	2006	8,45 (3,20)	8,12 (2,63)	6,03 (4,55)	6,58 (3,80)	5,30**
	2007	10,36 (4,58)	11,56 (4,53)	8,59 (5,24)	7,65 (4,32)	5,99***
	2008	12,00 (4,64)	11,46 (5,57)	8,00 (4,4)	9,16 (4,19)	4,08***
	2009	12,36 (5,61)	13,54 (5,11)	11,00 (4,72)	12,55 (4,99)	0,94
Diámetro a la altura del cuello	<i>Inicial</i>	5,49 (0,13)			5,61 (0,12)	0,49

DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. Los números en negrita indican valores significativamente mayores. Los asteriscos indican: * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, y *** $P < 0,001$.

Tabla V.4. Caracterización bioclimática de los sitios experimentales de altura (A) y de baja altitud (B) en el Valle del Challhuaco, en los cuales se estableció el trasplante recíproco de las plántulas de *Nothofagus pumilio*.

Período	Variables bioclimáticas	2006		2007		2008	
		A	B	A	B	A	B
Anual	Temperatura promedio	4,6	5,3	3,6	4,4	5,1	6,0
	<i>T máxima</i>	18,3	17,9	17,8	18,0	19,4	21,0
	<i>T mínima</i>	-8,1	-5,3	-12,7	-12,0	-3,6	-4,6
	% días T < 0° C	78	13	71	24	97	20
	Humedad relativa (%)	67	82	62	74	61	72
	% días RH < 50%	26	0	32	4	56	10
	Estación de crecimiento	Temperatura promedio	8,6	9,0	8,5	8,5	10,3
<i>T máxima</i>		18,3	17,9	17,8	18,0	19,4	21,0
<i>T mínima</i>		-1,1	0,5	0,2	0,1	-1,0	0,2
% días T < 0° C		1	0	0	0	2	0
Humedad relativa (%)		64	80	57	67	55	63
% días RH < 50%		22	0	34	9	43	21
Período cálido y seco		Temperatura promedio	9,9	10,9	9,0	10,1	11,9
	<i>T máxima</i>	18,3	17,9	17,8	18,0	19,4	21,0
	Humedad relativa (%)	61,4	79,6	57,4	66,4	53,8	59,8
	% días RH < 50%	27	0	29	2	47	24
Período frío y húmedo	Temperatura promedio	-0,3	0,3	-2,2	-1,9	ND	-0,4
	<i>T mínima</i>	-8,1	-5,3	-12,7	-12,0	ND	-4,6
	Humedad relativa (%)	80,2	90,8	67,2	83,1	ND	87,7
	% días RH < 50%	11	0	19	1	ND	0

ND = no disponible

Tabla V.5. Valores de r obtenidos en las correlaciones de Pearson entre la temperatura y la humedad relativa en los distintos períodos de tiempo (anual, estación de crecimiento, tercio más cálido) para los sitios experimentales de arriba y abajo en el Valle del Challhuaco. * indica $P < 0,05$.

Período	Arriba	Abajo
Anual	-0,44*	-0,53*
Crecimiento	-0,51*	-0,39*
Cálido/seco	-0,50*	-0,65*

Tabla V.6. Regresiones múltiples entre las variables climáticas y las distintas variables de crecimiento de las plántulas de *Nothofagus pumilio* en distintos sitios experimentales y distintos orígenes del trasplante recíproco establecido en el Valle del Challhuaco.

Período	Variable dependiente	r^2	F	Variable independiente	β	t
Anual	Altura DA-OB	0,99	204,6*	T_{MED}	-0,97	-14,31*
	Ramas DB-OB	0,99	20722,4*	T_{MAX}	0,99	143,95*
	Ramificación DB-OB	0,99	3536,3*	$HR_{<50\%}$	0,99	59,47*
	Mortalidad DA-OA	0,99	258,1*	$T_{<0^\circ C}$	-0,99	-13,07*
	Mortalidad DA-OB	0,99	1680,3*	T_{MED}	-0,99	-40,99*
				T_{MAX}	-0,99	-23,01*
			$T_{<0^\circ C}$	-1,00	-265,00*	
Crecimiento	RGR DA-OA	0,99	321,15*	HR	1,00	17,92*
	RGR DA-OB	0,99	45538,95* *	$HR_{<50\%}$	-1,00	-213,40**
	Ramificación DA-OA	0,99	677,2*	$HR_{<50\%}$	0,99	26,02*
	Ramas DB-OB	0,99	20722,0**	T_{MAX}	0,99	143,95**
	Ramificación DB-OA	0,99	2335,2**	T_{MIN}	-0,99	-48,32**
	Ramificación DB-OB	0,99	3977,8**	$HR_{<50\%}$	0,99	63,07**
	Mortalidad DA-OA	0,99	578,7*	T_{MED}	-0,99	-24,06*
	Mortalidad DA-OB	0,99	448,9*	T_{MED}	-1,00	-21,19*
Cálido y seco	Ramas DB-OB	0,99	8046,8**	T_{MAX}	1,00	89,70**
				$HR_{<50\%}$	0,99	21,28*
	Ramificación DA-OA	0,99	11881,4**	HR	-1,00	-109,00**
	Mortalidad DA-OB	0,99	1032,7*	T_{MAX}	-1,00	-32,14*

Sólo se muestran las regresiones significativas (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$) y las variables independientes que entraron en el modelo. DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. T_{MED} , t° promedio; T_{MAX} , t° máxima; T_{MIN} , t° mínima; HR, humedad relativa; $HR_{<50\%}$, porcentaje de días que HR fue menor al 50%.

Tabla V.7. Variables de morfología foliar medidas para las plántulas de *Nothofagus pumilio* bajo distintos tratamientos (destino x origen) del trasplante recíproco establecido en el Valle del Challhuaco.

Variable	DA-OA	DA-OB	DB-OA	DB-OB	g. l.	F
Área	0,90	1,03	2,12	2,71	3.976	248.79***
Perímetro	4,59	4,90	8,12	9.54	3.976	334.62***
Forma	0.53	0.52	0.39	0.37	3.976	527.10***
Largo (L)	1.32	1.38	2.13	2.47	3.976	278.98***
Ancho (A)	0.96	1.03	1.43	1.61	3.976	283.15***
L/A	0.73	0.75	0.68	0.66	3.976	74.81***
Dentición	4.90	4.92	5.79	5.92	3.976	184.13***

DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. g. l. grados de libertad. *** $P < 0,001$.

Tabla V.8. Valores promedio de Q_{ST} calculados para las variables de crecimiento y morfología foliar medidas en las plántulas de *Nothofagus pumilio* bajo los distintos tratamientos del trasplante recíproco en el Valle del Challhuaco.

Tratamiento	Crecimiento			Morfología foliar							
	altura	ramas	<i>promedio</i>	área	perímetro	largo	ancho	ancho/largo	forma	dentición	<i>promedio</i>
DA-OA	0.40	0.30	0.35	0.87	0.86	0.81	0.74	0.40	0.73	0.85	0.63
DA-OB	0.43	0.34	0.39	0.81	0.80	0.76	0.69	0.57	0.70	0.82	0.74
DB-OA	0.29	0.38	0.34	0.57	0.68	0.56	0.61	0.36	0.75	0.56	0.58
DB-OB	0.27	0.35	0.31	0.33	0.39	0.42	0.39	0.41	0.64	0.37	0.42
<i>promedio</i>	0.35	0.34	0.35	0.65	0.68	0.64	0.51	0.44	0.71	0.65	0.52

DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo.

Tabla V.9. Valores de Q_{ST} calculados entre tratamientos para las plántulas de *Nothofagus pumilio* del trasplante recíproco en el Valle del Challhuaco.

Tratamiento	Crecimiento		Morfología foliar						
	altura	ramas	área	perímetro	largo	ancho	ancho/largo	forma	dentición
DA-OA vs DA-OB	0,39	0,32	0,84	0,83	0,79	0,71	0,47	0,72	0,84
DB-OA vs DB-OB	0,28	0,36	0,37	0,44	0,44	0,43	0,40	0,67	0,41
DA-OA vs DB-OA	0,37	0,32	0,49	0,47	0,45	0,45	0,34	0,37	0,45
DA-OB vs DB-OB	0,34	0,35	0,29	0,29	0,30	0,30	0,33	0,32	0,29
DA-OB vs DB-OA	0,36	0,34	0,50	0,48	0,46	0,48	0,37	0,37	0,44
DA-OA vs DB-OB	0,32	0,33	0,28	0,28	0,29	0,28	0,32	0,32	0,29

DA-OA: destino arriba, origen arriba; DA-OB: destino arriba, origen abajo; DB-OA: destino abajo, origen arriba; DB-OB: destino abajo, origen abajo.

Figura V.1. a) Mapa de Sud América donde se muestra la ubicación de Argentina; b), mapa de Argentina con la ubicación de la provincia de Río Negro y del Parque Nacional Nahuel Huapi; y c) mapa del Parque Nacional Nahuel Huapi mostrando la ubicación de los dos sitios experimentales en el Valle del Challhuaco (CHA y CHB).

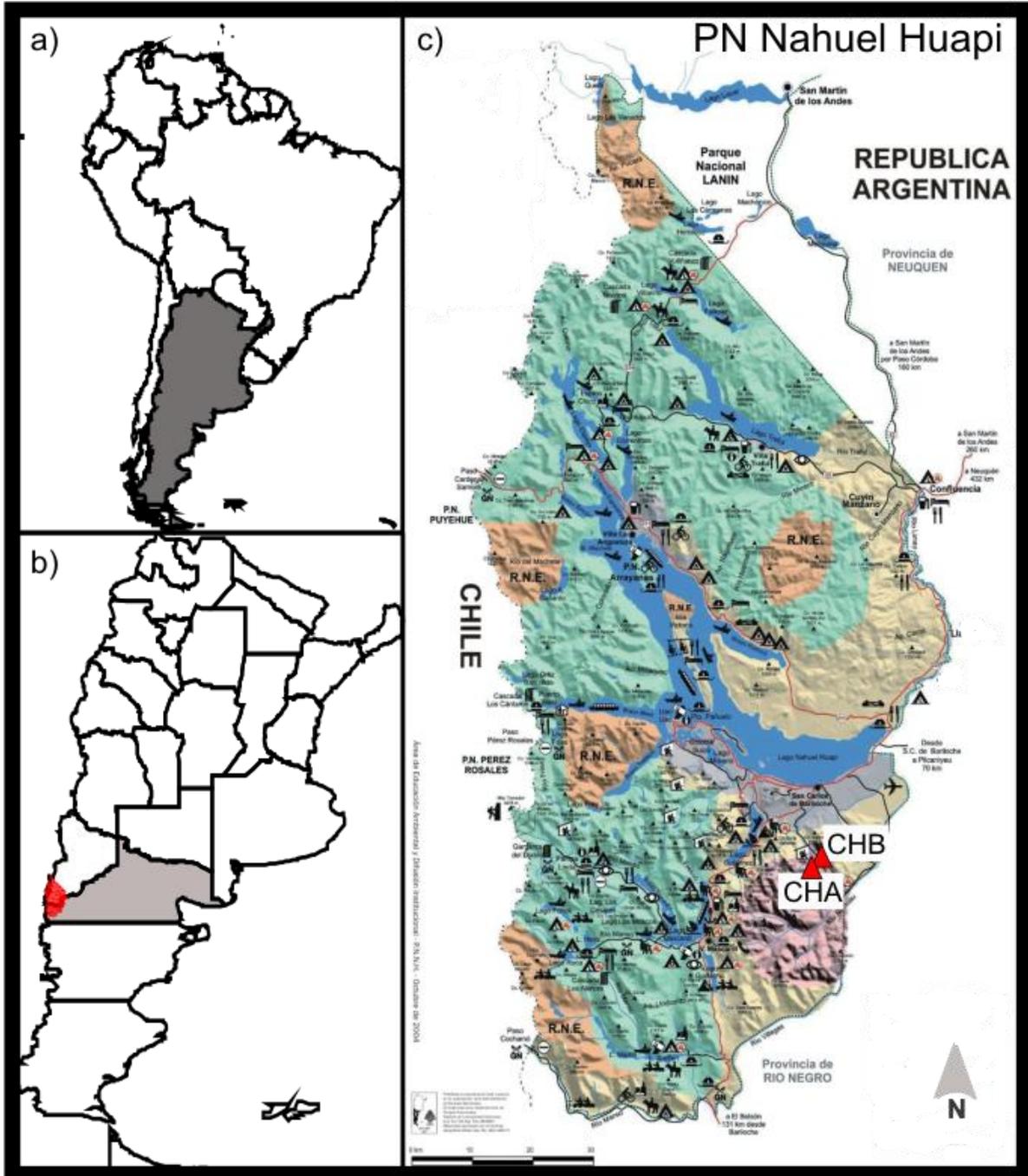


Figura V.2. Plántulas de *Nothofagus pumilio* creciendo en condiciones de jardín común, en el Laboratorio Ecotono antes de ser trasplantadas al Valle del Challhuaco.



Figura V.3. Fotografía de las plántulas de *Nothofagus pumilio* creciendo dentro de una clausura contra herbivoría en el sitio experimental de altura (a) y en el sitio experimental de abajo (b) en el Valle del Challhuaco.

a)



b)



Figura V.4. Variables de crecimiento promedio medidas sobre las plántulas de *Nothofagus pumilio* bajo los distintos tratamientos en los dos sitios experimentales del trasplante recíproco establecido en el Valle del Challhuaco. Se muestra la altura promedio de las plantas (a) y el número de ramas (b) medidos durante los años 2006-2009. DA-OA: destino arriba, origen arriba; DA-OB: destino arriba origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo.

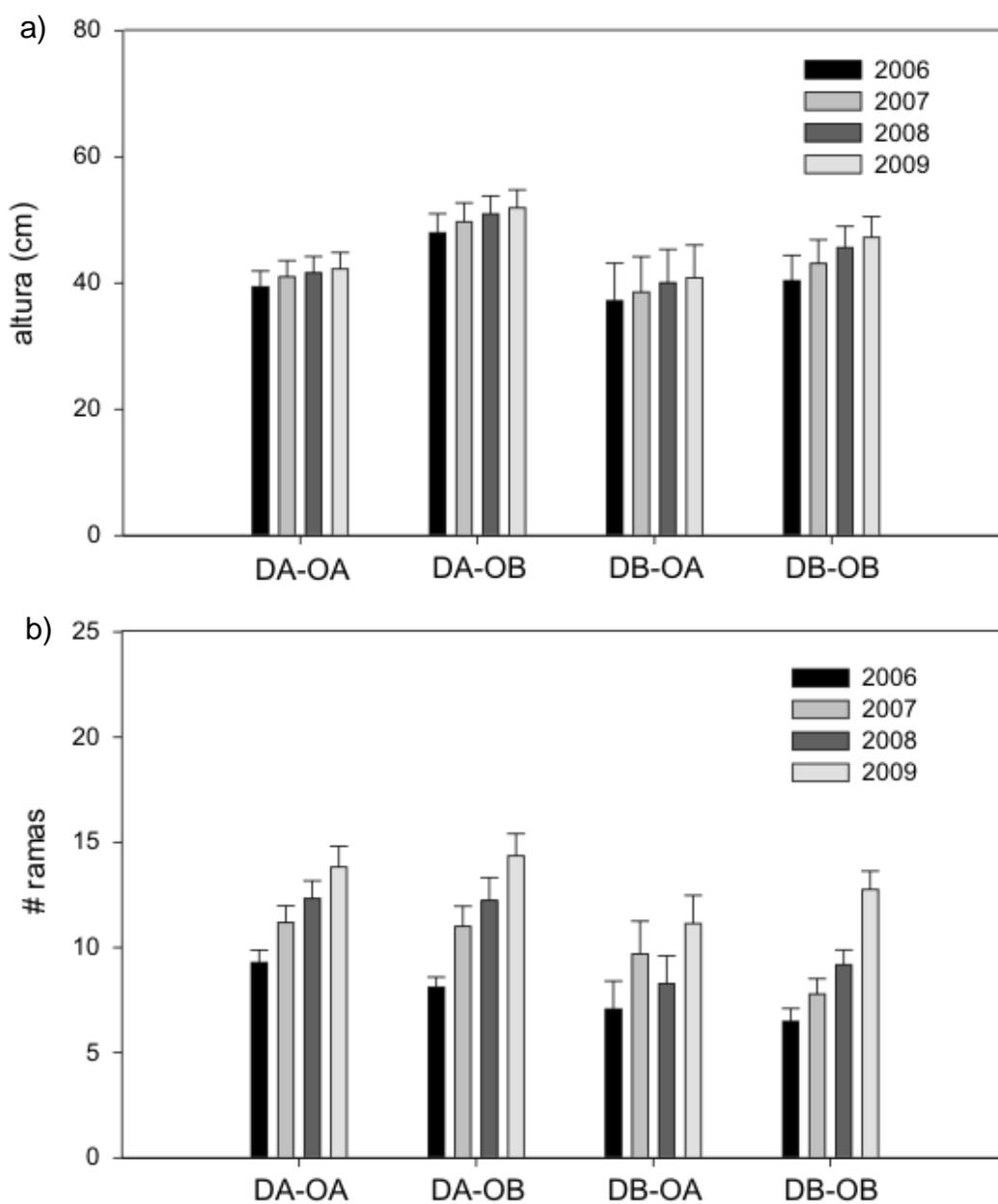


Figura V. 5. Tasa de crecimiento relativa (RGR) en relación a la altura inicial ($\ln(A_i)$) de las plántulas de *Nothofagus pumilio* sometidas a los distintos tratamientos del trasplante recíproco del Valle del Challhuaco. DA-OA: destino arriba, origen arriba; DA-OB: destino arriba origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo.

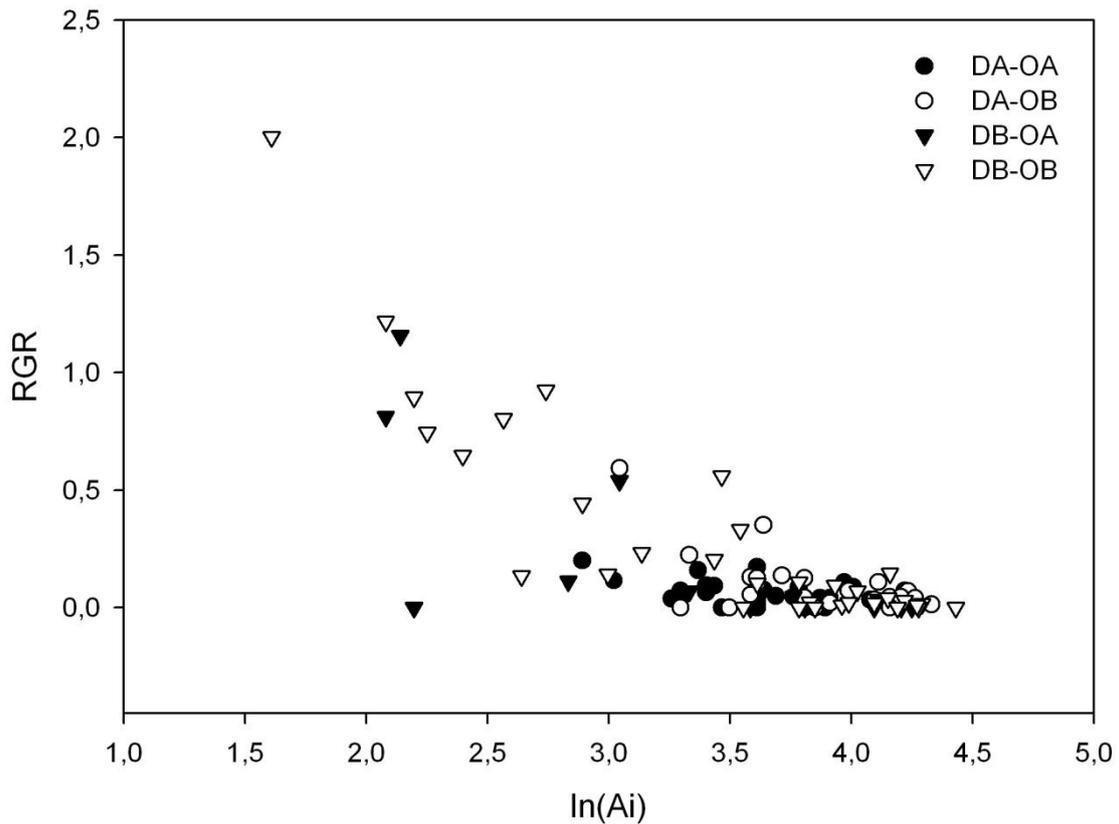
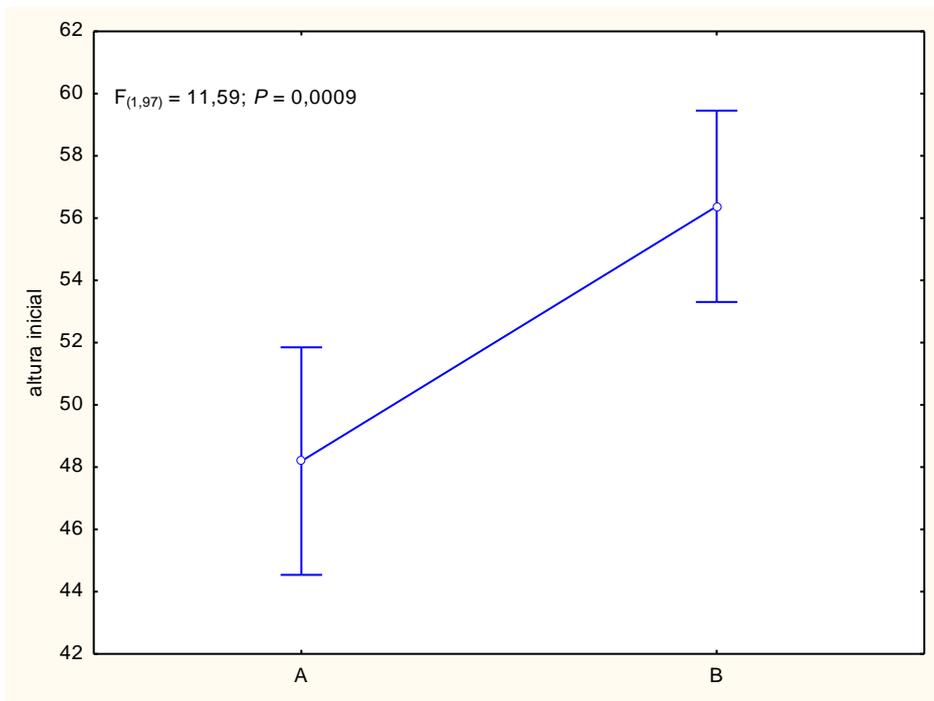


Figura V. 6. Altura inicial (a) y diámetro a la altura del cuello (b) medidas en condiciones de jardín común de las plántulas de *Nothofagus pumilio* previo al trasplante recíproco en el Valle del Challhuaco. A: Arriba; B: aBajo.

a)



b)

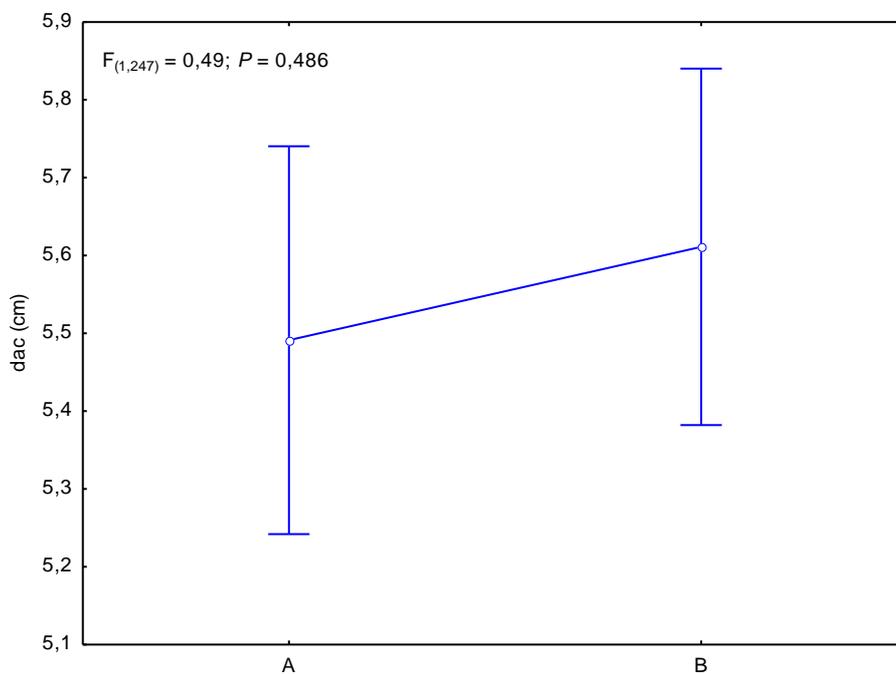


Figura V.7. Altura promedio de las plántulas de *Nothofagus pumilio* medidas durante cuatro años (2006-2009) en alturas contrastantes del Valle del Challhuaco. DA-OA: destino arriba, origen arriba; DA-OB: destino arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. Las letras en minúscula indican los distintos grupos homogéneos.

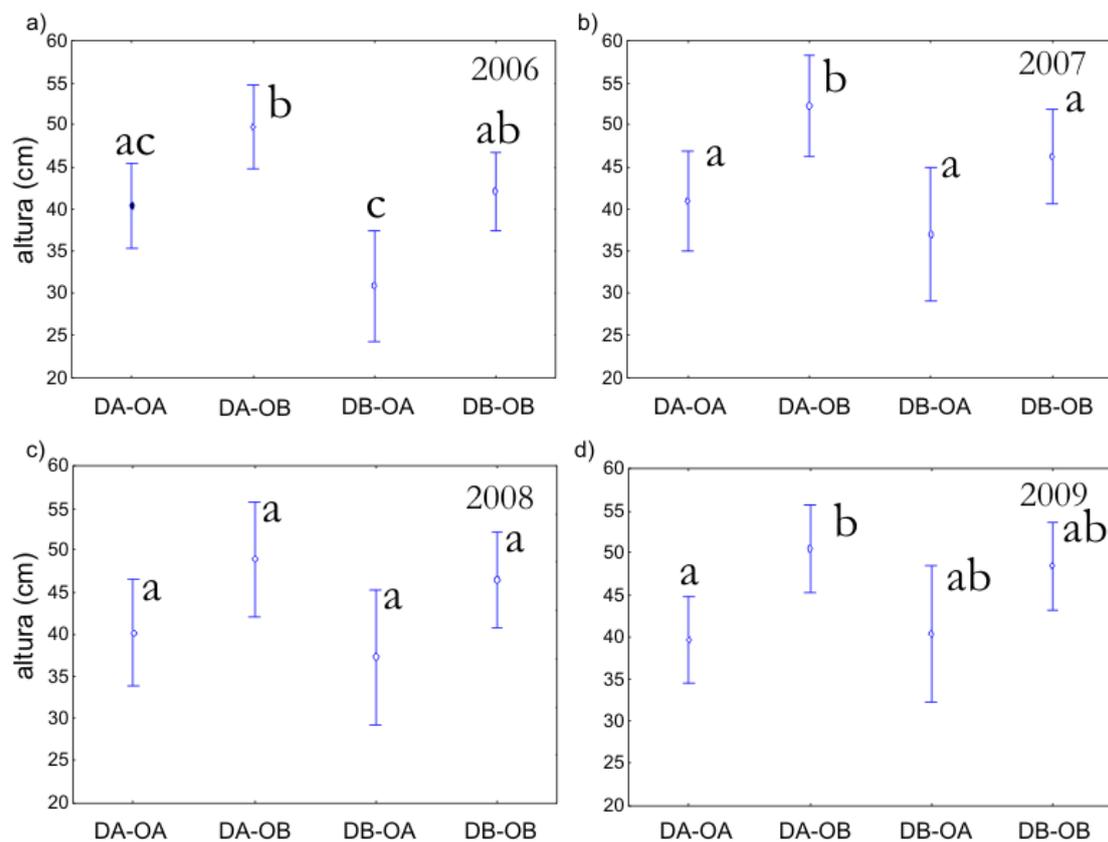


Figura V.8. Número promedio de ramas de las plántulas de *Nothofagus pumilio* medidas durante cuatro años (2006-2009) en alturas contrastantes del Valle del Challhuaco. DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. Las letras en minúscula indican los distintos grupos homogéneos.

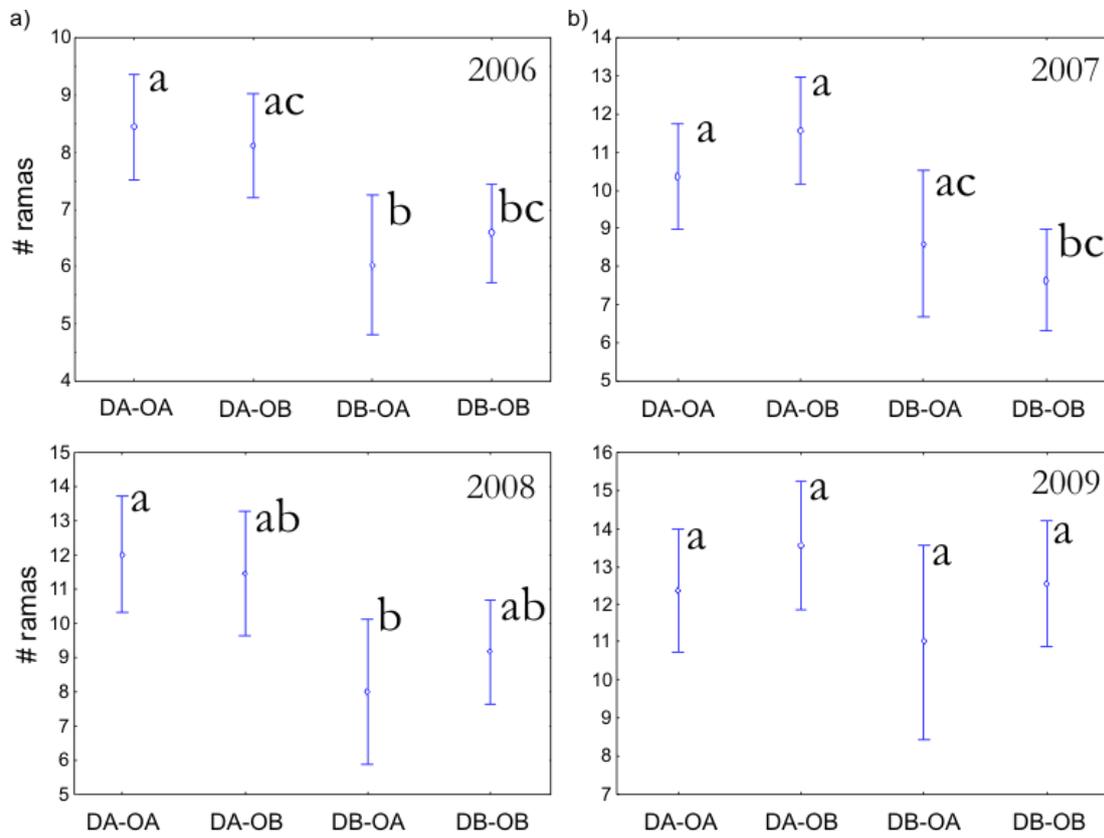
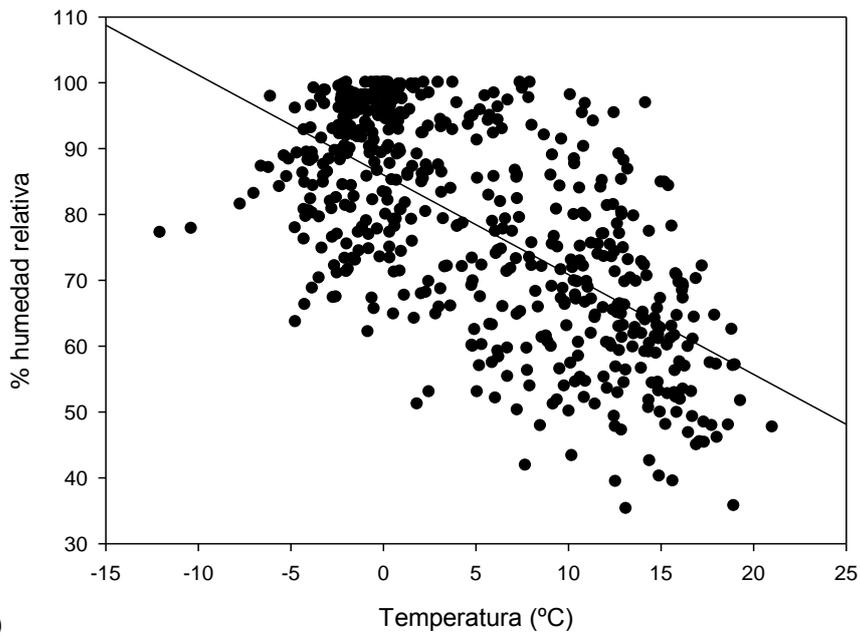


Figura V.9. Correlación de Pearson entre la temperatura y la humedad relativa durante el tercio más cálido y seco para los sitios experimentales de arriba (a) y abajo (b) del trasplante recíproco establecido en el Valle del Challhuaco.

a)



b)

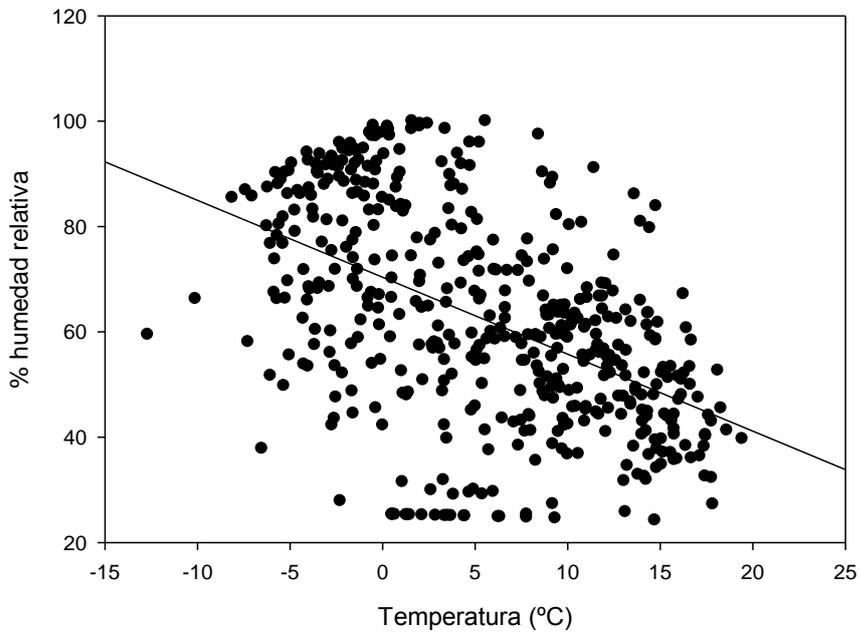
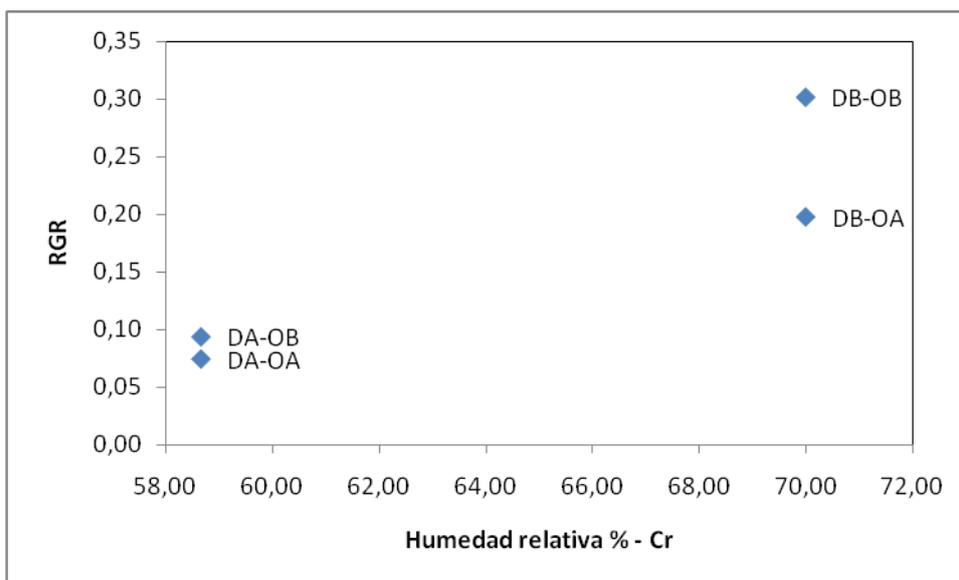


Figura V.10. Relación entre la tasa de crecimiento relativo (RGR) y (a) el porcentaje de humedad relativa (HR) y (b) el número de días en que la HR fue menor al 50 % ($HR_{<50\%}$) durante el período de crecimiento en plántulas de *Nothofagus pumilio* bajo los distintos tratamientos del trasplante recíproco en el Valle del Challhuaco. Los resultados obtenidos para el período cálido-seco arrojaron el mismo patrón. DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo.

a)



b)

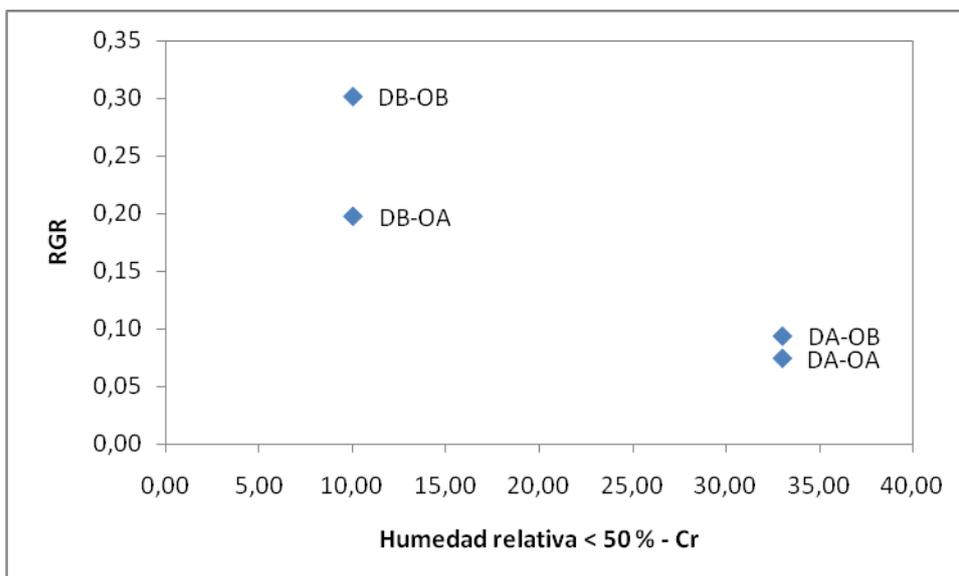


Figura V.11. Relación entre las variables de crecimiento de *Nothofagus pumilio* y las variables bioclimáticas a lo largo de los años para los distintos tratamientos del trasplante recíproco en el Valle del Challhuaco. A, período anual; Cr, período de crecimiento; Ca, período cálido/seco.

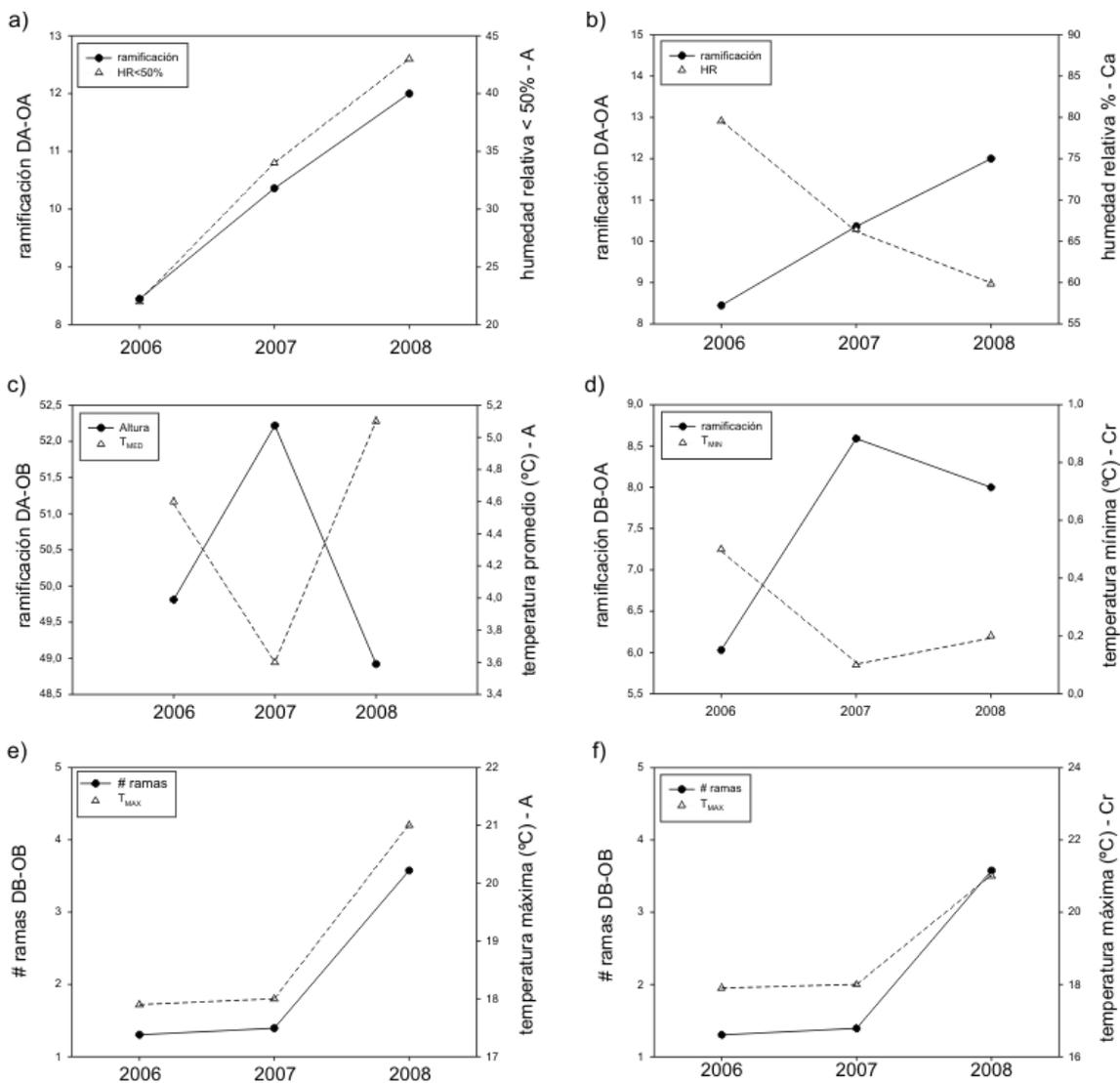


Figura V.11. (Continuación...)

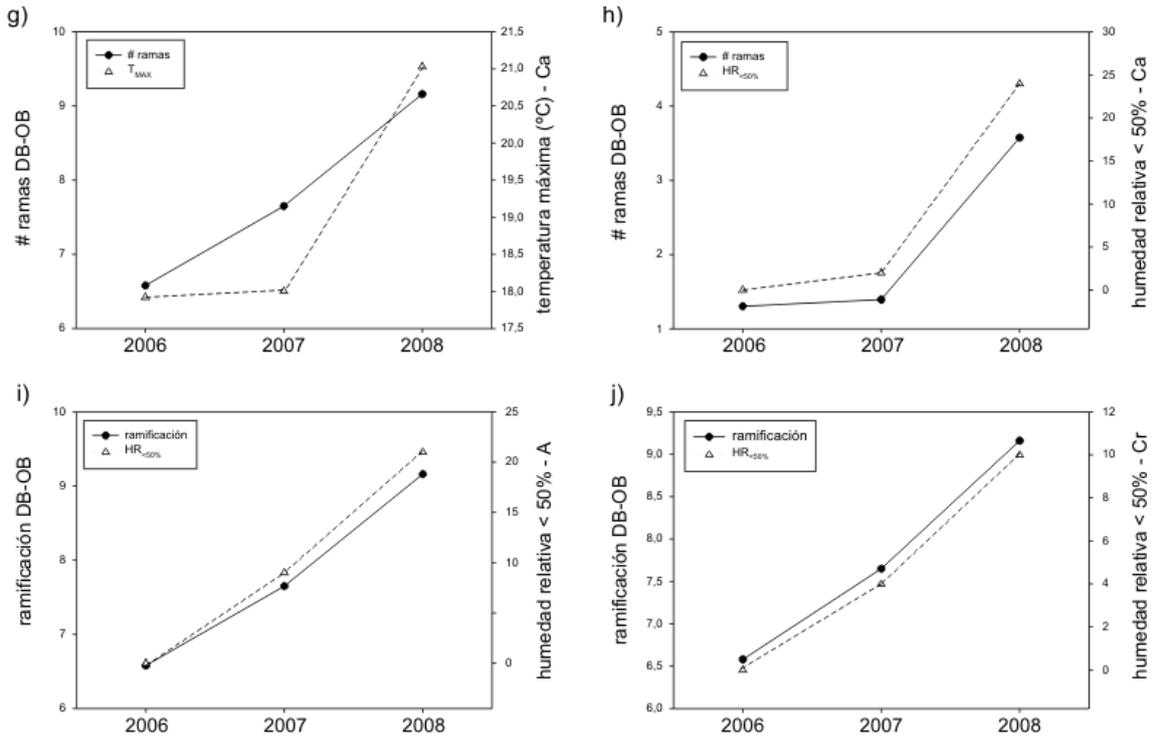


Figura V.12. Relación entre la mortalidad de las plántulas de crecimiento de *Nothofagus pumilio* y las variables bioclimáticas a lo largo de los años para los distintos tratamientos del trasplante recíproco en el Valle del Challhuaco. A, período anual; Cr, período de crecimiento; Ca, período cálido/seco.

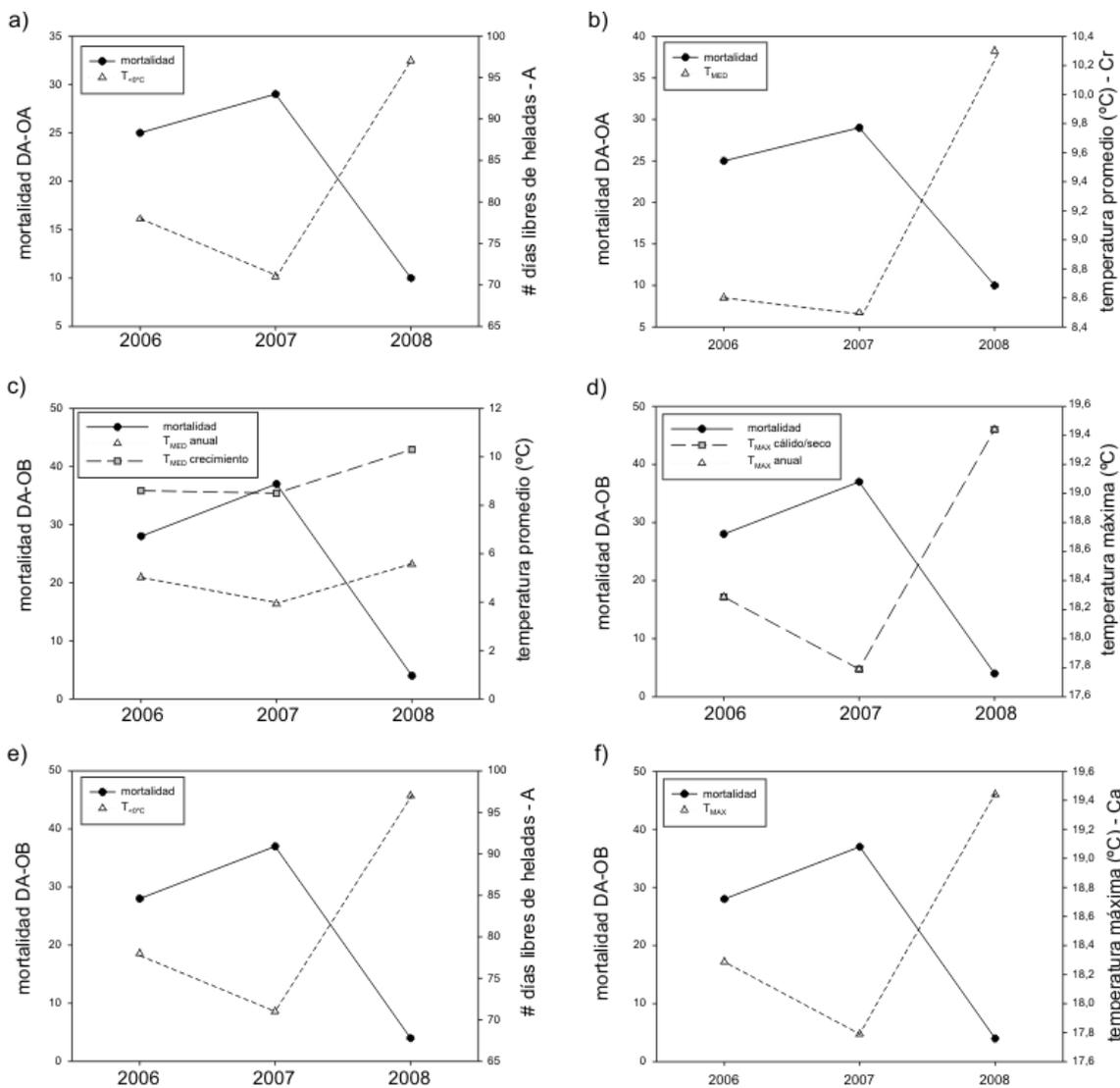


Figura V.13. Variables de morfología foliar de las plántulas de *Nothofagus pumilio* medidas en alturas contrastantes del Valle del Challhuaco. DA-OA: destino Arriba, origen Arriba; DA-OB: destino Arriba, origen aBajo; DB-OA: destino aBajo, origen Arriba; DB-OB: destino aBajo, origen aBajo. Las letras en minúscula indican los distintos grupos homogéneos.

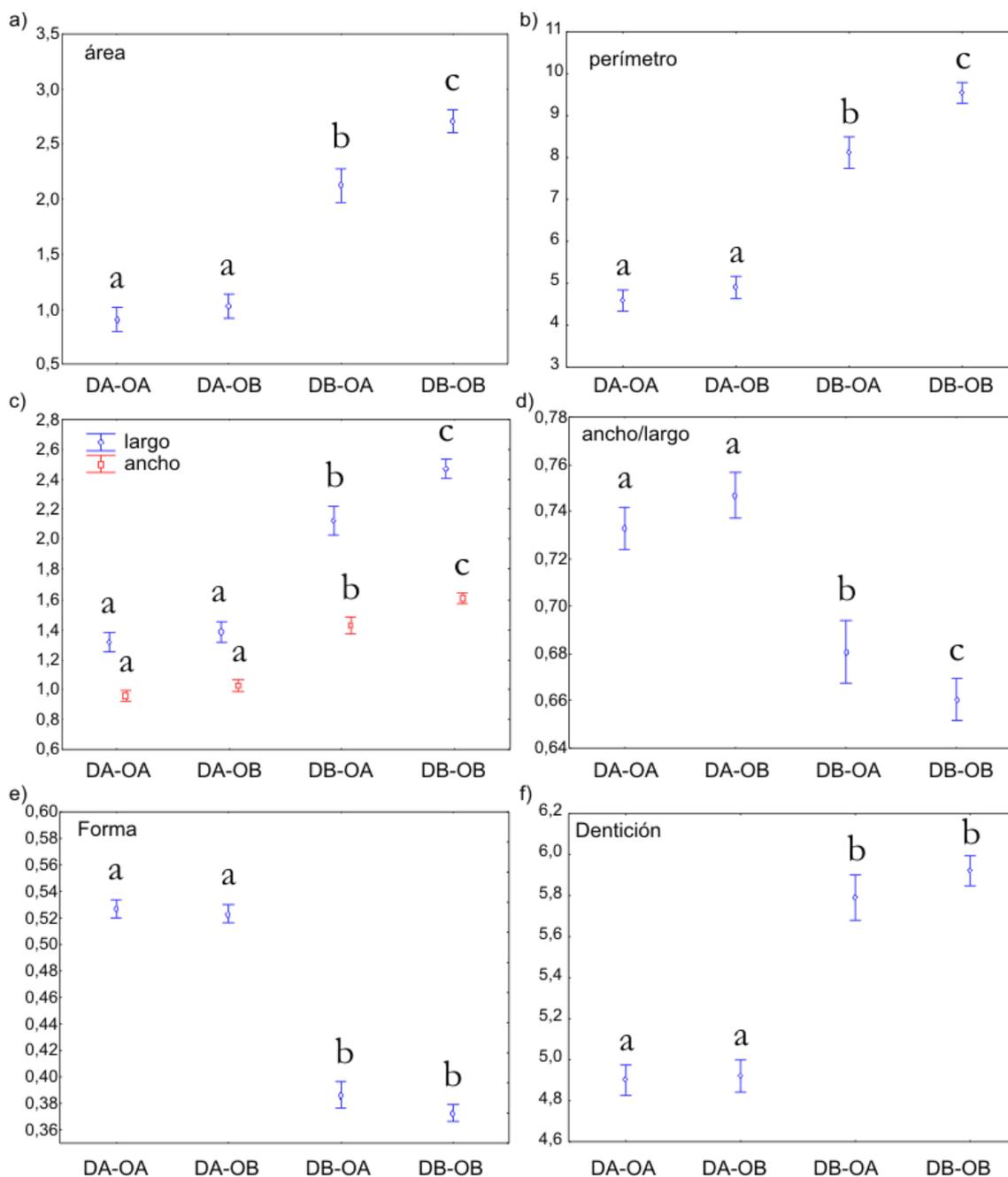


Figura V.14. Estados fenológicos para las plantas de *Nothofagus pumilio* bajo distintos tratamientos (destino x origen) medidos durante los años 2005 y 2006 en el Valle del Challhuaco, Patagonia. NL: sin hojas, BU: yemas hinchadas, RO: yemas recién abiertas, FE: hojas expandidas.

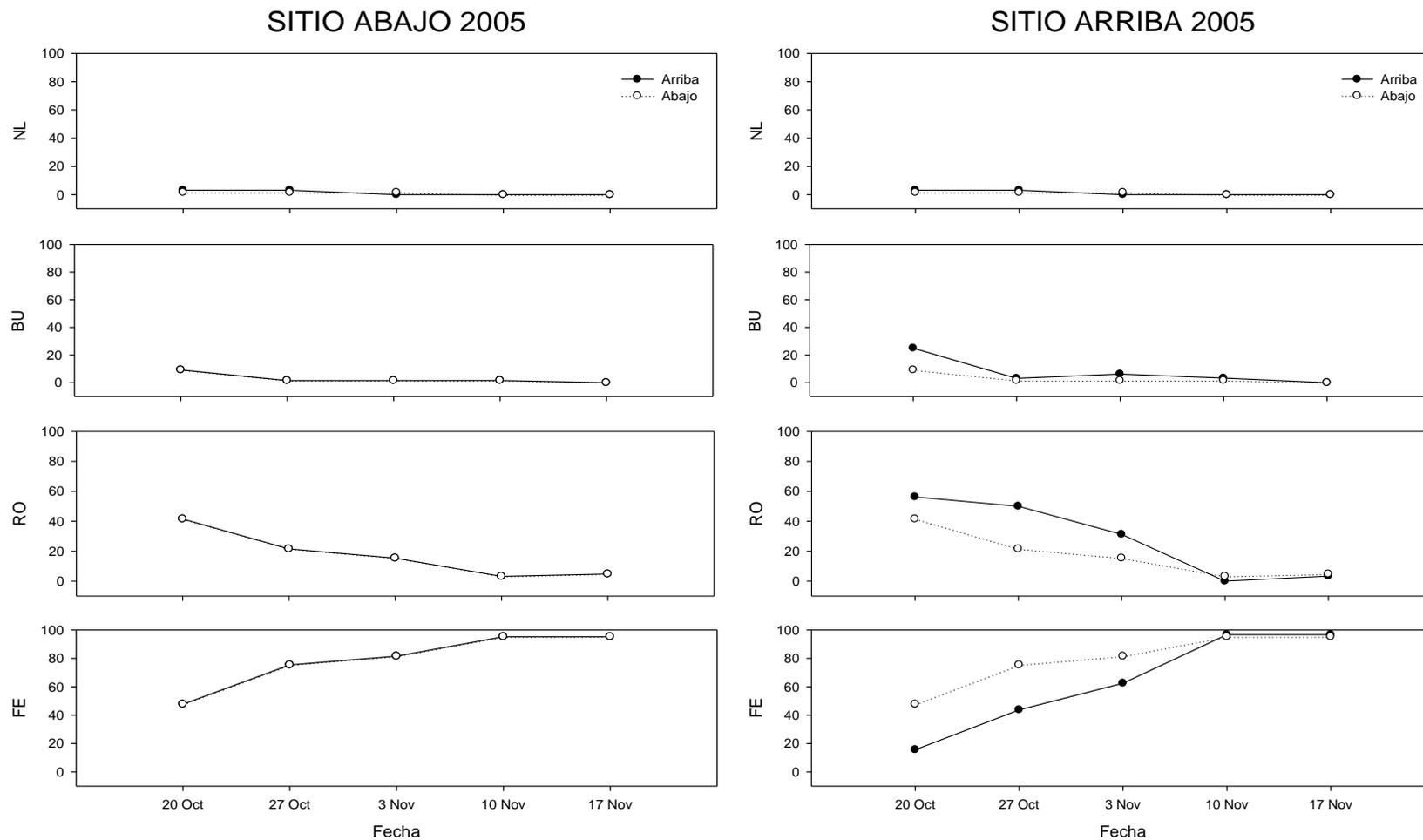
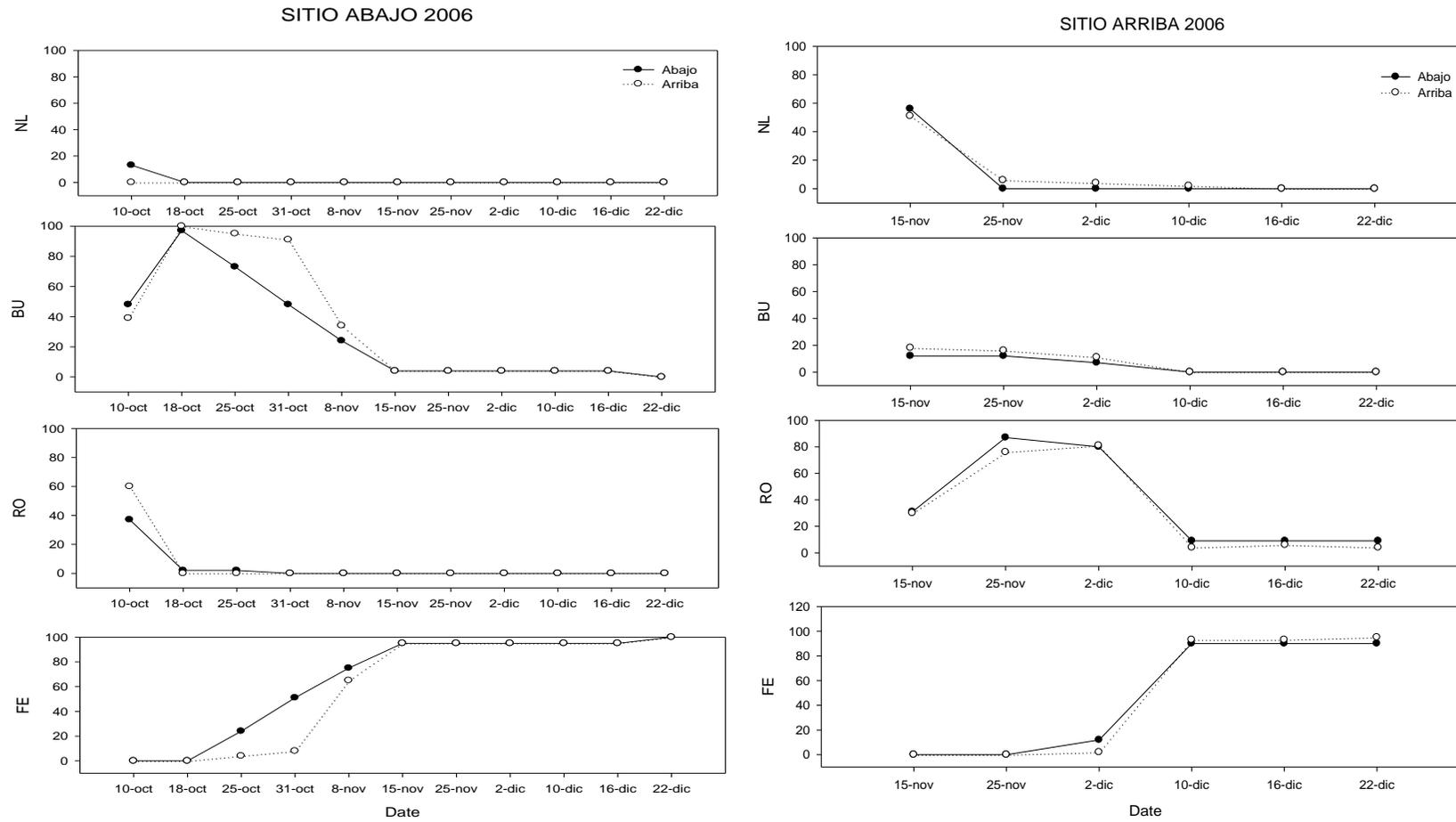


Figura V.14. (Continuación ...)



6. Capítulo VI: Discusión General



El acervo genético de *Nothofagus pumilio* es el resultado de la combinación de distintos factores que han ocurrido a lo largo de su historia evolutiva en distintos tiempos geológicos y a distintas escalas espaciales. La distribución de los polimorfismos genéticos encontrados mediante el análisis de ADN del cloroplasto ha podido capturar una señal histórica muy antigua y son concordantes con la paleogeografía de Patagonia. Los *Nothofagus* son taxones muy antiguos que se originaron en el Oeste de Gondwana hace 85 Ma, y los linajes actuales ya estaban presentes en varias regiones australes hace aprox. 75 Ma (Hill *et al.* 1996). Cuando se originaron los *Nothofagus*, durante el Cretácico superior, la configuración espacial de los océanos era muy diferente a la existente hoy en día. Los continentes actuales australes formaban una sola masa de tierra, el supercontinente de Gondwana. Además, en esa época el paisaje estaba caracterizado por un sistema de paleocuecas sedimentarias de distintos orígenes que fragmentaban el paisaje (Romero 1986, leRoux & Elgueta 2000, Lisker *et al.* 2006, Suárez & Márquez 2007). En particular, en la actual región Patagónica, existían numerosas de estas paleocuecas, sobre todo en latitudes más bajas, que se originaron en distintos períodos del tiempo geológico. Durante el período Jurásico se abrió una paleocuenca de grandes dimensiones a latitudes intermedias (43° S) de Patagonia, que se mantuvo abierta hacia el Pacífico durante varios millones de años (Suárez & Márquez 2007). Posteriormente a comienzos del Mioceno, se originaron otras paleocuecas de origen marino situadas en latitudes menores (40° S). Probablemente la mayoría de estas cuecas se drenaron juntamente con el levantamiento de la Cordillera de los Andes en el Mioceno. Anteriormente a la formación de la cordillera principal de los Andes, las regiones montañosas en el norte de la Patagonia, consistían de numerosas unidades geológicas de origen pre-Mesozoico, mientras que en el sur había grandes macizos de

tierra (Drewry 1976; Pankhurst *et al.* 1999, 2006; Rosello *et al.* 2004). Este hecho es particularmente importante para entender los patrones de distribución de los polimorfismos genéticos en *N. pumilio*, por tratarse de una especie que habita principalmente ambientes montañosos. Además de los factores geológicos, el clima de épocas pasadas habría afectado la distribución de las especies, incluida *N. pumilio*. Durante el límite entre el Eoceno y el Oligoceno ocurrió un gran cambio climático a nivel global, el régimen predominante pasó de ser tropical-subtropical a templado (Huber & Nof 2006). Durante este período, ocurrieron las primeras glaciaciones en la Antártida, por lo que la flora que habitaba altas latitudes se extinguió y/o tuvo que migrar hacia el norte donde las condiciones climáticas eran más favorables para la vida terrestre. Este hecho coincide con la época de mayor distribución y diversidad del género *Nothofagus*. Sin embargo, en ese tiempo el principal limitante para la dispersión de *N. pumilio*, habría sido la disponibilidad de ambientes adecuados para su establecimiento. Los resultados presentados en el Capítulo II sugieren que la dispersión de esta especie en el Sur de Sudamérica, previo al levantamiento de los Andes, habría ocurrido siguiendo un modelo de piedra en paso utilizando las montañas antiguas existentes como corredores. Esta dispersión habría ocurrido a través de diferentes rutas colonizadoras independientes, que se ven reflejadas en los distintos linajes encontrados mediante análisis de ADNc. Principalmente, las rutas habrían tenido dirección sur a norte (Fig. II.2), una en la región más austral de la Patagonia, y la otra a latitudes intermedias al norte de los 43° S. Dichos acervos genéticos, *i. e.* norte y sur, se mantuvieron aislados durante un período prolongado acumulando mutaciones, y habrían entrado en contacto más recientemente cuando se drenó la paleocuenca del Chubut. Similarmente, las paleocuecas de Valdivia y Neuquén habrían aislado temporalmente a los linajes del norte, *i. e.* Costa-norte, Andes-norte y Centro-norte (Fig. II.4). Las

diferentes características geológicas en distintas latitudes hicieron que los patrones de distribución de los polimorfismos de ADNc difieran latitudinalmente. En el norte una paleogeografía más compleja habría generado mayores fragmentaciones en la distribución de esta especie produciendo la marcada estructuración genética evidenciada por el ADNc. Por el contrario, las condiciones más estables que parecen haber gobernado en las regiones más australes habrían permitido la persistencia de *N. pumilio* en áreas más extensas sin sufrir grandes cambios en el ADNc.

Posteriormente al levantamiento de los Andes, las paleocuencas se drenaron y se desarrolló un marcado gradiente climático oeste-este. Hacia el este, donde las precipitaciones eran menores, se desarrolló la estepa Patagónica, y los bosques de *Nothofagus* pasaron a ser dominantes exclusivamente en la región Andino-Patagónica. En este mismo período finalizó la etapa de la ruptura de Gondwana, con la separación de la Península Antártica del sur de Sudamérica. Juntamente, se desarrolló la Corriente Circumpolar Antártica, el clima se volvió más cíclico, y cada vez se fue tornando más frío. Así, se desarrollaron las primeras glaciaciones en la región Austral de Sudamérica, hace aproximadamente entre 7 y 5 Ma. En los períodos subsiguientes y principalmente durante el Cuaternario ocurrieron grandes oscilaciones climáticas con alternancia de períodos fríos glaciarios y cálidos inter-glaciarios los cuales, sumado a los factores anteriores, afectaron el acervo genético de *N. pumilio*. Las glaciaciones en la Región Patagónica fueron distintas en diferentes latitudes. Mientras que en el norte hubo principalmente glaciares de valle que modificaron marcadamente la topografía del lugar, en el sur los glaciares a pesar de ser más extensos no generaron grandes cambios en el paisaje. Los resultados presentados en el Capítulo III muestran como fue moldeado el pool génico de *N. pumilio* bajo distintos escenarios glaciarios utilizando marcadores moleculares isoenzimáticos, que son menos conservados que el ADNc, y por lo tanto

reflejan patrones contemporáneos de flujo génico. Los períodos glaciarios no habrían afectado significativamente a *N. pumilio* por tratarse de una especie tolerante al frío. Las poblaciones del sur presentaron mayores niveles de diversidad genética y mayor diferenciación interpoblacional, sugiriendo la supervivencia de *N. pumilio* en múltiples áreas libres de hielo y de allí habrían recolonizado otras áreas después del retroceso de los hielos. Por el contrario, las poblaciones del norte presentaron menores niveles de variación isoenzimática y diferenciación poblacional, como resultado de los repetidos cuellos de botella sufridos durante el Pleistoceno. En los períodos fríos, *N. pumilio* podría haber expandido su rango, pero dado que en el norte esta especie está restringida principalmente a las cumbres de las montañas se dificultaba su expansión hacia abajo por la presencia de glaciares en los valles y por competencia con otras especies menos tolerantes al frío que habitan en las regiones más bajas. En cambio, en los períodos cálidos *N. pumilio* habría ascendido siguiendo las condiciones climáticas favorables para su supervivencia, reduciendo su rango. La mayor divergencia genética encontrada en el grupo Sur podría estar indicando que las poblaciones en latitudes australes habrían sufrido aislamientos históricos, mientras que el menor nivel de estructuración en el norte sugiere que la divergencia genética inter-poblacional es un fenómeno reciente. Así, para esta especie auto-incompatible, la relativamente mayor endogamia hacia el rango norte de distribución indicaría que la selección natural habría tenido mayores oportunidades de purgar variantes genéticas perjudiciales en homocigosis pudiendo ser más resilientes a los disturbios, mientras que las poblaciones australes serían más propensas a sufrir de las modificaciones en las tasas de flujo génico y tamaño poblacional. Por lo tanto, esto debería ser tenido en cuenta durante el diseño de prácticas de manejo y conservación en *N. pumilio*, la cual es considerada una especie clave que actualmente está siendo sometida a prácticas de extracción.

Nothofagus pumilio es la especie dominante de bosques altoandinos y de altas latitudes donde forma mayormente rodales puros a lo largo de más de 2.000 km de distribución latitudinal. A lo largo de su amplio rango presenta una marcada diferenciación genética a lo largo del gradiente altitudinal. Los resultados presentados en el Capítulo IV muestran que a escala local, la distribución de la variación genética dentro de las poblaciones ha mostrado estar estrechamente relacionada con el modo de regeneración predominante y con las características ecológicas de cada sitio en particular. Mientras que en sitios que no han sido disturbados y en donde predomina la regeneración por semillas, el establecimiento de las plántulas depende principalmente de la disponibilidad de micrositos microclimáticamente favorables y de la competencia con otras especies, la estructuración genética es mayor. En cambio, en sitios que han sufrido disturbios recurrentes, la distribución de los genotipos en el espacio sería aleatoria como resultado del establecimiento postdisturbio de plántulas provenientes de unos pocos individuos remanentes que sobreviven el disturbio. Por otro lado, la ausencia de una estructuración genética en condiciones extremas del gradiente altitudinal, sería el resultado de una mayor homogeneización genética producida por la predominante regeneración vegetativa en sitios donde las condiciones para la producción de semillas y el establecimiento de plántulas son poco favorables. Esto también se ve reflejado en los menores índices de diversidad genética encontrados en poblaciones de mayor altura en comparación con los sitios de menor altitud dentro de un mismo cerro. Además, las diferencias genéticas encontradas en *N. pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal mostraron tener valor adaptativo. Los resultados presentados en el Capítulo V muestran claramente que las plantas de altura están adaptadas a presiones de selección extremas, y que esas adaptaciones están fijadas genéticamente, limitando su crecimiento en sitios de baja altitud. Por el contrario, las plantas que habitan en menores

altitudes serían más plásticas sugiriendo una relativa ventaja competitiva frente a las plantas creciendo en ambientes de altura. A pesar de todos los eventos que afectaron a *N. pumilio* a lo largo de su historia evolutiva, esta especie ha respondido vigorosamente a los grandes cambios climáticos pasados, incluso durante las últimas glaciaciones, bajo condiciones que son desfavorables para la mayoría de las especies. *Nothofagus pumilio*, por ser una especie tolerante al frío, ha sido capaz de sobrevivir a lo largo del tiempo y se ha adaptado exitosamente a la vida en ambientes montañosos, donde actualmente existe como la única especie dominante. En el corto plazo, ante escenarios de calentamiento y debido a la plasticidad que muestran las plantas de menores alturas, se espera que las poblaciones de *N. pumilio* asciendan altitudinalmente en respuesta al aumento de la temperatura que está ocurriendo a nivel mundial, y así serán capaces de sobrellevar los cambios futuros. Sin embargo, en el largo plazo, sobre todo en poblaciones ubicadas hacia el norte de la distribución de la especie, donde el clima es más cálido, las condiciones climáticas venideras podrían no ser favorables en ambientes de altura, debido al estrés hídrico que ocurrirá en respuesta al aumento de la temperatura ambiente, conduciendo a la extinción local.

7. Conclusiones Generales

- *N. pumilio* ha conservado su identidad como especie desde el Paleógeno y ha respondido localmente a los cambios climáticos Neógenos.
- A escala regional, los patrones de variación genética en el ADN del cloroplasto de *N. pumilio* están estructurados geográficamente y son consistentes con la paleogeografía del Paleógeno de Patagonia.
- A escalas locales, los patrones genéticos isoenzimáticos de *N. pumilio* reflejan las oscilaciones climáticas del Cuaternario y muestran diferencias con la latitud.
- Las poblaciones del norte presentan mayores índices de endogamia en respuesta a fragmentaciones poblacionales debido al ascenso altitudinal bajo la influencia de climas más cálidos durante los interglaciares.
- Las poblaciones del sur presentan una alta divergencia interpoblacional lo que sugiere una dispersión local desde múltiples áreas libres de hielo durante los períodos de enfriamiento.
- A escala de rodal, la ausencia de estructura genética a escala espacial reducida en el rodal de baja altura en el Cerro Otto se correlaciona con la estructura coetánea posfuego.

- La marcada estructura genética a escala espacial reducida en los cerros Challhuaco y López indicaría un establecimiento agrupado de plántulas en claros abiertos bajo el dosel.
- Rodales de altura presentan estructuras etáreas y genéticas complejas que reflejan la historia de disturbio del sitio.
- Las diferencias genéticas medidas en las plantas de *N. pumilio* a lo largo del gradiente altitudinal se traducen en una mayor plasticidad y una mayor respuesta aclimatativa en las plantas provenientes de menor altitud.

8. Apéndices

Apéndice 1. Protocolo de extracción de ADN para muestras con alto contenido de polisacáridos.

Adaptado de Doyle & Doyle 1990. TA: temperatura ambiente; H: heladera; F: freezer.

1. Agregar 7,5 mg de DTT (H) y 0,01 g de PVP 40000 (TA) por cada 1 mL de buffer de extracción. Calentar el buffer de extracción a 55°C.
2. Colocar 1 hoja grande (40 mg material seco, o 100 mg material fresco) en un tubo Eppendorf de 0,5 mL y sumergir el tubo en nitrógeno líquido y moler hasta obtener un polvo fino.
3. Agregar 1 mL de buffer de extracción en cada tubo y mezclar bien.
4. Incubar en baño a 55° C durante 1 hora. Homogeneizar por inversión del tubo cada 15 min.
5. Sacar los tubos del baño y dejarlos 10 min para que se enfríen.
6. Agregar 400 µL de diclorometano (TA) y mezclar suavemente hasta obtener una emulsión.
7. Centrifugar 10 min a 13000 rpm. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo cuidando de no pipetear la interfase.
8. Repetir pasos 6 y 7.
9. Agregar 400 µL (2/3 del volumen) de isopropanol (F) y mezclar suavemente. Si el pellet de ADN no aparece, colocar los tubos en freezer a -20°C durante 30 min (Se puede dejar toda la noche).
10. Centrifugar 15 min a 13000 rpm. Remover el isopropanol cuidando de no perder el pellet y secar los tubos durante 1 hora sobre papel de filtro a TA.
11. Agregar 300 µL de TE o Ae (con ARNasa, 0,2 µL/mL) y 200 µL (2/3 vol.) de NaCl 5M. Mezclar bien suavemente hasta que el pellet se disuelva.

12. Agregar 1 mL (2 vol.) de etanol 100% (H), mezclar suavemente. Colocar a -20° C al menos 1 hora (se puede dejar toda la noche o varios días).
13. Centrifugar 15 min a 13.000 rpm. Remover el sobrenadante cuidadosamente y secar los tubos durante 1 hora sobre papel de filtro.
14. Agregar 50-100 µL de buffer TE 1X (TA) o buffer Ae (TA) con ARNasa (0,2 µL/mL de solución stock: 100 mg/mL). Colocar en baño a 55° C durante 10 min.

Buffer de extracción de ADN

ATMAB (Alkyltrimethyl Ammonium Bromide) – Sigma M7635 20 gr

*EDTA 0,5 M pH 8 40 mL

*Tris HCl 1 M pH 8 100 mL

*NaCl 5 M 280 mL

H₂O destilada llevar a 1000 mL

* Autoclavar antes de preparar el buffer. Disolver el ATMAB en baño a 55°C.

Autoclavar el buffer de extracción una vez preparado.

Buffer TE 10X (Solución stock)

Tris 100 mM 12,11 gr

EDTA 10 mM 3,72 gr

H₂O destilada 1000 mL

Agregar 20 mg/mL de ARNasa

Solución NaCl 5M (para preparar 1000 ml)

NaCl 292,2 gr

H₂O destilada 1000 mL

Apéndice 2. Parámetros de diversidad genética calculados para marcadores moleculares de ADN del cloroplasto e isoenzimas.

Basado en Berg & Hamrick (1997); Hartl & Clark (1997); Degen (2000); Merilä & Crnokrak (2001); Premoli & Kitzberger (2005).

Parámetros de diversidad genética molecular: son índices que se utilizan para medir el grado de variabilidad genética a partir de secuencias de ADN haploides.

Diversidad haplotípica (h): es la probabilidad de que dos haplotipos escogidos aleatoriamente en la muestra sean diferentes. n = número de secuencias en la muestra; k = número de haplotipos; p_i = frecuencia del haplotipo i en la muestra.

$$\hat{H} = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

Diversidad nucleotídica (π): es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos aleatoriamente en la muestra sean distintos. d_{ij} divergencia entre las secuencias de los haplotipos i y j ; L = número de loci.

$$\hat{\pi}_n = \frac{\sum_{i=1}^k \sum_{j<i} p_i p_j \hat{d}_{ij}}{L}$$

Sustituciones: son mutaciones en las que se altera un solo par de bases. Hay dos tipos de sustituciones según si se altera o no la naturaleza química de las bases cambiadas, las transiciones y transversiones.

Transiciones: son mutaciones de punto en las cuáles no se altera la naturaleza química de la base, por lo tanto se sustituye una purina por otra purina (A por G, o G por A), o una pirimidina por otra pirimidina (T por C, o C por T).

Transversiones: son mutaciones de punto en las cuáles se altera la naturaleza química de la base, se sustituye una purina por una pirimidina (A por C o A por T; C por A o C por G; G por C o G por T; T por A o T por G).

Inserciones/delecciones: son mutaciones en las cuales se omite uno o varios pares de bases.

Análisis demográficos: éste tipo de análisis se realiza para detectar cambios en el tamaño poblacional que son indicadores de eventos pasados que han ocurrido a nivel poblacional.

D de Tajima: es un test estadístico desarrollado por Tajima (1989) que se utiliza para detectar si las secuencias de ADN evolucionan en forma neutral o no. La hipótesis nula del test es evolución neutral. Valores negativos de D de Tajima

significan un exceso de polimorfismos de baja frecuencia, indicando expansión poblacional y/o selección. Valores positivos de D de Tajima expresan niveles bajos de polimorfismos de alta y baja frecuencia, indicando una reducción en el tamaño poblacional y/o selección estabilizadora.

F de Fu y Li: es un test estadístico similar al D de Tajima que se utiliza para testear la hipótesis de que todas las mutaciones son selectivamente neutras (Kimura 1983). El test estadístico F se basa en las diferencias entre el número de mutaciones que aparecen una única vez en las secuencias (“singletons”) y el número promedio de diferencias nucleotídicas entre pares de secuencias (Fu & Li 1993).

Análisis de distribución no correspondida (MMD): es el cálculo del número de sitios diferentes entre todas las combinaciones de pares de secuencias de ADN en una muestra. Los distintos patrones de distribución de estas diferencias indican historias demográficas distintas. En poblaciones que han sido estables a lo largo del tiempo o que presentan una marcada diferenciación geográfica, la distribución de las diferencias entre pares de secuencias posee una forma multimodal, mientras que en una población que ha sufrido una expansión genera una distribución suave y unimodal. La posición del pico refleja el tiempo del crecimiento poblacional (Harpending 1994). Una distribución bimodal indicaría que las poblaciones han estado históricamente aisladas o que la muestra está compuesta por especies distintas.

Medidas de variabilidad genética: son parámetros que miden la diversidad genética para caracteres de un único gen.

A: número promedio de alelos por locus, considerando los loci monomórficos y polimórficos.

A_P: número promedio de alelos por locus polimórfico.

A_e: número efectivo de alelos; es la inversa de la suma de cuadrados de las frecuencias alélicas.

$$A_e = \frac{1}{\sum p_i^2} = \frac{1}{1 - H_e}, \quad 1 \leq A_e < \infty$$

A_T: es el número total de alelos observados en todos los loci.

P: es el porcentaje de loci polimórficos del total de los loci analizados.

H_E: la heterocigosis esperada o diversidad génica es la proporción esperada de loci heterocigotas para cada individuo, promediada sobre todos los loci. Existen distintas formas de estimar este parámetro. Generalmente se utilizan las estimaciones no sesgadas. Entre ellas están la heterocigosis esperada de Nei (1973), y la heterocigosis esperada estimada mediante el algoritmo de Levene (1949), que es equivalente a la estimación no-sesgada de Nei (1978).

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

H_O : es la heterocigosis observada, que se calcula directamente de las frecuencias fenotípicas observadas.

A_R : la riqueza alélica es el número de alelos presentes en una muestra, calculada mediante el uso del método de rarefacción para corregir por el tamaño poblacional (el Mousadik & Petit 1996, Kalinowski 2004). El método de rarefacción fue desarrollado por Hurlbert (1971) para obtener el número esperado de especies en una muestra de n individuos seleccionados aleatoriamente, luego éste índice fue adaptado para genética de poblaciones por el Mousadik & Petit (1996). Dado que la riqueza alélica en una población depende del tamaño muestral (Nei 1978), el método de rarefacción permite hacer comparaciones del número de alelos entre poblaciones, cuando el tamaño de las muestras no es igual para todas las poblaciones. Así, se puede estandarizar el número de alelos por población, y comparar este índice entre todas las poblaciones (El Mousadik y Petit 1996). Este método utiliza la frecuencia de los alelos de un locus para estimar el número de alelos que habría en muestras de menor tamaño. La riqueza alélica (\hat{r}) es calculada para un tamaño muestral de g genes; N_i representa el número de veces que aparece el alelo i en los N genes muestreados.

$$\hat{r}(g) = \sum_i \left[1 - \binom{N - N_i}{g} / \binom{N}{g} \right],$$

F : es el índice de fijación o coeficiente de endogamia. Mide la desviación proporcional de la heterocigosis observada de la esperada bajo la condición de equilibrio Hardy-Weinberg. Cuando el número de heterocigotas es menor que el

esperado, F es positivo; mientras que cuando hay un exceso de heterocigotas, el valor de F es negativo.

$$F = \frac{H_e - H_o}{H_e} = 1 - \frac{H_o}{2pq}, \quad -1 \leq F \leq 1$$

H_T : es la diversidad genética total medida para un locus determinado.

$H_T = 1 - \sum \bar{p}_i^2$, donde p_i es la frecuencia media del alelo i en la muestra.

G_{ST} : es la diferenciación inter-poblacional relativa a la diversidad genética total.

$$G_{ST} = \frac{D_{ST}}{H_T}, \quad 0 \leq G_{ST} \leq 1$$

H_S : es la diversidad genética intra-poblacional. Es la diferencia entre la diversidad genética total y la diferenciación interpoblacional.

$$H_S = H_T - D_{ST};$$

Medidas de estructuración genética poblacional: miden que proporción de la variación genética total se distribuye dentro y entre las poblaciones.

Estadísticos F de Wright: fueron diseñados por Wright (1951) para medir el nivel de estructuración genética de una población y de sus sub-poblaciones.

Miden la fijación de los alelos en tres niveles de organización: individual, sub-población, y población. El grado de significancia de estos estadísticos es analizado por medio de intervalos de confianza generados mediante métodos de iteración sobre todos los loci desarrollados por Weir & Cockerham (1984).

F_{IS} : es la desviación proporcional de la heterocigosis observada de la esperada dentro de las sub-poblaciones. Es interpretada como una medida de endogamia dentro de la población.

$$F_{IS} = \frac{H_S - H_o}{H_S}, \quad -1 \leq F_{IS} \leq 1$$

F_{IT} : es la desviación proporcional de la heterocigosis observada de la esperada en la población total. Es interpretada como medida de la endogamia total.

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_o}{H_T}, \quad -1 \leq F_{IT} \leq 1$$

F_{ST} : es la desviación proporcional de la heterocigosis esperada total de la heterocigosis esperada dentro de las sub-poblaciones. Es interpretado como medida de diferenciación inter-poblacional.

$$F_{ST} = \frac{H_T - H_S}{H_T}, \quad 0 \leq F_{ST} \leq 1$$

Φ_{ST} : es una estimación de la diferenciación poblacional, análoga al F_{ST} , basada en la varianza genotípica provista por el programa GenAlEx. Es interpretado como la proporción de la varianza total que se da entre poblaciones. Siendo V_A la varianza entre poblaciones; y V_W la varianza dentro de las poblaciones:

$$\Phi_{PT} = \frac{\hat{V}_A}{\hat{V}_W + \hat{V}_A}$$

Q_{ST} : mide el grado de diferenciación genética poblacional calculada a partir de caracteres cuantitativos. Siendo σ_{GB}^2 la varianza entre las poblaciones y σ_{GW}^2 la varianza dentro de las poblaciones.

$$Q_{ST} = \frac{\sigma_{GB}^2}{2\sigma_{GW}^2 + \sigma_{GB}^2}$$

Medidas de estructuración genética espacial: miden el grado de parentesco entre los individuos distribuidos en el espacio.

I de Moran: es un estadístico para medir la estructuración genética espacial dentro de una población. El índice se calcula para una determinada clase de distancia s_q . Siendo n el número total de muestras; $w_{ij} = 1$ si los individuos i y j pertenecen al intervalo de distancia s_q , sino $w_{ij} = 0$; a_i es 1 si el individuo i es homocigota para ese alelo, 0,5 si es heterocigota, y 0 si el individuo no tiene

ninguna copia del alelo. El valor \bar{a} corresponde al valor promedio de a_i para todos los n individuos.

$$I_q = \frac{n \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n w_{ij} (a_i - \bar{a})(a_j - \bar{a})}{W \sum_{i=1}^n (a_i - \bar{a})^2} \quad W = \sum_{i=1}^n \sum_{j \neq i}^n w_{ij}$$

Número de alelos en común: es el número promedio de alelos en común, sobre todos los loci, entre pares de individuos que pertenecen a una determinada clase de distancia. Los valores varían entre 0 y 2. El valor promedio entre todos los pares de individuos sirve como valor de referencia. Los valores mayores al valor de referencia indican una estructuración genética espacial positiva, y los valores por debajo del valor de referencia indican una estructura espacial negativa.

9. Bibliografía

- Acosta MC, Mathiasen P, Premoli AC (2009) Filogeografía de *Nothofagus antarctica* (Nothofagaceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*. Pág. 18.
- Acosta MC, Premoli AC (2010) Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 235-242.
- Allnut TR, Newton AC, Premoli AC, Lara A (2003) Genetic variation in the threatened southamerican conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae) detected using RAPD markers. *Biological Conservation*, **114**, 245-253.
- Allnut LL, 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.
- Avise JC (1987) INTRASPECIFIC PHYLOGEOGRAPHY: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 89-522.
- Azpilicueta MM, Caron H, Bodénès C, Gallo LA (2004) SSR Markers for Analysing South American *Nothofagus* Species. *Silvae Genetica*, **53**, 240-243.
- Azpilicueta MM, Marchelli P, Gallo LA (2009) The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics & Genomes*, **5**, 561-571.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, **16**, 37-48.
<http://www.fluxus-technology.com/sharenet.htm>
- Barreda V, Palazessi L (2007) Patagonian vegetation turnovers during the Paleogene-Early Neogene: Origin of arid-adapted floras. *The Botanical Review*, **73**, 31-50.
- Barrera MD, Frangi JL, Richter LL, Perdomo MH, Pinedo LB (2000) Structural and functional changes in *Nothofagus pumilio* forests along an altitudinal gradient in Tierra del Fuego, Argentina. *Journal of Vegetation Science*, **11**, 179-188.
- Bekessy SA, Allnut TR, Premoli AC *et al.* (2002) Genetic variation in the vulnerable and endemic Monkey Puzzle tree, detected using RAPDs. *Heredity*, **88**, 243-249.
- Berg EE, Hamrick JL (1997) Quantification of genetic diversity at allozyme loci. *Canadian Journal of Forest Research*, **27**, 415-424.

- Blisniuk PM, Stern LA, Chamberlain CP, Idleman B, Zeitler PK (2005) Climatic and ecologic changes during Miocene surface uplift in the Southern Patagonian Andes. *Earth and Planetary Science Letters*, **230**, 125-142.
- Burban C, Petit RJ (2003) Phylogeography of maritime pine inferred with organelle markers having contrasted inheritance. *Molecular Ecology*, **12**, 1487-1495.
- Cantrill DJ, Poole I (2005) Taxonomic turnover and abundance in Cretaceous to Tertiary wood floras of Antarctica: implications for changes in forest ecology. *Palaeogeography Palaeocology*, **215**, 205-219.
- Cembrano J, Lara L (2009) The link between volcanism and tectonics in the southern volcanic zone of the Chilean Andes: A review. *Tectonophysics*, **471**, 96–113.
- Clausen J, Keck DD, Hiesey WM (1940) Experimental studies on the nature of species I. Effect of variable environments on western American plants. Carnegie Institute of Washington publication 520, Washington DC.
- Clausen J, Keck DD, Hiesey WM (1948) Experimental studies on the nature of species III. Environmental responses to climatic races of *Achillea*. Carnegie Institute of Washington publication 581, Washington DC.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology*, **9**, 1657-1659.
<http://darwin.uvigo.es/software/tcs.html>
- 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.
- Conkle MT, Hodgskiss PD, Nunnally LB, Hunter SC (1982) Starch gel electrophoresis of conifer seeds: a laboratory manual. General Technical Report PSW-64. Berkeley, CA: USDA Forest Service, Pacific Southwest Forest and Range Experiment Station.
- Cook LG, Crisp MD (2005) Not so ancient: the extant crown group of *Nothofagus* represents a post-Gonwanan radiation. *Proc. R. Soc. B* **272**, 2535-2544.
- Cordell S, Goldstein G, Mueller-Donbois D, Webb D, Vitousek PM (1998) Physiological and ecological variation in *Metrosideros polymorpha* a dominant Hawaiian tree species along an altitudinal gradient: the role of phenotypic plasticity. *Oecologia*, **113**, 188-196.

- Cruzan MB, Templeton AR (2000) Paleoeecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypothesis from the fossil record. *Trends in Ecology and Evolution*, **15**, 491-496.
- Cuevas JG (1999) *Dinámica poblacional en el límite arbóreo superior de Nothofagus pumilio (Poepp. Et Endl.) Krasser en Tierra del Fuego, Chile*. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile, Santiago, Chile.
- Cuevas JG (2000) Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Ecology*, **88**, 840–855.
- Cuevas JG (2002) Episodic regeneration at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Ecology*, **90**, 52-60.
- Daniels LD (2000) The dynamics of altitudinal treelines in northern Patagonia: spatio-temporal influences of climate. Ph.D Thesis Department of Geography, University of Colorado, Boulder, USA.
- Degen B (2000) SGS: Spatial Genetic Software. Computer program and user's manual. <http://kourou.cirad.fr/genetique/software.html>
- Degen B, Petit R, Kremer A (2001) SGS - Spatial Genetic Software: A computer program for analysis of spatial genetic and phenotypic structures of individuals and populations. *Journal of Heredity*, **92**, 447-448.
- Del Fueyo GM (1996) Microsporogenesis and microgametogenesis of the Argentinian species of *Podocarpus* (Podocarpaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **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.
- Dettmann ME, Pocknall DT, Romero EJ, Zamalao MC (1990) *Nothofagidites* Erdtman ex Potonié 1960: a catalogue of species with notes on the palaeogeographic distribution of *Nothofagus* Bl. (southern beech). New Zealand Geological Survey Palaeontological Bulletin 60, 79 p.
- Donoso C (1987) Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque*, **8**, 85-97.
- Donoso C, Atienza J (1983) Hibridación natural entre especies de *Nothofagus* siempreverdes en Chile. *Bosque*, **5**, 21-34.
- Donoso C, Atienza J (1984) Hibridación natural entre *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Oerst y *Nothofagus nítida* (Phill.) Krasser. *Medioambiente*, **7**, 16.

- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, **12**, 13-15.
- Drewry DJ (1976) Sedimentary basins of the east Antarctic craton from geophysical evidence. *Tectonophysics*, **36**, 301-314.
- Duhart P, Adriasola AC (2008) New time-constraints on provenance, metamorphism and exhumation of the Bahía Mansa Metamorphic Complex on the Main Chiloé Island, south-central Chile. *Revista Geológica de Chile*, **35**, 79-104.
- Dumolin-Lapègue 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.
- Dupanloup I, Schneider S, Excoffier L (2002) A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular Ecology*, **11**, 2571-2571.
- Eckert CG, Samis KE, Lougheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Molecular Ecology*, **17**, 1170–1188.
- El Mousadik A, Petit RJ (1996) Chloroplast DNA phylogeography of the argan tree of Morocco. *Molecular Ecology*, **5**, 547-555.
- Endler JA (1973) Gene flow and population differentiation. *Science* 179, 243–250.
- Ennos RA (1994) Estimating the relative rates of pollen and seed migration among plant populations. *Heredity*, **72**, 250-259.
- Epperson BK (1993) Recent advances in correlation analysis of spatial patterns of genetic variation. *Evolutionary Biology*, **27**, 95–155.
- Epperson BK, Allard RW (1989) Spatial Autocorrelation Analysis of the Distribution of Genotypes Within Populations of Lodgepole Pine. *Genetics*, **121**, 369-377.
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution*, **39**, 783-791.
- Ferris C, King RA, Hewitt GM (1999) Isolation within species and the history of glacial refugia. In: Hollingsworth, P.M., R.M. Bateman, & R.J. Gornall (Eds.). *Molecular systematics and plant evolution*. Taylor & Francis, London. Pp. 20-34.
- Folguera A, Ramos VA (2002) The effects produced by the approaching, collision and subduction of Pacific ridges in the Patagonian Andes. *Acta Geologica Hispanica*, **37**, 329-353.
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693–709.

- Galen C, Shore JS, Deyoe H (1991) Ecotypic divergence in alpine *Polemonium viscosum*: genetic structure, quantitative variation and local adaptation. *Evolution*, **45**, 1218–1228.
- Geburek T (1993) Are genes randomly distributed over space in mature populations of sugar maple (*Acer saccharum* Marsh.)?. *Annals of Botany*, **71**, 217–222.
- Geburek T, Tripp-Knowles P (1994): Genetic architecture in bur oak, *Quercus macrocarpa* (Fagaceae), inferred by means of spatial autocorrelation analysis. *Plant Systematics and Evolution*, **189**, 63–74.
- Giacosa RE, Heredia N (2004) Estructura de los Andes Nordpatagónicos en los cordones Piltriquitrón y Serrucho y en el valle de El Bolsón (41°30′-42°00′S), Río Negro. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, **59**, 91-102.
- Givnish TJ (1987) Comparative studies of leaf form: assessing the relative roles of selective pressures and phylogenetic constraints. *New Phytologist*, **106**, 131–160.
- Glasser N, Jansson KN, Harrison S, Kleman J (2008) The glacial geomorphology and Pleistocene history of South America between 381S and 561S. *Quaternary Science Reviews*, **27**, 365–390.
- Glodny J, Gräfe K, Echtler H, Rosenau M (2008) Mesozoic to Quaternary continental margin dynamics in South-Central Chile (36–42° S): the apatite and zircon fission track perspective. *International Journal of Earth Sciences*, **97**, 1271-1291.
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (v 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Goudet J, Büchi L (2006) The Effects of Dominance, Regular Inbreeding and Sampling Design on QST, an Estimator of Population Differentiation for Quantitative Traits. *Genetics*, **172**, 1337–1347.
- Gurevitch J, Chester ST (1986) Analysis of repeated measures experiments. *Ecology*, **67**, 251–5.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–523.
- Hampe A, Petit RJ (2007) Ever deeper phylogeographies: trees retain the genetic imprint of Tertiary plate tectonics. *Molecular Ecology*, **16**, 5113-5114.
- Hamrick JL, Godt MJW, & Sherman-Broyles SL (1992) Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, **6**, 95-124.

- Hamrick JL, Nason JD (1996) Consequences of dispersal in plants. En: Rhodes OE, Chesser RK, Smith MH (eds). *Population Dynamics in Ecological space and Time*. University of Chicago Press, Chicago. Pp. 203-236.
- Harpending H (1994) Signature of ancient population growth in a low resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology*, **66**, 591-600.
- Harper JL (1977) *Population biology of plants*. London Academic Press, London.
- Hartl DL, Clark AG (1997) *Principles of Population Genetics*. 3 ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 542 págs.
- Heinemann K (2007) *Aspectos espaciales y temporales del establecimiento de Nothofagus pumilio en claros de bosques maduros en los extremos de un gradiente ambiental en el Noroeste de la Patagonia*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.
- Heinemann K, Kitzberger T, Veblen TT (2000) Influences of gap microheterogeneity on the regeneration of *Nothofagus pumilio* in a xeric old-growth forest of northwestern Patagonia, Argentina. *Canadian Journal of Forest Research*, **30**, 25-31.
- Hendry A (2002) QST \geq \neq FST?. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 502.
- Hervé F, Miller H, Pimpirev C (2006) En: Fütterer DK, Damaske D, Kleinschmidt G, Miller H, Tessensohn F (eds) *Antarctica: Contributions to global earth sciences* 217–227. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, New York.
- Heusser CJ (1971) *Pollen and Spores of Chile*. University of Arizona Press, Tucson.
- Heusser CJ (1989) Late Quaternary vegetation and climate of southern Tierra del Fuego. *Quaternary Research*, **31**, 396-406.
- Heusser CJ (1993) Late Quaternary forest steppe contact zone, Isla Grande de Tierra del Fuego, subantarctic South America. *Quaternary Science Reviews*, **12**, 169-177.
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of the ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society*, **58**, 247-276.
- Hewitt GM (1999) Post-glacial recolonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society*, **68**, 87–112.
- Hewitt GM (2000) The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, **405**, 907-913.
- Hewitt GM (2004) Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B*, **359**, 183–195.

- Hill RS (1992) *Nothofagus*: Evolution from a southern perspective. *Trends in Ecology and Evolution*, **7**, 190-194.
- Hill RS (2001) Biogeography, evolution and palaeoecology of *Nothofagus* (Nothofagaceae): the contribution of the fossil record. *Australian Journal of Botany*, **49**, 321-332.
- Hill RS, Dettmann ME (1996) Origin and diversification of the genus *Nothofagus*. En: Veblen TT, Hill RS, Read J (eds). The ecology and biogeography of *Nothofagus* forests. pp. 11-24. Yale University Press: New Haven, CT.
- Hill RS, Jordan GJ, Macphail MK (1996) History and paleoecology of Australian *Nothofagus* forests. En: Veblen TT, Hill RS, Read J (eds). The ecology and biogeography of *Nothofagus* forests. pp. 182-199. Yale University Press: New Haven, CT.
- Hill RS, Read J (1991) A revised infrageneric classification of *Nothofagus* (Fagaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society*, **105**, 37-72.
- Hirao AS, Kudo G (2004) Landscape genetics of alpine-snowbed plants: comparisons along geographic and snowmelt gradients. *Heredity*, **93**, 290-298.
- Hollin JT, Schilling DH (1981) Late Wisconsin-Weichselian mountain glaciers and small ice caps. Chapter 3. En: Denton GH, Hughes TJ (Eds). The Last Great Ice Sheets. New York, John Wiley & Sons, págs. 179-206.
- Huber M, Nof D (2006) The ocean circulation in the southern hemisphere and its climatic impacts in the Eocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **231**, 9-28.
- Huenneke LF (1991) Ecological implication of genetic variation in plant populations. En: Falk DA, Holsinger KE (Eds). Genetic and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, Oxford.
- Hurlbert SH (1971) The nonconcept of species diversity: a critique and alternative parameters. *Ecology*, **52**, 577-586.
- Jakob SS, Martinez-Meyer E, Blattner FR (2009) Phylogeographic Analyses and Paleodistribution Modeling Indicate Pleistocene In Situ Survival of *Hordeum* Species (Poaceae) in Southern Patagonia without Genetic or Spatial Restriction. *Molecular Biology and Evolution*, **26**, 907-923.
- Jones HG (1992) Plant and microclimate. A quantitative approach to environmental plant physiology. Cambridge University Press, Cambridge.

- Jones RC, Vaillancourt RE, Jordan GJ (2004) Microsatellites for use in *Nothofagus cunninghamii* (Nothofagaceae) and related species. *Molecular Ecology Notes*, **4**, 14-16.
- Jordan GJ, Hill RS (1999) The Phylogenetic Affinities of *Nothofagus* (Nothofagaceae) Leaf Fossils Based on Combined Molecular and Morphological Data. *International Journal of Plant Sciences*, **160**, 1177-1188.
- Jordan N (1991) Multivariate analysis of selection in experimental populations derived from hybridization of two ecotypes of the annual plant *Diodia teres* W. (Rubiaceae). *Evolution*, **45**, 1760-1772.
- Kalinowski ST (2004) Counting alleles with rarefaction: private alleles and hierarchical sampling designs. *Conservation Genetics*, **5**, 539-543.
- Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- King RB, Lawson R (1995) Color-pattern variation in Lake Erie water snakes: the role of gene flow. *Evolution*, **49**, 885-896.
- Knapp M, Stöckler K, Havell D, Delsuc F, Sebastiani F, Lockhart PJ (2005) Relaxed molecular clock provides evidence for long-distance dispersal of *Nothofagus* (southern beech). *PLoS Biology*, **3**(1), e14.
- Knowles P, Perry DJ, Foster HA (1992) Spatial genetic structure in two tamarack [*Larix laricina* (Du Roi) K. Koch] populations with differing establishment histories. *Evolution*, **46**, 572-576.
- Lande R (1992) Neutral theory of quantitative genetic variance in an island model with local extinction and colonization. *Evolution*, **46**, 381-389.
- Larcher W. (1995) *Physiological Plant Ecology*, 3rd edn. Springer, New York.
- Latta RG (2006) Integrating patterns across multiple genetic markers to infer spatial processes. *Landscape Ecology*, **21**, 809-820.
- Leonardi S, Menozzi P (1996) Spatial structure of genetic variability in natural stands of *Fagus sylvatica* L. (beech) in Italy. *Heredity*, **77**, 359-368.
- leRoux JP, Elgueta S (2000) Sedimentologic development of a Late Oligocene-Miocene forearc embayment, Valdivia Basin Complex, southern Chile. *Sedimentary Geology*, **130**, 27-44.
- Levene H (1949) On a matching problem in genetics. *The Annals of Mathematical Statistics*, **20**, 91-94.
- Levin D, Kerster A (1974) Gene flow in seed plants. *Evolutionary Biology*, **7**, 138-220.

- Li CC, Horvitz DG (1953) Some methods of estimating the inbreeding coefficient. *American Journal of Human Genetics*, **5**, 107–117.
- Linhart YB, Grant MC (1996) Evolutionary Significance of Local Genetic Differentiation in Plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **27**, 237–277.
- Lisker F, Läufer AL, Olesch M, Rossetti F, Schäfer T (2006) Transantarctic Basin: new insights from fission track and structural data from the USARP Mountains and adjacent areas (Northern Victoria Land, Antarctica). *Basin Research*, **18**, 497–520.
- Loveless MD, Hamrick JL (1984) Ecological determinants of genetic structure of plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **15**, 65–95.
- Magri D, Fineschi S, Bellarosa R, Buonamici A, Sebastiani F, *et al.* (2007) The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology*, **16**, 5259–5266.
- Mancini MV (2009) Holocene vegetation and climate changes from a peat pollen record of the forest – steppe ecotone, Southwest of Patagonia (Argentina). *Quaternary Science Reviews*, **28**, 1490–1497.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 189–197.
- Manos PS (1997) Systematics of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): taxonomic congruence with morphology and plastid sequences. *American Journal of Botany*, **84**, 137–1155.
- Marchelli P, Caron H, Azpilicueta MM, Gallo LA (2008) Primer Note: A New Set of Highly Polymorphic Nuclear Microsatellite Markers for *Nothofagus nervosa* and Related South American Species. *Silvae Genetica*, **57**, 83–85.
- 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.
- Marchelli P, Gallo LA, Scholz F, Ziegenhagen B (1998) Chloroplast DNA markers revealed a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theoretical and Applied Genetics*, **97**, 642–646.

- 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 change in southern temperate ecosystems—a southern perspective. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 143–147.
- Martínez-Pastur G, Pinedo L, Fernandez C (1997) Germinación de semillas y sistema de propagación clonal en bosques de Tierra del Fuego. Actas II Congreso Forestal Argentino y Latinoamericano. Tomo Bosques nativos y protección ambiental. Pp. 141-147. Posadas, Argentina.
- Mathiasen P, Acosta MC, Premoli AC (2008) Phylogeographical studies in subgenus *Nothofagus* reflect past events occurred in Patagonia. XXVII International Meeting of the Willi Hennig Society y VIII Reunión Argentina de Cladística y Biogeografía. San Javier, Tucumán, Argentina, 28-31 Octubre.
- McCauley DE (1995) The use of chloroplast DNA polymorphisms in studies of gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **10**, 198-202.
- McKay JK, Latta RG (2002) Adaptive population divergence: markers, QTL and traits. *Trends in Ecology and Evolution*, **17**, 285-291.
- Mead R (1988) *The Design of Experiments. Statistical Principles for Practical Application*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Merilä J, Crnokrak P (2001) Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 892-903.
- Millar CI, Libby WJ (1992) Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. En: *Genetics and conservation of rare plants* (eds D.A. Falk & K.E. Holsinger) Oxford University Press, Oxford. Pp 149-170.
- Miller H (2007) in *Antarctica: A Keystone in a Changing World* (eds Cooper, A. K. & Raymond, C. R.) (Online Proceedings of the 10th ISAES, USGS Open-File Report, Short Research Paper 41, 2007; doi:10.3133/of2007-1047.srp041).
- Miller KG, Kominz MA, Browning JV, Wright JD, Mountain GS, Katz ME, Sugarman PJ, Cramer BS, Christie-Blick N, Pekar SF(2005) The Phanerozoic Record of Global Sea-Level Change. *Science*, **310**, 1293-1298.

- Miller MP (2005) Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity*, **96**, 722-724.
- Mitton JB, Linhart YB, Sturgeon KB, Hamrick JL (1979) Allozyme polymorphisms detected in mature needle of ponderosa pine. *Journal of Heredity*, **70**, 86-89.
- Moore PD (2000) Chile refuges. *Nature*, **408**, 532-533.
- Moran PAP (1950) Notes on continuous stochastic phenomena. *Biometrika*, **37**, 17-23.
- Mpodozis C, Ramos VA (2008) Tectónica Jurásica en Argentina y Chile: extensión, subducción oblicua, rifting, deriva y colisiones?. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, **63(4)**, 481 – 497.
- Murphy RW, Sites JW, Buth DG, Hufler CH (1996) Proteins: isozyme electrophoresis. En: Hilli DM, Moritz C, Mable BK (eds) *Molecular systematic*. Sinauer Associates, Massuchestts, USA.
- Nagy ES (1997) Selection for native characters in hybrids between two locally adapted plant subspecies. *Evolution*, **51**, 1469–1480.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, **70**, 3321-3323.
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, **89**, 583-590.
- Nei M, Maruyama T, Chakraborty R (1975) The bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution*, **29**, 1–10.
- Nishizawa T, Watano Y (2000) Primer pairs suitable for PCR-SSCP analysis of chloroplast DNA in angiosperms. *Journal of Phytogeography*, **48**, 63-66.
- Núñez-Avila M, Armesto JJ (2006) Relict islands of the temperate rainforests tree *Aextoxicon punctatum* (Aextoxicaceae) in semi-arid Chile: genetic diversity and biogeographic history. *Australian Journal of Botany*, **54**, 733-743.
- Nylander J A (2004) MrModelTest. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Uppsala. <http://www.abc.se/~nylander/>
- Ohsawa T, Ide Y (2008) Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains. *Global Ecology and Biogeography*, **17**, 152–163.
- Oleksyn J, Modrzynski J, Tjoelker MG, Zytowskiak R, Reich PB, Karolewsky P (1998) Growth and physiology of *Picea abies* populations from elevational transects:

- common garden evidence for altitudinal ecotypes and call adaptation. *Functional Ecology*, **12**, 573-590.
- Ortiz-Jaureguizar E, Cladera GA (2006) Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments*, **66**, 498-532.
- Panchal M (2007) The automation of Nested Clade Phylogeographic Analysis. *Bioinformatics*, **23**, 509-510. <http://www.rubic.rdg.ac.uk/~mahesh/software.html>
- Pankhurst RJ, Rapela CW, Fanning CM, Márquez M (2006) Gondwanide continental collision and the origin of Patagonia. *Earth-Science Reviews*, **76**, 235-257.
- Pankhurst RJ, Weaver SD, Hervé F, Larrondo P (1999) Mesozoic-Cenozoic evolution of the North Patagonian Batholith in Aysen, southern Chile. *Journal of the Geological Society*, **156**, 673-694.
- Parmesan C, Yohe G (2003) A globally coherent fingerprint of climate change impacts across natural systems. *Nature*, **421**, 37-42.
- Pastorino MJ, Marchelli P, Milleron M, Soliani C, Gallo LA (2009) The effect of different glaciation patterns over the current genetic structure of the southern beech *Nothofagus Antarctica*. *Genetica*, **136**, 79-88.
- Peakall R, Smouse PE (2006) GenAlEx 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, **6**, 288-295.
- Perreta MG, Vegetti AC (2008) Patrones estructurales en las plantas vasculares: una revisión. *Gayana Botanica*, **62**, 9-19.
- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu J-L *et al.* (2003) Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*, **300**, 1563-1565.
- Petit RJ, Csaikl UM, Bordács S, Burg K, Coart E, *et al.* (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, El Mousadik A, Pons O (1998) Identifying populations for conservation on the basis of genetic markers. *Conservation Biology*, **12**, 844-855.
- Poole I, Mennega AMW, Cantrill DJ (2003) Valdivian ecosystems in the late Cretaceous and Early Tertiary of Antarctica: further evidence from myrtaceous and eucryphiaceous 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. <http://darwin.uvigo.es/software/modeltest.html>

- Posada D, Crandall KA, Templeton AR (2000) GeoDis: A program for the cladistic nested analysis of the geographical distribution of genetic haplotypes. *Molecular Ecology*, **9**, 487-488. <http://darwin.uvigo.es/software/geodis.html>
- Premoli AC (1996) Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hybridization of South American *Nothofagus*. *Genetica*, **97**, 55-64.
- Premoli AC (1997) Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography*, **24**, 883-892.
- Premoli AC (1998) Use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas for more widespread species. In: *Proceedings of an International Workshop on Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management* (ed. International Foundation for Science), pp. 157-171. Universidade Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, Brazil.
- Premoli AC (2003) Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity*, **94**, 218-226.
- Premoli AC (2004) Variación en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Lenga). In: *Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina* (eds. Donoso C, Premoli AC, Gallo L, Iliniza R), pp. 145-166. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, Chile.
- Premoli AC, Brewer C (2007) Environmental vs. genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Australian Journal of Botany*, **55**, 585-591.
- Premoli AC, Del Castillo RF, Newton AC *et al.* (2007) Patterns of genetic variation in tree species and their implications for conservation. In: *Biodiversity loss and conservation in fragmented forest landscapes: The Forests of Montane Mexico and Temperate South America* (ed. Newton AC), pp. 121-157. CAB International.
- Premoli AC, Kitzberger T (2005) Regeneration mode affects spatial genetic structure of *Nothofagus dombeyi* forests. *Molecular Ecology*, **14**, 2319-2329.
- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen TT (2000a) Conservation genetics of the endangered conifer *Fitzroya cupressoides* in Chile and Argentina. *Conservation Genetics*, **1**, 57-66.
- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen TT (2000b) Isozyme variation and recent biogeographical history of the longlived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography*, **27**, 251-260.

- Premoli AC, Mathiasen P, Acosta MC (in review) Tree population divergence reflects Paleogene events in West Gondwana.
- Premoli AC, Raffaele E, Mathiasen P (2007) Morphological and phenological differences in *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Austral Ecology*, **32**, 515-523.
- Premoli AC, Souto CP, Allnutt 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 AE, Allnutt TR, Newton AC (2002) Patterns of isozyme variation as indicators of biogeographic history in *Pilgerodendron uviferum* (D. Don) Florín. *Diversity and Distributions*, **8**, 57–66.
- Premoli AC, Steinke L (2008) Genetics of sprouting: effects of long-term persistence in fire-prone ecosystems. *Molecular Ecology*, **17**, 3827-3835.
- Premoli AC, Vergara R, Souto CP, Lara A, Newton AC (2003) Lowland valleys shelters ancient *Fitzroya cupressoides* in the central depression of southern Chile. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, **33**, 623-631.
- Quiroga MP (2009). *Contribución para la conservación de Podocarpaceae del Sur de Sudamérica a partir de patrones genéticos y biogeográficos*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina.
- Quiroga MP, Premoli AC (2010) Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **285**, 186–193.
- Quiroga MP, Vidal Russel R, Premoli AC (2005) Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste Patagónico. *Bosque*, **26**, 25-32.
- 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.
- Ranker TA, Haufler CH, Soltis PS, Soltis DE (1989) Genetic evidence for allopolyploidy in the neotropical fern *Hemionitis* (Adiantaceae) and the reconstruction of an ancestral genome. *Systematic Botany*, **14**, 439–447.
- Rathcke B, Lacey EP (1985) Phenological patterns of terrestrial plants. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **16**, 179-214.

- Reed DH, Frankham R (2001) How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? A meta analysis. *Evolution*, **55**, 1095-1102.
- Riveros M, Parades MA, Rosas MT *et al.* (1995) Reproductive biology in species of the genus *Nothofagus*. *Environmental and Experimental Botany*, **35**, 519-524.
- Rogers DL, Millar CI, Westfall RD (1999) Fine-scale genetic structure of white bark pine *Pinus albicaulis*: associations with watershed and growth form. *Evolution*, **53**, 74-90.
- Romero EJ (1977) Polen de gimnospermas y fagáceas de la formación Río Turbio (Eoceno), Santa Cruz, Argentina. Editorial Fecic, Buenos Aires. P. 219.
- Romero EJ (1986) Paleogene Phytogeography and Climatology of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, **73**, 449-461.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP (2003) MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, **19**, 1572-1574.
- Rosello EA, Ottonei EG, Harina CE, Nevistic VA (2004) Significado tectónico y paleoambiental de los niveles carbonosos paleógenos de Estancia La Correntina, Andes Fueguinos. *Revista de la Asociación Geológica Argentina*, **59**, 778-784.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R (2003) DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*, **19**, 2496-2497. <http://www.ub.es/dnasp>
- Rusch VE (1987) Estudio sobre la regeneración de la Lengua en la cuenca del Río Manso Superior, Río Negro. Report to Consejo Nacional de investigaciones Científicas y técnicas, Buenos Aires, Argentina.
- Rusch VE (1993). Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural*, **66**, 131-141.
- Schaal BA, Veverich WJ, Rogstad SH (1991) A comparison of methods for assessing genetic variation in plant conservation of rare plants. En: Falk A, Hollinger KE (eds) Genetic and conservation of rare plants. Oxford University Press, New York, pp. 123-134.
- Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) *Arlequin ver. 2.000: a software for population genetics data analysis*. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland. <http://anthro.unige.ch/arlequin>
- Schweingruber FH (1988) Tree Rings: Basics and Applications of Dendrochronology. D. Reidel Publishing Company, Dordrecht, Holland. Páginas 39-92.

- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany*, **94**, 275-288.
- Sokal R, Oden DL (1978) Spatial autocorrelation in biology. I. Methodology. *Biological Journal of the Linnean Society*, **10**, 199-228.
- Sokal R, Rohlf FJ (1981) *Eiutnctry*, Ed. 2. W. H. Freeman & Company, San Francisco.
- Soltis DE, Haufler CH, Darrow DC, Gastoni GJ (1983) Starch gel electrophoresis of ferns: a complication of grinding buffers, and staining schedules. *American Fern Journal*, **73**, 9-27.
- Soltis DE, Morris AB, McLachlan JS, Manos PS, Soltis PS (2006) Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Molecular Ecology*, **15**, 4261-4293.
- Sork VL, Nason JD, Campbell DR, Fernandez JF (1999) Landscape approaches to historical and contemporary gene flow in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, **14**, 219-224.
- Souto C, Premoli AC (2007) Genetic variation in the widespread Proteaceae *Embothrium coccineum* (Proteaceae) endemic to Patagonia: effects of phylogeny and historical events. *Australian Journal of Botany*, **55**, 809-817.
- Spitze K (1993) Population structure in *Daphnia obtusa*: Quantitative genetic and allozymic variation. *Genetics*, **135**, 367-374.
- StatSoft, Inc. (2004). STATISTICA (data analysis software system), *version 7*.
www.statsoft.com.
- Stecconi M, Marchelli P, Puntieri J, Picca P, Gallo LA (2004) Natural Hybridization between a Deciduous (*Nothofagus antarctica*, Nothofagaceae) and an Evergreen (*N. dombeyi*) Forest Tree Species: Evidence from Morphological and Isoenzymatic Traits. *Annals of Botany*, **94**, 775-786.
- Stern K, Roche L (1974) Genetics of forests ecosystems. Ecological studies 6. Springer-Verlag, New York.
- Suárez M, Márquez M (2007) Cuenca de retroarco toarciana en Patagonia central (Chubut), Argentina: cierre, migración del arco y ambiente tectónico durante el Jurásico Medio. *Revista Geológica de Chile*, **34**, 63-79.
- 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.
- Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123**, 585–595.
- 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. <http://www.megasoftware.net/mega.html>
- Templeton AR (1983) Phylogenetic inference from restriction endonuclease cleavage site maps with particular reference to the evolution of, man and the apes. *Evolution*, **37**, 221-244.
- Templeton AR, Crandall KA, Sign CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics*, **132**, 619-633.
- Templeton AR, Routman E, Phillips CA (1995) Separating population structure from population history: a cladistic analysis of the geographical distribution of mitochondrial DNA haplotypes in the tiger salamander, *Ambystoma tigrinum*. *Genetics*, **140**, 767-782.
- Thomson SN, Brandon MT, Reiners PW *et al.* (2007) A poleward transition from destructive to constructive glacio-climatic control on mountain building. AGU Meeting, 10-14 December, San Francisco, CA, USA.
- Troncoso A, Romero EJ (1998) Evolución de las comunidades florísticas en el extremo sur de Sudamérica en el Ceofítico. En: Fortunato R, Bacigalupo N (eds) Proceedings of the VI Congreso Latinoamericano de Botánica. Monographs in Systematic Botany, Missouri Botanical Garden, Vol. 68 149-172.
- Tureson G (1922) The genotypical response of the plant species to the habitat. *Hereditas*, **3**, 211-350.
- Upchurch P (2008) Gondwana break-up: legacies of a lost world?. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 229-236.
- van Steenis CGGJ (1971) *Nothofagus*, key genus of plant geography, in time and space, living and fossil, ecology and phylogeny. *Blumea*, **19**, 65-98.
- Vekemans X, Hardy OJ (2004) New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, **13**, 921–935.

- Villagrán C, Hinojosa LF (2005) Esquema Biogeográfico de Chile. In: *Regionalización Biogeográfica en Iberoamérica y tópicos afines* (eds. Bousquets JL, Morrone JJ), pp. 551-577. Ediciones de la Universidad Nacional Autónoma de México, Jiménez Editores, México.
- Villagrán C, Moreno P, Villa R (1996) Antecedentes palinológicos acerca de la historia Cuaternaria de los bosques chilenos. In: *Ecología de los bosques nativos de Chile* (eds. Armesto JJ, Villagrán C, Arroyo MTK), pp. 51-70. Editorial Universitaria, Santiago de Chile.
- Villa-Martínez R, Moreno PI (2007) Pollen evidence for variations in the southern margin of the westerly winds in SW Patagonia over the last 12,600 years. *Quaternary Research*, **68**, 400–409.
- Volis S, Yakubov B, Shulgina I, Ward D, Mendlinger S (2005) Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of QST and FST at two spatial scales. *Heredity*, **95**, 466–475.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- Wheeler NC, Guries RP (1982) Population structure, genic diversity and morphological variation in *Pinus contorta* Dougl. *Canadian Journal of Forest Research*, **12**, 595-606.
- Whitlock MC (1999) Neutral additive genetic variance in a metapopulation. *Genetics Research*, **74**, 215-221.
- Workman PL, Niswander JD (1970) Population studies on southwestern Indian tribes. II. Local genetic differentiation in the Papago. *American Journal of Human Genetics*, **22**, 24–49.
- Wright S (1931) Evolution in mendelian populations. *Genetics*, **16**, 97-159.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323-354.
- Wright S (1965) The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard to systems of mating. *Evolution*, **19**, 358-420.
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TBJ, Ye ZH, Mao JX (1999) *POPGENE 1.32, the User-Friendly Shareware for Population Genetic Analysis*. Molecular Biology and Biotechnology Center, University of Alberta, Edmonton. Available from <http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>

10. Agradecimientos

A mi Directora, Dra. Andrea Premoli.

A los miembros del Jurado: Dr. José Bava, Dra. Viviana Confalonieri y Dra. Beatriz Saidman.

A mi familia, mi esposo Gabriel y mi hija Rocio, mis padres y hermanos.

A mis compañeros del Laboratorio Ecotono, en especial a M. C. Acosta, M. Arbetman, P. Quiroga, C. Souto, M. Fernandez, R. DiMarco, L. Garibaldi, V. Werenkraut, K. Heinemann, R. Vidal-Russell.

A mis colegas Australianos, R.C. Jones, R. Vaillancourt.

A A. Lara, F. Pedrozo, J. Rabassa, K. Duran.

A la Administración de Parques Nacionales (APN).

A la Agencia de Promoción Científica y Tecnológica que financió parte de la tesis dentro de los proyectos PICT 25833, PICT REDES 331.

A la Universidad Nacional del Comahue

A CONICET