

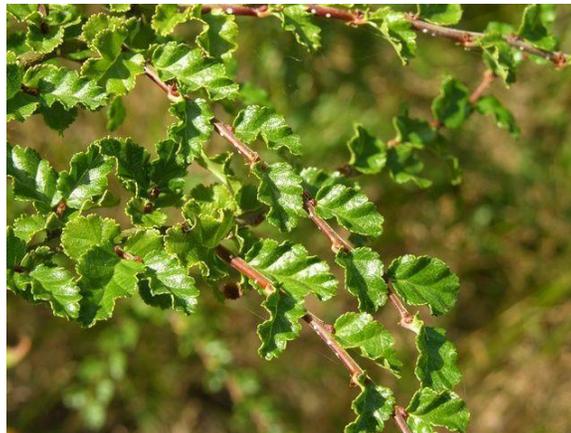
**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE**



TRABAJO FINAL DE TESIS DE LICENCIATURA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

TEMA:

**“HISTORIA BIOGEOGRÁFICA Y FILOGEOGRAFÍA DE *NOTHOFAGUS*
ANTARCTICA EN SUDAMÉRICA AUSTRAL”**



ALUMNA
Marisol Glatzel

DIRECTORA
Dra. Paula Mathiasen

CO- DIRECTORA
Dra. Andrea C. Premoli

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN	5
HISTORIA GEOLÓGICA Y CLIMÁTICA DE PATAGONIA	5
EFFECTOS DE LA HISTORIA GEOLÓGICA Y CLIMÁTICA SOBRE LA BIOTA EN PATAGONIA	9
BIOGEOGRAFÍA DE LINAJES DE BOSQUE	11
FILOGEOGRAFÍA DE NOTHOFAGUS	12
IMPLICANCIAS EN CONSERVACIÓN	14
ESPECIE Y ÁREA DE ESTUDIO	16
OBJETIVO GENERAL	19
OBJETIVOS PARTICULARES	19
HIPÓTESIS	19
PREDICCIONES	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
RECOLECCIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS	21
EXTRACCIÓN Y AMPLIFICACIÓN DE ADN	21
ANÁLISIS DE DATOS	24
<i>Diversidad genética</i>	24
<i>Red de haplotipos, análisis filogenéticos y datación molecular</i>	25
<i>Estructura genética poblacional</i>	27
<i>Análisis demográficos</i>	28
<i>Determinación de zonas genéticas y unidades de manejo y conservación</i>	29
RESULTADOS	29
<i>Distribución geográfica de la variación genética</i>	29
<i>Red de haplotipos</i>	32
<i>Árbol filogenético y análisis de datación molecular</i>	34
<i>Estructura genética poblacional mediante BAPS y AMOVA</i>	36
<i>Test de Mantel</i>	39
<i>Análisis demográficos</i>	39
<i>Bayesian Skyline Plots (BSP)</i>	41
DISCUSIÓN	42
PATRONES DE DIVERSIDAD GENÉTICA E HISTORIA DEMOGRÁFICA DE N. ANTARCTICA	42
PATRONES FILOGEOGRÁFICOS E HISTORIA EVOLUTIVA DE N. ANTARCTICA	44
DETERMINACIÓN DE ZONAS GENÉTICAS Y UNIDADES DE MANEJO Y CONSERVACIÓN	47
CONCLUSIONES	50
ANEXO	51
BIBLIOGRAFÍA	56

RESUMEN

La historia geológica y climática del sur de Sudamérica muestra transformaciones complejas del paisaje que fueron el resultado de procesos que comenzaron hace millones de años en el antiguo continente de Gondwana. La formación de cuencas sedimentarias marinas Mesozoicas hasta los eventos glaciales ocurridos durante el Pleistoceno, han determinado cambios climáticos y ambientales que influenciaron el paisaje y el desarrollo de los ecosistemas. Por lo tanto, los patrones genéticos de la biota con raíces antiguas en Patagonia como son los linajes de *Nothofagus* reflejarán dichos cambios. En esta tesis se realizó un estudio filogeográfico de *Nothofagus antarctica* a lo largo de su rango total de distribución en los bosques templados de Argentina y Chile, mediante la utilización de ADN del cloroplasto como marcador molecular. Se analizaron secuencias de ADN en total de 158 individuos de 112 sitios de colecta, pertenecientes a tres regiones no codificantes (trnH-psbA, trnL-trnF, psbB-psbH); para evaluar la variabilidad genética presente y reconstruir su historia biogeográfica y filogeográfica. Se estimaron parámetros de diversidad genética y se realizaron análisis de estructura genética y demográficos. Los resultados muestran una estructuración genética geográfica con la latitud, y una mayor diversidad genética en el centro y norte de la distribución con presencia de haplotipos únicos en todas las regiones. Se identificaron tres linajes (clados) ubicados en el norte, centro y sur de la distribución de la especie. La divergencia entre linajes y la filogenia datada mediante fósiles de *N. antarctica* fue concordante con eventos geológicos ocurridos en Patagonia en el Eoceno y Mioceno. La mayor diversidad genética en el centro y norte de la distribución y la extensa homogeneidad detectada en el sur están asociadas a eventos climáticos más recientes que ocurrieron durante el Plioceno y Pleistoceno. Se sugiere tener en cuenta la información generada en esta tesis al realizar prácticas con fines de manejo y restauración, y así evitar la mezcla de individuos provenientes de acervos genéticos divergentes.

Palabras clave: ADNcp, cuellos de botella, ESUs, ingresiones marinas, refugios glaciales, restricciones al flujo génico, vicarianza antigua.

ABSTRACT

The geological and climatic history of southern South America shows complex landscape transformations, as a result of different processes that began millions of years ago on the ancient continent of Gondwana. From the formation of Mesozoic marine sedimentary basins until the glacial events that occurred during the Pleistocene, have determined climatic and environmental changes that influenced the landscape and the development of ecosystems. Therefore, the genetic patterns of biota with ancient roots in Patagonia such as *Nothofagus* lineages will reflect these changes. This thesis conducted a phylogeographic study of *Nothofagus antarctica* throughout its total distribution range in Argentina and Chile's temperate forests, using chloroplast DNA as a molecular marker. A total of 158 DNA sequences from 112 sites were analyzed, belonging to three non-coding DNA regions (trnH-psbA, trnL-trnF, psbB-psbH); to evaluate the present genetic variability and to reconstruct the biogeographic and phylogeographic history of the species. Genetic diversity parameters were estimated and demographic and genetic structure analyses were performed. The results show a geographical genetic structuring with latitude, and greater genetic diversity in the center and north of the distribution with the presence of unique haplotypes in all regions. Three lineages (clades) were identified located in the north, center and south of the specie's distribution. The divergence between lineages and calibrated phylogeny by fossils of *N. antarctica* was consistent with geological events that occurred in Patagonia in the Eocene and Miocene. The greater genetic diversity in the center and north of the distribution and the extensive homogeneity detected in the south are associated with more recent climatic events that occurred during the Pliocene and Pleistocene. It is suggested that the information generated in this thesis should be taken into account when carrying out practices for management and restoration purposes, and thus avoid the mixing of individuals from divergent genetic pools.

Key words: ancient vicariance, bottlenecks, cpDNA, ESUs, glacial refugia, marine ingressions, restrictions to gene flow.

Introducción

Historia geológica y climática de Patagonia

La historia geológica y climática de la región Patagónica en el sur de Sudamérica muestra transformaciones complejas como resultado de diferentes procesos que comenzaron a lo largo del margen occidental de Gondwana (Hervé et al., 2006; Pankhurst et al., 2006; Miller, 2007; Upchurch, 2008). En aquel entonces, el supercontinente de Gondwana estaba formado por Sudamérica, que se encontraba todavía unida a África y a la Antártida, y estaba separada de América del Norte. Al inicio de la Era Cenozoica, hace 65 millones de años (Ma), ya se había separado África, pero el sur de Sudamérica todavía estaba unido en parte a Australia, Tasmania y Nueva Zelanda a través de la Antártida (Ezcurra et al., 2014). En el límite entre el Eoceno/Oligoceno (Fig. 1) ocurrió un gran cambio climático, los regímenes cálidos (de invernadero) pasaron a un régimen frío (de iglú) (llamados regímenes de “greenhouse” y “icehouse” según 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 de este enfriamiento, 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). Antes de que el hielo la cubriera, la Antártida tenía un clima más benigno y pudo sostener vegetación leñosa incluso hasta hace 3 millones de años (Ma), habiendo podido actuar como puente entre continentes australes (Ezcurra et al., 2014).

		Eonotema / Eón	Eratema / Era	Sistema / Período	Serie / Época	Piso / Edad	GSSP	Edad (Ma)	
Fanerozoico	Cenozoico	Cuaternario				Megalayiano	actualidad	0.0042	
						Norgripiano	0.0082		
						Groenlandiano	0.0117		
						Superior	0.129		
						Chibaniano	0.774		
		Pleistoceno						Calabriano	1.80
								Gelasiano	2.58
								Piacenziano	3.600
		Plioceno						Zancliano	5.333
								Mesiniano	7.246
		Neógeno						Tortoniano	11.63
								Serravaliano	13.82
								Langhiano	15.98
								Burdigaliano	20.44
								Aquitano	23.03
								Chatiano	27.82
								Rupeliano	33.9
		Paleógeno						Priaboniano	37.71
								Bartoniano	41.2
	Lutetiano							47.8	
	Ypresiano							56.0	
	Thanetiano							59.2	
	Selandiano							61.6	
	Mesozoico	Cretácico					Daniano	66.0	
							Maastrichtiano	72.1 ± 0.2	
							Campaniano	83.6 ± 0.2	
							Santoniano	86.3 ± 0.5	
							Coniaciano	89.8 ± 0.3	
							Turoniano	93.9	
Cenomaniano							100.5		
Albiano							~ 113.0		
Aptiano							~ 121.4		
Barremiano							125.77		
Inferior						Hauteriviano	~ 132.6		
						Valanginiano	~ 139.8		
						Berriasiano	~ 145.0		

Figura 1. Detalle del período Cretácico y de la era Cenozoica con sus períodos, épocas y Edad en millones de años (Ma). Modificado del Cuadro Estratigráfico Internacional, Comisión Internacional de Estratigrafía 2023/09; <https://stratigraphy.org/ICSchart/ChronostratChart2023-09SpanishAmer.jpg>.

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 (que comenzó a formarse en el Eoceno, pero su máxima elevación se dio desde la mitad del Mioceno, hace aprox. 15 Ma, hasta el Plioceno temprano, aprox. 5 Ma), estaba caracterizado por la formación de un sistema de grandes cuencas sedimentarias interiores, algunas de las cuales representan las mayores cuencas preservadas en Antártida, África, India, Australia y Sudamérica (Lisker et al., 2006). Particularmente a los 43º de latitud S de Patagonia, ya desde el período Jurásico, se encontró una sucesión de depósitos sedimentarios de origen marino sugiriendo la existencia de paleo-cuencas que mantenían conexión con el Océano Pacífico. 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. Más adelante, durante el Paleógeno (hace 32 Ma), se produjeron nuevas ingresiones marinas en otras regiones de Patagonia (Fig. 2).

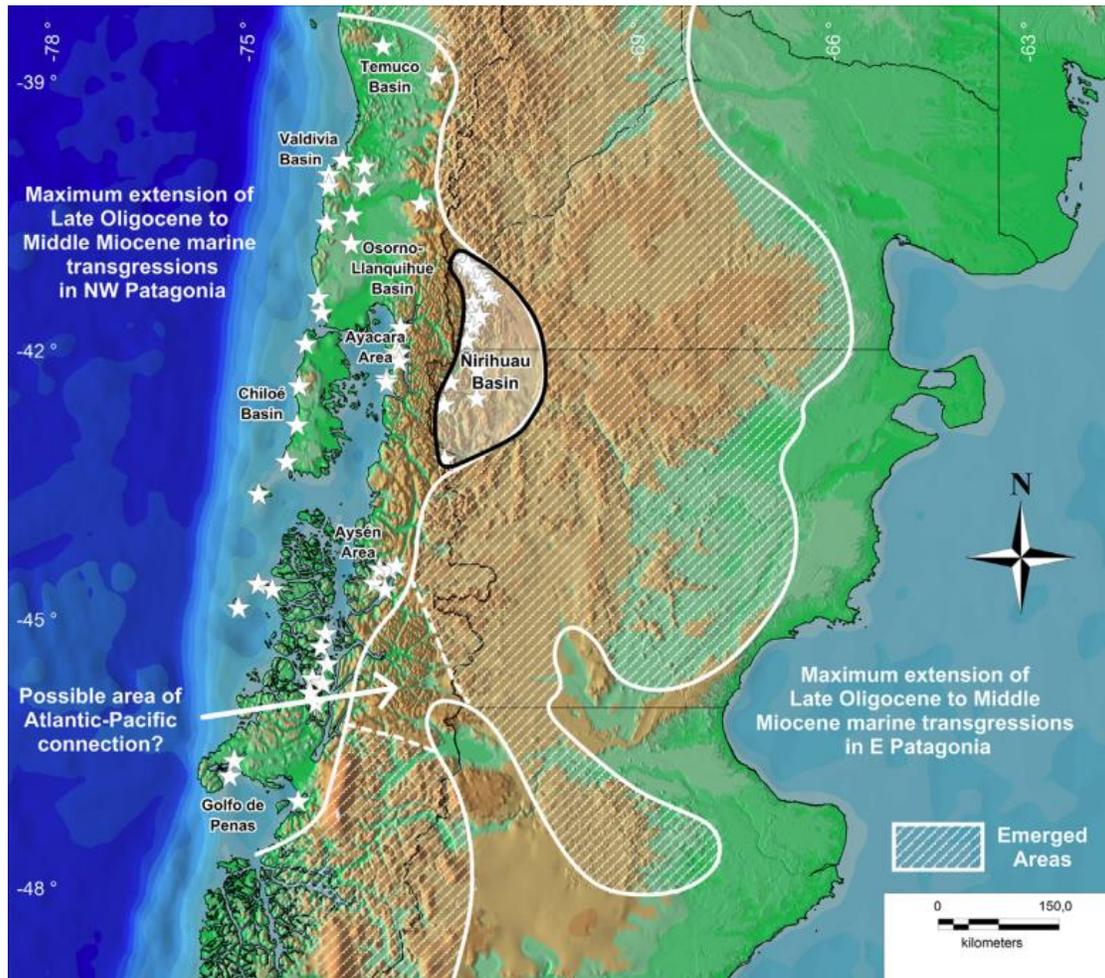


Figura 2. Mapa paleogeográfico que muestra la extensión territorial de las transgresiones marinas del Oligoceno tardío al Mioceno medio de la Patagonia central y norte. El área sombreada indica las áreas emergidas. Se indican también los límites de la cuenca de Nirihuau ubicada a los 42° de latitud S. El mapa fue extraído de Bechis et al. (2014).

Hacia el final de la era Cenozoica (hace aproximadamente 6 Ma), durante el Plioceno y Pleistoceno, la Cordillera de los Andes llegó a su máxima altura, lo que generó una gran barrera para la circulación atmosférica de los vientos húmedos provenientes del Océano Pacífico. Juntamente con la culminación del levantamiento de los Andes Patagónicos, retrocedieron los océanos y se drenaron las cuencas de origen marino. Como consecuencia, se incrementaron las diferencias oeste-este en el gradiente de precipitación (Fig. 3), produciéndose un gran cambio climático y ecológico al este de la Cordillera de los Andes (Blisniuk et al., 2005). Los bosques desaparecieron de la región extra-Andina siendo reemplazados por la estepa Patagónica (Barreda & Palazzessi, 2007). De esta manera, se dieron las condiciones

más secas y frías del continente sudamericano. El clima se fue enfriando progresivamente y tuvieron lugar las más antiguas glaciaciones cuaternarias conocidas para la Patagonia (Rabassa et al., 2005). A continuación, ocurrieron varios eventos glaciarios fríos, con sus respectivos períodos interglaciarios cálidos. Las mayores glaciaciones Patagónicas (GPG por su sigla en inglés: Great Patagonian Glaciation) 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 glaciarios (Rabassa et al., 2005).

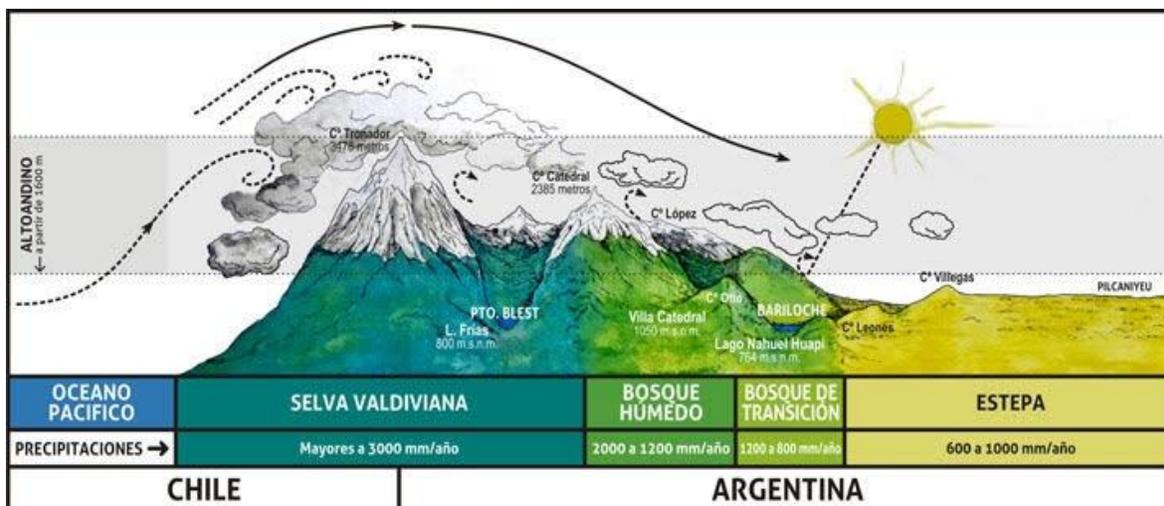


Figura 3. Gradiente de precipitaciones de oeste-este en la región de la Patagonia (extraído de Administración de Parques Nacionales <https://www.nahuelhuapi.gov.ar/flora.html>).

Efectos de la historia geológica y climática sobre la biota en Patagonia

Los eventos geológicos antiguos y los cambios climáticos y ambientales ocurridos durante los últimos cinco millones de años, influenciaron el paisaje y el desarrollo de los ecosistemas. Si bien una porción muy importante de la Patagonia estuvo cubierta por hielos, las especies vegetales tolerantes al frío, tales como *Nothofagus pumilio*, permanecieron y sobrevivieron en distintas áreas libres de hielo, formando refugios glaciarios múltiples (Premoli, 1998; Premoli et al., 2010) a lo largo de su distribución actual; desde los cuales se habría producido la expansión de rango postglacial luego del retiro de los hielos (Ezcurra et al., 2014). Estas especies sobrevivieron cerca de

los glaciares hacia latitudes más altas (54°S) (Mathiasen & Premoli, 2010) y la colonización posterior desde estos múltiples y distantes refugios implica cuellos de botella en la población, eventos fundacionales y mezcla de linajes genéticos. Así mismo, se postuló que la convergencia de linajes intraespecíficos aislados, que evolucionan independientemente durante la colonización puede contrarrestar los impactos de los eventos fundadores e incluso aumentar la diversidad genética mediante la mezcla de acervos genéticos altamente diferenciados. Así, las zonas de contacto secundarias pueden convertirse en lugares importantes para la conservación (Soliani et al., 2015).

Existen evidencias de que, durante el período glaciario, en el norte de la Patagonia hubo una mayor ocurrencia de refugios potenciales que en el área sur debido a una configuración topográfica particular a los 44°S, donde hay cambios en la orientación de las cuencas (las cadenas montañosas orientadas de norte a sur entre 42°S y 44°S cambian luego a una orientación oeste-este). Esta característica contribuyó al desarrollo diferente de las masas de hielo durante el período glacial, lo que condujo a una disposición particular de nichos ecológicos y refugios (Mattera et al., 2020). Por ello hubo una menor influencia glaciaria y áreas extensas disponibles para la existencia de refugios hacia el norte (zonas relativamente más cálidas) como los macrorrefugios documentados para Europa (Rull, 2014). La alta riqueza alélica, el bajo nivel de endogamia y la falta de evidencia de cuellos de botella genéticos en las poblaciones alrededor de la zona de contacto (en esta zona de quiebre a los 42-44° S), añaden apoyo al encuentro de rutas de colonización desde estos refugios del norte y del sur (Mathiasen & Premoli, 2010). Sin embargo, esto no descarta que la zona de contacto se deba a la convergencia de linajes que divergieron en el pasado por la existencia de cuencas interiores e intrusiones marinas a latitudes intermedias en Patagonia (Premoli et al., 2012). En segundo lugar, la zona de contacto podría ser el resultado de inmigrantes de refugios locales o cercanos (Soliani et al., 2015). Son entonces de particular interés para la conservación los patrones de colonización y asentamiento después del último período glacial, incluida la detección de contacto

secundario entre diferentes linajes y/o hibridación entre especies relacionadas alrededor de quiebres filogeográficos (Soliani et al., 2015).

Biogeografía de linajes de bosque

La historia evolutiva de la biota con raíces antiguas y que habitan en estas regiones del Hemisferio Sur y de Patagonia, en particular como son los linajes de las especies de bosque del género *Nothofagus* cuyo origen se remonta al período Cretácico, se verá afectada por todos estos cambios geológicos y climáticos. El registro fósil es una herramienta utilizada para reconstruir las condiciones climáticas pasadas que afectaron la historia biogeográfica de las especies y así poder explicar los patrones de distribución actual. El registro fósil de *Nothofagus* es muy rico y amplio en distribución (Hill, 1992); los fósiles más antiguos fueron encontrados en la Antártida y datan del período Cretácico determinando un origen gondwánico para el género (Hill, 2001). *Nothofagus* es el único género de la familia Nothofagaceae y en la actualidad está representado por cuatro subgéneros: *Lophozonia*, *Fuscospora*, *Brassospora* y *Nothofagus*, cuyas especies se distribuyen exclusivamente en el hemisferio Sur (Vento et al., 2022). Por esto, el género *Nothofagus* es considerado clave en biogeografía para comprender el origen, la distribución y la historia de colonización de la biota austral (Romero, 1986; Hill, 1992).

Las variaciones en el medio físico imponen condiciones heterogéneas sobre las especies de plantas que las habitan. En especies con amplias distribuciones geográficas (cientos a miles de kilómetros), como ocurre en *Nothofagus*, 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. Precisamente, 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), siendo los bosques patagónicos los bosques templados más australes del mundo. 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 dentro y entre poblaciones provocaría un incremento en la diferenciación genética resultando en una estructura genética compleja en especies de amplio rango como los *Nothofagus*.

Filogeografía de Nothofagus

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. Además, los enfoques filogeográficos y genéticos de poblaciones han contribuido en gran medida a dilucidar la historia evolutiva de especies individuales o grupos de taxones estrechamente relacionados y a definir puntos críticos en la conservación (Quiroga et al., 2019).

El uso de marcadores genéticos de ADN, principalmente del cloroplasto, nos permite reconstruir las relaciones genealógicas entre distintos linajes (e. g. Acosta & Premoli, 2010). Dado que estas secuencias de ADN del cloroplasto (ADNcp) son más conservadas, debido a su menor tasa de mutación, serán utilizadas para evaluar los procesos históricos que ocurrieron en Patagonia. A diferencia del ADN del núcleo (ADNn) que contiene información combinada de ambos progenitores, el de los cloroplastos solamente posee ADN de uno de ellos. En la mayoría de las angiospermas la herencia del ADNcp es materna. Como resultado, dado que las

mutaciones en el ADNcp ocurren a tasas muy lentas, permiten reconstruir eventos del pasado que ocurrieron hace decenas de miles o millones de años. Los análisis filogenéticos y filogeográficos del subgénero *Nothofagus* en el sur de Sudamérica demostraron que, aunque el ADNn permite inferir las relaciones entre especies emparentadas (Acosta & Premoli, 2010), el ADNcp es específico de la región, con lo cual la filogenia de este último, respalda la ubicación geográfica. Estudios similares realizados en otras especies arbóreas como *Quercus* (Yang et al., 2021) y *Euclalyptus* (Healey et al 2018) sólo por mencionar algunos, mostraron este mismo fenómeno, en el que poblaciones de distintas especies de un área determinada comparten las mismas variantes del cloroplasto que fue llamado captura del cloroplasto (Rieseberg & Soltis, 1991). El mismo tiene lugar en especies que pueden hibridar bajo determinadas condiciones ambientales, por ejemplo, bajo un ambiente híbrido que favorece la formación de los mismos. Al hacerlo, los híbridos tendrán en su citoplasma los cloroplastos de la especie receptora del polen, mientras que el núcleo consistirá de la contribución de ambas especies. Al cambiar las condiciones del ambiente, los individuos híbridos tenderán a retrocruzarse con individuos de las especies puras y recuperándose nuevamente estas últimas por introgresión (retrocruza en dirección de una especie parental) favorecida por la selección natural (introgresión adaptativa). De esta forma, especies que han hibridado en el pasado compartirán variantes citoplasmáticas como los haplotipos del cloroplasto. Este fenómeno ha sido descrito en detalle y comprobado mediante un extenso muestreo a lo largo de la latitud y análisis de secuencias nucleares y del cloroplasto en las especies del subgénero *Nothofagus* (Acosta y Premoli 2010) y confirmado recientemente con la secuenciación completa del cloroplasto de dichas especies (Juri 2023). Por lo tanto, las genealogías de plástidos están dissociadas de la taxonomía (y en conflicto con las nucleares) y, en cambio, muestran claros patrones geográficos y en términos de resolver relaciones taxonómicas es esencial comparar las filogenias de los plástidos con las del genoma nuclear para comprender mejor la historia evolutiva (Yang et al 2021).

Una hipótesis consiste en plantear que una vez drenadas las paleo-cuencas, probablemente como resultado del levantamiento de la principal Cordillera Andina durante el Mioceno, linajes que eran genéticamente distintos entraron en contacto entre los 40º y 43º de latitud S. Por lo tanto, estas zonas genéticamente diversas y segmentadas son áreas de contacto secundarias entre poblaciones con diferentes historias biogeográficas controladas significativamente por la geología (Premoli et al., 2012). Como resultado de una paleogeografía fragmentada, las poblaciones de distintas especies dentro del subgénero *Nothofagus* en las latitudes mencionadas sufrieron el aislamiento y la deriva. Esto resultó en la divergencia de linajes y una mayor diversidad de haplotipos de ADNcp en las zonas de contacto (Mathiasen & Premoli, 2010) que fueron además geográficamente concordantes entre distintas especies (Premoli et al., 2012). Otra posibilidad es que esa zona de contacto se haya producido mucho más recientemente, en relación al último máximo glacial (Soliani et al., 2015). El análisis de los polimorfismos (variantes genéticas) del ADN nos permite inferir si las poblaciones estuvieron separadas por mucho tiempo o poco tiempo, de acuerdo a si acumularon muchas o pocas diferencias. Además, podremos calcular a qué velocidad ocurrieron esos cambios y su relación con el tiempo que dichas poblaciones estuvieron separadas. Aunque estas fechas pueden ser medidas en unidades arbitrarias, también pueden calibrarse en millones de años utilizando el registro fósil u otra información geológica. Por ejemplo, análisis de ADN de plantas cuyo origen se remonta al mega continente Gondwana y que tienen un registro fósil incompleto, al ser combinados con información geológica, han permitido dilucidar su historia y las relaciones de parentesco entre las especies (filogenia) con relativa exactitud (Ezcurra et al., 2014).

Implicancias en conservación

La gestión adecuada de los recursos nativos depende de comprender la naturaleza y distribución de la diversidad genética entre y dentro de las especies, y de resaltar cómo se estructura esta variación genética en su rango de distribución. Dado que la

mayoría de los bosques nativos están ampliamente distribuidos y compuestos por cientos de poblaciones naturales, el manejo de sus recursos genéticos no puede basarse en unidades de una sola población. Por lo tanto, el establecimiento de unidades de manejo (MUs por sus siglas en inglés *sensu* Moritz, 1994), es necesario para la implementación de prácticas específicas que surjan de los programas de conservación o restauración. La identificación de Zonas Genéticas (GZ) es una alternativa a la delimitación de MUs. Las GZ son regiones genéticamente homogéneas dentro de las cuales las semillas pueden transferirse con bajo riesgo de provocar cambios en la estructura genética original. Un requisito para la identificación de GZ es la caracterización de la estructura poblacional de una especie, resultante de huellas genéticas de la historia evolutiva, que pueden evaluarse mediante marcadores moleculares neutros (Mattera et al., 2020).

Las especies ampliamente extendidas suelen consistir en poblaciones grandes y relativamente continuas con una alta diversidad genética. Una gran cantidad de la variación genética neutral está estructurada en el espacio (por ejemplo, debido al aislamiento histórico y las barreras al flujo de genes), lo que permite identificar las ESUs (siglas en inglés de unidades evolutivamente significativas) y las unidades de manejo (MUs) dentro de la especie. En particular, las ESUs se han utilizado en gran medida para diseñar estrategias de conservación con el fin de preservar el potencial evolutivo de especies individuales, protegiendo recíprocamente grupos de poblaciones monofiléticas por medio de secuencias de ADN y mostrando una divergencia significativa en genes nucleares (Moritz, 1994). Además, se puede utilizar para estudiar taxones emparentados, pudiendo los patrones concordantes/discordantes que surgen del análisis de distintos marcadores moleculares indicar importantes fuerzas evolutivas compartidas y procesos ecológicos actuales que dan forma a sus acervos genéticos y que pueden contribuir a la conservación de la biodiversidad (Quiroga et al., 2019; Manel et al., 2012). Como la filogeografía y la biogeografía pueden responder las mismas preguntas al abordarlas a través de diferentes metodologías, Quiroga et al. 2019, sugieren utilizar

estas dos disciplinas para extender el concepto de ESU de Moritz (Moritz, 1994) a un nivel jerárquico más inclusivo, ampliando las ESUs a la biota y así poder delimitar unidades biogeográficamente significativas (BGSUs por sus siglas en inglés *sensu* Quiroga et al., 2019).

Especie y área de estudio

Nothofagus antarctica (G.Forst.) Oerst., nombre común 'ñire', es una especie monoica que varía su tamaño según las condiciones de hábitat donde se desarrolle desde un árbol grande, de hasta 20 m de altura, hasta un árbol pequeño e incluso de tipo arbustivo (Donoso, 1974). Las hojas son bastante variables, a veces similares a las de *Nothofagus obliqua*, con base asimétrica u oblicua, y a veces relativamente similares a las de *Nothofagus pumilio*, con bordes lobulados, pero más irregularmente dentados.

Es la especie que presenta mayor amplitud ecológica entre los *Nothofagus* Sudamericanos, ocupando una gran variedad de hábitats (Steinke et al., 2008) incluidos los de condiciones ambientales extremas (Vidal Russel & Premoli, 2004). Se adapta a climas templados y fríos, caracterizados por las bajas temperaturas y heladas de los inviernos rigurosos, evidenciando una gran resistencia de sus órganos, y cuya distribución se extiende a climas polares y a la alta cordillera (Donoso, 1995). Este amplio rango de distribución pone de manifiesto algún grado de diferenciación genética y/o plasticidad fenotípica en distintos caracteres de sus poblaciones (Donoso, 1987).

Posee la capacidad de reproducirse vegetativamente más que otras especies de *Nothofagus*, siendo un modo importante de propagación de la especie, especialmente luego de la ocurrencia de disturbios. También posee una gran variación morfológica intraespecífica (Fig. 4). Esto está asociado a los biotopos diferentes que ocupa, modificando su cuerpo vegetativo y adoptando diferentes formas de vida (Vidal Russel & Premoli, 2004). Por otro lado, en la fase de reproducción sexual, se reproduce mediante semillas que son anemócoras o

dispersadas por el viento, con flores masculinas y femeninas, con un tiempo aproximado de 50 años entre generaciones dada la baja capacidad reproductiva por vía sexual (Premoli, 1991), y semejante a los valores que se han reportado para otras especies relacionadas de *Nothofagus* (Donoso, 2006).

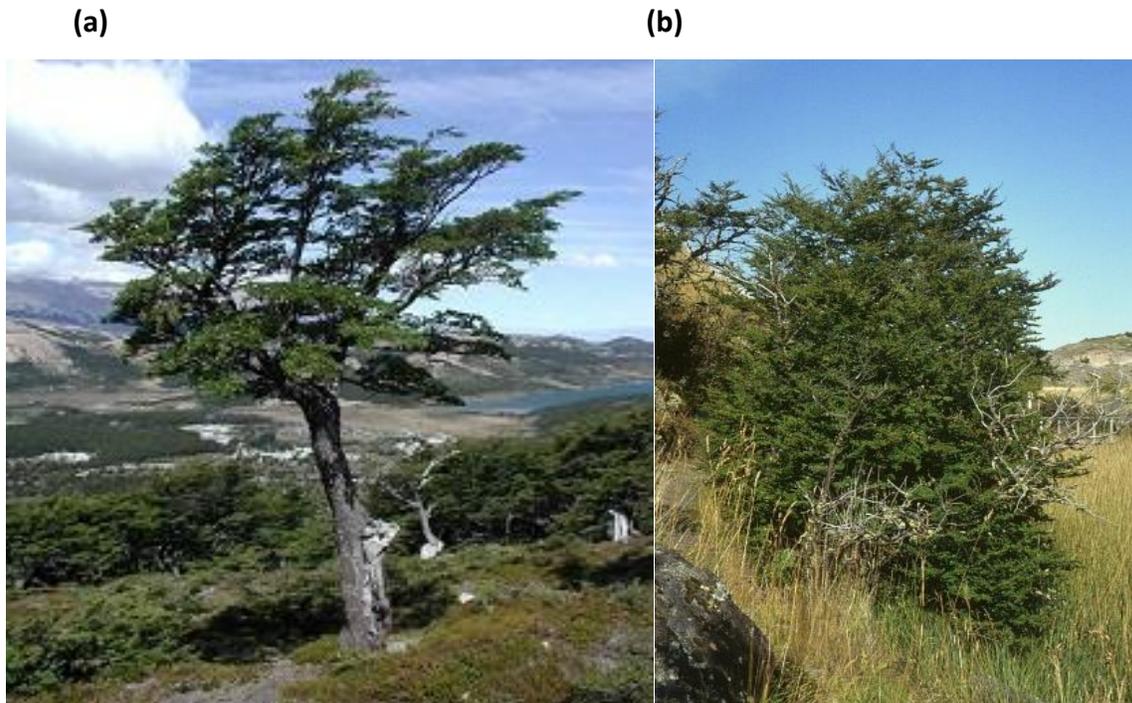


Figura 4. Diferencias morfológicas observadas en la especie *N. antarctica*, donde se muestran ejemplares con crecimiento de tipo arbóreo (a) y de tipo arbustivo (b). Fotografías de Laila Huber y Franz Xaver, respectivamente.

Nothofagus antarctica posee una amplia distribución geográfica desde los 36° 30'S hasta los 56° S a lo largo de la cordillera de los Andes (Fig. 5), tanto de Chile como de Argentina (Donoso, 1974). En este amplio rango de distribución latitudinal se encuentra desde el nivel del mar en su extremo austral (Tierra del Fuego), hasta el límite altitudinal superior del bosque (2000 msnm) hacia el límite norte de su distribución geográfica. Ocupa una gran variedad de ambientes a lo largo del abrupto gradiente de precipitaciones oeste-este (Vidal Russel & Premoli, 2004).

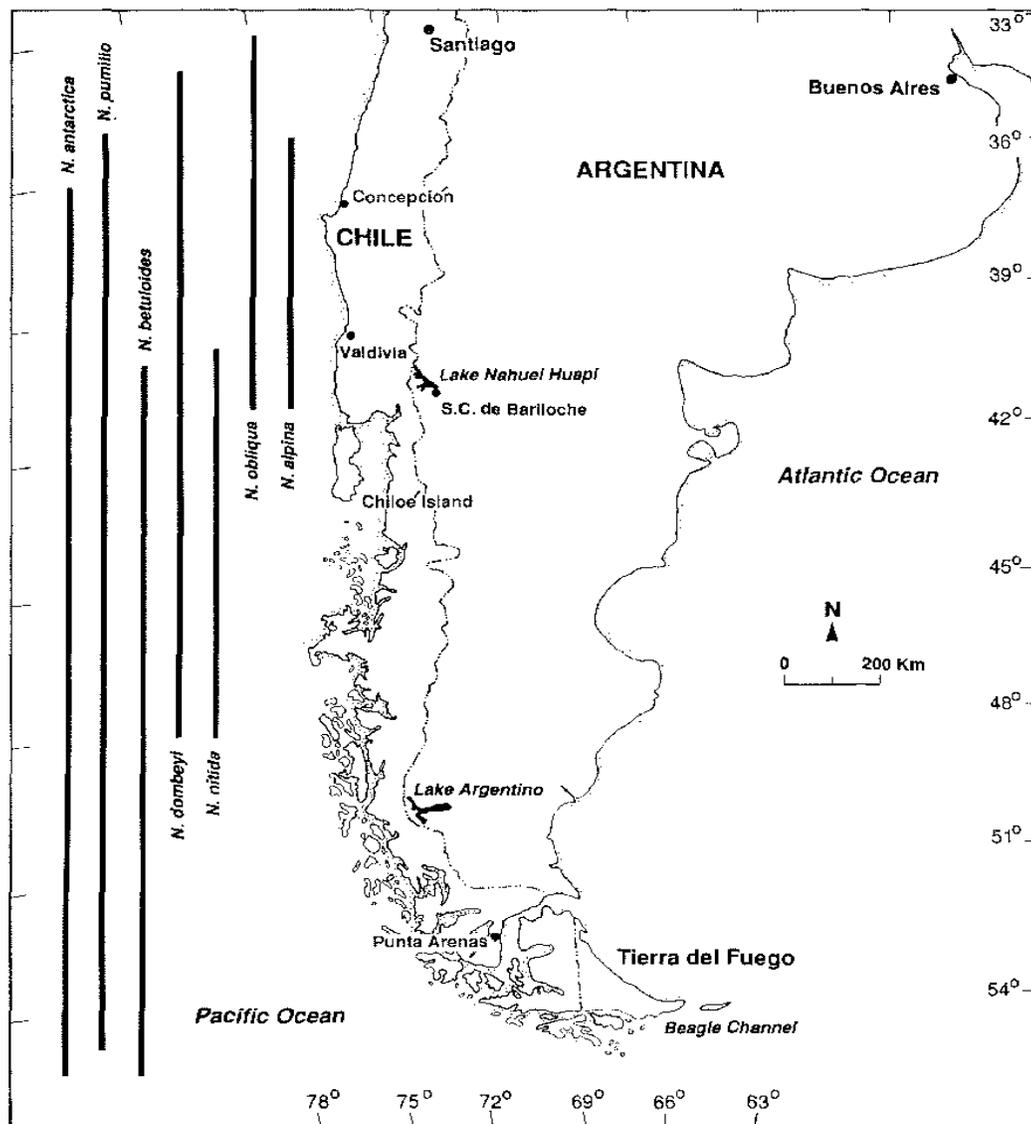


Figura 5. Distribución de las distintas especies de *Nothofagus* en la Patagonia. Mapa extraído de Veblen et al. (1996).

En esta tesis se realizó un estudio filogeográfico de *Nothofagus antarctica* (ñire) a lo largo de su rango total de distribución en los bosques templados de Argentina y Chile, utilizando el ADN del cloroplasto como marcador molecular para evaluar los distintos procesos que han modelado su acervo genético.

Objetivo general

El objetivo general de este trabajo es contribuir a la reconstrucción de la historia biogeográfica y filogeográfica de *Nothofagus antarctica*, mediante el análisis de secuencias de ADN del cloroplasto, identificando la variabilidad genética presente a lo largo de la distribución de la especie, de utilidad para el desarrollo futuro de estrategias de conservación y manejo de la especie.

Objetivos particulares

Objetivo 1. Relacionar fenómenos biogeográficos con patrones de diversidad y estructuración genética de *N. antarctica* a lo largo de su distribución geográfica.

Objetivo 2. Identificar zonas de alta y baja diversidad genética a lo largo de la distribución de la especie.

Objetivo 3. Datar las divergencias genéticas entre diferentes linajes del ADN del cloroplasto.

Objetivo 4. Delimitar zonas de alta homogeneidad genética (GZ).

Objetivo 5. Detectar distintas unidades de conservación y manejo (ESU y MU).

Hipótesis

Hipótesis 1. Las poblaciones de *Nothofagus antarctica* que actualmente están distribuidas formando bosques continuos estuvieron separadas por alguna barrera en el pasado.

Hipótesis 2. Las barreras geográficas impiden/restringen el flujo génico en las poblaciones naturales, lo que llevará a una diferenciación genética entre las poblaciones a uno y otro lado de la barrera.

Hipótesis 3. A mayor tiempo de establecimiento de las poblaciones de la especie en un área geográfica determinada, mayores serán las diferencias genéticas con poblaciones de otras áreas.

Predicciones

Predicción 1. Esperamos que las poblaciones de *N. antarctica* de diferentes regiones geográficas presenten diferencias en el ADN debido a mutaciones que ocurrieron al azar (deriva) y que se acumularon por efecto del aislamiento.

Predicción 2. Dado que la historia glaciaria al sur de los 44°S mostró procesos diferentes a los del norte, esperamos encontrar mayor variabilidad genética en este último. Por lo tanto, esperamos encontrar áreas prioritarias basadas en la diversidad genética que puedan ser de utilidad para generar unidades de conservación.

Materiales y métodos

Recolección y procesamiento de muestras

Se utilizaron secuencias de ADN del cloroplasto (ADNcp) pertenecientes a 133 individuos de 92 sitios de colecta de bases de datos preexistentes de *N. antarctica* (Acosta et al., 2014) y secuencias de 25 individuos de 20 sitios de colecta nuevos (Ver en Anexo, Tabla 1), aportando a los datos ya publicados e incrementando el número de secuencias analizadas a lo largo de la distribución de la especie (Fig. 6). Las secuencias nuevas de ADNcp fueron obtenidas a partir de muestras de tejido fresco (hojas). Para ello se colectaron a campo ejemplares de pequeñas ramas (entre 10 y 15 cm) y de 1 a 5 individuos por sitio de muestreo, que fueron transportadas al laboratorio en heladeras portátiles para su correcto mantenimiento. Las muestras colectadas fueron almacenadas en el laboratorio del INIBIOMA (CONICET-UNCo, Bariloche) en la heladera a 4°C hasta el momento de la extracción de ADN.

Extracción y amplificación de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el método de CTAB (Doyle & Doyle 1990), modificado para plantas con alta concentración de polisacáridos y que ya ha sido utilizado en otras especies del género *Nothofagus* (Mathiasen, 2010). Las concentraciones de ADN de cada muestra fueron estimadas por electroforesis en gel de agarosa 1% p/v con Buffer TAE 1X y comparados con un marcador de peso molecular de ADN de 1-kb (Fermentas, Burlington, ON, Canadá).

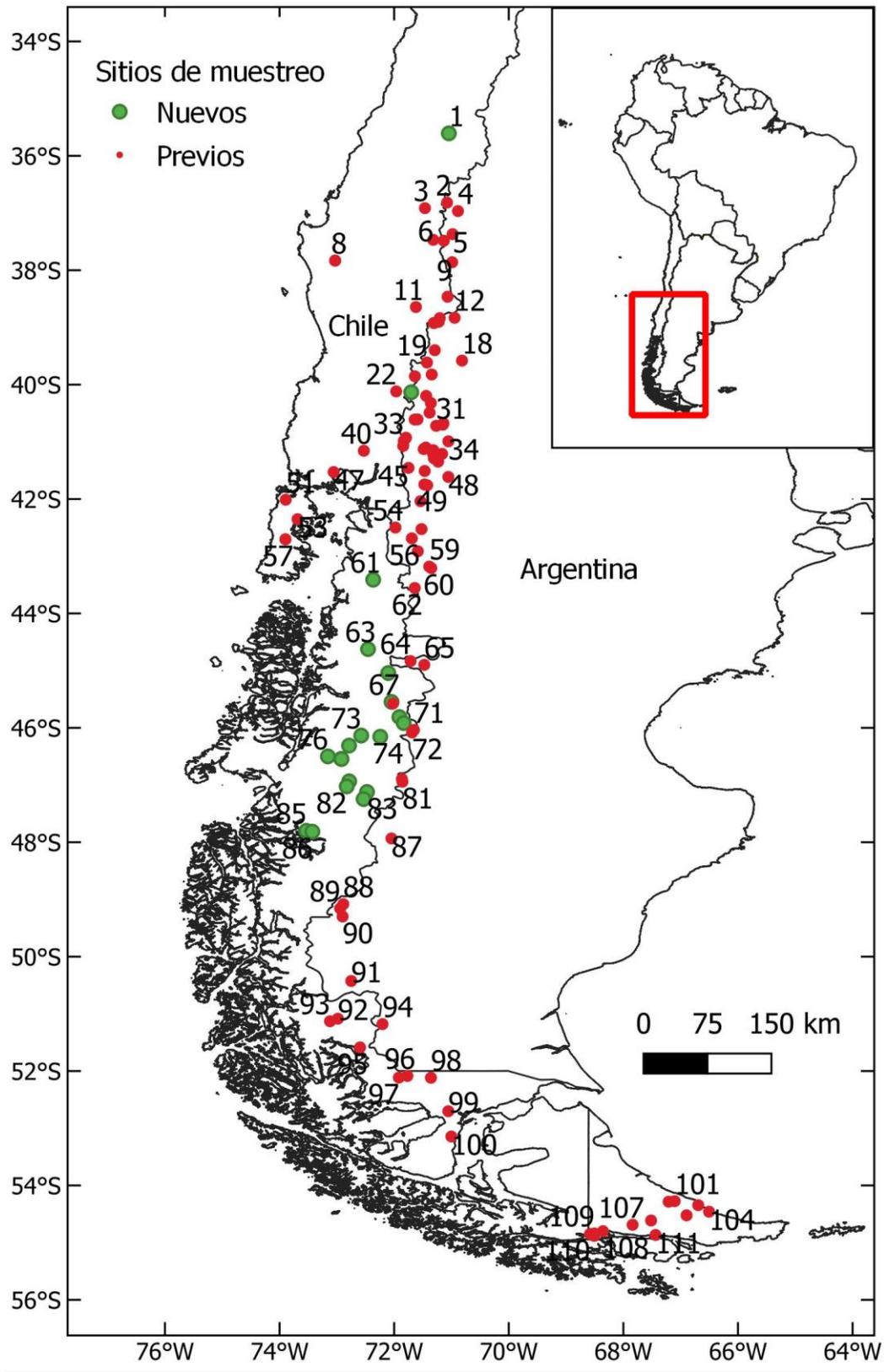


Figura 6. Distribución geográfica de los sitios de colecta de los individuos de *N. antarctica* analizados. En verde se indican los 20 sitios de colecta nuevos de esta tesis y en rojo los 92 sitios previos de Acosta et al. (2014).

El ADN extraído fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores universales de tres regiones no codificantes del genoma del cloroplasto: psbB-psbH (Hamilton, 1999), trnL-trnF (Taberlet et al., 1991) y trnH-psbA (Hamilton, 1999). La mezcla de PCR contenía 2 µL de extracto de ADN (~10 ng), 0,625 U de ADN polimerasa GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA), 5 µL de buffer 5X GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA), 0,25 mM de cada deoxinucleótido (dNTP) y 0,3 µM de cada iniciador molecular en un volumen total de 25 µL. La PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95°C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94°C por 1 minuto, anclaje según la temperatura óptima de cada iniciador a 57°C, 54°C o 56°C (para psbB-psbH, trnL-trnF y trnH-psbA, respectivamente) por 1 minuto, y extensión a 72°C por 1,5 minutos, seguidos por una extensión final a 72°C por 7 minutos. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Biosystems 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v con Buffer TAE 1X, teñidos con Syber Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA); y visualizado con un transiluminador UV. Los productos de PCR fueron limpiados con Exonucleasa I (Fermentas, Burlington, ON, Canadá) y fosfatasa alcalina (USB, Cleveland, OH, USA). La secuenciación de los productos de PCR se realizó en las instalaciones del centro de secuenciación masiva de Macrogen (Seúl, Corea).

Las secuencias amplificadas analizadas consistieron en un total de 474 secuencias de tres regiones de ADNcp de 158 individuos (158 individuos x 3 regiones = 474 secuencias), de las cuales 75 secuencias de ADN fueron obtenidas de 25 individuos de 20 sitios de colecta nuevos que completan áreas geográficas que no habían sido muestreadas previamente de la distribución de *N. antarctica* en Patagonia (Tabla 1), y 399 secuencias de ADN de 133 individuos ya publicadas en GenBank pertenecientes a las tres regiones de ADNcp (trnH-psbA, trnL-trnF, psbB-psbH) analizadas por Acosta et al. (2014).

Análisis de datos

Diversidad genética

Las 474 secuencias amplificadas fueron alineadas para cada una de las tres regiones de ADNcp por separado con el programa Mega 11 (Tamura et al., 2021) mediante el algoritmo ClustalW (Thompson et al., 1994) y dejando los parámetros de alineamiento por defecto. Posteriormente, las porciones iniciales y finales de las secuencias, correspondientes a los sitios de anclaje de los iniciadores fueron eliminadas de la matriz final del alineamiento. Se corroboró la calidad de las secuencias en base a los electroferogramas emitidos por el secuenciador de ADN. Una vez depuradas las secuencias, los alineamientos de las tres regiones de ADNcp fueron concatenadas manualmente en un solo conjunto de datos combinado para los análisis posteriores que consistió de un total de 1700 columnas alineadas. La ausencia de un determinado nucleótido (gap) y las inserciones y deleciones de un mayor número de nucleótidos (indeles), fueron codificados como eventos mutacionales únicos siguiendo la codificación simple según el método de Simmons y Ochoterena (2000) mediante el programa SeqState (Müller, 2005). Se determinaron los haplotipos de ADNcp (H) identificando la presencia de sitios variables en base a sustituciones de nucleótidos e inserciones y deleciones (indeles). Para cada región y sub-región (ver más abajo análisis de agrupamiento de BAPS), se calcularon los siguientes parámetros de diversidad: contenido de CG (%CG), número de sitios variables (S), número de haplotipos (H), y los índices de diversidad nucleotídica (π) y haplotípica (H_d) utilizando el programa DNAsp (Rozas et al., 2017). La diversidad nucleotídica es la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos escogidos aleatoriamente en la muestra sean distintos. La diversidad haplotípica es la probabilidad de que dos haplotipos escogidos aleatoriamente en la muestra sean diferentes.

Red de haplotipos, análisis filogenéticos y datación molecular

Para visualizar las relaciones entre los haplotipos generamos una red según el método de Median-Joining utilizando el programa NETWORK v10.2.0.0 (Bandelt et al., 1999), incluyendo todas las secuencias de los individuos analizados de *N. antarctica*. Los bucles o reticulaciones internas en la red se resolvieron colapsando en un solo círculo a aquellos haplotipos que presentaban conexiones ambiguas. Además, inferimos las relaciones filogenéticas entre haplotipos de las secuencias de ADNcp por el método de inferencia bayesiana (IB) utilizando el programa BEAST v1.10.4 (Suchard et al., 2018). Se utilizaron como grupo externo 10 secuencias de ADNcp de las tres regiones mencionadas anteriormente obtenidas de distintas especies de *Nothofagus* pertenecientes a los subgéneros *Lophozonia* y *Fuscospora* (*Lophozonia*: *N. cunninghamii*, *N. moorei*, *N. menziesii*, *N. glauca*, *N. obliqua*, *N. nervosa*, y *N. macrocarpa*; *Fuscospora*: *N. alessandrii*, *N. fusca* y *N. solandri*) y una de la especie *Betula pendula* de la familia Betulaceae, que pertenece al grupo hermano de la familia Nothofagaceae. Los archivos de entrada se generaron en el programa BEAUti v1.10.4 (proporcionado en el paquete BEAST) con los siguientes parámetros: el modelo de sustitución se estableció como GTR (del inglés modelo “*General Time-Reversible*”) con un modelo de heterogeneidad del sitio Gamma de cuatro categorías, e igual proporción de sitios invariantes (modelo GTR+G+I) seleccionado bajo el criterio de información de Akaike (AIC) en jModelTest v2.1.10 (Darriba et al., 2012). Se fijó un reloj estricto y el proceso de Yule para construir los árboles; se establecieron 5×10^7 generaciones para el método Monte Carlo basado en cadenas de Markov (MCMC), muestreando cada 1000 ciclos. Se generó el árbol de máxima credibilidad de clados (MCC) descartando un 25% de los 50.000 árboles obtenidos y se utilizó un límite inferior del 50% de probabilidad posterior para cada nodo, tomando el valor de la mediana con el programa TreeAnnotator v1.10.4 (provisto en el paquete BEAST). El árbol MCC obtenido se visualizó en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2018).

Los tiempos de divergencia entre haplotipos de ADNcp se estimaron mediante un análisis de datación molecular calibrado con fósiles utilizando el programa BEAST. Se utilizaron como puntos de calibración (Tabla 2) diferentes restricciones de edad de los fósiles recomendadas por Sauquet et al. (2012), que verifican la ubicación filogenética y datos geocronológicos del registro fósil de *Nothofagus* siguiendo la metodología empleada en Acosta et al. (2014). El archivo de entrada se preparó en BEAUTI configurado según: un modelo de reloj molecular relajado no correlacionado con una distribución log-normal y el proceso de especiación de Yule para la distribución de los tiempos de divergencia. Los parámetros de calibración *a priori* se establecieron de la siguiente manera: para la restricción de la edad de la raíz del árbol se implementó una distribución normal (con una media de 85 Ma y un desvío estándar de 5 Ma, de acuerdo a la edad del tipo de polen ancestral de *Nothofagus*; Tabla 2) y para los nodos internos se implementaron distribuciones uniformes con límites mínimos estrictos (edad del fósil), y límites máximos arbitrariamente grandes (1000 Ma). Las MCMC se configuraron para correr por a $1,5 \times 10^7$ generaciones, tomando muestras cada 1000 ciclos. Para determinar la densidad del núcleo para cada nodo se utilizaron las fechas de divergencia y los intervalos de credibilidad utilizando Tracer v1.7.1 (Rambaut et al., 2018). El árbol de máxima credibilidad de clados obtenido se visualizó en FigTree v1.4.4 (Rambaut, 2010).

Tabla 2: Conjuntos de taxones con sus respectivas restricciones de edad en los puntos de calibración y edades estimadas a partir del análisis de datación molecular basado secuencias de datos de ADNcp de especies de *Nothofagus*.

Taxon	Nodo*	Edad (Ma)*	Tipo de fósil
Betulaceae/Nothofagaceae (raíz)	R	85±5	Polen ⁽¹⁾
<i>Lophozonia/Fuscospora/Nothofagus</i>	LFN	83.5	Polen ⁽²⁾
<i>Fuscospora/Nothofagus</i>	FN	65.5-70.6	Polen ⁽³⁾
<i>Lophozonia</i>	L	31.5-33.9	Hojas ⁽⁴⁾
<i>Lophozonia Australia</i>	LAus	0.8-1.8	Hojas ⁽⁵⁾

*Los nombres de identificación de los nodos, las restricciones de edad y los fósiles corresponden a los utilizados para el análisis de datación molecular de *Nothofagus* por Sauquet et al. (2012) y Acosta et al. (2014).

⁽¹⁾ 'tipo ancestral' *Nothofagidites kaitangataensis* Te Punga; Romero (1973); Dettman et al. (1990).

⁽²⁾ *Nothofagidites senectus* M. E. Dettmann and G. Playford; Dettman and Playford (1968), Stover and Partridge (1973), Macphail (2007).

⁽³⁾ *Nothofagidites brachyspinulosus* (Cookson) W. K. Harris; Harris (1965), Macphail (2007).

⁽⁴⁾ *Nothofagus tasmanica* R. S. Hill; Hill (1983).

⁽⁵⁾ *Nothofagus cunninghamii* (Hook. F.) Oerst; Oersted (1871), Jordan (1999).

Estructura genética poblacional

Se evaluó la existencia de estructuración poblacional mediante un análisis de agrupamiento de individuos. El número de grupos genéticos (o 'clusters', denominados con la letra K) se determinó mediante inferencia Bayesiana implementada en el programa BAPS v6.0 (Cheng et al., 2013). Se realizó un análisis de agrupamiento genético de los individuos, partiendo de mezcla de poblaciones (admixture) y variando el número de grupos desde K = 2 hasta K = 6 con 10 réplicas cada uno. El número óptimo de grupos genéticos (K) se determinó en base a los cambios de probabilidad marginal logarítmica del factor Bayesiano. El grado de diferenciación entre los grupos identificados fue explorado en base a la matriz de distancias genéticas KL estimada en BAPS. Los patrones de divergencia genética (restricciones al flujo génico) entre poblaciones de *N. antarctica* fueron evaluados a través de un análisis de varianza molecular (AMOVA) usando GenAIEx v6.503

(Peakall & Smouse, 2012). Para el AMOVA se utilizaron dos niveles jerárquicos agrupando a los individuos en regiones y sub-regiones en base a los agrupamientos determinados por el análisis de BAPS, y se determinó la significancia de los parámetros estimados mediante 9999 permutaciones. Por otro lado, para evaluar aislamiento por distancia se analizó la relación entre la distancia genética y geográfica mediante un Test de Mantel con 9999 permutaciones usando GenAlEx v6.503 (Peakall & Smouse, 2012).

Análisis demográficos

Se realizaron distintos análisis para detectar cambios en el tamaño efectivo poblacional en el pasado para el total de la muestra y en cada región en particular. Los test de neutralidad ponen a prueba la hipótesis de que las poblaciones evolucionan en forma neutral viendo las desviaciones de la condición de equilibrio. Bajo la premisa de una población con evolución neutral (en ausencia de selección y migración), se espera que una población estable muestre un equilibrio entre la pérdida de variación genética por deriva y la acumulación de nuevas mutaciones por mutación. Esta condición de equilibrio que se da en una población neutral puede estar influenciada por la historia poblacional y la selección natural. Para ello, se emplearon las pruebas de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989), F y D de Fu y Li (Fu y Li, 1993), Fs de Fu (Fu, 1997) y los gráficos de distribución de desajuste observada y esperada (MMD) (Rogers & Harpending, 1992). Estos análisis parten de observar que los episodios de crecimiento/decrecimiento poblacional dejan huellas en las diferencias en los sitios nucleotídicos entre pares de individuos que pueden detectarse en secuencias de ADN (Ramos-Onsins & Rozas, 2002). De esta manera, los diferentes patrones observados reflejan historias demográficas distintas. Un exceso de polimorfismos de baja frecuencia es indicativo de una expansión poblacional, mientras que un déficit indicaría una reducción poblacional significativa (cuello de botella). Además, se estimó cambio en el tamaño efectivo poblacional a lo largo del tiempo a partir de los datos de secuencias de ADNcp a través de gráficos

de horizonte bayesianos (BSP, del inglés Bayesian Skyline Plots) (Drummond et al., 2005) implementado en el software BEAST, siguiendo los parámetros establecidos para *Nothofagus* por Acosta et al. (2014). Estos análisis muestran la relación entre el tamaño efectivo poblacional (N_e) y la cantidad de cambios (θ) a partir de datos de secuencias de ADN y son una herramienta robusta para estimar fluctuaciones en el tamaño poblacional en el tiempo. Los gráficos BSP fueron realizados a partir de los archivos .log obtenidos en el programa Tracer v1.7.1 (Rambaut et al., 2018).

Determinación de zonas genéticas y unidades de manejo y conservación

Tanto los grupos de máxima divergencia genética que determinaron las regiones y sub-regiones y los resultados de divergencia entre grupos del AMOVA, son de utilidad para poder determinar zonas genéticas (GZ), y áreas de manejo y conservación como Unidades Evolutivas Significativas y Unidades de Manejo (ESUs y MUs, respectivamente).

Resultados

Distribución geográfica de la variación genética

El análisis de las secuencias concatenadas de 158 individuos pertenecientes a 112 sitios de muestreo de *N. antarctica* resultó en una matriz alineada de 1700 columnas, de las cuales 791 correspondían a la región psbB-psbH, 437 a la región trnL-trnF, y 472 a la región trnH-psbA. El promedio del contenido de C/G de las secuencias analizadas fue del 33,8%. Se identificaron en total 28 sitios variables (S) entre sustituciones e indels (Tabla 3). Particularmente se encontraron 4 indels de más de 10 pb como eventos mutacionales únicos: un indel de 15 pb en la región psbB-psbH; un indel de 17 pb en la región trnH-psbA; y dos indels de 25 y 19 pb en la región trnH-psbA (Tabla 3). En base a los sitios variables se determinaron un total de 22 haplotipos que corresponden a toda la distribución geográfica de la especie. La distribución geográfica de los haplotipos se encontró estructurada latitudinalmente (Fig. 7), con 7 haplotipos pertenecientes a la región Norte, 10 a la

región del Centro y 5 a la del Sur (Tabla 3). La diversidad haplotípica total de la muestra fue de $H_d = 0.881$, y comparando entre las 3 regiones la que mostró mayor diversidad fue la del norte ($H_d = 0.837$), luego la del centro ($H_d = 0,775$), y la menos diversa fue la del sur ($H_d = 0,445$). En cuanto a la diversidad nucleotídica, la observada para el total fue $\pi = 0.0057$, siendo la región del Centro la más diversa ($\pi = 0.00136$). Así mismo, esta región fue la que presentó el mayor número de haplotipos ($H = 10$) y de sitios variables ($S = 8$), seguida por la del Norte con 7 haplotipos y 6 sitios variables, y por último la del Sur, con 5 haplotipos y 3 sitios variables. El contenido de C+G fue muy similar para todos los grupos (Tabla 4).

Tabla 3. Sitios variables de las secuencias alineadas de las regiones de ADN del cloroplasto psbB-psbH, trnL-TrnF y trnH-psbA utilizados para determinar los 22 haplotipos de *N. antarctica* encontrados en el Bosque Templado Austral.

Región	psbB-psbH				trnL-trnF					trnH-psbA																			
Haplotipo	43	150	203	218	930	1097	1127	1128	1129	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1334	1392	1405	1406	1412	1413	1416	1417	1418	1419	1460	1484	1528	
H1	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	-	-	A	A	-	G	T	A	A	A	A	A	A	A	A	****	A	T
H2	C	T	*	A	-	**	-	-	-	T	T	-	-	A	A	-	G	A	A	A	A	A	A	A	A	A	****	A	T
H7	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	T	-	A	-	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	T	
H8	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	T	
H9	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	T	T	A	-	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	T	
H10	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	-	-	A	-	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	T	
H13	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	-	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	T	
H15	C	T	*	A	-	**	-	-	-	T	T	-	-	A	A	-	G	A	A	A	A	A	A	A	A	****	C	T	
H12	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	T	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	G	
H22	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	T	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	****	A	T	
H3	A	A	-	C	T	**	T	T	T	-	-	-	-	C	A	-	T	T	C	A	A	-	-	-	-	-	A	G	
H4	A	A	-	C	T	**	T	T	-	-	-	-	-	C	A	-	T	T	C	A	A	-	-	-	-	-	A	G	
H5	A	A	-	C	T	**	T	T	-	-	-	-	-	C	A	-	T	T	C	A	A	A	-	-	-	-	A	G	
H6	A	A	-	C	T	**	T	T	T	-	-	-	-	C	A	-	T	T	C	A	A	A	-	-	-	-	A	G	
H11	A	A	-	C	T	**	T	T	T	-	-	-	-	C	A	***	T	T	C	A	A	A	-	-	-	-	A	G	
H19	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	T	T	-	A	-	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	-	A	T	
H18	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	-	-	-	A	A	-	G	T	A	T	C	A	A	A	-	-	A	G	
H20	C	T	*	A	-	**	T	-	-	T	-	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	-	A	G	
H21	C	T	*	A	-	**	T	T	-	T	-	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	-	A	G	
H14	C	T	*	A	-	-	T	-	-	T	-	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	-	A	G	
H16	C	T	*	A	-	-	T	-	-	T	T	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	-	A	G	
H17	C	T	*	A	-	-	T	-	-	T	-	-	-	A	A	-	G	T	A	T	A	A	A	A	-	-	C	G	

* Indel 15 pb "TTTTTGATTTGGC"; ** indel de 17 pb "GCCTGAATAAGACTTTG"; *** indel de 25 pb "TTATAAGATATAAGAGTCAAAAAAT";

****:indel de 19 pb "GATTAAGAAGAACGTATAT".

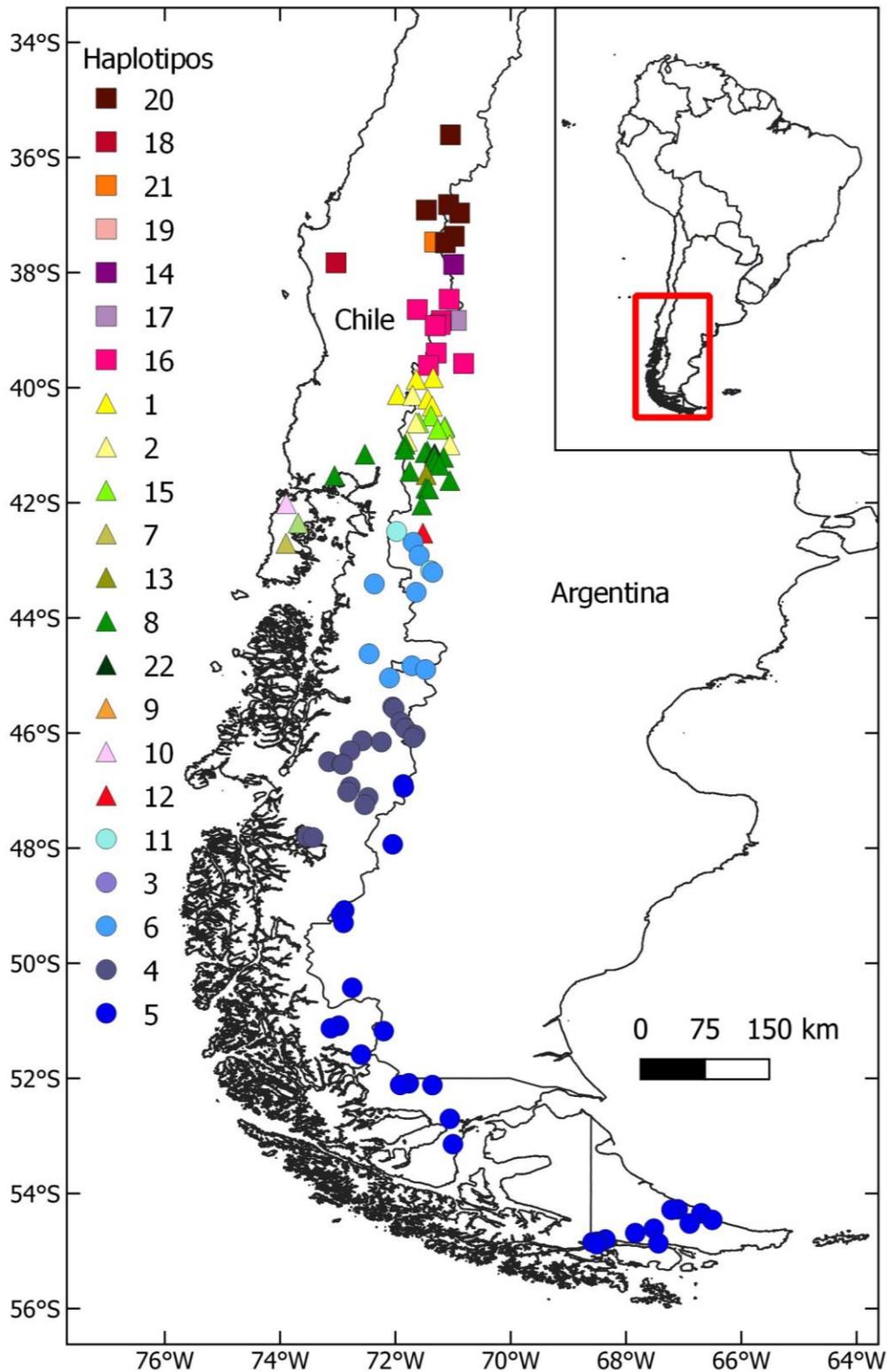


Figura 7. Distribución geográfica de los 22 haplotipos de ADNcp de *N. antarctica* en el sur de Argentina y Chile. Cada haplotipo está marcado con un color diferente y el tipo de símbolo indica la región geográfica a la cual pertenece; norte (cuadrados), centro (triángulos) y sur (círculos).

Tabla 4: Parámetros de diversidad genética de *N. antarctica* estimados a partir de secuencias de ADNcp para tres regiones geográficas (norte centro y sur) y para el total de la muestra. N: número de individuos analizados; H: número de haplotipos; Hd: diversidad haplotípica; pi: diversidad nucleotídica; S: número de sitios variables; C+G contenido de citosina y guanina.

Región	N	H	Hd	Pi	S	C+G
Norte	29	7	0.837	0,00090	6	0.335
Centro	70	10	0.775	0,00136	8	0.337
Sur	59	5	0.445	0,00032	3	0.337
TOTAL	158	22	0.881	0.00577	28	0.338

Red de haplotipos

Se obtuvo una red que incluyó a los 22 haplotipos obtenidos para la especie, que presentaba 2 reticulaciones internas (o bucles). Para resolverlas se colapsaron los haplotipos ambiguos con los haplotipos más frecuentes, que presentaban una diferencia de un solo paso mutacional (Fig. 8, círculos con colores combinados). Es posible observar a grandes rasgos en esta red tres grandes grupos de haplotipos estructurados geográficamente, en las tres regiones previamente mencionadas. Los haplotipos del grupo sur se separan por un mayor número de pasos mutacionales de los de los grupos norte y centro. Se pueden observar algunos haplotipos más frecuentes (círculos de mayor tamaño) ubicados en una posición central en la red. Estos poseen más haplotipos derivados de ellos. También encontramos otros círculos de menor tamaño, que corresponden a los haplotipos menos frecuentes ubicados en la periferia. Todos los haplotipos mostraron una significativa asociación geográfica y estuvieron restringidos a áreas particulares. No se encontró ningún haplotipo distribuido a lo largo de toda la distribución geográfica analizada de la especie.

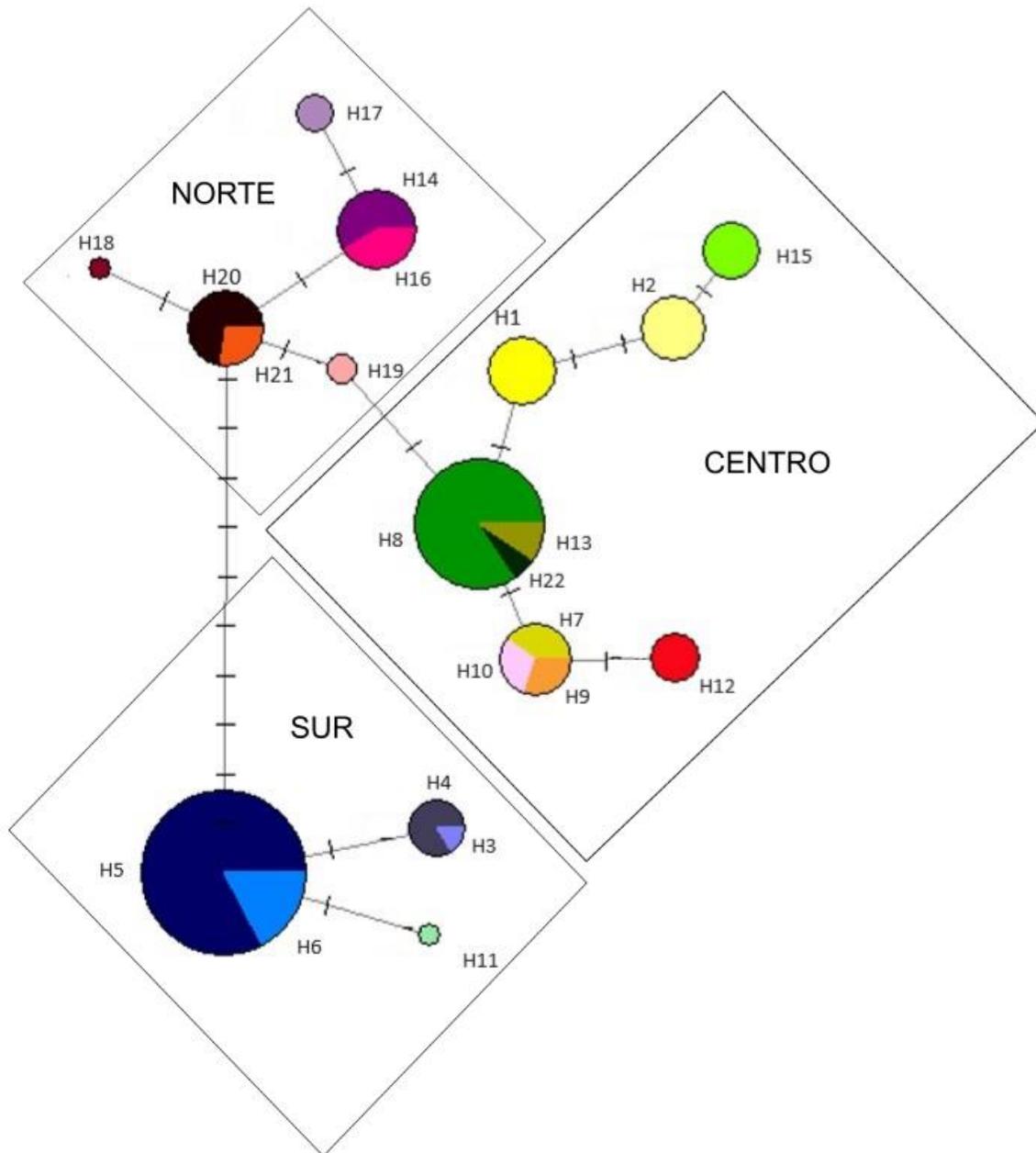


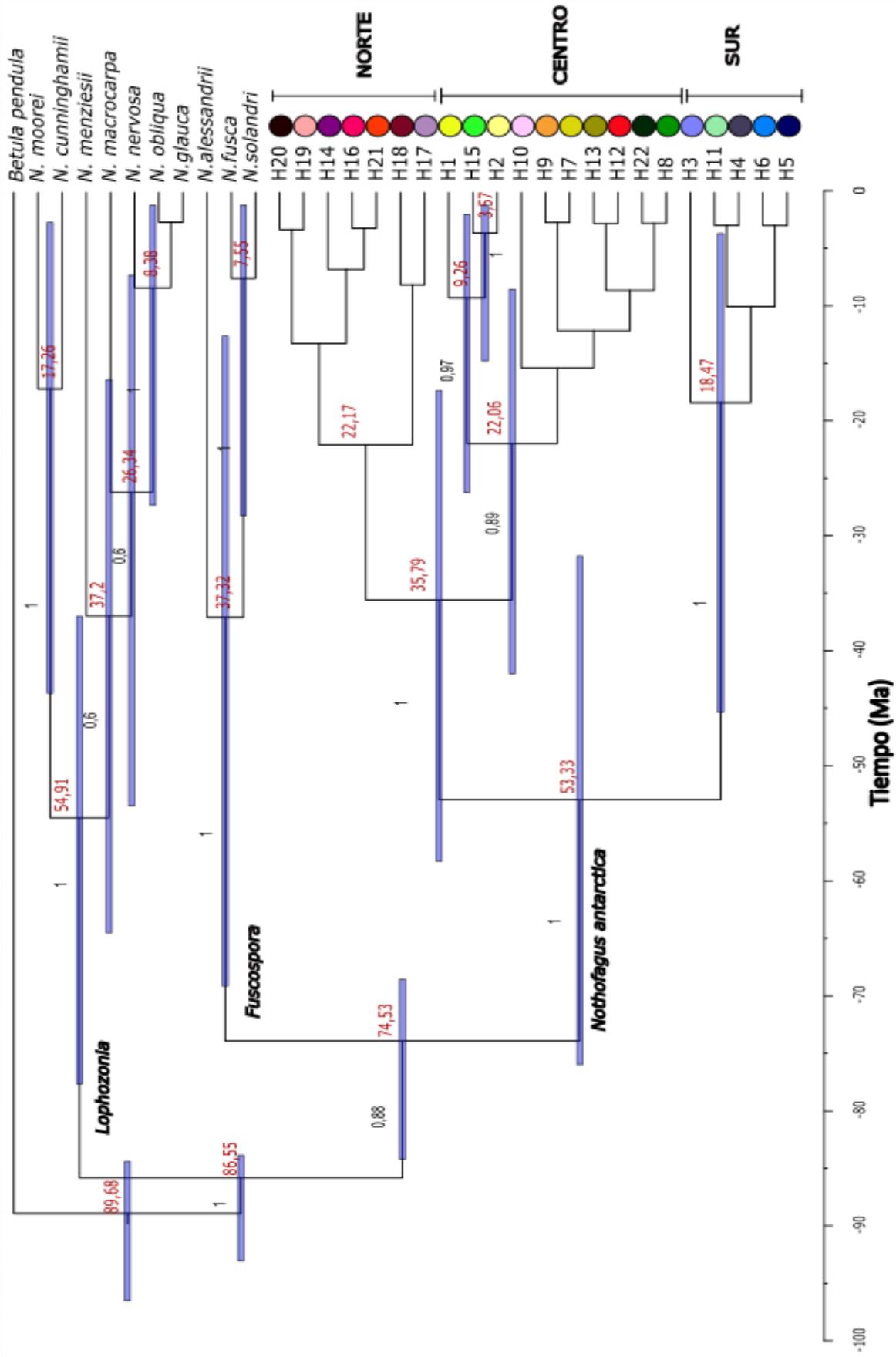
Figura 8. Red de haplotipos mostrando las conexiones entre los 22 haplotipos de ADN del cloroplasto identificados en *N. antarctica* en base a secuencias de ADNcp. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo correspondiente. Las líneas indican los sitios donde ocurrieron los cambios en las secuencias de ADN (eventos mutacionales). Los círculos con más de un color representan los haplotipos que fueron colapsados por formar reticulaciones internas.

Árbol filogenético y análisis de datación molecular

Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos fueron deducidas mediante el método de Inferencia Bayesiana (IB). El árbol de máxima credibilidad de clados obtenido arrojó una primera y clara separación en dos grandes grupos (subgéneros *Fuscospora* y *Nothofagus*) hermanos al grupo del subgénero *Lophozonia*, utilizados como grupo externo (Fig. 9). El clado que contiene a los 22 haplotipos de *N. antarctica* se divide en tres clados, dos grandes grupos monofiléticos y a su vez uno de ellos también se divide en dos. Estos 3 grandes clados corresponden entonces a cada una de las regiones Norte, Centro y Sur de la distribución geográfica de la especie. El clado sur está representado por 5 haplotipos: H3, H4, H5, H6 y H11, mientras que los otros dos clados corresponden a las regiones Norte y Centro, e incluyen a los 15 haplotipos restantes (Fig. 9).

El análisis de datación molecular mostró que la edad estimada de divergencia entre los subgéneros de *Nothofagus* resultó concordante en aproximadamente 54 Ma (Fig. 9). Por otra parte, nos muestra una divergencia de los linajes de ADNcp de *N. antarctica* de 53.3 Ma (Eoceno) entre los grandes grupos del Norte y Sur, mientras que entre los grupos Norte y Centro obtuvimos una edad de divergencia de 35.79 Ma aproximadamente, siendo el grupo del Sur el último en diversificarse a los 18.47 Ma (Fig. 9).

Figura 9 (página siguiente). Árbol de máxima credibilidad de clados obtenido por inferencia bayesiana con BEAST y datación molecular calibrada con fósiles de la divergencia entre haplotipos de *N. antarctica*. Los números en color rojo al lado de los nodos indican la edad de divergencia estimada (Ma); los números sobre las ramas indican los valores de probabilidad posterior bayesiana (sólo se muestran los valores de BPP>0,50); las barras azules indican el intervalo del 95% de la densidad posterior máxima para cada nodo (95% HPD). Los círculos de colores indican los distintos haplotipos, que se corresponden con los colores de la red de haplotipos (Fig. 8). Se indican los distintos subgéneros (*Lophozonia*, *Fuscospora*) y especies de *Nothofagus* y *Betula pendula* utilizados como grupo externo.



Estructura genética poblacional mediante BAPS y AMOVA

El análisis de agrupamiento Bayesiano de los individuos identificó dos agrupamientos más probables con K=3 y K=5, los cuales produjeron los menores cambios de probabilidad marginal logarítmica del factor Bayesiano ($\ln -1366,46$ y $\ln -1418,88$, respectivamente) y que a su vez presentaron la máxima diferenciación genética (Fig. 10; Tablas 6 y 7). Estos agrupamientos se utilizaron para definir las tres regiones (K=3), y las cinco sub-regiones (K=5). En el caso del agrupamiento con K=3, se identificaron 3 grupos separados latitudinalmente (Fig. 10A), los cuales se corresponden a los linajes de haplotipos del Norte, Centro y Sur (coincidente con las regiones establecidas para el rango de distribución de la especie). Con K=5, el agrupamiento generado fue de 2 para el sector Norte, 2 pertenecientes al Centro y uno para el Sur (Fig. 10B).

Tabla 6: Matriz de distancias KL obtenida del BAPS para las distintas regiones (K=3).

	Norte	Centro	Sur
Norte	0	0,012	0,050
Centro	0,012	0	0,046
Sur	0,050	0,046	0

Tabla 7: Matriz de distancias KL obtenida del BAPS para los distintas sub-regiones (K=5).

	G1	G2	G3	G4	G5
G1	0.000	0.008	0.011	0.029	0.051
G2	0.008	0.000	0.018	0.027	0.042
G3	0.011	0.018	0.000	0.027	0.048
G4	0.029	0.027	0.027	0.000	0.046
G5	0.051	0.042	0.048	0.046	0.000

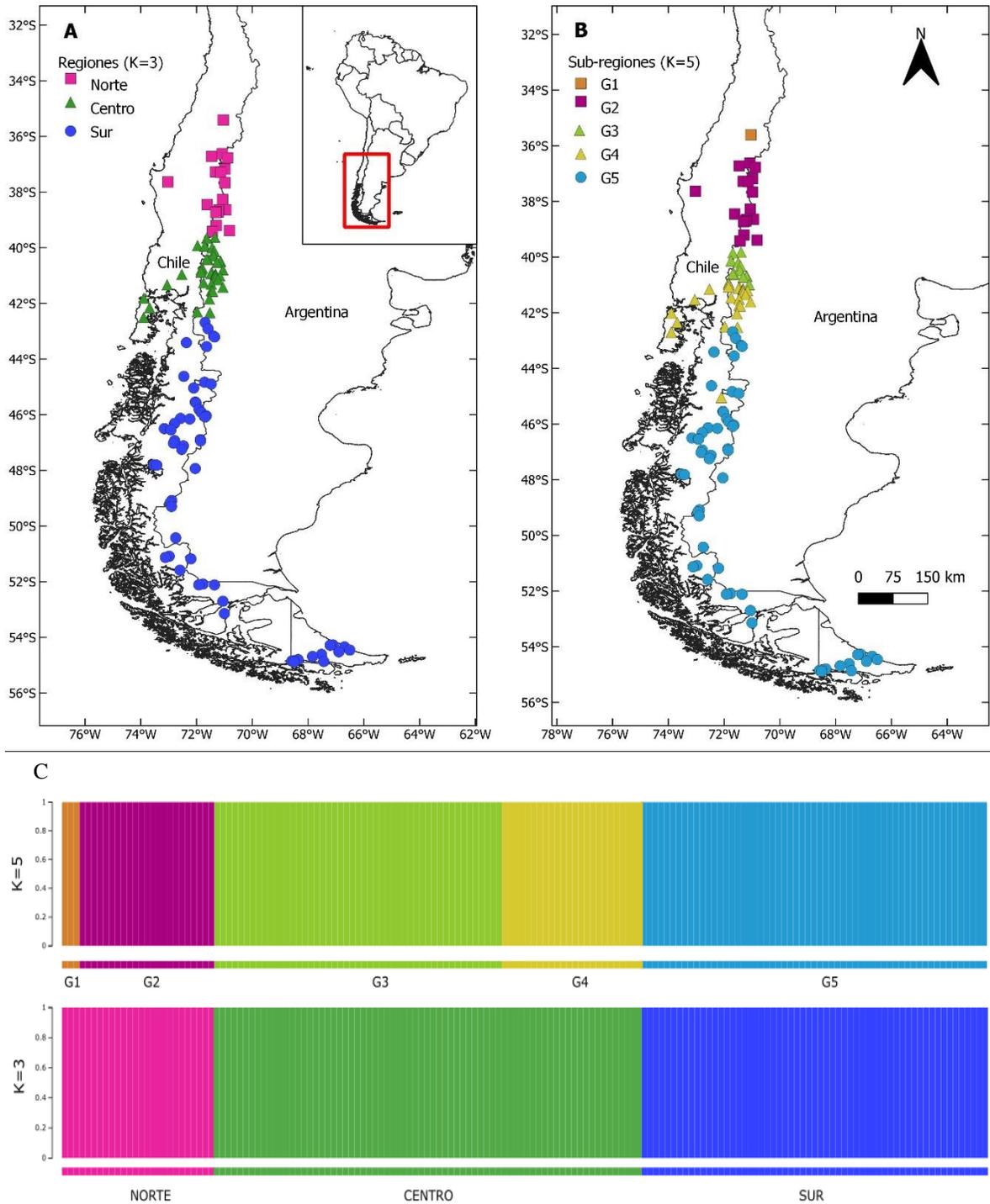


Figura 10. Análisis de agrupamiento bayesiano realizado con BAPS. Se muestran los resultados obtenidos para los grupos genéticos de $K=3$ y $K=5$ que se utilizaron para definir las regiones y sub-regiones respectivamente. (A) Distribución geográfica de los individuos coloreados según las regiones y (B) de las sub-regiones identificadas por este análisis; (C) gráficos de barras que muestran la asignación de cada individuo según los distintos agrupamientos para $K=5$ (G1 a G5) y $K=3$ (Norte, Centro y Sur) indicados con distintos colores.

Se utilizaron los agrupamientos obtenidos en BAPS para determinar los niveles jerárquicos del análisis de AMOVA, particionando la varianza total entre las tres regiones (Norte, Centro y Sur) y las 5 sub-regiones (G1 a G5). Los resultados del análisis de AMOVA mostraron una estructura genética significativa en *N. antarctica* (Tabla 8). La mayor parte de la estructuración genética se debe a las diferencias entre las 5 sub-regiones ($\Phi_{iPR}= 0.384$, $p=0.001$), y la diferenciación entre regiones también fue significativa ($\Phi_{iRT}=0.197$, $p=0.001$). Dentro de las sub-regiones se observa también una alta variabilidad genética (Tabla 8, Fig. 11).

Tabla 8. Resumen del AMOVA, analizando la partición de la variabilidad genética entre regiones, entre sub-regiones y dentro de las sub-regiones.* indica valores significativos ($p<0,01$). GI: grados de libertad; SC: suma de cuadrados del error; CM: cuadrado medio del error; Est.Var: Varianza estimada; %: porcentaje de la varianza total.

Fuente de variación	GI	SC	CM	Est. Var.	%
Entre Regiones	2	2040,989	1020,495	9,185*	20%
Entre Sub-Regiones	2	585,432	292,716	14,374*	31%
Dentro de Sub-Regiones	153	3521,959	23,019	23,019*	49%
Total	157	6148,380		46,578*	100%

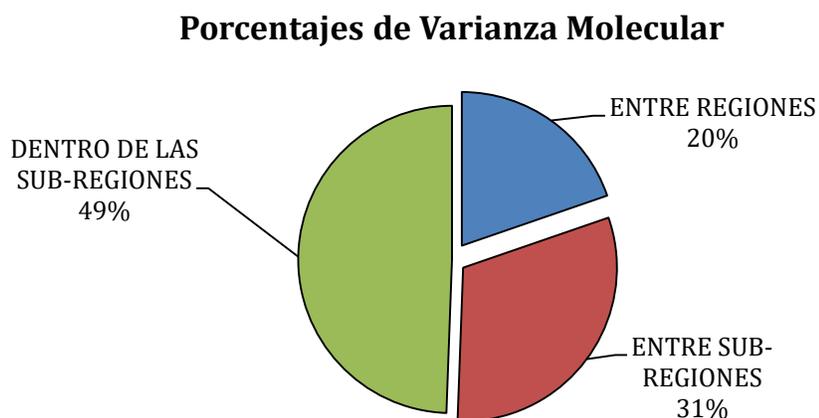


Figura 11. Porcentajes de la varianza molecular obtenida mediante el análisis de AMOVA jerárquico utilizando los agrupamientos de BAPS en regiones y sub-regiones de las secuencias de ADNcp de *N. antarctica*.

Test de Mantel

El análisis de aislamiento por distancia mostró una correlación positiva y significativa ($r_{xy} = 0,419$; $p = 0,001$) entre la distancia genética y la distancia geográfica, lo que indica que los individuos que están más cercanos geográficamente son más similares entre sí genéticamente. De la misma manera, a medida que los individuos están más alejados geográficamente se encuentra mayor diferenciación genética (Fig. 12).

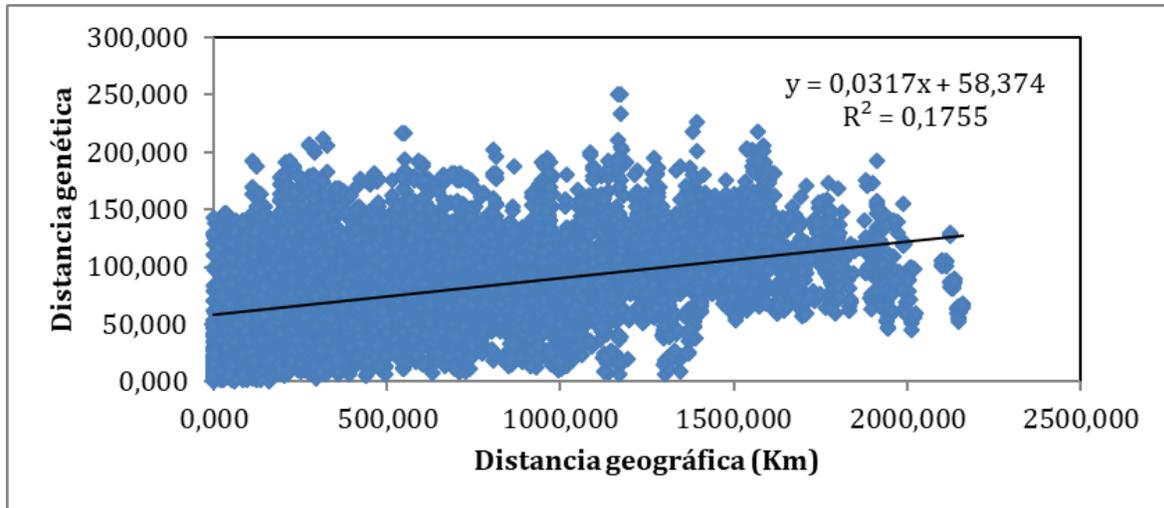


Figura 12. Correlación entre la distancia genética y la distancia geográfica proporcionada por el test de Mantel en *N. antarctica*.

Análisis demográficos

Los resultados de los tests de neutralidad, estadísticos D de Tajima, Fs de Fu, y F y D de Fu & Li, mostraron valores positivos significativos (2,75, $p < 0,01$ para el D de Tajima y 2,08, $p < 0,02$ para F de Fu & Li) para el total de las secuencias, indicando un déficit de polimorfismos de baja frecuencia. En cuanto a estos estadísticos evaluados para cada región en particular, los valores para las tres regiones resultaron no significativos ($p > 0,10$) (Tabla 9).

Tabla 9. Diferentes estadísticos estimados por los test de neutralidad realizados en *N. antarctica*. * indica valores significativos ($p < 0,05$).

Región	D de Tajima	Fu's Fs	D de Fu y Li	F de Fu & Li
Total de la muestra	2.74537*	2.515*	1.12841*	2.07690*
Norte	-0,81707	-0,877	-3,36559	-2,77325
Centro	0,93248	1,263	1,28173	1,37547
Sur	-0,36189	-1,708	-0,45718	-0,47439

Los análisis de distribución no correspondida de las diferencias entre pares de secuencias (MMD) indicaron historias demográficas distintas (Fig. 13). Analizando el total de la muestra, la distribución multimodal de las diferencias pareadas entre secuencias evidenciando grupos genéticos diferenciados. En la región Centro se observó un patrón bimodal en la distribución de frecuencias de diferencias pareadas. En cambio, en el caso de las poblaciones pertenecientes a la región Norte y a las del Sur, se obtuvo una curva unimodal, lo que nos estaría indicando una mayor frecuencia de polimorfismos con pocas diferencias entre las secuencias.

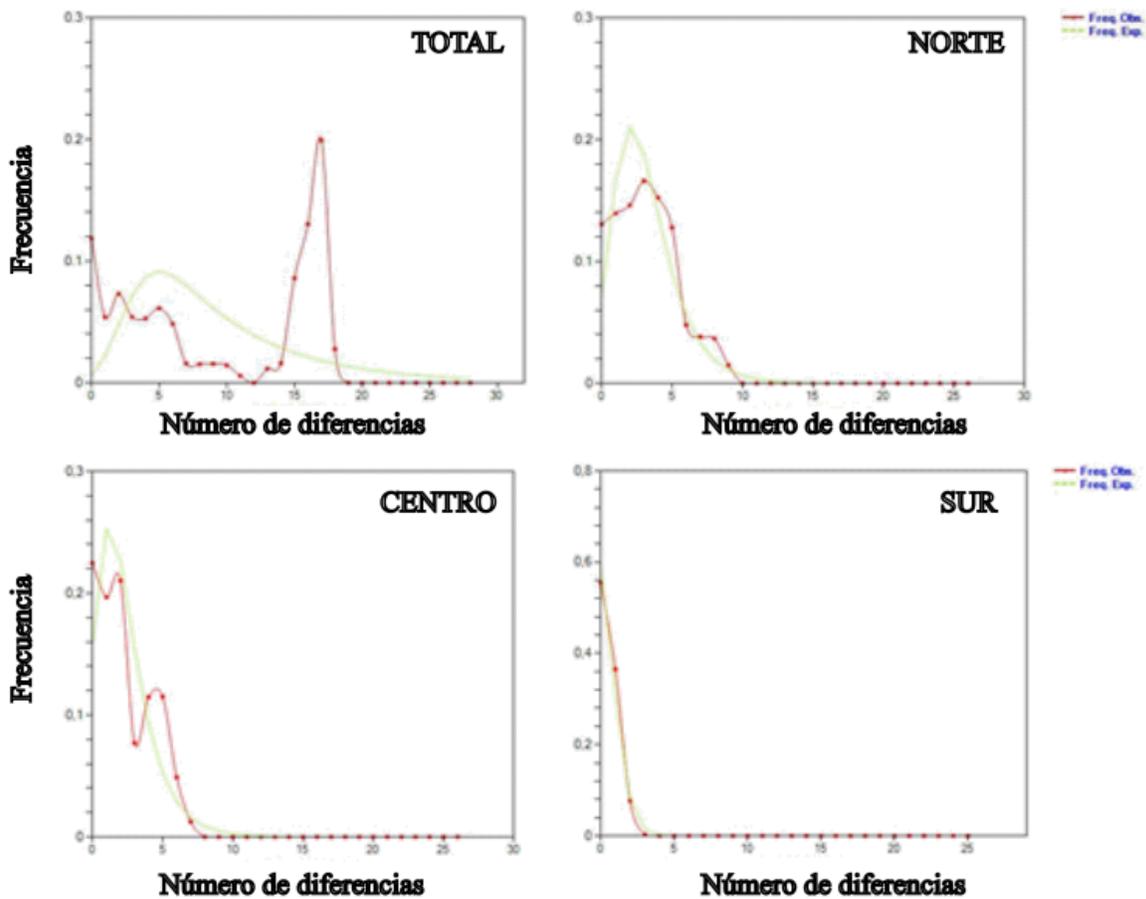


Figura 13. Gráficos de análisis de distribución no correspondida de diferencias entre pares de secuencias (MMD) de *N. antarctica* para la muestra total, y para las regiones Norte, Centro y Sur respectivamente.

Bayesian Skyline Plots (BSP)

Las estimaciones en el cambio del tamaño efectivo poblacional a lo largo del tiempo mostraron diferentes patrones para el total de la muestra y para las tres regiones (Fig. 14). Podemos observar una tendencia general en la especie a una expansión poblacional, sobre todo en los últimos 2,5 Ma (Pleistoceno inferior). En el caso de las regiones del Centro y del Sur, ambas muestran esta tendencia de expansión poblacional, aunque el grupo del Centro permanece incrementando el tamaño efectivo poblacional, mientras que en el caso del Sur se estabilizó y ese crecimiento poblacional comenzó hace más tiempo (hace 7 Ma aproximadamente). Por otro lado, el grupo del Norte contrario a la tendencia, indicaría una disminución reciente (1 Ma) en el tamaño efectivo poblacional.

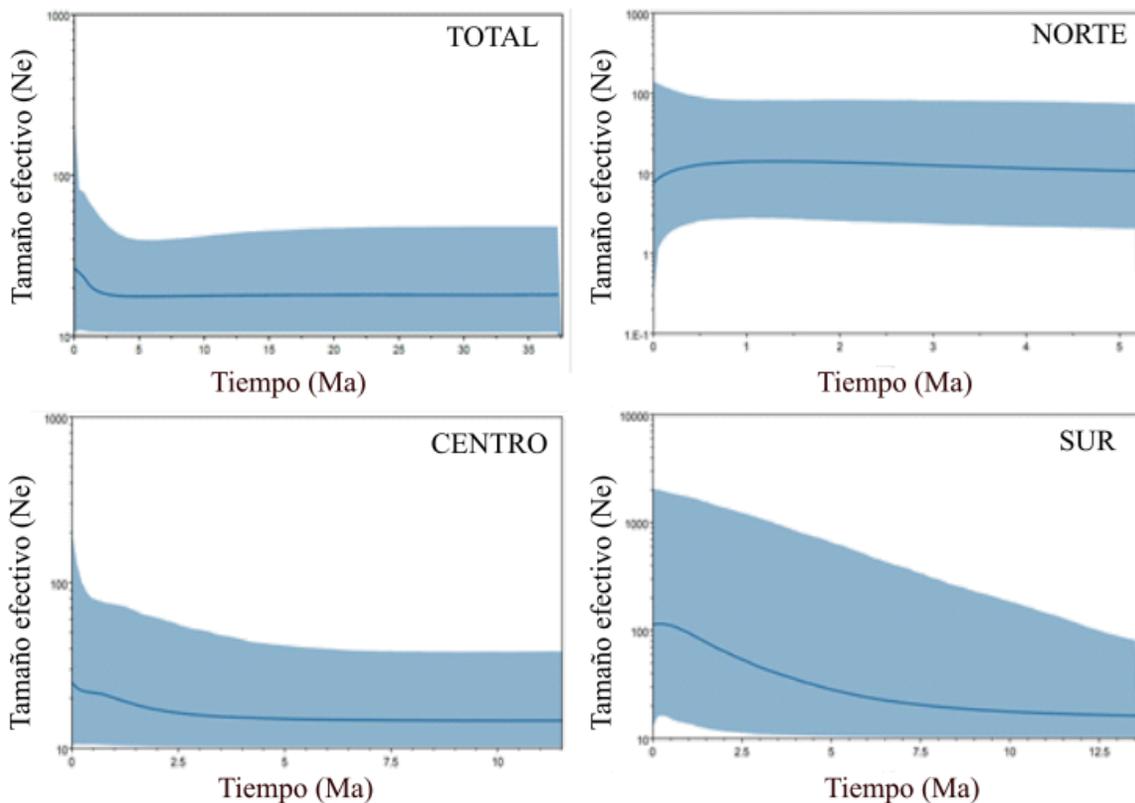


Figura 14. Estimaciones del tamaño efectivo poblacional (N_e) mediante los análisis de BSP (Bayesian Skyline Plots) para todas las poblaciones de la distribución de *N. antarctica* (Total) y para cada una de las regiones geográficas (Norte, Centro y Sur).

Discusión

Patrones de diversidad genética e historia demográfica de N. antarctica

La diversidad de haplotipos del cloroplasto de *N. antarctica* varió con la latitud encontrándose una mayor diversidad en el centro y norte de la distribución y una gran homogeneidad genética hacia el sur. Este resultado es congruente con lo encontrado en otras especies de *Nothofagus* como *N. pumilio*, en la que la diversidad de haplotipos disminuyó hacia el sur y que fuera explicado en base a la compleja orogenia en latitudes más bajas que históricamente aisló a las poblaciones del norte entre sí (Mathiasen & Premoli, 2010). Esto, sumado a que durante los períodos glaciarios existió una menor cobertura de hielo en el norte que habría favorecido la supervivencia en múltiples áreas, i.e. refugios, conservando así una mayor diversidad de haplotipos del cloroplasto en el norte de la distribución. Los análisis demográficos para la especie muestran un patrón multimodal y junto con los valores positivos significativos de los test de neutralidad muestran una marcada estructura geográfica. En cuanto a los MMD, el patrón unimodal tanto del Sur como del Norte mostraron señales de expansión poblacional, mientras que el patrón bimodal del Centro evidenció cuellos de botella. A su vez, los análisis bayesianos (BSP) para estimar las fluctuaciones en el tamaño efectivo poblacional contemporáneo de *N. antarctica*, evidencian patrones divergentes al norte y al sur de la distribución. Por un lado, estos análisis muestran una reciente declinación poblacional en el grupo del norte, mientras que el grupo del centro presenta una expansión poblacional. Por otro lado, las variaciones en el tamaño efectivo del grupo sur indican un aumento del tamaño efectivo poblacional en el último millón de años, con una estabilización demográfica más reciente. Estos patrones podrían estar reflejando que la reducción en el tamaño efectivo de las poblaciones del norte podría ser debido a que las condiciones climáticas en estas latitudes se volvieron más cálidas para esta especie tolerante al frío. La evidencia del registro palinológico muestra una mayor abundancia de polen de *Nothofagus* tipo *dombeyi*, tipo polínico que comparten las

cinco especies del subgénero *Nothofagus*, hacia el centro de la distribución (41°S) en el tardiglacial, y que las poblaciones del sur (47°S) habrían alcanzado los valores de abundancia actuales recién en los últimos 7.000 años calAP (Iglesias et al., 2016). Por otro lado, el modelaje de nicho ecológico de su especie hermana *N. pumilio* mostró que, aunque existieron áreas habitables para especies leñosas a lo largo de la distribución del bosque de Patagonia durante la última glaciación, dichas zonas fueron más extensas hacia el norte del rango (Premoli et al., 2010). Si bien *N. antarctica* posee una gran amplitud ecológica y crece en una variedad de hábitats diferentes, hacia el norte de su distribución se la encuentra a mayor altitud (Veblen et al., 1996), ya que los climas más cálidos en zonas de menor altitud a esas latitudes serían menos favorables para su crecimiento. Por otro lado, las poblaciones del centro se encuentran distribuidas en una gran variedad de hábitats incluyendo zonas anegadas, bosques de gran porte en áreas de baja altitud, cerca del límite altitudinal superior del bosque y en bolsones de frío de fondos de valle por lo cual habría una mayor disponibilidad de hábitats propicios para su desarrollo (Veblen et al., 1996). Esta diversidad de ambientes concuerda con el mayor número de haplotipos y diversidad nucleotídica detectados en esta zona. Además, la zona central posee un marcado gradiente de precipitación oeste-este, que habría favorecido el mantenimiento de esta relativamente elevada diversidad. Evidencia previa en poblaciones de *N. pumilio* mostró que hacia el extremo oriental de la región centro, utilizando los mismos marcadores aquí analizados, constituyen un reservorio de variantes de haplotipos de ADN del cloroplasto en áreas libres de hielo (Mathiasen et al., 2021). Por último, las poblaciones del sur se desarrollan en ambientes más estables en cuanto a las condiciones climáticas, lo que se ve reflejado en la mayor estabilidad demográfica y homogeneidad genética de las mismas.

Patrones filogeográficos e historia evolutiva de N. antarctica

Los resultados obtenidos en base al análisis de secuencias conservadas de ADN del cloroplasto indican que el acervo genético de *N. antarctica* refleja una historia filogeográfica y evolutiva previa a las glaciaciones del Pleistoceno. Este resultado es congruente con los análisis filogeográficos realizados con los mismos marcadores efectuados en su especie hermana decidua *Nothofagus pumilio* (Mathiasen & Premoli, 2010) y la perenne *N. dombeyi* (Fasanella et al., 2022) con las que comparte distintos tipos de bosques a lo largo de sus distribuciones en Patagonia. El análisis a nivel de todo el subgénero *Nothofagus*, utilizando secuencias como así también el análisis de plastomas, es decir genomas del cloroplasto completo de las especies individuales (Juri, 2023), da cuenta de una estructura espacial significativa controlada por la latitud en Patagonia. La estructura espacial en clados diferenciados latitudinalmente, que determina quiebres filogeográficos, es el resultado de eventos evolutivos que han modelado el acervo genético de las especies de *Nothofagus* a lo largo de millones de años. Esta estructura coincide con la categoría I filogeográfica propuesta por Avise (2000) la cual está definida por clados con una coalescencia profunda (i. e. clados con divergencias tempranas) y concordantes geográficamente (que muestran filopatría de los haplotipos). Estudios realizados previamente han propuesto que existieron en el pasado barreras generalizadas y persistentes al intercambio genético (Premoli et al., 2012), que produjeron una divergencia por vicarianza debido a ingresiones marinas ocurridas en latitudes medias de Patagonia (Ramos, 1982). Si bien dichas barreras ocurrieron al menos hace 30 Ma, la marcada diferencia entre linajes que produjeron persiste actualmente. Los linajes norte y sur del cloroplasto de la especie cercanamente emparentada *N. dombeyi*, fueron utilizados para asociar mediante técnicas genómicas distintos loci de SNPs (polimorfismos de nucleótidos únicos por sus siglas en inglés) a variables ambientales. Se pudo detectar la acción de la selección natural actuando en ambientes contrastantes al sur y al norte de la barrera. Estas condiciones

diferenciales habrían favorecido la persistencia de distintos genotipos a través del tiempo (Fasanella et al., 2022). De esta manera, los análisis realizados con marcadores de SNPs muestran que la divergencia producida por un evento de vicarianza antiguo habría sido reforzada y mantenida hasta el presente por diferencias adaptativas a lo largo del tiempo (Fasanella et al., 2022).

La datación molecular de haplotipos de *N. antarctica* sugiere que la divergencia entre clados habría ocurrido durante el Eoceno. Sin bien los intervalos de confianza obtenidos para los nodos datados son amplios, sus límites no sobrepasan los del período geológico (Fig. 9). Los análisis de coalescencia contemporáneos sugieren que el tiempo transcurrido desde el aislamiento genético entre grupos habría ocurrido más recientemente pero previamente a las oscilaciones climáticas del Pleistoceno (como mínimo hace 4 millones de años AP), lo cual refuerza la idea de que las características genéticas de las especies del subgénero *Nothofagus* analizadas mediante secuencias de ADN del cloroplasto reflejan procesos antiguos. Esta hipótesis acerca de las especies de *Nothofagus* como miembros de una flora pre-Pleistocénica en la que sus acervos genéticos reflejan procesos evolutivos antiguos fue sugerida por Premoli (1997). La distribución geográfica de los haplotipos de *N. antarctica* consistió en variantes particulares asociadas a cada banda latitudinal (región norte, centro y sur), lo cual se ve reflejado en el alto soporte de los nodos que definen esos clados y la longitud de las ramas desde la divergencia entre clados y la diversificación de los mismos que muestran los análisis filogenéticos (Harpending et al., 1998). Asimismo, la red de haplotipos muestra que un mayor número de pasos mutacionales (sin haplotipos intermedios) separan a los haplotipos de la región sur del resto (norte y centro). Por lo tanto, se habrían acumulado mutaciones diferentes en cada grupo latitudinal que a su vez se encontraban aislados por vicarianza debido a las ingresiones marinas y presencia de cuencas interiores (Acosta et al., 2014).

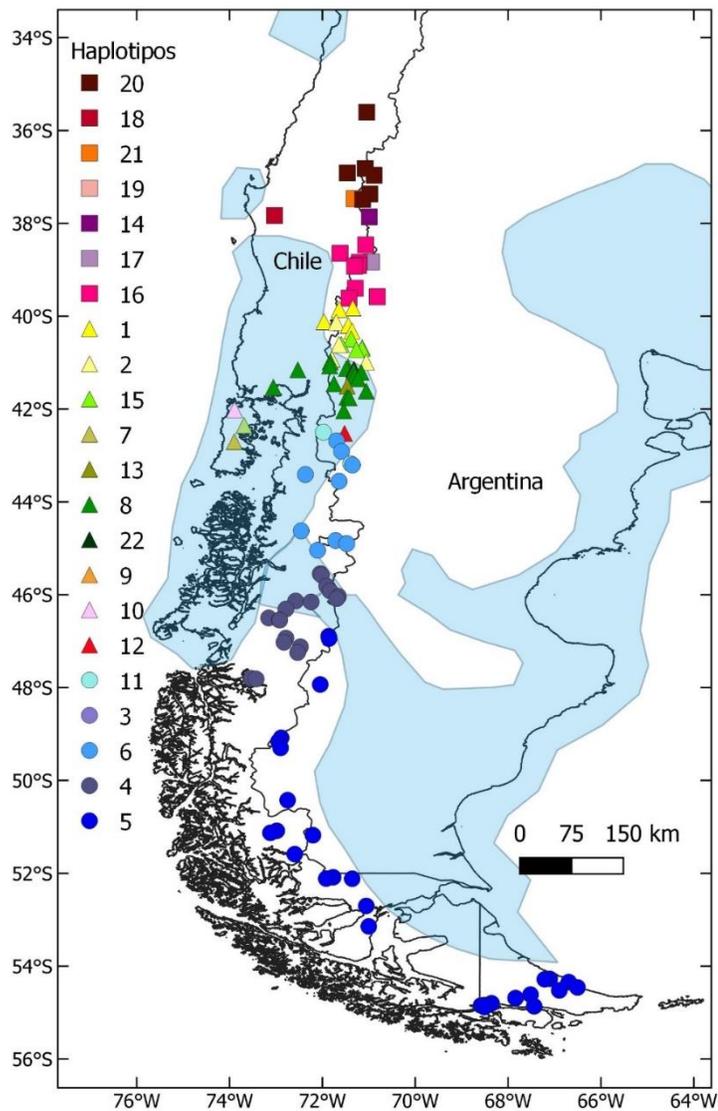


Figura 15. Distribución geográfica de los haplotipos de *N. antarctica* superpuesto sobre los límites de las ingresiones marinas del Mioceno delimitadas por Bechis et al. (2014).

La datación molecular sobre el árbol filogenético por inferencia bayesiana muestra que el clado sur se habría diversificado más tardíamente que el que el clado hermano que contiene el grupo norte-centro. Una hipótesis posible es que los haplotipos del norte reflejan edades más antiguas por estar ubicados en zonas que permanecieron en áreas libres de hielo. Por lo tanto, estos haplotipos más antiguos fueron conservados a lo largo del tiempo principalmente en relación a las oscilaciones climáticas y las glaciaciones patagónicas que tuvieron lugar desde el final del Mioceno (ca. 6 Ma) en múltiples eventos, de variada duración e intensidad (Rabassa et al., 2011). Evidencia geomorfológica que consiste en el mapeo y datación

de depósitos glaciarios como la ubicación de las morenas frontales de Patagonia llevaron a proponer que la mayoría del paisaje andino actual es el resultado del modelado glaciario durante el Pleistoceno ocurrido desde la Gran Glaciación Patagónica hace 1 Ma a lo largo de la Patagonia. Si bien existieron zonas libres de hielo aún en el extremo más austral del bosque templado que permitieron la supervivencia en refugios glaciarios de especies como *N. pumilio* en Tierra del Fuego (Premoli et al., 2010), *N. antarctica* sufrió cuellos de botella demográficos y genéticos como lo reflejan los análisis de distribución no correspondida de diferencias entre pares de secuencias (MMD). Se puede plantear además que la zona sur estuvo afectada en gran medida por la extensión de los campos de hielo produciendo incluso la extinción local de haplotipos. Esto evidencia la antigüedad y complejidad de los eventos evolutivos a lo largo de la latitud que resultaron en esa marcada estructura filogeográfica. En todo caso, para estudiar eventos más recientes deberían utilizarse marcadores hipervariables como los microsatélites los cuales han sido utilizados con anterioridad en *N. antarctica* y otras especies de *Nothofagus* (Vergara et al., 2014; Soliani et al., 2015; Mathiasen et al., 2020).

Determinación de zonas genéticas y unidades de manejo y conservación

La monofilia recíproca encontrada en los grupos genéticos, podría considerarse como un excelente ejemplo de lo que se consideran Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) como fueron definidas por Moritz en 1994. En particular, el concepto de ESUs es aún debatido hoy en día en la literatura (Moritz, 1994; numerosas citas en Casacci et al., 2014). Tomando un criterio genético para reconocer las ESUs se considera que deben ser clados recíprocamente monofiléticos para los alelos de ADN mitocondrial (ADNmt) y mostrar una divergencia significativa de las frecuencias alélicas en loci nucleares (Moritz, 1994). Recíprocamente monofilético significa que todos los haplotipos encontrados en el linaje norte estarían más estrechamente relacionados entre sí que con cualquier haplotipo del linaje sur, y viceversa. Dado que se espera que los polimorfismos ancestrales

compartidos entre linajes persistan mucho tiempo después del cese del flujo génico, encontrar que dos linajes intraespecíficos son recíprocamente monofiléticos sugiere que han estado aislados durante un período de tiempo prolongado. Esta definición considera más el patrón que el grado de divergencia de las secuencias y se diferencia de la de unidades de manejo (MUs) que se reconocen como poblaciones con una divergencia significativa de las frecuencias alélicas en los loci nucleares o mitocondriales independientemente de la distinción filogenética de los alelos (Moritz, 1994). Cabe mencionar que los conceptos originales de ESUs y MUs fueron planteados para especies animales y por lo tanto las consideraciones en cuanto al ADN mitocondrial de herencia uniparental aplican a polimorfismos para el ADN de similar tipo de herencia como el del cloroplasto en plantas. Si bien en el caso particular de *N. antarctica* dada su amplia distribución en los bosques de Patagonia no se trata de una especie de relevancia en conservación, su marcada estructura genética para marcadores de ADN del cloroplasto puede utilizarse para delinear zonas genéticas con distintos objetivos especialmente en restauración de áreas degradadas. Por ejemplo, la gran homogeneidad genética que presentan las poblaciones del sur, representada por 5 de los 22 haplotipos (<23%) encontrados para la especie en toda su distribución y con pocos pasos mutacionales entre ellos, podría utilizarse para determinar una gran zona genética (GZ) sur altamente diferenciada del resto de las poblaciones de la distribución. Por otro lado, si bien es deseable que los esfuerzos de restauración luego de disturbios se lleven a cabo mediante la utilización de germoplasma local, dicho criterio ha sido discutido en el contexto de cambio climático y bosques futuros (Jones, 2013). Esto se debe a que las variantes genéticas que se ajustan a las condiciones ambientales actuales podrían no hacerlo en el futuro. Para conocer la plasticidad y/o base genética de distintas poblaciones y su adaptación al ambiente se requieren estudios experimentales y/o también estudios genómicos, que permitan conocer potenciales variantes adaptativas. Los estudios genómicos en la especie cercanamente emparentada *N. dombeyi* mostraron que los linajes de ADN del cloroplasto estaban asociados a

diferencias adaptativas (Fasanella et al., 2022) y que podrían ser de relevancia para el desarrollo de pautas de manejo. Por lo tanto, se podría considerar que los linajes del cloroplasto de *N. antarctica*, al menos norte y sur, podrían representar variantes con distinto valor adaptativo y que por lo tanto sería deseable conservarlas en el largo plazo como distintas ESUs y fuentes de germoplasma para restauración. Así mismo, los dos grupos de poblaciones detectados en latitudes menores (centro y norte) podrían ser considerados como unidades de manejo (MUs) separadas, debido a la divergencia significativa. En el caso particular de *N. antarctica*, dada su limitada capacidad germinativa y capacidad de rebrote (Salinas et al., 2014), fuente de germoplasma para la restauración podría consistir de esquejes que podrían utilizarse para la propagación vegetativa.

Si bien las regiones intergénicas del cloroplasto secuenciadas y los genes que se encuentran generalmente en los cloroplastos conservan el contenido de la secuencia, la forma en que están ordenados puede diferir entre organismos, y algunas variantes asociadas con el tamaño o los arreglos estructurales pueden incluso tener un valor adaptativo (Hu et al., 2015; Piot et al., 2018; Gao et al., 2019). Por lo tanto, la estructura genética encontrada podría reflejar procesos tanto neutrales como adaptativos. Cabe destacar además que *N. antarctica* es la especie del subgénero *Nothofagus* que muestra un gran polimorfismo a nivel morfológico, ecológico y genético (Premoli & Steinke, 2008). Se requieren estudios experimentales o asociativos mediante el uso de marcadores genómicos, que evalúen respuestas ya sean aclimatativas (plásticas) o adaptativas de base genética de los distintos morfotipos a condiciones futuras y que orienten medidas de recuperación de ambientes degradados.

Conclusiones

- La divergencia entre linajes de *N. antarctica* fue concordante con eventos geológicos antiguos ocurridos en Patagonia durante el Eoceno y Mioceno.
- Se encontró un total de 22 haplotipos de ADNcp estructurados latitudinalmente, con presencia de haplotipos únicos en las tres regiones estudiadas; 7 en la región Norte, 10 en la región del Centro y 5 en la del Sur.
- La mayor diversidad genética en el norte de la distribución de *N. antarctica* y la extensiva homogeneidad genética detectada en el sur está asociada a eventos climáticos recientes, como las glaciaciones del Plioceno y Pleistoceno.
- La declinación poblacional observada en el norte, a diferencia de las otras regiones, evidencia un cambio en el clima con aumento de la temperatura poco favorable para especie como *N. antarctica*.
- Las diferentes variantes genéticas encontradas en las poblaciones estudiadas nos permiten delimitar dos unidades evolutivamente significativas (ESUs), una que incluye las poblaciones del norte y centro y otra hacia el sur, ya que han acumulado diferencias genéticas a lo largo del tiempo.
- Sugerimos la creación de dos unidades de manejo (Centro y Norte) debido a la diferenciación genética y geográfica de sus poblaciones. En particular, la región del centro es de gran interés en conservación debido a su gran variabilidad de hábitats y plasticidad.
- La información generada en esta tesis debe ser tenida en cuenta al momento de elegir individuos semillas y/o esquejes para ser utilizados con fines de restauración, y así evitar la mezcla de individuos provenientes de acervos genéticos divergentes.

ANEXO

Tabla 1. Listado del total de las poblaciones analizadas (92 poblaciones ya registradas, tomadas de Acosta et al., 2014) y 20 poblaciones que completan la distribución geográfica de *Nothofagus antarctica*. Se incluyen las coordenadas geográficas de cada población, además de la región de la distribución a la que pertenecen (Norte, Centro, Sur) y la subregión (1 a 5) asignadas por el análisis de BAPS.

Nº	Localidad	Latitud	Longitud	Haplotipo	Región	Sub-región
1	Chile, VII Región, Lircay	-35,607	-71,047	20	Norte	1
2	Arg., Neuquén, Laguna de Epulafquen (16.03.08).	-36,818	-71,079	20	Norte	2
3	Chile, camino a las Termas de Chillán, Reserva Forestal de Ñiuble (15.03.08).	-36,914	-71,464	20	Norte	2
4	Arg., Neuquén, Laguna de Epulafquen, al este, cerca de Las Ovejas (16.03.08).	-36,965	-70,888	20	Norte	2
5	Arg., Paso Pichachén, Arroyo Pehahuenco (16.03.08).	-37,369	-70,981	20	Norte	2
6	Chile, Paso Pichachén, Esteros del Volcán (16.03.08).	-37,469	-71,319	21	Norte	2
7	Arg., Paso Pichachén (16.03.08).	-37,484	-71,135	20	Norte	2
8	Chile, Parque Nacional Nahuelbuta (15.03.08).	-37,831	-73,031	18/19	Norte	2
9	Arg., Neuquén, cerca del desvío a Copahue (17.03.08).	-37,860	-70,990	14	Norte	2
10	Arg., Neuquén, Caviahue (17.03.08).	-38,463	-71,069	16	Norte	2
11	Chile, Curacautín (14.03.08).	-38,644	-71,622	16	Norte	2
12	Chile, Paso Pino Hachado, lado chileno (14.03.08).	-38,831	-70,946	17	Norte	2
13	Arg., Neuquén, Volcán Batea Mahuida, camino al cráter (3.02.08).	-38,837	-71,205	16	Norte	2
14	Arg., Neuquén, Volcán Batea Mahuida, (3.02.08).	-38,903	-71,226	16	Norte	2
15	Arg., Neuquén, Lago Moquehue (3.02.08).	-38,923	-71,308	16	Norte	2
16	Arg., Neuquén, Moquehue, camino al volcán (3.02.08).	-39,398	-71,293	16	Norte	2
17	Arg., Neuquén, Lago Moquehue (3.02.08).	-38,923	-71,308	16	Norte	2
18	Arg., Neuquén, Catanlil, Cuesta de Rahue (3.02.08).	-39,580	-70,817	16	Norte	2
19	Arg., Neuquén, PN Lanín, camino a Lago Tromen (9.12.07).	-39,613	-71,429	16	Norte	2
20	Arg., Neuquén, PN Lanín, sección Tromen, entrada al parque (9.12.07).	-39,823	-71,346	1	Centro	3

Tabla 1. Continuación ...

Nº	Localidad	Latitud	Longitud	Haplotipo	Región	Sub-región
21	Arg., Neuquén, Paso Carirriñe abajo (10.04.09).	-39,854	-71,639	1	Centro	3
22	Chile, Región de Los Lagos, Huilo-Huilo (01.09).	-40,118	-71,966	1	Centro	
23	Arg., Neuquén, SM de los Andes Arroyo Acol	-40,133	-71,703	1/2	Centro	3
24	Arg., Neuquén, San Martín de los Andes, camino a Yuco (24.03.07).	-40,197	-71,443	1	Centro	3
25	Arg., Neuquén, SM de los Andes. Camping Rincón del Mochilero (9.12.07).	-40,321	-71,361	1	Centro	3
26	Arg., Neuquén, camino 7 lagos, Va. Meliquina (9.12.07).	-40,489	-71,382	15	Centro	3
27	Arg., Neuquén, camino 7 lagos, Pichi Traful (9.12.07).	-40,608	-71,595	15	Centro	3
28	Arg., Neuquén, Va. Traful, en el desvío, yendo por camino de los 7 lagos (30.03.08).	-40,610	-71,643	2	Centro	3
29	Arg., Neuquén, Paso Córdoba (30.03.08).	-40,676	-71,142	15	Centro	3
30	Arg., Neuquén, Paso Córdoba este (30.03.08).	-40,699	-71,151	15	Centro	3
31	Arg., Neuquén, Va. Traful, camino a Confluencia (30.03.08).	-40,720	-71,269	1/15	Centro	3
32	Arg., Neuquén, Paso Samoré, lado argentino, Laguna Pire (9.11.07).	-40,928	-71,794	2	Centro	3
33	Arg., Río Negro, Puerto Blest, mallín intermedio (22.02.09).	-40,983	-71,833	8	Centro	4
34	Arg., Neuquén, Arroyo Corral, Estancia La Lonja (02.09).	-40,991	-71,055	2	Centro	3
35	Arg., Río Negro, Puerto Blest, Laguna El Alerzal (22.02.09).	-41,071	-71,843	8	Centro	4
36	Arg., Río Negro, Bariloche, Vivero Lovi (31.01.07).	-41,100	-71,450	8	Centro	4
37	Arg., Río Negro, Bariloche, Laguna El Trébol (23.11.07).	-41,127	-71,486	8	Centro	4
38	Arg., Río Negro, Bariloche, Cerro Otto (19.03.06).	-41,147	-71,326	8	Centro	4
39	Arg., Río Negro, Bariloche, Km 13 (15.03.06).	-41,150	-71,316	22	Centro	4
40	Chile, Volcán Osorno (Arriba) (29.11.07).	-41,156	-72,530	8	Centro	4
41	Arg., Río Negro, Estancia El Cóndor (1.09).	-41,200	-71,326	8	Centro	4
42	Arg., Río Negro, Challuaco, en el valle (16.04.08).	-41,210	-71,165	8	Centro	4

Tabla 1. Continuación ...

Nº	Localidad	Latitud	Longitud	Haplotipo	Región	Sub-región
43	Arg., Río Negro, Ñirihuau, guardaparque(16.04.08).	-41,287	-71,309	8	Centro	4
44	Arg., Río Negro, Lago Fonk (lina).	-41,347	-71,235	8	Centro	4
45	Arg., Río Negro, Pampa del Toro (lina).	-41,455	-71,751	8	Centro	4
46	Arg., Río Negro, Cañadón de la Mosca (20.11.07).	-41,510	-71,468	13	Centro	4
47	Chile, Puerto Montt, a Km de Huelmu (7.11.07).	-41,528	-73,057	8	Centro	4
48	Arg., Río Negro, Cerro La Serrucha (01.09).	-41,614	-71,056	8	Centro	4
49	Arg., Río Negro, El Cañadón del Foyel, sobre la ruta (20.11.07).	-41,746	-71,474	8	Centro	4
50	Arg., Río Negro, Paraje El Repollo, turbera (12.08).	-41,759	-71,425	8	Centro	4
51	Chile, Isla de Chiloé, camino Coipomó-Ancud (8.11.07).	-42,012	-73,894	10	Centro	4
52	Arg., Chubut, antes del desvío a Lago Puelo (20.11.07).	-42,038	-71,542	8	Centro	4
53	Chile, Isla de Chiloé, Ruta Castro-Ancud (dentro del glaciar) (8.11.07).	-42,352	-73,688	10/7/9	Centro	4
54	Arg., Chubut, Río Tigre, Laguna Errasti (02.09).	-42,499	-71,979	6 y 11	Centro	4
55	Arg., Chubut, Cholila (20.11.07).	-42,526	-71,524	12	Centro	4
56	Arg., Chubut, PN Los Alerces, entre Lago Futalaufquen y Lago Rivadavia (20.11.07).	-42,687	-71,693	6	Sur	5
57	Chile, Isla de Chiloé, Huillinco (7.11.07).	-42,704	-73,899	8, 9, 7, 10	Centro	4
58	Arg., Chubut, PN Los Alerces, Río Desaguadero, cerca del desvío a Va. Futalaufquen (20.11.07).	-42,914	-71,589	6	Sur	5
59	Arg., Chubut, Arroyo El Pajarito, Sierra Colorada, por el camino Trevelín-Corcovado (20.11.07).	-43,181	-71,389	6 y 11	Sur	5
60	Arg., Chubut, Sierra Colorada, pasando la comunidad, camino a Lago Rosario (20.11.07).	-43,207	-71,354	6	Sur	5
61	Chile, X Región, Villa Santa Lucia	-43,411	-72,368	6	Sur	5
62	Arg., Chubut, Carrenleuful (por Cintia).	-43,555	-71,642	6	Sur	5
63	Chile, XI Región, Sendero Bosque Encantado	-44,624	-72,457	6	Sur	5
64	Prov. Chubut, Lago La Plata, cerca de Arroyo Perdido (7.03.2007).	-44,833	-71,715	6	Sur	5
65	Arg., Chubut, Lago Fontana este (7.03.2007).	-44,899	-71,476	6	Sur	5
66	Chile, XI Región, Lago Verde	-45,043	-72,104	6	Sur	4
67	Reserva Nacional Coyhaique	-45,547	-72,047	3	Sur	5

Tabla 1. Continuación ...

Nº	Localidad	Latitud	Longitud	Haplotipo	Región	Sub-región
68	Chile, Coyhaique (01.09)	-45,574	-72,023	4	Sur	5
69	Chile, XI Región, Cruce a Balmaceda I	-45,812	-71,910	4	Sur	5
70	Chile, XI Región, Cruce a Balmaceda II	-45,918	-71,835	4	Sur	5
71	Arg., Sta. Cruz, El Portezuelo, gendarmería (6.03.07) .	-46,038	-71,656	4	Sur	5
72	Arg., Sta. Cruz, El Portezuelo, camino a casa de los gendarmes (6.03.07) .	-46,082	-71,689	4	Sur	5
73	Chile, XI Región, Villa Cerro Castillo II	-46,135	-72,576	4	Sur	5
74	Chile, XI Región, Villa Cerro Castillo I	-46,156	-72,244	4	Sur	5
75	Chile, XI Región, Río Murta	-46,311	-72,789	4	Sur	5
76	Chile, XI Región, Glaciar Exploradores	-46,500	-73,158	4	Sur	5
77	Chile, XI Región, Camping Alacaluf	-46,543	-72,926	4	Sur	5
78	Chile, XI Región, Turbera camino a glaciar exploradores	-46,546	-72,920	4	Sur	5
79	Arg., Sta. Cruz, camino a Los Antiguos (abajo) (5.03.07).	-46,894	-71,866	5	Sur	5
80	Chile, XI Región, Lago Bertrand	-46,935	-72,787	4	Sur	5
81	Arg., Sta. Cruz, Arroyo Canalele (4.03.07).	-46,9431	-71,856	5	Sur	5
82	Chile, XI Región, Nacimiento Río Baker	-47,024	-72,829	4	Sur	5
83	Chile, XI Región, Estancia Chacabuco	-47,122	-72,475	4	Sur	5
84	Chile, XI Región, Reserva Nacional Tamango	-47,246	-72,535	4	Sur	5
85	Chile, XI Región, Caleta Tortel	-47,801	-73,535	4	Sur	5
86	Chile, XI Región, turbera Río Baker	-47,816	-73,429	4	Sur	5
87	Arg., Sta Cruz, camino a Lago Burmensteiner, Valle del Río Roble (4.03.07).	-47,934	-72,048	5	Sur	5
88	Arg., Sta. Cruz, El Chaltén, Laguna del Desierto (3.03.07).	-49,083	-72,890	5	Sur	5
89	Arg., Sta. Cruz, El Chaltén, camino a la Laguna del Desierto (3.03.07).	-49,158	-72,945	5	Sur	5
90	Arg., Sta Cruz, El Chaltén, camino a la Laguna del Desierto, Chorrillo del Salto (3.03.07).	-49,299	-72,902	5	Sur	5
91	Arg., Sta. Cruz, entrada el Parque Nacional Los Glaciares (2.03.07).	-50,426	-72,750	5	Sur	5
92	Chile, XII Región, Lago Pehoe (25.03.09).	-51,086	-72,984	5	Sur	5
93	Chile, XII Región, Lago Grey (25.03.09).	-51,130	-73,120	5	Sur	5
94	Arg., Santa Cruz, Cancha Carrera (25.03.09).	-51,181	-72,205	5	Sur	5
95	Chile, XII Región, Cueva del Milodon (25.03.09).	-51,588	-72,597	5	Sur	5

Tabla 1. Continuación ...

Nº	Localidad	Latitud	Longitud	Haplotipo	Región	Sub-región
96	Chile, XII Región, Monte Alto, turbera (25.03.09).	-52,087	-71,770	5	Sur	5
97	Chile, XII Región, Monte Alto, fondo (25.03.09).	-52,116	-71,919	5	Sur	5
98	Chile, XII Región, camino a Punta Arenas (26.03.09).	-52,118	-71,359	5	Sur	5
99	Chile, XII Región, Monumento al viento (26.03.09).	-52,704	-71,057	5	Sur	5
100	Chile, XII Región, Reserva Magallanes, sector Minas (26.03.09).	-53,145	-71,003	5	Sur	5
101	Arg., Tierra del Fuego, a 8 Km de la entrada a la Ea. San Pablo desde la ruta (25.02.2007).	-54,276	-67,105	5	Sur	5
102	Arg., Tierra del Fuego, a 27 Km al Norte de Tolhuin (25.02.2007).	-54,285	-67,211	5	Sur	5
103	Arg., Tierra del Fuego, cerca de Ea. San Pablo (25.02.2007).	-54,346	-66,694	5	Sur	5
104	Arg., Tierra del Fuego, cerca de Ea. María Luisa (25.02.2007).	-54,460	-66,505	5	Sur	5
105	Arg., Tierra del Fuego, entre La Correntina y Aserradero Las Lengas (26.02.2007).	-54,524	-66,897	5	Sur	5
106	Arg., Tierra del Fuego, camino a Usuahia, entre Los Álamos y Paso Garibaldi (26.02.07).	-54,615	-67,517	5	Sur	5
107	Arg., Tierra del Fuego, Paso Garibaldi (26.02.07).	-54,689	-67,840	5	Sur	5
108	Arg., Tierra del Fuego, Camino a Glaciar Martial (27.02.07).	-54,801	-68,357	5	Sur	5
109	Arg., Tierra del Fuego, PNTDF Lapataia (27.02.07).	-54,841	-68,509	5	Sur	5
110	Arg., Tierra del Fuego, PNTDF Lapataia (27.02.07).	-54,849	-68,582	5	Sur	5
111	Arg., Tierra del Fuego, Bahía Brown (28.02.07).	-54,867	-67,439	5	Sur	5
112	Arg., Tierra del Fuego, Río Cambaceres (28.02.07).	-54,883	-68,509	5	Sur	5

Bibliografía

Acosta MC, Premoli AC (2010) Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **54**, 235-242.

Acosta MC, Mathiasen P, Premoli AC (2014) Retracing the evolutionary history of *Nothofagus* in its geo-climatic context: new developments in the emerging field of phylogeology. *Geobiology*, **12** (6), 497-510.

Avise JC (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 89-522.

Avise JC (2000) Phylogeography: the history and formation of species. Harvard University Press.

Bandelt HJ, Forster P, Röhl, A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 37-48.

Barreda V, Palazessi L (2007) Patagonian vegetation turnovers during the Paleogene-Early Neogene: Origin of arid-adapted floras. *The Botanical Review*, **73**, 31-50.

Bechis F, Encinas A, Concheyro A, Litvak VD, Aguirre-Urreta B, Ramos VA (2014) New age constraints for the Cenozoic marine transgressions of northwestern Patagonia, Argentina (41°-43° S): Paleogeographic and tectonic implications. *Journal of South American Earth Sciences*, **52**, 72-93.

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.

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.

Casacci LP, Barbero F, Balletto E (2014). The “Evolutionarily Significant Unit” concept and its applicability in biological conservation. *Italian Journal of Zoology*, **81**(2), 182-193.

Cheng L, Connor TR, Sirén J, Aanensen DM, Corander J (2013) Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Mol Biol Evol*, **30** (5), 1224-1228. doi.org/10.1093/molbev/mst028

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, **9** (8), 772. DOI:10.1038/nmeth.2109

Dettmann ME, & Playford G (1969) Palynology of the Australian Cretaceous: a review. *Stratigraphy and palaeontology: essays in honour of Dorothy Hill*, 174-210.

- 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**, 1-79.
- Donoso C (1974) Dendrología: Árboles y arbustos chilenos. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Forestales, *Manual N°2*.
- Donoso C (1987) Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque*, **8**, 85-97.
- Donoso C (1995) Bosques Templados de Chile y Argentina. Variación, estructura y dinámica. Ed. Universitaria, Santiago, Chile.
- Donoso C (2006) Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Autoecología. Marisa Cuneo Ediciones. Valdivia, Chile.
- Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B, Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular biology and evolution*, **22** (5), 1185–1192.
doi.org/10.1093/molbev/msi103
- Ezcurra C, Premoli AC, Souto CP, Aizen MA, Arbetman M, Mathiasen P, Acosta MC, Quiroga P (2014) La vegetación de la región andino-patagónica tiene su historia. En Raffaele E, De Torres Curth M, Morales CL, Kitzberger T. *Ecología e Historia Natural de la Patagonia Andina- Un cuarto de siglo de investigación en biogeografía, ecología y conservación*, **1**, 19-36.
- Fasanella M, Mathiasen P, Juri G, Díaz DG, Hasbún R, Premoli AC (2023). Ancient vicariance is reinforced by adaptive divergence in the southern beech: Contributions from genomics. *Journal of Biogeography*, **50** (3), 564-575.
- Fu YX, Li WH (1993) Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, **133**, 693-709.
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Gao LZ, Liu YL, Zhang D, et al. (2019) Evolution of *Oryza* chloroplast genomes promoted adaptation to diverse ecological habitats. *Communications Biology*, **2**, 1–13.
- Hamilton MB (1999) Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology*, **8**, 521–523.
- Harpending HC, Batzer MA, Gurven M, Jorde LB, Rogers AR, Sherry ST (1998) Genetic traces of ancient demography. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **95**(4), 1961-1967.
- Harris WK (1965) Basal Tertiary microfloras from the Princetown Area, Victoria, Australia. *Paleontographica*, B, **115**, 75-106.
- Healey A, Lee DJ, Furtado A, Henry, RJ (2018) Evidence of inter-sectional chloroplast capture in *Corymbia* among sections *Torellianae* and *Maculatae*. *Australian Journal of Botany*, **66** (5), 369-378.

doi:10.1071/bt18028

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.

Hill RS (1983) *Nothofagus* macrofossils from the Tertiary of Tasmania. *Alcheringa*, **7** (3), 169–183.

Hill RS (1992) *Nothofagus*: evolution from a southern perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, **7** (6), 190–194.

Hu S, Sablok G, Wang B, et al. (2015) Plastome organization and evolution of chloroplast genes in Cardamine species adapted to contrasting habitats. *BMC Genomics*, **16**, 1–14.

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.

Iglesias V, Markgraf V, Whitlock C (2016) 17,000 years of vegetation, fire and climate change in the eastern foothills of the Andes (lat. 44 S). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **457**, 195–208.

Jones TA (2013) When local isn't best. *Evolutionary applications*, **6** (7), 1109–1118.

Jordan G (1999) A new Early Pleistocene species of *Nothofagus* and the climatic implications of co-occurring *Nothofagus* fossils. *Australian Systematic Botany*, **12**, 757–76.

Juri G (2023) Divergencia entre especies simpátricas: barreras al flujo génico intra e interespecífico en tres especies del género *Nothofagus* (*N. pumilio*, *N. antarctica* y *N. dombeyi*). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue.

URI: <http://rdi.uncoma.edu.ar/handle/uncomaid/17410>

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.

Macphail MK (2007) Australian Palaeoclimates Cretaceous to Tertiary. A review of palaeobotanical and related evidence to the year 2000. *CRC-LEME Open File Report*, **151**, 1–279 (Special Volume ISBN 1 921039 75 2).

Manel S, Gugerli F, Thuiller W, Alvarez N, Legendre P, Holderegger R, Gielly L, Taberlet P (2012) Broad-scale adaptive genetic variation in alpine plants is driven by temperature and precipitation. *Molecular Ecology*, **21**, 3729–3738.

Mathiasen P (2010) Variación y estructura genética en *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endle.) Krasser 'lenga' a lo largo de diferentes gradientes ambientales. Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Comahue.

Mathiasen P, Premoli AC (2010) Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology*, **19**, 371–385.

doi: 10.1111/j.1365-294X.2009.04456.x

- Mathiasen P, Venegas-González A, Fresia P, Premoli, AC (2020) A relic of the past: current genetic patterns of the palaeoendemic tree *Nothofagus macrocarpa* were shaped by climatic oscillations in central Chile. *Annals of Botany*, **126**(5), 891-904.
- Mathiasen P, Ignazi G, Premoli, AC (2021) Biogeographically marginal: Source of evolutionary novelties and future potential. *Forest Ecology and Management*, **499**, 119596.
- Mattera MG, Pastorino MJ, Lantschner MV, Marchelli P, Soliani C (2020) Genetic diversity and population structure in *Nothofagus pumilio*, a foundation species of Patagonian forests: defining priority conservation areas and management. *Sci Rep* **10**, 19231
doi.org/10.1038/s41598-020-76096-0
- 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. 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.
- Moritz C (1994) Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: a critical review. *Molecular Ecology*, **3**, 401–411.
- Moritz, C (1994) Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 373–375
- Müller K (2005) SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics*, **4**, 65-69.
- Oersted SA (1871) Bidrag til Kundskab om Egefamilien i Nutid og Fortid. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifter*, **9**, 31–538.
- Pankhurst RJ, Rapela CW, Fanning CM, Márquez M (2006) Gondwanide continental collision and the origin of Patagonia. *Earth-Science Reviews*, **76**, 235-257.
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research - an update. *Bioinformatics*, **28** (19), 2537–2539.
doi: 10.1093/bioinformatics/bts460
- Piot A, Hackel J, Antoine P, Guillaume C (2018) One - third of the plastid genes evolved under positive selection in PACMAD grasses. *Planta*, 255–266.
- 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.

- Premoli AC (1991) Morfología y capacidad germinativa en poblaciones de *Nothofagus antarctica* (Forster). *Bosque*, **12** (2), 53-59.
- Premoli AC (1998) Use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas for more widespread species. En: International Foundation for Science ed. *Proceedings of an International Workshop* en “Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management”. Universidad Federal de Santa Catarina. Santa Catarina, Brasil. 157-171.
- Premoli AC, Mathiasen P, Acosta MC, Ramos VA (2012) Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be?. *New Phytologist* **193**, 261–275.
- Premoli AC (1997) Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography*, 883-892.
- Premoli AC & Steinke L (2008) Genetics of sprouting: effects of long-term persistence in fire-prone ecosystems. *Molecular Ecology*, **17**(17), 3827-3835.
- Premoli AC, Mathiasen P, Kitzberger T (2010) Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54°S) glacial refugia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, **298**, 247–256.
- Quiroga MP, Castello L, Quipildor V, Premoli AC (2019). Biogeographically significant units in conservation: A new integrative concept for conserving ecological and evolutionary processes. *Environmental Conservation*, **46** (4), 293-301.
doi:10.1017/S0376892919000286
- 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.
- Rabassa J, Coronato A, Martinez O (2011) Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society*, **103** (2), 316-335.
doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01681
- Ramos VA (1982) Las intrusiones pacíficas del Terciario en el Norte de la Patagonia (Argentina). III Congreso Geológico Chileno (Concepción) Actas I, pp. 262–288.
- Rambaut A (2018) FigTree v1.4.4. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh, Edinburgh.
<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>
- Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology*, **67** (5), 901–904.
doi:10.1093/sysbio/syy032
- Ramos-Onsins SE, Rozas J (2002) Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Molecular Biology Evolution*, **19** (12), 2092-100.
doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a004034.
- Rieseberg LH, Soltis DE (1991) Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *American Journal of Botany*, **5**, 65–84.

- Rogers AR, Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- Romero EJ (1973) Polen fósil de *Nothofagus* (*Nothofagidites*) del Cretácico y Paleoceno de Patagonia. *Revista del Museo de la Plata*, **7** (47), 291-303.
- Romero EJ (1986) Fossil evidence regarding the evolution of *Nothofagus blumei*. *Annals Missouri Botanical Garden*, **73** (2), 276-283.
- Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-DelBarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A (2017) DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, **34** (12), 3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248
- Rull V (2014) Macrorefugia and microrefugia: a response to Tzedakis et al. *Trends in Ecology & Evolution* (5) 243-4.
doi: 10.1016/j.tree.2014.02.008.
- Sauquet H, Ho SYW, Gandolfo MA, Jordan GJ, Wilf P, Cantrill DJ, Bayly MJ, Bromham L, Brown GK, Carpenter RJ, Lee DM, Murphy DJ, Sniderman JMK, Udovicic F (2012) Testing the Impact of Calibration on Molecular Divergence Times Using a Fossil-Rich Group: The Case of *Nothofagus* (Fagales). *Systematic Biology*, **61** (2), 289–313.
doi.org/10.1093/sysbio/syr116
- Salinas SJ, Acuña Aroca B, Koch ZL, et al. (2014) Propagación sexual y asexual de Ñire *Nothofagus antarctica* (Forster) Oerst en la Patagonia Chilena. *Ciencia e Investigación Forestal*, CIFOR, **20** (3), 15-42.
- Simmons MP, Ochoterena H (2000) Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analysis. *Systematic Biology*, **49**, 369-381.
dx.doi.org/10.1093/sysbio/49.2.369
- Soliani C, Gallo L, Marchelli P (2012) Phylogeography of two hybridizing southern beeches (*Nothofagus* spp.) with different adaptive abilities. *Tree Genetics & Genomes* **8**, 659–673.
doi.org/10.1007/s11295-011-0452-9
- Soliani C, Tsuda Y, Bagnoli F, Gallo LA, Vendramin GG, Marchelli P (2015) Halfway encounters: Meeting points of colonization routes among the southern beeches *Nothofagus pumilio* and *N. antarctica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **85**, 197-207
doi.org/10.1016/j.ympev.2015.01.006
- Steinke LR, Premoli AC, Souto CP, Hedrén M (2008) Adaptive and neutral variation of the resprouter *Nothofagus antarctica* growing in distinct habitats in north-western Patagonia. *Silva Fennica*, **42** (2), 177-188.
doi.org/10.14214/sf.251
- Stover LE, Partridge AD (1973) Tertiary and Late Cretaceous spores and pollen from the Gippsland Basin, southeastern Australia. *Proc. Royal Soc. Victoria*, **85**, 237-286.
- Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus evolution*, **4** (1), vey016.

doi: 10.1093/ve/vey016

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant molecular biology*, **17**, 1105-1109.

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, **38** (7), 3022-3027.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, **123** (3), 585-595.
doi: 10.1093/genetics/123.3.585

Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, **22** (22), 4673-4680.

Upchurch P (2008) Gondwana break-up: legacies of a lost world?. *Trends in Ecology and Evolution*, **23**, 229-236.

Veblen TT, Donoso C, Kitzberger T, & Rebertus, AJ (1996). Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. The ecology and biogeography of *Nothofagus* forests, **10**, 93-353.

Vento B, Agrain F, Puebla G (2024) Ancient Antarctica: the early evolutionary history of *Nothofagus*. *Historical Biology*, **36** (1), 136-146.

Vergara R, Gitzendanner MA, Soltis DE, Soltis PS (2014) Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of *Nothofagus* subgenus *Lophozonia* (Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. *Ecology and Evolution*, **4**, 2450-2471.

Vidal Russel R, Premoli A (2004) Variación en *Nothofagus antarctica* (Forster) Oerst. (Ñirre o Ñire). En Donoso C, Premoli AC, Gallo L, Ipinza R. Variación intraespecífica en las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. Editorial Universitaria, **7**, 173-185.

Yang YY, Qu XJ, Zhang R, Stull GW, Yi TS (2021) Plastid phylogenomic analyses of Fagales reveal signatures of conflict and ancient chloroplast capture. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **163**, 107232.
doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107232