

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Variabilidad genética de *Arachnitis uniflora* Phil.  
(Corsiaceae) y de sus simbioses fúngicas:  
historia evolutiva de la asociación micoheterotrófica  
más austral

por

Biól. Mauricio Renny

Directoras: Dra. Alicia N. Sérsic

Dra. M. Cristina Acosta

Laboratorio de Ecología Evolutiva y Biología Floral.

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal. IMBIV, UNC-CONICET



Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

2017 - Córdoba, Argentina

## COMISIÓN ASESORA

**Dra. Viviana G. Solís Neffa.** Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y Agrimensura.  
Universidad Nacional del Nordeste.

**Dr. Gabriel Bernardello.** Facultad de Ciencias Exactas Físicas y Naturales.  
Universidad Nacional de Córdoba.

**Dra. Alicia N. Sérsic.** Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal. Universidad  
Nacional de Córdoba.

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y Fecha:

Calificación:

## TRIBUNAL

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

Firma: ..... Aclaración: .....

“La ciencia devendrá real, objetiva  
en la medida que tenga la capacidad  
de integrarse a la vida del sujeto histórico,  
a la política del pueblo”

Gunnar Olsson

## AGRADECIMIENTOS

A mis directoras, Alicia y Cristina, por brindarme sus conocimientos. Por la dedicación, el entusiasmo y el apoyo constantes.

A mi Comisión Asesora de Tesis, Viviana Solís Neffa y Gabriel Bernardello, por su predisposición, apoyo y comprensión en todo momento.

Al IMBIV, a sus directivos e integrantes que hacen de éste un espacio de trabajo amigable, armónico y cooperativo.

Al Doctorado en Ciencias Biológicas, y a sus administrativos siempre cordiales y comprensivos. A Victoria, que en este último tiempo estuvo siempre dispuesta y atenta.

A la SECyT, por confiarme la beca Doctoral que hizo posible que hoy pueda escribir esta Tesis. Al CONICET, por renovar mi entusiasmo y otorgarme la beca de Finalización de Doctorado. A las gestiones que conducían entonces los destinos de ambas instituciones y, por lo tanto, mi destino: las Dras. Carolina Scotto y Cristina Fernández de Kirchner.

A las entidades otorgantes de subsidios para llevar a cabo este trabajo: FONCYT, SECyT-UNC, MINCyT, CONICET, Bentham-Moxon Trust, entre otras.

**D**e forma menos formal, quiero darle las gracias a cientos de personas hermosas que compartieron mis días de tesis, y sin ellas nunca podría haber llegado hasta acá.

El Lab. Florido, lleno de gente hermosa... y cada vez somos más (porque me dí cuenta que de este lugar nadie que lo transita se va). Gente tan entusiasta y dedicada, que brindan todo siempre. A mis dires, que las volvería a elegir. Al Grupo Educativo Floral, compas grosos si los hay (adornados de friselina, obvio). Destaco a la Vale y su ayuda

con el RDA, a la Flor que tanto me instruyó en el mundo de los hongos. A la Sil y nuestras charlas de box a box. Los consejos de la Andreita... y la lista sigue...

Al laboratorio de Micología, que me abrieron las puertas siempre. Noe que me enseñó todo lo que sé de esporas y se transformó en una amiga y confidente. Laura que no tengo palabras para expresar todo lo que es y agradecer todo lo que hizo y hace para ayudarme. Al Gaby, y su ayuda oportuna con las secuencias de HMA.

A Ali, Marina, Laura, Andrea, Andre, Totoy, Gaby, Mati, Vale... por ayudarme en los muestreos.

A Martin Bidartondo, por abrirme las puertas de su Laboratorio. A Laura, Bonnie y Zietse por ayudarme tanto en el Kew. Nicholas, por hacerme sentir parte de su casa y ayudarme a vivir en Londres.

A Lili y Normis, por hacerme enamorar de la Ciencia, por enseñarme tanto y compartir tantos momentos, dentro y fuera de la Facu.

A mis amigas genetistas! Karli, Sole, Noe, Anita, Paula (y Alvi, que se sale del combo del ADN). Unas por un lado, otras por otro, pero siempre presentes. Gracias Sole por tantas lindas charlas y consejos. Karli, que te quiero tanto!

A la Jime... juntos desde Matemática I. Amiga como pocas, siempre presente, con sus consejos y tu tranquilidad. Y la Fer... super amiga y confidente.

Amigos nuevos, que se hicieron grandes amigos tan rápido! Al Facu que es un confidente como pocos y con el que pasamos miles de momentos de lo más diversos! La Vik, otra genia! amiga sincera y hermosa persona, llena de amor. Katy querida, ahora lejos pero siempre presente. Luz!!! que te quiero infinito... y la Patri... tan "jamaiquinos" todos. Me encanta que sean parte de mis tiempos libres y los no tan libres.

Los CyUA... todos tan importantes en esta tesis. Me enseñan tanto cada día.

Los Malvones!!! Gente hermosa con la que aprendimos a escaparnos de los largos malos ratos con mucha mística y buena onda.

A Sole y a Karli... por darme una mano gigante con los "detallitos" de la tesis!!!

A mi familia, por comprenderme, aunque entendiendo tan poco de las becas, la tesis, el laboratorio... pero igual ahí!

A otra gente linda que recorrió conmigo estos cinco años... a Severino, a mis amigos de toda la vida... y muchas más personas que me ayudaron y alentaron a llegar al final de este camino.

Quise adrede dejar a alguien para el final... alguien que sin proponérselo (nada más lejos de eso) me enseñó tanto en este último año... **Nico!!!** me hiciste ver todas las cosas de otra forma... estuviste presente en mí cada día de escritura de esta tesis.

Muchas gracias a todxs!!!

## PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS

Renny M, Acosta MC, Cofré N, Domínguez LS, Bidartondo MI, Sérsic AN. Genetic diversity patterns of arbuscular mycorrhizal fungi associated with the mycoheterotroph *Arachnitis uniflora* Phil (Corsiaceae). *Annals of Botany* (En prensa).

# ÍNDICE TEMÁTICO

COMISIÓN ASESORA Y EVALUADORA DE TESIS.....	i
AGRADECIMIENTOS.....	iii
PUBLICACIONES DERIVADAS DE LA TESIS.....	vi
ÍNDICE TEMÁTICO.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	x
ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
ABSTRACT.....	4
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	6
Sistema de estudio.....	9
<i>Arachnitis uniflora</i> Phil. ....	9
Hongos micorrícicos arbusculares asociados .....	11
Alcances de esta tesis.....	12
Hipótesis.....	13
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
CAPÍTULO I: Diversidad genética de <i>Arachnitis uniflora</i> . Análisis filogeográfico y demográfico de la especie.....	15
Introducción.....	16
Materiales y Métodos.....	19
Resultados.....	29
Genealogía de haplotipos.....	31
Distribución geográfica de la diversidad genética.....	33

Estructura poblacional.....	36
Análisis de procesos demográficos pasados.....	38
Tiempos de divergencia de los grupos de haplotipos.....	41
Paleoclima Pleistocénico para <i>A. uniflora</i> .....	45
Discusión.....	47
Aspectos biogeográficos y evolutivos de <i>A. uniflora</i> . Genealogía y edades de divergencia de sus haplotipos.....	54
<i>ADN nuclear</i> .....	54
<i>ADN cloroplástico</i> .....	62
<i>Contraste de evidencias nucleares y cloroplásticas</i> .....	64
CAPÍTULO II: Patrones de diversidad en los hongos micorrícicos arbusculares asociados a <i>Arachnitis uniflora</i> . De esporas a genes.....	67
Introducción General.....	68
<i>Relación micoheterotrófica</i> .....	70
Estudios moleculares: Diversidad genética de hongos micorrícicos arbusculares en raíces de <i>Arachnitis uniflora</i> .....	72
Introducción.....	72
Materiales y Métodos.....	73
Resultados.....	77
Análisis filogenéticos de los simbiontes fúngicos de <i>A. uniflora</i> .....	77
Estructura y diversidad genéticas de los simbiontes fúngicos de <i>A. uniflora</i> .....	80
Diversidad genética y filogeografía del 'clado <i>Arachnitis</i> '.....	82
Discusión.....	85
Hongos micorrícicos arbusculares en raíces de <i>A. uniflora</i> .....	85
Estructura geográfica de la diversidad genética.....	87

Estudios morfológicos: Diversidad de esporas de hongos micorrícicos arbusculares procedentes de raíces de <i>Arachnitis uniflora</i> . Ensayos a partir de plantas trampa....	91
Introducción.....	91
Materiales y Métodos.....	92
Resultados.....	94
Discusión.....	97
Consideraciones globales: De esporas a genes.....	102
CAPÍTULO III: Caracterización del gradiente ambiental en el rango de distribución de <i>Arachnitis uniflora</i> .....	104
Introducción.....	105
Materiales y Métodos.....	107
Resultados.....	109
Variables ambientales en el rango de distribución de <i>A. uniflora</i> .....	109
Influencia de las variables ambientales en la diversidad genética de <i>A. uniflora</i> y sus simbioses fúngicos.....	116
Discusión.....	121
Condicionantes ambientales de la diversidad genética.....	124
CAPÍTULO IV: <i>Patrones evolutivos comunes para el par micoheterotrófico</i> .....	128
Consideraciones finales.....	134
BIBLIOGRAFÍA.....	142
APÉNDICES.....	164

# ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

## INTRODUCCIÓN GENERAL

<b>Figura 1:</b> Estructuras de <i>A. uniflora</i> .....	12
--	----

## CAPÍTULO I

<b>Tabla 1:</b> Descripción de los sitios de muestreo para <i>A. uniflora</i> .....	20
<b>Figura 2:</b> Distribución de los sitios de muestreo para <i>A. uniflora</i> .....	21
<b>Tabla 2:</b> Caracterización genética de los sitios de <i>A. uniflora</i> estudiados.....	30
<b>Figura 3:</b> Red y distribución de los haplotipos nucleares de <i>A. uniflora</i> .....	32
<b>Figura 4:</b> Red y distribución de los haplotipos cloroplásticos de <i>A. uniflora</i> .....	34
<b>Figura 5:</b> Distribución de la diversidad genética de <i>A. uniflora</i> .....	35
<b>Figura 6:</b> Gráfico de relación de la diversidad genética de <i>A. uniflora</i> respecto de las coordenadas geográficas y la altitud.....	37
<b>Figura 7:</b> Gráfico de interpolación espacial del paisaje genético de <i>A. uniflora</i> .....	39
<b>Figura 8:</b> Agrupamiento bayesiano de los sitios estudiados para <i>A. uniflora</i> , de acuerdo a sus secuencias de ADN nuclear.....	42
<b>Figura 9:</b> Agrupamiento bayesiano de los sitios estudiados para <i>A. uniflora</i> , de acuerdo a sus secuencias de ADN cloroplástico.....	44
<b>Tabla 3:</b> Parámetros demográficos pasados para las poblaciones de <i>A. uniflora</i> .....	45
<b>Figura 10:</b> Distribución de las diferencias mutacionales pareadas en secuencias de ADN nuclear de <i>A. uniflora</i> .....	46
<b>Figura 11:</b> Dinámica poblacional bayesiana en poblaciones de <i>A. uniflora</i> a través del ADN nuclear.....	47
<b>Figura 12:</b> Distribución de las diferencias mutacionales pareadas en secuencias de ADN cloroplástico de <i>A. uniflora</i> .....	52

<b>Figura 13:</b> <i>Dinámica poblacional bayesiana en poblaciones de A. uniflora a través del ADN cloroplástico.....</i>	53
---	----

<b>Figura 14:</b> <i>Filogenia y edades de divergencia de los haplotipos nucleares de A. uniflora.....</i>	56
--	----

<b>Figura 15:</b> <i>Filogenia y edades de divergencia de los haplotipos cloroplásticos de A. uniflora.....</i>	57
---	----

<b>Figura 16:</b> <i>Modelado de nicho ecológico para A. uniflora durante el Pleistocénico.....</i>	59
---	----

## CAPÍTULO II

<b>Tabla 4:</b> <i>Descripción de los sitios de muestreo para los HMA de A. uniflora.....</i>	75
---	----

<b>Figura 17:</b> <i>Filogenia y principales edades de divergencia de los HMA de A. uniflora.....</i>	79
---	----

<b>Figura 18:</b> <i>Distribución de la diversidad genética de los HMA de A. uniflora....</i>	81
---	----

<b>Figura 19:</b> <i>Red de haplotipos, distribución y edades de divergencia para los HMA de A. uniflora.....</i>	83
---	----

<b>Figura 20:</b> <i>Gráfico de interpolación espacial del paisaje genético para los HMA de A. uniflora.....</i>	85
--	----

<b>Tabla 5:</b> <i>Sitios estudiados y diseño experimental para los tratamientos con plantas trampa.....</i>	95
--	----

<b>Figura 21:</b> <i>Estructuras de los HMA de A. uniflora en raíces de plantas trampa.....</i>	96
---	----

<b>Figura 22:</b> <i>Esporas de los HMA de A. uniflora obtenidos a partir de plantas trampa.....</i>	98
--	----

<b>Figura 23:</b> <i>Distribución de los grupos de HMA asociados a A. uniflora.....</i>	100
---	-----

## CAPÍTULO III

<b>Tabla 6:</b> <i>Caracterización ambiental de los sitios estudiados.....</i>	111
--	-----

<b>Figura 24:</b> <i>Modelado de nicho ecológico actual para A. uniflora.....</i>	113
---	-----

<b>Figura 25:</b> Gráficos de relación de la temperatura según coordenadas geográficas y altitud.....	114
<b>Figura 26:</b> Gráficos de relación de las precipitaciones según coordenadas geográficas y altitud.....	115
<b>Figura 27:</b> Gráficos de relación de las características edáficas según coordenadas geográficas y altitud.....	116
<b>Figura 28:</b> Caracterización de los sitios muestreados según variables ambientales, mediante ACP.....	117
<b>Tabla 7:</b> Relevancia de cada variable ambiental utilizada en los ACP.....	118
<b>Figura 29:</b> Gráficos de relación entre la diversidad genética de <i>A. uniflora</i> y las variables ambientales.....	119
<b>Figura 30:</b> Gráficos de relación entre la diversidad genética de los HMA de <i>A. uniflora</i> y las variables ambientales.....	120
<b>Figura 31:</b> Gráficos de relación entre la diversidad genética de <i>A. uniflora</i> y de sus HMA respecto de cada grupo de variables ambientales.....	122
<b>Figura 32:</b> Gráfico de relación conjunta entre las diversidades genéticas de <i>A. uniflora</i> y sus HMA, respecto del conjunto de variables ambientales, mediante RDA.....	123
CAPÍTULO IV	
<b>Figura 33:</b> Refugios glaciarios y barreras geográficas comunes para <i>A. uniflora</i> y sus HMA.....	131
APÉNDICES	
<b>Apéndice I:</b> Cebadores ensayados para estudios en <i>A. uniflora</i> .....	165
<b>Apéndice II:</b> Secuencias incluidas en filogenias de <i>A. uniflora</i> .....	167
<b>Apéndice III:</b> Frecuencia de agrupamientos poblacionales más probables de los análisis de agrupamientos bayesianos.....	167
<b>Apéndice IV:</b> Filogenia del orden Liliales.....	168
<b>Apéndice V:</b> Secuencias incluidas en la filogenia de los HMA de <i>A. uniflora</i> ...	169

**Apéndice VI:** *Filogenia de los HMA de A. uniflora a partir del gen ribosomal nuclear 18S completo*..... 170

## ABREVIATURAS

**A.:** *Arachnitis*

**Ac.:** *Acaulospora*

**ACP:** Análisis de Componentes Principales

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico

**ADNcp:** ADN cloroplástico

**ADNn:** ADN nuclear

**AIC:** Criterio de información de Akaike

**BPP:** Probabilidad Posterior Bayesiana

**BSP:** *Bayesian Skyline Plot*

**C.:** *Claroideoglossum*

**com. pers.:** comunicación personal

**CTAB:** Bromuro de cetiltrimetilamonio

**CV:** Coeficiente de Variación

**E.:** *Entrophospora*

**ej.:** ejemplo

**G.:** *Glomus*

**HMA:** Hongos Micorrízicos Arbusculares

**ITS:** genes nucleares de la región de los espaciadores transcritos internos

**Ka:** miles de años

**Km:** kilómetros

**Ma:** millones de años

**MCMC:** Cadena de Markov de Monte Carlo

**MGP:** Máxima Glaciación Patagónica

**min:** minutos

**mm:** milímetros

**mM:** milimolar

**MNE:** Modelado de Nicho Ecológico

**ng:** nanogramos

**obs. pers.:** observación personal

**pb:** pares de bases

**PCR:** Reacción en Cadena de la Polimerasa

**RDA:** Análisis Multivariado de Redundancia

**seg:** segundos

**sp.:** especie

**SSD:** suma de los desvíos al cuadrado

**UMG:** Último Máximo Glaciar

**µl:** microlitros

**µm:** micrómetros

**µM:** micromolar

## RESUMEN

*Arachnitis uniflora* Phil. (Corsiaceae) pertenece a un grupo de plantas micoheterotróficas, las cuales no poseen clorofila y por lo tanto son incapaces de asimilar carbono por sí mismas. Así, dependen de la asociación con hongos micorrícicos para obtenerlo, quienes lo capturan de plantas autótrofas de la comunidad. La mayor parte de las poblaciones de *A. uniflora* se sitúan a lo largo de los bosques templados andino-patagónicos de Argentina y Chile, pero existen otras más distantes, en los bosques andinos tropicales húmedos y sub-húmedos del centro-sur de Bolivia, y en ambientes húmedos y sin árboles de las Islas Malvinas. La presente tesis aborda principalmente el estudio de la variabilidad genética de *A. uniflora* y de sus hongos micorrícicos arbusculares (HMA) e intenta explicar cómo los eventos climáticos y geológicos pasados condujeron a su actual distribución espacial. Debido a la relación micoheterotrófica entre ambos, es interesante describir los patrones evolutivos conjuntos entre *A. uniflora* y sus HMA y conocer cómo son afectados por factores ambientales actuales. Se estudiaron 27 sitios en total a lo largo de su distribución geográfica. *A. uniflora* presentó tres principales focos de alta diversidad genética, relacionados con refugios glaciarios pleistocénicos. Existieron discrepancias en la evidencia brindada por las secuencias del ADN nuclear y cloroplástico; sin embargo ambas marcaron su origen hacia finales del Eoceno, y la separación definitiva de las poblaciones bolivianas en el Mioceno-Plioceno. Los principales eventos relacionados con la diversificación de *A. uniflora* se correspondieron con el levantamiento de los Andes y la Máxima Glaciación Patagónica (MGP). Los HMA asociados a *A. uniflora* describieron patrones de distribución espacial de la diversidad similares a la planta; sin embargo el origen y el comienzo de la diversificación de los HMA se habrían iniciado mucho antes, desde el Cretácico Inferior, y probablemente en asociación con otras plantas fotosintetizantes de la comunidad. En ambos grupos taxonómicos y de forma conjunta, las glaciaciones pleistocénicas habrían configurado la distribución espacial observada en la actualidad. Por otra parte, la identificación de los HMA asociados a *A. uniflora* reveló la presencia de un grupo mayoritario denominado aquí 'clado *Arachnitis*' (Glomeraceae). En más bajas proporciones fueron encontrados también integrantes de Claroideoglomeraceae y Acaulosporaceae. La evidencia morfológica incluyó también a esporas de Gigasporaceae. Estos HMA

encontrados en baja proporción serían simbioses "facultativos" de *A. uniflora* y representarían una estrategia evolutiva de la especie vegetal ante condiciones ambientales adversas. Claroideoglomeraceae nunca antes fue encontrado en asociación con plantas micoheterotróficas. Por último, los estudios ambientales revelaron que hubo poca influencia de los factores ambientales sobre la diversidad genética de *A. uniflora* por lo que se puede afirmar que su mayor condicionante es biótico, representado por sus HMA asociados, los cuales están mayormente condicionados por las variables de temperatura.

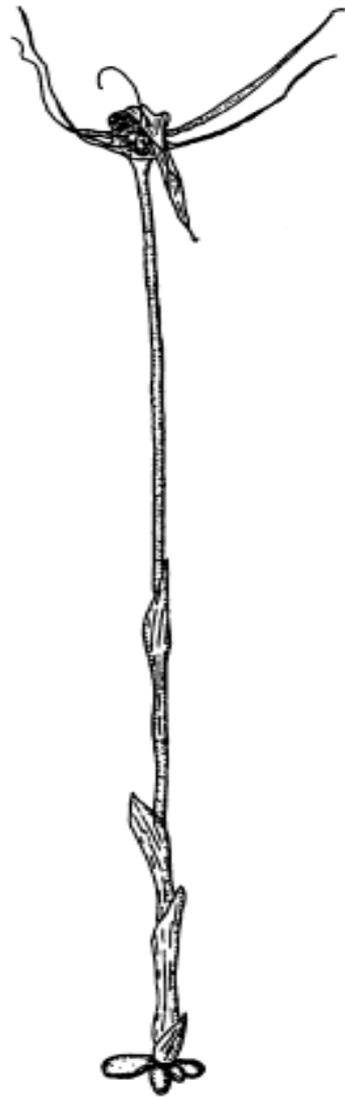
## ABSTRACT

*Arachnitis uniflora* Phil. (Corsiaceae) belongs to a group of mycoheterotrophic plants, which do not possess chlorophyll and therefore, are unable to assimilate carbon by themselves. Thus, they depend on the association with mycorrhizal fungi to obtain carbon; these fungi capture it from autotrophic plants of the community. Most of the populations of *A. uniflora* are located along the Andean-Patagonian temperate forests of Argentina and Chile. However, there are others more distant in the humid and sub-humid tropical Andean forests of south-central Bolivia and in moist and treeless environments of Malvinas Islands. The present Thesis mainly addresses the study of the genetic variability of *A. uniflora* and its arbuscular-mycorrhizal fungi (AMF), and tries to explain how the past climatic and geological events led to their current spatial distribution. Due to the mycoheterotrophic relationship between them, it is interesting to study about their common evolutionary patterns and the influence of current environmental factors affecting this relationship. A total of 27 sites were sampled throughout their geographic distribution. *A. uniflora* presented three main hot spots of genetic diversity, related to Pleistocene glacial refuges. There were discrepancies in the evidence provided by nuclear and chloroplast DNA sequences. However, both marked the origin of the plant species towards the end of the Eocene, and the definitive separation of Bolivian populations in the Miocene-Pliocene. The main events related to the diversification of *A. uniflora* corresponded to the rise of the Andes and the Great Patagonian Glaciation (GPG). *A. uniflora* and the AMF associated with this plant described similar patterns of spatial distribution. However, the origin and beginning of AMF diversification would have been initiated much earlier in the Lower Cretaceous, and probably in association with other photosynthesizing plants in the community. The current spatial distribution of both taxonomic groups was influenced by the Pleistocene glaciations. On the other hand, the identification of AMF associated with *A. uniflora* revealed the presence of a majority group denominated here '*Arachnitis* clade' (Glomeraceae). Members of Claroideoglomeraceae and Acaulosporaceae were also found but in lower proportions. Morphological evidence also showed spores of Gigasporaceae. Those AMF in low proportion would correspond to "facultative" symbionts of *A. uniflora*. Claroideoglomeraceae has never been found in association with mycoheterotrophic

plants. Finally, the low influence of environmental factors on *A. uniflora* suggest that its major conditioner is biotic, and would be represented by its associated AMF, which were mainly affected by temperature variables.

# INTRODUCCIÓN

## GENERAL



## INTRODUCCIÓN GENERAL

La heterogeneidad ambiental que se presenta en amplios rangos geográficos puede promover diferencias entre poblaciones debido a variaciones en condiciones físicas y biológicas. Así, especies ampliamente distribuidas ofrecen la oportunidad de explorar la dinámica de los procesos evolutivos que tienen lugar a nivel interpoblacional (Dobzhansky, 1970; Thompson, 1999). Para ello, es fundamental conocer los patrones genéticos a lo largo de la distribución y así relacionar el polimorfismo intraespecífico con procesos de especiación, adaptación y/o flujo génico entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984).

La estructura genética de una especie es el resultado de la acción conjunta de distintos procesos evolutivos que operan en el contexto histórico y biológico de la especie (Loveless y Hamrick, 1984). Entre las fuerzas que favorecen la divergencia interpoblacional, pueden mencionarse la deriva genética y la selección natural, que opera localmente, mientras que el flujo génico actúa impidiendo o disminuyendo tal diferenciación (Thompson *et al.*, 1994; Futuyma, 1997). La deriva genética, es decir el cambio en las frecuencias alélicas de una generación a la siguiente por efecto del azar, genera una diferenciación no direccional entre las poblaciones, mientras que los patrones generados por diferenciación por selección natural estarían correlacionados con la variación de ciertas condiciones bióticas y/o abióticas en las respectivas poblaciones (Primack y Kang, 1989; Hartl y Clarck, 1997). Dichos procesos afectan el reservorio génico de las poblaciones por lo que pueden modificar el patrón de las frecuencias génicas de una generación a la siguiente (Primack y Kang, 1989).

La combinación de estudios filogenéticos y datos biogeográficos permite conocer sobre los principios y procesos que gobiernan la distribución geográfica de linajes, especialmente dentro y entre especies relacionadas (Manel *et al.*, 2003; Avise, 2004). Dado que la filogeografía enfatiza los aspectos históricos de la actual distribución de los linajes génicos, la misma puede considerarse una subdisciplina de la biogeografía histórica, que integra conceptos y técnicas de genética molecular, genética de poblaciones, demografía, sistemática filogenética, etología y paleontología (Avise *et al.*, 1994; Avise, 2000).

La reconstrucción de las relaciones genealógicas intraespecíficas contribuyen a la comprensión de los procesos de diversificación y patrones de distribución de las especies, y más relevante aún, permite explorar las interrelaciones que existen entre los cambios geológicos y climáticos pasados (procesos históricos) y los procesos demográficos y de diversificación de las especies (Templeton y Sing, 1993; Avise, 2000). Estos eventos históricos pueden explicar patrones de variación genética en poblaciones de una especie que han estado aisladas por mucho tiempo, o por el contrario que son el resultado de colonizaciones o expansiones demográficas recientes (Avise, 2000; Hewitt, 2000; 2004). A pesar de ello, en muchos casos estas hipótesis basadas en características geográficas del paisaje para explicar la estructura filogeográfica fallan en proveer explicaciones generales sobre los patrones de variación genética (Paz *et al.*, 2015). En esos casos, se ha postulado que algunas particularidades intrínsecas de los organismos podrían jugar un rol más importante que las características del paisaje en determinar la estructura genética espacial (Crawford *et al.*, 2007, Burney y Brumfield, 2009, Fine *et al.*, 2013, Wang *et al.*, 2013). Así, ciertos caracteres relacionados con aspectos propios de la especie como su sistema reproductivo, sistema de dispersión, amplitud de su rango geográfico, hábitat, conectividad de las poblaciones, comportamiento, entre otros, serían factores determinantes de su estructura y diversidad genética, siendo importantes predictores del nivel de variabilidad y del modo en que la misma está distribuida dentro y entre poblaciones (Loveless y Hamrick, 1984; Hamrick y Godt, 1996; Schaal *et al.*, 1998; Paz *et al.*, 2015).

Al respecto, múltiples estudios indican que la historia evolutiva reciente y la ocurrencia de eventos pasados que habrían modificado el acervo génico de las poblaciones son, en algunos casos, importantes factores explicativos de la magnitud y estructura de la variabilidad genética actual (Karron, 1987; Premoli, 1997; Comes y Abbott, 2000). Así, la apertura del océano Atlántico sur (Somoza & Zaffarana, 2008) que comenzó hace unos 115 Ma, produjo cambios sustanciales en la biota gondwánica (Raven, 1972), los cuales fueron profundizados en Sudamérica por el levantamiento de los Andes, que actuó como un corredor para múltiples especies (Bell y Donoghue, 2005; Winkworth y Donoghue, 2005), promoviendo una rápida diversificación por especiación alopátrica y desplazamientos en los nuevos hábitats formados (Bell y

Donoghue, 2005; Hughes y Eastwood, 2006). Por su parte, el efecto de los cambios climáticos del Pleistoceno sobre los patrones biogeográficos y la diferenciación intraespecífica está bastante bien establecido en el hemisferio norte, particularmente en Europa y Norteamérica (Hewitt, 1996, 2000; Soltis *et al.*, 1997; Taberlet *et al.*, 1998; Palmé *et al.*, 2003; Pinceel *et al.*, 2005; Magri *et al.*, 2007; Paun *et al.*, 2008), mientras que el estudio de dichos efectos en el sur de Sudamérica cobró importancia recién en las últimas dos décadas (Premoli *et al.*, 2000; Morando *et al.*, 2007; Ruzzante *et al.*, 2008; Jakob *et al.*, 2009; Lessa *et al.*, 2010; Sérsic *et al.*, 2011; de Aranzamendi *et al.*, 2011; Soliani *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014; Souto *et al.*, 2015). Por su parte, las interacciones entre diferentes tipos de organismos, los cuales pueden hacerlo de múltiples formas, tienen consecuencias que son de gran impacto en la estructura y dinámica poblacional de las especies participantes, con importantes implicancias evolutivas (Ehrlich y Raven, 1964; Thompson, 2013).

### *Sistema de estudio:*

#### *Arachnitis uniflora* Phil.

*Arachnitis uniflora* pertenece a Corsiaceae Becc., una pequeña familia de paleohierbas monocotiledóneas del Orden Liliales Perleb, compuesta por tres géneros: *Corsia* Becc., de Nueva Guinea, Australia e Islas Solomon; *Corsiopsis* Zhang, Saunders y Hu, de China, y *Arachnitis* Phil., en América del Sur (Dimitri, 1972; Cribb *et al.*, 1995; Ibisch *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2001). Todas sus especies son plantas que no poseen clorofila, y por lo tanto son incapaces de asimilar carbono por sí mismas. Así, dependen de la asociación con hongos micorrícicos para obtenerlo, los cuales lo capturan de plantas autótrofas de la comunidad. Las plantas de este tipo se denominan micoheterotróficas y muestran una particular forma de vida que ha evolucionado convergentemente numerosas veces y se presenta en diez familias de Angiospermas, siete de las cuales son paleohierbas monocotiledóneas (Merckx y Freudenstein, 2010; Merckx *et al.*, 2013a,b).

La ubicación taxonómica del género *Arachnitis* ha sido bastante controvertida, ya que fue incluido sucesivamente en diferentes familias (Philippi, 1864, 1865; Fenzl,

1865; Bentham, 1883); su actual posición en la familia Corsiaceae fue también cuestionada por estudios filogenéticos realizados por Neyland y Hennigam (2003), quienes sugerían la polifilia de Corsiaceae. Sin embargo, estudios recientes ratifican la monofilia de la familia y su pertenencia al Orden Liliales (Mennes *et al.*, 2015).

La distribución geográfica de *A. uniflora* presenta una marcada disyunción (Graf, 1992; Ibisch *et al.*, 1996), ya que la mayor parte de las poblaciones se sitúan a lo largo de los bosques templados andino-patagónicos de Argentina y Chile, pero existen otras más distantes, en los bosques andinos tropicales húmedos y sub-húmedos del centro-sur de Bolivia y en ambientes húmedos y sin árboles de las Islas Malvinas (Dimitri, 1972; Cribb *et al.*, 1995; Ibisch *et al.*, 1996).

Se trata de una especie geófito, reducida a un pequeño sistema radical formado por unas ocho raíces tuberosas, fasciculadas, no ramificadas donde se acumulan las sustancias de reserva en forma de almidón y aceites (Domínguez y Sérscic, 2004; Domínguez *et al.*, 2009; Fig. 1B) obtenidas gracias a su asociación fúngica. En la época de floración crece un único escapo floral por planta de variada longitud que remata en una sola flor terminal. La flor (Fig. 1A) es zigomorfa, perfecta (Ibisch *et al.*, 1996) con dos ciclos de tépalos, siendo el tépalo dorsal del ciclo externo más desarrollado que los restantes. El perianto es de coloración blanco-rosado con nervaduras a veces de color pardo-rojizo. El androceo tiene 6 estambres y el gineceo está formado por tres carpelos soldados, el ovario es ínfero y cuenta con tres cortas ramas estigmáticas. Si bien se sospecha que dichas plantas serían polinizadas por pequeñas moscas micetófilas que, atraídas por el olor y la coloración, buscarían en las flores un sustrato de oviposición, es altamente probable que se trate de una especie con altos niveles de autogamia. Por otro lado, muestra reproducción vegetativa por gemación de sus raíces (Domínguez *et al.*, 2005). Existe además, una marcada variación en el fenotipo tanto floral como vegetativo entre y dentro de las poblaciones (obs. pers.), que llevó a Dimitri (1972) a describir una segunda especie, *A. quetrihuensis* Dimitri, la cual se encontraría parcialmente en simpatría con *A. uniflora* en los bosques andino-patagónicos de Argentina y Chile. Sin embargo, mucha de la bibliografía disponible no hace mención a la misma y se han tratado como sinónimos (Mabberley, 1987; Domínguez y Sérscic, 2004; Domínguez *et al.*, 2009), al igual que en la presente tesis.

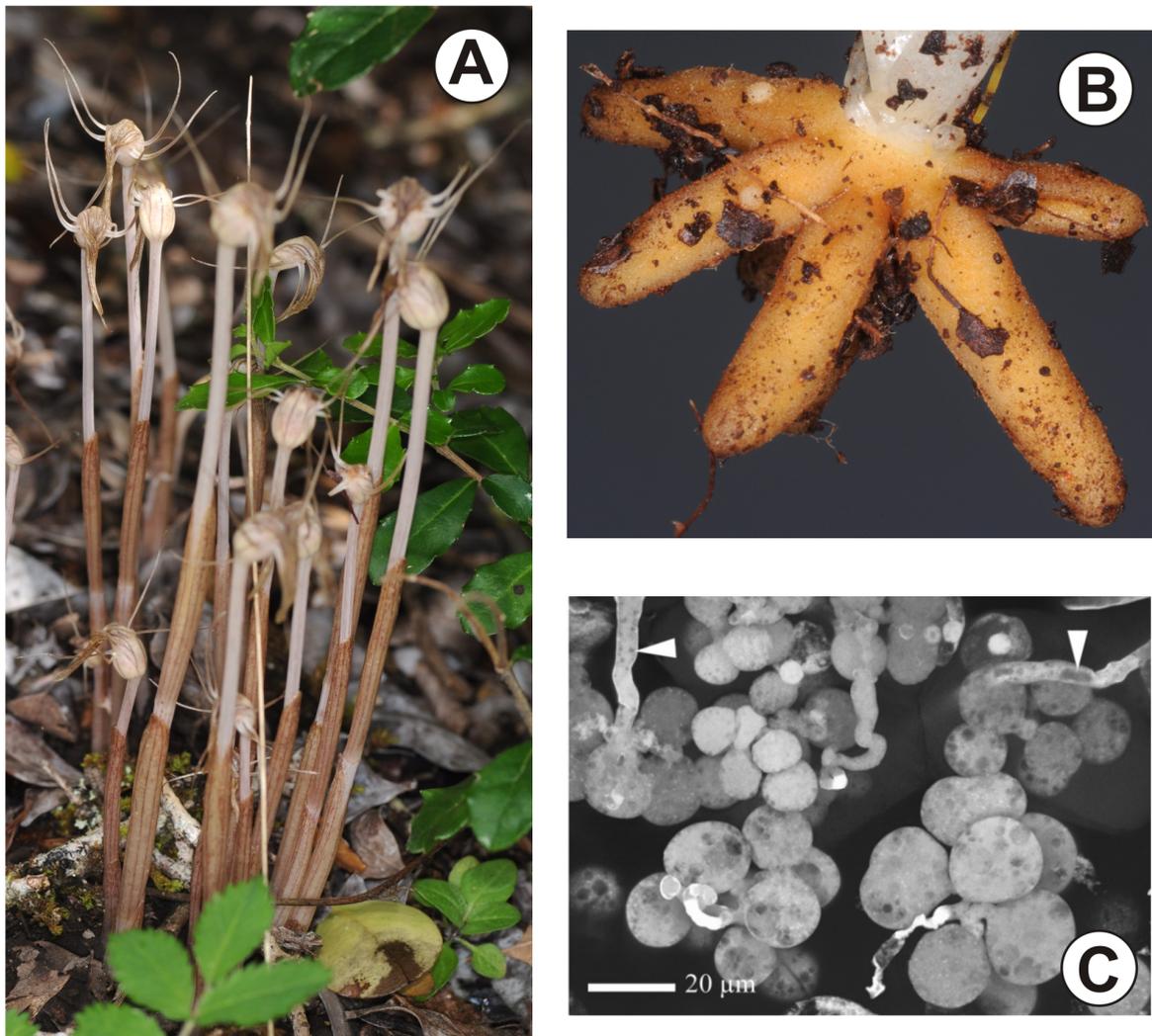
## Hongos micorrícicos arbusculares asociados

Si bien las plantas micoheterotróficas pueden realizar simbiosis con miembros de tres *phyla* de hongos (Glomeromycota Walker y Schüßler, Ascomycota Caval.-Sm. y Basidiomycota Whittaker ex Moore) y formar micorrizas arbusculares, monotropoides, orquideoides o arbutoides (Smith y Read, 2008), un estudio realizado por Bidartondo *et al.* (2002) mostró para tres poblaciones de *A. uniflora*, una asociación específica de *A. uniflora* con hongos micorrícicos arbusculares (HMA) pertenecientes a *Glomus* grupo A (actualmente ubicado en la familia Glomeraceae Piroz. y Dalpé). Posteriormente, Domínguez y Sérsic (2004) y Domínguez *et al.* (2009) confirmaron esta asociación simbiótica con HMA en las raíces de *A. uniflora*, aunque descubrieron la ausencia de arbusculos y la presencia de vesículas en racimos (Fig. 1C).

Los HMA pertenecen al phylum Glomeromycota, en el cual se reconoce una única clase (Glomeromycetes Caval.-Sm.), formada por 4 órdenes (Glomerales Morton y Benny, Diversisporales Walker y Schüßler, Paraglomerales Walker y Schüßler, y Archaeosporales Walker y Schüßler) y un total de 11 familias, según la clasificación de Schüßler y Walker (2010) y Redecker *et al.* (2013) adoptadas en esta tesis.

Estos HMA viven en simbiosis con raíces de muchas especies de plantas y producen esporas capaces de germinar en ausencia de señales provenientes de sus hospedadores, aunque necesitan de esta asociación para completar su ciclo de vida (Giovannetti, 2000), entre las cuales se supone la existencia de una transferencia bidireccional de nutrientes. Aquellos mismos HMA que se hallaron asociados a *A. uniflora* fueron encontrados asociados también a, al menos, tres especies de plantas fotosintetizantes (Bidartondo *et al.*, 2002): *Austrocedrus chilensis* (D. Don) Pic. Serm. y Bizzarri (Cupressaceae), *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. (Nothofagaceae) y *Osmorrhiza chilensis* Hook. y Arn. (Apiaceae). Esta habitual interacción entre HMA y plantas fotosintetizadoras se encuentra alterada debido a la interferencia de *A. uniflora* en el sistema mutualista dando como resultado una simbiosis tripartita, donde la planta micoheterotrófica establece su asociación con los hongos

beneficiándose mediante mecanismos poco claros, con la obtención completa de sus nutrientes y sin la mediación de una clara contribución de la planta hacia el hongo (Bidartondo, 2005; Smith y Read, 2008; Merckx *et al.*, 2009).



**Figura 1:** *Arachnitis uniflora*. A) Escapo floral. B) Raíces. C) Arbúsculos formados en el interior de sus raíces, a partir de las hifas (flechas) de los hongos micorrícicos arbusculares que se asocian a ella.

### *Alcances de esta tesis*

*Arachnitis uniflora* es la especie micoheterotrófica más austral. Presenta un amplio rango de distribución, con una pronunciada disyunción, el cual fue abordado en su totalidad en la presente tesis, y mediante múltiples enfoques. Su especial hábito de vida micoheterotrófica, su particular distribución geográfica con marcadas

disyunciones, su asociación con sólo determinados HMA, son características que hacen de *A. uniflora* un sistema de estudio interesante para poner a prueba hipótesis sobre la historia evolutiva de esta especie y sus hongos asociados.

De este modo, en esta tesis se plantea abordar en forma conjunta la diversidad genética de *A. uniflora* y sus hongos asociados desde una perspectiva filogeográfica, analizando aquellos procesos evolutivos que llevaron a la actual distribución de sus linajes y a la conformación poblacional actual. Con este propósito, se abordarán los eventos biogeográficos históricos atravesados por la planta, promotores de procesos como vicarianza y diversificación, lo cual requiere del conocimiento de las edades de separación de los principales haplotipos de *A. uniflora*, así como también de un estudio del paleoclima, sobre la base de los requerimientos climáticos actuales, y de esta manera inferir los patrones de distribución frente a escenarios climáticos pasados. Por otro lado, caracterizar el ambiente donde actualmente se desarrolla la especie vegetal puede dar cuenta de las barreras al flujo génico aún persistentes. Por último, y no menos importante, la condición micoheterotrófica de *A. uniflora* es contemplada desde varios aspectos, abordando la diversidad morfológica y genética de sus HMA asociados y cómo esta se distribuye a lo largo del rango geográfico de la planta, e infiriendo también la historia evolutiva que subyace a estos hongos. Así, se abordarán también los patrones evolutivos conjuntos que planta y HMA describen, así como los niveles de especificidad en esta relación micoheterotrófica.

### *Hipótesis*

- La actual distribución, estructura genética poblacional y demografía de *Arachnitis uniflora* son el resultado de eventos pasados, tanto climáticos (ej. últimas glaciaciones pleistocénicas), como geológicos (levantamiento de los Andes, principalmente durante el Mioceno y Plioceno).
- Los eventos climáticos y orográficos pasados fragmentaron las poblaciones de *Arachnitis uniflora*, la cual se extendía de forma más continua y extensa.
- Dada la condición micoheterotrófica de *Arachnitis uniflora* y su amplia distribución, se ha asociado a más de un taxón de hongos micorrícicos

arbusculares, como estrategia de adaptación a diferentes condiciones ambientales, a lo largo de su historia evolutiva.

- La historia evolutiva común entre *Arachnitis uniflora* y sus hongos micorrícicos arbusculares asociados dio lugar a patrones de diversidad y estructura genéticas similares para ambas partes del par micoheterotrófico.

### *Objetivo General*

- Conocer la historia evolutiva y la diversidad genética de *Arachnitis uniflora* y de sus simbiontes fúngicos, considerando el rango geográfico y los cambios geológicos y climáticos ocurridos principalmente durante el Cenozoico.

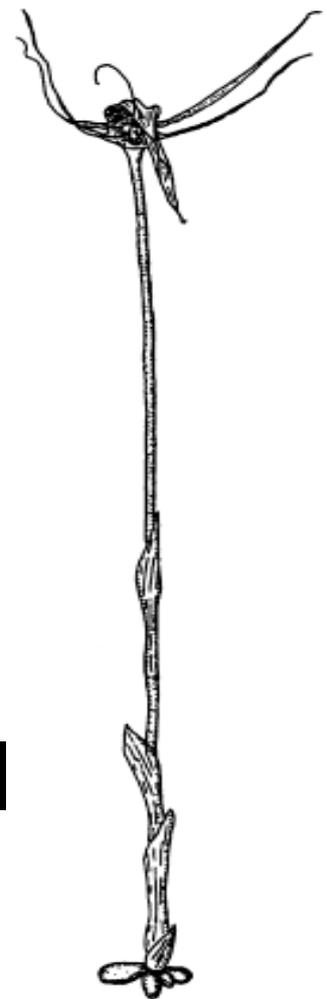
### *Objetivos Específicos*

- Caracterizar los niveles de polimorfismo en el ADN nuclear y cloroplástico de *Arachnitis uniflora*.
- Determinar la diversidad morfoespecífica y genética de los hongos micorrícicos arbusculares asociados a *Arachnitis uniflora* entre y dentro de las comunidades donde se distribuyen, así como su relación con variables ambientales.
- Analizar el rango de distribución potencial de los filogrupos obtenidos en las poblaciones de *Arachnitis uniflora* en un escenario climático actual y pasado.
- Inferir los eventos geológicos y/o climáticos que han influenciado en la historia evolutiva de *Arachnitis uniflora* y sus hongos micorrícicos asociados.
- Determinar los factores ambientales condicionantes de la diversidad genética de *Arachnitis uniflora* y de sus hongos micorrícicos asociados.

*Diversidad genética de  
Arachnitis uniflora.*

*Análisis filogeográfico y  
demográfico de la especie.*

# CAPÍTULO I



# **CAPÍTULO I: *Diversidad genética de *Arachnitis uniflora*. Análisis filogeográfico y demográfico de la especie.***

## INTRODUCCIÓN

La comprensión de los principios y procesos que gobiernan la actual distribución geográfica de linajes requiere de un detallado conocimiento de la historia evolutiva y el rol de la modificación del paisaje en el moldeado de la diversidad genética y ecológica a nivel intraespecífico (Hewitt, 1996; Hutchinson y Templeton, 1999; Davis y Shaw, 2001), por lo cual demanda de un estudio combinado de análisis filogenéticos y datos biogeográficos (Manel *et al.*, 2003; Avise, 2004). En este sentido la filogeografía permite conocer e interpretar las consecuencias de los procesos históricos que afectaron a la demografía poblacional, configurando la actual distribución de la variación genética espacial (Avise 2000).

En Patagonia, los estudios filogeográficos han tenido su auge en los últimos años, y entre los cuales las plantas están muy bien representadas (por ej. Premoli *et al.*, 2000; Marchelli y Gallo, 2004; Muellner *et al.*, 2005; Amico y Nickrent, 2009; Azpilicueta *et al.*, 2009; Jakob *et al.*, 2009; Cosacov *et al.*, 2010; Acosta y Premoli, 2010; Mathiasen y Premoli, 2010; Premoli *et al.*, 2012; Sede *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014; Baranzelli *et al.*, 2014) y de los cuales emerge como denominador común las glaciaciones del Cuaternario como principales moldeadoras de los patrones de diversidad y distribución de las especies en estudio.

Sin embargo, la geografía de Patagonia se encuentra altamente condicionada por la cordillera de los Andes y gran parte de la historia evolutiva de las especies que la habitan han sido modificadas por su diastrofismo (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006; Hoorn *et al.*, 2010; Turchetto-Zolet *et al.*, 2013). El levantamiento de la cordillera tuvo su comienzo hace unos 115 Ma como consecuencia de la apertura del océano Atlántico sur (Somoza & Zaffarana, 2008), y experimentó fases discretas en el Cretácico Superior, Eoceno tardío, Oligoceno-Mioceno y en el Cuaternario tardío (Groeber, 1946; Folguera *et al.*, 2011). Las últimas tres fases ocurrieron en el Cenozoico y son también referidas como Inca, Quechua y Diaguita, respectivamente

(ver Yrigoyen, 1979). La primera de ellas, la fase Inca, comenzó hace unos 37 Ma y fue la responsable de la formación del oroclinal boliviano, entendido como una compresión y doblamiento de la cordillera durante su levantamiento (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006; O'Driscoll *et al.*, 2012). La fase Quechua (11-7 Ma) dio fin a la edad de las planicies australes en el Mioceno superior e incrementó la sombra de lluvia que llevó a la conformación de una franja de ambientes xerófilos, denominada Diagonal Árida. Ésta actualmente se extiende desde cerca del Ecuador (5° S) hasta los 30° S por la costa del Pacífico y los Andes, cruzando por territorio argentino hasta los 42° S (Huek, 1978; Villagrán e Hinojosa, 1997; Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006; Ramos y Ghiglione, 2008). La última Fase, o Diaguita, culminó hace cerca de 3 Ma con el cierre del Istmo de Panamá, hecho que alteró la circulación marítima incrementando el descenso de la temperatura de los océanos (Jackson y D'Croz, 2003; Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006).

Las vinculaciones florísticas entre las regiones subtropicales del norte de Argentina y Bolivia con las regiones frías andino-patagónicas datarían desde el Paleógeno y el Mioceno, según Villagrán e Hinojosa (1997), e incluso afirman que la conformación del Desierto de Atacama en el Plio-Pleistoceno habría imposibilitado cualquier contacto florístico posterior. Por su parte, Quiroga *et al.* (2015) hallaron un último contacto en *Podocarpus* L'Hér. ex Pers. para el Mioceno medio (46 Ma) asociado con etapas tempranas del levantamiento de los Andes, y vinculado a la existencia de una topografía patagónica compleja, caracterizada por trasgresiones marinas y por la formación de cuencas internas que habrían actuado como barreras muy efectivas al flujo génico (Ramos, 1982; Premoli *et al.*, 2012; Bechis *et al.*, 2014). Es entonces probable que los tiempos de divergencia de los distintos linajes guarden relación con características intrínsecas a la biología de la especie que se trate.

Resulta interesante que más allá de los efectos vicariantes que imprimió el levantamiento de los Andes, también resultó en la conformación de nuevos valles, laderas, altas montañas, cada uno con su microclima particular que brindó abundantes hábitats disponibles para la diversificación de la biota (Linder, 2008; Graham, 2009), y particularmente de géneros de plantas como *Chuquiraga* Juss. (Ezcurra, 2002), *Calceolaria* L. (Cosacov *et al.*, 2009), *Heliotropium* L. (Luebert *et al.*,

2011), *Valeriana* L. (Bell *et al.*, 2012), *Oxalis* L. (Heibl y Renner, 2012), *Nothofagus* Blume (Acosta *et al.*, 2014) *Monttea* Gay (Baranzelli, 2016), entre otros.

No menos importantes sobre la biota patagónica, sin embargo, fueron los eventos climáticos pleistocénicos, los cuales impactaron en la distribución y dinámica de especies, generando procesos como flujo génico, expansiones/contracciones demográficas, cuellos de botella, entre otros (Avice, 2000). Si bien el enfriamiento del Sur de Sudamérica comenzó hacia finales del Mioceno - comienzos del Plioceno (7,4-5 Ma), cuando se registró la primer glaciación en el continente (Mörner y Sylwan, 1989; Ton-That *et al.*, 1999; Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006; Rabassa, 2008; Rabassa *et al.*, 2011), los eventos cíclicos de avance y retroceso de los hielos durante el Pleistoceno fueron más severos en Patagonia, donde se destaca en primer lugar la Gran Glaciación Patagónica (GGP; 1-1.2 Ma), y el Último Máximo Glaciar registrado a nivel global hace unos 20-18 mil años (ka; Ponce *et al.*, 2011). Además de la capa de hielo que cubrió gran parte de los bosques andino-patagónicos, los sucesivos cambios en los niveles de la línea de costa jugaron un papel importante en la distribución de las especies, e incluso en la colonización de terrenos relativamente alejados. Este es el caso de las Islas Malvinas, donde según Coronato *et al.* (2008), un descenso en el nivel de mar en 150 m por debajo del actual (relativamente habitual en períodos de glaciaciones) podría haber formado un puente entre Malvinas y Sudamérica. La evidencia del último contacto puede darlo el lobo de Malvinas (*Dusicyon australis* Kerr), cuyo aislamiento respecto de sus congéneres continentales dató de aproximadamente 330 ka (Pleistoceno medio; Slater *et al.*, 2009), en el período interglaciar que, según Raynaud *et al.* (2005), fue el más cálido del último millón de años (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006).

Las consecuencias de las glaciaciones pleistocénicas se hicieron sentir también en regiones alejadas de Patagonia. Hacia la latitud 17° S y sobre el flanco Este de los Andes, la línea de glaciares descendió unos 1400 m respecto a los niveles que existen en la actualidad (Seltzer, 1992; Clayton y Clapperton, 1997; Kull y Grosjean, 2000; Ammann *et al.*, 2001; Mark *et al.*, 2005). Los más viejos registros de glaciaciones fueron obtenidos en La Paz y datan, aunque de forma equívoca, entre 3,27 y 2,2 Ma (Clapperton, 1979; Thouveny y Servant, 1989), con los máximos avances de los hielos ocurridos hace 20 ka, con sustanciales reavances entre 15-12 ka atrás y la ocurrencia

de la deglaciación definitiva hace cerca de 10 ka, en el Holoceno temprano (Zech *et al.*, 2007).

Particularmente en Patagonia, y referido a los procesos evolutivos ocurridos durante las glaciaciones pleistocénicas, Sársic *et al.* (2011) los describen y agrupan en dos patrones fundamentales: por un lado, la existencia de zonas de alta diversidad, entendidas como refugios, y por otro la presencia de barreras filogeográficas, dispuestas latitudinalmente a lo largo de los Andes. El presente capítulo tiene por principal meta hallar ambos procesos a lo largo de todo el rango de distribución de *A. uniflora*, especie micoheterotrófica que presenta, a grandes rasgos, tres principales regiones por las que se distribuye, el Centro-Sur de Bolivia, los bosques andino-patagónicos y las islas Malvinas, separadas por evidentes barreras geográficas que, como se mencionó, se produjeron en diferentes etapas e intensidades. Por esta razón, cobra valor el conocer cuál de estos eventos fue más determinante sobre la historia evolutiva de la especie. Para ello, se llevó a cabo un estudio filogeográfico de *A. uniflora*, en el que se aborda el análisis de su diversidad genética y cómo ésta se distribuye, así como también las edades de divergencia de los principales grupos; para que, más allá de detectar refugios y barreras para la especie, puedan inferirse las causas históricas de tales sucesos.

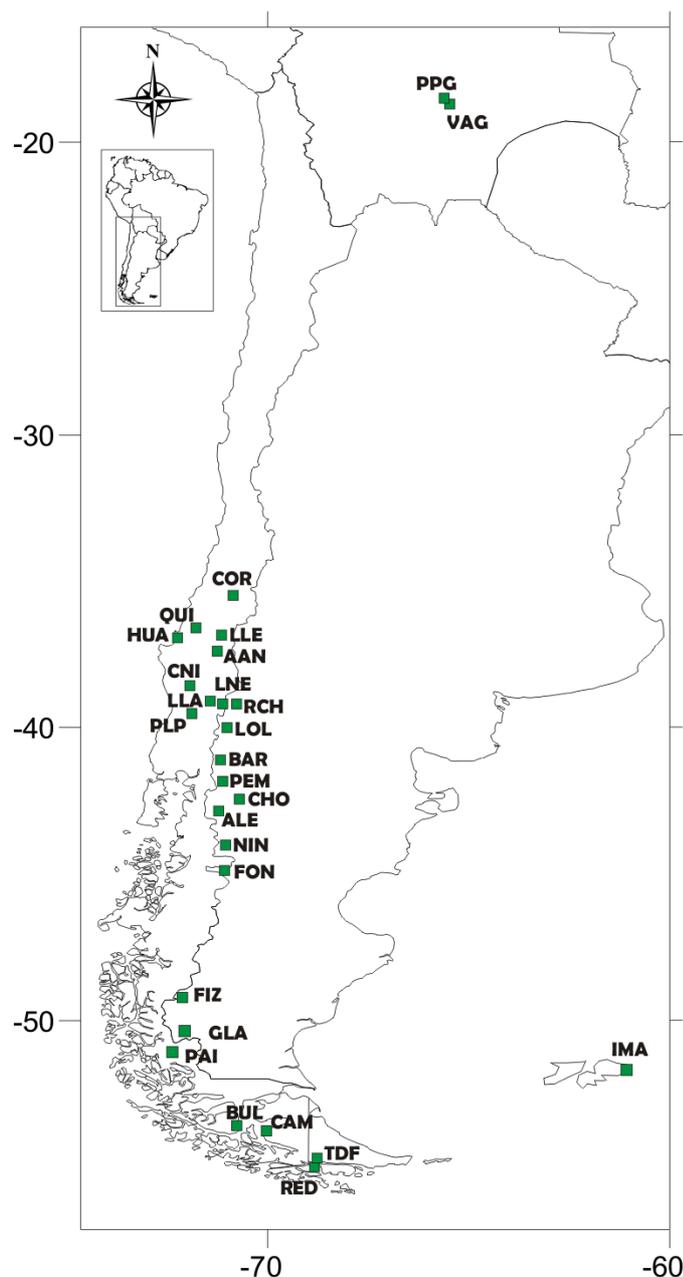
## MATERIALES Y MÉTODOS

**Muestreo.** Se obtuvo tejido vegetal proveniente de 27 sitios donde crece *A. uniflora* (Tabla 1; Fig. 2). En cada uno de estos, se recolectó material correspondiente a ocho individuos de la especie, el cual fue almacenado en sobres individuales, debidamente rotulados y dentro de bolsas herméticas con gel de sílice; además se tomó la posición geográfica de cada localidad mediante GPS. Un ejemplar de cada sitio fue depositado en el Herbario CORD. La excepción a ello fue la localidad situada en Islas Malvinas cuyo material, perteneciente a un solo individuo, fue aportado por el Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra, por intermedio del Dr. Martin Bidartondo. Además, se obtuvo material a utilizar como grupo externo en los análisis filogenéticos, el cual fue cedido por el Dr. Vincent Merckx (Naturalis Biodiversity

Center - Leiden University, Holanda) y corresponden a *Corsia* sp. (Corsiaceae) de Nueva Guinea y *Burmannia bicolor* Mart. (Burmanniaceae) de Guayana Francesa.

**Tabla 1:** Total de sitios muestreados para *A. uniflora* y sus respectivas referencias, donde (A) corresponde a Argentina, (B) a Bolivia y (C) a Chile.

Sitio	Ubicación	Latitud	Longitud	Altitud	
VAG	Valle Grande	Santa Cruz (B)	-18,572	-64,043	2387
PPG	Pampa Grande	Santa Cruz (B)	-18,677	-63,917	2378
COR	Corel	Maule (C)	-35,535	-71,197	487,3
QUI	Quillón	Bio Bio (C)	-36,668	-72,460	41,2
HUA	Parque Hualpén	Bio Bio (C)	-36,805	-73,172	17,7
LLE	Los Lleuques	Bio Bio (C)	-36,877	-71,627	729,5
AAN	Alto Antuco	Bio Bio (C)	-37,369	-71,697	749
CNI	Cerro Ñielol, Temuco	Araucanía (C)	-38,724	-72,589	217,6
LLA	Llancalil	Araucanía (C)	-39,236	-71,636	333
RCH	Lago Ruca Choroy	Neuquén (A)	-39,246	-71,189	1241,9
LNE	Los Nevados	Araucanía (C)	-39,327	-71,834	400
PLP	La Peña	Los Ríos (C)	-39,507	-72,582	153,9
LOL	Lago Lolog	Neuquén (A)	-40,017	-71,373	936,9
BAR	Bariloche	Río Negro (A)	-41,053	-71,541	822,3
PEM	Cerro Perito Moreno, El Bolsón	Río Negro (A)	-41,857	-71,537	593,2
CHO	Cholila	Río Negro (A)	-42,461	-71,010	580
ALE	Parque Nacional Los Alerces	Chubut (A)	-42,887	-71,608	526,2
NIN	Laguna Los Niños	Chubut (A)	-44,0033	-71,495	1026,3
FON	Lago Fontana	Chubut (A)	-44,890	-71,527	927,8
FIZ	Monte Fitz Roy	Santa Cruz (A)	-49,268	-72,950	693,2
GLA	Parque Nacional Los Glaciares	Santa Cruz (A)	-50,484	-72,875	403
PAI	Parque Nacional Torres del Paine	Magallanes (C)	-51,084	-73,214	258,2
IMA	Islas Malvinas	Pto. Argentino (A)	Posición estimada		
BUL	Fuerte Bulnes	Magallanes (C)	-53,610	-70,945	403,9
CAM	Puerto Cameron	Magallanes (C)	-53,750	-70,095	116,4
TDF	Parque Nacional Tierra del Fuego	Tierra del Fuego (A)	-54,847	-68,483	8,5
RED	Isla Redonda	Tierra del Fuego (A)	-54,863	-68,479	402,2



**Figura 2:** Ubicación geográfica de las localidades donde fue muestreada *A. uniflora*. El nombre completo y otros datos de referencia para cada una de ellas se detallan en la Tabla 1.

**Extracción de ADN y selección de cebadores.** La extracción del ADN de *A. uniflora* se llevó a cabo según protocolo de Wilkie (1997), con modificaciones. Debido a que este es el primer estudio intraespecífico realizado en *A. uniflora*, fue necesaria una búsqueda de los cebadores (o *primers*) más apropiados. Se seleccionaron 15 individuos pertenecientes a 8 sitios de muestreo que cubrieron con relativa

equidistancia la distribución patagónica de la especie. Las pruebas se realizaron con 25 pares de cebadores, ocho pertenecientes a genes mitocondriales, ocho nucleares y nueve cloroplásticos (Apéndice I). Las correspondientes amplificaciones de los fragmentos de ADN se efectuaron mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), con condiciones iniciales comunes para todos los cebadores. La mezcla de reacción fue para 25 µl consistió de un protocolo estándar: 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 5 µl de *buffer* 10X [75 mM Tris-HCl pH 8,8; 20 mM (NH<sub>4</sub>)SO<sub>4</sub>; 0,01 % Tween-20]; 200 µM de cada nucleótido (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 0,2 µM de cada cebador; 1 unidad de Taq ADN polimerasa (Invitrogen, Brasil) y 10-15 ng de ADN molde (muestra). Se incluyó un control negativo en cada reacción para detectar posibles contaminaciones. El programa de termociclado consistió de una etapa de desnaturalización inicial de 5 min a 80° C, seguido de 30 ciclos que consistían de 1 min de desnaturalización a 95° C, 40 seg de hibridación a 50° C (con rampa de 0,3° C/ seg) y 4 min de extensión a 65° C. El programa finaliza con una fase de extensión final de 5 min a 65° C. El termociclador utilizado fue Eppendorf Mastercycler.

En los casos negativos de amplificación, se optó por seguir el protocolo citado por cada autor. También se realizaron cambios en las temperaturas de hibridación del ADN molde con el cebador y la enzima polimerasa. Además, se modificaron las concentraciones de MgCl<sub>2</sub> y del ADN molde. Sin embargo, en muchos casos no fue posible obtener producto de amplificación (fundamentalmente en los genes correspondientes al cloroplasto), lo que podría deberse a mutaciones en el ADN de *A. uniflora*. Los productos de amplificación obtenidos fueron enviados a Macrogen Inc. para su secuenciación. Para identificar las regiones variables del ADN de *A. uniflora*, las secuencias se alinearon mediante el programa ClustalW (Thompson *et al.*, 1994) implementado en MEGA v.5.2.2 (Tamura *et al.*, 2011) con sus parámetros por defecto. Posteriormente el alineado fue revisado de forma manual.

**Amplificación de ADN.** Fueron seleccionadas cuatro regiones del ADN de *A. uniflora* para el estudio filogeográfico. En primer lugar, la región nuclear de los espaciadores transcritos internos (ITS; cebadores ITS17SE/ITS4; Apéndice I), que evidenció un relativo alto número de sitios informativos (alrededor de 10) en los análisis de selección de los cebadores. Por otro lado, la porción 16S del ADN

ribosomal cloroplástico (cebadores 8for/1525rev; Apéndice I) que, si bien sólo presentó dos sitios polimórficos en los primeros estudios, fue escogida por su ubicación extra-nuclear. Otras dos regiones nucleares y con escaso número de sitios informativos fueron también escogidas, las cuales son codificantes de las subunidades ribosomales 18S (NS1/NS4; Apéndice I) y 26S (N-nc26S1/950rev; Apéndice I), respectivamente. La primera subunidad cuenta con una tasa de sustitución conocida (Lemaire *et al.*, 2011), mientras que los cebadores de la región 26S ya fueron utilizados en una filogenia que agrupa plantas micoheterotróficas y que, incluso, ha revelado diferencias intraespecíficas para *A. uniflora* (Neyland y Hennigam, 2003).

**Genealogía de haplotipos.** A partir de las secuencias de ADN se construyeron redes de haplotipos utilizando el algoritmo *median joining* implementado en el programa Network v.5.0 (Bandelt *et al.*, 1999). Las matrices con las secuencias pertenecientes al ADN ribosomal nuclear (18S, ITS y 26S) fueron unidas mediante el programa WinClada v.1.00.08 (Nixon, 2002) para formar una sola matriz de análisis. De esta forma se presentan dos redes de haplotipos, una construida con las secuencias nucleares y otra con las cloroplásticas. En la red perteneciente a las secuencias nucleares, la presencia de dos conexiones ambiguas o *loops*, fueron resueltas empleando los tres criterios postulados por Crandall y Templeton, (1993), derivados de la teoría de la coalescencia, que pueden resumirse en: 1) es más probable que los haplotipos de menor frecuencia se sitúen en los extremos de las redes, mientras que los menos raros, en el interior, 2) un haplotipo se unirá más probablemente a haplotipos internos que externos, y 3) es más probable que un haplotipo esté conectado a otros pertenecientes a la misma región geográfica.

**Diversidad genética.** Los análisis se llevaron a cabo empleando la matriz de secuencias nucleares, por un lado, y las cloroplásticas por otro. Para la especie y para cada localidad se calculó el número de sitios polimórficos (S), la diversidad haplotípica (h; Nei, 1987) y la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ; Nei, 1987), con el programa DnaSP v.5 (Rozas *et al.*, 2003).

**Distribución geográfica de la diversidad genética.** La distribución geográfica de la diversidad genética se representó mediante el uso de la herramienta de análisis estadístico de "punto a grilla" en DIVA-GIS 7.5.0 (Hijmans *et al.*, 2005). Este trazado se

llevó a cabo con un tamaño de grilla de  $0,3 \times 0,3^\circ$  ( $33,3 \times 33,3$  km en el ecuador) y una opción de vecindad circular de  $1,5^\circ$  (166,5 km). También se realizaron regresiones lineales entre la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) respecto de las coordenadas geográficas y la altitud de cada sitio de muestreo. Estos análisis fueron realizados mediante Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2014). Para estos análisis sólo se utilizó la matriz de datos del ADN nuclear, debido al mayor número de individuos secuenciados para este marcador. Además, para detectar patrones espaciales de diversidad genética se realizó un análisis de interpolación de la forma del paisaje genético, utilizando el programa Alleles in Space v.1.0 (AIS; Miller, 2005). Este procedimiento permite la representación gráfica de la distancia genética entre individuos para detectar la ubicación de posibles barreras y/o zonas de contacto entre individuos con composición genética diferente. El análisis se llevó a cabo con un tamaño de cuadrícula de  $50 \times 50$  y un valor ponderado de distancia de  $a=1$ .

**Estructura poblacional.** La estructuración genética poblacional fue evaluada a través de inferencia bayesiana, analizando el número óptimo de poblaciones a lo largo del rango de distribución, mediante el programa Geneland v.4.0.0 (Guillot *et al.*, 2005). Se corrieron 5 réplicas independientes con un número de poblaciones entre 1 y 25, asumiendo un modelo de frecuencias alélicas correlacionado y un modelo espacial con una incerteza de 3 m en las coordenadas geográficas. Cada corrida consistió en  $8 \times 10^6$  iteraciones con un muestreo cada 100 y una fase de calentamiento del 10%. Dado que el número óptimo de poblaciones hallado en el análisis fue el mismo para cada corrida independiente, se seleccionó aquella con una mayor probabilidad posterior. A partir de ella, se crearon mapas de probabilidad de pertenencia de la localidad en un dominio espacial definido por 50 píxeles en ambos ejes X e Y siguiendo las recomendaciones de los autores.

Luego de los análisis de estructuración, se calcularon en DnaSP los mismos índices de diversidad ya obtenidos a nivel poblacional ( $S$ ,  $H$  y  $\pi$ ), pero en esta oportunidad contemplando los grupos genéticos más probables hallados mediante Geneland. Todos estos análisis fueron realizados con los datos de las secuencias nucleares y cloroplásticas separadamente.

**Análisis de procesos demográficos pasados.** Es posible analizar, a partir de la diversidad genética observada en *A. uniflora*, posibles huellas de eventos demográficos pasados; partiendo del supuesto de que dicha variación evoluciona de manera neutral, esto quiere decir que no se encuentra sujeta a selección natural ni está genéticamente ligada a sitios bajo esta fuerza (Wayne y Simonsen, 1998). Mediante pruebas de neutralidad se puede evaluar entonces, si los cambios históricos en el tamaño poblacional se ajustan o no a un modelo sin crecimiento demográfico. Aquí se estimaron las denominadas pruebas de neutralidad de Tajima (D; Tajima, 1989) y de Fu (Fs; Fu, 1997). El estadístico D emplea la información de la frecuencia de mutaciones para comprobar crecimiento poblacional, el cual genera un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía (linajes recientes). Por su parte, Fs utiliza la información de la distribución de los haplotipos, basado en la probabilidad de encontrar un cierto número de haplotipos para una diversidad genética dada; por lo tanto cuando existe un exceso de mutaciones en singletons se interpreta que ha ocurrido expansión poblacional reciente. En resumen, valores negativos y significativos de estos parámetros (Fs y D) indican un exceso de mutaciones de baja frecuencia en relación a lo esperado bajo el modelo neutral estándar, que son indicadores de expansión poblacional reciente.

Un segundo tipo de análisis demográfico es el de distribución de las diferencias pareadas entre las secuencias de los individuos (*mismatch distribution*), y permite distinguir entre poblaciones que se han mantenido estables a lo largo del tiempo, de aquellas que han experimentado una expansión demográfica reciente. Esta distribución se calcula contando el número de diferencias entre sitios nucleotídicos que existe entre cada par de secuencias y se representa de acuerdo a la frecuencia de pares de secuencias que difieren en cero sitio, un sitio, dos sitios,  $n$  sitios. Así, en poblaciones que han experimentado una expansión demográfica reciente se esperarían un patrón unimodal para la distribución de las diferencias pareadas, donde existe un alto número de pares de secuencias que difieran en pocas mutaciones; por el contrario cuando ha existido equilibrio demográfico se observa un patrón multimodal (Rogers y Harpending, 1992).

La ocurrencia de expansión demográfica reciente fue puesta a prueba con todos los grupos poblacionales más probables obtenidos mediante Geneland para *A. uniflora*, analizándolos separadamente además según secuencias nucleares y cloroplásticas. Los tres tipos de análisis demográficos anteriormente descritos fueron realizados con los programas Arlequin v.3.1 (Excoffier *et al.*, 2005) y DnaSP. La significancia de los estadísticos D y Fs fue puesta a prueba simulando 10000 muestras bajo el modelo neutral estándar y utilizando un algoritmo de coalescencia adaptado de Hudson (1990), a partir de los que se obtuvieron valores de significancia ( $p \leq 0.05$ ) para rechazar la hipótesis nula de equilibrio en el tamaño poblacional. El ajuste de los datos al modelo de expansión demográfica en el estudio de la distribución de las diferencias pareadas se evaluó realizando aleatorizaciones con *bootstrap* de la suma de desvíos al cuadrado (SSD). Un valor significativo de SSD ( $p \leq 0.05$ ) evidencia que los datos difieren significativamente de lo esperado bajo el modelo de expansión demográfica.

La dinámica en la que ocurren los cambios en el tamaño poblacional efectivo a lo largo del tiempo fue analizada para los grupos obtenidos con Geneland, mediante un perfil demográfico bayesiano o *bayesian skyline plot* (BSP) implementado en Beast v.1.7.5 (Drummond *et al.*, 2012). El modelo de evolución molecular utilizado dependió del arreglo de los datos genéticos empleados en cada caso y fueron obtenidos mediante MrModeltest v.2.2 (Nylander, 2004), a través del criterio de inferencia de Akaike (AIC); el más comúnmente empleado en estos casos fue el modelo de HKY. El modelo de reloj molecular empleado fue relajado, no correlacionado y de distribución log-normal, cuya calibración fue llevada a cabo de acuerdo a la tasa de sustitución nucleotídica obtenida en la datación de la filogenia de los haplotipos (ver Resultados de este capítulo). Además se empleó una cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) de  $5 \times 10^7$  generaciones de largo y muestreo cada 1000 generaciones.

**Filogenia de haplotipos y tiempos de divergencia.** Se reconstruyó la filogenia mediante inferencia bayesiana para *A. uniflora* y especies afines (listadas en el Apéndice II) en MrBayes v.3.1 (Ronquist y Huelsenbeck, 2003) y a partir de los genes 18S y 26S, además de una pequeña fracción de la porción ITS (correspondiente al gen 5.8S) ya que las secuencias para *A. uniflora* difieren ampliamente del resto de las

especies incluidas en la filogenia por numerosas introgresiones. El modelo de evolución molecular empleado fue GTR+I+G (obtenido mediante AIC en MrModeltest) y los algoritmos empleados consistieron en cuatro MCMC (tres calientes y una fría) de  $5 \times 10^6$  de largo, con un muestreo cada 100 ciclos. La primera etapa de iteraciones o fase de calentamiento coincidente con el primer 10% de los árboles obtenidos, fue eliminada.

Partiendo de este árbol filogenético, fue posible incorporarle puntos de calibración que sirvieran para la datación de los tiempos de divergencia de los principales linajes de *A. uniflora*. Esta datación se llevó a cabo en dos etapas (datación indirecta) debido a que, como ya se dijo, las grandes diferencias entre las secuencias ITS de *A. uniflora* respecto de las restantes del orden Liliales impidieron su correcta alineación, y por ello fueron incorporadas en la segunda etapa de la datación que se circunscribió únicamente a la familia Corsiaceae.

En base a hojas fosilizadas de *Ripogonum tasmanicum* se calibró el origen de la familia Ripogonaceae Conran y Clifford a un mínimo de 51 Ma (Carpenter *et al.*, 2007, 2014; Conran *et al.*, 2009), mientras que los fósiles de hojas de *Luzuriaga* permitieron ceñir a una mínima edad de 23.2 Ma a la familia Alstroemeriaceae Dumort. (Lindqvist y Lee, 2009; Conran *et al.*, 2014), ambas pertenecientes al orden Liliales. Finalmente, de acuerdo a dataciones previas para Corsiaceae (Mennes *et al.*, 2015), se ajustó el origen del orden Liliales a 85 Ma, el cual se modeló con distribución normal. Se utilizó *Burmannia* sp. (Orden Dioscoreales) como grupo externo y se llevó a cabo el análisis en Beast v.1.7.5. El mismo fue corrido bajo el modelo de reloj molecular relajado, no correlacionado y de distribución log-normal, con un modelo de sustitución nucleotídica de GTR+I+G (obtenido previamente al reconstruir la filogenia). Además se empleó una MCMC de  $2 \times 10^7$  generaciones de largo y un muestreo cada 1000 iteraciones. El 10% de los árboles obtenidos, coincidentes con la fase de calentamiento, fueron descartados.

Las edades de divergencia de ciertos nodos obtenidos en esta primera etapa fueron utilizadas para la datación final de los principales clados de *A. uniflora*, en la cual se incorporaron las tres matrices de secuencias nucleares completas (18S, ITS y 26S) correspondientes a *A. uniflora* y *Corsia* sp. El modelo de sustitución obtenido

para este arreglo de secuencias en MrModeltest fue el de GTR. Los puntos de calibración para el nodo de origen de Corsiaceae y de la diversificación de *A. uniflora* fueron modelados con distribución normal de las edades. El resto de los algoritmos utilizados fueron iguales a los ya descritos para la primera etapa de datación.

También se realizó la datación de los tiempos de divergencia de los principales clados de *A. uniflora* de acuerdo a las secuencias del gen 16S ribosomal cloroplástico. Debido a que en GenBank sólo se obtuvieron secuencias de tres especies de Liliales para este gen (*Colchicum autumnale* L., *Luzuriaga radicans* Ruiz y Pav., y *Lilium distichum* Nakai; números de acceso a GenBank en el Apéndice II), se tomaron las edades de divergencia obtenidas para estos géneros en la primera etapa de la datación de las secuencias nucleares como base para la nueva estimación. El modelo de sustitución nucleotídica obtenido mediante AIC en MrModelTest para estas secuencias fue el de GTR+I. El resto de los parámetros fueron similares a los de las estimaciones de tiempos de divergencias para las secuencias nucleares.

**Modelado predictivo de nicho ecológico (MNE).** Sobre la base de datos climáticos globales y datos geográficos donde la especie se encuentra distribuida, se puede cuantificar la identidad ambiental y climática que caracteriza a una especie (Nakazato *et al.*, 2010). En efecto, los MNE permiten inferir procesos de contracción/expansión, desplazamiento y/o fragmentación del rango de distribución durante los cambios climáticos pasados de manera independiente a la información genética, y así, poder validar las inferencias sobre refugios, rutas de migración, aislamientos históricos, etc. o bien, generar hipótesis alternativas que puedan ser posteriormente exploradas en los patrones filogeográficos (Richards *et al.*, 2007).

A partir de diferentes fuentes de información como referencias de herbarios y citas bibliográficas, se confeccionó una base de datos de las coordenadas geográficas para los sitios fehacientes de presencia de *A. uniflora*, los cuales totalizaron 50 referencias. La información paleoclimática escogida perteneció al Último Máximo Glaciar (UMG) y fue tomada de Community Climate System Model (CCSM; [www.cesm.ucar.edu](http://www.cesm.ucar.edu)) y Model for Interdisciplinary Research on Climate ([www.ccsr.utokyo.ac.jp/~hasumi/MIROC/](http://www.ccsr.utokyo.ac.jp/~hasumi/MIROC/)). De esta forma se modeló la paleodistribución de la especie correlacionando cada punto de presencia de *A.*

*uniflora* con los 19 parámetros bioclimáticos del paleoclima, a través de los programas BIOCLIM (Nix, 1986) y MaxEnt (Phillips *et al.*, 2006).

## RESULTADOS:

En términos generales fueron secuenciados entre 5-7 ejemplares de *A. uniflora* por sitio, aunque por razones propias del desarrollo de la especie y el corto plazo en que ésta se puede encontrar en flor, en ciertas localidades el número de individuos muestreados fue inferior a este rango (COR, LLE, NIN y TDF, sumado a IMA de donde se consiguió material de sólo un ejemplar). Fue significativamente menor el número de fragmentos de ADN cloroplástico obtenidos, ya que los cebadores utilizados no siempre pudieron hibridar con éxito en dicha región.

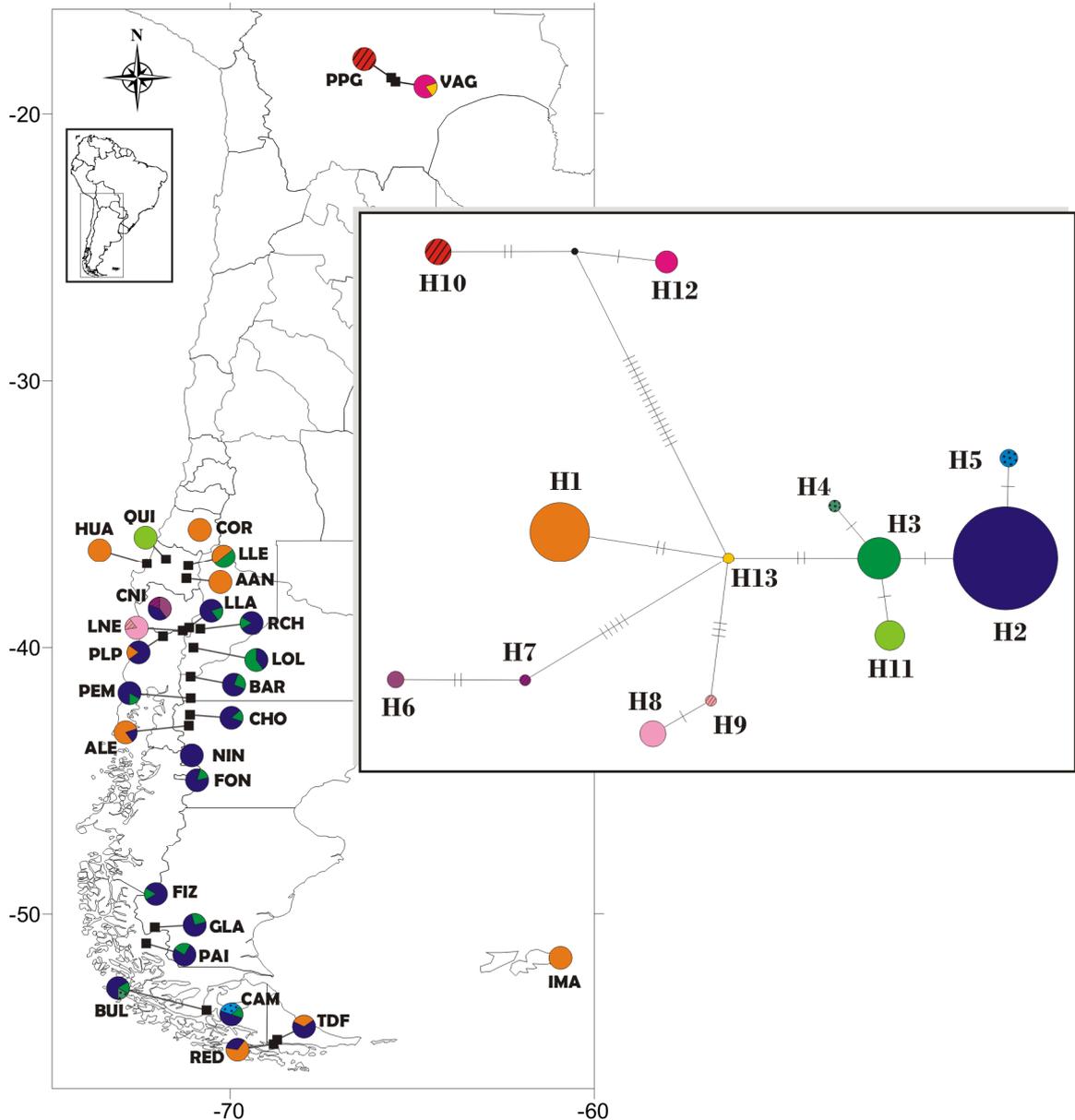
Se obtuvieron las secuencias completas de los genes nucleares de 136 individuos, pertenecientes a 27 localidades. Los tramos secuenciados fueron tres, obteniéndose así 978, 688 y 936 pb (pares de bases) respectivamente para 18S, ITS y 26S, que en su conjunto totalizaron 39 sitios variables o informativos que arrojaron una diversidad nucleotídica de  $\pi = 0,00223$  (Tabla 2). Discriminando por poblaciones, las de mayor diversidad fueron VAG, CNI, LLE y RED, con valores superiores a  $\pi = 0,001$ . Las secuencias de ADN de la subunidad 16S del ribosoma cloroplástico totalizaron 87 de 1205 pb y con 22 sitios informativos. Ello representó un valor de  $\pi = 0,00082$ , observándose que las localidades de LLA, PLP, PPG, LNE, RCH, COR, AAN y LOL fueron las únicas con valores de diversidad superiores a cero; de ellas LLA fue la de mayor diversidad nucleotídica (Tabla 2).

**Tabla 2:** Índices de diversidad (H y  $\pi$ ) y S para cada sitio y para la especie; además del número de secuencias (N) y los haplotipos encontrados en cada localidad. También se presentan los índices de diversidad (H y  $\pi$ ) y S, obtenidos luego de la subdivisión poblacional propuesta por Geneland (ver Figs. 5 y 6), además del agrupamiento de los sitios andino-patagónicos. Se muestran los datos pertenecientes tanto al ADN nuclear como cloroplástico.

**Tabla 2:** Continúa de la página anterior.

	Secuencias del ADN nuclear					Secuencias del ADN cloroplástico				
	N	S	H	pi	Haplotipos	N	S	H	pi	Haplotipos
VAG	5	17	0,4	0,00262	H1, H12	0	-	-	-	-
PPG	6	0	0	0	H10	2	1	1	0,00083	H8, H9
COR	4	0	0	0	H1	3	1	0,667	0,00055	H2, H3
QUI	7	0	0	0	H11	6	0	0	0	H2
HUA	7	0	0	0	H1	5	0	0	0	H2
LLE	2	4	1	0,00154	H1, H3	2	0	0	0	H2
AAN	7	0	0	0	H1	5	1	0,6	0,0005	H1, H2
CNI	6	10	0,733	0,00226	H2, H6, H7	1	-	-	-	H2
LLA	5	1	0,4	0,00015	H2, H3	5	3	0,7	0,001	H2, H4, H5
RCH	6	1	0,333	0,00013	H2, H3	5	2	0,4	0,00066	H2, H10
LNE	7	1	0,286	0,00011	H8, H9	6	2	0,733	0,00072	H2, H5, H6
PLP	5	5	0,4	0,00077	H1, H2	2	1	1	0,00083	H2, H7
LOL	5	1	0,6	0,00023	H2, H3	5	1	0,6	0,0005	H2, H5
BAR	4	1	0,5	0,00019	H2, H3	2	0	0	0	H2
PEM	6	1	0,333	0,00013	H2, H3	5	0	0	0	H2
CHO	7	1	0,286	0,00011	H2, H3	4	0	0	0	H2
ALE	5	5	0,4	0,00077	H1, H2	4	0	0	0	H2
NIN	2	0	0	0	H2	1	-	-	-	H2
FON	6	1	0,333	0,00013	H2, H3	2	0	0	0	H2
FIZ	6	1	0,333	0,00013	H2, H3	4	0	0	0	H2
GLA	4	1	0,5	0,00019	H2, H3	2	0	0	0	H2
PAI	4	1	0,5	0,00019	H2, H3	5	0	0	0	H2
IMA	1	-	-	-	H1	1	x	x	x	H2
BUL	6	2	0,6	0,00033	H2, H3, H4	2	0	0	0	H2
CAM	7	2	0,667	0,00029	H2, H3, H5	3	0	0	0	H2
TDF	3	1	0,667	0,00026	H1, H2	3	0	0	0	H2
RED	3	5	0,667	0,00128	H1, H2	2	0	0	0	H2
Especie	136	39	0,736	0,00223		87	22	0,348	0,000817	
G. Bolivia	11	23	0,6182	0,002012						
G. Quillón	7	0	0	0						
G. Disyunto	17	12	0,6397	0,001571						
G. Patagonia N	33	9	0,4489	0,000943						
G. Patagonia S	68	2	0,3999	0,000167						
Patagonia	124	18	0,6887	0,001105						
G. Bolivia						2	1	1	0,000830	
G. Extremos Patagonia						59	2	0,099	0,000083	
G. Patagonia Central						26	7	0,652	0,000832	
Patagonia						84	9	0,32	0,000357	

**Genealogía de haplotipos.** La red de haplotipos nucleares (Fig. 3) quedó conformada por 13 haplotipos, los que representaron una diversidad haplotípica relativamente alta ( $H= 0,74$ ), con LLE, CNI, TDF, RED y CAM con valores de diversidad mayores a  $H= 0,65$  (Tabla 2). El H2 fue el haplotipo más frecuente, y estuvo ampliamente distribuido; sin embargo, si bien H1 presentó una frecuencia algo menor, fue el más ampliamente distribuido, ocupando de extremo a extremo los bosques andino-patagónicos, e incluso Islas Malvinas. Continúa en frecuencia H3, el cual también mostró una extensión similar a los otros dos para Patagonia. Entre estos tres haplotipos se ubica como central en la red H13, que representa un único individuo hallado en VAG (Bolivia) y del cual se separan H1 por dos mutaciones, al igual que H3. Con eje en H13, se separó H7 por cinco pasos mutacionales, del cual se diferencia H6 por otros dos (ambos exclusivos de CNI). H13 se distanció de H9 por tres pasos mutacionales, el cual se diferenció de H8 por una mutación (ambos exclusivos de LNE). Otros dos haplotipos bolivianos están asociados entre sí por un conector intermedio o *median joining*, el cual es un artefacto del análisis para representar un haplotipo no muestreado o extinto, del cual divergen más de un haplotipo. De este discurren H10 con dos mutaciones y H12 con una, y a la vez se separa de H13 por 16 pasos mutacionales. Hacia otro extremo de H13 se ubica H3 separado por dos pasos mutacionales, y del cual se diferencian H4 (exclusivo de BUL), H11 (exclusivo de QUI) y H2, todos por una mutación cada uno. Este último dio lugar a H5 por una mutación, el cual fue exclusivo de CAM. Cabe destacar que de los haplotipos exclusivos, H4, H7, H9 y H13 fueron a su vez haplotipos únicos, es decir que fueron encontrados en sólo un individuo. Los sitios COR, QUI, HUA, AAN y NIN resultaron monomórficos y de ellos sólo QUI lo fue para un haplotipo exclusivo. De IMA sólo se cuenta con una secuencia de ADN que resultó pertenecer al haplotipo más abundante.

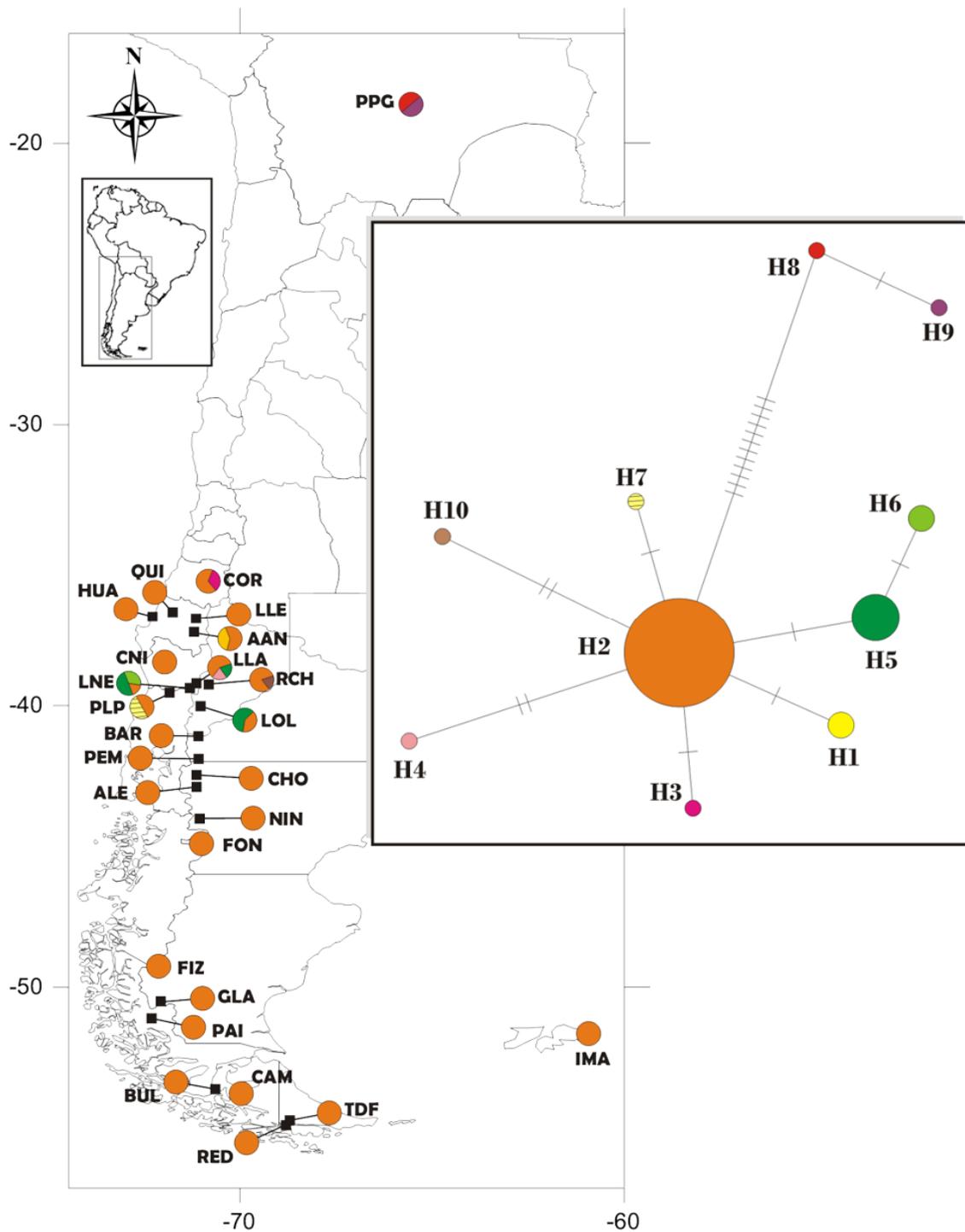


**Figura 3:** Red de haplotipos de las secuencias nucleares (18S, ITS y 26S) y distribución de los mismos para las poblaciones de *A. uniflora* analizadas. Cada segmento perpendicular en la unión entre haplotipos representa un paso mutacional. El círculo negro más pequeño representa un vector intermedio (o *median vector*), que representa un antepasado no muestreado o extinto. El nombre completo y otros datos de cada población se muestran en la Tabla 1.

Los haplotipos del ADN cloroplásticos obtenidos totalizaron 10 (Fig. 4), los cuales constituyeron una diversidad total de  $H= 0,35$ . La diversidad haplotípica fue cero en la mayoría de las poblaciones, y sólo en PLP, PPG, LNE y LLA estos valores alcanzaron o superaron los 0,7 (Tabla 2). La topografía de la red fue en estrella, con un haplotipo central (H2) presente en todos los sitios del bosque andino-patagónico e Islas Malvinas, y sólo estuvo ausente en Bolivia, donde se hallaron dos haplotipos propios de esa población (H8-H9). H2, resultó monotípico para todas las poblaciones más australes desde BAR, además de CNI, LLE, HUA y QUI, sin que existan poblaciones monotípicas para otro haplotipo que no sea H2. El resto de los haplotipos fueron exclusivos de poblaciones, a excepción de H5, presente en tres sitios cercanos (LNE, LLA y LOL). Del haplotipo central H2 discurrieron por una mutación los haplotipos H1, H3, H5 y H7; a su vez H5 se diferenció también por un paso mutacional de H6. Los haplotipos H4 y H10 se separan por dos pasos de H2, mientras que H8 lo hizo por 12 mutaciones y a partir de este se diferenció H9, por una mutación (ambos exclusivos de Bolivia).

**Distribución geográfica de la diversidad genética.** La representación gráfica de la distribución geográfica de la diversidad genética de *A. uniflora* (Fig. 5) permitió en términos generales, reconocer para el ADNn tres sitios de alta diversidad, uno de ellos correspondió a la región norte de los bosques andino-patagónicos, otro al conjunto de las localidades bolivianas y un tercer área localizada en el extremo austral de Patagonia; dicho patrón fue más claro con la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) que con la haplotípica (H), ya que la última resultó en valores más uniformes, en general (Fig. 5A-B). Sólo los dos sitios más septentrionales de mayor diversidad obtenidos para el ADNn también se recuperaron con el ADNcp; la diversidad haplotípica en este caso muestra un patrón muy parecido a la diversidad nucleotídica (Fig. 5C-D).

El análisis de regresión lineal de la diversidad nucleotídica para Patagonia, respecto de las coordenadas geográficas y la altitud (Fig. 6) no mostró un patrón clinal en la distribución de la diversidad nuclear para *A. uniflora*, dado que las tres regresiones fueron no significativas, con valores de  $R^2$  muy bajos, inferiores a 0,03.



**Figura 4:** Red de haplotipos de las secuencias cloroplásticas (16S) y distribución de los mismos para las poblaciones de *A. uniflora* analizadas. En la red, cada segmento perpendicular en la unión entre haplotipos (círculos) representa un paso mutacional. El nombre completo y otros datos de cada población se muestran en la Tabla 1.

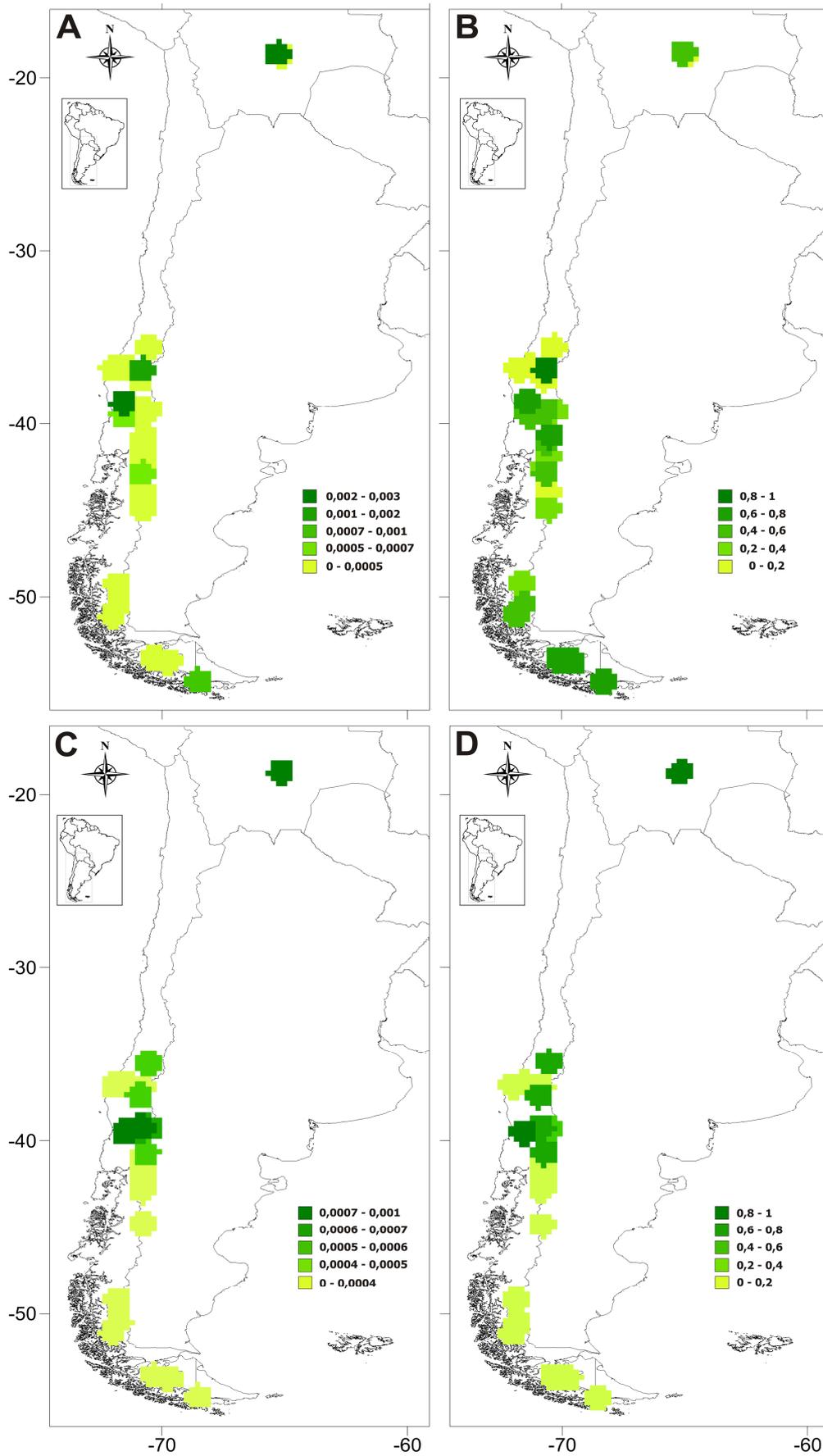


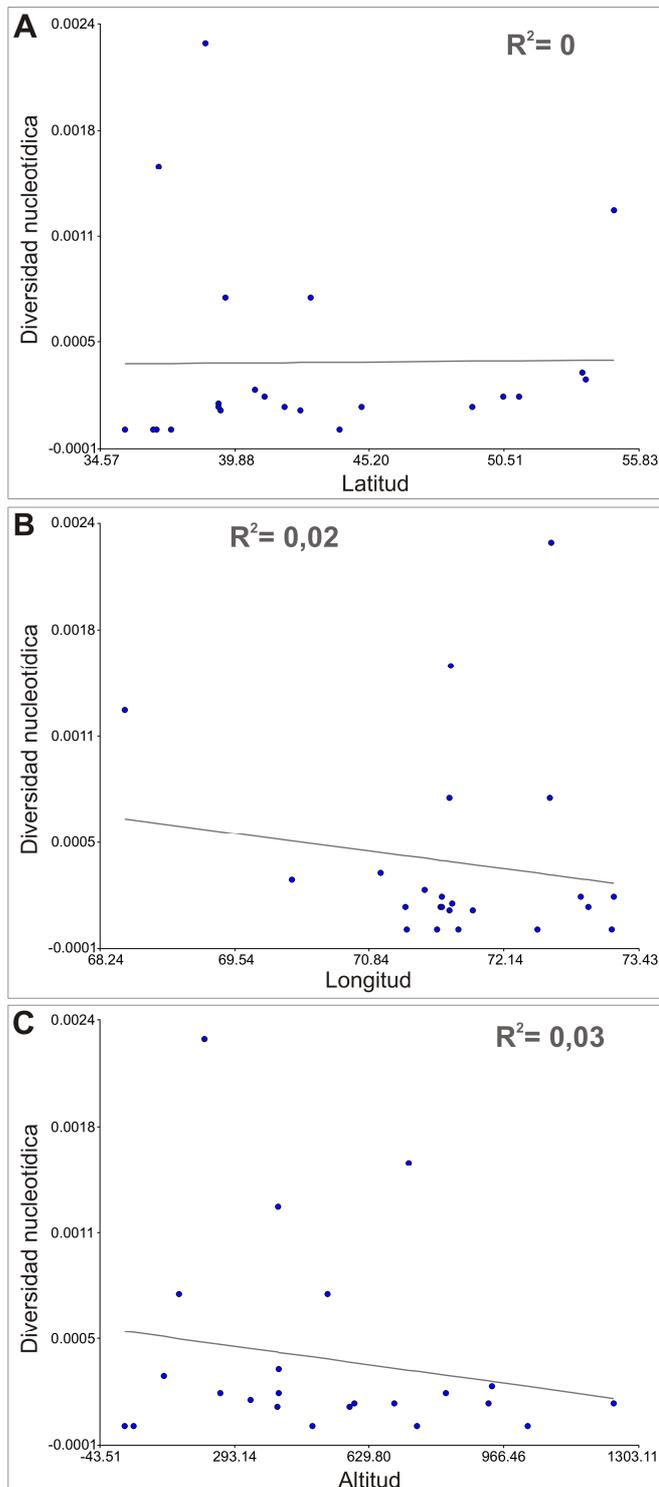
Figura 5: Continúa en la siguiente página.

**Figura 5 (cont.):** Patrones de distribución geográfica de la diversidad genética de *A. uniflora*. A) Diversidad nucleotídica nuclear. B) Diversidad haplotípica nuclear. C) Diversidad nucleotídica cloroplástica. D) Diversidad haplotípica cloroplástica. Por referencias de poblaciones, ver Fig. 2. La escala de colores indica graduación en la diversidad (como lo indican las referencias de la figura) para un tamaño de grilla de 33,3x33,3 km.

El análisis de interpolación de la forma del paisaje genético realizado para los individuos de *A. uniflora* pertenecientes a los bosques andino-patagónicos (Fig. 7) mostró una gran discontinuidad genética (presencia de secuencias disímiles representada por los picos positivos o ascendentes) a los 39,4° S (entre LNE y PLP), revelada tanto con los datos nucleares (Fig. 7A) como cloroplásticos (Fig. 7B). Otros picos, menos evidentes fueron hallados a los 44° y 46,4° S para el ADNn, y 44,4° y 47,5° S (al Sur de NIN y FON) para el cloroplástico. Picos negativos señalan la presencia de secuencias muy similares y fueron reportados para el extremo Norte de la distribución, de forma muy pronunciada a los 37,5° S en el perfil nuclear, y menos pronunciado y más uniforme en la misma región, para el cloroplástico. En sectores intermedios el perfil nuclear evidenció picos negativos a los 44,5° S (FON) y a los 47° S (a distancia intermedia entre FON y FIZ); el cloroplástico, presentó similares picos negativos, señalados en 44,8° y 47° S. Hacia el extremo sur, el ADNn describió picos negativos pronunciados alrededor de 49,8° S (entre FIZ y GLA), posterior a lo cual el perfil tomó valores más positivos hasta el final del mismo. El cloroplástico, en cambio, presentó picos negativos más al sur de GLA y se mantuvo en valores muy bajos hasta ese extremo del perfil.

**Estructura poblacional.** La estructuración bayesiana de las localidades en grupos genéticos a partir de las secuencias nucleares, convergió para cada una de las cinco corridas independientes en la estimación de cinco poblaciones (Fig. 8A; Apéndice III); sin embargo los valores de probabilidad posterior obtenidos en estos agrupamientos fue bajo. El primero de ellos (Grupo Bolivia; Fig. 8B) involucra a ambos sitios bolivianos y lo hace con una probabilidad de pertenencia de 0,36. El segundo conglomerado (Grupo Quillón; Fig. 8C) contiene únicamente la localidad QUI, con una probabilidad de pertenencia de 0,28. El tercero de éstos (Grupo Disyunto; Fig. 8D) agrupó localidades ubicadas en ambos extremos de los bosques de Patagonia,

PLP y CNI al Norte, junto con RED y TDF, en Tierra del Fuego (probabilidad posterior de 0,26). El cuarto grupo (Grupo Patagonia Norte; Fig. 8E) comprende Chile hacia el norte de AAN (excepto QUI), ALE e IMA con una probabilidad de pertenencia de 0,28. El último agrupamiento (Grupo Patagonia Sur; Fig. 8F) asocia las localidades al sur de LNE con una probabilidad de 0,45.

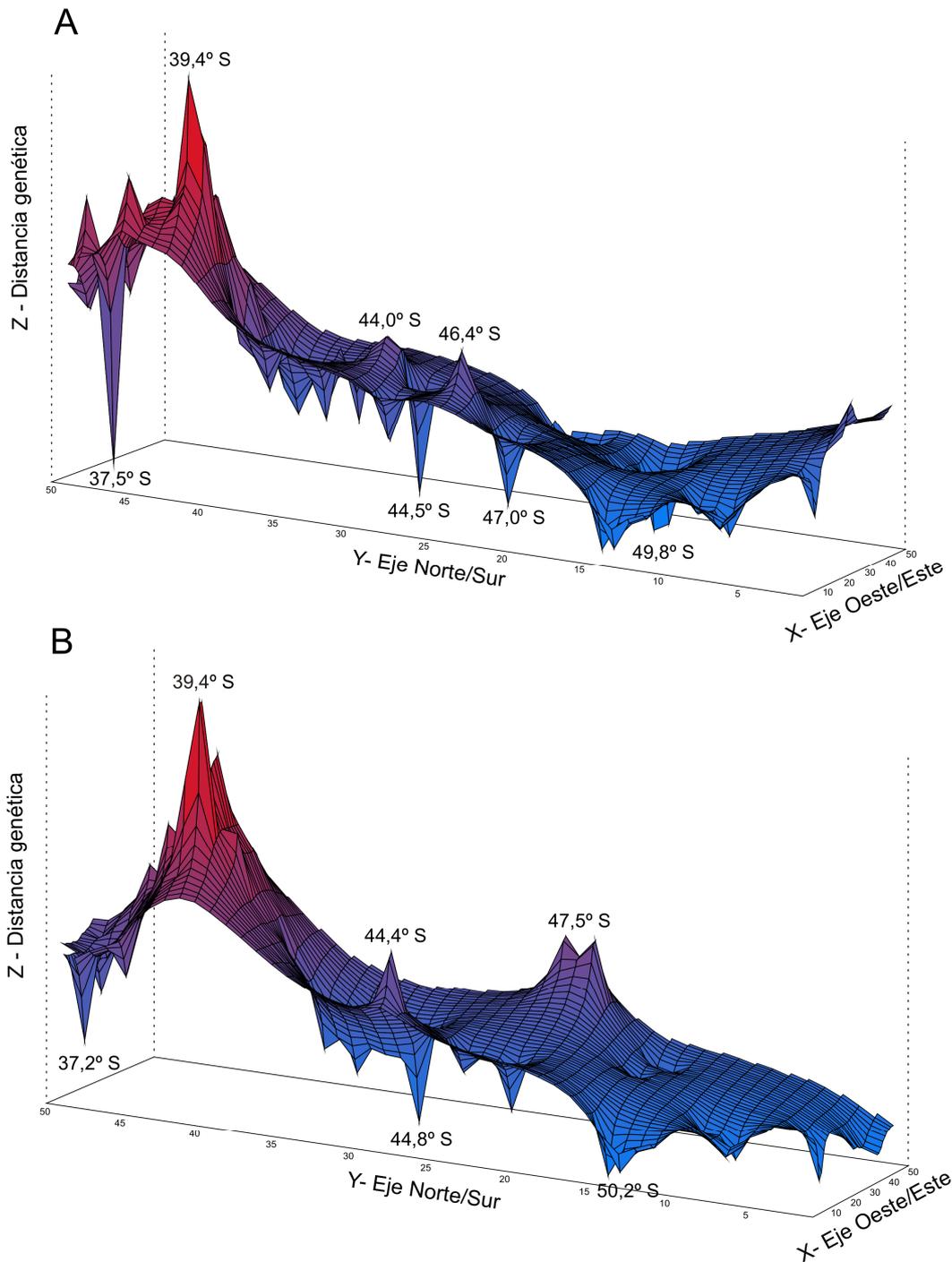


**Figura 6:** Regresiones lineales simples donde se relaciona la diversidad nucleotídica nuclear ( $\pi$ ) con las coordenadas geográficas (latitud y longitud) y la altitud de los sitios de muestreo. Los coeficientes de regresión se muestran en cada gráfico.

Con estos reagrupamientos de poblaciones, pudo observarse que los valores más altos de diversidad haplotípica y nucleotídica ( $H$  y  $\pi$ , respectivamente) y  $S$  (número de sitios variables) se presentaron en G. Bolivia ( $H= 0,62$  y  $\pi= 0,002$ ) y G. Disyunto ( $H= 0,64$  y  $\pi= 0,0016$ ); mientras que en las dos poblaciones genéticas donde se reunió el mayor número de localidades (Gs. Patagonia Norte y Patagonia Sur) los valores de diversidad fueron más bajos, con valores de  $H$  alrededor de  $0,4$  y de  $\pi$  promediando los  $0,0005$ . El G. Quillón fue monotípico, por lo cual sus índices de diversidad genéticas equivalieron a cero. Por su parte, un agrupamiento de todos los individuos pertenecientes a Patagonia arrojó valores de diversidad haplotípica relativamente altos ( $H= 0,69$ ), aunque  $\pi= 0,0011$  representó valores intermedios de diversidad (Tabla 2).

Las secuencias de origen cloroplástico analizadas en Geneland, convergieron tras las cinco corridas independientes de forma unánime en reunir a las localidades de *A. uniflora* en tres grupos genéticos (Fig. 9A; Apéndice III). Para este caso, Bolivia también resultó un grupo independiente del resto (Grupo Bolivia; Fig. 9B), con una probabilidad posterior de pertenencia de  $0,55$ . Los sitios al norte, desde AAN y aquellos desde PEM hacia el sur, incluido IMA, fueron conglomerados con una probabilidad de  $0,4$  (Grupo Extremos de Patagonia; Fig. 9C). Finalmente el Grupo Patagonia Central (Fig. 9D) reunió a las localidades de CNI, PLP, LNE, LLA, RCH, LOL y BAR con una probabilidad posterior de  $0,4$ .

**Análisis de procesos demográficos pasados.** Las pruebas de neutralidad realizadas para las secuencias nucleares (Tabla 3) y de acuerdo a los cinco grupos genéticos conformados resultaron no significativas ( $p>0,05$ ); Quillón no pudo analizarse por no presentar sitios informativos entre las secuencias de sus integrantes. Sin embargo las diferentes pruebas no son coincidentes en sus resultados; así el Grupo Bolivia presentó valores que podrían acercarse marginalmente al modelo de expansión poblacional ( $D= -1,52$ ;  $p= 0,06$ ; aunque  $F_s$  arrojó valores positivos y no significativos) y algo similar ocurrió con la población Patagonia Sur, donde  $D= -0,96$ ; aunque  $p= 0,3$ ; mientras que  $F_s$  fue positivo y no significativo. En la estructuración patagónica de los individuos de *A. uniflora*, ambas pruebas fueron también no significativas, aunque  $D= -0,38$  ( $p= 0,4$ ; Tabla 3).



**Figura 7:** Análisis de interpolación del paisaje genético, con un tamaño de grilla de 50x50 y un valor ponderado de distancia de  $a=1$ . Los ejes X e Y se corresponden con latitud y longitud, respectivamente, mientras que el eje Z muestra la distancia genética. Picos positivos muestran discontinuidades genéticas o posibles barreras al flujo génico, en contraposición a los picos negativos, ambos se muestran referenciadas con las coordenadas de latitud. A) secuencias del ADN nuclear. B) secuencias del ADN cloroplástico.

De modo similar, los gráficos del análisis de distribución de las diferencias pareadas entre secuencias (*mismatch distribution*; Fig. 10) mostraron distribuciones multimodales, a excepción de Patagonia Sur (Fig. 10D) la cual presentó una distribución coherente con expansión poblacional, que fue sustentada por valores no significativos ( $p= 0,2$ ) de la suma de los desvíos al cuadrado (SSD), no rechazándose entonces la hipótesis nula de crecimiento demográfico (Tabla 3). En contraposición, estos mismos valores de SSD fueron no significativos en el grupo Disyunto ( $p= 0,1$ ), aunque el gráfico resultó multimodal (Fig. 10B; Tabla 3). En el agrupamiento de todos los individuos patagónicos los valores de SSD resultaron no significativos ( $p= 0,3$ ), si bien el gráfico de las diferencias pareadas fue multimodal. De esta forma la población Patagonia Norte fue la única para la cual todas estas pruebas demográficas no mostraron indicios de expansión poblacional. El estudio de los perfiles demográficos bayesianos (BSP) fue llevado a cabo únicamente en Patagonia Sur, ya que fue la población con más indicios de expansión reciente. Se observó en el gráfico (Fig. 11) que este incremento habría comenzado alrededor de los últimos 2 Ma, con un marcado crecimiento en el tamaño poblacional para el último millón de años.

Las pruebas de neutralidad para las secuencias cloroplásticas (Tabla 3), agrupadas de acuerdo a los resultados poblacionales obtenidos en Geneland, arrojaron siempre valores negativos. El índice de  $F_u$  para el grupo de los Extremos de Patagonia fue el único que evidenció valores significativos ( $F_s= -2,54$ ;  $p= 0,006$ ), sin embargo  $D$  lo fue marginalmente ( $D= -1,31$ ;  $p= 0,055$ ). Para el grupo Patagonia Central ambos valores fueron no significativos, así  $F_s= -1,84$  ( $p= 0,088$ ) y  $D= -1,39$  ( $p= 0,07$ ). El grupo Bolivia no fue analizado debido a que estuvo compuesto únicamente por dos haplotipos. Por su parte, cuando se reunió a todos los individuos procedentes de los bosques andino-patagónicos, ambas pruebas resultaron negativas y significativas ( $p < 0,01$ ), con  $F_s= -6,17$  y  $D= -1,95$  (Tabla 3), coherentes con la hipótesis alternativa de expansión demográfica. Los análisis de distribución de las diferencias pareadas entre secuencias (*mismatch distribution*; Fig. 12) fueron en todos los casos coincidentes con el modelo nulo de expansión demográfica, lo cual se corroboró con valores de SSD no significativos ( $p > 0,05$ ) respecto de la hipótesis de estasis poblacional. En línea con ello, los perfiles demográficos bayesianos (BSP; Fig. 13) mostraron expansión demográfica reciente en todos los agrupamientos. El grupo

Bolivia no fue analizado ya que sólo presentó dos haplotipos, lo cual es insuficiente para llevar a cabo el análisis en una población. El grupo de los Extremos de Patagonia (Fig. 13A), comenzó su crecimiento demográfico hace aproximadamente 15 Ma, mientras que la población de Patagonia Central (Fig. 13B) comenzó más recientemente, hace cerca de 10 Ma. El grupo conformado con los individuos de Patagonia (Fig. 13C) fue el de más reciente expansión, hace unos 7 Ma. Sin embargo, en los tres casos, el crecimiento del tamaño efectivo más acelerado se dio en el lapso de los últimos 5 Ma.

**Tiempos de divergencia de los grupos de haplotipos.** La filogenia obtenida para *A. uniflora* y la familia Corsiaceae dentro del orden Liliales (Apéndice IV) reconstruyó con alta fidelidad y buen soporte de nodos en general, la alcanzada por Mennes *et al.* (2015) para monocotiledóneas; sin embargo el clado de Corsiaceae alcanzó un valor de 0,55 de probabilidad posterior bayesiana (BPP) para el soporte del nodo. Este análisis se realizó con la matriz de datos del ADN nuclear, aunque tomando de la región ITS, sólo la porción menos variable (177 pb, que se estima son los correspondientes a la subunidad 5.8S), quedando compuesta entonces la matriz por las secuencias 18S, 5.8S y 26S. Las edades de divergencia entre *Corsia* sp. y *A. uniflora* (46,2 Ma) y la edad de diversificación de *A. uniflora* (4,8 Ma) allí obtenidas fueron las dos fechas utilizadas para datar las edades de divergencia entre los haplotipos de *A. uniflora* (con los fragmentos nucleares completos). Este segundo árbol obtenido (Fig. 14) permitió separar los haplotipos de *A. uniflora* en grupos. La separación entre los géneros *Corsia* y *Arachnitis* fue datada en 42 Ma, mientras que la diversificación de *A. uniflora* habría comenzado 6,8 Ma atrás (Mioceno tardío), momento en el que aparece el linaje N1 presente en Bolivia. Otro clado que mostró buen soporte reúne los haplotipos H2-H5 y H11 (linajes N5 y N6), el cual se diversificó hace 2,5 Ma atrás (Plioceno Tardío), y cuyas últimas divergencias datan de alrededor de 1 Ma (Pleistoceno). El linaje N3 quedó formado hace 2,12 Ma, el linaje N2 hace 1,14 Ma y el linaje N4, 0,86 Ma atrás. Varios de los nodos que condujeron a estas diversificaciones mostraron bajo soporte (BPP < 0.5).

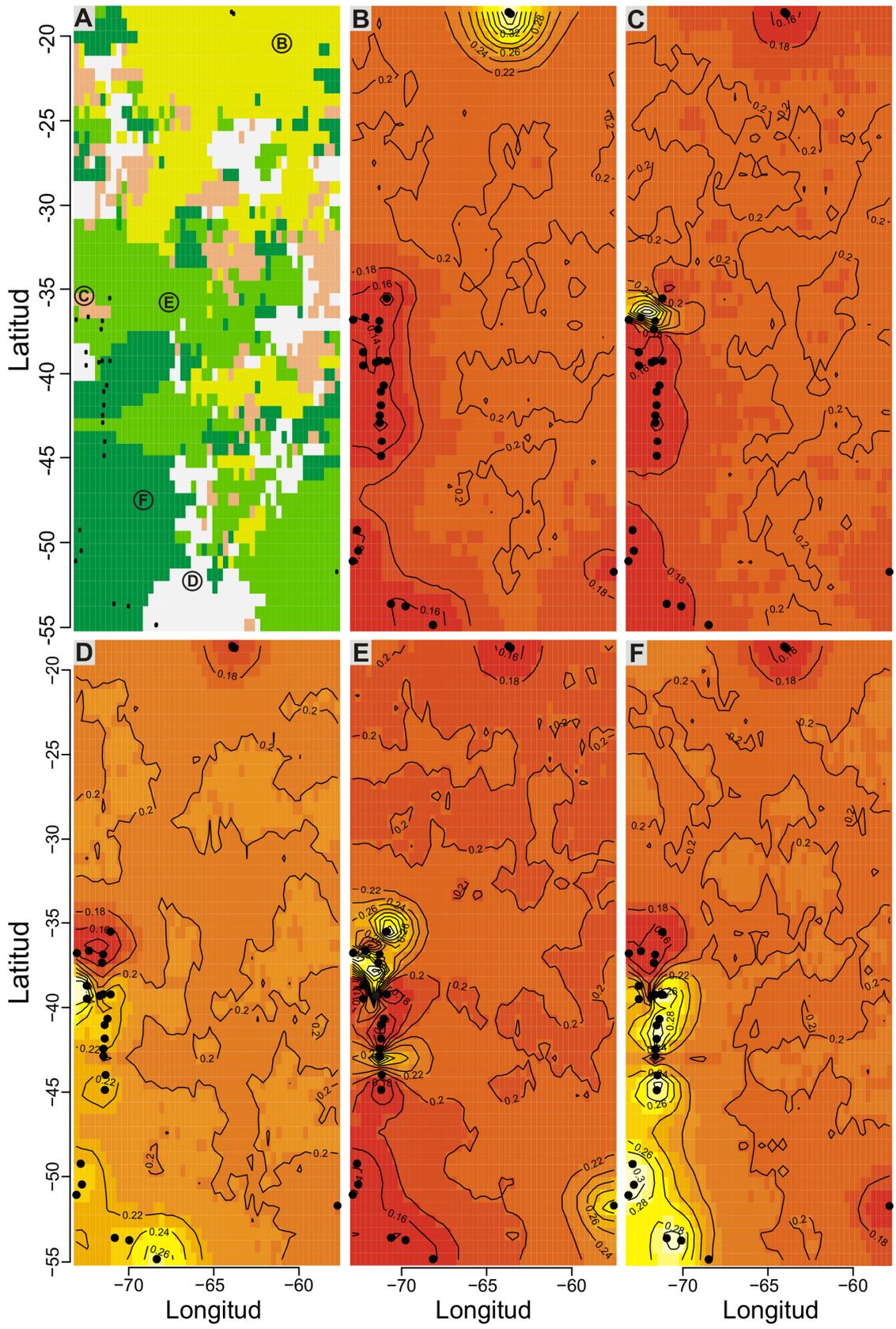
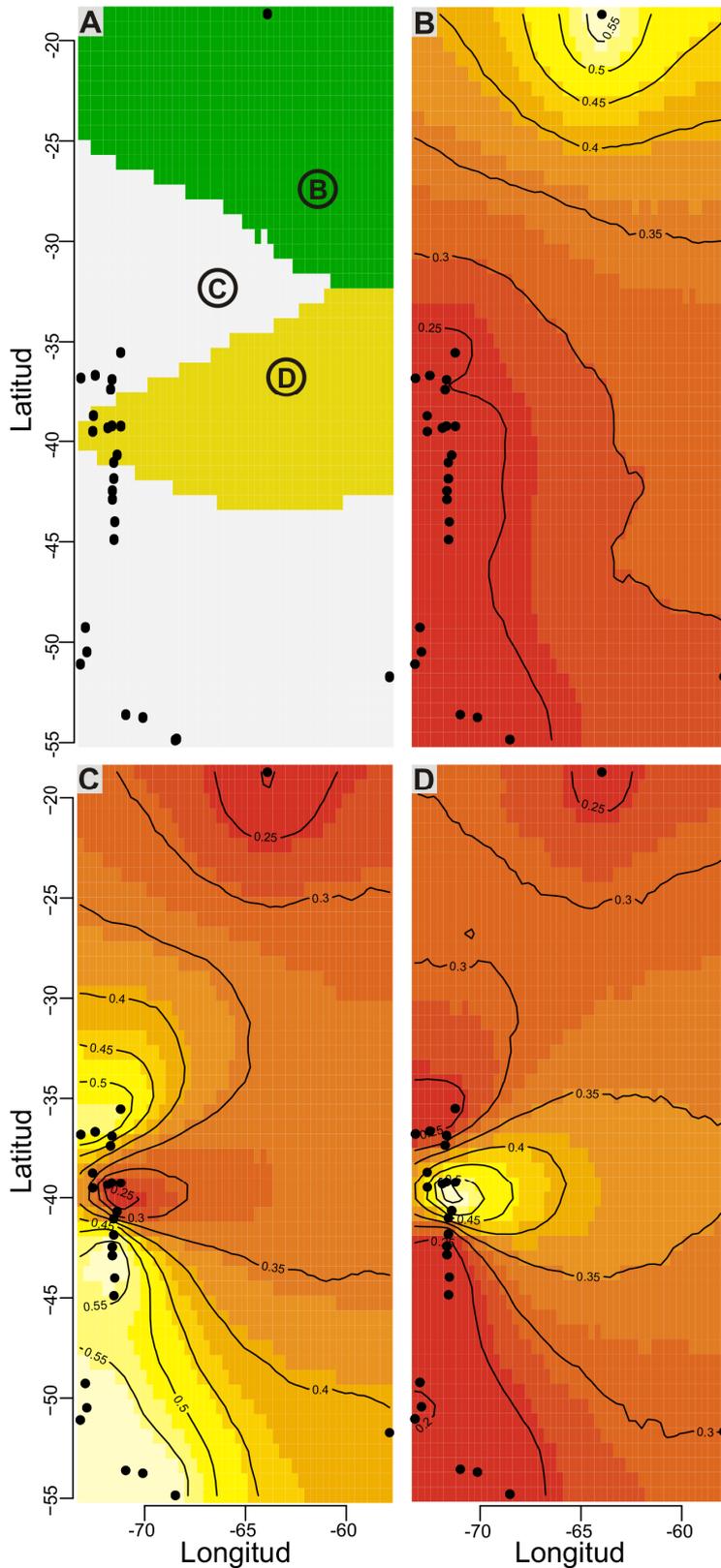


Figura 8: Continúa en la siguiente página.

**Figura 8 (cont.):** Agrupamientos de los sitios muestreados para *A. uniflora*, obtenidos mediante inferencia bayesiana, a partir de las secuencias de origen nuclear. A) Agrupamiento más probable de las localidades, donde cada color indica una población genética diferente y los puntos negros, dichas localidades. B-F) Probabilidades de pertenencia de las distintas localidades (puntos negros) a cada uno de los cinco agrupamientos dados por el programa Geneland, donde el color blanco indica la máxima probabilidad de pertenencia, que decrece hacia el color rojo. Las curvas indican iguales probabilidades de pertenencia de las localidades a cada grupo. B) Grupo Bolivia. C) Grupo Quillón. D) Grupo Disyunto. E) Grupo Patagonia Norte. F) Grupo Patagonia Sur.

La datación del *A. uniflora* a partir de sus secuencias del ADNcp se efectuó partiendo de las edades obtenidas en la filogenia del orden Liliales (Apéndice IV). La filogenia de haplotipos cloroplásticos para *A. uniflora* (Fig. 15) logró distinguir al linaje Cp1 con buen soporte de nodo (BPP= 1), mientras que pueden observarse otros dos linajes, aunque menos sustentados (BPP= 0,27). Se halló como edad de origen para la diversificación de la especie en 34,2 Ma, edad en la que se separan los haplotipos bolivianos (H8-H9; linaje Cp1), al comienzo del Oligoceno. Ambos haplotipos divergieron entre sí, posteriormente, en el Plioceno (4,7 Ma). En este período también se separaron H5-H6 (linaje Cp2; 5 Ma), haplotipos distribuidos en LNE, LLA y LOL, en el centro norte de la distribución patagónica. El resto de los haplotipos no presentaron estructura jerárquica y fueron ubicados en el linaje Cp3.



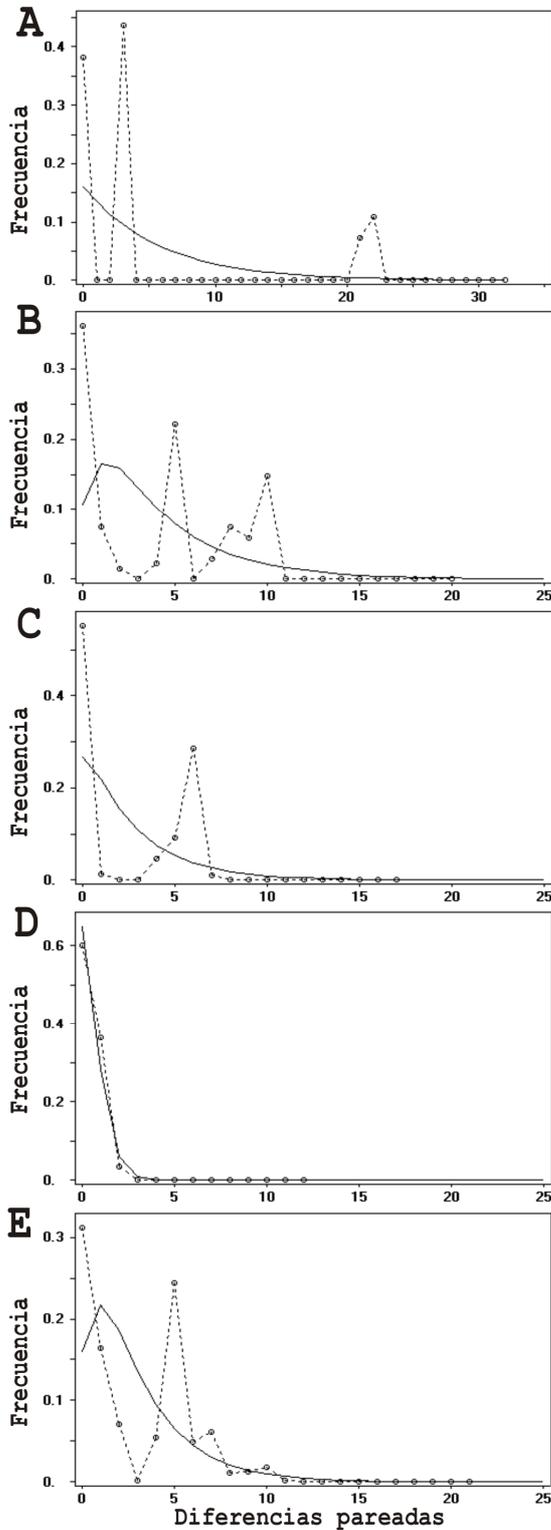
**Figura 9:** Agrupamientos de los sitios muestreados para *A. uniflora*, obtenidos mediante inferencia bayesiana, a partir de las secuencias de origen cloroplástico. A) Agrupamiento más probable de las localidades, donde cada color indica una población genética diferente y los puntos negros, dichas localidades. B-D) Muestran las probabilidades de pertenencia de las distintos sitios (puntos negros) a cada uno de los tres agrupamientos dados por el programa Geneland, donde el color blanco indica la máxima probabilidad de pertenencia, que decrece hacia el color rojo. Las curvas indican iguales probabilidades de pertenencia de las localidades a cada grupo. B) Grupo Bolivia. C) Grupo de los Extremos de Patagonia. D) Grupo Patagonia Central.

**Tabla 3:** Parámetros demográficos (Fs, D y SSD) para las poblaciones propuesta por Geneland, además del agrupamiento de los sitios andino-patagónicos. Se muestran los datos pertenecientes tanto al ADN nuclear como cloroplástico. Entre paréntesis se señala los valores de significancia (p) de cada valor. En **negrita** se muestran los valores que indican expansión reciente del tamaño efectivo poblacional. \* p< 0,05; \*\* p< 0,01.

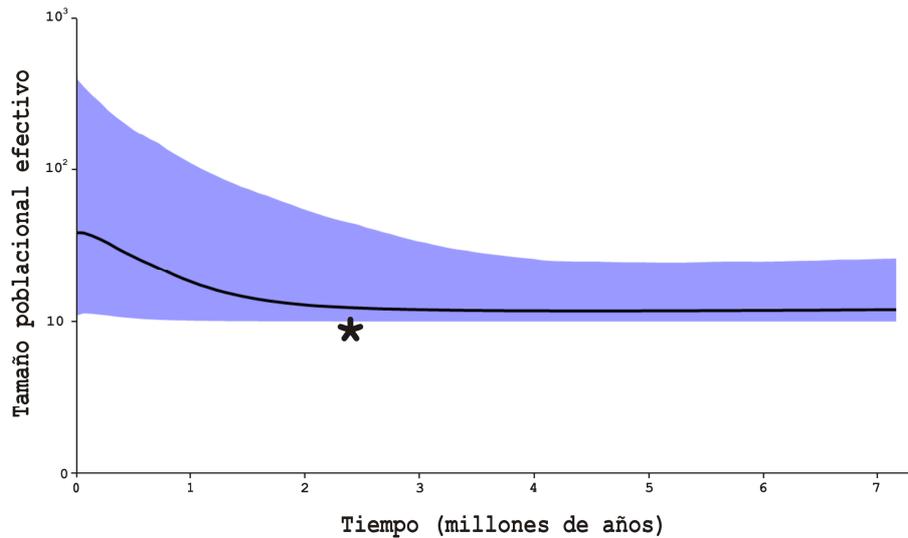
	D	Fs	SSD
Secuencias del ADN nuclear			
G. Bolivia	-1,52269 (0,059)	5,45105 (0,99)	0,20868* (0,04)
G. Quillón	-	-	-
G. Disyunto	0,56956 (0,7)	2,60320 (0,9)	<b>0,10366</b> (0,1)
G. Patagonia Norte	0,32513 (0,7)	2,19729 (0,9)	0,29425** (0,0002)
G. Patagonia Sur	0,06768 (0,6)	-0,95668 (0,3)	<b>0,00526</b> (0,2)
Patagonia	-0,38489 (0,4)	1,05858 (0,7)	<b>0,05439</b> (0,3)
Secuencias del ADN cloroplástico			
G. Bolivia	-	-	-
G. Extremos Patagonia	-1,31515 (0,055)	<b>-2,53934**</b> (0,006)	<b>0,00012</b> (0,3)
G. Patagonia Central	-1,38722 (0,07)	-1,83858 (0,088)	<b>0,00094</b> (0,96)
Patagonia	<b>-1,94945**</b> (0,0037)	<b>-6,17316**</b> (0,0008)	<b>0,00057</b> (0,7)

**Paleoclima Pleistocénico para *A. uniflora*.** El modelado para el último máximo glacial (UMG) ocurrido durante el Pleistoceno (Fig. 16) evidenció que *A. uniflora* podría haber sufrido fragmentación de sus poblaciones patagónicas, alrededor de los 45° S aproximadamente, manteniéndose hacia el sur relictos de sitios habitables; sin embargo se observó también que la especie pudo haber colonizado regiones hoy cubiertas por el mar, más hacia el sur de Tierra del Fuego. El límite Norte de la distribución patagónica habría sido similar al actualmente muestreado, y fue donde se observó mayores probabilidades de existencia de la especie. Por su parte, el paleoclima modelado para Bolivia, habría dado la oportunidad de que *A. uniflora* extienda su rango de distribución hacia el norte, sobre la ladera Este de los Andes, con diferentes espacios de altas probabilidades de ocurrencia, llegando incluso al actual Perú. También habría sido factible su ingreso a Argentina, desde el Norte, por la actual selva de las Yungas, pudiendo hallar sitios aptos incluso en las sierras de Córdoba. Por último, durante la UMG las islas Malvinas fueron un sitio de bajas probabilidades de existencia para *A. uniflora*, aunque habrían presentado una mayor extensión territorial que en la actualidad. Las variables que más contribuyeron al

modelado del paleoclima fueron las precipitaciones de la estación más fría (31,1%), la temperatura del mes más cálido (27%), la precipitación anual (21%) y, en menor medida, las precipitaciones de la estación más seca (8,7%). El resto de los factores influyeron en porcentajes inferiores al 2%.



**Figura 10:** Distribución del número de diferencias mutacionales entre pares de secuencias nucleares para los individuos de *A. uniflora*. A) Para el Grupo Bolivia. B) Para el Grupo Disyunto. C) Para el Grupo Patagonia Norte. D) Para el Grupo Patagonia Sur. E) Para todos los individuos ubicados exclusivamente en Patagonia. Las líneas enteras representan los valores esperados bajo un modelo de expansión demográfica y las líneas punteadas los datos observados.



**Figura 10:** Dinámica poblacional a través de un modelo bayesiano para el grupo genético Patagonia Sur detectado en los análisis de estructuración poblacional con las secuencias del ADN nuclear (ver Fig. 8F). La línea negra representa la mediana en el valor de tamaño efectivo estimado a través del tiempo, cuyo contorno azul representa un intervalo de confianza del 95% de probabilidad posterior (PPB) del tamaño poblacional a lo largo de la historia coalescente. El asterisco (\*) muestra el punto de inflexión estimado para el comienzo del crecimiento poblacional.

#### DISCUSIÓN:

Los niveles de diversidad genética hallados en *A. uniflora* fueron en general bajos, además fue notable la diferencia entre los valores encontrados para el ADN nuclear y cloroplástico. La diversidad a nivel cloroplástico fue muy similar tanto para la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) como para la haplotípica (H) y se observó un brusco descenso a cero a partir de la localidad BAR hacia el sur, mientras que hacia el norte la distribución de la diversidad fue más heterogénea. Por su parte, ambos índices medidos a partir de los datos nucleares difieren notablemente entre sí; con la diversidad nucleotídica comportándose de forma similar a lo observado en el ADNcp, mientras que H presentó valores intermedios y se mantuvo más o menos constante a lo largo de toda la geografía. Existió consenso para ambos tipos de secuencias en la existencia de dos puntos de máxima diversidad: los sitios correspondientes a los bosques de Bolivia y a un sector de la región norte de Chile, coincidente con CNI y alrededores. La diversidad medida a través de ADN nuclear permitió hallar un tercer foco de diversidad, menos aparente que los anteriores, en el extremo austral de la

distribución de *A. uniflora*, en un área que comprende la isla de Tierra del Fuego. En tal sentido, las regresiones lineales, que fueron realizadas con esta misma matriz de secuencias nucleares no evidenciaron un patrón clinal de incremento de la diversidad, por lo cual aquellos sitios de mayor diversidad no estarían mostrando un patrón determinado por su ubicación respecto de la latitud, la longitud y la altitud, sino que la distribución de la diversidad genética podría estar afectada por otros factores, a una menor escala (por ej., suelo y sus componentes, humedad, condicionantes biológicos dados por su acompañante fúngico, entre otros que se desarrollarán en los siguientes capítulos) o incluso estar relacionados con eventos históricos, por ejemplo sitios de alta diversidad genética mantenidos por la formación de refugios glaciarios (Hipótesis de múltiples refugios glaciarios; *sensu* Premoli, 1998).

Los perfiles del paisaje genético mostraron ciertas discrepancias respecto a las regresiones lineales abordadas anteriormente, ya que en vista general reconocen al extremo norte de la distribución patagónica de *A. uniflora* como la zona donde se centraron las mayores disimilitudes genéticas, las cuales más allá de pequeñas excepciones, fueron descendiendo hacia el sur, tornándose más homogéneas. En estos perfiles, los picos positivos o ascendentes son interpretados como la presencia de secuencias muy distantes en términos genéticos y ubicadas muy próximas geográficamente, en contraposición a los negativos o descendentes. De esta forma, los picos positivos pueden entonces interpretarse como barreras al flujo génico, que separan regiones de diferente composición genética. Es evidente el pico a los 39,4° de latitud S, tanto para ADNn como ADNcp, que se correspondió con la localidad de PLP, un área de alta diversidad genética también interpretada como barrera por Sérsic *et al.* (2011) y fijada en a los 40,5° S. En el extremo de la distribución, hacia el Norte de esta barrera, se evidenciaron con las secuencias nucleares otros dos picos de menor intensidad y muy próximos entre sí, que separan en dos a esta región (ambos promedian los 37,5° S; al igual que la barrera propuesta por Sérsic *et al.*, 2011; y de forma similar por Mathiasen y Premoli, 2010). Queda así definido un sector más septentrional, con COR, QUI, HUA, LLE y AAN, y otro principalmente definido para la ladera Oeste de los Andes (LNE) y Depresión Central (CNI y PLP). En ambos perfiles de forma similar, se encontraron picos entre los 44° y 44,4° S, alrededor de las

localidades NIN y FON; siempre al sur de ALE, Sérsic *et al.* (2011) y Mathiasen y Premoli (2010) postularon una barrera a los 43° S. Otros picos, más al sur fueron reportados a los 46,4° y 47,5° S para ADNn y ADNcp, respectivamente, sin embargo un vasto territorio de aproximadamente 500 km sin muestreos (más precisamente entre los 45° y los 49° S) podría estar generando un artefacto del análisis producido por la falta de datos. Si bien no se observaron picos, hacia el final de la distribución austral, el perfil nuclear mostró un alza moderada, mientras que el cloroplástico continuó en descenso; ello sería producto del incremento de la diversidad observada con las secuencias nucleares en Tierra del Fuego (haplotipos exclusivos H4-H5), la cual no se manifestó mediante el ADNcp. Tales comportamientos coincidieron con lo observado en los mapas de distribución de diversidad. Hacia latitudes bien australes, Sérsic *et al.* (2011) hallaron también una barrera, propuesta en coincidencia con el Estrecho de Magallanes.

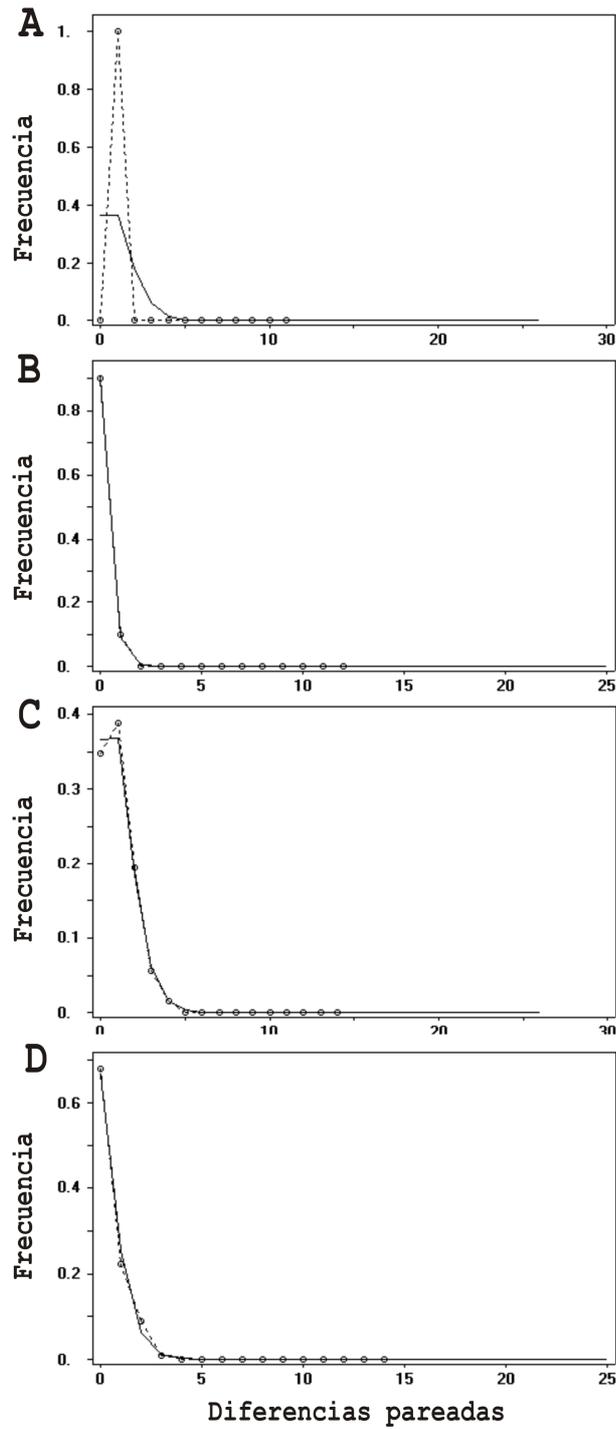
Los tres grandes sectores de alta diversidad genética anteriormente definidos, fueron acompañados de haplotipos exclusivos según los datos del ADN nuclear, mientras que el ADN cloroplástico, reveló sólo dos regiones de alta diversidad coincidentes con las ubicadas más al Norte, ya que la austral resultó monomórfica. Los mapas de distribución geográfica de los haplotipos permitieron analizar más de cerca y en detalle estas tres zonas de alta diversidad y obtener más conclusiones. Bolivia presentó alta diversidad ya que para ambos marcadores, prácticamente todos sus haplotipos son exclusivos; mientras que en el extremo más austral, los sitios que aportan a la alta diversidad genética nuclear encontrada fueron BUL y CAM; esta región fueguina fue propuesta también por Souto *et al.* (2015) como un punto caliente de diversidad para especies arbóreas. Sitios restringidos y con presencia de haplotipos exclusivos son interpretados por Sérsic *et al.* (2011) como refugios glaciarios pleistocénicos. Sobre la base de estos criterios, es interesante observar lo que ocurre en el extremo norte de los bosques andino-patagónicos, zona extensa y diversa en accidentes geográficos, que no debe tomársela como una unidad. Podría, por un lado, delimitarse como refugio el extremo norte de los Andes (entre 35,5° y 37,5° S, aproximadamente), donde se encontró un haplotipo cloroplástico exclusivo en COR y otro en AAN. Mientras que en la cordillera de la Costa (ya propuesto por Sérsic *et al.*, 2011) se observó un sitio con un haplotipo exclusivo mediante el ADN

nuclear (H11 en QUI). También se destacó la Depresión Central de Chile donde se ubicó CNI, con dos haplotipos exclusivos y uno de los más extensamente encontrados (para datos nucleares) y PLP con un haplotipo exclusivo (en cloroplasto). La región comprendida aproximadamente entre los 39° y 40° S de dicha Depresión fue propuesta como refugio por Vergara *et al.* (2014) para *Nothofagus obliqua* (Mirb.) Oerst. y en concordancia con registros palinológicos para esa especie (Villagrán, 1991). Por los flancos de los Andes, del lado Oeste y en la parte media-superior de esta cadena, y en concordancia con Marchelli y Gallo (2006) para *Nothofagus alpina* (Poepp. ex A. DC.) Oerst., entre otros, se localizó LNE presentando dos haplotipos exclusivos nucleares, mientras que el cloroplasto mostró en el mismo sitio un haplotipo exclusivo y dos compartidos, uno de ellos (H5) a escaso rango; además el ADNcp presentó otro sitio de alta diversidad en esta zona (LLA) que comparte el mismo H5, y otro haplotipo exclusivo. En el flanco Este de la cordillera, RCH presentó un haplotipo exclusivo (datos del ADN cloroplástico) y LOL fue el tercer y último sitio en presentar H5. Esta región que rodea los 40° de latitud sur, también coincide con un punto de alta diversidad postulado por Souto *et al.* (2015).

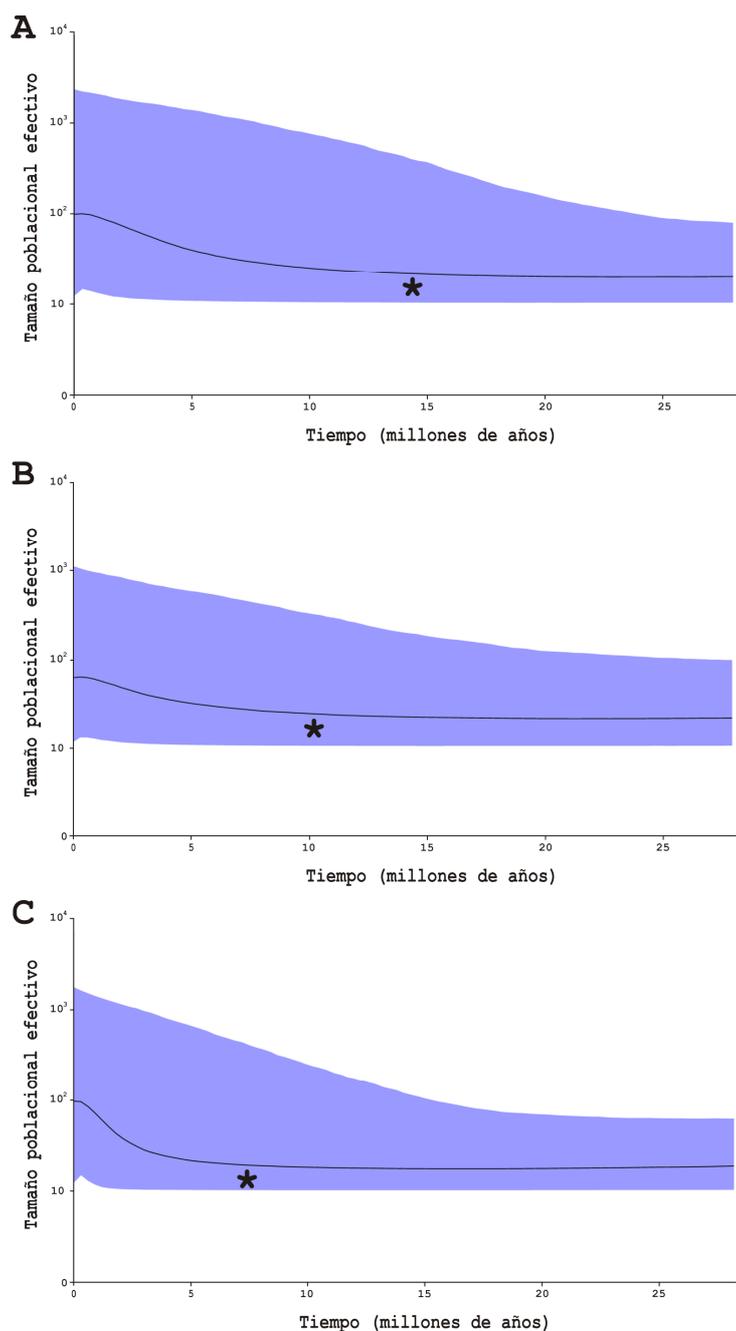
Los cinco rearrreglos poblacionales obtenidos desde una perspectiva bayesiana a través de Geneland para los datos del ADN nuclear mostraron bajos valores de probabilidad posterior (BPP) en los agrupamientos alcanzados, lo que estaría asociado con la amplia distribución de haplotipos comunes y escasos sitios que comparten haplotipos más raros. En primer lugar, se agruparon ambas localidades de los bosques andinos de Bolivia en el llamado Grupo Bolivia, caracterizado por la proximidad genética y geográfica de sus integrantes. En segundo lugar, quedó conformado el Grupo Quillón, cuyos siete integrantes (todos pertenecientes a QUI) presentaron el mismo haplotipo exclusivo (H11) para dicha localidad, dejando en evidencia un fuerte aislamiento genético de la población, sin que diste considerablemente del resto, en términos geográficos. Otra de las poblaciones genéticas conformadas reunió en el Grupo Disyunto a individuos de dos regiones muy distantes, la Depresión Central de Chile (CNI y PLP), hacia el Norte de la distribución patagónica, junto con Tierra del Fuego (RED y TDF); ambas áreas tuvieron en común la presencia de individuos representados por H1-H2. Aunque ningún individuo de CNI presentó H1, pudo observarse que el análisis bayesiano realizó una interpretación de

H6-H7 como haplotipos derivados de éste, aunque están separados por varios pasos mutacionales intermedios. Es notable que ALE, a distancias intermedias entre ambos focos del agrupamiento, y poseyendo ambos haplotipos en cuestión, no fuera parte del agrupamiento. Sí en cambio, esta localidad integró la población de Patagonia Norte, compuesta mayoritariamente por individuos que presentaron H1 (como es el caso de ALE), y donde también estuvo contenido IMA. Aquí es interesante la presencia de LNE, afirmando también la similitud de sus haplotipos H8-H9 con H1, más allá de los pasos mutacionales que los separan. El último grupo genético es el más homogéneo y el que más compatibiliza con la distribución haplotípica de la Fig. 3, e integra dentro del Grupo Patagonia Sur a las localidades que evidenciaron H2-H3, además de NIN, que sólo contuvo H2. Aunque con ciertas excepciones, es notable que las poblaciones Patagonia Norte y Sur agruparon diferencialmente a sitios chilenos y argentinos, respectivamente. De esta forma, podría extenderse la generalización a que H1 es principalmente distribuido por el flanco Oeste de la cordillera y H2 y H3 por el Este, al menos en la parte Norte, donde esta cadena tiene mayor altura.

Las poblaciones genéticas conformadas mediante el ADNcp fueron tres. El criterio bayesiano de Geneland separó al grupo Patagonia Central por la presencia de H5 junto con otros sitios muy cercanos geográficamente que presentaron algunos niveles de diversidad. Desde esta perspectiva, se hubiera podido suponer que CNI (que presentó exclusivamente H2) perteneciera al Grupo Extremos de Patagonia; sin embargo este arreglo fue coherente con el quiebre genético observado en el perfil del paisaje genético. El Grupo Extremos de Patagonia, por su parte reunió el resto de los individuos con H2 únicamente (incluido IMA) más otros dos sitios (AAN y COR) con representantes de otros haplotipos; bajo este criterio, se hubiera esperado que RCH, por contener alta proporción de individuos con H2, perteneciese a esta población. Es interesante que la separación entre el Grupo Patagonia Central y la parte Norte del Grupo Extremos de Patagonia coincida con la barrera de los 37,5° S propuestas también por Sérsic *et al.* (2011) y Mathiasen y Premoli (2010); todo ello le concede más importancia a este quiebre. Por último, y de igual modo que lo sucedido con las secuencias nucleares, los individuos bolivianos conformaron el grupo genético del Grupo Bolivia.



**Figura 12:** Distribución del número de diferencias mutacionales entre pares de secuencias cloroplásticas para los individuos de *A. uniflora*. A) Para el Grupo Bolivia. B) Para el Grupo Extremos de Patagonia. C) Para el Grupo Patagonia Central. D) Para todos los individuos ubicados exclusivamente en Patagonia. Las líneas enteras representan los valores esperados bajo un modelo de expansión demográfica y las líneas punteadas los datos observados.



**Figura 13:** Dinámica poblacional a través de un modelo bayesiano para los grupos genéticos detectados en los análisis de estructuración poblacional efectuados con las secuencias del ADN cloroplástico (ver Fig. 9). A) para el grupo de los Extremos de Patagonia. B) grupo Patagonia Central. C) grupo conformado con los individuos de Patagonia, exclusivamente (no obtenido en el análisis de estructuración poblacional). Las líneas negras representan la mediana en el valor de tamaño efectivo estimado a través del tiempo, cuyos contornos azules representan un intervalo de confianza del 95% de probabilidad posterior (PPB) del tamaño poblacional a lo largo de la historia coalescente. El asterisco (\*) muestra el punto de inflexión estimado para el comienzo del crecimiento poblacional.

## **Aspectos biogeográficos y evolutivos de *A. uniflora*. Genealogía y edades de divergencia de sus haplotipos.**

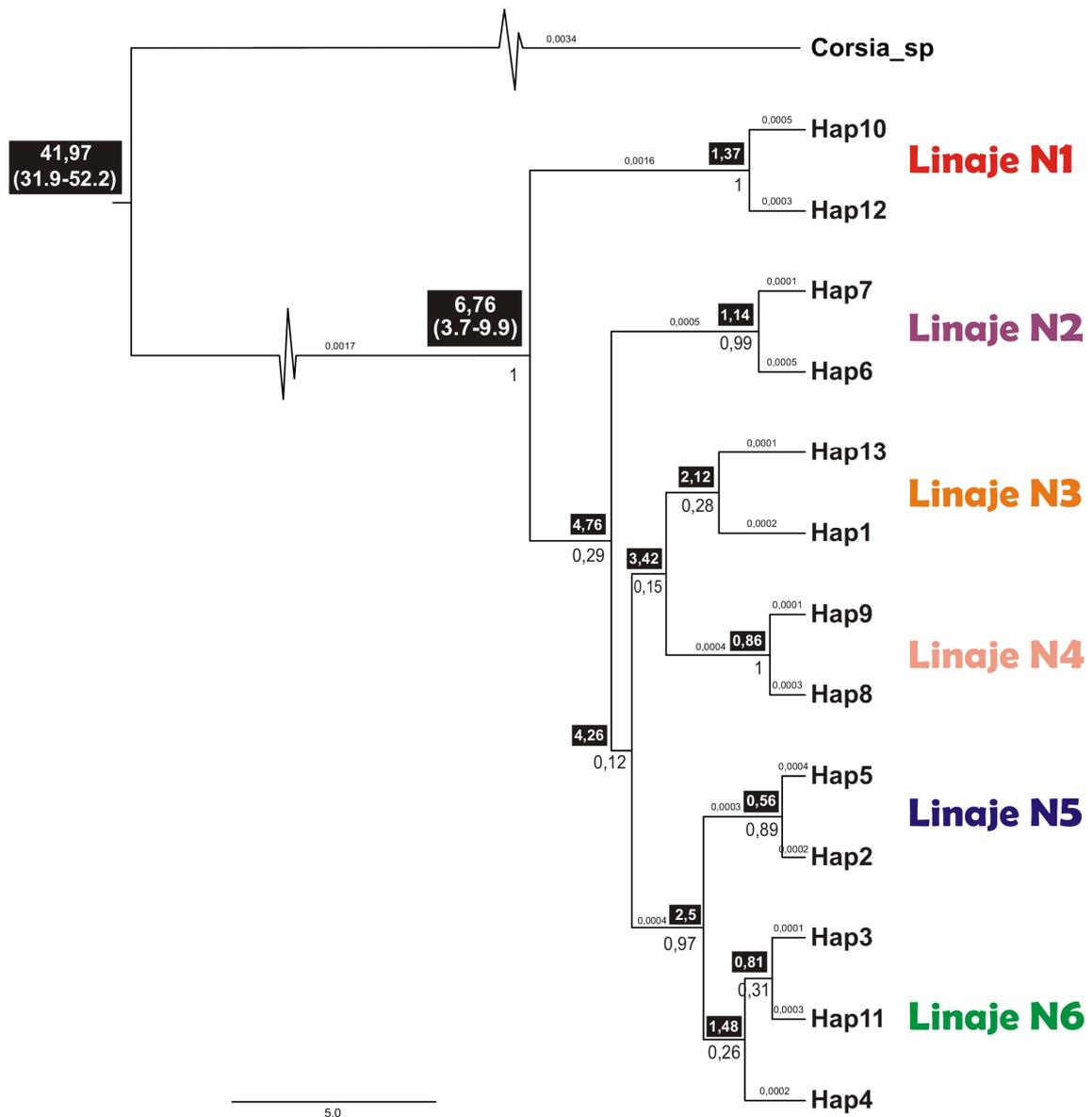
### *ADN nuclear*

La forma de la red obtenida a partir del ADN nuclear y la distribución geográfica de sus haplotipos permitieron encontrar tres principales grupos de haplotipos, relacionados con H1, H2 y H3, que aparecieron en diferentes momentos de la historia evolutiva (entre 6,8-2,5 Ma) y que actualmente constituyen los tres haplotipos con el mayor rango de distribución. Uno de estos grupos, y el más intermedio en la red correspondió a H3 y sus dos derivados H4 y H11, ambos de baja frecuencia y ocupando el Sur y el Norte de la distribución, respectivamente. Otro de los grupos de haplotipos lo conformó H2 y su derivado H5, este último ocupando apenas una localidad en Tierra del Fuego. El último grupo es el que contuvo el mayor número de haplotipos, donde H1, si bien fue externo en la configuración de la red, se encontró distribuido de extremo a extremo de los bosques andino-patagónicos (y en Islas Malvinas) y se vinculó estrechamente con H13; este último si bien es un único haplotipo hallado en Bolivia, estuvo situado más central en la red. Durante la divergencia entre Bolivia y el resto de la distribución de *A. uniflora*, datada en 6,8 Ma (Mioceno Tardío), dicho H13 habría estado entre los pioneros de aquellas bajas latitudes, dando origen posteriormente a H10 y H12. En Patagonia, por el contrario, H13 se presumiría actualmente extinto, aunque estuvo estrechamente vinculado a varios linajes de esta región y a los que habría dado origen: H1, H3, H7 y H9. Es notable que si bien H13 se encontró separado por dos mutaciones tanto de H1 como de H3, los análisis bayesianos de estructuración genética (Fig. 7) encontraron mayor afinidad de H13 con H1, que con H3.

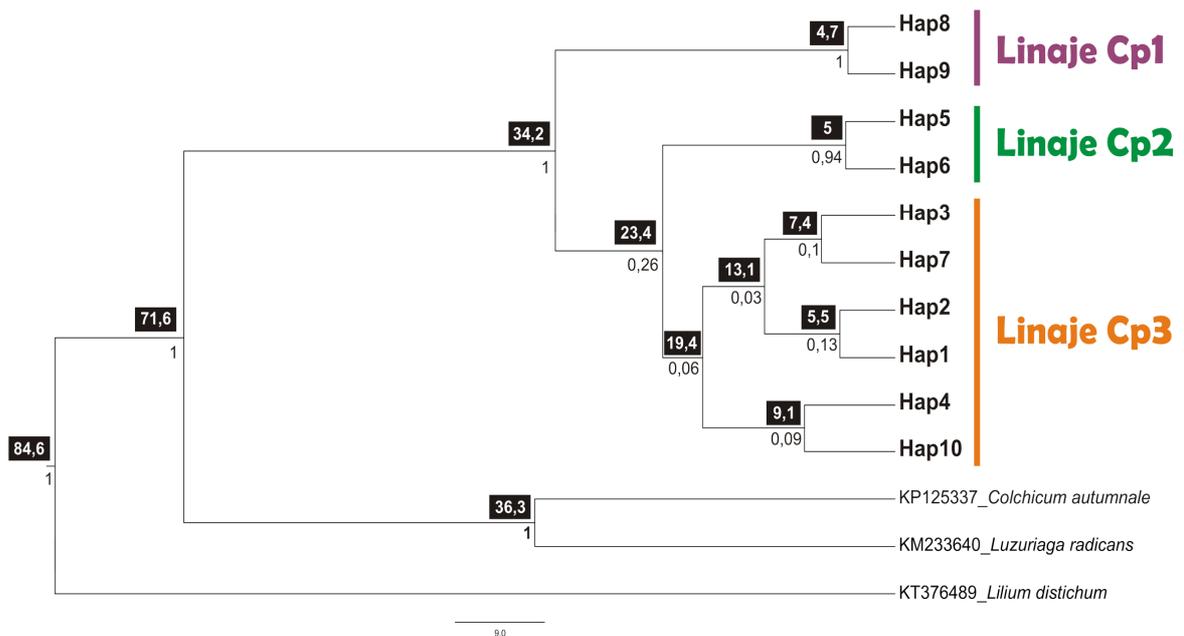
La aparición de los haplotipos nucleares más recientes tuvo lugar alrededor del último millón de años, los cuales cohabitan con otros de cerca de 7-5 Ma, evidenciando la no ocurrencia de eventos drásticos que produjeran cuellos de botella demográficos muy marcados, permitiendo la convivencia de estos tres grandes grupos (relacionados con H1, H2 y H3) de haplotipos que cubren casi con totalidad el rango de distribución de *A. uniflora*. Algo similar arrojaron las pruebas de neutralidad (con valores por lo general positivos y nunca significativos) y el análisis de

distribución de las frecuencias pareadas entre individuos (menos evidente, ya que en la mayoría de los grupos no se rechaza la hipótesis nula de crecimiento poblacional); sin embargo, el conjunto de los análisis demográficos condujeron a la idea de no existencia de cambios drásticos recientes en el tamaño poblacional efectivo de las poblaciones analizadas (Tabla 3). Además ello quedó reflejado en una muy baja frecuencia de mutaciones, que estuvieron muy localizadas geográficamente (como aquellas que conforman los haplotipos H4-H9) y una alta frecuencia de mutaciones comunes a múltiples sitios (secuencias que integran los haplotipos H1-H3) ampliamente distribuidos. La expansión demográfica evidenciada para Patagonia Sur, y cuya aceleración ocurrió en el último millón de años fue coincidente con la aparición de los haplotipos más recientes en BUL y CAM; e incluso podría estar asociado a la recolonización de áreas ocupadas por los hielos durante la Máxima Glaciación Patagónica (MGP) acontecida en el Pleistoceno.

Desafortunadamente, la escasez de individuos obtenidos de las Islas Malvinas no permitió tener un buen registro de la diversidad genética de la especie en este sitio. La única secuencia perteneció al haplotipo más común, como se observó en la red de haplotipos. Tales hechos imposibilitan conocer con precisión la fecha en la cual la barrera marítima condujo a la separación definitiva de los ambientes. Existen pocas evidencias de conexiones (desde la configuración continental más o menos actual) entre las islas Malvinas y Sudamérica, aunque esto habría ocurrido en sucesivos eventos glaciarios, cuando el nivel del mar bajó a niveles inferiores a 150 m, respecto del nivel actual (Coronato *et al.*, 2008). La primera glaciación del Cenozoico registrada para Patagonia fue durante el Mioceno tardío - Plioceno temprano (11-3 Ma), época que coincide con el episodio de levantamiento de los Andes conocido como fase Quechua. Ambos hechos (levantamiento y glaciaciones) favorecieron la retirada de las aguas continentales (conocida como Edad de las Planicies Australes; Pascual y Bondesio, 1982), pudiendo permitir la conformación de un puente entre el archipiélago y el continente por el cual *A. uniflora* podría haberse desplazado. Esta fecha representó la primera posibilidad que habría existido para la especie de colonizar las islas, dada la edad datada de su origen. Las curvas eustáticas de Haq *et al.* (1987) registraron, además, una muy considerable baja de los niveles del mar hace unos 5 Ma atrás, también durante el Mioceno-Plioceno.



**Figura 14:** Árbol de inferencia bayesiana construido a partir de secuencias de ADN nuclear de *A. uniflora* y con *Corsia* sp. como grupo externo (número de acceso a GenBank en Apéndice II). En cada nodo se muestra el valor del soporte (probabilidad posterior bayesiana; BPP) en la parte inferior y la edad de divergencia del mismo (en Ma) en cajas negras sobre el nodo. Se señalan los principales linajes obtenidos (N1-N6) cuyos patrones de color guardan relación con la red haplotípica de la Fig. 3.



**Figura 15:** Árbol de inferencia bayesiana construido a partir de secuencias de ADN cloroplástico de *A. uniflora* y con *Lilium disticum*, *Luzuriaga radicans* y *Colchicum autumnale* como grupos externos (números de acceso a GenBank en Apéndice II). En cada nodo se muestra el valor del soporte (probabilidad posterior bayesiana; BPP) en la parte inferior y la edad de divergencia del mismo (en Ma) en cajas negras sobre el nodo. Se señalan los principales linajes obtenidos (N1-N3) cuyos patrones de color guardan relación con la red haplotípica de la Fig. 4.

Como consecuencia de la intensificación de la sombra de lluvia en la fase Quechua, que condujo a condiciones extremadamente xerofíticas hasta la conformación de la Diagonal Árida, las poblaciones de *A. uniflora* comenzaron a divergir paulatinamente en esta zona, hasta perder el contacto definitivo hace 6,76 Ma entre los sectores bolivianos y los andino-patagónicos, tal como datan las edades de divergencias de los haplotipos bolivianos H10 y H12, respecto del resto. Los individuos de *A. uniflora* que quedaron hacia el lado boliviano de la Diagonal Árida, habrían pertenecido a H13 o a un haplotipo precursor de éste que luego dio origen a los otros dos haplotipos hallados allí (H10 y H12). En Patagonia, por otro lado, más allá de que actualmente H13 estaría extinto, persistió allí hasta dar origen a sus haplotipos derivados. El primero en diferenciarse habría sido H7, un haplotipo exclusivo de CNI, hace 4,76 Ma. Si bien este nodo no estuvo soportado por BPP, la evidencia sedimentológica da cuenta de introgresiones marinas durante el Plioceno

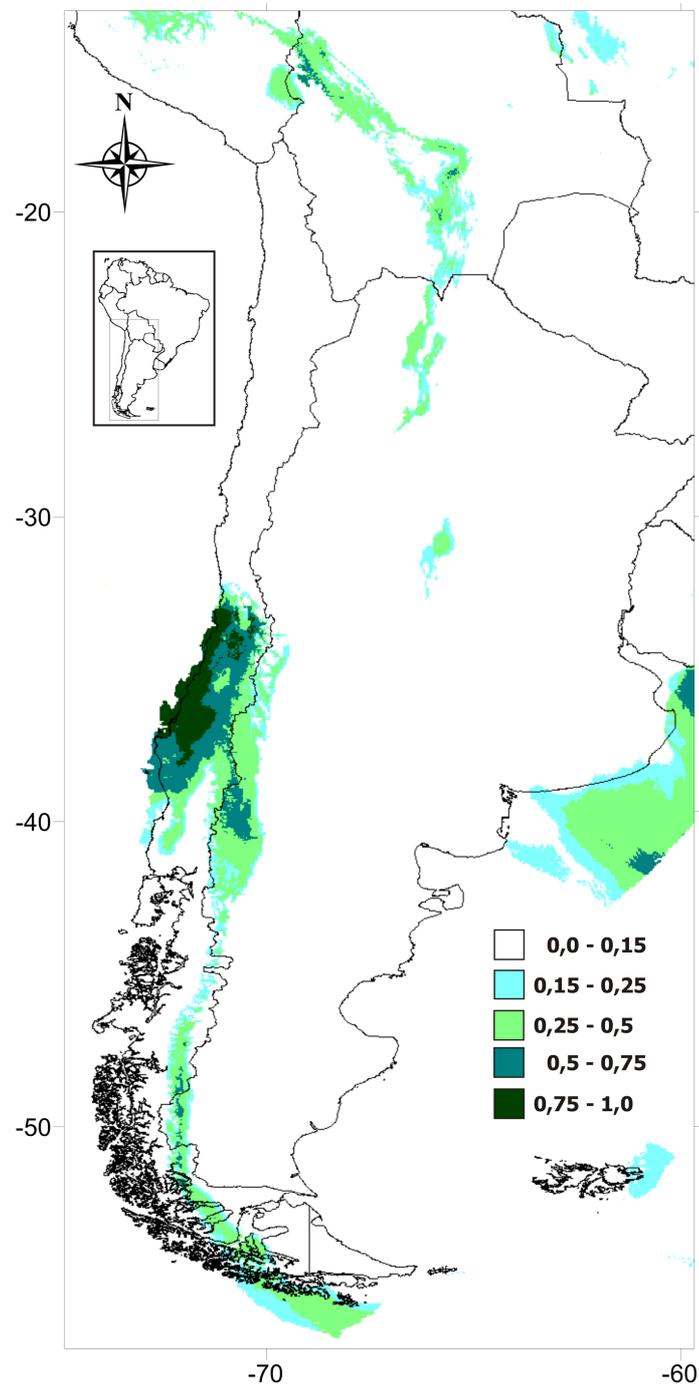
(Encinas *et al.*, 2007; Finger *et al.*, 2007) para la Depresión Central chilena (donde se sitúa CNI) actuando como barrera muy fuerte y persistente a la dispersión, reflejada en los cinco pasos mutacionales que separan a H7 de H13.

Durante el Plioceno (hace 4,26 Ma) se habría producido además la separación de los haplotipos que luego dieron origen a los linajes N5 y N6 por un lado, y los linajes N3 y N4 por el otro. Algo más tarde (3,42 Ma) se dio origen al clado actualmente exclusivo de LNE (Linaje N4), y cuya diferenciación genética respecto del resto de los haplotipos de la red, hace suponer un largo tiempo de aislamiento.

Los demás haplotipos, distribuidos en la actualidad por todo el eje andino-patagónico, fueron también originados en una nueva etapa de levantamiento de la cordillera, conocida como fase Diaguita (cerca de 3 Ma). Es posible que este evento haya posibilitado un incremento de hábitats disponibles para *A. uniflora*, que actuaron a modo de corredor, promoviendo procesos de dispersión (Linder, 2008). Concomitante a este levantamiento, y producto de la intensificación de la corriente circumantártica, ocurrió un nuevo evento de enfriamiento que condujo a la Máxima Glaciación Patagónica (MGP), con su pico más alto hace 2,3 Ma (Mörner y Sylwan, 1989); dicho suceso promovió procesos de vicarianza, separando geográficamente el norte del sur de la ocupación andino-patagónica de *A. uniflora*. De esta forma, es probable que la diversificación y distribución de H2 y H3 se hayan visto influidos primero por dicho corredor andino y más recientemente por las barreras impuestas por los hielos, que habrían favorecido el desarrollo de refugios periglaciarios sobre las laderas de los Andes, como ha sido documentado por Sérsic *et al.* (2011) y Souto *et al.* (2015), y los trabajos allí citados.

También en el Pleistoceno, se habría originado el H1 hace unos 2 Ma como consecuencia del inicio de la MGP. Sin embargo los resultados permiten suponer que su origen habría ocurrido con anterioridad, dado que, por la intensidad de esta glaciación, el haplotipo (ya conformado) habría sufrido una disyunción, persistiendo en refugios *in situ* en el extremo sur, al tiempo que migró hacia latitudes más septentrionales, a medida que se intensificaron las glaciaciones, quedando allí separado en áreas disyuntas por la barrera de hielo. La designación de Tierra del

Fuego como refugio pleistocénico es también sostenida por otros autores, como Jakob *et al.* (2009), Tremetsberger *et al.* (2009) y Souto *et al.* (2015).



**Figura 16:** Distribución potencial de *A. uniflora* bajo el escenario climático del último máximo Glaciar (UMG) ocurrido durante el Pleistoceno, obtenida mediante modelado de nicho ecológico. Las referencias, y sus colores asociados, indican la probabilidad de persistencia de la especie en el sitio.

Las últimas divergencias de haplotipos dataron de comienzos del Pleistoceno, todas cerca de un millón de años atrás, y como consecuencia de los sucesivos ciclos de contracción-retracción de los hielos que se continuaron sobre los bosques andino-patagónicos (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006) con resultados similares a los expresados para MGP. La aparición de estos haplotipos más recientes de *A. uniflora* coincidieron con los sitios previamente postulados como refugios glaciarios, esbozados de acuerdo a la topología de la red de haplotipos y su distribución geográfica.

Durante el Pleistoceno, en la cordillera de la Costa (QUI) surgió el haplotipo exclusivo H11 a partir de H3, último haplotipo en divergir del linaje N6. En la Depresión Central de Chile, donde se ubica CNI, se originó H6, exclusivo de la población y perteneciente al linaje N2. En el flanco Oeste de los Andes, sobre la parte media-superior del mismo, H9 dio lugar H8, exclusivos de LNE, que conforman el linaje N4. Es curioso que en el flanco Este de la Cordillera, ALE, más allá de no poseer haplotipos exclusivos, haya conservado a H1 que, si bien fue el más ampliamente distribuido, se presentó allí aislado de los demás sitios donde fue encontrado (ambos extremos patagónicos); se postula así, como otro sitio de refugio *in situ*, como consecuencia de las glaciaciones pleistocénicas. Algo similar ocurrió en PLP (en la Depresión Central chilena) con el mismo H1. Por su parte, en el extremo sur de la distribución de *A. uniflora*, en CAM se originó el haplotipo exclusivo H5, divergido de H2 (linaje N5); mientras que en BUL, en este mismo período se formó el haplotipo único H4, perteneciente al linaje N6.

De forma complementaria, el modelado predictivo del nicho ecológico (MNE) indicó una retracción del rango de distribución de la especie hacia el extremo norte, durante el UMG. Si bien este modelado reúne la información climática de hace 20-18 ka, y las últimas divergencias de haplotipos para *A. uniflora* dataron en unos 600 ka, los diferentes ciclos de glaciación/deglaciación ocurridos durante el Pleistoceno produjeron en general similares resultados, como indican Ortiz-Jaureguizar y Cladera (2006), entre otros. De esta forma, existieron altas probabilidades de que *A. uniflora* conservara su hábitat entre los 34° y 40° S, por la cordillera de la Costa y la Depresión Central de Chile, e incluso con mayores probabilidades al norte de Concepción, también sobre la cordillera de la Costa. Además, en el extremo sur el modelado

mostró con alta-media probabilidad la persistencia *in situ* de *A. uniflora*. La retracción de la línea de costa durante las glaciaciones pleistocénicas fue reportado por numerosos autores (por ej. Rabassa *et al.*, 2005; 2011; Ponce *et al.*, 2011) y aquí se evidenció que *A. uniflora* podría haber conservado un vasto territorio hacia el sur de la actual isla de Tierra del Fuego, en zonas de tierras altas desprovistas de agua durante ese período glaciario.

Es interesante observar que el sector de los bosques andino-patagónicos entre estos dos polos de refugios glaciarios, esto es hacia el sur de RCH y hasta el final de la extensión continental patagónica (39,2°-52,5° S) se ubican los sitios agrupados en el Grupo Patagonia Sur (según Geneland), la única población genética que evidenció expansión demográfica reciente y conformada por los haplotipos H2 y H3. El perfil demográfico bayesiano para ésta mostró un acelerado incremento de su tamaño efectivo desde los últimos 2-1,5 Ma que se mantuvo hasta casi el presente, probablemente acompañando la retracción de los hielos en todo ese sector de los Andes de la Patagonia argentina, principalmente.

Bolivia, aunque alejada de los hielos que cubrieron Patagonia, presentó la última diversificación de sus haplotipos también durante el Pleistoceno (hace 1,37 Ma). La altura de los Andes en esta región fue suficiente como para sobrellevar también glaciaciones en el Plioceno tardío y Pleistoceno (entre 3,27 y 2,2 Ma; Clapperton, 1979; Thouveny y Servant, 1989), y hasta el Holoceno temprano, hace unos 10 ka (Zech *et al.*, 2007). En sectores cercanos a VAG y PPG la línea de glaciares habría descendido unos 1400 m respecto a los niveles actuales (que rondan los 5100 m; Mark *et al.*, 2005), según numerosos autores (por ej. Seltzer, 1992; Clayton y Clapperton, 1997; Kull y Grosjean, 2000; Ammann *et al.*, 2001; Mark *et al.*, 2005). Así, estas poblaciones de *A. uniflora*, situadas a los 2300 m podrían haberse mantenido *in situ*, donde incluso la humedad se habría mantenido casi invariable, más allá del considerable descenso de la temperatura (Kull *et al.*, 2008). Ambas variables ambientales fueron las de mayor peso en el MNE, el cual registró una elongada distribución para *A. uniflora* en Bolivia, con probabilidades de subsistencia hacia latitudes más bajas, por el flanco Este de los Andes, llegando incluso a Perú.

En las islas Malvinas, el MNE para el UMG evidenció con baja probabilidad la persistencia *in situ* de *A. uniflora*, estimando entonces que la especie podría haber quedado confinada a un sector muy reducido, tal como ocurriría en la actualidad (aunque no existen datos poblacionales claros). Esta observación radica en que la última conexión de las islas Malvinas con el continente habría sido en el período entre las dos glaciaciones de hace 460 ka y la de 350 ka (Ortiz-Jaureguizar y Cladera, 2006), tiempo desde el cual la especie habría suspendido el flujo génico con el continente.

La existencia andino-patagónica de haplotipos de diferentes edades, sumado a que algunos de los más antiguos aún se presentan ampliamente distribuidos y en alta frecuencia, además de que la mayoría de ellos están separados por pocas mutaciones, podría suponer que los tiempos de aislamiento en refugios fueron relativamente cortos. Por otro lado, la alta diversidad encontrada hacia el norte de la distribución habría sido producto del desplazamiento de la especie hacia latitudes septentrionales, por acción del hielo con el límite que le confería la diagonal árida. Esto pudo constatararse en la paleodistribución de la especie en el UMG, como ya fue indicado. Ello, sin dejar de lado los eventos orográficos y de introgresiones marinas, también causantes de formación/extinción de los grandes grupos de haplotipos en los períodos previos a las glaciaciones, como datan muchas edades de divergencia para *A. uniflora*.

#### *ADN cloroplástico*

La historia evolutiva que describió el ADN cloroplástico es muy distinta a la perspectiva propuesta por las secuencias nucleares. Su red de haplotipos presentó la típica forma de estrella, indicando una expansión demográfica reciente y donde claramente se distinguió a H2 como central y por tanto, el más ancestral. Ello fue soportado con las pruebas de neutralidad (valores siempre negativos que indican crecimiento poblacional, aunque no siempre sean significativos) y el análisis de distribución de las frecuencias pareadas entre individuos (valores que nunca rechazan la hipótesis nula de expansión demográfica), que en todos los agrupamientos llevados a cabo se evidenció un incremento en el tamaño efectivo poblacional, más allá de que no siempre fueran significativos. Se presentaron inequívocos los perfiles demográficos bayesianos (BSP) en hallar señales de

expansión para las dos poblaciones genéticas estudiadas, así como también en el agrupamiento de todos los individuos patagónicos. Las edades obtenidas para el comienzo más acelerado de la expansión poblacional rondaron en los 5 Ma de antigüedad, edad que coincide con la que se estimó para el comienzo de la diversificación de los haplotipos nucleares de *A. uniflora*. Sin embargo, las edades de divergencia obtenidas con el ADNcp difieren mucho de las analizadas hasta el momento, mostrando una historia evolutiva diferente, desde este punto de vista. El comienzo de la diversificación de los haplotipos cloroplásticos tuvo lugar en el Eoceno tardío, unos 34,2 Ma atrás, cuando se separaron aquellos exclusivos de Bolivia de los restantes. En este período, entre 37-25 Ma, fue cuando se intensificó la etapa de levantamiento de los Andes con la formación del oroclinal boliviano, que fue una fuerte compresión y doblamiento de los entonces jóvenes Andes centrales (O'Driscoll *et al.*, 2012), y que se corresponde con la fase Inca del levantamiento de la cordillera (Pascual *et al.*, 1996; 2002; Zachos *et al.*, 2001).

El resto de los haplotipos comenzaron a diversificarse hace entre 23-19 Ma (nodos no soportados por valores de BPP), época en la que existían barreras marinas y lacustres entre los 41° y 43° S (cuenca de Ñirihuau, hacia el sur del lago Nahuel Huapi), las cuales perduraron en el lapso ocurrido hace 23-16 Ma atrás (Bechis *et al.*, 2014). Esta barrera es considerada por Premoli *et al.* (2012) como la mayor separación latitudinal para los bosques de *Nothofagus* y podría explicar disyunciones para muchas especies de plantas (Acosta *et al.*, 2014). Es notable que esta barrera cedió hace 16 Ma, no obstante el tiempo transcurrido, hacia el sur de ésta todas las localidades son monomórficas para H2.

Hacia el Norte de la barrera marina de los 41° y 43° S, el linaje Cp2 fue el primero en diferenciarse de H2 (y dada la configuración de la red de la Fig. 4, H5 habría sido el primero de este linaje) y ello ocurrió hace unos 23 Ma, probablemente ligado a tierras altas que sirvieron de islas en medio de esta cuenca inundada. El linaje Cp2 actualmente se circunscribe a LLA, LOL y LNE. El resto de las divergencias de haplotipos presentaron edades de separación bastante homogéneas, alrededor de 9-5 Ma. Por lo tanto, y sobre la base de la hipótesis de archipiélago (Premoli *et al.*, 2012), donde transgresiones marinas y cuencas internas aislaron pequeñas y múltiples áreas emergidas, podría explicarse la diversidad de haplotipos que existió en esta región.

Producto de la fase Quechua del levantamiento de los Andes, que devino en la edad de las planicies sudamericanas, el mar fue cediendo lugar a la tierra firme durante el Mioceno medio a tardío, uniendo nuevamente estos islotes; pero una vez más, es de notar que luego del cese de las barreras marítimas, la dispersión de los haplotipos fue baja.

Las edades de las últimas divergencias entre los haplotipos cloroplásticos fueron coincidentes con el aceleramiento en las tasas de crecimiento poblacional, expresado en los perfiles demográficos (BSP) y ambos eventos ocurrieron hace aproximadamente 5 Ma. Esta edad, que se remonta al Plioceno, es relativamente antigua y podría reflejar, en realidad, una baja tasa mutacional para el ADNcp estudiado aquí para *A. uniflora*.

### *Contraste de evidencias nucleares y cloroplásticas*

Resultó diferente la historia evolutiva, de acuerdo a la procedencia del ADN en estudio, presentándose muy disímiles edades de divergencia de haplotipos; sin embargo, son también muy diferentes los mecanismos de evolución subyacentes entre el ADN nuclear y el cloroplástico. El modo de transferencia de uno y otro ADN no es el mismo: la dispersión de la semilla conlleva el transporte de cloroplastos, mientras que la polinización no lo contempla. En el caso de *A. uniflora* existe una tercera estrategia de reproducción vegetativa por gemación de sus raíces, en la que tanto núcleo como cloroplasto están involucrados; ésta pareciera ser el mecanismo más prolífico para la especie (Domínguez *et al.*, 2005), al tiempo que es una limitante para su dispersión. La existencia de una barrera muy vieja para el ADNcp entre Bolivia y Patagonia (34 Ma), respecto del ADNn (7 Ma) harían suponer una mayor eficiencia en el transporte polínico (movimiento de ADN nuclear, pero no cloroplástico); sin embargo, la probable polinización de la especie por moscas micetófilas no permite suponer movimiento de polen a largas distancias. Como punto a favor, si bien las semillas son pequeñas y de aspecto anemócoro, Ibisch *et al.* (2006) señalan que los hábitats de bosques cerrados donde se desarrolla *A. uniflora* y la reducida altura de la planta hacen también poco eficiente esta dispersión. Se deduce

de esto, entonces, una lenta movilidad de la especie por medio de las semillas y por ende del ADN de cloroplastos.

Como ya fue notado, es importante comparar las tasas de mutación de ambos tipos de ADN para analizar esta diferencia encontrada entre las edades de divergencia de los haplotipos. Si se observan ambas redes de haplotipos y cómo estos se distribuyen se encuentra que en el ADNn hay mayor número de pasos mutacionales entre los haplotipos y que, en general, estos se encontraron más dispersos, lo que permite deducir que es el que presentó una mayor tasa de sustitución. Estudios del ADN cloroplastidial de plantas holoparásitas y micoheterotróficas evidencian una elevada pérdida de genes y/o alta tasa de mutación para aquellos relacionados a la función bioenergética de la especie (Wolfe *et al.*, 2006; Delannoy *et al.*, 2011). Incluso, Lam *et al.* (2016) registraron al ADNcp de *A. uniflora* entre los de mayor tasa de sustitución. Estos autores, analizaron genes involucrados en la traducción de proteínas estructurales (como el gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S, aquí estudiado), conocidos por permanecer muy conservados en la mayoría de las plantas terrestres (Delannoy *et al.*, 2011) y por lo tanto, al presentar menos mutaciones, dejan menos evidencias de su historia evolutiva.

En su momento, la baja tasa de efectividad en la amplificación fue atribuida a mutaciones en el sitio de unión del cebador al ADN de *A. uniflora*, pero si se lo observa desde el punto de vista evolutivo, estas mutaciones podrían estar dando lugar a variantes génicas no detectables con estos cebadores, incluso provenientes de otros linajes que presentaran otras historias evolutivas y diferente edad de divergencia. No obstante, como ya se hizo notar, plantas con una historia biogeográfica similar a *A. uniflora* han evidenciado diferentes edades de divergencia: desde finales del Paleógeno (Villagrán e Hinojosa, 1997) e incluso desde el Eoceno medio, por ejemplo para *Podocarpus* (acompañante de *A. uniflora* en los bosques de Bolivia; Quiroga *et al.*, 2015). Ello vuelve verosímil las edades obtenidas en el presente trabajo, y a partir de los datos cloroplásticos.

De esta forma, se propone que la especie habría comenzado su separación en esta época (ca. 30 Ma atrás), provocada por la fase Inca de levantamiento de los Andes; sin embargo dado que se trata de una especie pequeña y herbácea, podría

haber permanecido en islas fragmentadas de bosque, e incluso en sitios con ambientes de estepa húmeda, similares a los que en la actualidad presentan las islas Malvinas, donde habita; por lo cual pudo mantener el flujo génico hasta hace 7 Ma, cuando la Diagonal Árida actuó como barrera definitiva. Previo a esta edad, las introgresiones marinas habrían jugado también un rol preponderante en la limitación del flujo génico hasta su completa divergencia. En Patagonia, la diversificación habría estado fuertemente influenciada por el levantamiento de los Andes, principalmente durante la fase Diaguita (Plioceno superior), que desencadenó la MGP (Pleistoceno). De esta forma, la expansión habilitada por el corredor de los Andes se vio limitada por la formación de los hielos, produciéndose aislamiento y diversificación de los haplotipos de *A. uniflora*. Los sucesivos eventos de glaciación/deglaciación ocurridos a lo largo del Pleistoceno, hasta hace aproximadamente 12 ka con el UMG, habrían tenido efectos similares sobre la distribución de la planta, contribuyendo a configurar la actual distribución de la especie, aunque no a la formación de nuevos haplotipos.

*Patrones de diversidad en los hongos micorrícicos arbusculares asociados a *Arachnitis uniflora*.*

*De esporas a genes.*



## **CAPÍTULO II**

## **CAPÍTULO II: *Patrones de diversidad en los hongos micorrícicos arbusculares asociados a *Arachnitis uniflora*. De esporas a genes.***

### INTRODUCCIÓN:

La implicancia evolutiva que tiene la simbiosis entre organismos complejos es ya en la actualidad indiscutible. Este término fue acuñado por Anton de Bary, en 1879, pensado como la coexistencia entre organismos disímiles. La simbiosis mutualista, por su parte, contempla sólo aquellas asociaciones en las cuales ambas partes intervinientes resultan beneficiadas, lo cual implica que en el intercambio ceden ciertos recursos relativamente fáciles de conseguir o producir para obtener otros que le serían costosos de elaborar (Schwartz y Hoeksema, 1998; Bronstein, 2001; Smith y Read, 2008).

Las micorrizas son un tipo de asociación simbiótica mutualista entre hongos de varios grupos dentro de los *phyla* Glomeromycota, Basidiomycota y Ascomycota, y plantas terrestres, muy difundido en Plantae (Smith y Read, 2008). Son de gran interés ya que tienen consecuencias sobre la productividad y diversidad de las plantas; además juegan un papel clave en el ciclo del carbono (C), nitrógeno (N) y fósforo (P), interviniendo en el ciclo de nutrientes del ecosistema al conformar una red subterránea de hifas que comunican a las plantas de una comunidad (van der Heijden y Horton, 2009).

El tipo de simbiosis micorrícica más común es integrado por hongos micorrícicos arbusculares (HMA); de hecho, cerca del 70-90% de las especies de plantas terrestres forman micorrizas con ellos, todos miembros del phylum Glomeromycota (Parniske, 2008; Smith y Read, 2008; Merckx *et al.*, 2012). El término arbuscular, deriva de la estructura típica de esta interacción, el arbúsculo, el cual se forma dentro de células corticales de las raíces de las plantas para el intercambio de sustancias y representa la estructura diagnóstico de este tipo de simbiosis endomicorrícica (Smith y Read, 2008).

En un sistema micorrícico arbuscular hay tres componentes principales: la raíz, el micelio intrarradical (MIR; dentro del apoplasto de la raíz) y el micelio extrarradical (MER; en el suelo circundante). El MIR presenta estructuras particulares con funciones específicas involucradas en la transferencia de nutrientes entre ambos simbiontes, diferenciándose en: arbusculos intracelulares, vesículas intra- o intercelulares y circunvoluciones (Bonfante-Fasolo, 1988; Morton *et al.*, 1996). Los arbusculos son estructuras formadas por hifas muy ramificadas que se encuentran dentro de las células corticales del hospedante e incrementan la superficie de contacto entre el hongo y la planta, favoreciendo el intercambio de nutrientes, con ciertos elementos como P o Zinc (Zn) que fluyen hacia la planta y los fotosintetatos, hacia el hongo (Smith y Read, 2008; Smith y Smith, 2011). Las circunvoluciones son repliegues o enrollamientos de hifas intrarradicales cuya función sería análoga a la de los arbusculos (Powell y Bagyaraj, 1984). Las vesículas son estructuras globosas llenas de lípidos que se forman en la raíz del hospedante inter- o intracelularmente y su función principal es de reserva (Bonfante-Fasolo, 1988), así cuando disminuye el suministro de metabolitos desde la planta, el hongo utiliza las reservas lipídicas de las vesículas, que posteriormente degeneran (Sieverding, 1991).

Influenciado por la heterogeneidad del suelo, el MER está involucrado en la búsqueda de nuevas plantas y en la exploración del suelo para la adquisición de nutrientes minerales que utilizarán tanto el hongo como la planta. Sus hifas son capaces de interconectar diferentes plantas hospedantes y establecer simbiosis micorrícica con diversas especies de ellas (Giovannetti *et al.*, 2004). Durante el crecimiento del MER se pueden diferenciar esporas y células auxiliares. Las esporas de los HMA son estructuras que contienen lípidos, citoplasma y hasta 2000-3000 núcleos y se forman asexualmente, tanto en suelo como raíces, por diferenciación de las hifas del MER. Además, las esporas pueden encontrarse agregadas en grupos denominados esporocarpos que funcionan como estructuras de reserva y propágulos (Smith y Read, 2008). En ecosistemas naturales, tanto propágulos de los HMA, esporas, fragmentos de raíces colonizados y fragmentos de hifas o micelio del MER, son capaces de iniciar la colonización micorrícica arbuscular en una planta (Martins y Read, 1997).

### *Relación micoheterotrónica:*

En una relación micorrícica que, en términos generales es interpretada como mutualista, los hongos son socios obligados, que no pueden completar su ciclo de vida sin las plantas. Por el contrario, las plantas micorrícicas son autótrofas y capaces (otra vez, en términos generales) de desarrollarse en ausencia de colonización, considerándose simbioses facultativos en esta relación (Giovannetti, 2000; Smith y Read, 2008). Este mutualismo así definido puede llegar a ser alterado y transformado en una relación parasítica. La aparición de individuos "tramposos" (o incluso linajes enteros) dentro de una u otra de las partes, así como también la aparición de un tercer linaje que interfiera en un mutualismo pueden ser causantes de una falla en la reciprocidad de dicha relación (Bidartondo, 2005). Un tercer socio puede ser, de hecho, una especie de planta aclorófito que interfiere en el mutualismo de micorrizas arbusculares invadiendo y aprovechándose de esa relación. Surge de ello una simbiosis tripartita, donde la planta aclorófito es una parte obligada y dependerá del destino que tenga esta relación mutualista (Bidartondo, 2005; Smith y Read, 2008; Waterman *et al.*, 2013). Este tipo de relación es llamada micoheterotrónica (Leake, 1994; Smith y Read, 2008).

Los mecanismos bioquímicos y estructurales de las plantas micoheterotrónicas para evitar el reconocimiento y/o suprimir las defensas en sus huéspedes fúngicos para así secuestrarles carbono no son claros (Merckx *et al.*, 2009), aunque la evolución y el mantenimiento de estas vías pueden generar presiones selectivas hacia la especialización (Futuyma y Moreno, 1988; Waterman *et al.*, 2013). Además, la dependencia de hongos por parte de una planta micoheterotrónica para su establecimiento, supervivencia y/o diversificación se corresponde con gran especificidad de algunas asociaciones micoheterotrónicas (Bidartondo y Bruns, 2002; Bidartondo *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Leake, 2004). Por su parte, los generalistas tienen un mayor potencial para adaptarse a nuevos ambientes, proporcionando más oportunidades para la especiación y un menor riesgo de extinción (Zayed *et al.*, 2005). Así, el desarrollo de herramientas moleculares ha demostrado que no todas las asociaciones micoheterotrónicas son especialistas extremas; de hecho, algunas plantas micoheterotrónicas tienen la capacidad de

asociarse con más de una familia de hongos. Se han encontrado relaciones micoheterotróficas generalistas en *Sciaphila ledermannii* Engl., que se asocia con Acaulosporaceae Morton y Benny, Gigasporaceae Morton y Benny, y Glomeraceae Piroz. y Dalpé; en *Campylosiphon congestus* (Wright) Maas y *Gymnosiphon capitatus* (Benth.) Urb., asociadas con Acaulosporaceae y Glomeraceae; y en especies del género *Voyria* Aubl. relacionadas con Gigasporaceae y Glomeraceae (Bidartondo *et al.*, 2002; Franke *et al.*, 2006; Merckx *et al.*, 2010; Courty *et al.*, 2011; Merckx *et al.*, 2012). Sin embargo, Glomeraceae es la familia más comúnmente asociada a plantas micoheterotróficas, posiblemente debido a características ecológicas particulares (Merckx *et al.*, 2012; Chagnon *et al.*, 2013).

Bidartondo *et al.* (2002) estudiaron los simbiontes fúngicos de *A. uniflora* para tres sitios del norte de su distribución en los bosques templados andino-patagónicos, encontrando una asociación específica con miembros de Glomeraceae. Si bien la evidencia indica que la especialización hacia una especie de hongo micorrícico no se opone a una amplia distribución de la especie vegetal (como confirma el caso de la orquídea *Eulophia zollingeri* (Rchb.) Sm.; Ogura-Tsujita y Yukawa, 2008), la particular distribución geográfica disyunta de *A. uniflora*, perteneciente a diferentes regiones florísticas, podría sugerir la presencia de una mayor variedad de hongos asociados a ella, que lo encontrado por Bidartondo *et al.* (2002). Para probar esta expectativa, en el presente capítulo se abordó la caracterización de los HMA presentes en raíces de *A. uniflora* provenientes de diferentes localidades a lo largo de su área de distribución desde distintas perspectivas tanto molecular como morfológica.

## **Estudios moleculares:** Diversidad genética de hongos micorrícicos arbusculares en raíces de *Arachnitis uniflora*.

### INTRODUCCIÓN:

La identificación clásica de los HMA, basada en la estructura de sus esporas puede ser incompleta o sesgada, dado que ciertas especies forman más de un morfotipo de esporas, e incluso existen varios taxones crípticos, que solamente se descubrieron como resultado de análisis moleculares (Krüger *et al.*, 2011). De la misma forma, los análisis de diversidad genética en Glomeromycota se ven obstaculizados por la falta de consenso en cuanto a qué criterios son adecuados para delimitar filogrupos (grupos de secuencias, especies, OTU o unidades taxonómicamente operativas, etc.), además que tampoco existe un sistema universal de nomenclatura aplicable a taxones que sólo se identifican por sus secuencias de ADN (Õpik *et al.*, 2009).

La disponibilidad de los datos de las secuencias originales de Glomeromycota en bases de datos públicas posibilita una sistematización y delimitación en filogrupos de estas secuencias de ADN, como es el caso de la base de datos de MaarjAM (Õpik *et al.*, 2010), la cual tiene como objetivo proporcionar un repositorio con control de calidad que sistematiza las secuencias de Glomeromycota publicadas en OTU denominados taxones virtuales (VTX).

El perfeccionamiento de herramientas moleculares aumentó en gran medida la capacidad de identificar hongos micorrícicos. El desarrollo de cebadores específicos para determinados hongos permitió identificar su ADN directamente desde las raíces de las plantas donde ellos estaban alojados. Mediante la aplicación de este método, los hongos micorrícicos de muchas plantas micoheterotróficas han sido identificados en los últimos 20 años, lo que proporciona mayores certezas sobre la diversidad e identidad de los hongos involucrados en tales asociaciones (Waterman *et al.*, 2013).

La creciente disponibilidad de secuencias de ADN, facilitó el uso de la filogeografía como un método poderoso para responder incógnitas sobre su distribución en un contexto evolutivo. Así, el clásico paradigma que regía para los

hongos “todo está en todos lados” está siendo derribado en los últimos años con la aparición de estudios que documentan la distribución de los hongos en paralelo con su estructura filogenética. En su gran mayoría estos trabajos acuerdan en la existencia de grandes barreras al flujo génico, como océanos y montañas, e incluso muy por debajo de la escala continental (Lumbsch *et al.*, 2008; y trabajos allí citados).

Aquí, se realiza un estudio de identificación de la diversidad genética de los HMA asociados a raíces de *A. uniflora* y que son parte de su relación micoheterotrófica; la cual, según Bidartondo *et al.* (2002) es específica para con un grupo particular de HMA pertenecientes a la familia Glomeraceae. Es importante en este contexto conocer además cuál es la historia evolutiva de estos hongos o grupos de hongos y cómo fueron afectados por factores climáticos y geológicos históricos.

#### MATERIALES Y MÉTODOS:

**Muestreo.** Las raíces de *A. uniflora* se obtuvieron de 24 sitios a lo largo de los bosques andino-patagónicos de Argentina y Chile y los bosques de Bolivia, cubriendo prácticamente toda el área de distribución geográfica de la especie (con la excepción de Malvinas; Tabla 4). Se recolectó el sistema radical entero, el cual fue lavado y almacenado inmediatamente en *buffer* 2% CTAB, y conservado a -20°C hasta su posterior procesamiento.

**Extracción del ADN fúngico, amplificación y secuenciación.** Se extrajo el ADN fúngico de una sección delgada de la raíz de cada individuo de *A. uniflora*, de acuerdo con Gardes y Bruns (1993) con una etapa de purificación utilizando GeneClean (QBIOSCIENCE). Se amplificó mediante PCR el ADN fúngico del gen ribosomal 18S (JumpStart, Sigma), utilizando los cebadores NS1 (White *et al.*, 1990) y EF3 (Smit *et al.*, 1999). El procedimiento de PCR fue de 2 min a 94° C; 34 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53° C, y de 1:30 min a 72° C; con una extensión final de 7 min a 72° C. Debido a que en las pruebas iniciales los electroferogramas evidenciaron varias copias de ADN superpuestas, provenientes de diferentes organismos que componen cada muestra, fue necesario implementar la técnica de clonación para identificar cada uno de estos fragmentos de ADN. Esta metodología se basa en la obtención de ADN recombinante a

partir del fragmento de ADN de interés y de un vector de clonación (un plásmido bacteriano, en este caso), el cual se introduce en una célula huésped (bacteria), donde se replicará, produciendo numerosas copias idénticas o clones de este ADN recombinante introducido (Griffiths *et al.*, 2008). Con tal propósito, se utilizó el kit TOPO TA (Invitrogen, Reino Unido). Posteriormente, de cada producto de amplificación, al menos cuatro colonias interpretadas *a priori* como portadoras del ADN fúngico, fueron utilizadas como molde para una segunda ronda de amplificación. El esquema de amplificación para ellas fue de 7 min a 94 ° C; 25 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 53° C y de 1:30 min a 72° C; una extensión final de 5 min a 72° C. Los cebadores utilizados fueron NS1/NS3, NS3/NS5, y NS5/EF3 (White *et al.*, 1990), lo cual cubrió casi completamente el gen 18S. Cada fragmento se secuenció (BigDye, Applied Biosystems) mediante un secuenciador 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Las secuencias fueron editadas en MEGA v.5.2.2 y el alineado múltiple fue realizado mediante ClustalW utilizando los parámetros por defecto; posteriormente fue revisado manualmente. A partir de estas secuencias se construyeron dos matrices, una que incluyó las secuencias del gen 18S en toda su extensión (1514 pb) y otra que contenía sólo el fragmento con el mayor número de sitios polimórficos (S). Este fragmento se correspondió con la parte media de dicho gen, amplificada con los cebadores NS3/NS5 (604 pb). Las secuencias fueron identificadas mediante la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local (BLAST), tanto en la base de datos de GenBank como en la de MaarjAM para Glomeromycota; las secuencias de ADN no pertenecientes a Glomeromycota fueron descartadas.

**Análisis filogenéticos.** Las secuencias de los hongos obtenidos a partir de raíces de *A. uniflora* fueron asignados mediante BLAST con un criterio de similitud  $\geq 97\%$  a taxones virtuales (VTX) en la base de datos de MaarjAM; éstas totalizaron 10 secuencias y se añadieron a las matrices. Ocho secuencias de *Glomus* grupo A obtenidos por Bidartondo *et al.* (2002) para *A. uniflora* fueron recuperadas de GenBank mediante los números de acceso citados en dicho trabajo. Por último, se incluyeron 23 secuencias de otros géneros de Glomeraceae citados en Krüger *et al.* (2011) y Redecker *et al.* (2013) para maximizar la resolución en los árboles filogenéticos. *Paraglomus* Morton y Redecker (Paraglomeraceae) fue seleccionado como grupo externo. El conjunto de datos completo se muestra en el Apéndice V.

**Tabla 4:** Sitios de muestreo de los HMA asociados a *A. uniflora* con sus respectivos códigos, coordenadas geográficas, altitud, índices de diversidad genética y haplotipos encontrados en cada sitio. En la ubicación, A representa Argentina, B es Bolivia y C es Chile.  $\pi$  es diversidad nucleotídica y H es diversidad haplotípica. \* LAV sólo cuenta con secuencias de HMA de *A. uniflora* obtenidas de Bidartondo *et al.* (2002) y tomadas de GenBank.

Sitio	Ubicación	Latitud	Longitud	Altitud	$\pi$ para Glomeromycota	H para el 'clado <i>Arachnitis</i> '	Haplotipos
VAG	Valle Grande (B)	-18.572	-64.043	2387	0.042	1.000	H1, H11
PPG	Pampa Grande (B)	-18.677	-63.917	2378	0.062	0.667	H1, H11
COR	Corel (C)	-35.535	-71.197	487.3	0.009	0.667	H10, H14
QUI	Quillón (C)	-36.668	-72.460	41.2	0.012	0.500	H1, H16
HUA	Hualpén (C)	-36.805	-73.172	17.7	0.037	1.000	H1-H2, H17
AAN	Alto Antuco (C)	-37,369	-71,697	749	0.054	-	-
CNI	Cerro Nielol (C)	-38.724	-72.589	217.6	0.025	1.000	H3, H18
LLA	Llançalil (C)	-39.236	-71.636	333	0.011	1.000	H1-H2, H6
RCH	Lago Ruca Choroy (A)	-39.246	-71.189	1241.9	0.010	1.000	H1-H2, H6, H20
LNE	Los Nevados (C)	-39.327	-71.834	400	0.016	0.900	H1, H3, H17-H18
PLP	La Peña (C)	-39.507	-72.582	153.9	0.003	0.667	H1-H2
LOL	Lago Lolog (A)	-40.683	-71.373	936.9	0.019	0.867	H1, H3, H13, H17
LAV*	Laguna Verde, Va. La Angostura (A)	-40.777	-71.659	813	0.000	0.000	H1
BAR	San Carlos de Bariloche (A)	-41.053	-71.541	822.3	0.015	0.476	H1-H2
PEM	C° P. Moreno, El Bolsón (A)	-41.857	-71.537	593.2	0.027	0.500	H1, H4
CHO	Cholila (A)	-42.461	-71.610	580	0.006	0.733	H1-H2, H8
ALE	P.N. Los Alerces (A)	-42.887	-71.608	526.2	0.040	0.857	H1-H2, H12, H15, H19
NIN	Laguna Los Niños (A)	-44.006	-71.490	1026.3	-	-	H6
FON	Lago Fontana (A)	-44.890	-71.527	927.8	0.024	0.833	H1, H3-H4
FIZ	Fitz Roy, El Chaltén (A)	-49.268	-72.950	693.2	0.005	1.000	H1-H2
GLA	P.N. Los Glaciares (A)	-50.484	-72.875	403	0.010	1.000	H1, H6
PAI	P.N. Torres del Paine (C)	-51.092	-73.198	258.2	0.002	0.667	H, H2
BUL	Fuerte Bulnes (C)	-53.610	-70.945	403.9	0.006	0.800	H2, H7-H8
CAM	Puerto Cameron (C)	-53.750	-70.095	116.4	0.034	1.000	H8-H9
RED	Isla Redonda (A)	-54.863	-68.479	402.2	0.007	0.700	H2, H5-H6

Las relaciones filogenéticas entre las secuencias fueron reconstruidas con inferencia bayesiana. El modelo GTR+I+G de evolución de ADN fue seleccionado mediante AIC en MrModeltest v.2.2. El análisis se realizó en MrBayes v.3.1.2 y consistió en  $10^7$  generaciones, con cuatro cadenas (tres calientes y una fría) y las muestras tomadas cada 1000 ciclos; el 25% de los árboles (correspondientes al período de calentamiento inicial) fue descartado. Todos estos análisis se llevaron a cabo con ambas matrices (secuencia completa y sólo la parte media del gen 18S).

**Datación molecular.** La estimación de los tiempos de divergencia para los diferentes clados de HMA asociados con *A. uniflora* se llevó a cabo utilizando tres puntos de calibración. La división entre Ascomycota, Basidiomycota y Glomeromycota se estableció en 595 Ma y el nodo de diversificación de Glomeromycota se dató en 460 Ma (Redecker *et al.*, 2000). El punto de calibración del origen de Gigasporaceae fue de 240 Ma (Padovan *et al.*, 2005). Debido a que estos puntos de calibración se ubicaron fuera de Glomeraceae, fue necesario añadir secuencias de Ascomycota, Basidiomycota y representantes de cada familia de Glomeromycota a la filogenia descrita anteriormente. Estas secuencias fueron recuperadas de GenBank, siguiendo a Merckx y Bidartondo (2008) y se muestran en el Apéndice V. Los tiempos de divergencia se estimaron utilizando un enfoque bayesiano, mediante un modelo de reloj molecular relajado en Beast v.1.7.5. El modelo de sustitución fue GTR con un modelo con gamma sitios de heterogeneidad, con cuatro categorías, siguiendo el resultado de MrModeltest; el modelo de reloj molecular se estableció como log-normal relajado no correlacionado y se seleccionó *Yule process* como modelo de especiación. La cadena de Markov de Monte Carlo fue de  $1,5 \times 10^6$  generaciones, con un muestreo cada 100 iteraciones.

**Diversidad genética y estructuración espacial.** La diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el número de taxones de HMA se calcularon para cada sitio muestreado. Por otro lado, se reunieron las secuencias que conformaron el clado principal de HMA asociado con *A. uniflora* (ver Resultados de esta sección) y con ellas se calculó también la diversidad de haplotipos (H). Estos índices se calcularon en DnaSP v.5.10. La distribución de estas diversidades de HMA para cada sitio fue representada mediante la herramienta de análisis estadístico de "punto a la grilla" en DIVA-GIS

v.7.5.0. Este trazado se llevó a cabo con un tamaño de celda de 0,3 x 0,3° (33,3 x 33,3 km en el ecuador) y una opción de vecindad circular de 1,5° (166,5 km en el ecuador).

A partir de las secuencias pertenecientes al clado de hongos mayoritariamente encontrado en raíces de *A. uniflora*, se construyó una red de haplotipos usando el algoritmo *median joining* implementado en Network v.5.0; aquí las autapomorfías fueron desestimadas y los gaps no fueron considerados. Cinco conexiones ambiguas (*loops*) se resolvieron usando los tres criterios postulados por la teoría de la coalescencia (Ver Materiales y Métodos del Capítulo I; Crandall y Templeton, 1993).

Los patrones de diversidad genética y la estructura genética se estimaron mediante un análisis de interpolación de la forma del paisaje genético, utilizando el programa AIS. Este procedimiento permite la representación gráfica de la distancia genética entre individuos para detectar la ubicación de barreras o zonas de contacto entre grupos genéticos de composición diferentes. El análisis se llevó a cabo con un tamaño de cuadrícula de 50 x 50 y un valor de distancia de  $a=1$ . Las secuencias de ADN analizadas fueron las pertenecientes al clado principal de HMA detectado en *A. uniflora*. Además, dada la gran discontinuidad geográfica entre Bolivia y Patagonia, sólo se consideraron en este análisis las secuencias de los bosques andino-patagónicos.

## RESULTADOS:

La amplificación del ADN fúngico y la secuenciación de cuatro clones por raíz, para 123 individuos de *A. uniflora* recuperó 104 secuencias de Glomeromycota pertenecientes a 69 individuos vegetales diferentes y procedentes de 25 sitios de muestreo. Las secuencias descartadas por no pertenecer a Glomeromycota fueron principalmente Pezizales Schröt. en Ascomycota y Agaricales Underw. en Basidiomycota, las que se asumieron como contaminantes.

**Análisis filogenéticos de los simbiontes fúngicos de *A. uniflora*.** Las relaciones filogenéticas fueron reconstruidas a partir de 104 secuencias de ADN de Glomeromycota obtenidas en este estudio, con la adición de secuencias procedentes

de las bases de datos de GenBank y MaarjAM, alcanzando en total 145 secuencias (Apéndice V). Los árboles se generaron con las dos matrices antes mencionadas (gen 18S completo y solamente parte media del mismo) y las topologías de ambos árboles obtenidos fueron similares (Fig. 17 y Apéndice VI); sin embargo, se encontró un mayor soporte para cada nodo con el árbol construido únicamente con la parte media del gen 18S respecto del obtenido a partir de todo el gen. De este modo, todos los análisis que se continúan se llevaron a cabo utilizando únicamente esta parte media.

El árbol filogenético (Fig. 17) reveló con buen soporte, la presencia de HMA asociados a *A. uniflora* pertenecientes a tres familias de Glomeromycota: Glomeraceae (probabilidad posterior bayesiana; BPP= 1,00), Acaulosporaceae (BPP= 0,98) y Claroideoglomeraceae (BPP= 0,97). El clado Glomeraceae recuperó la mayor parte de las secuencias encontradas en *A. uniflora* (95,5%), donde se reconocieron tres géneros: *Glomus* Tul. y Tul. (parafilético), *Sclerocystis* Berk. y Broome (BPP= 0,69) y *Rhizophagus* Dang. (BPP= 0,97); sin embargo, el 84,1% de estas secuencias se reunieron en un grupo no resuelto dentro de Glomeraceae (de aquí en más, denominado 'clado *Arachnitis*'; BPP= 0,73) identificado con el taxón virtual VTX00123 de la base de datos MaarjAM (simbionte de *Arachnitis uniflora*, obtenido por Bidartondo *et al.*, 2002).

La familia Glomeraceae mostró una temprana división que separó con buen soporte (BPP= 0,99) al género *Funneliformis* Walker y Schüßler de los restantes, los cuales formaron un gran clado. La mayoría de estos linajes restantes se agruparon en dos (BPP= 0,85), uno pequeño formado por *Glomus* de posición incierta, que contenía una sola secuencia obtenida de *A. uniflora* (ALE5) y un gran clado con dos subclados, el 'clado *Arachnitis*' (BPP= 0,73) que estaba poco resuelto y soportaba la mayoría de los hongos de *A. uniflora* y un segundo (BPP= 0,88), que también se dividió en dos, ubicándose en uno los géneros *Sclerocystis* y *Rhizophagus*, y en el otro *Glomus* con sólo una secuencia de *A. uniflora* (AAN1). Los clados *Sclerocystis* y *Rhizophagus* agrupaban a dos y 13 secuencias de *A. uniflora*, respectivamente. Esta topología del árbol evidenció que *Glomus* sería parafilético.

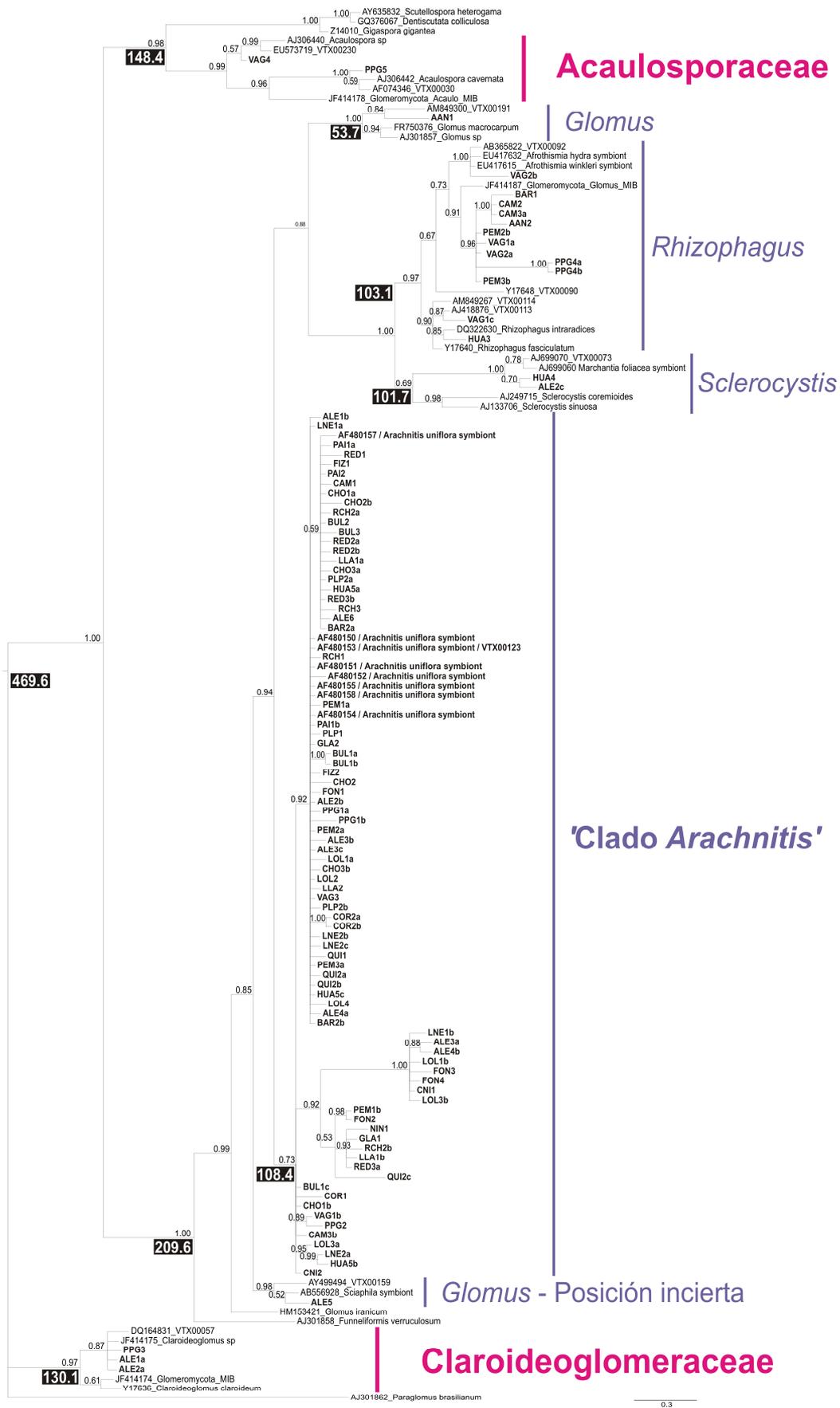


Figura 17: Continúa en la siguiente página.

**Figura 17 (cont.):** Árbol de inferencia bayesiana, construido a partir de secuencias del fragmento medio (604 pb) del gen ribosomal nuclear 18S, de los hongos de Glomeromycota encontrados en raíces de *A. uniflora*. Se muestran también representantes de linajes fúngicos no encontrados en dicha planta, los cuales fueron utilizados como identificadores y presentan su correspondiente número de acceso a GenBank (ver Apéndice V). Sobre cada nodo se muestra el valor del soporte (probabilidad posterior bayesiana; BPP); aquellos con BPP < 0.5 fueron colapsados a politomías. Los cuadros negros bajo los nodos indican los tiempos de divergencia de los mismos (en Ma).

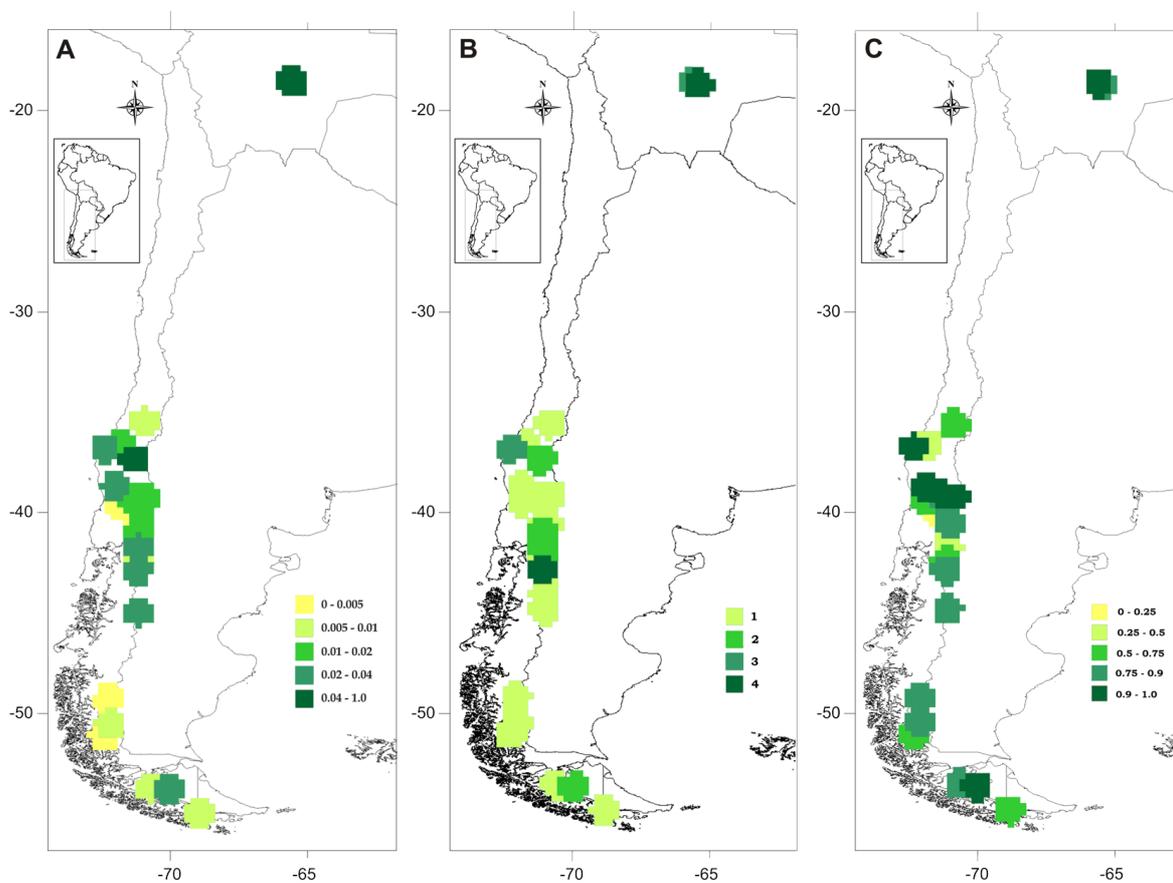
Fuera de Glomeraceae, las familias Claroideoglomeraceae Walker y Schüßler, y Acaulosporaceae constituyeron dos clados bien soportados, que contuvieron tres y dos secuencias obtenidas de *A. uniflora*, respectivamente. Acaulosporaceae estuvo restringida a los sitios de bosques bolivianos (en individuos VAG4 y PPG5), además se ubicó dentro de un clado más grande, que reunió secuencias de GenBank de representantes de Gigasporaceae (BPP= 0,98). Claroideoglomeraceae fue encontrado en uno de los sitios de Bolivia (en individuo PPG3) y en dos individuos de *A. uniflora* diferentes, que pertenecieron a ALE (ALE1a y ALE2a).

Respecto a la distribución y forma de estructuración interpoblacional de cada clado, sólo se encontraron dos plantas de *A. uniflora* donde coexistieron dos familias distintas de hongos en una misma raíz (Glomeraceae y Claroideoglomeraceae) en ALE; aunque sí se han encontrado hasta tres diferentes clados de HMA por raíz en ALE, CAM, PEM y VAG, entre los cuales el 'clado *Arachnitis*' estuvo siempre presente. De acuerdo a los sitios de muestreo, ALE y PPG mostraron cuatro clados de Glomeromycota diferentes; HUA y VAG, tres clados de hongos; AAN, BAR, CAM y PEM dos clados; y en los sitios restantes sólo el 'clado *Arachnitis*' estuvo presente. Sólo en AAN no se encontró representantes del 'clado *Arachnitis*' (aquí se obtuvieron solamente dos secuencias, a partir de dos raíces analizadas).

### **Estructura y diversidad genéticas de los simbiontes fúngicos de *A. uniflora*.**

En general, la diversidad genética de los HMA tendió a aumentar hacia menores latitudes (Fig. 18A), detectándose la más alta diversidad en Bolivia y los sitios más al norte de Chile. Teniendo en cuenta todos los hongos del Phylum Glomeromycota detectados en raíces de *A. uniflora*, el índice de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) mostró los valores más altos para Bolivia y AAN, con  $\pi= 0,0617$  en PPG;  $\pi= 0,0545$  en AAN y  $\pi=$

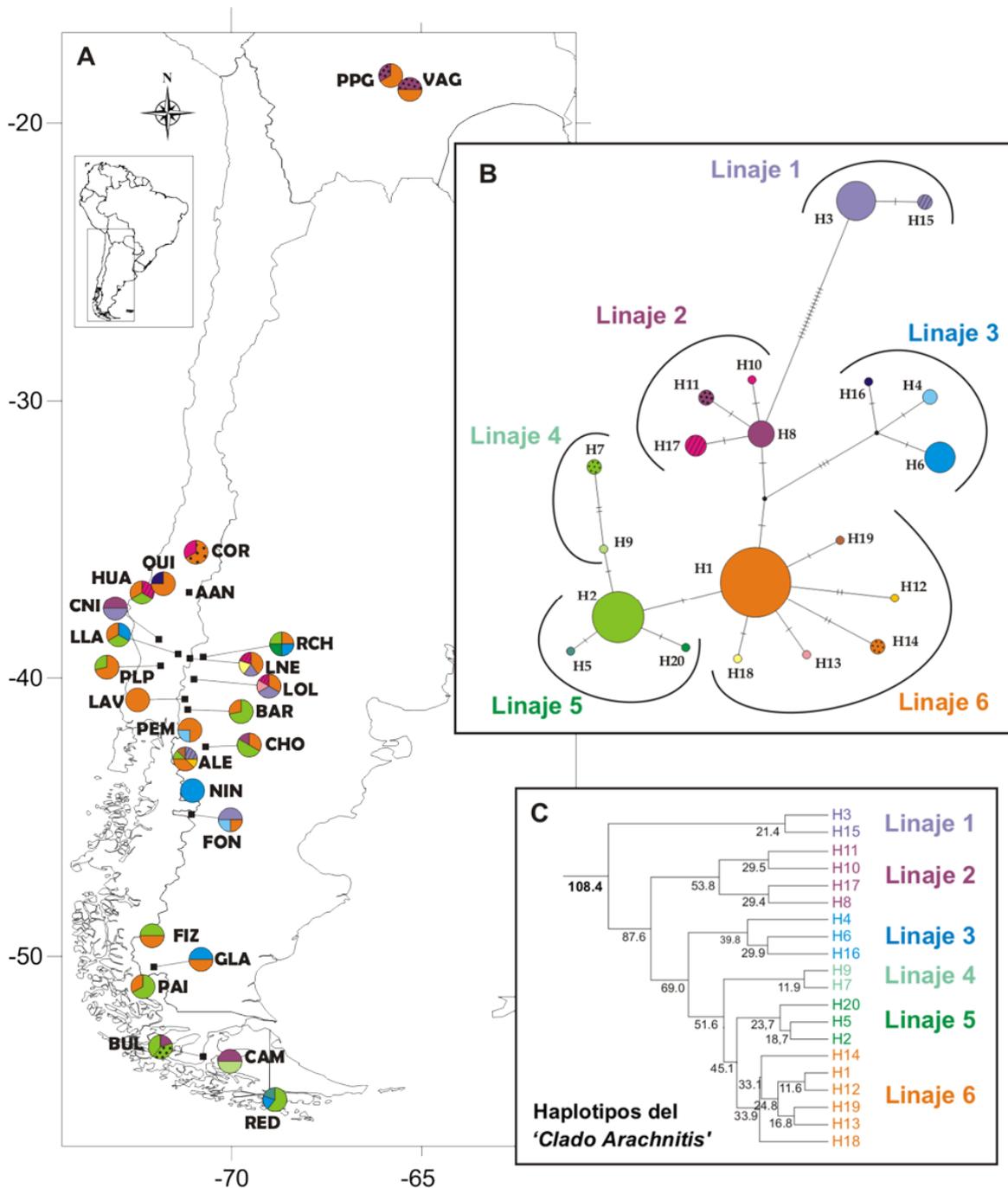
0,0416 en VAG (Tabla 4); mientras que los valores más bajos se encontraron en LAV ( $\pi=0$ ). No fue posible calcular  $\pi$  en NIN dado que se halló la secuencia de sólo un hongo. No fue claro un patrón clinal en la distribución de la diversidad genética fúngica, debido a que algunos puntos de media-alta diversidad genética fueron detectados en las latitudes más australes. Un patrón similar se encontró cuando fue considerado el número de diferentes taxones de HMA (Acaulosporaceae, Claroideoglomeraceae, *Glomus*, *Sclerocystis*, *Rhizophagus* y 'clado *Arachnitis*') para cada sitio (Fig. 18B).



**Figura 18:** Patrones de distribución geográfica de la diversidad genética de los HMA asociados a *A. uniflora*. A) Diversidad nucleotídica de todos los HMA asociados a *A. uniflora*. B) Número de clados de HMA asociados a *A. uniflora*. C) Diversidad haplotípica de las secuencias pertenecientes al 'clado *Arachnitis*'. Por referencias de poblaciones, ver Fig. 2 (Cap. I). La escala de colores indica graduación en la diversidad (como lo indican las referencias de la figura) para un tamaño de grilla de 33,3 x 33,3 km.

**Diversidad genética y filogeografía del 'clado *Arachnitis*'**. El 'clado *Arachnitis*' (representado por VTX00123) incluyó a la mayoría de las secuencias de ADN obtenidas de las raíces de *A. uniflora* y cubrió casi todo el rango geográfico de la especie; por esta razón pudo ser utilizado para realizar un análisis filogeográfico. La diversidad haplotípica obtenida para el clado fue relativamente alta en todo el rango de distribución (Fig. 18C), sin embargo existieron zonas de mayor diversidad en Bolivia, en la región norte de Chile y en Tierra del Fuego, por lo cual queda poco delimitado un patrón clinal de distribución de la diversidad. En ocho sitios se hallaron los valores máximos de diversidad ( $H= 1$ ; Tabla 4), mientras que todos los demás mostraron valores que van desde  $H= 0,69$  a  $H= 0$ . Los sitios NIN y AAN no se incluyeron en este análisis debido a la escasez de secuencias.

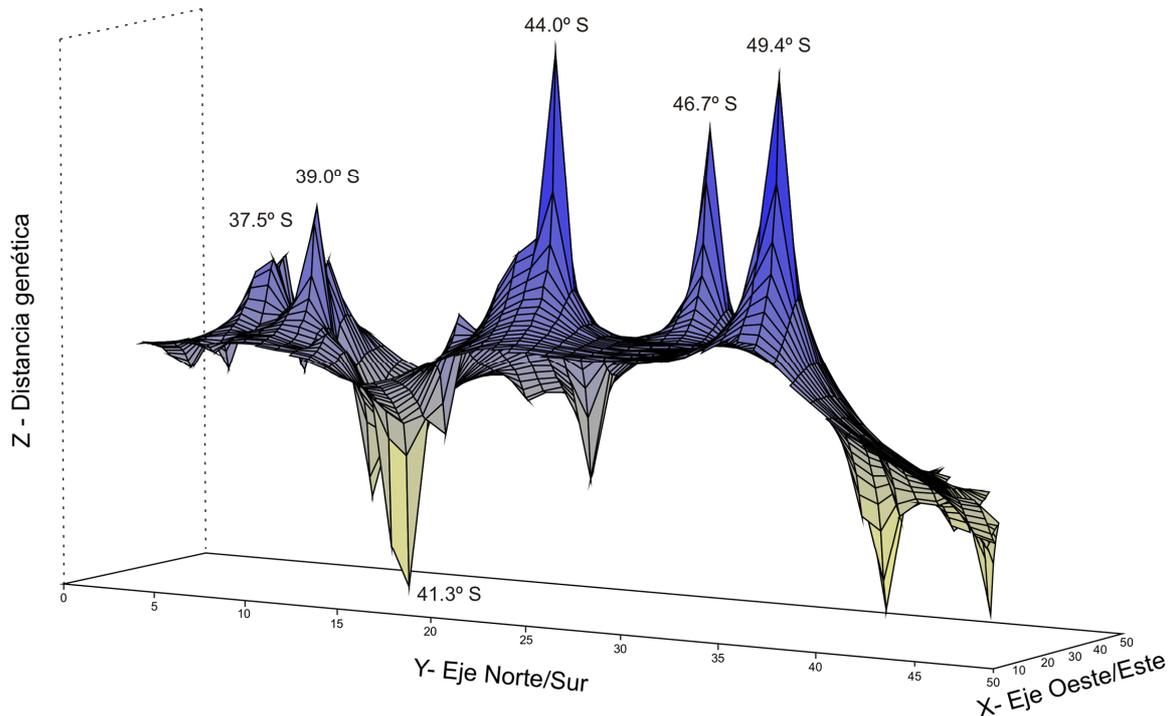
Por su parte, la red de haplotipos evidenció un total de 20 haplotipos, donde H1 y H2 fueron los más frecuentes y comunes (Fig. 19); con H1 presente desde Bolivia a PAI, casi en el extremo sur de la distribución continental, y H2, aunque ausente en Bolivia, extendido a lo largo de los bosques andino-patagónicos hasta Tierra del Fuego. H6 y H8 también estuvieron ampliamente distribuidos, pero en menor frecuencia. Teniendo en cuenta los pasos mutacionales, H3 y su derivado H15 fueron los más divergentes, separados de H8 por 14 y 15 pasos mutacionales, respectivamente; estos dos haplotipos se encontraron entre las latitudes 39° y 45° S (desde CNI hasta FON). Los haplotipos H4, H6 y H16 formaron un grupo que se originó a partir de un ancestro no muestreado o extinto (*median vector*) y que divergió del resto por tres pasos mutacionales. Todos los otros haplotipos difirieron en uno o dos pasos mutacionales entre sí. Los sitios geográficamente más aislados, en Bolivia, presentaron además de H1, un haplotipo exclusivo (H11). Haplotipos 5, 7, 9-10 y 12-20 fueron exclusivos de una población (Tabla 4). Con la excepción de NIN y LAV, todas las poblaciones fueron polimórficas, con ALE alcanzando cinco haplotipos, el número más alto.



**Figura 19:** Distribución geográfica y relaciones genealógicas de los haplotipos del 'clado *Arachnitis*' encontrados en raíces de *A. uniflora* para el gen ribosomal nuclear 18S. A) Distribución geográfica de los haplotipos, donde los círculos reflejan la frecuencia de ocurrencia de haplotipos en cada sitio. Nomenclatura de los sitios es referenciado en Tabla 4. B) Red de haplotipos, donde cada segmento perpendicular en la unión entre haplotipos (círculos) representa un paso mutacional. Puntos negros son vectores intermedios y representan ancestros no muestreados o extintos. C) Filogenia de los linajes de haplotipos para el 'clado *Arachnitis*' con sus tiempos de divergencia (indicados bajo los nodos). Existe correspondencia de colores entre figuras.

Al estimar los tiempos de divergencia entre los haplotipos del 'clado *Arachnitis*', el árbol filogenético obtenido recuperó la misma estructura de la red, con seis linajes principales de haplotipos (Fig. 19C). El origen de esta diversificación fue datada hacia principios del Cretácico Superior (108,4-87,6 Ma); mientras que la conformación de los primeros linajes fue hace 69-45,1 Ma, durante el Paleoceno-Eoceno; y las últimas divergencias que dieron lugar a los haplotipos más actuales se produjeron durante el Oligoceno-Mioceno (33,9-11,6 Ma).

El análisis de interpolación de la forma del paisaje genético (Fig. 20) arrojó un gráfico de superficie que mostró dos discontinuidades genéticas importantes o áreas de probable contacto de acervos genéticos disímiles; uno a los 44° S, alrededor de los sitios NIN y FON y otro hacia los 49,4° S, entre FIZ y GLA; ambos tomados conjuntamente delimitan una región norte y una sur para los bosque andino-patagónicos. La región norte, en general fue caracterizada por la presencia de haplotipos derivados de H1 (linaje 6; H12-H14 y H18-H19) y haplotipos derivados de H8 (linaje 2; H10 y H17 solamente situados en esta región). Los haplotipos más divergentes H3 y H15 (linaje 1) sólo se encontraron entre las discontinuidades proporcionadas por el análisis entre los 37,5° y 46,7° S. Aunque el linaje 3 (H4, H6 y H16) estuvo ampliamente distribuido, sus haplotipos se concentraron principalmente en esta región, con H4 y H16 exclusivos de allí. Por su parte, la región sur estuvo dominada por los haplotipos derivados de H2 (linajes 4 y 5; H5, H7, H9 y H20), estando presente además el haplotipo más distribuido (H1). Otros picos relevantes fueron evidenciados también mediante este análisis hacia los 37,5°; 46,7° y 39° S; de forma contraria, las depresiones indicaron zonas genéticamente más homogéneas, producidas principalmente en torno a los 41,3° S y hacia el sur desde los 49,4° S.



**Figura 20:** Análisis de interpolación del paisaje genético, con un tamaño de grilla de 50x50 y un valor de distancia de  $a=1$ . Los ejes X e Y se corresponden con latitud y longitud, respectivamente, mientras que el eje Z muestra la distancia genética. Picos positivos muestran discontinuidades genéticas o posibles barreras al flujo génico, en contraposición a los picos negativos, ambos se muestran referenciadas con las coordenadas de latitud. El análisis fue llevado a cabo con las secuencias del 'clado *Arachnitis*' (referenciado en la Fig. 17).

## DISCUSIÓN:

**Hongos micorrícicos arbusculares en raíces de *A. uniflora*.** Casi el 95% de las secuencias de Glomeromycota obtenidas de raíces de *A. uniflora* pertenecieron a Glomeraceae, lo cual sustentó en parte, las conclusiones alcanzadas por Bidartondo *et al.* (2002). Glomeraceae es además el HMA más común en plantas micoheterotróficas (Merckx *et al.*, 2012) y *A. uniflora* no forma parte de la excepción, aunque aquí se reveló además la existencia de otras dos familias de hongos asociadas a sus raíces (Acaulosporaceae y Claroideoglomeraceae). La presente tesis, junto a otros recientes trabajos proporcionan evidencias en el sentido de que otras familias diferentes a Glomeraceae pueden también asociarse a plantas micoheterotróficas. Representantes de Acaulosporaceae, así como los géneros *Rhizophagus*, *Sclerocystis* y *Glomus*, en Glomeraceae, fueron ya registrados también para otras especies micoheterotróficas

(ej. Russell y Bulman, 2005; Franke *et al.*, 2006; Merckx y Bidartondo, 2008; Merckx *et al.*, 2010; Courty *et al.*, 2011; Yamato *et al.*, 2011; Merckx *et al.*, 2012). Sin embargo, Claroideoglomeraceae nunca antes fue hallada en asociación con plantas micoheterotróficas (Franke *et al.*, 2006; Merckx *et al.*, 2012). Este es el primer estudio que aborda la diversidad genética de los hongos asociados a una especie de planta micoheterotrófica en todo su rango de distribución geográfico, lo cual podría haber permitido recuperar taxones de HMA que son menos eficaces para co-colonizar las raíces o que se presentan en sitios específicos de la distribución geográfica de *A. uniflora*. Por otro lado, el uso de cebadores universales reduce las chances de detectar una amplia gama de Glomeromycota en cada planta, al tiempo que incrementa el potencial de detectar los mismos grupos taxonómicos a lo largo de las diferentes raíces analizadas (MI Bidartondo, com. pers.).

La topología del árbol filogenético fue, en general, congruente con las filogenias de Glomeromycota ya publicadas (como Kruger *et al.*, 2011; Redecker *et al.*, 2013). En comparación con ellas, las diferencias radican principalmente en las posiciones de Claroideoglomeraceae (familia entendida como hermana de Glomeraceae y que aquí se separó con anterioridad a Acaulosporaceae) y *Funneliformis* (género hermano de *Glomus* que aquí se encontró separado del resto, siendo el taxón más externo de Glomeraceae). Por último, se destaca que *Glomus* se reconstruyó en la filogenia como polifilético; suceso que ya fue observado por Schüßler y Walker (2010), quienes clasifican como "especie de posición incierta" a algunos individuos y/o clados de *Glomus*. A pesar de que es siempre deseable obtener una alta resolución para este tipo de análisis filogenético, la intención principal del mismo fue observar cuán diversos eran los HMA asociados con *A. uniflora*. Es importante destacar que la topología recuperada en el árbol construido con todo el gen 18S (Apéndice VI) fue similar también a las filogenias de los autores antes mencionados, pero los soportes de cada nodo (BPP) fueron en general significativamente más bajos, con varios grupos no monofiléticos.

Los valores más altos de diversidad genética y también de número de taxones de HMA fueron hallados en los sitios bolivianos, los cuales incluyeron a representantes de las tres familias de hongos halladas, con Acaulosporaceae exclusiva para tales

sitios. Resulta notable que la distribución de Claroideoglomeraceae resultó disyunta, por un lado en uno de los sitios de Bolivia y por otro en ALE, en los bosques andino-patagónicos.

Como se ha mencionado, la familia Glomeraceae, y esencialmente el 'clado *Arachnitis*', son los grupos de HMA más comúnmente encontrados en *A. uniflora*. Esto confirmaría que la especie depende de Glomeraceae (o más puntualmente del 'clado *Arachnitis*') para su supervivencia. Si bien este clado estuvo ausente en AAN, los resultados no pueden ser tomados como representativos de la diversidad total del sitio, debido al escaso número de secuencias que se obtuvieron. Por otro lado, la presencia de otras familias de hongos en raíces de *A. uniflora* encontradas de forma más esporádica, podría reforzar la idea de la existencia de micobiontes 'facultativos', tal como fuera sugerido por Franke *et al.* (2006). Incluso podría llegar a interpretarse este evento como un incipiente cambio de huésped de la planta, de acuerdo con la teoría coevolutiva del mosaico geográfico (Thompson, 2005), la cual postula que las variaciones, en este caso de los ensamblajes de hongos, darían lugar a adaptaciones locales, que se expresan como un cambio de huéspedes para la planta. Sin embargo, se pone énfasis en destacar que el análisis coevolutivo escapa a los objetivos planteados, y sólo son interpretaciones parciales sin más evidencia que la planteada. Respecto a la capacidad de colonización de los diferentes HMA y su efectividad para formar micorrizas, Hart y Reader (2002) sostienen que los miembros de Glomeraceae, en general, entran en contacto con las raíces rápidamente y producen una mayor cantidad de micelio intraradical (MIR) que en el suelo (MER), mientras que los miembros de Acaulosporaceae contactan las raíces más lentamente y establecen un micelio mucho menos extenso, ya sea MIR o MER (Chagnon *et al.*, 2013).

**Estructura geográfica de la diversidad genética.** Teniendo en cuenta los patrones de distribución geográfica de la diversidad genética, fue posible reconocer varias zonas de gran diversidad que pueden ser hipotetizados como refugios o zonas de mayor estabilidad demográfica. Los sitios en Bolivia mostraron alta diversidad genética fúngica debido principalmente a la presencia de las tres familias de hongos halladas y, a pesar de compartir el haplotipo H1 con los restantes sitios, presentó a H11 como exclusivo, probablemente como respuesta de los procesos de

fragmentación y aislamiento. A través de los sitios andino-patagónicos, se identificaron otras cinco zonas de refugio, como en la Cordillera de la Costa chilena a los 36,8° S (en HUA), ya propuesta también por Séršic *et al.* (2011). En la Depresión Central de Chile a los 38,7° S, en cercanías a CNI, que fue propuesta como refugio por Vergara *et al.* (2014) para *Nothofagus obliqua* (especie que acompaña la distribución andino-patagónica de *A. uniflora*), mientras que Acosta *et al.* (2014) encontraron una población de *Nothofagus* con un haplotipo exclusivo dentro de la misma región. Flanqueando longitudinalmente los Andes por el Oeste (vinculado a LNE) y por el Este (en relación a RCH y LOL) entre 39,3° S y 40,7° S y otro más al Sur, alrededor de los 42,5°-43° S (en cercanías de CHO y ALE). Latitudes cercanas a éstas también fueron propuestas como refugios en estudios de múltiples especies como Séršic *et al.* (2011) y Souto *et al.* (2015), y en estudios específicos como Premoli *et al.* (2000), Marchelli y Gallo (2004) y Cosacov *et al.* (2010). Finalmente se propone otro refugio a los 53,7° S, localizado en alrededores de CAM, también propuesto de este modo por Jakob *et al.* (2009), Tremetsberger *et al.* (2009) y Souto *et al.* (2015). Este refugio austral, además, refuerza la idea de la persistencia local del bosque hacia latitudes australes (Premoli *et al.*, 2000). Notablemente, la aparición de hongos co-colonizadores o 'facultativos' es coincidente con los sitios de VAG, PPG, ALE, HUA, CAM, y las zonas alrededor de estas, que aquí se propone como refugios.

Veinticuatro de los 25 sitios analizados contaron con la presencia del 'clado *Arachnitis*' entre los hongos que colonizaban las raíces de *A. uniflora*; esta amplia representación geográfica permitió realizar un análisis filogeográfico más detallado a partir de este clado en particular. El patrón obtenido mediante la red de haplotipos no mostró ninguna estructuración geográfica clara, lo cual se evidencia en la amplia distribución de los haplotipos más frecuentes. Sin embargo, en Patagonia esos haplotipos se distribuyeron y agruparon en áreas de diversificación particulares (zonas norte y sur). Focalizando en los dos haplotipos más frecuentes y ampliamente distribuidos (H1-H2), la red mostró una topología de estrella, patrón que sugiere una rápida expansión del haplotipo ancestral en una amplia zona geográfica (Avice, 2000). Por otra parte, los cuatro haplotipos más abundantes (H1-H2, H6 y H8) fueron compartidos por casi todas las poblaciones, lo que indica que en el pasado hubo un contacto fluido entre las poblaciones. Así, las distancias geográficas no parecen ser

barreras relevantes para la conexión entre haplotipos, como ya fuera reportado por Davison *et al.* (2015); de hecho, las poblaciones de Bolivia compartieron uno de esos dos haplotipos ampliamente encontrados en los bosques andino-patagónicos.

Los dos principales quiebres detectados en el análisis del paisaje genético (interpretados como zonas de contacto entre acervos genéticos divergentes) hacia las latitudes 44° S y 49,4° S, entre los sitios FON y FIZ, coinciden con una amplia extensión territorial menos muestreada, y para la cual no existen registros de la presencia de *A. uniflora* en herbarios u otras bases de datos; sin embargo, no es posible descartar la posibilidad de que esta especie crezca en esta zona. La presencia de un pico en la latitud 46,7° S, en medio de esta brecha sugiere que este vacío puede haber afectado a los resultados del análisis. Se detectaron quiebres menores para las latitudes 37,5° y 39° S entre HUA y CNI, y en cercanía a LLA, respectivamente. Todos los quiebres detectados están latitudinalmente de acuerdo con barreras propuestas por Sérsic *et al.* (2011) para los Andes de la Patagonia, a excepción del pico a los 46,7° S que fue propuesto como barrera por Mathiasen y Premoli (2010).

En general, tanto refugios como quiebres genéticos se correlacionan con cambios climáticos asociados a las glaciaciones del Pleistoceno (Sérsic *et al.*, 2011, y referencias allí citadas), aunque la datación molecular de las divergencias de haplotipos de HMA asociados a *A. uniflora* mostraron concordancia con eventos previos referidos al levantamiento de los Andes. De este modo, es posible identificar un origen antiguo en la diversificación dentro del 'clado *Arachnitis*' durante el Cretácico Superior. Debido a que la diversificación de la familia Corsiaceae es más reciente, durante el Eoceno (53-36 Ma; Mennes *et al.*, 2015), ello podría sugerir que la diversificación de los HMA actualmente asociados a *A. uniflora* se habría producido en vinculación con otras plantas, presumiblemente verdes. Con ello, estos hongos han tenido el suficiente tiempo para diversificarse y ampliar su distribución, moldeados por sucesivos acontecimientos históricos que dejaron diferentes señales en sus linajes actuales, y que comenzaron en el Cretácico y continuaron al menos hasta el Pleistoceno.

En la misma línea, estudios realizados en *Nothofagus* (Acosta y Premoli, 2010; Acosta *et al.*, 2014), un género asociado a este clado de hongos (Bidartondo *et al.*,

2002), trazan cinco discontinuidades genéticas (37,5°; 39°; 42°; 46° y 50° S) que están en concordancia con las encontradas aquí, aunque fueron explicadas como resultado de introgresiones marinas durante el Oligoceno-Mioceno.

La larga historia de vida evidenciada aquí para el 'clado *Arachnitis*' habría estado influenciada por varios y sucesivos fenómenos climáticos y geológicos que moldearon su distribución geográfica y diversidad genética a lo largo del tiempo, bien sea en asociación o no (o ambas) con *A. uniflora*. En línea con estos procesos, es posible que aquellos taxones de hongos encontrados en baja frecuencia en raíces de esta especie, hayan sido el resultado de asociaciones facultativas durante épocas de condiciones ambientales adversas en diferentes períodos de tiempo. Por otro lado, el 'clado *Arachnitis*' es en apariencia quien podría haber acompañado a *A. uniflora* desde el momento en que esta especie comenzó a diversificarse (ver Cap. I). En el Capítulo IV de la presente tesis, se abordan diferentes aspectos comparativos entre ambos grupos del par para intentar dilucidar este aspecto evolutivo.

## **Estudios morfológicos:** Diversidad de esporas de hongos micorrícicos arbusculares procedentes de raíces de *Arachnitis uniflora*. Ensayos a partir de plantas trampa.

### INTRODUCCIÓN:

El almacenamiento de la información genética, el flujo génico a nuevos hábitats y el inicio de nuevos individuos separados temporal y/o espacialmente de los organismos parentales, son las principales funciones de las esporas de los hongos (Morton *et al.*, 1993), y en Glomeromycota, además, es el único modo de reproducción conocido (Morton, 2000).

Debido a que muchos componentes de la estructura subcelular de las esporas (como la de las láminas de la pared) son estables en diferentes condiciones ambientales, constituyen las estructuras más importantes para la identificación morfológica de los HMA. Algunas estructuras diagnóstico de las esporas son: tamaño, color, forma, formación de agrupamientos (esporocarpos), características de la pared (número y grosor de capas, reacción con yodo, ornamentaciones) y de la hifa sustentora o del sáculo esporífero, entre otras. Más allá de estas particularidades, la clasificación taxonómica de los HMA es objeto de continuo debate, e incluso la definición de especie dentro del *phylum* Glomeromycota es controvertida (Rosendahl, 2008), utilizándose el término morfoespecie (Robinson-Boyer *et al.*, 2009) cuando está basado en las características morfológicas y en la ontogenia de las esporas.

Las esporas aisladas de muestras recolectadas a campo pueden dar una idea de la abundancia y la diversidad de las especies de HMA que, en esas condiciones ambientales, han formado esporas (Błaszowski, 2012). Pero una alta proporción de HMA produce esporas estacionalmente, e incluso puede no hacerlo si no están dadas ciertas circunstancias (Brundrett *et al.*, 1999). Por ello, la determinación de la diversidad de especies de HMA existente en un determinado sistema de estudio necesita complementariamente de la inducción a producirlas en cultivos trampa; con el conocimiento de que la identidad de las especies de plantas trampa afectará

significativamente la composición y la diversidad de las comunidades de HMA asociadas (Mathimaran *et al.*, 2005).

Como técnica complementaria a los estudios moleculares, se realizó una caracterización de la diversidad de morfoespecies de los HMA que se asocian con *A. uniflora*, respecto del conjunto de las existentes en las comunidades donde esta especie habita, mediante la utilización de plantas trampa. Este estudio es principalmente descriptivo, por lo cual el término diversidad aquí empleado debe interpretarse en términos de número de morfoespecies distintas.

#### MATERIALES Y MÉTODOS:

**Muestreo.** Se seleccionaron diez sitios a lo largo de la distribución de *A. uniflora* en los bosques andino-patagónicos (Tabla 5). En cada uno se recolectó una muestra de raíz de *A. uniflora* y una del suelo rizosférico (500 g, aproximadamente) de la comunidad. Las raíces se mantuvieron refrigeradas hasta su utilización, mientras que el suelo se almacenó en bolsas individuales, apropiadamente etiquetadas. Tanto el muestreo como los ensayos que le continuaron se llevaron a cabo en dos momentos, el primero de ellos con muestras de Patagonia Norte (LLA, PEM y CHO) y el posterior, con las provenientes de Patagonia Sur (FON, FIZ, GLA, PAI, BUL, CAM y RED), como serán denominados de aquí en adelante.

**Ensayo con plantas trampa.** Se utilizaron como plantas trampa a las especies *Petroselinum sativum* Hoffm. (perejil), *Sorghum bicolor* (L.) Moench (Sorgo) y *Bidens pilosa* L. var. *pilosa* (amor seco). Las semillas de las plantas hospedantes se esterilizaron superficialmente en hipoclorito de sodio (NaClO) 10% por agitación durante 10 minutos. Luego, las semillas se hicieron crecer en una mezcla de arena y suelo estéril en proporción 1:1 (V/V) y una vez germinadas, se asignaron a los distintos tratamientos. Éstos fueron tres y consistieron de macetas de 400 cm<sup>3</sup> con suelo estéril en proporción 1:1 (V/V) hasta los 2/3 del volumen de la misma. El restante 1/3 de la capacidad de la maceta fue lo que dio singularidad a cada tratamiento. El TR (Tratamiento con Raíz) contó con la adición de fragmentos de raíces de *A. uniflora*, completándose la maceta con suelo estéril. Estas raíces fueron

esterilizadas superficialmente en NaClO 10% durante 5-10 minutos. En el TS (Tratamiento con Suelo) se adicionó al restante 1/3 del volumen de cada maceta suelo nativo de cada comunidad, conteniendo propágulos viables como esporas, micelio extrarradical y fragmentos de raíces colonizadas con micelio intrarradical y vesículas. Por último, en el TC (Tratamiento Control) cada maceta fue completada con suelo estéril. En cada maceta fueron plantados tres individuos plántulas (una especie de planta trampa por maceta) de acuerdo al diseño mostrado en la Tabla 5. En el ensayo de Patagonia Sur, sólo se utilizó *Petroselinum sativum* (perejil) como planta trampa, dado que se observaron similares resultados con las tres especies en el primer ensayo. Además, en la segunda oportunidad no pudo ser analizado el lote de TS. En todos los casos, las macetas se mantuvieron en invernadero a 24° C durante el día y a 19° C durante la noche, con un fotoperíodo de 16/8 hs día/noche, regadas por aspersión durante 1 minuto dos veces al día, durante 6 meses. Posteriormente, se sometieron a estrés hídrico por otros 45 días, con un riego semanal, para favorecer la formación de esporas de HMA. Luego de ello se dio por terminado el ensayo, el suelo de cada maceta fue removido y acopiado individualmente a 4° C, mientras que las raíces de las plantas trampa fueron almacenadas en etanol 96%.

**Análisis de laboratorio.** Los sistemas radicales de cada una de las plantas trampa se clarificaron con hidróxido de potasio (KOH) 10% por aproximadamente 20 minutos a 90° C. Posteriormente fueron lavadas en agua y acidificadas en ácido clorhídrico (HCl) por 2 minutos, para luego ser teñidas con azul de anilina al 0,025% durante 10 minutos a 90° C (Brundrett *et al.*, 1996; Grace y Stribley, 1991). Las raíces así teñidas se examinaron en busca de las estructuras intrarradicales típicas que caracterizan una colonización micorrícica arbuscular (arbusculos, vesículas, hifas intra- e intercelulares, puntos de entrada y circunvoluciones), mediante un microscopio óptico (Nikon, E200) a 400 x de aumento. Los segmentos radicales colonizados fueron fotografiados.

De cada muestra del suelo de las macetas donde crecieron las plantas trampa se tomaron 100 g, los cuales se tamizaron y centrifugaron para extraer las esporas del suelo, empleando mallas de distinto tamaño de apertura (38 y 125 µm), según la metodología propuesta por Gerdemann y Nicolson (1963). Posteriormente, los

materiales retenidos en uno y otro tamiz fueron transferidos a tubos de 50 ml y centrifugados en sacarosa al 80% (Walker *et al.*, 1982). Las esporas suspendidas en la interfase entre la solución de sacarosa y el agua fueron lavadas y colocadas en cápsulas de Petri de 9 cm de diámetro con base cuadrada de 1 cm de lado. Éstas, fueron observadas bajo lupa estereoscópica Nikon SMZ745T y los diferentes tipos morfológicos de esporas fueron separadas y montadas en preparados permanentes mediante Polivinil-alcohol (PVA) y PVA + Melzer (Morton, 1988; Omar *et al.*, 1979). Las morfoespecies fueron identificadas bajo microscopio óptico Nikon Eclipse E200, fotografiadas y comparadas con las descripciones de las especies originales y aislamientos de referencia, descritos en Schenck y Perez (1990), INVAM (<http://invam.caf.wvu.edu/fungi/taxonomy/speciesID.htm>), Błaszowski (2012) y Redecker *et al.* (2013). Las especies fueron asignadas a cada tipo de espora siguiendo las nominaciones taxonómicas de Schübler y Walker (2010) y Redecker *et al.* (2013).

## RESULTADOS:

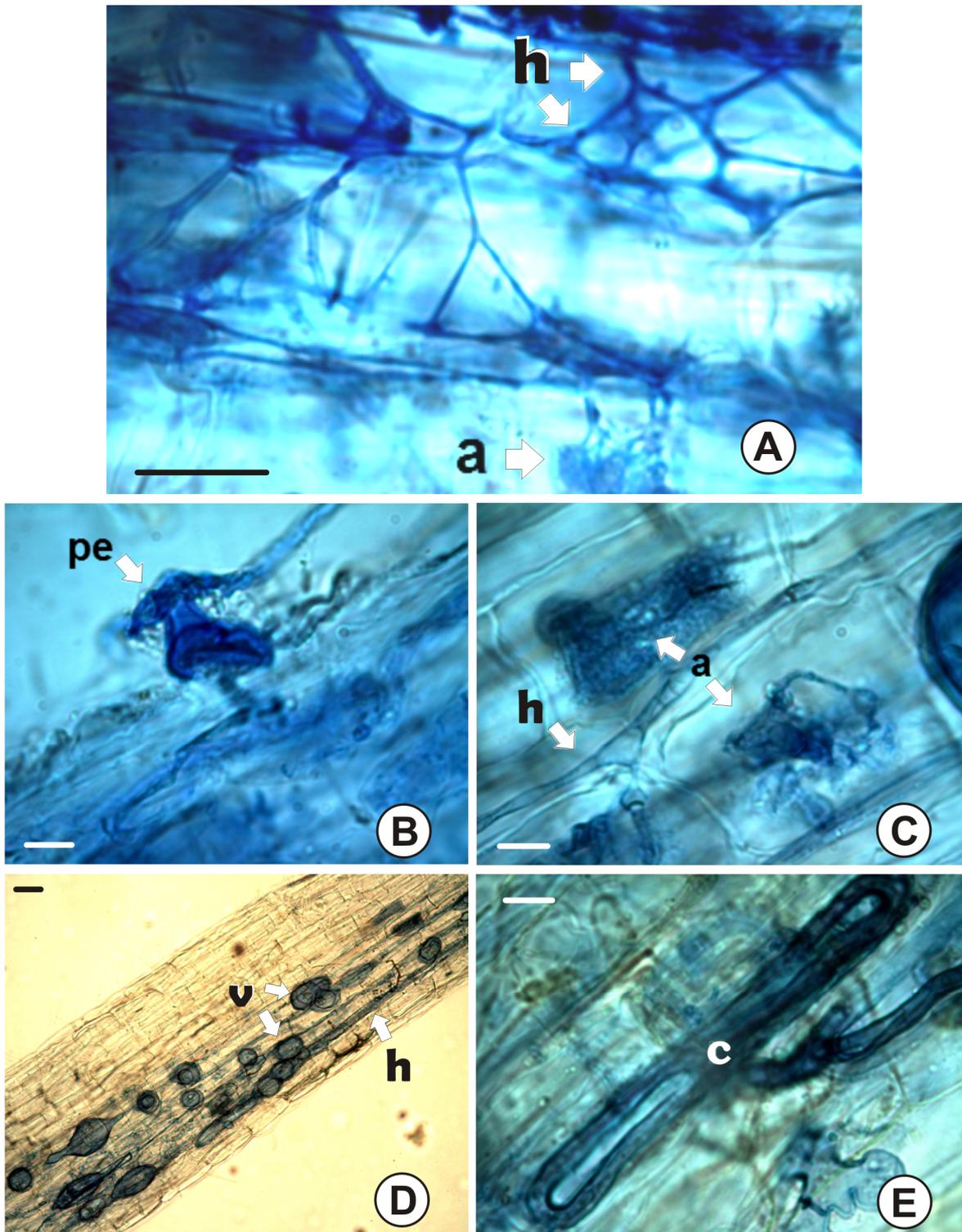
La observación de las raíces de plantas trampa bajo microscopio óptico permitió encontrar las típicas estructuras formadas por los HMA (Fig. 21): arbúsculos (a), puntos de entrada (pe), hifas (h), vesículas intracelulares (v) y circunvoluciones (c), tanto en aquellos hospedadores inoculados con raíz de *A. uniflora* (TR), como en los inoculados con suelo nativo (TS). Como particularidades, pudo observarse la presencia de hifas muy delgadas en LLA, tanto en TR como en TS, dispuestas de forma reticulada (Fig. 21A). Por su parte, en PEM se hallaron arbúsculos con estructuras globosas, sin distinción entre tratamientos. Ninguna de las raíces de plantas trampa del TC mostró señales de colonización por HMA. Estos ensayos sólo pudieron analizarse en Patagonia Norte.

Respecto a las esporas de HMA encontradas en las plantas trampa, es importante diferenciar entre TS y TR. En plantas inoculadas con suelo rizosférico de las respectivas comunidades fueron encontradas las morfoespecies: *Glomus brohultii* Sieverd. y Herrera (Glomeraceae), *Claroideoglomus claroideum* (Schenck y Sm.) Walker y Schübler, y *C. aff. luteum* (Kenn., Stutz y Morton) Walker y Schübler

(Claroideoglomeraceae), *Acaulospora scrobiculata* Trappe (Acaulosporaceae) y *Entrophospora infrequens* (Hall) Ames y Schneid. (morfoespecie de ubicación taxonómica incierta). Estas morfoespecies se encontraron distribuidas de forma similar entre las comunidades de Patagonia Norte; las muestras correspondientes a Patagonia Sur no pudieron analizarse.

**Tabla 5:** Sitios de procedencia de las muestras utilizadas para el análisis de la diversidad de esporas de HMA asociados a *A. uniflora*, y diseño de los ensayos con plantas trampa.

Comunidad	Latitud	Longitud	Experimento	Tratamiento	Réplicas	Morfoespecies en raíces de <i>A. uniflora</i>
<b>LLA</b>	-39,236	-71,636		TR	9	<i>Glomus</i> sp. - <i>Acaulospora scrobiculata</i>
<b>LLA</b>	-39,236	-71,636		TS	9	-
<b>PEM</b>	-41,857	-71,537	Patagonia Norte	TR	9	<i>Glomus</i> sp. – <i>Ac. scrobiculata</i>
<b>PEM</b>	-41,857	-71,537		TS	9	-
<b>CHO</b>	-42,461	-71,010		TR	9	-
<b>CHO</b>	-42,461	-71,010		TS	9	-
<b>FON</b>	-44,89	-71,527		TR	3	<i>G. brohultii</i> – <i>Ac. scrobiculata</i>
<b>FIZ</b>	-49,268	-72,95		TR	3	<i>Entrophospora infrequens</i>
<b>GLA</b>	-50,484	-72,875		TR	3	<i>Claroideoglomus</i> af. <i>luteum</i> – <i>Ac. bireticulata</i>
<b>PAI</b>	-51,084	-73,214	Patagonia Sur	TR	3	<i>Ac. scrobiculata</i> – <i>E. infrequens</i> – <i>Scutellospora</i> sp.
<b>BUL</b>	-53,61	-70,945		TR	3	<i>Funneliformis geosporum</i> – <i>Ac. scrobiculata</i>
<b>CAM</b>	-53,75	-70,095		TR	3	<i>Rhizophagus intraradices</i> – <i>Ac. scrobiculata</i> – <i>C. af. luteum</i>
<b>RED</b>	-54,863	-68,479		TR	3	<i>F. geosporum</i> – <i>E. infrequens</i>

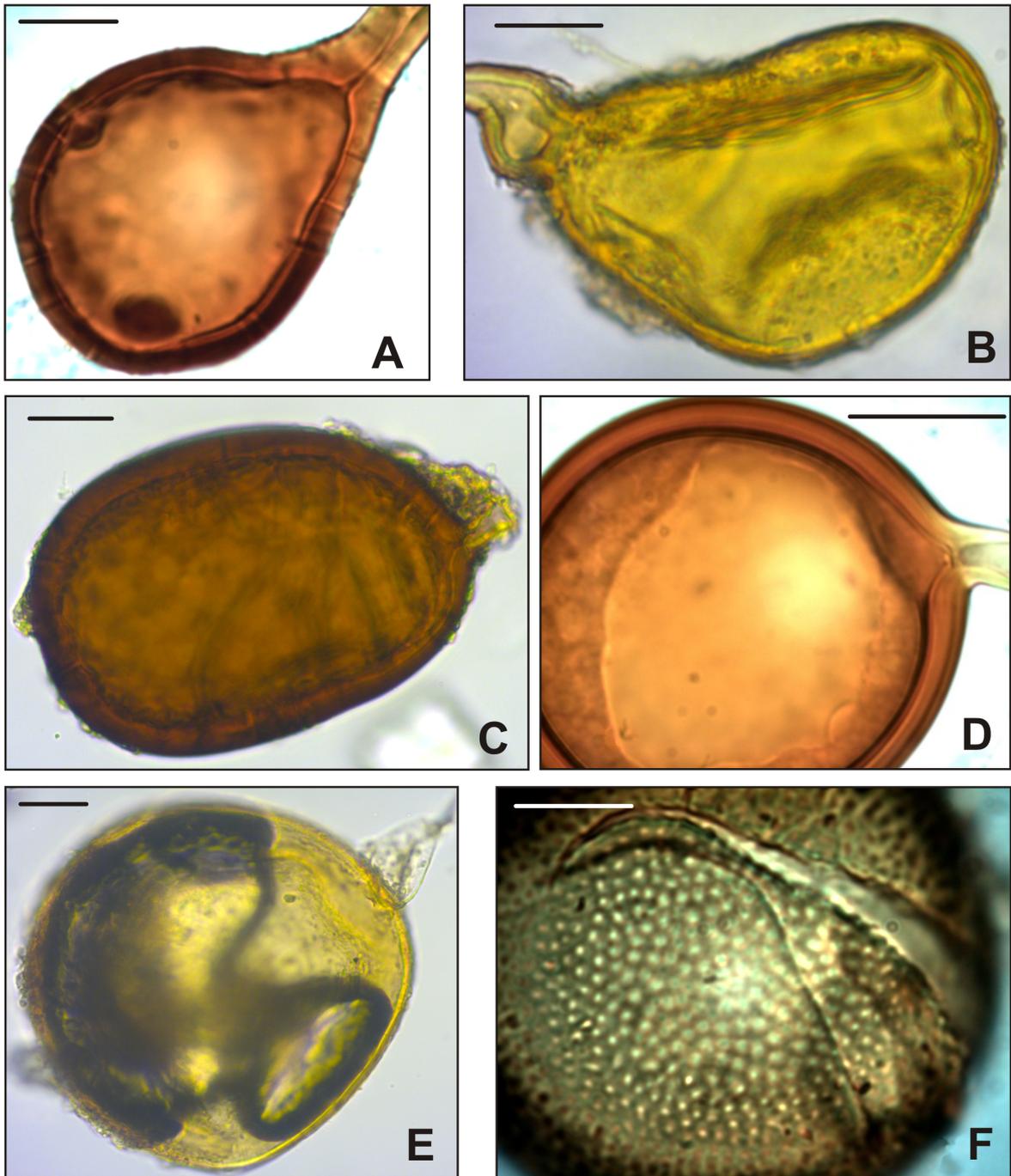


**Figura 21:** Estructuras de HMA observadas en plantas trampa inoculadas con raíces de *A. uniflora* provenientes de diferentes localidades andino-patagónicas. a: arbusculos, h: hifas intercelulares, pe: puntos de entrada, c: circunvolución, v: vesículas. La barra en cada figura indica una longitud de 20 µm.

Las esporas obtenidas a partir del TR fueron (Fig. 22): *Rhizophagus intraradices* (Schenck y Sm.) Walker y Schüßler, *Funneliformis geosporum* (Nicolson y Gerd.) Walker & Schüßler, *G. brohultii*, y *Glomus* sp. (Glomeraceae), *C. aff. luteum* (Claroideoglomeraceae), *Ac. scrobiculata* y *Ac. bireticulata* Rothwell y Trappe (Acaulosporaceae), *Scutellospora* sp. (Gigasporaceae) y *E. infrequens*. Discriminando por comunidad, y de Norte a Sur (Fig. 23): LLA, *Glomus* sp. y *Ac. scrobiculata*; PEM, *Glomus* sp. y *Ac. scrobiculata*; CHO, no pudieron individualizarse esporas; FON, *G. brohultii* y *Ac. scrobiculata*; FIZ, *E. infrequens*; GLA, *C. aff. luteum* y *Ac. bireticulata*; PAI, *Ac. scrobiculata*, *Scutellospora* sp. y *E. infrequens*; CAM, *R. intraradices*, *C. aff. luteum* y *Ac. scrobiculata*; BUL, *F. geosporum* y *Ac. scrobiculata*; y RED, *F. geosporum* y *E. infrequens*.

#### DISCUSIÓN:

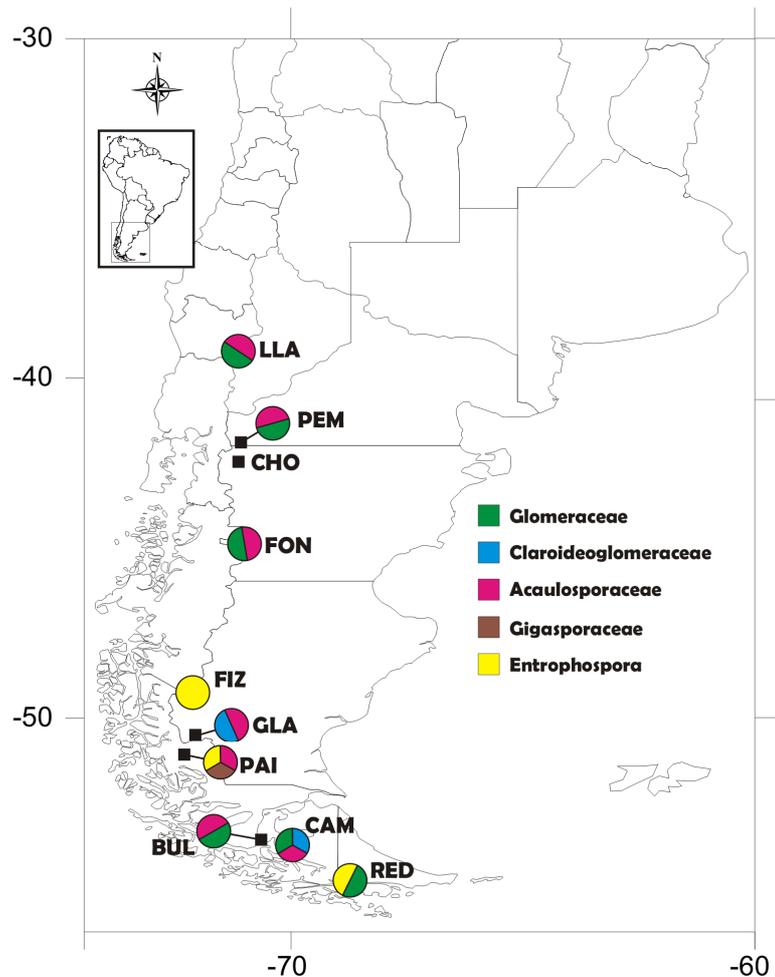
Los hongos asociados a las raíces de *A. uniflora* presentan características particulares, en especial la ausencia de arbuscúlos y la formación de vesículas intracelulares en racimos, y en menor medida, vesículas intercelulares típicas de HMA (Domínguez y Sérsic, 2004); sin embargo, las plantas trampa inoculadas con raíces de *A. uniflora* no presentaron estas características, sino que desarrollaron las típicas estructuras de una asociación de HMA con plantas verdes. No obstante, arbuscúlos de estructura globosa se hallaron en PEM (utilizando *Bidens* como planta trampa). También se observaron hifas muy finas y en red, en LLA, cuando se utilizó *Sorghum* como hospedador trampa. Ambas singularidades se repitieron tanto en TR como en TS. Las finas hifas son características de *G. tenue* (Greenall) Hall (MF Allen, com. pers.), morfoespecie de ubicación taxonómica incierta y cuyo tamaño de la espora es muy pequeño (10-12 µm de diámetro; Błaszowski, 2012) por lo que no habría sido retenida en las mallas utilizadas para la captura y por ello no se observaron representantes. Es importante destacar que, según estudios elaborados recientemente por Orchard *et al.* (2016), las morfoespecies identificadas como *G. tenue* no pertenecerían al Phylum Glomeromycota sino a Mucoromycotina, y fueron denominados por los autores como endófitos finos. Sin embargo, la falta de evidencias no permite concretar conclusiones respecto a este hallazgo.



**Figura 22:** Esporas encontradas en la rizósfera de plantas trampa inoculadas con raíces de *A. uniflora* de diferentes localidades andino-patagónicas. Se muestran representantes de los géneros reconocidos. A) *Glomus brohultii*, B) *Rhizophagus intraradices*, C) *Funneliformis geosporum*, D) *Claroideoglomus* aff. *luteum*, E) *Scutellospora* sp. y F) *Acaulospora scrobiculata*. La barra en cada figura indica una longitud de 30  $\mu\text{m}$ .

El abordaje de las esporas de HMA identificadas a partir del suelo de las plantas trampa inoculadas con suelo nativo de las comunidades estudiadas fue de utilidad para caracterizar la rizósfera que acompaña a *A. uniflora* en los bosques andino-patagónicos. Dicho estudio es de gran relevancia por ser uno de los primeros realizados en estos ecosistemas, y se realizó con las tres comunidades de Patagonia Norte. Pueden enumerarse entonces integrantes de tres familias (Glomeraceae, Claroideoglomeraceae y Acaulosporaceae), además de la presencia de la morfoespecie de posición incierta, *E. infrequens*. Respecto al número de especies, la familia Glomeraceae fue la más diversa (tres especies, mientras que de las restantes se encontró sólo una). En contraste, Velázquez *et al.* (2016) hallaron para tres comunidades de alta montaña del Parque Nacional Nahuel Huapi que Acaulosporaceae fue la familia dominante en las comunidades, tanto en número de especies como en la contribución de cada una al número total de esporas. Estos autores capturaron las esporas directamente a partir del suelo nativo, mientras que en el presente trabajo se obtuvieron utilizando plantas trampa inoculadas con suelo nativo; aunque esta diferencia podría también residir en variaciones de las características ecosistémicas de los sitios estudiados en la presente tesis respecto del trabajo de Velázquez *et al.* (2016).

Al analizar específicamente la diversidad de HMA proveniente de inocular plantas trampa con raíces de *A. uniflora*, es interesante discriminar ambos experimentos ya que Patagonia Sur alcanzó mayor número de morfoespecies distintas, incluso superando al obtenido con suelo nativo para Patagonia Norte. Este incremento puede estar relacionado con el número de comunidades analizadas en cada ensayo (tres en Patagonia Norte y siete en Patagonia Sur). Así, los sitios que conformaron el Norte, presentaron de igual modo en cada comunidad *Glomus* sp. (Glomeraceae) y *Ac. scrobiculata* (Acaulosporaceae), utilizando diferentes plantas trampa. Es interesante destacar que en CHO, si bien se evidenció actividad micorrícica por las estructuras halladas en raíces de los hospedadores trampa, no pudieron identificarse las esporas asociadas a *A. uniflora* (sí se hallaron esporas con TS); sin embargo, no existe ninguna evidencia para pensar que esto se deba a cambios en los simbiontes fúngicos de *A. uniflora*, sino que más bien pudo deberse a problemas en la captura de las esporas.



**Figura 23:** Distribución, por comunidad, de las familias de HMA encontradas en plantas trampa inoculadas con raíces de *A. uniflora*. Se indican las referencias de colores en el mapa.

En Patagonia Sur el número total de morfoespecies encontradas se vio incrementada, hecho que puede ser atribuido a que la cantidad de comunidades analizadas se duplicó respecto del primer ensayo, mientras que el número de morfoespecies dentro de cada comunidad se mantuvo en los mismos rangos. Tres nuevos grupos taxonómicos asociados a raíces de *A. uniflora* fueron encontrados aquí: las familias Claroideoglomeraceae y Gigasporaceae, y *Entrophospora*, de posición incierta, además de Glomeraceae y Acaulosporaceae ya vistas en Patagonia Norte.

Al analizar la diversidad existente dentro de cada comunidad, se observó que las familias Glomeraceae y Acaulosporaceae estarían asociadas a *A. uniflora* prácticamente de extremo a extremo de los bosques andino-patagónicos y estuvieron

presentes en casi todas las comunidades. Los otros grupos taxonómicos como Claroideoglomeraceae y *Entrophospora*, tuvieron una aparición más esporádica; mientras que más limitada aún fue la distribución de Gigasporaceae, sólo hallada en PAI. En términos de morfoespecies, resultó interesante encontrar, asociado a la distribución fueguina, un cambio en los representantes de Glomeraceae, ya que aparecieron *F. geosporum* y *R. intraradices*, cuyos géneros no fueron vistos hacia latitudes más septentrionales. En contraposición, el extremo Norte fue menos diverso y sólo exhibió *Glomus* sp. y *Ac. scrobiculata*.

El único conocimiento taxonómico de los HMA asociados a raíces de *A. uniflora* parte de la evidencia molecular proporcionada por Bidartondo *et al.* (2002), quienes sólo encontraron miembros de Glomeraceae. Desde la perspectiva rizosférica y a nivel de morfoespecies, se incrementó a un total de cinco, los grupos taxonómicos asociados a *A. uniflora*. Glomeraceae fue ampliamente registrada como simbiote fúngico de especies micoheterotróficas (ej. Bidartondo *et al.*, 2002; Russell y Bulman, 2005; Franke *et al.*, 2006; Merckx y Bidartondo, 2008; Merckx *et al.*, 2010; Courty *et al.*, 2011; Yamato *et al.*, 2011; Merckx *et al.*, 2012), al igual que Acaulosporaceae y Gigasporaceae (Merckx *et al.*, 2012), aunque estos últimos, en menor proporción. Claroideoglomeraceae, por el contrario, nunca antes fue encontrada en raíces de plantas aclorófitas (Franke *et al.*, 2006; Merckx *et al.*, 2012). Respecto a *Entrophospora*, su posición es incierta dentro de la filogenia de Glomeromycota, e incluso sus integrantes podrían estar dispersos entre varias otras familias (Schüßler y Walker, 2010), por lo cual se mantiene aquí la entidad de *E. infrequens*, sin hacer conjeturas sobre su ubicación dentro de Glomeromycota.

Por último, con estos resultados, se sustenta la propuesta de Franke *et al.* (2006), de la existencia de micobiontes 'facultativos' que pueden asociarse de forma esporádica a *A. uniflora* debido a, por ejemplo mayores demandas energéticas de la misma o por escasez del simbiote fúngico habitual.

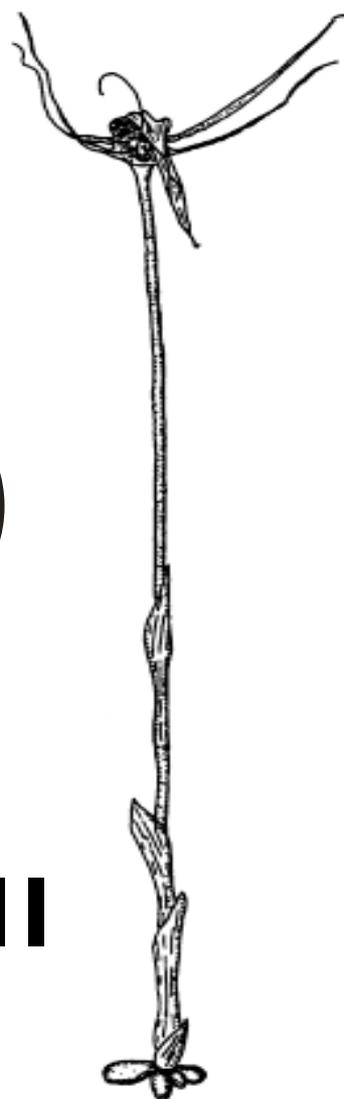
## Consideraciones globales: De esporas a genes.

Al hacer un contraste entre lo observado por los métodos moleculares y por los morfológicos se pone en evidencia que la diversidad de HMA encontrada mediante técnicas moleculares fue más acotada que la obtenida por métodos morfológicos de identificación. Como ya se observó, el uso de cebadores universales reduce las chances de detectar una amplia gama de individuos de Glomeromycota en cada planta, con la probabilidad de que se secuencien los más abundantes en detrimento de los demás. Una de las grandes discrepancias encontradas entre ambos abordajes estuvo referida a Acaulosporaceae, ya que secuencias de este taxón fueron halladas preferentemente en las poblaciones de Bolivia, de donde sólo existen datos moleculares. Sin embargo podría interpretarse que estos hongos serían más abundantes en los suelos de aquellas latitudes que en los de Patagonia, donde la evidencia molecular la detectó en una sola población, pero fue más común mediante el método morfológico. Patrones similares de abundancia podrían explicar los hallazgos para Claroideoglomeraceae, e incluso para Gigasporaceae que no fue evidenciada genéticamente.

En este capítulo se postuló la existencia de micobiontes 'facultativos' asociados a *A. uniflora*, planteada en primer lugar para Acaulosporaceae y Claroideoglomeraceae a partir de la evidencia genética. El estudio morfoespecífico de estos HMA indica que *A. uniflora* es aún más generalista que lo señalado por los datos moleculares. Las morfoespecies pertenecientes a las familias Glomeraceae y Acaulosporaceae se encontraron juntas en cinco de nueve comunidades, y sólo en un sitio no estuvo presente ninguna de las dos familias. Esto da la pauta de que ambas serían similarmente importantes para el desarrollo de *A. uniflora*. Sin embargo, y en línea con Merckx *et al.* (2012), quienes postulan que Glomeraceae es la familia más comúnmente asociada a plantas micoheterotróficas, en *A. uniflora* el número de morfoespecies pertenecientes a Glomeraceae fue mayor (al menos cuatro morfoespecies) al encontrado para Acaulosporaceae (dos morfoespecies). Si bien sería apropiado registrar la frecuencias relativas de cada morfoespecie, varios autores (Hart y Reader, 2002; Chagnon *et al.*, 2013) atribuyen esta predominancia a

la mayor capacidad proliferativa de Glomeraceae que resultaría más beneficiosa para *A. uniflora* o cualquier otra especie micoheterotrófica.

*Caracterización del gradiente  
ambiental en el rango de  
distribución de  
Arachnitis uniflora*



# CAPÍTULO III

### **CAPÍTULO III: Caracterización del gradiente ambiental en el rango de distribución de *Arachnitis uniflora*.**

#### INTRODUCCIÓN:

Las especies de plantas ampliamente distribuidas se encuentran en general en ambientes muy heterogéneos, incluso contrastantes, lo que implica una disponibilidad diferencial de recursos en su rango de distribución (Primack y Hall, 1990; Galen, 1999; 2000; Galen *et al.*, 1999; Carroll *et al.*, 2001) y tienen, en general, el potencial de exhibir una amplia variación intraespecífica (Soolanayakanahally *et al.*, 2009). El aislamiento y la deriva genética son procesos preponderantes en la generación de variabilidad genética, incluso bajo condiciones de similitud ambiental, donde la selección natural podría actuar de forma menos evidente (Millar y Libby, 1991). Los patrones de diferenciación genética son aún más pronunciados si se trata de una especie de amplio rango de distribución y que además presenta una marcada disyunción de sus poblaciones.

*A. uniflora* muestra una notable disyunción de sus poblaciones, lo que es muy raro, tratándose de una especie de planta micoheterotrófica (Maas *et al.*, 1986), sin embargo presenta similares condiciones climáticas a lo largo de los sitios por donde se distribuye en los Andes centrales de Bolivia, en los andino-patagónicos, al sur, y en las islas Malvinas (Ugarte y Arriagada, 1983; Minoletti, 1986). En general crece sobre suelos profundos, con densa vegetación circundante y alta humedad durante el período de crecimiento; sin embargo todos estos factores están embebidos en diferentes contextos macroclimáticos (Ibisch *et al.*, 1996). El flujo génico podría considerarse completamente restringido entre estas tres grandes regiones; el mar sirve de barrera para las islas Malvinas, y las regiones desérticas que componen la diagonal árida, lo son para los bosques templados de Patagonia y los andinos tropicales/subtropicales de Bolivia. Este espacio transicional en los Andes se caracteriza por la duración e intensidad de los periodos de déficit hídrico, que lo convierte en el principal controlador ambiental para la distribución de las comunidades vegetales (Sarmiento, 1975; Morrone, 2006; 2014).

Patagonia presenta una temperatura propia de una región templada fría. Abarca dos ecorregiones con características bien contrastantes: los bosques andino-patagónicos o Subantárticos y la Estepa patagónica, donde el clima ejerce una influencia importante sobre la estructura y el funcionamiento de los ecosistemas, dado principalmente por la dinámica del agua (Paruelo *et al.*, 1998). El régimen pluvial está marcado por la cordillera de los Andes, al interceptar las masas de aire húmedo de la corriente de Humboldt provenientes del océano Pacífico, constituyendo una sombra de lluvia hacia el este de la cordillera en latitudes altas, e incluso hacia las zonas costeras a más bajas latitudes (Ramos y Ghiglione, 2008; Coronato *et al.*, 2008). En la región Andina el clima presenta estacionalidad, con una amplitud térmica anual que supera a la diaria; el extremo norte presenta una temperatura anual de 12–13° C y precipitaciones anuales entre 1000-3000 mm, que hacia el sur se hacen más variables (600–4300 mm) y la temperatura desciende a 5–8° C (Ibisch *et al.*, 1996).

En Bolivia, la humedad existente en el piedemonte oriental de los Andes es debida a los vientos que provienen del anticiclón del Atlántico Sur (Vuille, 1999; Vuille y Keiming, 2004), ello conduce a un típico clima tropical de montaña con gran amplitud térmica diaria (mayor a la que se produce anualmente) y cuyo período de mayor sequía comprende desde mayo hasta septiembre. La temperatura media anual ronda los 17–18° C y las precipitaciones, los 800–1000 mm al año (Saravia, 1993).

La distribución de las especies está fuertemente influenciada no sólo por factores abióticos, sino también por factores bióticos que condicionan el espacio en el cual éstas pueden existir (Holt, 2009), y ambos constituyen lo que fuera denominado como nicho por Hutchinson (1957). Cuando tales variables son tomadas en cuenta para inferir patrones o modelar distribuciones de especies, es muy común la tendencia a que prevalezcan los factores climáticos por sobre las interacciones bióticas, posición criticada por Davis *et al.* (1998) y Leathwick (2002), entre otros. Sobre esta base, Pearson y Dawson (2003) y Pearson *et al.* (2004) proponen un marco jerárquico, en el cual el clima tendría un rol dominante a escala regional y continental, mientras que las interacciones bióticas lo tendrían a nivel local. Algo similar proponen Paruelo *et al.* (1998) para Patagonia, quienes introducen a los factores edáficos como estructurantes a microescala.

Resulta interesante analizar diferentes características edáficas cuando se estudia la relación del ambiente respecto a hongos micorrícicos ya que existen fuertes evidencias de que los nutrientes y otras características del suelo, junto con la comunidad vegetal con la cual éstos se asocian, afectan la distribución y abundancia de HMA, así como el desarrollo de sus hifas, la colonización de raíces y la germinación de sus esporas (Smith y Read, 2008; Camargo-Ricalde, 2002; Kivlin *et al.*, 2011).

Dado que todos estos factores influyen en la dinámica de los ecosistemas, interesa entonces evaluar su importancia como agentes estructurantes de la diversidad genética. Por ello, el objetivo del presente capítulo es caracterizar el gradiente climático (temperatura y precipitación) y el gradiente edáfico en el que se encuentra distribuida *A. uniflora*, para luego analizar el efecto de estas variables en la diversidad genética de la especie, así como también en la de sus HMA asociados. Ello, sin perder de vista la evidente interrelación existente entre ambas partes del par micoheterotrófico. Respecto a ellos, McKendrick *et al.* (2000) y Waterman *et al.* (2013) sostienen que la distribución de las plantas micoheterotróficas se encuentra delimitada por los requerimientos ambientales del simbionte fúngico.

#### MATERIALES Y MÉTODOS:

**Modelado predictivo de nicho ecológico (MNE).** Sobre la base de los datos geográficos donde la especie se encuentra distribuida y datos climáticos globales, se puede cuantificar la identidad ambiental y climática que caracteriza a una especie (Nakazato *et al.*, 2010). A partir de diferentes fuentes de información como referencias de herbarios y citas bibliográficas, se confeccionó una base de datos con las coordenadas geográficas de aquellos sitios con información fehaciente de presencia de *A. uniflora*, las cuales totalizaron 50 localidades. Estos datos fueron utilizados para conocer, mediante un modelado predictivo del nicho climático de la especie, la correlación de cada punto geográfico de presencia actual de *A. uniflora* con los 19 parámetros bioclimáticos actuales disponibles en WorldClim Global Climate GIS ([www.worldclim.org](http://www.worldclim.org)), utilizando los programas DIVA-GIS y MaxEnt. Mediante

este análisis se pudo detectar cuáles variables bioclimáticas fueron más importantes en la distribución potencial de la especie.

**Variables ambientales.** Las coordenadas geográficas y la altitud de cada población muestreada fueron registradas mediante GPS (Tablas 1 y 4). A través de la información disponible en la base de datos WorldClim utilizada en el MNE, se adquirieron las variables bioclimáticas de cada localidad con una resolución espacial de 1 km<sup>2</sup>. De las 19 variables bioclimáticas se seleccionaron los promedios de temperatura y precipitaciones anuales (TA y PA, respectivamente), la temperatura y la precipitación de los cuatrimestres más cálidos (TPC y PPC, respectivamente), fríos (TPF y PPF, respectivamente), secos (TPS y PPS, respectivamente) y húmedos (TPH y PPH, respectivamente), debido a la fácil interpretación biológica de estas variables (Tabla 6). Para caracterizar las condiciones edáficas, en cada lugar se tomó una muestra de suelo de aproximadamente 500 g, a una profundidad de 15 cm. En cada una de éstas, el valor de pH, carbono orgánico (C), nitrógeno (N), potasio (K), fósforo (P), y porcentajes de arena y de limo (Ar, Li; respectivamente) fueron determinados en el Laboratorio de Suelos de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (UNC; Tabla 6).

Estas variables ambientales fueron relacionadas con la latitud, la longitud y la altitud registrada en cada localidad mediante regresiones lineales. Además, cada tipo de variable (precipitaciones, temperaturas y condiciones edáficas) se resumió mediante análisis de componentes principales (ACP), tratándolas todas juntas (temperatura + precipitaciones + edáficas, factor ambiental), agrupando las climáticas (temperatura + precipitaciones, factor climático) y las tres por separado. Estos análisis se llevaron a cabo en InfoStat.

Se tomaron los valores de los dos primeros componentes de cada ACP realizado (correspondientes a variables de temperatura, precipitaciones y edáficas, de forma separada) para utilizarlos como variables ambientales resumen, las que se contrastaron con las diversidades nucleotídicas (de *A. uniflora* y de sus HMA asociados, de forma separada) a través de regresiones lineales en InfoStat. Del mismo modo, para analizar la asociación de cada variable climática y edáfica sobre la diversidad genética, se llevaron a cabo regresiones lineales entre las diversidades

nucleotídicas de cada parte del par micoheterotrófico y cada variable ambiental por separado.

Por último, para analizar el efecto de los factores ambientales (juntos o individualmente) sobre la diversidad genética de *A. uniflora* y de sus HMA asociados, se realizó un análisis multivariado de redundancia (RDA) mediante el paquete Vegan (Oksanen, 2008) implementado en el programa R v.2.13.2 (R Development Core Team, 2007). El RDA es un método de ordenación multivariada (terBraak y Smilauer, 2002) donde se utilizaron como variables predictoras a todos los condicionantes ambientales y como variables respuesta la diversidad nucleotídica de ambos pares interactuantes.

## RESULTADOS:

**Variables ambientales en el rango de distribución de *A. uniflora*.** Las condiciones ambientales analizadas (Tabla 6) fueron muy variables a lo largo de los sitios muestreados. Así, la temperatura y la precipitación media anual varió de 4° a 16,8° C y de 665 a 2.143 mm, respectivamente (Tabla 6). Entre los factores bioclimáticos más variables, la temperatura de la estación más fría (TPF) y las precipitaciones de la estación más cálida (PPC) fueron los de mayores valores para temperatura y precipitaciones, con coeficientes de variación de 89,6 y 62,5, respectivamente. En relación con los caracteres edáficos, la concentración de P fue el más variable, desde 0,4 hasta 114,7 ppm (CV= 156,2).

El modelado predictivo de nicho climático para la distribución actual de *A. uniflora* (Fig. 24) reflejó con relativa fidelidad el rango conocido para la especie, marcando altas probabilidades de ocurrencia en todo el bosque andino-patagónico. En relación a los sitios bolivianos, también marcó altas probabilidades en zonas cercanas a los datos de presencia y, en menor medida modeló la existencia de la especie ascendiendo hacia el Norte por la ladera oriental de los Andes, donde nunca ha sido encontrada. La probabilidad de ocurrencia en las islas Malvinas fue relativamente baja para todo el archipiélago de forma uniforme. Los sitios de máxima probabilidad se localizaron en la zona costera de Chile entre los 35° y 37,5° S. Las

variables bioclimáticas que mayor influencia tuvieron sobre el MNE fueron las precipitaciones de la estación más fría (34,8%), la temperatura del mes más cálido (26,9%), la precipitación anual (20,6%) y, en menor medida, las precipitaciones de la estación más seca (7,6%); el resto de las 19 variables contribuyeron en un porcentaje cercano al 1%.

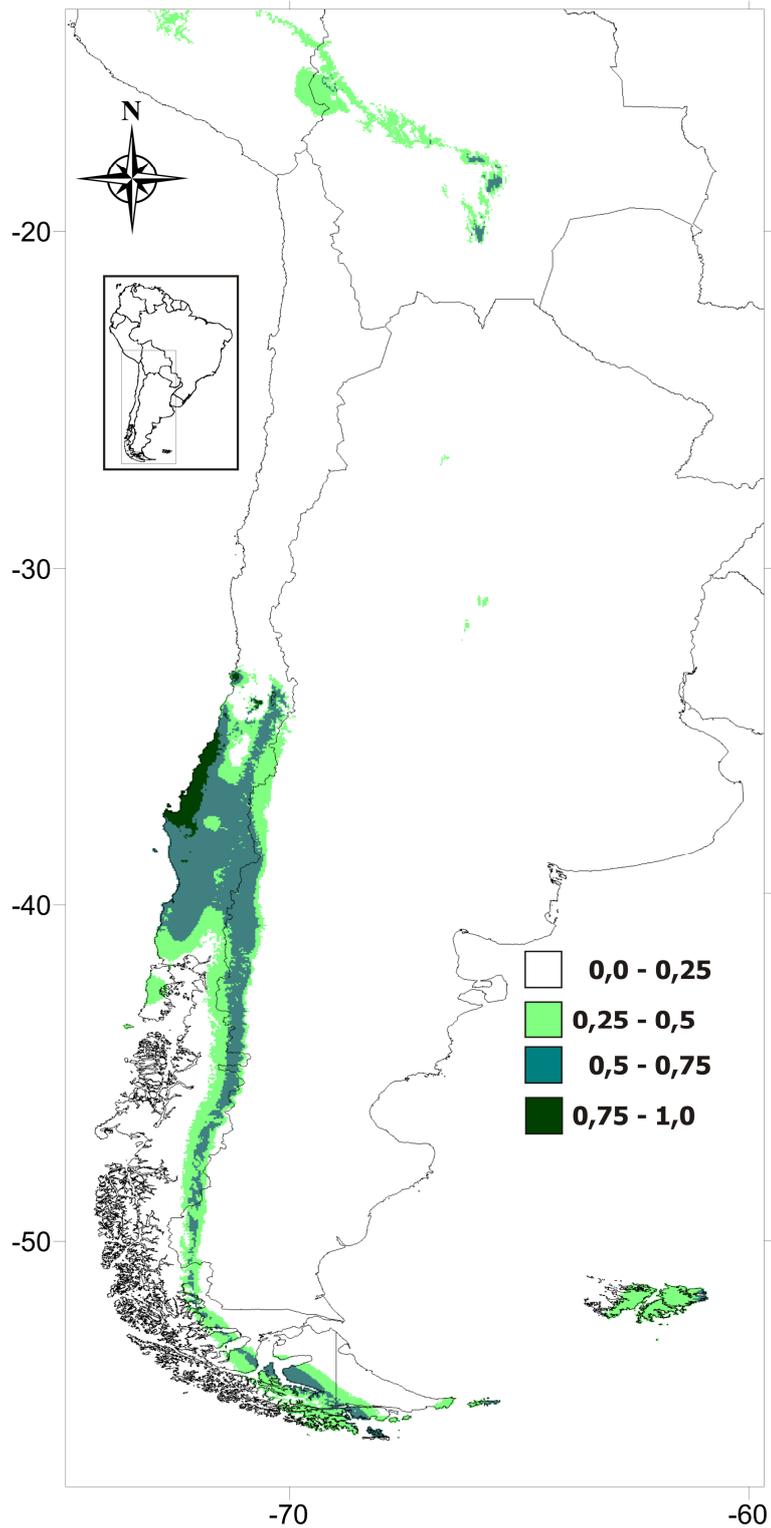
Las regresiones lineales realizadas para conocer la asociación entre las variables ambientales (temperatura, precipitaciones y condiciones edáficas) con la latitud, longitud y altitud de los diferentes sitios muestreados, mostraron diferentes patrones (Figs. 25-27). La latitud mostró una asociación negativa y significativa con todas las variables de temperatura, aunque TA, TPF y TPC (temperaturas anual, del periodo más frío y del más cálido, respectivamente) fueron las que tuvieron mayores coeficientes de regresión (0,77; 0,7 y 0,69; respectivamente; Fig. 25); también fue negativa y significativa su asociación con dos variables de precipitaciones de los periodos más húmedo y más cálido (PPH y PPC, respectivamente; Fig. 26) y se asoció positivamente con las precipitaciones en el período seco (PPS; Fig. 26) y con el pH del suelo (Fig. 27). La longitud mostró asociaciones significativas y negativas para TA, TPH y TPF entre las variables de temperatura (Fig. 25), sólo para una variable de precipitaciones, correspondiente al periodo más cálido (PPC; Fig. 26) y para una de suelo (porcentaje de arena; Fig. 27); las asociaciones positivas correspondieron a PPS, PPF, pH y Li, y las más destacadas fueron la temperatura del periodo más húmedo (TPH), las precipitaciones del periodo más cálido (PPC) y el pH del suelo ( $R^2= 0,44$ ,  $R^2= 0,48$  y  $R^2= 0,56$ , respectivamente). La altitud se asoció significativa y positivamente con sólo una variable de temperatura (TPH; Fig. 2), una variable de precipitaciones (PPC; Fig. 3) y una de características del suelo (Ar; Fig. 4); las asociaciones negativas fueron con las precipitaciones de los periodos más secos (PPS) y más fríos (PPF) y con el pH y el porcentaje de arena (Ar) del suelo. Las Figs. 25, 26 y 27, sólo muestran las regresiones que resultaron significativas.

**Tabla 6:** Sitios de muestreo y sus códigos de nombres (donde A es Argentina, B, Bolivia y C, Chile), y las variables ambientales (caracteres de temperatura, precipitaciones, y características edáficas) de los sitios muestreados donde crece *A. uniflora*. Tales variables son: temperaturas y precipitaciones anuales promedio (TA y PA, respectivamente), temperatura y precipitación de la estación más húmeda (TPH y PPH, respectivamente), más seca (TPS y PPS, respectivamente), más cálida (TPC y PPC, respectivamente) y más fría (TPF y PPF, respectivamente); porcentajes de carbono orgánico (C), nitrógeno (N), arena (Ar) y limo (Li); valores de fósforo (P; en ppm), potasio (K; en meq/100g) y pH.

		Temperatura					Precipitaciones					Características edáficas						
		TA	TPH	TPS	TPC	TPF	PA	PPH	PPS	PPC	PPF	C	N	P	pH	K	Ar	Li
VAG	Valle Grande (B)	16,1	18,0	13,5	18,0	13,5	787	409	39	409	39	8,2	0,57	4,1	4,2	0,7	81,8	14,1
PPG	Pampa Grande (B)	16,8	18,9	14,1	18,9	14,1	928	475	44	475	44	10,9	0,71	23,8	5,0	0,7	76,8	14,1
COR	Corel (C)	12,2	7,2	18,4	18,4	6,5	1055	611	44	44	571	2,5	0,22	6,6	5,9	0,7	56,8	22,4
QUI	Quillón (C)	14,4	10,4	19,1	19,7	9,6	1099	648	51	54	586	7,2	0,62	25,2	6,4	1,6	78,2	18,6
HUA	Hualpén (C)	13,2	10,6	16,7	16,7	10,0	893	495	49	49	461	6,4	0,52	4,7	5,9	1,7	43,6	27,2
AAN	Alto Antuco (C)	9,1	4,7	13,9	14,5	4,2	1606	854	113	113	794	11,0	0,82	0,9	6,1	0,5	45,0	40,0
CNI	Cerro Ñielol (C)	12,4	8,7	16,8	17,0	8,2	1244	578	126	127	534	7,6	0,64	7,1	6,0	1,3	32,9	51,0
LLA	Llancalil (C)	8,8	4,7	13,6	13,6	4,2	1590	769	142	142	737	13,2	1,05	0,8	5,8	0,5	52,8	31,6
RCH	Lago Ruca Choroy (A)	5,6	1,1	10,8	10,8	0,7	828	417	69	69	406	16,0	1,45	4,3	5,9	0,6	63,3	26,4
LNE	Los Nevados (C)	9,2	5,4	13,9	14,0	4,9	1929	912	179	179	878	8,8	0,73	0,8	5,9	0,4	53,5	36,6
PLP	La Peña (C)	10,8	7,5	14,7	14,9	6,9	2143	1040	172	190	1006	9,2	0,76	0,9	5,7	0,3	51,4	35,4
LOL	Lago Lolog (A)	6,7	1,4	12,2	12,2	1,4	911	426	95	95	426	9,0	0,75	3,6	5,70	0,4	70,6	24,6
LAV*	Laguna Verde, La Angostura (A)	8,7	4,2	14,0	14,0	3,8	1540	686	193	193	645	-	-	-	-	-	-	-
BAR	Bariloche (A)	8,6	3,9	14,0	14,0	3,5	1289	617	160	160	549	4,8	0,4	0,4	5,9	0,2	69,8	22,2
PEM	Co. P. Moreno, El Bolsón (A)	8,7	3,9	14,3	14,3	3,2	1131	523	120	120	492	9,2	0,8	0,5	6,2	0,5	61,7	27,1
CHO	Cholila (A)	7,8	3,1	13,1	13,1	2,4	1027	466	122	122	446	9,0	0,7	3,2	6,3	0,4	64,2	26,6
ALE	P.N. Los Alerces (A)	8,7	4,1	13,5	14,0	3,5	1037	462	133	133	443	5,8	0,5	4,7	5,5	0,9	53,5	25,0

NIN	Laguna Los Niños (A)	6,1	1,4	10,8	11,3	0,9	710	286	102	102	262	-	-	-	-	-	-	-
FON	Lago Fontana (A)	5,7	1,0	10,6	10,6	0,4	716	282	109	109	255	6,2	0,5	70,5	6,4	0,6	77,8	18,0
FIZ	Fitz Roy, El Chaltén (A)	4,0	4,0	7,6	8,4	-0,6	923	280	192	204	244	7,0	0,6	48,9	5,95	0,5	65,4	27,4
GLA	P.N. Los Glaciares (A)	5,6	5,5	6,1	10,1	0,8	736	220	158	166	192	4,7	0,4	114,7	6,4	1,1	65,8	24,0
PAI	P.N. Torres del Paine (C)	6,1	6,0	6,5	10,1	1,7	1067	310	237	260	260	9,1	0,75	24,3	6,4	0,5	57,8	34,4
BUL	Fuerte Bulnes (C)	5,1	5,2	5,0	8,6	1,6	725	220	154	178	173	9,9	0,78	40,5	5,6	1,1	49,8	34,2
CAM	Puerto Cameron (C)	6,0	6,1	5,9	9,5	2,5	670	204	126	167	173	8,4	0,68	10,2	4,8	0,7	58,8	27,8
RED	Isla Redonda (A)	5,0	5,2	3,6	8,4	1,5	665	189	136	171	164	31,9	2,10	9,1	6,4	1,2	-	-
	Promedio	8,9	6,1	12,2	13,5	4,4	1101	505	121,2	158,3	441,6	9,39	0,74	17,8	5,8	0,7	60,5	27,7
	CV	39,4	73,0	34	24,8	89,6	35,7	46,1	43,2	62,5	57,9	60,5	51,5	156,2	9,5	54,7	20,6	31,2
	Min	4	1	3,6	8,4	-0,6	665	189	39	44	39	2,5	0,22	0,4	4,2	0,16	32,9	14,1
	Max	16,8	18,9	19,1	19,7	14,1	2143	1040	237	475	1006	31,9	2,1	114,7	6,4	1,7	81,8	50,9

Estadísticos



**Figura 24:** Distribución potencial de *A. uniflora* bajo el escenario climático actual, obtenida mediante modelado de nicho ecológico a partir de las 19 variables bioclimáticas establecidas por Hijmans *et al.* (2005). Las referencias, y sus colores asociados, indican la probabilidad de persistencia de la especie en el sitio.

El análisis de componentes principales (ACP; Fig. 28) que en mayor medida explicó la variabilidad existente fue el referido a temperatura (CP1= 0,83 y CP2= 0,16; Fig. 28A). En segundo lugar se encontraron las variables de precipitaciones (CP1= 0,59 y CP2= 0,23; Fig. 28B), posteriormente ambas variables climáticas juntas (temperatura y precipitaciones; CP1= 0,51 y CP2= 0,31; Fig. 28D), luego de ésta, las variables edáficas (CP1= 0,36 y CP2= 0,27; Fig. 28C), y por último el ACP que reúne a todas las variables ambientales (CP1= 0,33 y CP2= 0,27; Fig. 28E).

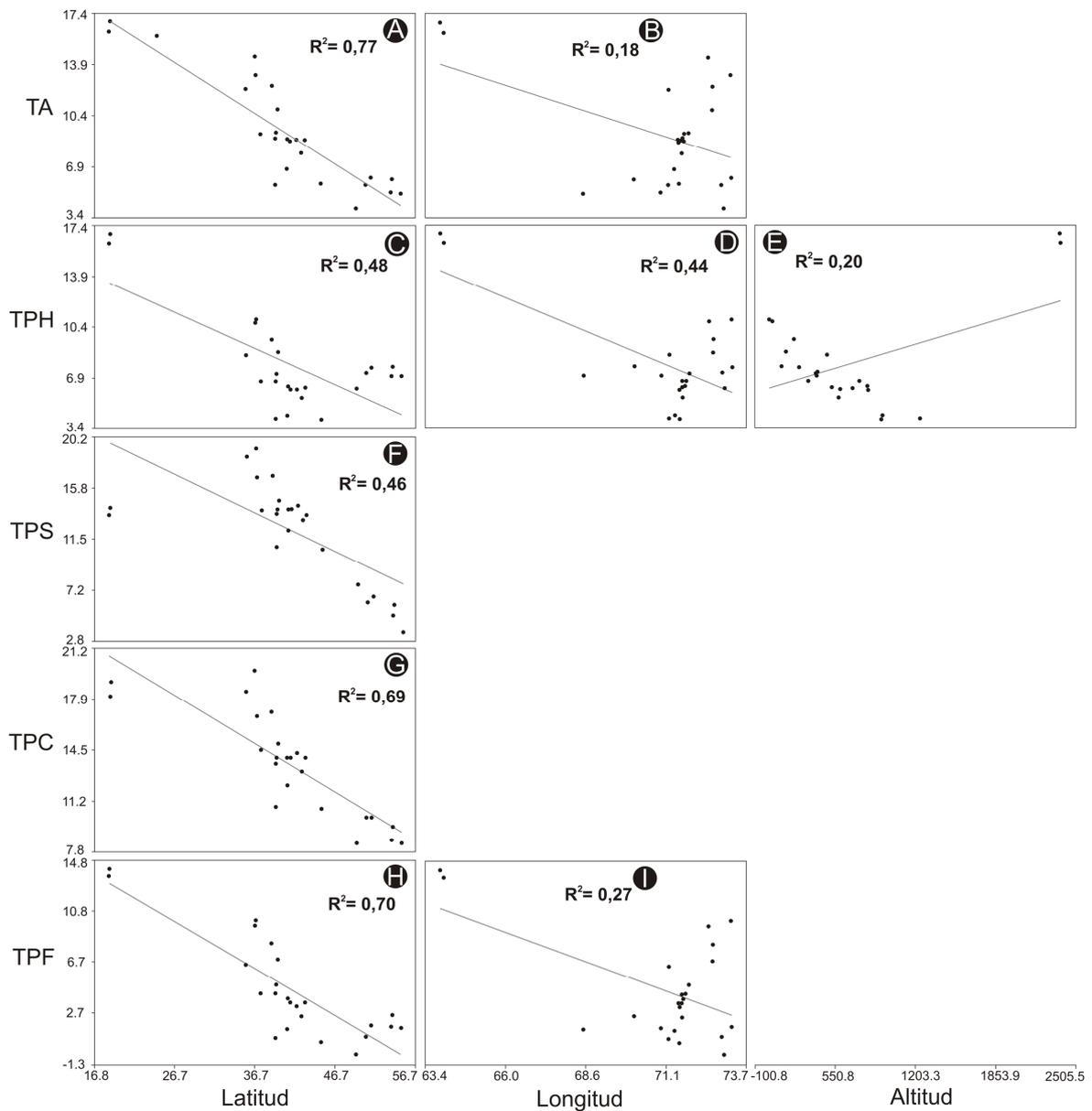
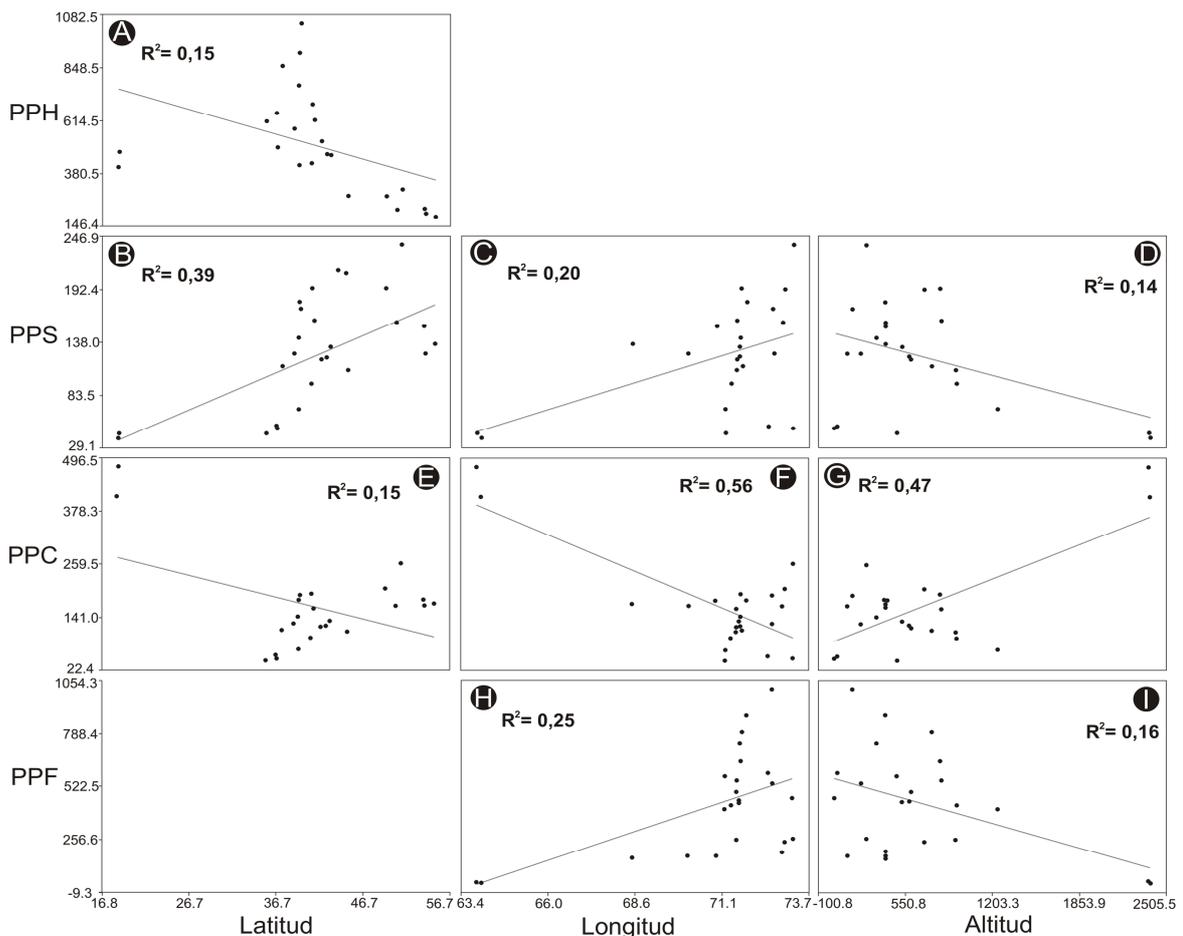


Figura 25: Continúa en la siguiente página.

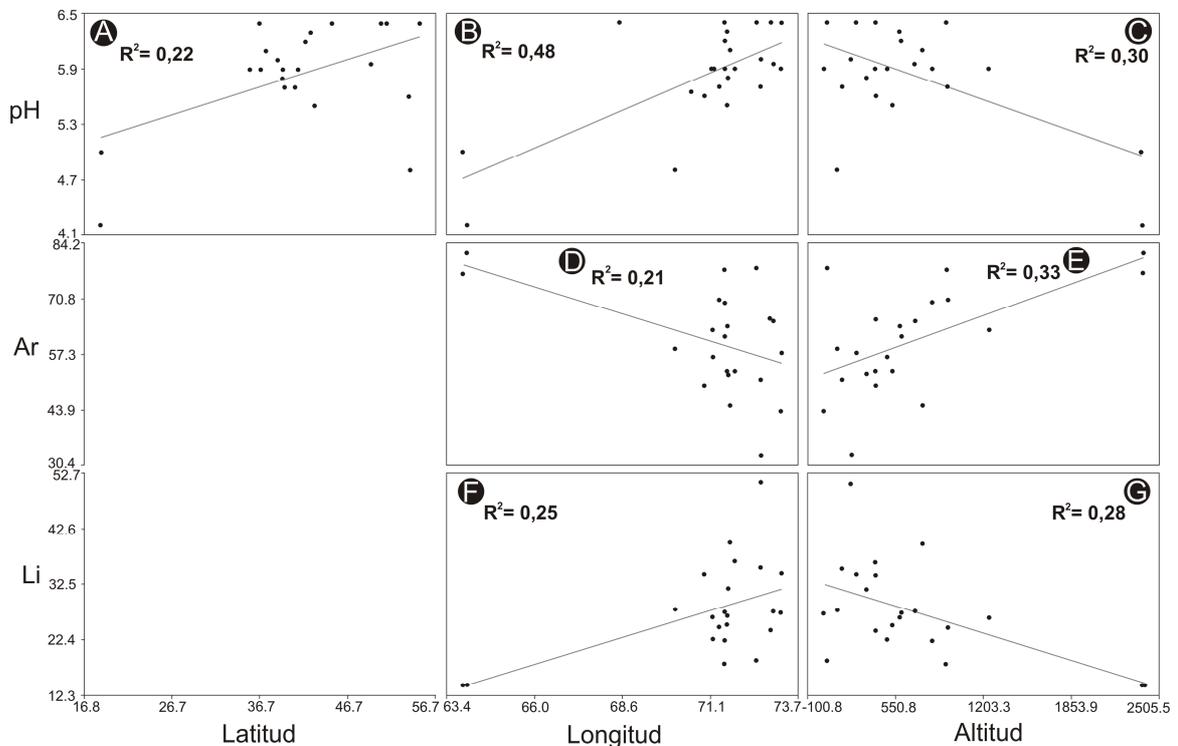
**Figura 25 (cont.):** Regresiones lineales simples donde se relacionan las variables de temperatura listadas en la Tabla 6, con las coordenadas geográficas y la altura de los sitios de muestreo. Los coeficientes de regresión se muestran en cada gráfico. Sólo se graficaron las regresiones que resultaron significativas ( $p < 0.05$ ).

Las variables de temperatura que más se destacaron fueron TA, TPF y TPC, en el primer componente y TPS, TPH en el segundo (Fig. 28A). Para precipitaciones, las variables más significativas fueron PPF, PA y PPH (en CP1) y PPC y PPS (en CP2; Fig. 28B). Las variables edáficas más influyentes fueron N y C para el primer eje de variación, y Ar y Li en el segundo, junto con pH algo menos relevante (Fig. 28C). Tanto cuando se analizó el conjunto de las variables climáticas (Fig. 28D), como cuando se estudiaron todas las variables juntas (ambientales; Fig. 28E) resultaron representadas en el primer eje de variación representantes de temperatura y en el segundo componente a precipitaciones. Los autovectores que indican las variables de mayor influencia sobre cada ACP se muestran en la Tabla 7.



**Figura 26:** Continúa en la siguiente página.

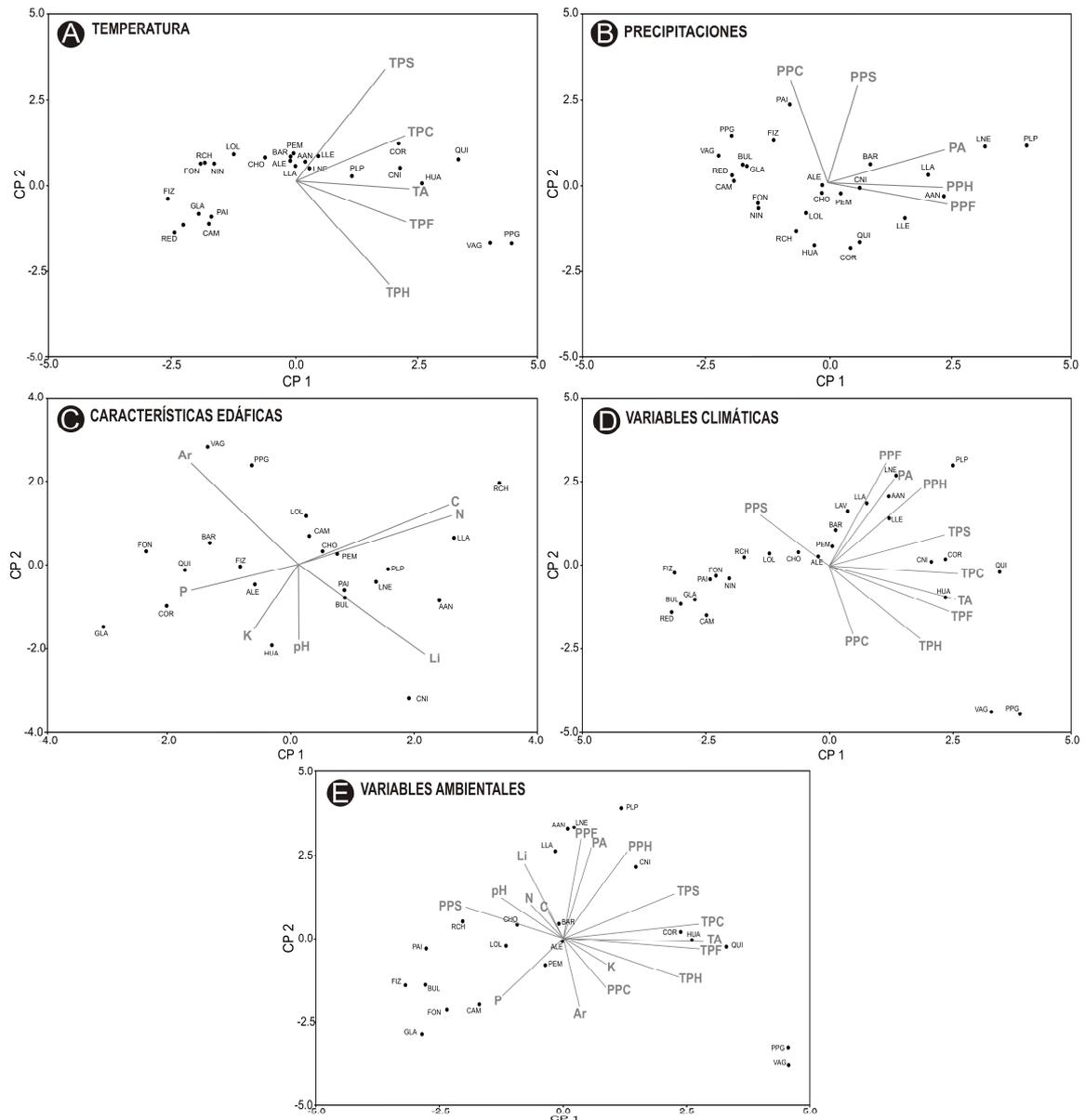
**Figura 26 (cont.):** Regresiones lineales simples donde se relacionan las variables de precipitaciones listadas en la Tabla 6, con las coordenadas geográficas y la altura de los sitios de muestreo. Los coeficientes de regresión se muestran en cada gráfico. Sólo se graficaron las regresiones que resultaron significativas ( $p < 0.05$ ).



**Figura 27:** Regresiones lineales simples donde se relacionan las variables ambientales listadas en la Tabla 6, con las coordenadas geográficas y la altura de los sitios de muestreo. Los coeficientes de regresión se muestran en cada gráfico. Sólo se graficaron las regresiones que resultaron significativas ( $p < 0.05$ ).

**Influencia de las variables ambientales en la diversidad genética de *A. uniflora* y de sus simbioses fúngicos.** Las regresiones lineales realizadas para evaluar la asociación de cada variable ambiental individual con la diversidad genética de *A. uniflora* resultaron no significativas, a excepción de la variable de pH del suelo, cuyo índice de regresión fue negativo y estuvo significativamente relacionado a la diversidad, con  $R^2 = 0,13$  ( $p = 0,048$ ; Fig. 29). Por su parte, las regresiones lineales efectuadas con la diversidad nucleotídica fúngica (Fig. 30) mostraron algunas asociaciones significativas. Dentro de las variables relacionadas con la temperatura, TA ( $R^2 = 0,24$ ;  $p = 0,0092$ ), TPH ( $R^2 = 0,24$ ;  $p = 0,009$ ), TPC ( $R^2 = 0,15$ ;  $p = 0,036$ ) y TPF

( $R^2= 0,27$ ;  $p= 0,006$ ) estuvieron positiva y significativamente asociadas a la diversidad de HMA (Fig. 30A-D). Una variable relacionada con las precipitaciones (PPS;  $R^2= 0,26$ ;  $p= 0,006$ ) y una relativa a las características edáficas (pH;  $R^2= 0,24$ ;  $p= 0,011$ ) estuvieron asociadas significativa y negativamente con la diversidad genética de los HMA (Fig. 30E-F). Para ambas diversidades (Figs. 29 y 30), sólo se muestran las regresiones significativas.



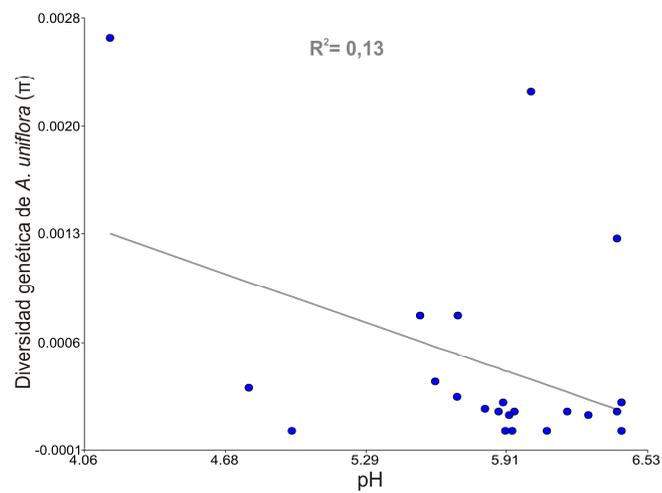
**Figura 28:** Análisis de componentes principales de las variables ambientales relevadas para caracterizar las poblaciones de *A. uniflora* muestreadas. Las mismas se reunieron en tres grupos: A) temperatura, B) precipitaciones, C) características edáficas, D) variables climáticas (temperatura y precipitaciones) y E) variables ambientales (temperatura, precipitaciones y edáficas). Las unidades de medida de cada variable se expresan en la Tabla 6.

**Tabla 7:** Autovectores obtenidos para cada variable ambiental utilizada en los análisis de componentes principales, mostrados en la Fig. 28.

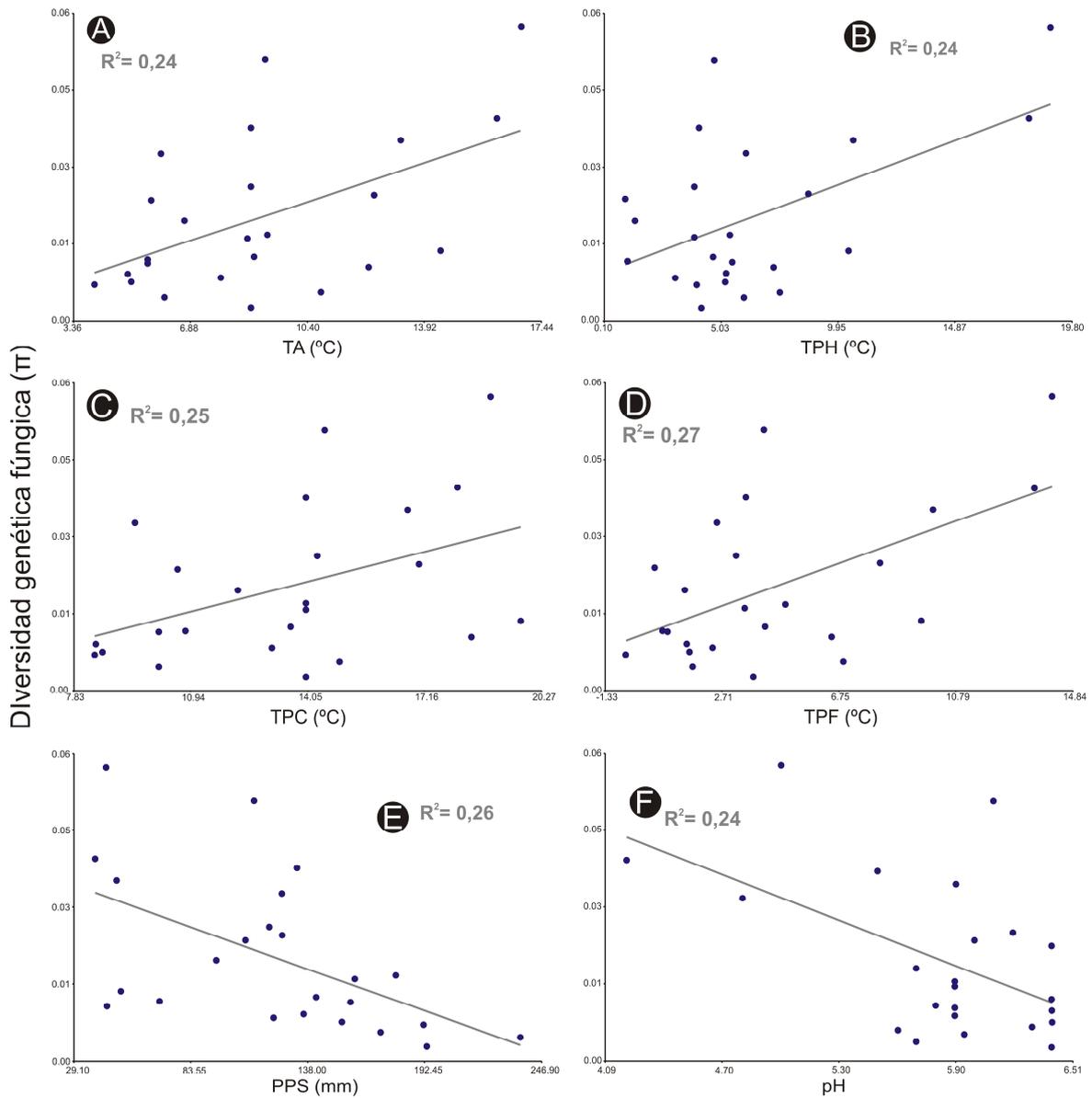
	Variables	CP1	CP2
Factor Temperatura	TA	<b>0,49</b>	-0,05
	TPH	0,4	<b>-0,63</b>
	TPS	0,38	<b>0,68</b>
	TPC	<b>0,47</b>	0,28
	TPF	<b>0,48</b>	-0,25
Factor Precipitaciones	PA	<b>0,56</b>	0,22
	PPH	<b>0,55</b>	-0,03
	PPS	0,14	<b>0,67</b>
	PPC	-0,18	<b>0,7</b>
	PPF	<b>0,57</b>	-0,14
Factor Edáfico	C	<b>0,51</b>	0,32
	N	<b>0,52</b>	0,27
	P	-0,36	-0,14
	pH	1,80E-03	-0,4
	K	-0,15	-0,35
	Ar	-0,36	<b>0,54</b>
	Li	0,43	<b>-0,48</b>
Factor Climático	TA	<b>0,42</b>	-0,16
	TPH	0,3	-0,36
	TPS	<b>0,39</b>	0,16
	TPC	<b>0,43</b>	-0,04
	TPF	<b>0,4</b>	-0,22
	PA	0,22	<b>0,43</b>
	PPH	0,31	0,38
	PPS	-0,23	0,25
	PPC	0,08	-0,34
	PPF	0,19	<b>0,51</b>
	Factor Ambiental	C	-0,05
N		-0,1	0,15
P		-0,18	-0,26
pH		-0,18	0,18
K		0,13	-0,11
Ar		0,05	-0,3
Li		-0,12	0,33
TA		<b>0,42</b>	-0,01
TPH		0,35	-0,17
TPS		0,33	0,2
TPC		<b>0,41</b>	0,06
TPF		<b>0,41</b>	-0,05
PA		0,08	<b>0,41</b>
PPH		0,19	<b>0,39</b>
PPS		-0,29	0,14
PPC	0,13	-0,21	
PPF	0,05	<b>0,44</b>	

Las regresiones lineales realizadas con los CP1 y CP2 de las variables de temperatura, precipitación y el componente edáfico, respecto de la diversidad genética, tanto de la planta como de sus hongos asociados, se muestran en la Fig. 31. No existió asociación entre las variables abióticas resumidas en los ACP y la

diversidad genética nucleotídica de *A. uniflora*, y sus  $R^2$  promediaron así, valores de cero (Fig. 31A-C). Por su parte, las regresiones realizadas con las variables ambientales resumen y la diversidad nucleotídica de los HMA resultó positiva y significativa únicamente para el CP1 de temperatura ( $R^2= 0,25$ ;  $p= 0,01$ ; Fig. 31D). Tanto las precipitaciones como las características edáficas resultaron no significativas y sus valores de  $R^2$  estuvieron cercanos a cero (Fig. 31E-F). Todos los segundos componentes de las variables ambientales estuvieron no significativamente relacionados a ambas diversidades genéticas, y por ello no fueron graficados.



**Fig. 29:** Relación entre la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de *A. uniflora* y la variable ambiental que resultó significativa: pH del suelo.

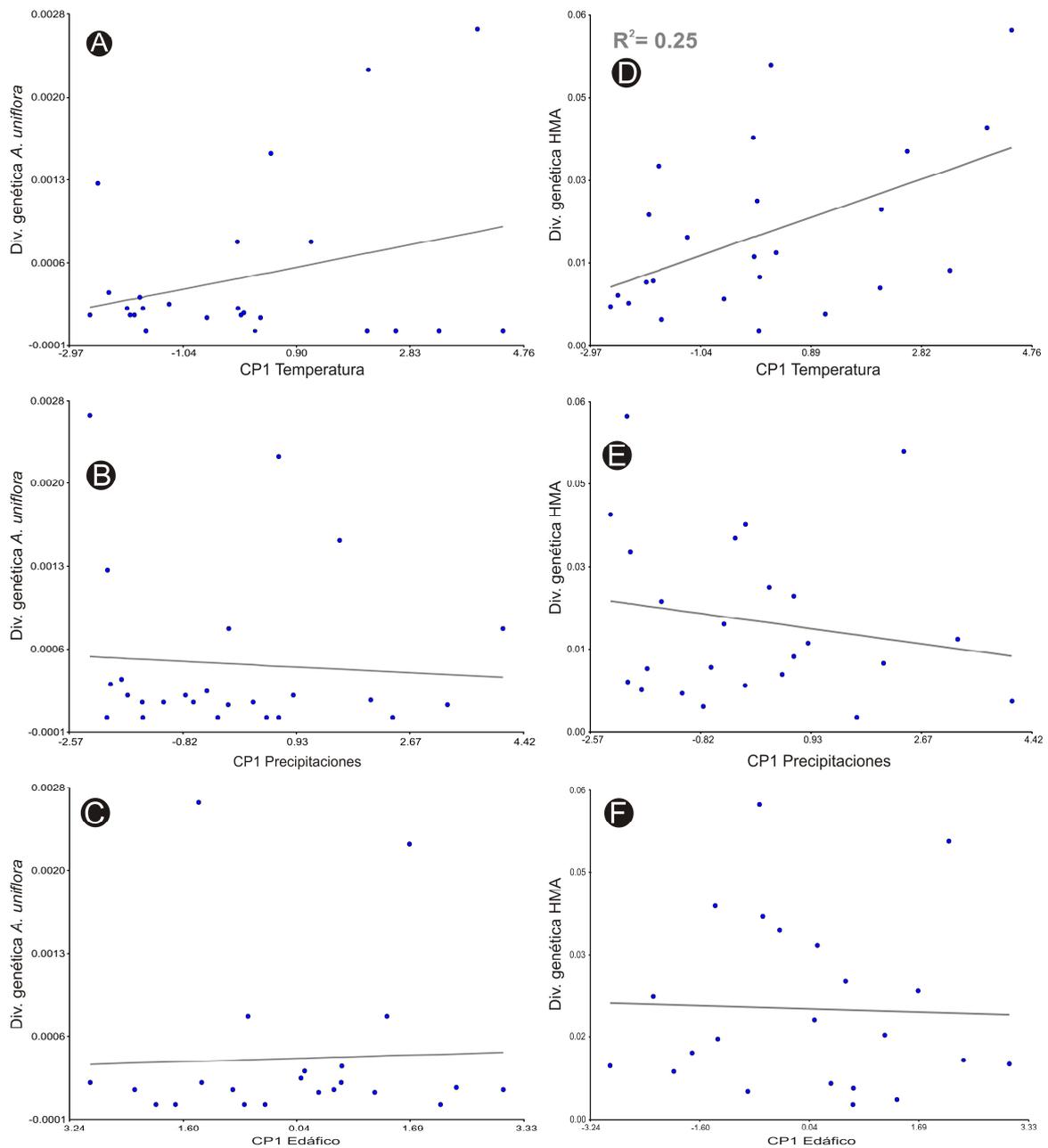


**Fig. 30:** Relación entre la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) de los hongos micorrícicos arbusculares asociados a *A. uniflora* y las variables ambientales tomadas en cada sitio y señaladas en la Tabla 6. Sólo se muestran las regresiones que resultaron significativas. A) Temperatura anual. B) Temperatura media durante la estación más húmeda. C) Temperatura media durante la estación más cálida. D) Temperatura media durante la estación más fría. (E) Precipitaciones durante la estación más seca. F) pH del suelo.

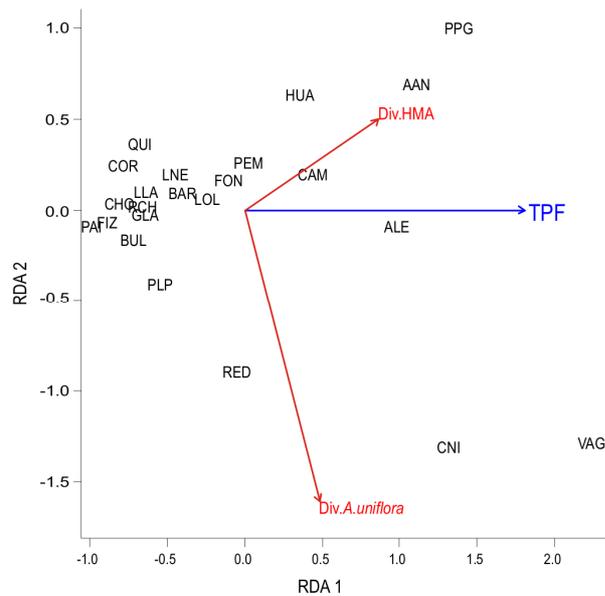
El análisis multivariado conjunto (RDA) para las diversidades nucleotídicas ( $\pi$ ) de *A. uniflora* y de sus HMA asociados, mostró a la temperatura del período más frío (TPF) como el único factor que pudo explicar conjuntamente y de forma significativa ( $p= 0,015$ ) ambas diversidades genéticas; relación que además resultó positiva (Fig. 32). Otros factores ambientales que resultaron relevantes en la influencia sobre  $\pi$ , aunque no resultaron significativos ( $p> 0,05$ ) fueron el pH del suelo, la temperatura del período más cálido (TPC) y las precipitaciones del período más frío (PPF). Se observó además, que la temperatura del período más frío (TPF) guardó más relación con la diversidad de HMA y que las poblaciones que más contribuyeron en la diversidad del par micoheterotrófico fueron ALE, CAM, AAN, PPG, VAG y CNI.

#### DISCUSIÓN:

El modelado predictivo de nicho ecológico reprodujo la distribución conocida para *A. uniflora* en los bosques andino-patagónicos, alcanzando los límites del rango esperados, dados por la fisonomía de las comunidades que la acompañan. En las inmediaciones de los sitios de Bolivia, sin embargo, este modelado mostró una distribución algo extendida (aunque menos probable) por áreas más septentrionales a las conocidas, que podría suponer una falta de exploración del hábitat, producto de la forma de vida tan particular de *A. uniflora* que se hace visible en la superficie apenas un mes durante el año; sin embargo, puede que esto sólo se haya debido a una sobreestimación de su nicho climático por parte del análisis, debido a que en el modelo no se incluyen factores distintos de los climáticos, como las interacciones bióticas (Davis *et al.*, 2008; Brooker *et al.*, 2009), es decir que si bien el modelo predice áreas climáticamente apropiadas, tal vez estas condiciones no lo son para sus HMA asociados. Un patrón semejante se observó para las islas Malvinas, cuya distribución modelada cubre completamente las islas, aunque con probabilidades relativamente bajas.



**Figura 31:** Relación entre la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y el primer eje resumen de la variación obtenido mediante los análisis de componentes principales para temperatura, precipitaciones y factores edáficos. A-C) Para *A. uniflora*. D-F) Para los hongos micorrícicos arbusculares asociados a *A. uniflora*. A) y D) Componente principal de la temperatura. B) y E) Componente principal de las precipitaciones. C) y F) Componente principal de las características edáficas.



**Fig. 32:** Análisis multivariado de redundancia, donde las diversidades nucleotídicas (de *A. uniflora* y de sus HMA asociados) son las variables respuesta y los condicionantes ambientales son las predictoras.

Explicaron este modelado una alta proporción de variables relacionadas con las precipitaciones totales e invernales, y la temperatura del mes más cálido; este último coincidente con la etapa de floración de la especie (las tres variables sumaron el 82,3%). Se observó entonces que la estacionalidad climática es un factor modelador de la distribución de *A. uniflora*, como fue indicado por León *et al.* (1998) y Paruelo *et al.* (1998) para Patagonia. De forma similar, la caracterización ambiental de las poblaciones muestreadas fue explicada principalmente por las variables de temperatura y precipitaciones, siendo poco relevantes las características edáficas de cada sitio. Ello se observó en el ACP, cuya variación fue bien resumida en los dos primeros ejes para la temperatura (99%) y las precipitaciones (82%), e incluso para ambas características climáticas juntas (82%) fueron más relevantes que para las edáficas (63% de la variación explicada en los primeros dos ejes). De cada tipo de variable ambiental, fueron más preponderantes TA, TPF y TPC para Temperatura, PPF, PA y PPH para Precipitaciones, y N y C entre las características edáficas. De forma similar, Pearson y Dawson (2003) y Hodkinson (1999) sostienen que la temperatura y las precipitaciones rigen la distribución de las especies a escala continental y/o regional; más radicalmente, Whittaker (1975) asevera que éstos son

exclusivamente los factores que operan a gran escala. La menor importancia que cobró el factor edáfico se relacionaría entonces con la relevancia local de las características del suelo como factores estructurantes (Paruelo *et al.*, 1998). De forma similar, la distribución clinal de las variables ambientales, esto es, de acuerdo a las coordenadas geográficas y la altitud, siguió el mismo patrón ya expuesto, donde la temperatura fue la que mostró un mejor ajuste latitudinal. Así, TA ( $R^2= 0,77$ ), TPC ( $R^2= 0,69$ ) y TPF ( $R^2= 0,7$ ) fueron los factores que mayores valores de regresión presentaron y fueron quienes mejor describieron la variación dentro del ACP para la temperatura. Con esto, se reafirma entonces que la temperatura sería el factor que más influye en la distribución de *A. uniflora*, la que a su vez presenta un patrón altitudinal; siendo las precipitaciones menos relevantes.

**Condicionantes ambientales de la diversidad genética.** El alto grado de diversidad biológica presente en los Andes está estrechamente relacionado con los suelos, precipitaciones, temperatura, variabilidad de los nichos ecológicos específicos, entre otras características ambientales que lo hacen una región con características exclusivas para el crecimiento de microorganismos, hongos, fauna y flora específica (Myers *et al.*, 2000; Herzog *et al.*, 2012). Sin embargo, la diversidad genética de *A. uniflora* presentó una escasa asociación con los factores ambientales evaluados, ya que sólo el pH del suelo guardó relación con la diversidad nucleotídica. Por su parte, la diversidad genética de los HMA sí presentó asociación con factores ambientales, como diferentes variables de temperatura, una correspondiente a precipitaciones (PPS) y con el pH del suelo.

Las comunidades donde crece *A. uniflora* se caracterizaron por valores de pH de ligeramente ácido a neutro (4,2-6,4), lo cual, como se indicó, estuvo relacionado con la diversidad genética de la especie. El pH es un factor determinante que afecta la disponibilidad de micronutrientes del suelo, los cuales incrementan su disponibilidad debido a cambios en los estados de oxidación y solubilidad, a medida que disminuye la alcalinidad del suelo (Lambers *et al.*, 2008). Aquellos sitios con menores valores de pH en sus suelos se correspondieron con ambos extremos de la distribución de *A. uniflora*, VAG y PPG en Bolivia y CAM en la isla de Tierra del Fuego. Resulta interesante, y a la vez congruente, que el pH cobre relevancia en las comunidades más

diversas de *A. uniflora*, ya que ello incrementa la disponibilidad de P para las plantas fotosintetizantes, moneda de intercambio en las asociaciones micorrícicas (Godo y Reisenauer, 1980; Oburger *et al.*, 2011); por consiguiente, será también beneficioso para *A. uniflora*.

En los HMA asociados a *A. uniflora*, la diversidad genética estuvo relacionada con diferentes factores ambientales. Los relacionados con la temperatura fueron TPF, TA, TPH y TPC y lo hicieron de forma positiva y significativa; en menor medida las variables edáficas y de precipitación se correlacionaron con la diversidad de HMA, estando sólo representadas por PPS (entre las variables de precipitación) y los valores de pH (de las variables edáficas), ambas condicionando de manera significativa y negativa. Existe conocimiento sobre la influencia de varios factores (como la temperatura, los nutrientes y características del suelo, el rango latitudinal, entre otros) sobre la distribución, la riqueza y la aptitud de los HMA (por ej. Green *et al.*, 1976; Koske, 1987; Porter *et al.*, 1987; Johnson *et al.*, 1991; Allen *et al.*, 1995; Lekberg *et al.*, 2007; Kivlin *et al.*, 2011; Davison *et al.*, 2015); incluso otros factores, como la comunidad en la que se desarrollan o requisitos particulares de las especies de HMA pueden también alterar estos patrones de diversidad (Camargo-Ricalde, 2002; Landis *et al.*, 2004; Kivlin *et al.*, 2011).

En línea con esta estrecha relación entre el patrón de temperatura y la diversidad de hongos en las raíces *A. uniflora*, Pirozynski (1968) sugiere que la temperatura es el factor principal que determina la distribución y ocurrencia de hongos. Green *et al.* (1976) incluso argumentan que el pH y la temperatura contribuyen de manera similar al patrón de distribución de los HMA, en concordancia con los resultados aquí obtenidos. En general, la temperatura tiene un efecto estimulante sobre los HMA (por ej. Schenck *et al.*, 1975; Koske, 1987; Hu *et al.*, 2013) permitiendo mayor absorción y transporte de P por parte de sus hifas (Gavito *et al.*, 2003). Lo hallado aquí en VAG, CAM, PPG, y ALE sugirió que con valores más ácidos del pH aumenta la diversidad genética de los HMA asociados a *A. uniflora*. Coughlan *et al.* (2000), encontraron que el aumento de la esporulación de HMA estaba correlacionado con una disminución de los valores de pH. En línea con esto, Anderson

y Liberta (1992) observaron que si bien la acidez disminuye la colonización, aumenta la esporulación.

Por último, el aumento de la diversidad de hongos asociados con *A. uniflora* se correlacionó con los sitios con baja precipitación durante la estación más seca. En los bosques andino-patagónicos, este período coincide con el tiempo de primavera-verano y en Bolivia con el otoño-invierno (el comienzo de ambas épocas se condice con la floración de *A. uniflora*). Se ha reportado el incremento en la colonización de HMA asociado a los momentos de mayor estrés hídrico (Sigüenza *et al.*, 1996; Lugo *et al.*, 2003; Bohrer *et al.*, 2004; Kennedy *et al.*, 2002), período que también fue correlacionado con los momentos de mayor densidad de esporas para diferentes ecosistemas (por ej. Mago y Mukerji, 1994; Carvalho *et al.*, 2001; Lugo y Cabello, 2002; Escudero y Mendoza, 2005; Sivakumar, 2013), en línea con los resultados aquí obtenidos para diversidad genética.

El análisis conjunto para ver la asociación entre las diversidades de *A. uniflora* y sus HMA asociados con las variables ambientales mostró que a mayores temperaturas durante el invierno (TPF) se favorecía la diversidad genética en ambos integrantes de la asociación; esta misma variable fue significativa también en los análisis parciales con la diversidad de HMA, sin embargo, no hubo asociación con la diversidad genética de *A. uniflora*. Por ello, es interesante observar que los beneficios de inviernos no tan crudos (esto es, mayor TPF) llevan a una mayor actividad fúngica, estimulando en ellos mayor absorción y transporte de P (Gavito *et al.*, 2003), lo cual resulta en condiciones beneficiosas para un mayor desarrollo y proliferación de la planta, que depende exclusivamente de los compuestos carbonados de los HMA a los que está asociado.

Es difícil identificar cuál de los miembros de una relación micoheterotrófica es quien selecciona el medio en el cual ambos se desarrollarán; en general, se entiende que los simbiontes fúngicos delimitan el hábitat que la especie alicorófito podrá ocupar (McKendrick *et al.*, 2000; Waterman *et al.*, 2013). En línea con esto, es interesante observar que la diversidad de hongos se asoció a múltiples factores ambientales, favorecida, en general, por mayores temperaturas; mientras que la perteneciente a *A. uniflora* apenas se vinculó débilmente a requerimientos de pH del

suelo. De forma conjunta, ambas diversidades se vieron incrementadas con mayores temperaturas durante los inviernos. De estos análisis se evidencia entonces, que los condicionantes ecológicos fúngicos serían también los que rigen conjuntamente para el par micoheterotrófico. Cobra cada vez más fuerza la idea de la multidimensionalidad de los factores que restringen la distribución de especies. Respecto a ello, Pearson y Dawson (2003) proponen que a escala regional y continental prevalece el ambiente climático (temperatura y precipitaciones), mientras que las interacciones biológicas tiene un mayor rol a escala microclimática. En el caso estudiado (particular, dada la fuerte interacción HMA/planta micoheterotrófica), surge entonces que para *A. uniflora*, más allá de los factores ambientales analizados, la interacción biológica que experimenta con sus HMA, sería el condicionante principal para su distribución, y estaría por lo tanto influenciada directamente por los factores ambientales que rigen sobre sus hongos asociados. Davis *et al.* (1998) arribaron a similares conclusiones y recomiendan la inclusión de variables bióticas en estudios de distribución.

*Patrones evolutivos comunes para  
el par micoheterotrófico.*



# CAPÍTULO IV



## **CAPÍTULO IV:** *Patrones evolutivos comunes para el par micoheterotrófico.*

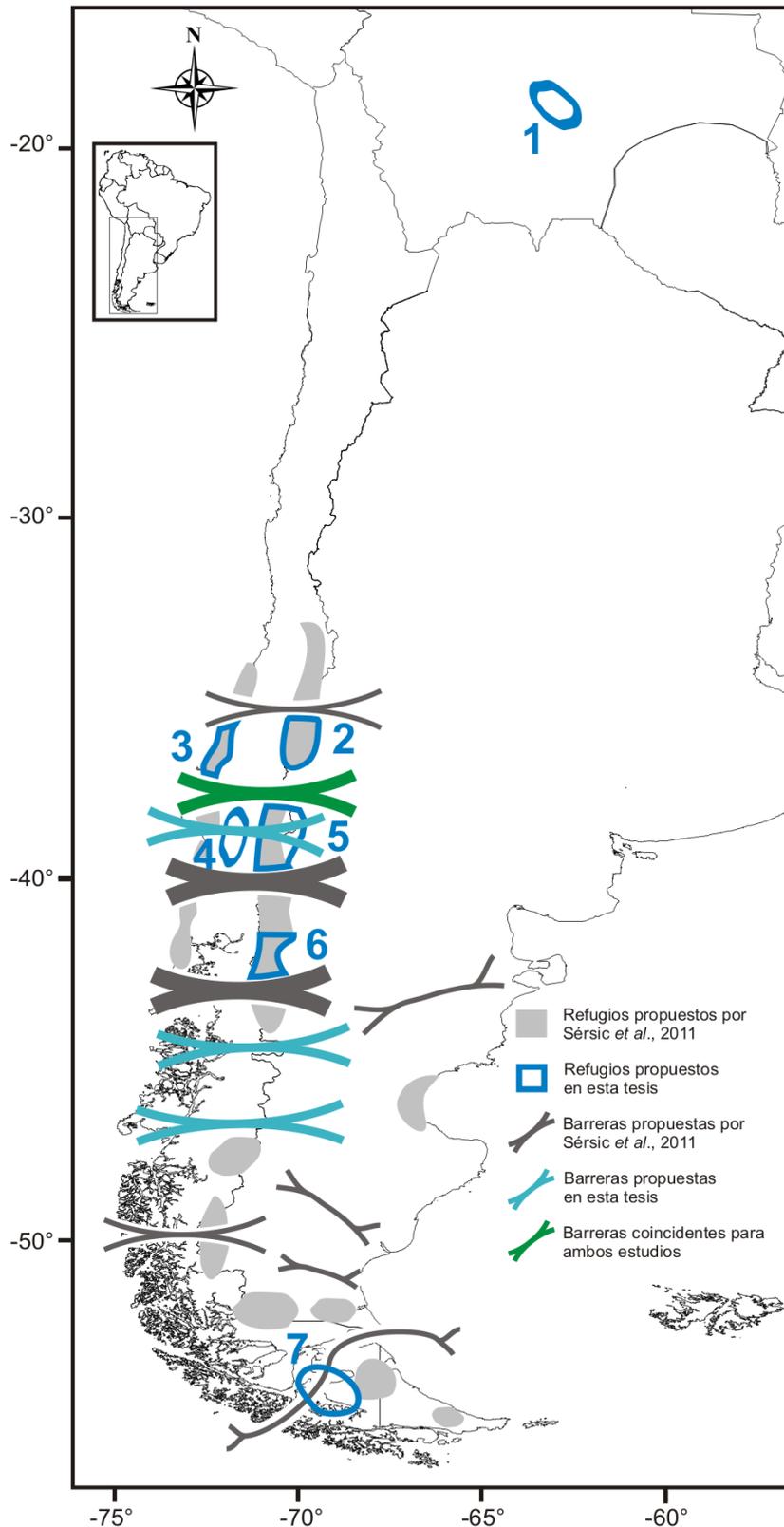
Durante el Cuaternario, las especies de las regiones templadas fueron sometidas a cambios en sus áreas de distribución. La vegetación en particular, ha sufrido fragmentación debido al aumento de la extensión del hielo durante los períodos glaciales (Hewitt, 1996, 2000); sin embargo, el impacto del clima depende de las características del ciclo de vida de las especies (McLachlan *et al.*, 2005) y de sus tolerancias ecológicas, las que también pueden reflejarse en su composición genética (Premoli *et al.*, 2007).

Las principales evidencias halladas en esta tesis, como la distribución de la diversidad genética de *A. uniflora* y de sus HMA asociados, las edades de divergencia de sus haplotipos y eventos climáticos y tectónicos asociados a ellos, además de las características ambientales donde se desarrollan, hacen posible analizar patrones comunes de evolución para el par micoheterotrófico.

En general, *A. uniflora* y sus HMA mostraron historias evolutivas con escenarios diferentes; así por ejemplo, el principal grupo de HMA asociado a la especie o 'clado *Arachnitis*', se habría originado durante el Cretácico, mucho antes de que *A. uniflora* se conformara como tal. Por lo tanto, el origen y conformación de los linajes más ancestrales de HMA debieron estar fuertemente vinculados con las plantas fotosintetizantes de la comunidad donde se desarrollaban.

Sin embargo, existen también patrones comunes muy marcados. Las últimas divergencias de los haplotipos de los hongos del 'clado *Arachnitis*' fueron originadas entre el Oligoceno y comienzos del Mioceno, y pudieron ser impulsadas por el origen del género *Arachnitis*, el cual se separó de *Corsia* hace unos 42 Ma, durante el Eoceno medio. Por otra parte, la aparición de los últimos haplotipos en *A. uniflora* fue ubicada hace alrededor de 1 Ma, en concordancia con la fase del levantamiento de los Andes conocida como Diaguita, junto con la Máxima Glaciación Patagónica (MGP). Sin embargo, las edades de formación de los últimos haplotipos de los hongos del 'clado *Arachnitis*' no son coincidentes con las glaciaciones pleistocénicas, aunque sí parece ser un factor que influyó fuertemente en la distribución de sus haplotipos.

Coincidentemente, los sitios con alta diversidad y haplotipos exclusivos para ambos miembros del par micoheterotrófico fueron propuestos como refugios glaciares pleistocénicos, de acuerdo con Séršic *et al.* (2011). Así, se pueden distinguir siete refugios (Fig. 33), a saber: 1) los sitios bolivianos, que presentaron alta diversidad genética y haplotipos exclusivos coincidentes con este período glacial; 2) los Andes patagónicos, a latitudes próximas a los 37,5° S, si bien la diversidad de HMA no fue alta, sí existió un haplotipo exclusivo en AAN; 3) la cordillera de la Costa, con alta diversidad y haplotipos exclusivos en ambos grupos; 4) la Depresión central de Chile, también con alta diversidad y haplotipos exclusivos; 5) ambos flancos de los Andes, al Norte, entre los 39,3° y 40,5° S; 6) entre las latitudes 42,4° y 43° S, en el flanco Este de la Cordillera, que para el caso de *A. uniflora* sólo representó un área de conservación *in situ* de haplotipos ancestrales; y 7) la región asociada a Tierra del Fuego que también mostró haplotipos exclusivos y alta diversidad para ambos grupos estudiados. Todos ellos estuvieron relacionados con zonas de persistencia de *A. uniflora* durante el UMG, según el modelado de nicho (MNE), además de coincidir con refugios propuestos por Premoli *et al.* (2000), Marchelli y Gallo (2004), Jakob *et al.* (2009), Tremetsberger *et al.* (2009), Cosacov *et al.* (2010), Séršic *et al.* (2011), Vergara *et al.* (2014), Acosta *et al.* (2014), Souto *et al.* (2015), entre otros. Estas áreas de alta diversidad fueron en parte explicadas por grandes quiebres geográficos longitudinales al eje de los Andes, interpretadas como barreras al flujo génico (Mathiasen y Premoli, 2010; Séršic *et al.* 2011), que resultaron comunes para *A. uniflora* y sus HMA. Existieron entonces cuatro principales quiebres (Fig. 33), el primero se correspondió con la latitud de los 37°-37,5° S, al sur de AAN, otro importante ocurrió en cercanías de PLP, a los 39°-39,4° S. Más al sur, otra barrera se presentó a los 44°-44,4° S entre NIN y FON, y el más austral fue a los 46,4°-47,5°, al sur de FON, donde existe un vasto territorio, aparentemente sin presencia de *A. uniflora*. Por otro lado, el quiebre de los 39° S fue coincidente también con el límite sur de la mayor probabilidad de persistencia de *A. uniflora* durante el UMG, según el MNE, el cual se habría extendido desde cerca de los 34° S. Asimismo, en la actualidad esta zona de mayor probabilidad de existencia de la especie se expandió considerablemente, permitiendo un corredor casi continuo a lo largo de toda la cordillera de los Andes.



**Figura 33:** Refugios glaciarios pleistocénicos y barreras al flujo génico encontradas conjuntamente para *A. uniflora* y para sus hongos micorrícicos arbusculares asociados. Estos se comparan con los propuestos por Sérsic *et al.* (2011), a partir de donde la presente figura fue extraída y modificada.

Lamentablemente, la existencia de una sola muestra de *A. uniflora* proveniente de las islas Malvinas, que resultó pertenecer al haplotipo más ampliamente distribuido, no permitió obtener mayores inferencias respecto a la colonización del archipiélago, además no se conoce nada sobre cuáles son los HMA que se asocian a ella. El MNE para el UMG evidenció en baja probabilidad su persistencia *in situ*.

Más allá de los eventos históricos comunes que explican la distribución espacial de la diversidad genética, existirían también factores ambientales actuales responsables de mantener esta diversidad en ambos grupos taxonómicos. Si bien se observó que las comunidades se distribuyeron principalmente por la influencia de la temperatura y las precipitaciones, como ocurre con los patrones globales de distribución de las especies (Hodkinson, 1999; Pearson y Dawson, 2003), los condicionantes ambientales que explicaron la diversidad para cada uno fueron más restringidos. Así, la diversidad genética de *A. uniflora* se encontró condicionada exclusivamente, y débilmente, por el pH del suelo; mientras que la de sus HMA asociados fue condicionada simultáneamente por variables de temperatura, por las precipitaciones de la estación más seca y por el pH. Sin embargo, es curioso que al analizar los patrones ambientales que operan sobre la diversidad conjunta de ambos miembros del par micoheterotrófico, el patrón varió notablemente. El aumento de la diversidad genética de ambos fue explicado por mayores temperaturas durante los períodos fríos; esta asociación fue especialmente marcada para la diversidad genética en los HMA. Se deduce entonces, que los condicionantes que operan sobre la diversidad de *A. uniflora* son en realidad los que rigen para sus HMA asociados. Esto va de acuerdo con Waterman *et al.* (2013), quienes afirman que en una relación micoheterotrófica, son los hongos quienes delimitan el hábitat en el cual la especie vegetal va a desarrollarse. Podría decirse entonces que en esta asociación, *A. uniflora* es condicionada fuertemente por el factor biótico, más que por cualquier otro condicionante ambiental. Esto es soportado por Davis *et al.* (1998), quienes recomiendan incluir esta variable al momento de considerar el rango de distribución de una especie.

Según los resultados obtenidos *A. uniflora* establece relaciones 'facultativas' con otros simbiontes fúngicos lo que eventualmente podría permitirle a la especie

ampliar su rango geográfico, como fuera observado por Franke *et al.* (2006) en otras interacciones de este tipo. Más allá de que por mucho tiempo gobernó la idea de que la especialización de las asociaciones micoheterotróficas era fundamental para el establecimiento, supervivencia y/o diversificación de la especie vegetal (Bidartondo y Bruns, 2002; Bidartondo *et al.*, 2002; Taylor *et al.*, 2002; Leake, 2004), los avances en materia de análisis moleculares brindan cada vez más evidencias hacia la no especificidad en este tipo de interacciones (Bidartondo *et al.*, 2002; Franke *et al.*, 2006; Merckx *et al.*, 2010; Courty *et al.*, 2011; Merckx *et al.*, 2012). *A. uniflora* no es la excepción, ya que además de miembros de Glomeraceae como señalaron Bidartondo *et al.* (2002), confirmados en esta tesis bajo el nombre de 'clado *Arachnitis*', otros grupos de simbioses fueron hallados aunque en una proporción mucho menor.

En la distribución de la diversidad de grupos taxonómicos de esporas de HMA, es interesante remarcar que la misma se incrementó en las comunidades del sur patagónico. Allí, las condiciones ambientales son más extremas, con temperaturas promedio más bajas, por lo que ampliar su rango de interacción con HMA favorecería a *A. uniflora*. En relación con esta estrategia, los sitios aquí postulados como refugios glaciarios fueron altamente coincidentes con las zonas de mayor diversidad de taxones de HMA. Con todo esto, la ocasional inespecificidad de *A. uniflora* representaría una potencial estrategia ante condiciones ambientales adversas.

# *Consideraciones Finales*



## ***Consideraciones finales.***

La premisa de que los factores históricos habrían generado modificaciones significativas del paisaje (Hewitt, 1996), jugando un rol fundamental en la diversificación de las especies, fue el punto de partida de las principales hipótesis que dieron lugar a la presente tesis. No menos importante es la gama de condicionantes abióticos y bióticos que delimitan el espacio en el cual las especies pueden existir (Holt, 2009). Ello fue, además, puesto a prueba no sólo para *Arachnitis uniflora*, sino también para los hongos micorrízicos arbusculares que se asocian a ella. Tanto el estudio a nivel intraespecífico de una especie micoheterotrófica de Patagonia como el abordaje filogeográfico de los HMA asociados a ésta, resultan inéditos en el contexto de la historia evolutiva compartida de dos especies simbiotes.

Sobre la base de estos enunciados se planteó el principal objetivo de conocer la diversidad genética de *A. uniflora* y de sus HMA asociados, con una perspectiva filogeográfica.

En el **Capítulo I** se hizo énfasis en analizar la diversidad genética de *A. uniflora* y abordar los aspectos biogeográficos que la configuran. Los puntos sobresalientes fueron:

- Tres principales focos de alta diversidad: en Bolivia, y en los extremos Norte y Sur de los Andes Patagónicos, que se relacionaron con refugios glaciares durante el Pleistoceno.
- La evidencia provista por el ADN nuclear reveló tres principales haplotipos ampliamente distribuidos. El ADN de cloroplastos mostró un único haplotipo ampliamente distribuido, acompañado de la típica topología en forma de estrella en dicha red, que da indicios de señales de expansión poblacional reciente. Con ambos marcadores, los haplotipos bolivianos fueron exclusivos de esas poblaciones, mientras que Islas Malvinas presentó únicamente el haplotipo más frecuente.

- La edad del linaje que dio origen a *A. uniflora* fue de alrededor de 42 Ma. Asimismo, la separación definitiva entre las poblaciones de Bolivia y Patagonia habría ocurrido a finales del Mioceno – principios del Plioceno, y se explica principalmente por la fase Quechua del levantamiento de los Andes. Los últimos haplotipos fueron originados en el último millón de años, probablemente influenciado por la fase Diaguita del levantamiento de los Andes, en concomitancia con la Máxima Glaciación Patagónica (MGP).
- El modelado de nicho ecológico (MNE) para el Último Máximo Glaciar (UMG) mostró altas probabilidades de persistencia de la especie en sitios costeros, próximos a Concepción (Chile). Aunque menos marcado, también habría existido *in situ* en la costa extendida al sur de Tierra del Fuego, las islas Malvinas y Bolivia.

En el **Capítulo II** se abordó la diversidad genética y morfológica de los simbiontes fúngicos que acompañan a *A. uniflora*, con principal énfasis en su identificación e infiriendo también la historia evolutiva que subyace a estos hongos. Los puntos sobresalientes fueron:

- Se evidenciaron tres familias de Glomeromycota asociados a raíces de *A. uniflora*. El 'clado *Arachnitis*' (Glomeraceae) representó cerca del 85%. Existirían simbiontes "facultativos" asociados a la relación micoheterotrófica con *A. uniflora*, con representantes de Acaulosporaceae y Claroideoglomeraceae; esta última, nunca antes encontrada en asociación con plantas micoheterotróficas.
- Existieron tres grandes regiones de alta diversidad fúngica: en Bolivia, en el extremo Norte de los Andes, aunque más extendido hacia latitudes medias, y en el extremo Sur de los mismos. Estos sitios se relacionaron con refugios glaciarios o zonas de estabilidad climática, postulados para el Pleistoceno.
- La datación de los haplotipos del 'clado *Arachnitis*' evidenció el origen del mismo hacia finales del Cretácico Inferior. La aparición de los últimos haplotipos fue más cercana al Oligoceno-Mioceno, cuya diversificación de estos

hongos habría ocurrido principalmente en asociación con especies de plantas fotosintetizantes de la comunidad.

- El cultivo de plantas trampa inoculados con HMA provenientes de raíces de *A. uniflora* permitió hallar las típicas estructuras de los HMA en las raíces de estos hospedadores trampa; y sumar a cuatro las familias de Glomeromycota asociadas a *A. uniflora*, donde Glomeraceae y Acaulosporaceae fueron las más ampliamente halladas.
- La diversidad de esporas fue más alta hacia latitudes más australes.

En el **Capítulo III** se abordaron los condicionantes ambientales que caracterizaron a las comunidades donde se distribuyen *A. uniflora* y sus HMA asociados. Los puntos sobresalientes fueron:

- El MNE para la actualidad reflejó el nicho conocido actualmente para *A. uniflora*. Las variables que mayormente explicaron este modelado estuvieron relacionadas con las precipitaciones de la estación más fría, la temperatura del mes más cálido y la precipitación anual. Los análisis de componentes principales ordenaron los sitios de acuerdo a variables relacionadas con la temperatura, principalmente.
- La diversidad genética de *A. uniflora* fue levemente influenciada por el pH del suelo, mientras que la correspondiente a sus HMA estuvo condicionada simultáneamente por variables de temperatura, por las precipitaciones de la estación más seca y por el pH del suelo.
- El análisis de la influencia de las variables ambientales sobre las diversidades genéticas conjuntas de *A. uniflora* y HMA evidenció que éstas se favorecieron ante mayores temperaturas en los períodos más fríos.
- La poca influencia de factores ambientales sobre *A. uniflora* permite afirmar que su mayor condicionante es biótico, y está representado por sus HMA asociados.

En el **Capítulo IV** se analizaron conjuntamente los patrones evolutivos comunes que presentaron *A. uniflora* y HMA. Los puntos sobresalientes fueron:

- Los patrones de distribución espacial de la diversidad genética fueron coincidentes y estuvieron influenciados principalmente por las glaciaciones pleistocénicas.
- Las edades obtenidas para el origen y diversificación de los HMA fueron más antiguas que las halladas para *A. uniflora*. La especie vegetal se originó al momento de la última diversificación dentro del 'clado *Arachnitis*' en el Oligoceno-Mioceno.
- La aparición de simbioses "facultativos" fue observada en sitios de refugios glaciarios y hacia el sur de Patagonia, donde las temperaturas son más bajas.
- La ocasional inespecificidad de *A. uniflora*, de acuerdo a la asociación con HMA tendría implicancias sobre el éxito evolutivo de la planta.

El abordaje de los principales resultados de esta tesis permite destacar que, en general, las hipótesis planteadas inicialmente fueron validadas, pudiéndose explicar los patrones de distribución de la diversidad genética de *A. uniflora* a través de eventos climáticos y geológicos ocurridos en el pasado. En el caso de los HMA asociados a esta especie, tanto su diversidad genética, como así también la de sus principales taxones y la morfológica, pueden asimismo ser vinculadas a este tipo de acontecimientos antiguos. Se evidenció también el fuerte condicionamiento actual que presenta *A. uniflora* circunscripto a los requerimientos ambientales de sus HMA que podrían dar lugar a sus asociaciones "facultativas" con otros simbioses fúngicos.

- La primera de las hipótesis señala que *la actual distribución, estructura genética poblacional y demografía de Arachnitis uniflora son el resultado de eventos pasados, tanto climáticos (ej. glaciaciones pleistocénicas), como geológicos (levantamiento de los Andes, principalmente durante el Mioceno y Plioceno)*. Ésta se confirma en el Capítulo I, donde puede observarse que el levantamiento de los Andes, en sus sucesivas etapas, habría actuado tanto como un corredor para la especie en

ciertos tiempos, así como generando la fragmentación en la distribución de la misma en otros periodos por eventos como sombra de lluvia e introgresiones marinas, asociados a ello. Por su parte la Máxima Glaciación Patagónica, principalmente y el Último Máximo Glaciar actuaron también como barreras al flujo génico para *A. uniflora* durante el Pleistoceno, contribuyendo a la conformación de los haplotipos más recientes y moldeando la distribución espacial de los mismos.

- En línea con la anterior, otra de las hipótesis plantea que *los eventos climáticos y orográficos pasados fragmentaron las poblaciones de Arachnitis uniflora, la cual se extendía de forma más continua y extensa*; ésta también fue confirmada en el Capítulo I, y se desprende de la misma evidencia que la anterior. Puede agregarse al respecto que el levantamiento de los Andes generó barreras definitivas al flujo génico, mientras que las glaciaciones lo fueron para determinados períodos de tiempo delimitados al Pleistoceno. De forma contraria, para la población de las islas Malvinas el cese de los periodos glaciarios (ascenso en los niveles del mar) significó la clausura del puente que la unía al continente y, por lo tanto, el comienzo de la separación definitiva entre los miembros de ambas partes.

- Un tercer enunciado indica que se esperaba que, *dada la condición micoheterotrófica de Arachnitis uniflora y su amplia distribución, se ha asociado a más de un taxón de hongos micorrízicos arbusculares, como estrategia de adaptación a diferentes condiciones ambientales, a lo largo de su historia evolutiva*. Esta hipótesis se confirma en el Capítulo II, donde por métodos moleculares y morfológicos se evidenció la presencia de más de una familia de HMA asociados a *A. uniflora*; donde además un taxón aparece como el más frecuente y los restantes son interpretados como simbioses "facultativos" de la especie.

- La última de las hipótesis de trabajo planteadas expresa que *la historia evolutiva común entre Arachnitis uniflora y sus hongos micorrízicos arbusculares asociados dio lugar a patrones de diversidad y estructura genéticas similares para ambas partes del par micoheterotrófico*; la cual fue abordada en los sucesivos Capítulos de la tesis, y sistematizada en el Capítulo IV. Si bien, en líneas generales esto se confirma debido a la similar distribución espacial actual de las diversidades genéticas y a que el par micoheterotrófico presenta una historia evolutiva

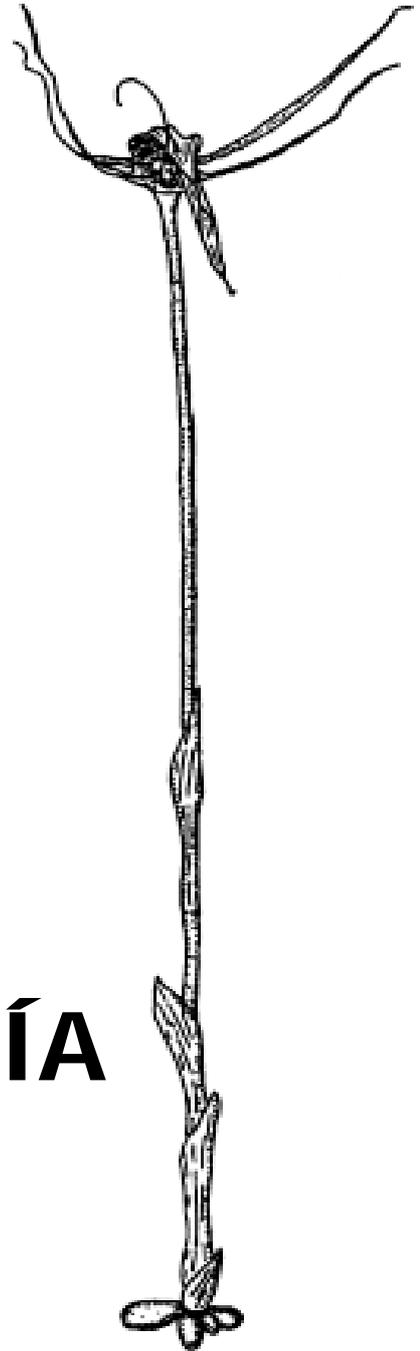
compartida; las edades de surgimiento de los grupos es muy diferente y también lo son los eventos que propiciaron la diversificación de haplotipos. Se evidencia más claramente que los condicionantes ambientales actuales están bien definidos para los HMA, mientras que para *A. uniflora* no lo son tanto, entendiéndose así que su principal factor ambiental condicionante lo representa el acompañante fúngico. De esta forma, si bien la hipótesis queda confirmada, es evidente que estos patrones similares tienen múltiples factores que los determinan, los cuales no siempre son comunes al par micoheterotrófico.

**L**uego de la concreción de esta tesis surgen nuevos interrogantes, interesantes de concretar para tener un panorama más acabado de la asociación micoheterotrófica estudiada y de sus alcances ecológicos. Se podría postular entonces que la preferencia por parte de *A. uniflora* hacia los HMA del "clado *Arachnitis*" sería una relación especializada, mientras que la que genera con el resto de los HMA encontrados sería facultativa, tal como sostiene Franke *et al.* (2006) para especies micoheterotróficas africanas de Burmaniaceae y Triuridaceae. De esta forma, se abre el interrogante sobre si *A. uniflora* realmente se asocia con preferencia a los HMA del "clado *Arachnitis*" o si estos hongos son los más abundantes en la región y por eso se vincula más comúnmente a ellos. La idea más generalizada es que las plantas micoheterotróficas seleccionan aquellos hongos que presentan menor capacidad para detectarlas (McKendrick *et al.*, 2000; Bidartondo, 2005; Merckx *et al.*, 2009); aunque también se conoce que ciertas características como amplia distribución geográfica, gran extensión de sus hifas, fuentes de C confiables, entre otras, pueden conferirle mayor susceptibilidad a ciertos linajes fúngicos para establecer asociación con plantas micoheterotróficas (Waterman *et al.*, 2013). Con ello, podría esperarse entonces que ciertos linajes de hongos, como en este caso el "clado *Arachnitis*", sean más propensos a vincularse con plantas micoheterotróficas; aunque por el contrario, hallar la presencia del "clado *Arachnitis*" en frecuencias similares en plantas fotosintetizantes de la comunidad donde habita *A. uniflora* haría suponer la asociación a estos hongos únicamente por su abundancia.

Esta y otras preguntas que puedan desprenderse, son posibles debido a los avances sobre el conocimiento de la historia evolutiva de *A. uniflora* y principalmente sobre la diversidad y distribución espacial de los simbioses fúngicos asociados a esta especie, que surgen de los resultados de esta tesis.



# BIBLIOGRAFÍA



## BIBLIOGRAFÍA CITADA.

- 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: 497-510.
- Allen EB, Allen MF, Helm DJ, Trappe JM, Molina R, Rincon E. 1995. Patterns and regulation of mycorrhizal plant and fungal diversity. *Plant and Soil* 170: 47-62.
- Amico GC, Nickrent DL. 2009. Population structure and phylogeography of the mistletoes *Tristerix corymbosus* and *T. aphyllus* (Loranthaceae) using chloroplast DNA sequence variation. *American Journal of Botany* 96: 1571-1580.
- Ammann C, Jenny B, Kammer K, Messerli B. 2001. Late Quaternary Glacier response to humidity changes in the arid Andes of Chile (18–29° S). *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 172: 313-326.
- Anderson RC, Liberta AE. 1992. Influence of supplemental inorganic nutrients on growth, survivorship, and mycorrhizal relationships of *Schizachyrium scoparium* (Poaceae) grown in fumigated and unfumigated soil. *American Journal of Botany* 79: 406-414.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, UK.
- Avise JC. 2004. *The hope, hype, and reality of genetic engineering: Remarkable stories from agriculture, industry, medicine, and the environment*. Oxford University Press.
- Avise JC, Nelson WS, Sibley CG. 1994. DNA sequence support for a close phylogenetic relationship between some storks and New World vultures. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91: 5173-5177.
- Azpilicueta MM, Marchelli P, Gallo LA. 2009. The effects of Quaternary glaciations in Patagonia as evidenced by chloroplast DNA phylogeography of Southern beech *Nothofagus obliqua*. *Tree Genetics and Genomes* 5: 561-571.
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular biology and evolution* 16: 37-48.
- Baranzelli MC. 2016. Diversificación inter e intraespecífica en las regiones áridas de Sudamérica Austral: genética espacial y variación geográfica de caracteres morfológicos en *Monttea* (Plantaginaceae), su relación con procesos históricos y

ecológicos. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales. Universidad Nacional de Córdoba.

- Baranzelli MC, Johnson LA, Cosacov A, Sérsic AN. 2014. Historical and ecological divergence among populations of *Monttea chilensis* (Plantaginaceae), an endemic endangered shrub bordering the Atacama Desert, Chile. *Evolutionary Ecology* 28: 751-774.
- 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.
- Bell CD, Donoghue MJ. 2005. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organisms Diversity & Evolution* 5:147-159.
- Bell CD, Kutschker A, Arroyo MTK. 2012. Phylogeny and diversification of Valerianaceae (Dipsacales) in the southern Andes. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 63:724-737.
- Bentham G. 1883. Liliaceae. En: Bentham G, Hooker JD (eds). *Gen. Pl.* 3: 748-836.
- Bidartondo MI. 2005. The evolutionary ecology of myco-heterotrophy. *New Phytologist* 167: 335-352.
- Bidartondo MI, Bruns TD. 2002. Fine-level mycorrhizal specificity in the Monotropoideae (Ericaceae): specificity for fungal species groups. *Molecular Ecology* 11: 557-569.
- Bidartondo MI, Redecker D, Hijri I, Wiemken A, Bruns TD, Domínguez L, Sérsic A, Leake JR, Read DJ. 2002. Epiparasitic plants specialized on arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 419: 389-392.
- Błaszowski J. 2012. Glomeromycota. W. Szafer Institute of Botany, Polish Academy of Sciences.
- Bohrer KE, Friese CF, Amon JP. 2004. Seasonal dynamics of arbuscular mycorrhizal fungi in differing wetland habitats. *Mycorrhiza* 14: 329-337.
- Bonfante-Fasolo P. 1988. The role of the cell wall as a signal in mycorrhizal associations, Cell to cell signals in plant, animal and microbial symbiosis. Springer 219-235 pp.
- Bronstein JL. 2001. The exploitation of mutualisms. *Ecology Letters* 4: 277-287.
- Brooker RW, Callaway RM, Cavieres LA, Kikvidze Z, Lortie CJ, Michalet R, Pugnaire FI, Valiente-Banuet A, Whitham TG. 2009. Don't diss integration: a comment on Ricklefs' disintegrating communities. *The American Naturalist* 174: 919-927.

- Brundrett M, Abbott L, Jasper D. 1999. Glomalean mycorrhizal fungi from tropical Australia. *Mycorrhiza* 8: 305-314.
- Burney CW, Brumfield RT. 2009. Ecology predicts levels of genetic differentiation in Neotropical birds. *American Naturalist* 174: 358-368.
- Camargo-Ricalde SL. 2002. Dispersal, distribution and establishment of arbuscular mycorrhizal fungi: a review. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 71: 33-44.
- Carpenter RJ, Jordan GJ, Hill RS. 2007. A toothed Lauraceae leaf from the Early Eocene of Tasmania, Australia. *International Journal of Plant Sciences* 168: 1191-1198.
- Carpenter RJ, Wilf P, Conran JG, Cúneo NR. 2014. Early Eocene Ripogonum. *Palaeontologia Electronica* 17: 1-39.
- Carroll AB, Pallardy SG, Galen C. 2001. Drought stress, plant water status, and floral trait expression in fireweed, *Epilobium angustifolium* (Onagraceae). *American Journal of Botany* 88: 438-446.
- Carvalho LM, Caçador I, Martins-Loução M. 2001. Temporal and spatial variation of arbuscular mycorrhizas in salt marsh plants of the Tagus estuary (Portugal). *Mycorrhiza* 11: 303-309.
- Chagnon PL, Bradley RL, Maherali H, Klironomos JN. 2013. A trait-based framework to understand life history of mycorrhizal fungi. *Trends in Plant Science* 18: 484-491.
- Clapperton CM. 1979. Glaciation in Bolivia before 3.27 Myr. *Nature* 277: 375-376.
- Clayton JD, Clapperton CM. 1997. Broad Synchrony of a Late-Glacial Glacier Advance and the Highstand of Palaeolake Tauca in the Bolivian Altiplano. *Journal of Quaternary Science* 12: 169-182.
- Comes HP, Abbott RJ. 2000. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) and quantitative trait analyses across a major phylogeographical break in the Mediterranean ragwort *Senecio gallicus* Vill. (Asteraceae). *Molecular Ecology* 9: 61-76.
- Conran JG, Carpenter RJ, Jordan GJ. 2009. Early Eocene Ripogonum (Liliales: Ripogonaceae) leaf macrofossils from southern Australia. *Australian Systematic Botany* 22: 219-228.
- Conran JG, Bannister JM, Mildenhall DC, Lee DE, Chacón J, Renner SS. 2014. Leaf fossils of *Luzuriaga* and a monocot flower with *in situ* pollen of *Liliacidites contortus* Mildenh. & Bannister sp. nov. (Alstroemeriaceae) from the Early Miocene. *American Journal of Botany* 101: 141-155.

- Coronato AMJ, Coronato F, Mazzoni E, Vázquez M. 2008. The Physical Geography of Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Sciences* 11: 13-55.
- Cosacov A, Sérsic AN, Sosa V, De-Nova A, Nylinder S, and Cocucci A. 2009. New insights in the phylogenetic relationships, character evolution, and biogeography of *Calceolaria* (Calceolariaceae). *American Journal of Botany* 96: 2240-2255.
- Cosacov A, Sérsic AN, Sosa V, Johnson LA, Cocucci AA. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography*, 37: 1463-1477.
- Coughlan AP, Dalpé Y, Lapointe L, Piché Y. 2000. Soil pH-induced changes in root colonization, diversity, and reproduction of symbiotic arbuscular mycorrhizal fungi from healthy and declining maple forests. *Canadian Journal of Forest Research* 30: 1543-1554.
- Courty P, Walder F, Boller T, Ineichen K, Wiemken A, Rousteau A, Selosse MA. 2011. C and N metabolism in mycorrhizal networks and mycoheterotrophic plants of tropical forests: a stable isotope analysis. *Plant Physiology* 156: 952-961.
- Crandall KA, Templeton AR. 1993. Empirical tests of some predictions from coalescent theory with applications to intraspecific phylogeny reconstruction. *Genetics* 134: 959-969.
- Crawford AJ, Bermingham E, Carolina PS. 2007. The role of tropical dry forest as a long-term barrier to dispersal: a comparative phylogeographical analysis of dry forest tolerant and intolerant frogs. *Molecular Ecology* 16: 4789-4807.
- Cribb PJ, Wilkin P, Clements M. 1995. Corsiaceae: a new family for the Falklands Islands. *Kew Bulletin* 50: 171-172.
- Davis AJ, Lawton JH, Shorrocks B, Jenkinson LS. 1998. Individualistic species responses invalidate simple physiological models of community dynamics under global environmental change. *Journal of Animal Ecology* 67: 600-612.
- Davis MB, Shaw RG. 2001. Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. *Science* 292: 673-679.
- Davison J, Moora M, Öpik M, Adholeya A, Ainsaar L, Bâ A, Burla S, Diedhiou AG, Hiiesalu I, Jairus T, Johnson NC, Kane A, Koorem K, Kochar M, Ndiaye C, Pärtel M, Reier Ü, Saks Ü, Singh R, Vasar M, Zobel M. 2015. Global assessment of arbuscular mycorrhizal fungus diversity reveals very low endemism. *Science* 349: 970-973.

- de Aranzamendi MC, Bastida R, Gardenal CN. 2011. Different evolutionary histories in two sympatric limpets of the genus *Nacella* (Patellogastropoda) in the South-western Atlantic coast. *Marine Biology* 158: 2405-2418.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW. 2014. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, UNC. <http://www.infostat.com.ar>
- Dimitri MJ. 1972. Una nueva especie del género *Arachnitis* Phil. (Corsiaceae). *Revista Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata* 48: 37-45.
- Dobzhansky T. 1970. *Genetics of the evolutionary process*. Columbia University Press, New York, EEUU.
- Domínguez LS, Sérsic A. 2004. The southernmost myco-heterotrophic plant, *Arachnitis uniflora*: root morphology and anatomy. *Mycologia* 96: 1143-1151.
- Domínguez L, Sérsic A, Melville L, Peterson RL. 2005. "Prepackaged symbioses" – propagules on roots of the epiparasitic plant *Arachnitis uniflora* Phil. *New Phytologist* 169: 191-198.
- Domínguez LS, Melville L, Sérsic A, Faccio A, Peterson RL. 2009. The myco-heterotroph, *Arachnitis uniflora*, has a unique association with arbuscular mycorrhizal fungi. *Botany* 87: 1198-1208.
- Drummond AJ, Suchard MA, Xie D, Rambaut A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution* 29: 1969-1973.
- Encinas A, Finger KL, Buatois LA. 2007. Evidence of deep-marine sedimentation in the present longitudinal depression of south-central Chile (38°30'-41°30'S) during the Neogene. Tectonic implications. En: Díaz-Martínez E., Rábano I. (eds.) , Cuadernos del Museo Geominero 8. Instituto Geológico y Minero de España, Madrid.
- Ehrlich PR, Raven PH. 1964. Butterflies and Plants: A Study in Coevolution. *Evolution* 18: 586-608.
- Escudero V, Mendoza R. 2005. Seasonal variation of arbuscular mycorrhizal fungi in temperate grasslands along a wide hydrologic gradient. *Mycorrhiza* 15: 291-299.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005 Arlequin ver 3.01. An Integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47-60.
- Ezcurra C. 2002. Phylogeny, Morphology, and Biogeography of *Chuquiraga*, an Andean-Patagonian Genus of Asteraceae-Barnadesioideae. *The Botanical Review* 68:153-170.

- Fenzl E. 1865. Bemerkungen zu Professor Dr. Philippi's Aufsätzen. Verhandlungen der Kaiserlich-Königlichen Zoologisch-Botanischen Gesellschaft in Wien 15: 523-524.
- Fine PV, Zapata F, Daly DC, Mesones I, Misiewicz TM, Cooper HF, Barbosa CEA. 2013. The importance of environmental heterogeneity and spatial distance in generating phylogeographic structure in edaphic specialist and generalist tree species of *Protium* (Burseraceae) across the Amazon Basin. *Journal of Biogeography* 40: 646-661.
- Finger KL, Nielsen SN, Devries TJ, Encinas A, Peterson DE. 2007. Paleontologic evidence for sedimentary displacement in neogene forearc basins of central Chile. *Palaios* 22: 3-16.
- Folguera A, Orts D, Spagnuolo M, Rojas Vera E, Litvak V, Sagripanti L, Ramos ME, Ramos VA. 2011. A review of Late Cretaceous to Quaternary palaeogeography of the southern Andes. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 250-268.
- Franke T, Beenken L, Döring M, Kocyan A, Agerer R. 2006. Arbuscular mycorrhizal fungi of the *Glomus*-group A lineage (Glomerales; Glomeromycota) detected in myco-heterotrophic plants from tropical Africa. *Mycological Progress* 5: 24-31.
- Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitch-hiking, and background selection. *Genetics* 147: 915-925.
- Futuyma DJ. 1997. *Evolutionary Biology*. 3 ed. Sinauer Sunderland, Massachusetts.
- Futuyma DJ, Moreno G. 1988. The evolution of ecological specialization. *Annual Review of Ecology and Systematics* 19: 207-233.
- Galen C. 1999. Why Do Flowers Vary? The functional ecology of variation in flower size and form within natural plant populations. *BioScience* 49: 631-640.
- Galen C. 2000. High and Dry: Drought Stress, Sex-Allocation Trade-offs, and Selection on Flower Size in the Alpine Wildflower *Polemonium viscosum* (Polemoniaceae). *American Naturalist* 156: 72-83.
- Galen C, Sherry RA, Carrol B. 1999. Are flowers physiological sinks or faucets? Costs and correlates of water use by flowers of *Polemonium viscosum*. *Oecologia* 118: 461-470.
- Gardes M, Bruns TD. 1993. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes-application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology* 2: 113-118.
- Gavito ME, Schweiger P, Jakobsen I. 2003. P uptake by arbuscular mycorrhizal hyphae: effect of soil temperature and atmospheric CO<sub>2</sub> enrichment. *Global Change Biology* 9: 106-116.

- Gerdemann JW, Nicolson TH. 1963. Spores of mycorrhizal *Endogone* species extracted from soil by wet sieving and decanting. *Transactions of the British Mycological Society* 46: 235-244.
- Giovannetti M. 2000. Spore germination and pre-symbiotic mycelial growth. In: Kapulnik Y, Douds DD (eds). 47-68 pp. Kluwer Academic Publishers.
- Giovannetti M, Sbrana C, Avio L, Strani P. 2004. Patterns of below-ground plant interconnections established by means of arbuscular mycorrhizal networks. *New Phytologist* 164: 175-181.
- Godo GH, Reisenauer HM. 1980. Plant Effects on Soil Manganese Availability. *Journal of Soil Science Society of America* 44: 993-995.
- Grace C, Stribley DP. 1991. A safer procedure for routine staining of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycological Research* 95: 1160-1162.
- Graf K. 1992. Pollendiagramme aus den Anden, eine Synthese zur Klimageschichte und Vegetationsentwicklung seit der letzten Eiszeit. *Physical Geography* 34: 1-138.
- Graham A. 2009. The Andes: a geological overview from a biological perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 96: 371-385.
- Green NE, Graham SO, Schenck NC. 1976. The Influence of pH on the Germination of Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Spores. *Mycologia* 68: 929-934.
- Griffiths JA. 2008. *Genética*. McGraw-Hill / Interamericana de España, España.
- Groeber P. 1946. Observaciones geológicas a lo largo del paralelo 70°. 1. Hojas Chos Malal, Sosneado, Maipo, Domuyo, Mari Mahuida, Huarhuarco y Parte de Epulafquen. *Revista de la Asociación Geológica Argentina* 1: 177-208; 2: 141-176; 2: 348-433.
- Guillot G, Mortier F, Estoup A. 2005. Geneland: A program for landscape genetics. *Molecular Ecology Notes* 5: 712-715.
- Hamrick JL, Godt MJW. 1996. Effects of life history traits on genetic diversity in plant species. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 351: 1291-1298.
- Haq BU, Hardenbol J, Vail PR. 1987. Chronology of fluctuating sea levels since the Triassic. *Science* 235: 1156-1167.
- Hart MM, Reader RJ. 2002. Taxonomic basis for variation in the colonization strategy of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 153: 335-344.
- Hartl DL, Clark AG. 1997. *Principles of population genetics*. Sinauer Associates Sunderland.

- Heibl C, Renner SS. 2012. Distribution models and a dated phylogeny for Chilean *Oxalis* species reveal occupation of new habitats by different lineages, not rapid adaptive radiation. *Systematic Biology* 61: 823-834.
- Herzog F, Balázs K, Dennis P, Friedel J, Geijzendorffer I, Jeanneret P, Kainz M, Pointereau P. 2012. Biodiversity indicators for European farming systems: a guidebook. Forschungsanst. Agroscope Reckenholz-Tänikon.
- Hewitt GM. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- Hewitt GM. 2000 The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907-913.
- Hewitt G.M. 2004. Genetic consequences of climatic oscillations in the Quaternary. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 359: 183-195.
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965-1978
- Holt RD. 2009 Bringing the Hutchinsonian niche into the 21st century: ecological and evolutionary perspectives. *Proceedings of the National Academy Science, USA* 106: 659-665.
- Hoorn C, Wesselingh FP, Ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Sanmartín I, Sanchez-Meseguer A, Anderson CL, Figueiredo JP, *et al.* 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* 330: 927-993.
- Hu Y, Rillig MC, Xiang D, Hao Z, Chen B. 2013. Changes of AM Fungal Abundance along Environmental Gradients in the Arid and Semi-Arid Grasslands of Northern China. *PLoS One* 8: e57593.
- Hudson RR. 1990. Gene genealogies and coalescent process. En: Futuyma D, Antonovics J (eds). 1-42 pp. *Oxford Surveys in Evolutionary Biology*. Oxford University Press, Inglaterra.
- Hueck K. 1978. Los bosques de Sudamérica. GTZ, Eschborn, Alemania.
- Hughes C, Eastwood R. 2006. Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103:10334-10339.
- Hutchinson DW, Templeton AR. 1999. Correlation of Pairwise Genetic and Geographic Distance Measures: Inferring the Relative Influences of Gene Flow and Drift on the Distribution of Genetic Variability. *Evolution* 53: 1898-1914.
- Hutchinson GE. 1957. Concluding remarks. *Cold Spring Harbor Symposium* 22: 415-427.

- Ibisch PL, Neinhuis C, Rojas PN. 1996. On the biology, biogeography, and taxonomy of *Arachnitis* Phil. nom. cons. (Corsiaceae) in respect to a new record from Bolivia. *Willdenowia* 26: 321-332.
- Jackson, JBC, D'Croz L. 2003. El océano se divide. En: Coates AG (Ed.). 41-79 pp. Paseo Pantera. Smithsonian Books, Washington EEUU
- Jakob SS, Martínez-Meyer E, Blattner FR. 2009. Phylogeographic analyses and paleodistribution modeling indicate Pleistocene in situ survival of *Hordeum* species (Poaceae) in southern Patagonia without genetic or spatial restriction. *Molecular Biology and Evolution* 26: 907-923.
- Johnson NC, Zak DR, Tilman D, Pflieger FL. 1991. Dynamics of vesicular-arbuscular mycorrhizae during old field succession. *Oecologia* 86: 349-358.
- Karron JD. 1987. A comparison of levels of genetic polymorphism and self-compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners. *Evolutionary Ecology* 1: 47-58.
- Kennedy LJ, Tiller RL, Stutz JC. 2002. Associations between arbuscular mycorrhizal fungi and *Sporobolus wrightii* in riparian habitats in arid South-west North America. *Journal of Arid Environments* 50: 459-475.
- Kivlin SN, Hawkes CV, Treseder KK. 2011. Global diversity and distribution of arbuscular mycorrhizal fungi. *Soil Biology and Biochemistry* 43: 2294-2303.
- Koske RE. 1987. Distribution of VA Mycorrhizal Fungi along a Latitudinal Temperature Gradient. *Mycologia* 79: 55-68.
- Krüger M, Krüger C, Walker C, Stockinger H, Schübler A. 2011. Phylogenetic reference data for systematics and phylotaxonomy of arbuscular mycorrhizal fungi from phylum to species level. *New Phytologist* 193: 970-984.
- Kull C, Grosjean M. 2000. Late Pleistocene climate conditions in the North Chilean Andes drawn from a climate–glacier model. *Journal of Glaciology* 46: 622-632.
- Kull C, Imhof S, Grosjean M, Zech R, Veit H. 2008. Late Pleistocene glaciation in the Central Andes: Temperature versus humidity control – A case study from the eastern Bolivian Andes (17°S) and regional synthesis. *Global and Planetary Change* 60: 148-164.
- Lambers H, Chapin III FS, Pons TL. 2008. *Plant Physiological Ecology*. 2 Edición. Springer, New York.
- Landis FC, Gargas A, Givnish TJ. 2004. Relationships among Arbuscular Mycorrhizal Fungi, Vascular Plants and Environmental Conditions in Oak Savannas. *New Phytologist* 164: 493-504.
- Leake JR. 1994. The biology of myco-heterotrophic ('saprophytic') plants. *New Phytologist* 127: 171-216.

- Leake JR. 2004. Myco-heterotroph/epiparasitic plant interactions with ectomycorrhizal and arbuscular mycorrhizal fungi. *Current Opinion in Plant Biology* 7: 422-428.
- Leathwick JR. 2002. Intra-generic competition among *Nothofagus* in New Zealand's primary indigenous forests. *Biodiversity and Conservation* 11: 2117-2187.
- Lekberg Y, Koide RT, Rohr JR, Aldrich-Wolfe L, Morton JB. 2007. Role of niche restrictions and dispersal in the composition of arbuscular mycorrhizal fungal communities. *Journal of Ecology* 95: 95-105.
- León RJC. 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecología Austral* 8:125-144.
- Lessa EP, D'Elia G, Pardiñas UF. 2010. Genetic footprints of late Quaternary climate change in the diversity of Patagonian– Fuegian rodents. *Molecular Ecology* 19: 3031-3037.
- Linder H. 2008. Plant species radiations: where, when, why? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 1506: 3097-3105.
- Lindqvist JK, Lee DE. 2009. High-frequency paleoclimate signals from Foulden Maar, Waipiata Volcanic Field, southern New Zealand: an Early Miocene varved lacustrine diatomite deposit. *Sedimentary Geology* 222: 98-110.
- Loveless MD, Hamrick JL. 1984. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual review of ecology and Systematics* 15: 65-95.
- Luebert F, Hilger HH, Weigend M. 2011. Diversification in the Andes: Age and origins of South American *Heliotropium* lineages (Heliotropiaceae, Boraginales). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 61: 90-102.
- Lugo MA, Cabello MN. 2002. Native arbuscular mycorrhizal fungi (AMF) from mountain grassland (Córdoba, Argentina) I: Seasonal variation of fungal spore diversity. *Mycologia* 94: 579-586.
- Lugo MA, Maza MEG, Cabello MN. 2003. Arbuscular mycorrhizal fungi in a mountain grassland II: seasonal variation of colonization studied, along with its relation to grazing and metabolic host type. *Mycologia* 95: 407-415.
- Lumbsch HT, Buchanan PK, May TW, Mueller GM. 2008. Phylogeography and Biogeography of Fungi. *Mycological Research* 112: 423-424.
- Mabberly DJ. 1987. *The plant book*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Mago P, Mukerji KG. 1994. Vesicular arbuscular mycorrhizae in Lamiaceae: I. Seasonal variation in some members. *Phytomorphology* 44: 83-88.
- Magri D, Fineschi S, Bellarosa R, Buonamici A, Sebastiani F, Schirone B, Simeone MC, Vendramin GG. 2007. The distribution of *Quercus suber* chloroplast haplotypes

matches the palaeogeographical history of the western Mediterranean. *Molecular Ecology* 16: 5259-5266.

- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189-197.
- Marchelli P, Gallo LA. 2004. The combined role of glaciations and hybridization in shaping the distribution of genetic variation in a Patagonian southern beech. *Journal of Biogeography* 31: 451-460.
- Marchelli P, Gallo L. 2006. Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics* 7: 591-603.
- Mark BG, Harrison SP, Spessa A, New M, Evans DJA, Helmens KF. 2005. Tropical snowline changes at the Last Glacial Maximum: a global assessment. *Quaternary International* 138: 168-201.
- Martins M, Read DJ. 1997. Efeitos da distribuição do micélio externo de fungos micorrízicos arbusculares sobre o crescimento vegetal. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 32: 1183-1189.
- 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.
- McKendrick SL, Leake JR, Read DJ. 2000. Symbiotic germination and development of myco-heterotrophic plants in nature: transfer of carbon from ectomycorrhizal *Salix repens* and *Betula pendula* to the orchid *Corallorhiza trifida* through shared hyphal connections. *New Phytologist* 145: 539-548.
- Mennes CB, Lam VKY, Rudall PJ, Lyon SP, Graham SW, Smets EF, Merckx VSFT. 2015. Ancient Gondwana break-up explains the distribution of the micoheterotrófica family Corsiaceae (Liliales). *Journal of Biogeography* 42: 1123-1136.
- Merckx V, Bidartondo MI. 2008. Breakdown and delayed cospeciation in the arbuscular mycorrhizal mutualism. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 275: 1029-1035.
- Merckx V, Bidartondo MI, Hynson NA. 2009. Myco-heterotrophy: when fungi host plants. *Annals of Botany* 104: 1255-1261.
- Merckx V, Freudenstein JV. 2010. Evolution of myco-heterotrophy in plants: a phylogenetic perspective. *New Phytologist* 185: 607-610
- Merckx V, Stöckel M, Fleischmann A, Bruns TD, Gebauer G. 2010. <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C natural abundance of two micoheterotrophic and a putative partially micoheterotrophic species associated with arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 188: 590-596.

- Merckx, VS, Janssens SB, Hynson, NA, Specht CD, Bruns TD, Smets EF. 2012. Mycoheterotrophic interactions are not limited to a narrow phylogenetic range of arbuscular mycorrhizal fungi. *Molecular Ecology* 21: 1524-1532.
- Merckx VS, Freudenstein JV, Kissling J, Christenhusz MJM, Stotler RE, Crandall-Stotler B, Wickett N, Rudall PJ, Maas-van de Kamer H, Maas PJM. 2013a. Taxonomy and Classification. En: Merckx VSFT (ed.) 19-101 pp. *Mycoheterotrophy. The Biology of Plants Living on Fungi*. Springer, Londres, UK.
- Merckx VS, Mennes CB, Peay KG, Geml J. 2013b. Evolution and Diversification. En: Merckx VSFT (Ed.) 215-244 pp. *Mycoheterotrophy. The Biology of Plants Living on Fungi*. Springer, Londres, UK.
- Millar CI, Libby WJ. 1991. Strategies for conserving clinal, ecotypic, and disjunct population diversity in widespread species. En: Falk DA, Holsinger KE. *Genetics and conservation of rare plants*. Oxford University Press, New York, EEUU. 149-170 pp.
- Miller MP. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- Minoletti ML. 1986. *Arachnitis uniflora* Phil., una curiosa monocotiledonea de la flora chilena. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* 57: 7-20.
- Morando M, Avila LJ, Baker J y Sites JW Jr. 2004. Phylogeny and phylogeography of the *Liolaemus darwini* complex (Squamata: Liolaemidae): Evidence for introgression and incomplete lineage sorting. *Evolution* 58: 842-861.
- Morando M, Avila LJ, Turner CR, Sites Jr. JW. 2007. Molecular evidence for a species complex in the patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 43: 952-973.
- Mörner NA, Sylwan C. 1989. Magnetostratigraphy of the Patagonian moraine sequence at Lago Buenos Aires. *Journal of South American Earth Sciences* 2: 385-389.
- Morrone JJ. 2006. Biogeographic areas and the transition zone of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistics analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51: 467-494.
- Morrone JJ. 2014. Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa* 3782: 1-110.
- Morton J. 1988. Taxonomy of VA mycorrhizal fungi: classification, nomenclature, and identification. *Mycotaxon* 32: 267-324.

- Morton JB. 2000. Evolution of endophytism in arbuscular mycorrhizal fungi of Glomales. *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Balckwell, Inc. Nueva York 121-140 pp.
- Morton J, Bentivenga S, Wheeler W. 1993. Germ plasm in the International Collection of Arbuscular and Vesicular-Arbuscular Mycorrhizal Fungi (INVAM) and procedures for culture development, documentation and storage. *Mycotaxon* 48: 491-528.
- Morton JB, Bever JD, Pflieger FL. 1996. Taxonomy of *Acaulospora gerdemannii* and *Glomus leptotichum*, synanamorphs of an arbuscular mycorrhizal fungus in Glomales. *Mycological Research* 101: 625-631.
- Muellner AN, Tremetsberger K, Stuessy T, Baeza CM. 2005. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Astraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14: 203-212.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nakazato T, Warren DL, Moyle LC. 2010. Ecological and geographic modes of species divergence in wild tomatoes. *American Journal of Botany* 97: 680-693.
- Nei M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York USA.
- Neyland R, Hennigan M. 2003. A phylogenetic analysis of large-subunit (26S) ribosome DNA sequences suggests that the Corsiaceae are polyphyletic. *New Zealand Journal of Botany* 41: 1-11.
- Nix HA. 1986. BIOCLIM—a bioclimatic analysis and prediction system. Annual report CSIRO. CSIRO Division of Water and Land Resources, Canberra.
- Nixon KC. 2002. WinClada ver. 1.00.08 Published by the author, Ithaca, NY.
- Nylander JAA. 2004. MrModeltest v.2. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University, Sweden.
- O'Driscoll LJ, Richards MA, Humphreys ED. 2012. Nazca–South America interactions and the late Eocene–late Oligocene flat-slab episode in the central Andes. *Tectonics* 31: 1-16.
- Oburger E, Jones DL, Wenzel WW. 2011. Phosphorus saturation and pH differentially regulate the efficiency of organic acid anion-mediated P solubilization mechanisms in soil. *Plant and Soil* 341: 363-382.
- Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. 2008. Epipactis helleborine shows strong mycorrhizal preference towards ectomycorrhizal fungi with contrasting geographic distributions in Japan. *Mycorrhiza* 18: 331-338.

- Oksanen J, Kindt R, Legendre P, O'Hara B, Stevens MHH, Oksanen MJ, Suggests MASS. 2008. The vegan package. Community ecology package 10.
- Omar M, Bolland L, Heather W. 1979. A permanent mounting medium for fungi. Bulletin of the British Mycological Society 13: 31-32.
- Öpik M, Vanatoa A, Vanatoa E, Moora M, Davison J, Kalwij JM, Reier U, Zobel M. 2010. The online database MaarjAM reveals global and ecosystemic distribution patterns in arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). New Phytologist 188: 223-241.
- Orchard S, Hilton S, Bending GD, Dickie IA, Standish RJ, Gleeson DB, Jeffery RP, Powell JR, Walker C, Bass D, Monk J, Simonin A, Ryan MH. 2016. Fine endophytes (*Glomus tenue*) are related to Mucoromycotina, not Glomeromycota. New Phytologist 213: 481-486.
- Ortiz-Jaureguizar E, Cladera GA. 2006. Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. Journal of Arid Environments 66: 498-532.
- Padovan ACB, Sanson GFO, Brunstein A, Briones MRS. 2005. Fungi evolution revisited: application of the penalized likelihood method to a Bayesian fungal phylogeny provides a new perspective on phylogenetic relationships and divergence dates of Ascomycota groups. Journal of Molecular Evolution 60: 726-735.
- Palmé AE, Su Q, Rautenberg A, Manni F, Lascoux M. 2003. Postglacial recolonization and cpDNA variation of silver birch, *Betula pendula*. Molecular Ecology 12: 201-212.
- Parniske M. 2008. Arbuscular mycorrhiza: the mother of plant root endosymbioses. Nature Reviews Microbiology 6: 763-775.
- Paruelo JM, Beltrán A, Jobbágy E, Sala OE, Golluscio RA. 1998. The climate of Patagonia: general patterns and control on biotic processes. Ecología Austral 8: 85-101.
- Pascual R, Bondesio P. 1982. Un roedor Cardiatheriinae (Hydrochoeridae) de la Edad Huayqueriense (Mioceno tardío) de La Pampa. Sumario de los ambientes terrestres en la Argentina durante el Mioceno. Ameghiniana 19: 19-36.
- Pascual R, Ortiz-Jaureguizar E, Prado JL. 1996. Land mammals: paradigm for Cenozoic South American geobiotic evolution. En: Arratia G.(ed.). Contributions of Southern South America to Vertebrate Paleontology. Münchner Geowissenschaftliche Abhandlungen 30: 265-319.
- Pascual R, Carlini AA, Bond M, Goin FJ. 2002. Mamíferos cenozoicos. En: Haller MJ (Ed.). 533-544 pp. Geología y Recursos Naturales de Santa Cruz. Relatorio del XV Congreso de la Asociación Geológica Argentina, Buenos Aires.
- Paun O, Schönswetter P, Winkler M, Consortium I, Tribisch A. 2008. Historical divergence vs. contemporary gene flow: evolutionary history of the calcicole

- Ranunculus alpestris* group (Ranunculaceae) in the European Alps and the Carpathians. *Molecular Ecology* 17: 4263-4275.
- Paz A, Ibáñez R, Lips KR, Crawford AJ. 2015. Testing the role of ecology and life history in structuring genetic variation across a landscape: a trait-based phylogeographic approach. *Molecular Ecology* 24: 3723-3737.
- Pearson RG, Dawson TE. 2003. Predicting the impacts of climate change on the distribution of species: are bioclimate envelope models useful? *Global Ecology and Biogeography* 12: 361-371.
- Pearson RG, Dawson TE, Liu C. 2004. Modelling species distributions in Britain: a hierarchical integration of climate and land-cover data. *Ecography* 27: 285-298.
- Philippi RA. 1864. Zwei neue Pflanzen aus Chile. *Botanische Zeitung* 22: 217.
- Philippi RA. 1865. Descripción de algunas plantas nuevas chilenas. *Anales de la Universidad de Chile* 638-650.
- Phillips SJ, Anderson RP, Schapire RE. 2006. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231-259.
- Pinceel J, Jordaens K, Pfenninger M, Backeljau T. 2005. Rangewide phylogeography of a terrestrial slug in Europe: evidence for Alpine refugia and rapid colonization after the Pleistocene glaciations. *Molecular Ecology* 14: 1133-1150.
- Pirozynski KA. 1981. Interactions between fungi and plants through the ages. *Can. J. Bot.* 59: 1824-1827.
- Ponce JF, Rabassa J, Coronato A, Borromei AM. 2011. Palaeogeographical evolution of the Atlantic coast of Pampa and Patagonia from the last glacial maximum to the Middle Holocene. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 363-379.
- Porter WM, Robson AD, Abott LK. 1987. Field survey of the distribution of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in relation to soil pH. *Journal of Applied Ecology* 24: 659-662.
- Powell CL, Bagyaraj DJ. 1984. VA Mycorrhiza. CRC Press, Inc, Boca Raton, FL.
- Premoli AC. 1997. Genetic Variation in a Geographically Restricted and Two Widespread Species of South American Nothofagus. *Journal of Biogeography* 24: 883-892.
- Premoli AC. 1998. The use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas of more widespread species. En: International Foundation for Science (ed.). 157–171 pp. Proceedings of an International Workshop: Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianopolis, Brazil.

- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251-260.
- Premoli AC, Mathiasen P, Acosta MC, Ramos VA. 2012. Phylogeographically concordant intraspecific cpDNA divergence in sympatric *Nothofagus*. How deep can it be? *New Phytologist*, 193: 261-275.
- Primack RB, Kang H. 1989. Measuring fitness and natural selection in wild plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 20: 367-396.
- Primack RB, Hall P. 1990. Costs of Reproduction in the Pink Lady's Slipper Orchid: A Four-Year Experimental Study. *The American Naturalist* 136: 638-656.
- Quiroga MP, Mathiasen P, Iglesias A, Mill RR, Premoli AC. 2015. Molecular and fossil evidence disentangle the biogeographical history of *Podocarpus*, a key genus in plant geography. *Journal of Biogeography* 43: 372-383.
- R Development Core Team. 2007. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. [www.R-project.org/](http://www.R-project.org/).
- Rabassa J. 2008. Late Cenozoic Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. *Developments in Quaternary Sciences* 11: 151-204.
- Rabassa J, Coronato AMJ, 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, Martínez O. 2011. Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 316-335.
- Ramos VA. 1982. Las intrusiones pacíficas del Terciario en el Norte de la Patagonia (Argentina). III Congreso Geológico Chileno (Concepcion) Actas I 262-288.
- Ramos VA, Ghiglione MC. 2008. Tectonic evolution of the Patagonian Andes. En: Rabassa J (ed.). 57-71 pp. *The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego. Developments in Quaternary Sciences* 11, Elsevier, Oxford, Reino Unido.
- Raven PH. 1972. Plant species disjunctions: a summary. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 59: 234-246.
- Raynaud D, Barnola JM, Souchez R, Lorrain R, Petit JR, Duval P, Lipenkov VY. 2005. Palaeoclimatology: the record for marine isotopic stage 11. *Nature* 439: 39-40.
- Redecker D, Kodner R, Graham LE. 2000. Glomalean Fungi from the Ordovician. *Science* 289: 1920-1921.

- Redecker D, Schüßler A, Stockinger H, Stürmer SL, Morton JB, Walker C. 2013. An evidence-based consensus for the classification of arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota). *Mycorrhiza* 23: 515-531.
- Richards CL, Carstens BC, Knowles LL. 2007. Distribution modeling and statistical phylogeography: an integrative framework for generating and testing alternative biogeographic hypotheses. *Journal of Biogeography* 34: 1833-1845.
- Robinson-Boyer L, Grzyb I, Jeffries P. 2009. Shifting the balance from qualitative to quantitative analysis of arbuscular mycorrhizal communities in field soils. *Fungal Ecology* 2: 1-9.
- Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9:552-569.
- Ronquist F, Huelsenbeck J. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572-1574.
- Rosendahl S. 2008. Communities, populations and individuals of arbuscular mycorrhizal fungi. *New Phytologist* 178: 253-266.
- Rozas J, Sánchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Russell J, Bulman S. 2005. The Liverwort *Marchantia foliacea* Forms a Specialized Symbiosis with Arbuscular Mycorrhizal Fungi in the Genus *Glomus*. *New Phytologist* 165: 567-579.
- Ruzzante DE, Walde SJ, Gosse JC, Cussac VE, Habit E, Zemplak TS y Adams ED. 2008. Climate control on ancestral population dynamics: insight from Patagonian fish phylogeography. *Molecular Ecology* 17: 2234-2244.
- Saravia P. 1993. Estudio de la diversidad arbustiva y arbórea de la cuenca alta del Río Pirai; proyecto inter-regional para la participación en la conservación y desarrollo de las tierras altas –Proyecto SEARPI-FAO, Samaipata, Bolivia.
- Sarmiento G. 1975. The dry plant formations of South America and their floristic connections. *Journal of Biogeography* 2: 233-251.
- Schaal BA, Hayworth DA, Olsen KM, Rauscher JT, Smith WA. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- Schenck NC, Graham SO, Green NE. 1975. Temperature and light effect on contamination and spore germination of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi. *Mycologia* 67: 1189-119.
- Schenck NC, Perez Y. 1990. Manual for identification of vesicular arbuscular mycorrhizal fungi.(INVAM). University of Florida, Gainesville, Florida USA.

- Schüßler A, Walker C. 2010. The Glomeromycota. A species list with new families and new genera. Gloucester, in libraries at The Royal Botanic Garden Edinburgh. The Royal Botanic Garden Kew, Botanische Staatssammlung Munich and Oregon State University.
- Schwartz MW, Hoeksema JD. 1998. Specialization and resource trade: biological markets as a model of mutualisms. *Ecology* 79: 1029-1038.
- Sede SM, Nicola MV, Pozner R, Johnson LA. 2012. Phylogeography and palaeodistribution modelling in the Patagonian steppe: the case of *Mulinum spinosum* (Apiaceae). *Journal of Biogeography* 39: 1041-1057.
- Seltzer GO. 1992. Late Quaternary glaciation of the Cordillera Real, Bolivia. *Journal of Quaternary Science* 7: 87-98.
- Sérsic AN, Cosacov A, Cocucci AA, Johnson LA, Pozner R, Avila LJ, Sites Jr. JW, Morando M. 2011. *Biological Journal of the Linnean Society* 103, 475-494.
- Sieverding E. 1991. Vesicular-arbuscular mycorrhiza management in tropical agrosystems. *Deutsche Gesellschaft für Technische Zusammenarbeit, GTZ* 224. Eschborn.
- Sigüenza C, Espejel I, Allen E.B. 1996. Seasonality of mycorrhizae in coastal sand dunes of Baja California. *Mycorrhiza* 6: 151-157.
- Sivakumar N. 2013. Effect of edaphic factors and seasonal variation on spore density and root colonization of arbuscular mycorrhizal fungi in sugarcane fields. *Annals of Microbiology* 63: 151-160.
- Slater GJ, Thalmann O, Leonard JA, Schweizer R, Koepfli KP, Pollinger JP, Rawlence NJ, Austin JJ, Cooper A, Wayne RK. 2009. Evolutionary history of the Falklands wolf. *Current Biology Magazine* 19: R937-R938.
- Smit E, Leeflang P, Glandorf B, van Elsas JD, Wernars K. 1999. Analysis of fungal diversity rhizosphere by sequencing of cloned PCR-amplified genes encoding 18S rRNA and temperature gradient gel in the wheat electrophoresis. *Applied and Environmental Microbiology* 65: 2614-2621.
- Smith FA, Smith SE. 2011. What is the significance of the arbuscular mycorrhizal colonisation of many economically important crop plants? *Plant and Soil* 348: 63-79.
- Smith SE, Read D. 2008. *Mycorrhizal Symbiosis*. 3 ed. Elsevier Academic Press, New York, EEUU.
- 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.

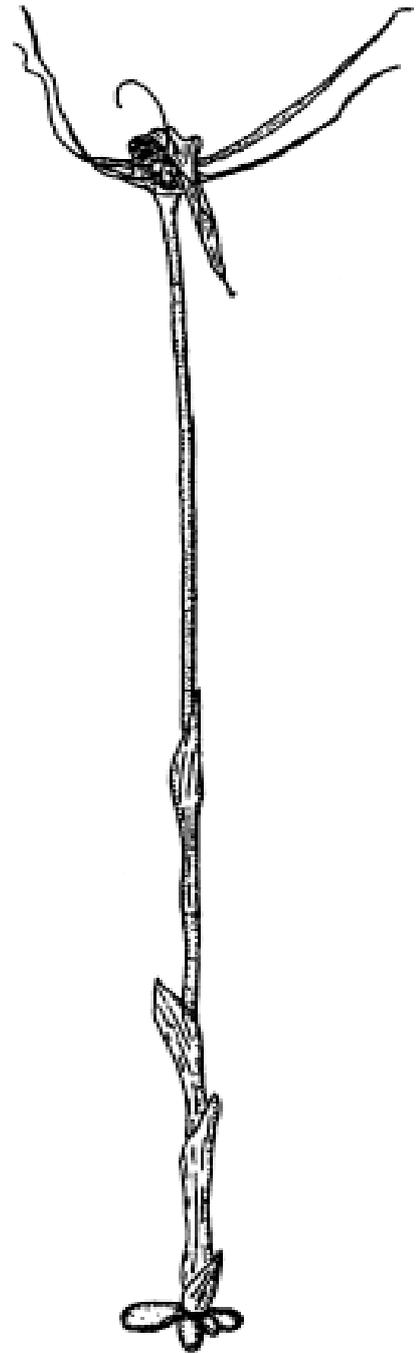
- Soltis DE, Gitzendanner MA, Strenge DD, Soltis PS. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution* 206: 353-373.
- Somoza R, Zaffarana C. 2008. Mid-Cretaceous polar standstill of South America, motion of the Atlantic hotspots and the birth of the Andean cordillera. *Earth and Planetary Science Letters* 271: 267-277.
- Soolanayakanahally RY, Guy RD, Silim SN, Drewes EC, Schroeder WR. 2009. Enhanced assimilation rate and water use efficiency with latitude through increased photosynthetic capacity and internal conductance in balsam poplar (*Populus balsamifera* L.). *Plant, Cell and Environment* 32: 1821-1832.
- Souto CP, Mathiasen P, Acosta MC, Quiroga MP, Vidal-Russell R, Echeverría C, Premoli AC. 2015. Identifying Genetic Hotspots by Mapping Molecular Diversity of Widespread Trees: When Commonness Matters. *Journal of Heredity* 106: 537-545.
- Taberlet P, Fumagalli L, Wust-Saucy AG, Cosson JF. 1998. Comparative phylogeography and post-glacial colonisation routes in Europe. *Molecular Ecology* 7: 453-464.
- Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739
- Taylor DL, Bruns TD, Leake JR, Read D. 2002. Mycorrhizal specificity and function in myco-heterotrophic plants, in: Sanders I, van der Hijden M (Eds.). 375-413 pp. *Ecological studies 157 Mycorrhizal Ecology*. Springer, Berlin, Alemania.
- Templeton AR, Sing CF. 1993. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping. IV. Nested analyses with cladogram uncertainty and recombination. *Genetics* 134: 659-669.
- 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: 4673-4680.
- Thompson JN. 1999. The evolution of species interactions. *Science* 284: 2116-2118.
- Thompson JN. 2005. The geographic mosaic of coevolution. The University of Chicago Press, Chicago USA.
- Thompson JN. 2013. Relentless Evolution. University of Chicago Press, Chicago. 499 pp.

- Thouveny N, Servant M. 1989. Palaeomagnetic stratigraphy of the Pliocene continental deposits of the La Paz Formation, Bolivia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 70: 331-344.
- Ton-That T, Singer B, Mörner NA, Rabassa J. 1999. Datación por el método  $^{40}\text{Ar}/^{39}\text{Ar}$  de lavas basálticas y geología del Cenozoico Superior en la región del Lago Buenos Aires, provincia de Santa Cruz, Argentina. *Asociación Geológica Argentina* 54: 333-352.
- Tremetsberger K, Urtubey E, Terrab A, Baeza CM, Ortiz MA, Talavera M, König C, Temsch EM, Kohl G, Talavera S, Stuessy TF. 2009. Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochoeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology* 18: 3668-3682.
- Turchetto-Zolet A, Pinheiro F, Salgueiro F, Palma-Silva C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193-1213.
- Ugarte E, Arriagada J. 1983. Presencia de *Arachnitis uniflora* Phil. (Corsiaceae) en la península de Hualpén, Concepción, Chile. *Boletín de la Sociedad de Biología de Concepción* 54: 167-170.
- van der Heijden MGA, Horton TR. 2009. Socialism in soil? The importance of mycorrhizal fungal networks for facilitation in natural ecosystems. *Journal of Ecology* 97: 1139-1150
- Villagrán C. 2001. A model for the history of vegetation of the Coastal Range of central-southern Chile: Darwin's glacial hypothesis. *Revista Chilena de Historia Natural* 74: 793-803.
- Villagrán C, Hinojosa LF. 1997. Historia de los bosques del sur de Sudamérica, II: Análisis fitogeográfico. *Revista Chilena de Historia Natural* 70: 241-267.
- Vuille M. 1999. Atmospheric circulation over the Bolivian Altiplano during dry and wet periods and extreme phases of the Southern Oscillation. *International Journal of Climatology* 19: 1579-1600.
- Vuille M, Keimig F. 2004. Interannual Variability of Summertime Convective Cloudiness and Precipitation in the Central Andes Derived from ISCCP-B3 Data. *Journal of Climate* 17: 3334-3348.
- Walker C, Mize CW, McNabb Jr HS. 1982. Populations of endogonaceous fungi at two locations in central Iowa. *Canadian Journal of Botany* 60: 2518-2529.
- Wang, IJ, Glor RE, Losos JB. 2013. Quantifying the roles of ecology and geography in spatial genetic divergence. *Ecology Letters* 16: 175-182.
- Waterman RJ, Klooster MR, Hentrich H, Bidartondo MI. 2013. Species Interactions of Micoheterotrophic Plants: Specialization and its Potential Consequences. En:

- Merckx VSFT (ed). 267-296 pp. Mycoheterotrophy. The Biology of Plants Living on Fungi. Springer. London, Inglaterra.
- Wayne ML, Simonsen KL. 1998. Statistical test of neutrality in the age of weak selection. *Trends in Ecology & Evolution* 13: 236-240.
- White TJ, Bruns T, Lee SB, Taylor JW. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. En: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (Eds.). 315-322 pp. PCR protocols. Academic Press, New York, U.S.A.
- Wilkie S. 1997. Isolation of total genomic DNA. En: Clark MS (ed.) 3-15 pp. Plant molecular biology - a laboratory manual. Springer-Verlag, Berlín, Alemania.
- Winkworth RC, Donoghue MJ. 2005. Viburnum phylogeny based on combined molecular data: Implications for taxonomy and biogeography. *American Journal of Botany* 92: 653-666.
- Wolfe AD, Randle CP, Datwyler SL, Morawetz JJ, Arguedas N, Diaz J. 2006. Phylogeny, taxonomic affinities, and biogeography of *Penstemon* (Plantaginaceae) based on ITS and cpDNA sequence data. *American Journal of Botany* 93: 1699-1713.
- Yamato M, Yagame T, Shimomura N, Iwase K, Takahashi H, Ogura-Tsujita Y, Yukawa T. 2011. Specific arbuscular mycorrhizal fungi associated with non-photosynthetic *Petrosavia sakurii* (Petrosaviaceae). *Mycorrhiza* 21: 631-639.
- Yrigoyen MR. 1979. Cordillera principal. En: Actas del II Simposio de Geología Regional Argentina, Córdoba 1: 651-694.
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K. 2001. Trends, rhythms, and aberrations in global climate 65 Ma to Present. *Science* 292: 686-693.
- Zayed A, Packer L, Grixti JC, Ruz L, Owen RE, Toro H. 2005. Increased genetic differentiation in a specialist versus a generalist bee: implications for conservation. *Conservation Genetics* 6: 1017-1026.
- Zech R, Kull C, Kubik PW, Veit H. 2007. LGM and Late Glacial glacier advances in the Cordillera Real and Cochabamba (Bolivia) deduced from <sup>10</sup>Be surface exposure dating. *Climate of the Past Discussions* 3: 839-869.
- Zhang LB, Comes HP y Kadereit JW. 2001. Phylogeny and quaternary history of the European montane/alpine endemic *Soldanella* (Primulaceae) based on ITS and AFLP variation. *American Journal of Botany* 88: 2331-2345.



# APÉNDICES



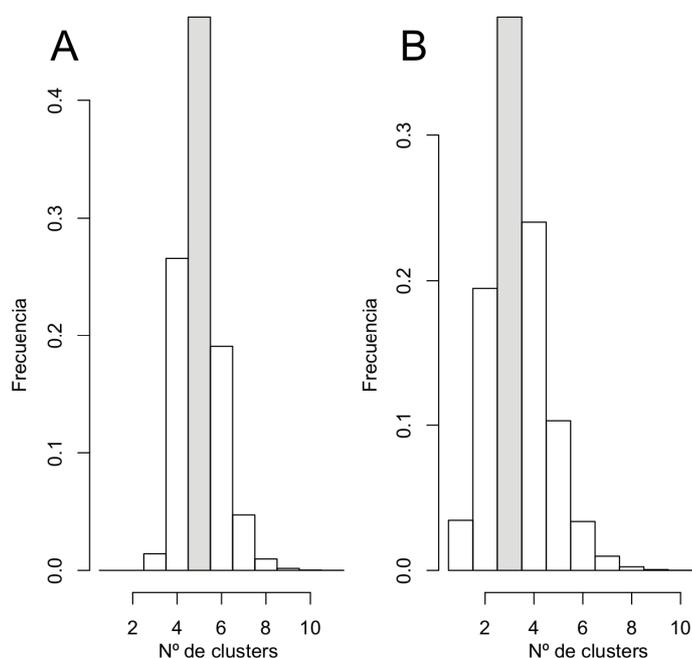
**Apéndice I:** Cebadores ensayados en *A. uniflora* para la selección de los adecuados para los estudios filogeográficos.

Nombre	Secuencia	Sentido	Autor	Ubicación	Amplif.	Sitios variables
rps2-47F	CTCGTTTTTTTATCTGAAGCCTG	F	dePamphillis <i>et al.</i> , 1997	Cloroplasto	N.E.	-
rps2-661R	ACCCTCACAAATAGCGAATACCAA	R				
atpF	AAGTGGATGAGATCGGTGCGAG	F	Eyre-Walker y Gaut, 1997	ATP A Mitocondria	+	-
atpR	GGCATTTCGATCACAGA	R				
NS5	AACTTAAAGGAATTGACGGAAG	F	White <i>et al.</i> , 1990	18S ribosomal - Núcleo	+	-
NS8	TCCGCAGGTTACCTACGGA	R				
181F	CGGGTAATGACAATATSTCC	F	Levin y Miller, 2005; Levin <i>et al.</i> , 2006; Levin <i>et al.</i> , 2007	Waxy - Núcleo	-	-
CRmod	GGCATAGTATGGGCTCACAGTAA	R				
181F	CGGGTAATGACAATATSTCC	F	Levin y Miller, 2005; Levin <i>et al.</i> , 2006; Levin <i>et al.</i> , 2007	Waxy - Núcleo	-	-
2R	GTTCCATATCGCATAGCATG	R				
8for	GGAGAGTTCGATCCTGGCTCAG	F	Nickrent <i>et al.</i> , 1997	16S ribosomal - Cloroplasto	+	+
1525rev	AAGGAGGTGATCCAGCC	R				
N-nc26S1	CGACCCAGGTCAGGCG	F	Kuzoff, 1998	26S ribosomal - Núcleo	+	+
950rev	GCTATCCTGAGGGAAACTTC	R				
Cox1 up	TTATTATCACTTCCGGTACT	F	Lu <i>et al.</i> (1998)	Mitocondria	+	-
Cox1 down	AGCATCTGGATAATCTGG	R				
Cox3 F	CCGTAGGAGGTGTGATGT	F	Duminil <i>et al.</i> (2002)	Mitocondria	+	-
Cox3 R	CTCCCCACCAATAGATAGAG	R				
NAD1B	GCATTACGAATCTGCAGCTCA	F	Demesure <i>et al.</i> (1995)	Mitocondria	+	-
NAD1C	GGAGCTCGATTAGTTTCT	R				
NAD4 e1A	CAGTGGGTTGGTCTGGTATC	F	Demesure <i>et al.</i> (1995)	Mitocondria	-	-
NAD4 e2B	TCATATGGGCTACTGAGGAG	R				
NAD4 e2A	TGTTTCCCGAAGCGACACTT	F	Demesure <i>et al.</i> (1995)	Mitocondria	+	-
NAD4 e4B	GGAACACTTTGGGGTGAACA	R				
NAD5 F	AGTCCAATAGGGACAGCAC	F	Jaramillo-Correa <i>et al.</i> (2003)	Mitocondria	-	-
NAD5 1Rb	GCTTTGATAGCTGCTTTATCTGC	R				
NAD7-1 F	GGAACCGCATATTGGATCAC	F	Jaramillo-Correa <i>et al.</i> (2003)	Mitocondria	-	-
NAD7-1 R	GTTGTACCGTAAACCTGCTC	R				
5SFULL	TTAGTGYTGGTATGATCGCA	F	Udovicic <i>et al.</i> (1995)	Núcleo	N.E.	-
5SR	CACCGGATCCCATCAGAACT	R				

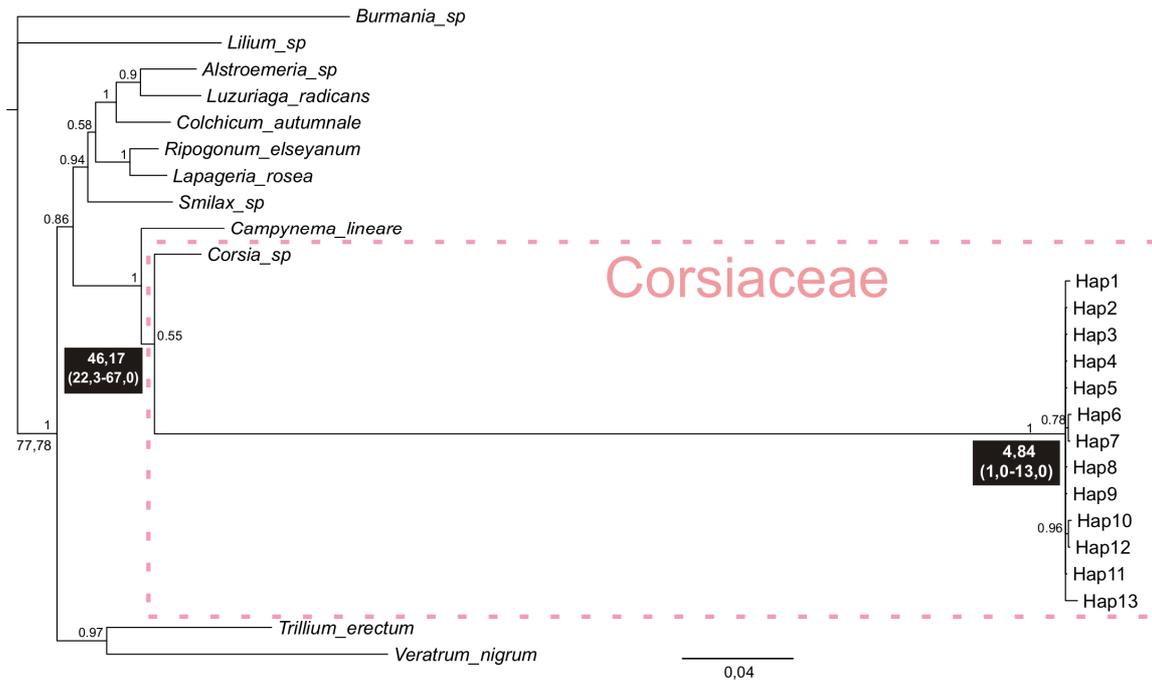
ITS17SE	ATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	F	Sun <i>et al.</i> (1994)			
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R	White (1990)	Núcleo	+	+
IwaxyF	ATTCCCTGCTACCTGAAGTC	F	Levin y Miller (2005), Levin <i>et al.</i> (2006, 2007)	Núcleo	-	-
2R	GTTCCATATCGCATAGCATG	R				
NS1	GTAGTCATATGCTTGTCTC	F	White (1990)	Núcleo	+	+
NS4	CTTCCGTC AATTCCTTTAAG	R				
trnK1L	CTCAATGGTAGAGTACTCG	F	Hu <i>et al.</i> (2000)	Cloroplasto	-	-
trnK2R	CCCGGAACTAGTCGGATG	R				
c	CGAAATCGGTAGACGCTACG	F	Taberlet <i>et al.</i> (1991)	Cloroplasto	-	-
f	ATTTGAACTGGTGACACGAG	R				
trnD	ACCAATTGAACTACAATCCC	F	Demesure <i>et al.</i> (1995)	Cloroplasto	-	-
trnT	CTACCACTGAGTTAAAAGGG	R				
rpL32 F	CAGTTCCAAAAAACGTA CTTC	F	Shaw <i>et al.</i> (2007)	Cloroplasto	-	-
trnL (UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	R				
ndhF	GAAAGGTATKATCCAYGMATATT	F	Shaw <i>et al.</i> (2007)	Cloroplasto	-	-
rpL32-R	CCAATATCCCTTYT TTTTCAA	R				
psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	F	Sang <i>et al.</i> (1997)	Cloroplasto	+	-
trnH2	CGCGCATGGTGGATT CACAATCC	R	Tate & Simpson (2003)			
rpsF	GTGGTAGAAAGCAACGTGCGACTT	F	Oxelmann <i>et al.</i> (1997)	Cloroplasto	+	-
rpsR2	TCGGGATCGAACATCAATTGCAAC	R				

**Apéndice II:** Secuencias incluidas en el análisis filogenético de *A. uniflora*. Se muestran los números de acceso a GenBank para cada porción de ADN analizada, tanto nuclear (ITS, 18S y 26S) como cloroplástico (16S).

Especie	ITS	18S	26S	16S
<i>Alstroemeria_sp</i>	JQ405055	KP420428	AF290586	-
<i>Burmannia_sp</i>	EU816712	Esta tesis	Esta tesis	-
<i>Campynema_lineare</i>	-	GQ497570	KM103460	-
<i>Colchicum_autumnale</i>	KC899568	-	-	KP125337
<i>Corsia_sp</i>	-	KP420413	AF205122	-
<i>Lapageria_rosea</i>	KC511481	KP420418	-	-
<i>Lilium_sp</i>	HQ724821	KP420419	KM117263	KT376489
<i>Luzuriaga_radicans</i>	JQ405067	KP420431	-	KM233640
<i>Ripogonum_elseyanum</i>	KF818394	KP420432	KM103468	-
<i>Smilax_sp</i>	JF978670	-	-	-
<i>Trillium_erectum</i>	DQ404196	AF207048	KM103465	-
<i>Veratrum_nigrum</i>	JF807683	KP420427	-	-



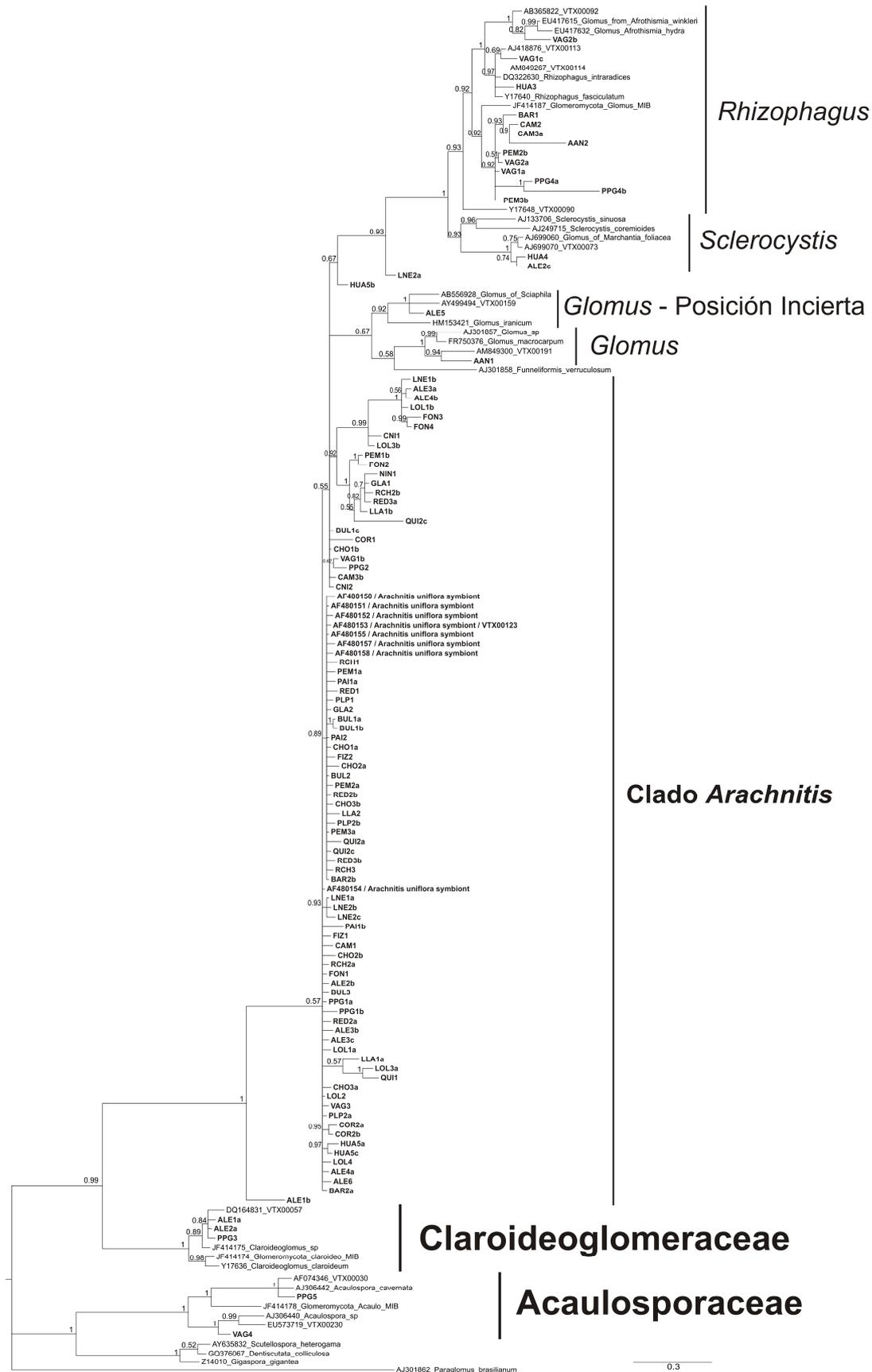
**Apéndice III:** Frecuencia de agrupamientos poblacionales más probables de los análisis bayesianos en Geneland. A) para las secuencias del ADN nuclear, B) para las secuencias del ADN cloroplástico.



**Apéndice IV:** Filogenia para el orden Liliales obtenida a partir de las secuencias nucleares (18S y 26S, y una pequeña porción de ITS), y cuyas dataciones de los nodos y tasas de evolución obtenidas, sirvieron para dataciones de los tiempos de divergencia de los haplotipos de *A. uniflora* más detalladas (mostradas en las Figs. 14 y 15). En cada nodo se muestra el valor del soporte (probabilidad posterior bayesiana; BPP) en la parte superior, y la edad de divergencia del mismo (en Ma) en cajas negras debajo del nodo. En recuadro y con líneas interrumpidas, se señala la familia Corsiaceae.

**Apéndice V:** Secuencias incluidas en el análisis filogenético de los HMA asociados a *A. uniflora* y en la datación de sus principales clados.

Familia	Código de población	Núm. acceso GenBank
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480150
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480151
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480152
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480157
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480158
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480154
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i>	AF480155
<i>Glomeraceae</i> - clado 'Arachnitis'	simbionte de <i>Arachnitis uniflora</i> / VTX00123	AF480153
<i>Glomeraceae</i>	<i>Funneliformis verruculosum</i>	AJ301858
<i>Glomeraceae</i>	Glomeromycota MIB 8366	JF414187
<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus iranicum</i>	HM153421
<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus macrocarpum</i>	FR750376
<i>Glomeraceae</i>	<i>Glomus</i> sp.	AJ301857
<i>Glomeraceae</i>	<i>Marchantia foliaceasymbiont</i>	AJ699060
<i>Glomeraceae</i>	<i>Rhizophagus fasciculatum</i>	Y17640
<i>Glomeraceae</i>	<i>Rhizophagus intraradices</i>	DQ322630
<i>Glomeraceae</i>	<i>Sciaphila symbiont</i>	AB556928
<i>Glomeraceae</i>	<i>Sclerocystis coremioides</i>	AJ249715
<i>Glomeraceae</i>	<i>Sclerocystis sinuosa</i>	AJ133706
<i>Glomeraceae</i>	<i>Afrothismia hydra</i> symbiont	EU417632
<i>Glomeraceae</i>	<i>Afrothismia winklerisymbiont</i>	EU417615
<i>Glomeraceae</i>	VTX00073	AJ699070
<i>Glomeraceae</i>	VTX00090	Y17648
<i>Glomeraceae</i>	VTX00092	AB365822
<i>Glomeraceae</i>	VTX00113	AJ418876
<i>Glomeraceae</i>	VTX00114	AM849267
<i>Glomeraceae</i>	VTX00159	AY499494
<i>Glomeraceae</i>	VTX00191	AM849300
<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus claroideum</i>	Y17636
<i>Claroideoglomeraceae</i>	<i>Claroideoglomus</i> sp.	JF414175
<i>Claroideoglomeraceae</i>	Glomeromycota MIB 8384	JF414174
<i>Claroideoglomeraceae</i>	VTX00057	DQ164831
<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora cavernata</i>	AJ306442
<i>Acaulosporaceae</i>	<i>Acaulospora</i> sp.	AJ306440
<i>Acaulosporaceae</i>	Glomeromycota MIB 8441	JF414178
<i>Acaulosporaceae</i>	VTX00030	AF074346
<i>Acaulosporaceae</i>	VTX00230	EU573719
<i>Gigasporaceae</i>	<i>Dentiscutata colliculosa</i>	GQ376067
<i>Gigasporaceae</i>	<i>Gigaspora gigantea</i>	Z14010
<i>Gigasporaceae</i>	<i>Scutellospora heterogama</i>	AY635832
<i>Paraglomeraceae</i>	<i>Paraglomus brasilianum</i>	AJ301862
Basidiomycota	<i>Tilletia iowensis</i>	DQ832252
Basidiomycota	<i>Tremella aurantia</i>	DQ836000
Ascomycota	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	EF153845



Apéndice VI: continúa en la siguiente página.

**Apéndice VI:** Árbol de inferencia bayesiana, construido a partir de secuencias del fragmento completo del gen ribosomal nuclear 18S, de los hongos de Glomeromycota encontrados en raíces de *A. uniflora*. Se muestran también representantes de linajes fúngicos no encontrados en dicha planta, los cuales fueron utilizados como identificadores y presentan su correspondiente número de acceso a GenBank (ver Apéndice I). El soporte de cada nodo (probabilidad posterior bayesiana; BPP) se muestra sobre cada nodo; aquellos con  $BPP < 0.5$  fueron colapsados a politomías.