



Universidad Nacional del Comahue
Centro Regional Universitario Bariloche

**DIVERGENCIA ENTRE ESPECIES SIMPÁTRICAS:
BARRERAS AL FLUJO GÉNICO INTRA- E
INTERESPECÍFICO EN TRES ESPECIES DEL GÉNERO
Nothofagus (*N. pumilio*, *N. antarctica* y *N. dombeyi*).**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología
Licenciada Gabriela Juri

Directora: Dra. Andrea Cecilia Premoli Il'Grande

Codirector: Dr. Mariano Martín Amoroso

2023

Índice de contenido

AGRADECIMIENTOS	5
RESUMEN.....	7
SUMMARY	9
Capítulo 1: Introducción general.....	11
DIVERGENCIA INTER E INTRAESPECIFICA	11
MARCADORES MOLECULARES Y GENOMICOS	13
QUIEBRES FILOGENÉTICOS INTRAESPECÍFICOS	15
EL MODELO BIOLÓGICO	18
CAPTURA DE CLOROPLASTO EN OTRAS ESPECIES	22
OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO	23
FIGURAS	28
Capítulo 2: Alocronía de especies ecológicas vecinas: ¿Puede el aislamiento temporal mantener la divergencia interespecífica? El experimento natural de los <i>Nothofagus</i> simpátricos.	29
INTRODUCCIÓN	29
Objetivos.....	32
Hipótesis y predicciones	33
MATERIALES Y MÉTODOS	34
Especies y diseño de muestreo	34
Observaciones fenológicas.....	36
Inicio de la floración y análisis de requerimientos térmicos	36
Anomalías térmicas	37
Análisis estadístico	38
RESULTADOS	39

Descripción de los ritmos fenológicos.....	39
Inicio de la floración, requerimientos térmicos y anomalías térmicas	40
DISCUSIÓN	45
TABLAS	52
FIGURAS	57
Capítulo 3: Señales filogenéticas y efectos de la geografía sobre distintos genomas de <i>Nothofagus</i>	68
INTRODUCCIÓN	68
Objetivos.....	74
Hipótesis y predicciones	74
MATERIALES Y MÉTODOS	75
Especies de estudio.....	75
Lugares de estudio y plan de muestreo	76
Colecta de material vegetal y extracción de ADN.....	77
PCR, obtención de secuencias y determinación del haplotipo del cloroplasto	78
Obtención de marcadores SNP y filtrado de los datos	79
Secuenciación, ensamblado y anotado de los genomas de completos de cloroplasto y parciales de mitocondria.....	81
Uso de codones, repeticiones de secuencias simples (SSR) y comparación estructural de los genomas de cloroplasto	82
Análisis filogenético	82
AMOVA.....	84
RESULTADOS	84
Haplotipos del cloroplasto y su distribución geográfica	84

Caracterización de los genomas de cloroplasto y lista de genes mitocondriales	85
Análisis filogenético	88
Análisis Molecular de la Varianza	90
DISCUSIÓN	91
TABLAS	98
FIGURAS	114
Capítulo 4: Geografía de la divergencia entre especies hermanas de <i>Nothofagus</i>	123
INTRODUCCIÓN	123
Objetivos.....	128
Hipótesis y Predicciones.....	128
MATERIALES Y METODOS	129
Área de estudio.....	129
Extracción de ADN	130
PCR, secuenciación y obtención de haplotipos de cloroplasto.....	130
Secuenciación de alto rendimiento	131
Obtención de SNP en especies sin genoma de referencia.....	131
Filtrado de las bases de datos	132
Asociaciones genotipo-fenotipo	133
Diversidad genética y estructuración poblacional	135
Análisis Multivariado	137
Anotado funcional	137
RESULTADOS	138
Obtención de SNP y filtrado de las bases de datos.....	138
Asociaciones genotipo-fenotipo	138

Diversidad genética y estructuración poblacional	140
Ordenamiento Multivariado.....	141
Análisis Funcional.....	144
DISCUSIÓN	146
TABLAS	155
FIGURAS	160
Capítulo 5: Discusión general.....	173
CONCLUSIONES.....	186
Bibliografía.....	187
Material Suplementario.....	202
CAPÍTULO 3	202
Tablas suplementarias.....	202
Figuras suplementarias	206
CAPÍTULO 4:	207
Tablas suplementarias.....	207
Figuras suplementarias	211
Trabajo de respaldo: Allochrony of neighbour ecological species: Can isolation by time maintain divergence? The natural experiment of sympatric <i>Nothofagus</i>	214

AGRADECIMIENTOS

A Malva, mi madre, por enseñarle a una nena de ciudad a maravillarse con la naturaleza. Gracias por ser mi fan número uno siempre, por enseñarme el valor del presente y el valor de los sueños. Gracias a vos aprendí que nunca es tarde para empezar nuevos desafíos. Gracias a vos aprendí que una nunca está sola si es fiel a sus ideas, que la gente afín llega a nuestras vidas y que no hay que doblarse por satisfacer a nadie.

A Luis, mi papa, por enseñarme el amor por la ciencia y el conocimiento. Gracias por sentarte todos los días a estudiar conmigo, por escuchar el resumen de cada cosa que alguna vez aprendí. Gracias por enseñarme que no existen los defectos si no las virtudes desaprovechadas y que importan más los caminos que los resultados. Gracias por levantar siempre la bandera de que investigar es trabajar.

A Andrea, mi directora y mentora, le quiero agradecer por la infinita paciencia que me ha tenido, por el amor con el que me acompañó durante todo este proceso. La confianza es el mejor regalo que alguien me puede dar y vos, Andy, confiaste en mí. Me ayudaste a crecer como bióloga y como investigadora, me diste espacio cuando estuve mal y empujones cuando empecé a sentirme mejor. Gracias por ser una excelente directora, una mentora comprometida y una compañera de trabajo dedicada.

Gracias a la educación pública, al estado argentino y a CONICET en particular por mi formación y por la posibilidad de hacer este trabajo. Creo que la educación pública es el mayor tesoro nacional.

A mi compañero Fausto por estar siempre, por enseñarme lo que significa una caricia amorosa, por respetar mi espacio y por quererme ñoña y trabajólica como soy.

A Mariano, mi codirector, por abrirme las puertas del IRNAD en donde pude conocer otras ciencias y comenzar mi carrera docente.

A Mariana Fasanella y Paula Mathiasen gracias por dedicar tanto tiempo a enseñarme a trabajar en el laboratorio. Gracias por las charlas, por compartir sus experiencias buenas y malas. Gracias a las dos por ser un ejemplo de que una mujer puede ser una soñadora, una científica productiva y una madre, todo a la vez.

A Ramiro Ripa por ser el mejor coautor de la tierra. Sin tu calidez y tu energía todo este último año hubiese sido aburridísimo.

A Karin Heinemann por enseñarme a amar todavía más los bosques de lenga, por enseñarme a caminar sin escupir los pulmones y por aguantarse toda mi angustia de novata

A Gonza, por caminar conmigo en ese sendero que nos rompió las rodillas, por su escucha y por toda la alegría que sumó a mi trabajo de campo.

A Marcelo Rubinstein, Manuel Guzmán, Silvia Ortubay y Daniel Werzing por abrirnos las puertas de sus casas, por facilitarnos el ingreso a los bosques y por compartir con nosotras. Gracias a la familia Guzmán entera por la buena onda, los chistes sobre vegetarianismo acompañados por deliciosas tortillas de papa con ensalada.

Al IRNAD y a ECOTONO por ser mi casa durante todos estos años.

A Daiana Jaume y a Grecia de Groot por ser mis amigas y mi familia cuando estuve en Bariloche

A Pablo Vena, por la inmensa paciencia y sorprendente dedicación con la que respondió todas mis preguntas sobre R y Linux.

A Momo y la China por ser mis gurús de la estadística.

A mi hermana Janis por siempre creer en mí, por compartir la pasión por la evolución, las bacterias y la endosimbiosis.

A Daniela, Clara y Luz por estar siempre, por enseñarme y por compartirse conmigo de la forma más generosa.

A Candy, el Podrido y Luna, que fueron mis amigos animales, por haber sido mi familia cuando todo parecía horrible.

A mi gato Mateo por ser mi familiar, mi pariente y mi mejor amigo.

RESUMEN

El origen y la distribución de la variación genotípica y fenotípica es un tema central de la biología evolutiva. El concepto de aislamiento entre poblaciones es común a muchas definiciones de especie, pero la historia y el mantenimiento de ese aislamiento han sido y son intensamente discutidos. Los modelos geográficos de especiación plantean dos escenarios opuestos para la divergencia: alopatria y simpatria. La especiación alopatrica propone que la divergencia entre linajes ocurre por aislamiento geográfico mientras que la simpátrica tiene lugar bajo potencial flujo genético. Las especies de *Nothofagus* subgénero *Nothofagus* (Nothofagaceae, Fagales) son un excelente sistema para el estudio de estos modelos de especiación y divergencia. En Patagonia Norte, las especies deciduas *N. antarctica* y *N. pumilio* y la siempreverde *N. dombeyi* son simpátricas en muchas porciones de su rango de distribución. Son capaces de hibridar, pero se diferencian ecológica, morfológica y genéticamente mediante secuencias nucleares ITS, pero secuencias neutras del cloroplasto muestran linajes geográficos ubicados al norte y al sur de la región 42°S a 43°S en donde coexisten en simpatria. Se ha asociado esta divergencia del cloroplasto a intrusiones marinas contemporáneas a la radiación de las especies. Estudiamos el mantenimiento de las barreras reproductivas entre y dentro de especies mediante: (1) el análisis comparativo de sus fenologías; (2) ensamblado, anotado y análisis filogenético de los genomas de representantes de las distintas especies y haplotipos de cloroplasto presentes en la zona 42°S a 43°S; (3) estudios de genómica de poblaciones basados en marcadores SNP (polimorfismos de nucleótido único) y secuencias no codificantes *trnH-psbA* del cloroplasto; (4) el análisis funcional de la variación fenológica, la divergencia entre especies y haplotipos de cloroplasto. Detectamos fuertes barreras reproductivas precigóticas (fenológicas) entre especies: en simpatria son alocrónicas y la distancia fenológica responde a la variación climática, climas fríos la reducen y cálidos la aumentan. Los genomas de cloroplasto son muy uniformes en cuanto a contenido génico y estructura en todo el subgénero. Las filogenias basadas en marcadores SNP muestran clados que coinciden con las especies. Los marcadores asociados a especies y haplotipos muestran un aislamiento significativo pero los marcadores no asociados sugieren intercambio genético fuerte entre haplotipos de

cloroplasto y moderado entre especies. El análisis funcional de los marcadores asociados a haplotipos muestra la naturaleza adaptativa de esta divergencia, aunque no existen barreras fenológicas entre ellos y el flujo génico entre linajes de cloroplasto es elevado. Las barreras fenológicas en *Nothofagus* son permeables, dependen de la elevación y del régimen climático. Nuestros estudios muestran regiones del genoma fuertemente diferenciadas entre especies (algunas de ellas con funciones biológicas conocidas) y otras compartidas que sugieren eventos de hibridación. La adaptación ecológica a un ambiente espacial y temporalmente heterogéneo como la Patagonia ejerce barreras reproductivas que han impactado sobre las especies de *Nothofagus* las cuales pueden considerarse entidades dinámicas que probablemente han hibridado y divergido durante su historia evolutiva.

SUMMARY

The origin and distribution of genotypic and phenotypic variation is a central topic in evolutionary biology. The concept of isolation between populations is common to many species' definitions, but the history and maintenance of such isolation have been and are intensely debated. Geographic models of speciation pose two opposing scenarios for divergence: allopatry and sympatry. Allopatric speciation proposes that lineage divergence occurs due to geographic isolation while sympatric speciation takes place under potential gene flow. The species of *Nothofagus* subgenus *Nothofagus* (Nothofagaceae, Fagales) are an excellent system for studying these patterns of speciation and divergence. In Northern Patagonia, the deciduous species *N. antarctica* and *N. pumilio* and the evergreen *N. dombeyi* are sympatric in many portions of their range. They are able to hybridize, but differ ecologically, morphologically, and genetically by ITS nuclear sequences, but neutral chloroplast sequences show geographic lineages located north and south of the 42°S to 43°S region where they coexist in sympatry. This divergence of the chloroplast has been associated with contemporary marine incursions to the radiation of the species. We study the maintenance of reproductive barriers between and within species through: (1) the comparative analysis of their phenologies; (2) assembly, annotation, and phylogenetic analysis of the genomes of representatives of the various species and chloroplast haplotypes present in the zone 42°S to 43°S; (3) population genomic studies based on SNP markers (single nucleotide polymorphisms) and chloroplast *trnH-psbA* non-coding sequences; and (4) functional analysis of phenological variation, interspecies divergence, and chloroplast haplotypes. We detected strong prezygotic (phenological) reproductive barriers between species: in sympatry they are allochronic and the phenological distance responds to climatic variation, cold climates reduce it and warm ones increase it. Chloroplast genomes are highly uniform in gene content and structure across the subgenus. Phylogenies based on SNP markers show clades that match the species. Species-associated and haplotype-associated markers show significant isolation but non-associated ones suggest strong genetic exchange between chloroplast haplotypes and moderate between species. Functional analysis of haplotype-associated markers shows the adaptive nature of this divergence, although

no phenological barriers exist and gene flow between chloroplast lineages is high. Phenological barriers in *Nothofagus* are permeable, dependent on elevation and climatic regime. Our studies show strongly differentiated regions of the genome (some of them with known biological functions) between species and other shared ones that suggest hybridization events. The ecological adaptation to a spatially and temporally heterogeneous environment such as Patagonia exerts reproductive barriers that have impacted *Nothofagus* species, which can be considered dynamic entities that have probably hybridized and diverged during their evolutionary history.

Capítulo 1: Introducción general

DIVERGENCIA INTER E INTRAESPECIFICA

La divergencia genética puede considerarse una etapa temprana en el proceso de diferenciación poblacional. Si la divergencia genética entre grupos se sostiene en el tiempo permite el surgimiento de novedades evolutivas, es decir de nuevas estructuras o modificaciones de estructuras existentes que asumen nuevas funciones adaptativas o nuevos roles ecológicos (Moczek, 2008). Tempranamente se propuso que “la evolución de las especies de plantas consiste de una serie de etapas de diferenciación evolutiva creciente, comenzando con las poblaciones locales, continuando a través de razas ecológicas, ecoespecies y grupos de especies de orden jerárquico cada vez mayor” (Clausen, 1951). Usualmente la divergencia se inicia gracias a la aparición de barreras al intercambio genético que pueden ser intrínsecas (fisiológicas, autoecológicas) o extrínsecas (geográficas, climáticas). Puede ocurrir en alopatría (en aislamiento geográfico), o en simpatría si las poblaciones comparten total o parcialmente su rango de distribución y coexisten localmente. A lo largo de las generaciones, las poblaciones que se mantienen aisladas continúan acumulando diferencias genéticas debido al efecto individual o combinado de la mutación, la deriva genética y/o la selección natural. La aparición de variantes genéticas adaptativas puede derivar en el establecimiento de ecotipos localmente adaptados e incluso en especiación. Independientemente del origen de la divergencia, la interpretación de los patrones de distribución geográfica de la diversidad genética y la caracterización funcional de la divergencia entre grupos permiten comprender los mecanismos que operan para sostener la diferenciación entre poblaciones o especies actualmente simpátricas.

Los patrones de divergencia entre poblaciones han sido comúnmente analizados en relación con las distancias geográficas que las separan en el contexto de mecanismos de aislamiento geográfico o por distancia, es decir en alopatría (Pyron & Burbrink, 2010). La divergencia alopátrica se asocia a barreras físicas que separan y aíslan poblaciones que, de este modo, acumulan variación genética de forma independiente unas de otras. Sin embargo, el aislamiento geográfico en sí mismo no

garantiza el surgimiento de barreras intrínsecas al flujo génico y las poblaciones pueden potencialmente volver a unificarse si la barrera física desaparece o pierde su fuerza. Por otro lado, poblaciones que sufrieron aislamiento geográfico en el pasado podrían estar en contacto físico en el presente y aún mantener diferencias genéticas a pesar del elevado flujo genético entre ellas (Fasanella *et al.*, 2023). Queda claro que la geografía representa sólo uno de los componentes clave del paisaje que pueden potencialmente influenciar el flujo génico y la conectividad poblacional. Las interacciones entre los organismos y el ambiente pueden determinar y modelar los patrones espaciales de la variación genética, lo que resulta en lo que se ha dado en llamar mecanismos de aislamiento por el ambiente en el que las distancias genéticas y ambientales se correlacionan independientemente de las distancias geográficas.

La divergencia simpátrica ocurre entre poblaciones físicamente conectadas y en presencia de flujo génico. Es un proceso parcialmente comprendido en el que poblaciones que comparten al menos una porción de su rango de distribución geográfica comienzan a evolucionar de manera independiente (Coyne & Orr, 2004; Fitzpatrick *et al.*, 2008; Mallet *et al.*, 2009). La superposición actual de rangos de distribución sugiere divergencia en simpatría pero también puede indicar un contacto secundario posterior a un evento de divergencia alopátrica. En cualquiera de los dos casos, el mantenimiento de la diferenciación entre poblaciones o especies simpátricas requiere el surgimiento de barreras de aislamiento reproductivo intrínsecas que restrinjan total o parcialmente el flujo génico entre ellas. Estas barreras intrínsecas derivan de las características propias de una especie y su interacción con el ambiente. Las diferencias ecológicas entre poblaciones pueden contribuir al fortalecimiento de estas barreras reproductivas intrínsecas, especialmente en condiciones de simpatría, es decir en ausencia de barreras físicas al flujo génico (reforzamiento) (Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009).

Los procesos ecológicos que afectan la divergencia genética tanto dentro como entre especies cobran relevancia en estos escenarios (Wang & Bradburd, 2014). Las variables ambientales pueden ser continuas, como la elevación, o discretas como el tipo de hábitat o sustrato; asimismo pueden deberse a factores abióticos como temperatura y precipitación o bióticos como la densidad de la vegetación o patógenos. Las

poblaciones localmente adaptadas poseen características ajustadas a dichas condiciones y, producto de la selección natural divergente, tendrían mayor aptitud que genotipos inmigrantes que se originaron en otros ambientes (Nosil *et al.*, 2005). La diferenciación ecológica entre especies pueden generar aislamiento postcigótico si los híbridos poseen baja aptitud biológica en los nichos de las poblaciones parentales y no existen nichos intermedios. El aislamiento ecológico también puede afectar el aislamiento precigótico. Por ejemplo, la sincronización de los ciclos de vida de las plantas con ambientes divergentes tiene el potencial de generar aislamiento fenológico (desfasaje de la fenología floral de algunos individuos respecto de otros) o la competencia polínica (Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009). Este enfoque, especialmente en el contexto de especies que divergen en simpatría, puede aportar elementos novedosos que expliquen mecanismos de dispersión, conectividad y diferenciación tanto dentro como entre especies.

Las plantas, gracias a las características del polen y sus dispersores, suelen tener altas tasas de flujo génico incluso entre poblaciones distantes. Si la selección natural es débil, este intercambio genético es suficiente para mantener la cohesión de especie entre poblaciones cercanas y a lo largo de rangos amplios de distribución geográfica (Baack *et al.*, 2015). Por el contrario, la selección natural fuerte asociada a ambientes heterogéneos puede promover la divergencia a escalas espaciales reducidas aún en presencia de alto flujo génico como es el caso de las especies leñosas que a menudo poseen altas tasas de fecundación cruzada y con un extenso flujo de genes (Sork, 2016). Al menos en estos casos es probable que las barreras reproductivas evolucionen como consecuencia de la selección natural actuando de modo directo vía aislamiento ecológico, inviabilidad de los migrantes, aislamiento fenológico, aislamiento por polinizador o selección ecológica en contra de los híbridos, etc. (Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009).

MARCADORES MOLECULARES Y GENOMICOS

Los estudios utilizando marcadores moleculares evidencian y permiten interpretar patrones de diversidad y divergencia genética en las poblaciones actuales y pasadas.

Los estudios genéticos también permiten conectar patrones microevolutivos (variación de las frecuencias alélicas entre poblaciones geográficas) con procesos estocásticos como la deriva genética, demográficos como pueden ser las variaciones en el tamaño poblacional y las migraciones, e incluso con procesos macroevolutivos (especiogénicos) evidenciados por filogenias interespecíficas e intraespecíficas (Avice *et al.*, 1987).

Una célula vegetal tiene tres genomas distintos: nuclear, mitocondrial y del cloroplasto. Los genomas de organelas (cloroplastos y mitocondrias) son diferentes a los genomas nucleares en muchos sentidos y están sujetos a una dinámica evolutiva particular. Su herencia es, en la mayoría de los casos, uniparental y por consiguiente no recombinante por lo que permite la reconstrucción de filogenias matri o patrilineales, en las mayoría de angiospermas y gimnospermas, respectivamente.

Cada cloroplasto contiene una población de moléculas de ADN. Según evidencia empírica, la mayoría de los individuos dentro de una población son homoplásmicos, es decir que estas moléculas son esencialmente idénticas en secuencia pudiéndose considerar como un genoma haploide. Esto facilita enormemente la construcción de haplotipos y su asignación a un individuo (genotipado). Su tasa de evolución es baja en comparación con el genoma nuclear y el genoma mitocondrial de animales y por este motivo el ADNcp es muy útil para establecer relaciones filogenéticas entre taxones de orden superior. Su aplicación a filogenias intraespecíficas requiere un muestreo extenso y un gran esfuerzo de secuenciación para poder encontrar polimorfismos suficientes, pero proporciona la ventaja de evidenciar procesos antiguos (Avice, 2009; Shaw *et al.*, 2014). Los genomas de cloroplasto son la herramienta tradicional para poner a prueba las relaciones entre fenómenos biológicos y geográficos en angiospermas. Las secuencias de cloroplasto han sido usadas para inferir relaciones filogenéticas y patrones filogeográficos en todos los niveles taxonómicos, desde las relaciones más profundas de las plantas terrestres, pasando por los niveles de orden y familia para llegar a las relaciones entre especies emparentadas e incluso poblaciones (Shaw *et al.*, 2014).

Los genomas mitocondriales de las plantas se diferencian de los genomas mitocondriales animales y de los cloroplastos en casi todos los aspectos. Las

mitocondrias animales suelen poseer genomas estructuralmente simples, circulares y compactos (cerca de 16kb). A diferencia de los cloroplastos y las mitocondrias animales, los genomas mitocondriales de las angiospermas son grandes (de 222 kb a varias megabases), estructuralmente complejos y muy dinámicos. Los rearrreglos estructurales, la incorporación de ADN foráneo desde el núcleo o los cloroplastos, la transferencia activa y reciente de genes mitocondriales al núcleo y la disrupción de genes en intrones y exones, aunque poco frecuentes en cloroplasto, son la marca distintiva de los genomas mitocondriales de las angiospermas. Pese a esto, las regiones codificantes de los genes mitocondriales están altamente conservados y son un reservorio de información filogenética sobre clados antiguos y sobre la divergencia a niveles taxonómicos altos como puede ser a nivel de orden (Knoop, 2004).

Los genomas nucleares, de herencia biparental y afectados por la alta capacidad de dispersión del polen, ofrecen un panorama distinto. Los marcadores SNP (polimorfismos de un solo nucleótido) han entrado en auge gracias al avance de las tecnologías de secuenciación masiva. Estos marcadores se obtienen analizando directamente los datos de secuenciación, están libres de homoplasia, permiten identificar porciones neutrales del genoma e incluso detectar huellas de la selección natural. No sólo son útiles para todo tipo de estudios microevolutivos y de genética clásica sino que también pueden asociarse a variables ambientales, a patrones de distribución geográfica y a distintos fenotipos incluso cuando no se cuenta con un genoma de referencia (Gupta *et al.*, 2001; Leaché & Oaks, 2017). La gran cantidad de información disponible en las bases de datos genéticos permite usar datos de secuencias obtenidas por otros investigadores para asociar SNPs de comportamiento especial o atípico de una especie no estudiada con distintos genes o regiones del genoma (Narum & Hess, 2011).

QUIEBRES FILOGENÉTICOS INTRAESPECÍFICOS

La superposición de una filogenia intraespecífica con su ubicación geográfica es conocida como filogeografía *sensu* Avise (1987) y propone tres hipótesis generales principales sobre la divergencia entre poblaciones y sus mecanismos: (a) la mayoría de

las especies se componen de poblaciones geográficas cuyos miembros ocupan distintas ramas de una filogenia intraespecífica, esta partición se denomina estructura filogenética; (b) las especies con una leve estructura filogenética tienen historias de vida relacionadas con una gran capacidad de dispersión y han ocupado rangos geográficos históricamente libres de impedimentos al flujo génico; (c) los grupos monofiléticos que se distinguen por quiebres filogenéticos profundos generalmente derivan de barreras extrínsecas y duraderas al flujo génico. De este modo, una alta divergencia genética entre clados que comparten distribución geográfica (quiebre filogeográfico) puede ser evidencia de una zona de contacto secundario reciente entre grupos históricamente aislados, o bien puede ser el resultado de barreras o restricciones al flujo génico incipientes (Avice *et al.*, 1987).

Irwin (Irwin, 2002) estudió, *in silico*, la formación de quiebres filogeográficos profundos en poblaciones de distribución continua y en ausencia de barreras al flujo génico. Los resultados de las simulaciones mostraron que es posible la formación de quiebres filogeográficos en ausencia de barreras al flujo génico. La estructura filogeográfica y el tiempo total de coalescencia dependen fuertemente de la distancia media de dispersión de los individuos en cada generación y del tamaño poblacional efectivo. A medida que la distancia de dispersión y el tamaño poblacional (N) disminuyen, los quiebres filogeográficos se hacen más profundos. Esto depende además del tipo de genoma analizado ya que los genomas de organelas como la mitocondria y el cloroplasto tienen tamaños poblacionales efectivos cuatro veces menores que los genomas nucleares (Charlesworth, 2009; Hickerson *et al.*, 2010). La naturaleza no recombinante de los genomas de organelas permite reconstruir patrones genealógicos con más claridad ya que no es posible que un individuo sea genéticamente intermedio. Las simulaciones muestran que los genomas plastidiales son susceptibles de mostrar estructuración filogeográfica profunda generada por procesos estocásticos como la deriva genética y el aislamiento cuando se estudian poblaciones pequeñas de baja capacidad de dispersión (Irwin, 2002).

En poblaciones naturales la distribución espacial y la dispersión no son uniformes. Los ambientes son heterogéneos de modo que puede haber extinciones locales que profundicen la divergencia, o puede estar actuando la selección natural

para mantenerla. En estas condiciones, el surgimiento y la persistencia de quiebres filogeográficos en ausencia de una barrera geográfica es aún más factible. La reconstrucción de la historia filogeográfica de una especie a partir de datos moleculares gana confiabilidad con la concordancia genealógica o coherencia entre caracteres y/o especies (Avice, 2009). Por un lado, la concordancia dentro de un mismo locus implica que un quiebre profundo se evidencia gracias a múltiples diferencias a lo largo de una secuencia de ADN que separan consistentemente un grupo de variantes genéticas de otro. Además, un quiebre profundo es confiable cuando múltiples árboles de genes independientes distinguen los mismos grupos de poblaciones o cuando existe un patrón de diferenciación genética común a varias especies. Por último, una barrera gana confiabilidad gracias a la concordancia entre evidencias empíricas provenientes de distintas disciplinas, como por ejemplo la concordancia geográfica y temporal de un quiebre filogeográfico con algún evento geológico o climático del pasado (Avice, 2009).

El uso de varios tipos de marcadores, el estudio de varios genes y de varias especies permite descartar la posibilidad de que la estructuración observada sea producto de eventos aleatorios (Quiroga *et al.*, 2019). Un mismo patrón de diferenciación genética compartido por especies simpátricas sugiere la existencia de una barrera física generalizada al flujo génico ya que los procesos estocásticos rara vez devienen en patrones compartidos. A escala mundial existen varios ejemplos de quiebres filogeográficos compartidos por especies no relacionadas, por ejemplo la hipótesis de “refugios dentro de refugios” para explicar la preservación de distintos linajes dentro de la península Ibérica (España) durante las glaciaciones del pleistoceno, o el surgimiento del istmo de Tehuantepec para explicar la estructuración latitudinal de la variación genética en México. La retracción de los bosques tropicales y fauna asociada durante las glaciaciones (hipótesis de refugios), la posición geográfica de estrechos navegables como el de Gibraltar o las oscilaciones climáticas que afectan la conectividad entre masas de tierra gracias a cambios en el nivel del mar, ingresiones marinas o hielos permanentes, son otros ejemplos de patrones filogeográficos asociados a variación topográfica y compartidos entre especies son (Kumar & Kumar, 2018).

¿Qué tan estable es la estructura filogeográfica generada por una barrera física al flujo génico? ¿Cuánto tiempo puede persistir un quiebre filogeográfico en ausencia de dicha barrera? La fuerza de un quiebre filogeográfico causado por una barrera extrínseca tiende a decaer rápidamente luego de la desaparición de la barrera. Valiéndose de simulaciones, Irwin (Irwin, 2002) mostró que las poblaciones de capacidad de dispersión alta o media pierden hasta el 50% de la fuerza inicial del quiebre luego de transcurridas aproximadamente 7000 generaciones. Únicamente las poblaciones con muy baja dispersión pudieron mantener el 75% de la fuerza del quiebre original. Irwin (2002) concluye que la tasa de disminución aumenta con la capacidad de dispersión de los individuos y que no depende del tamaño poblacional efectivo. Varios factores pueden estabilizar un quiebre filogeográfico una vez que la barrera se ha retirado. Entre ellos puede mencionarse el surgimiento de algún grado de aislamiento reproductivo entre los grupos que marcan dicho quiebre, divergencia ecológica y adaptación local o hasta incluso selección natural actuando en contra de la formación de híbridos (Fasanella *et al.*, 2023).

EL MODELO BIOLÓGICO

El subgénero *Nothofagus* (género *Nothofagus*, familia Nothofagaceae, orden Fagales) cuenta con cinco especies endémicas de la Patagonia Andina: *Nothofagus antarctica* (G. Forst.) Oerst. (Ñire), *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. (Coihue) y *Nothofagus pumilio* (Poepp. et Endl.) Krasser (Lenga), distribuidos en la zona cordillerana de Argentina y Chile; *Nothofagus nitida* (Phil.) Krasser (Coihue de Chiloé) y *Nothofagus betuloides* (Mirb.) Oerst. (Coihue de Magallanes o Guindo) son más abundantes en los bosques valdivianos húmedos al oeste de la Cordillera de los Andes. *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* son los árboles dominantes de los bosques del norte de la Patagonia Argentina y serán el objeto de estudio de esta tesis. Pese a estar adaptados a ambientes ecológicamente contrastantes, los extremos de sus rangos ecológicos de distribución se superponen y coexisten en simpatria en varios sitios (Veblen *et al.*, 1996; Donoso Zegers, 2006).

La Lengua, *N. pumilio* crece desde los 35°35'S hasta los 55°31'S. En Patagonia, al norte de los 44°S, *N. pumilio* forma fajas boscosas que crecen desde los 900-1000 msnm hasta el límite superior de la vegetación donde crece predominantemente como bosques monoespecíficos. Esta especie es de hoja caduca y amante del frío se desarrolla en ambientes de alta montaña. Se caracterizan por estaciones de crecimiento cortas con temperaturas bajas, vientos fuertes y precipitaciones en forma de nieve (Donoso Zegers, 2006). Puede encontrarse a lo largo de gradientes altitudinales en los que transiciona desde bosques de árboles altos con fustes que pueden alcanzar los 15 m en sitios de menor elevación (1000 msnm) hacia matorrales de altura achaparrados cercanos al límite de la vegetación arbórea a unos 1500 msnm (Veblen *et al.*, 1996). *N. antarctica* o Ñire, también de hoja caduca, crece desde la provincia de Neuquén (36°30'S) hasta el canal de Beagle (56°S) y exhibe la mayor amplitud ecológica del subgénero. En la Patagonia Norte crece en distintos ambientes desde bosques mixtos de baja elevación (200 a 600 msnm) hasta los 1000 a 1100 msnm donde forman matorrales achaparrados y pueden coexistir en simpatría con *N. pumilio* (Veblen *et al.*, 1996). También es posible encontrar Ñires formando bosques mixtos con *Austrocedrus chilensis* (el ciprés de la cordillera) y *N. dombeyi* (el Coihue) en las orillas de lagos y ríos. En fondos de valle y en zonas de mallín o sobre sustratos pedregosos y de baja capacidad de retención de agua forma matorrales de baja altura (Donoso Zegers, 2006). *Nothofagus dombeyi*, el Coihue, es de hoja perenne y tiene la distribución geográfica más restringida (30°30'S -47°S) y ocupa el extremo inferior del gradiente altitudinal en el que se distribuyen las especies del subgénero, entre los 200-700 msnm (Donoso Zegers, 2006). Esta especie, amante de la humedad y menos tolerante al frío que sus especies hermanas, crece en sitios húmedos y/o forma principalmente bosques riparios. En el extremo superior de su rango altitudinal, forma bosques mixtos en los que crece en simpatría con *N. antarctica*. Los sitios de simpatría entre Coihue y Lengua son poco frecuentes en la porción Argentina de la Patagonia Norte y suelen estar caracterizados por alta humedad y baja elevación (Donoso Zegers, 2006).

Pese a ser morfológica y ecológicamente distinguibles (Hill & Read, 1991; Manos, 1997; Donoso Zegers, 2006), las cinco especies del subgénero *Nothofagus*

comparten la anatomía general de sus flores (Figura 2.2), su síndrome de polinización (anemófila) y el tipo de polen llamado fusca F1 (Hill, 1991) o fusca b (Dettmann *et al.*, 1990), siendo este último un carácter diagnóstico del subgénero. La literatura muestra que las especies de *Nothofagus* son de polinización cruzada y que incluso son autoincomaptibles (Rusch, 1993; Riveros *et al.*, 1995; Torres & Puntieri, 2013). Esta afinidad reproductiva se evidencia en la existencia de híbridos entre las especies que comparten rango de distribución. Hay evidencias de hibridación entre las especies de hoja caduca *N. antarctica* y *N. pumilio* (Quiroga *et al.*, 2005), entre *N. antarctica* y la perennifolia *N. dombeyi* (Stecconi *et al.*, 2004) y entre las tres especies siempre verdes *N. dombeyi*, *N. betuloides* y *N. nitida* (Premoli 1996).

El acervo genético del subgénero ha sido intensamente estudiado durante los últimos años. Trabajos previos han analizado múltiples poblaciones y especies a lo largo de sus distribuciones geográficas usando marcadores nucleares y del cloroplasto como así también analizando caracteres morfológicos y ecofisiológicos en relación con la variación ambiental (Acosta & Premoli, 2010; Mathiasen & Premoli, 2010, 2016; Premoli & Mathiasen, 2011; Acosta *et al.*, 2014; Fasanella *et al.*, 2020, 2023; Juri & Premoli, 2021). Cada marcador molecular revela una porción distinta de la historia de *Nothofagus*. Las filogenias basadas en marcadores nucleares (ITS ribosomal) muestran, con buen soporte de ramas, la relación filogenética entre las especies del subgénero (*N. pumilio* (*N. antarctica* (*N. nitida* (*N. dombeyi*, *N. betuloides*)))) (Acosta & Premoli, 2010; Acosta *et al.*, 2014). Estos trabajos muestran similitudes con las filogenias basadas en caracteres morfológicos (Manos, 1997; Heenan & Smissen, 2013) que agrupan a las tres especies siempre verdes (*N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. betuloides*) dentro de un mismo clado pero no coinciden en su topología interna, la relación con las especies de hoja caduca no concuerda ni en la especie basal al subgénero. A diferencia de las relaciones filogenéticas evidenciadas por los análisis morfológicos y moleculares, estudios en base a marcadores del cloroplasto muestran una fuerte estructuración geográfica en la que los distintos haplotipos son compartidos por las especies que ocurren en simpatria (Acosta & Premoli, 2010). De acuerdo con el patrón geográfico que muestra el ADNcp, las poblaciones de *Nothofagus* pueden agruparse en dos grandes clados o linajes, al Norte y Sur de la franja comprendida

entre los 42°S y 43°S. Esta franja, estrecha en comparación con la distribución latitudinal de las especies, es la única zona en la que estos linajes Norte y Sur coexisten en simpatria. A su vez, el clado Norte se compone de varios sub linajes. Durante el Eoceno medio y tardío la distribución geográfica del subgénero *Nothofagus* era más mucho más amplia que la actual y las evidencias paleopalínológicas sugieren la presencia del subgénero a largo del sur de Sudamérica, la Antártida, Australia y Nueva Zelanda (Dettmann *et al.*, 1990). La posición interna de los haplotipos geográficamente distantes en las filogenias basadas en ADN plastidial es evidencia molecular de la distribución pasada del subgénero (Premoli *et al.*, 2012). Estos quiebres filogeográficos fueron datados utilizando filogenias calibradas mediante fósiles coinciden con eventos geológicos descritos previamente por Ramos (1982) que podrían explicar la existencia de estos linajes: las extensas ingresiones marinas del Oligoceno y Mioceno (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). Esta divergencia latitudinal antigua habría sido mantenida por los siguientes eventos de reducción y expansión poblacional más recientes como zonas de refugio glaciarios que fueron detectados mediante marcadores variables nucleares (Mathiasen y Premoli 2010; Acosta et al 2014). También efectos selectivos sobre linajes al norte y al sur de dicha barrera dejaron marcas en otro tipo de marcadores como los SNPs (polimorfismos de nucleótidos únicos) (Fasanella et al. 2023) Dataciones moleculares basadas en secuencias ITS y calibradas con macro y microfósiles ubican el inicio de la radiación dentro del subgénero *Nothofagus* cerca del límite Oligoceno-Mioceno iniciando con la divergencia de *N. pumilio* y continuando hasta fines del Pleistoceno con la divergencia de *N. dombeyi* (Premoli *et al.*, 2012). Esto sugiere que la estructuración del ADNcp refleja la distribución geográfica de poblaciones ancestrales previas a la divergencia de las especies que existen actualmente (Figura 1.1).

Hay varias explicaciones posibles para este fenómeno de distintos linajes del cloroplasto compartidos por distintas especies según la latitud (Acosta & Premoli, 2010): evolución convergente, distribución al azar de linajes o captura de cloroplastos. Es poco realista proponer que múltiples haplotipos surjan de modo independiente en cinco especies distribuidas a lo largo de 2000 km y dado que los polimorfismos hallados se ubican en zonas no codificantes, es difícil también imaginar la acción de la selección

natural actuando de modo directo sobre estas diferencias compartidas. La distribución aleatoria de haplotipos durante la especiación implicaría una población ancestral altamente polimórfica. Este proceso estocástico difícilmente pueda ser responsable de una estructuración geográfica tan marcada y compartida en cinco especies independientes. La explicación más verosímil implica un proceso de captura de cloroplastos en el que el citoplasma de una especie es reemplazado por el de otra mediante eventos sucesivos de hibridación e introgresión. Este proceso puede ocurrir con frecuencia en especies de distribución simpátrica y de alta compatibilidad reproductiva como es el caso de las especies de *Nothofagus*. Las cruza interespecíficas y las retrocruza entre individuos parentales y su progenie pueden verse favorecidas cuando el polen conspecífico es escaso (Premoli, 1996). Bajo este escenario, cuando una población sufre una reducción de tamaño poblacional fuerte, la formación de híbridos interespecíficos puede permitir la expansión de su rango geográfico. Acosta y Premoli (2010) proponen que, dada su gran variedad de hábitat y su asombrosa capacidad de rebrote, poblaciones reducidas de Ñire (*N. antarctica*) podrían haber actuado como centros de recolonización post disturbio. Así, individuos de Ñire podrían haber recibido polen procedente de poblaciones congénicas distantes (por ejemplo *N. pumilio*, la Lengua). Su progenie podría convertirse en la población híbrida que comenzara la expansión del rango. Continuas introgresiones llevarían finalmente a individuos con ADNcp exclusivamente de Ñire pero genoma nuclear de Lengua (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014).

CAPTURA DE CLOROPLASTO EN OTRAS ESPECIES

Como se menciona más arriba en el marco teórico general, aún los quiebres filogeográficos profundos se diluyen rápidamente luego de la desaparición de la barrera que los genera. Es muy llamativo que esta estructura tan antigua se mantenga, especialmente ante las evidencias de flujo génico actual entre poblaciones de *N. antarctica* (Acosta *et al.*, 2012), *N. dombeyi* (Premoli, 1996; Diaz *et al.*, 2022) y *N. pumilio* (Premoli, 2003; Mathiasen & Premoli, 2010). La falta de haplotipos compartidos entre los linajes norte y sur (Figura 1.1) para las tres especies señala que estos dos

linajes han estado históricamente aislados y que ninguno deriva del otro (Acosta et al., 2010) y sugiere un proceso de divergencia alopátrico debido a una barrera física, antigua y generalizada (Acosta et al., 2012). Estos patrones genéticos antiguos que fueron dilucidados utilizando técnicas de datación molecular y calibrados mediante fósiles no han sido borrados por los efectos de las glaciaciones del Pleistoceno. Evidencian una historia compleja de sucesivos eventos de aislamiento y recolonización hasta lograr el rango de distribución actual (Premoli et al., 2012; Acosta et al., 2014). Bajo esta hipótesis, la zona en la que coexisten los haplotipos derivados de estos dos grandes clados ha sido interpretada como una zona de simpatria por contacto secundario entre linajes históricamente aislados (Mathiasen & Premoli, 2010).

En el caso de *Nothofagus*, dada la gran similitud de las estructuras reproductivas de sus especies, la existencia de los linajes Norte y Sur sugiere la presencia de una barrera al flujo génico. Las condiciones ambientales en los extremos Norte y Sur de la distribución de estas especies son y han sido muy diferentes. El aislamiento prolongado en ambientes tan disímiles propicia la formación de barreras postcigóticas que pueden ser muy variadas y a distintos niveles: formación de semillas no viables, mal desarrollo de la plántula híbrida, incapacidad del híbrido de sobrevivir en los ambientes a los que están adaptados sus progenitores, escasa fertilidad en el híbrido adulto. Hasta ahora los esfuerzos se han concentrado en la identificación de híbridos interespecíficos naturales. Estos híbridos son poco frecuentes por lo que se presupone un aislamiento reproductivo fuerte pero incompleto entre especies. Por otro lado se desconoce el grado de flujo génico entre linajes, es decir entre los clados Norte y Sur de ADNcp.

OBJETIVOS E HIPÓTESIS DE TRABAJO

Esta tesis posee como objetivo general comprender cuáles son los factores que estabilizan y mantienen la divergencia entre poblaciones de distribución actual continua. Trabajamos con dos casos contrastantes: divergencia interespecífica (entre poblaciones de distintas especies que han divergido en un contexto de simpatria) y divergencia intraespecífica (entre linajes de cloroplasto que evidencian un evento de vicarianza antiguo y concordante para las tres especies). Específicamente nos preguntamos:

¿Cuál es el papel que juega la adaptación local? ¿Qué mantiene un quiebre filogeográfico tan marcado en presencia de flujo génico? ¿Qué rol cumple el surgimiento de barreras reproductivas intrínsecas durante el aislamiento simpátrico o alopátrico? ¿Ese rol se ve reflejado en los mecanismos que sostiene la divergencia actual entre especies o haplotipos del cloroplasto? ¿La selección natural puede actuar para mantener la estructuración filogeográfica?

Estos objetivos se abordaron con una metodología mixta que combina dos enfoques: ecológico y genómico. El enfoque ecológico busca estudiar barreras reproductivas precigóticas mediante el monitoreo y comparación de las fenologías de brotación foliar y floral en las tres especies y los dos linajes de cloroplasto, en sitios simpátricos a distintas elevaciones y alopátricos a distintas latitudes en torno a la región geográfica ocupada por la barrera reproductiva histórica (ingresiones marinas del Pacífico). El enfoque genómico se basó en la secuenciación y ensamblado de genomas de cloroplasto, en la obtención de marcadores tipo SNP (Polimorfismo de Nucleótido Simple) y la determinación del haplotipo de cloroplasto para cada individuo analizado. Esta información, haplotipo de cloroplasto y especie, permitió la identificación de SNP neutrales y atípicos (asociados a linajes o especies) con los que se estudió la diversidad y la divergencia dentro y entre grupos. Para conectar ambos enfoques se realizaron asociaciones entre genotipos y variables fenológicas. Se estimó un valor medio de inicio de la floración para cada individuo, usando los modelos fenológicos construidos en base a las observaciones a campo. Para diferenciar señales antiguas y modernas, se secuenció el genoma de cloroplasto completo de las tres especies y se estudiaron las relaciones filogenéticas y el flujo génico para marcadores totales (dispersión de polen) y marcadores exclusivos del cloroplasto (dispersión de semillas).

Se desprenden, de estas preguntas, tres objetivos específicos u objetivos de cada capítulo.

Objetivo capítulo 2: Analizar, mediante registros de floración a campo, las barreras fenológicas prepolinización al flujo génico entre poblaciones simpátricas de las tres especies de *Nothofagus* subgénero *Nothofagus* que dominan la parte oriental más seca

de los bosques norpatagónicos: las deciduas *N. antarctica* y *N. pumilio* y la siempreverde *N. dombeyi*.

Hipótesis 2.1: La adaptación climática de especies de *Nothofagus* resulta en la asincronía fenológica en sitios de simpatría ocasionando un desfase temporal que actúa como una barrera pre-polinización eficaz y favorece el mantenimiento de la divergencia en simpatría.

Predicción 2.1.1: Esperamos encontrar fuertes desfases fenológicos entre poblaciones simpátricas de distintas especies y entre poblaciones de una misma especie desarrollándose en sitios de elevación contrastante.

Predicción 2.1.2: Esperamos encontrar desfases sutiles o ausentes entre las fenologías de individuos de una misma especie y situados a elevaciones similares pero pertenecientes a distintos linajes de cloroplasto.

Hipótesis 2.2: Esta barrera alocrónica es dinámica y permeable ya que permite el intercambio interespecífico episódico evidenciado por la existencia de híbridos naturales.

Predicción 2.2.1: Esperamos que el desfase fenológico registrado a campo entre especies simpátricas varíe entre años más fríos o más cálidos.

Objetivos capítulo 3: (1) Describir la distribución geográfica de la variación haplotípica en la zona de contacto secundario entre linajes de ADN del cloroplasto; (2) describir, a partir de la comparación de genomas plastidiales completos, marcadores de ADNcp de secuencias codificantes y no codificantes que pueden ser útiles para investigar las discrepancias entre las señales filogenéticas nucleares y plastidiales con mayor profundidad; (3) explorar las diferentes contribuciones del ADN nuclear y organelar (plastidial y mitocondrial) para reconstruir la historia evolutiva de Fagales, centrándonos en el caso particular del subgénero *Nothofagus* y las definiciones de clado relacionadas con el origen geográfico.

Hipótesis 3.1: Los genomas nucleares están afectados por las barreras al flujo génico polínico mientras que los genomas organelares de herencia materna reflejarán la divergencia histórica por vicarianza.

Predicción 3.1: Las filogenias en base a genomas nucleares agruparán individuos pertenecientes a una misma especie morfológica en clados, independiente del origen geográfico de las muestras.

Predicción 3.2: Las filogenias en base a los genomas de herencia materna producirán clados controlados por la geografía que mezclan individuos de distintas especies morfológicas.

Predicción 3.3: La divergencia intraespecífica para los genomas del cloroplasto será concordante entre distintas especies y tan antigua como la obtenida a nivel de géneros de distintas familias del orden Fagales.

Objetivos capítulo 4: (1) Analizar mediante marcadores moleculares SNP (Polimorfismos de Nucleótido Simple) y secuencias del cloroplasto (ADNcp) los mecanismos que mantienen la divergencia de origen simpátrica y/o alopátrica entre y dentro de tres especies del subgénero *Nothofagus* (*N. pumilio*, *N. antarctica* y *N. dombeyi*). Buscamos conocer la naturaleza de barreras que mantienen a las especies como entidades ecológicas diferenciadas, incluso cuando habitan en simpatría y ante evidencias de potencial flujo génico interespecífico por tener el mismo tipo de polen y haberse descrito híbridos entre ellas. Para tal fin estudiamos los patrones de flujo genético pasado y actual, entre y dentro de las especies, para comparar la estructuración de la variación genética en los escenarios de divergencia en simpatría y alopatría. (2) Comprender los mecanismos que sostienen el quiebre filogeográfico intraespecífico antiguo y geográficamente concordante en tres especies hermanas. (c) Analizar, mediante el anotado funcional de marcadores SNP relevantes, los procesos biológicos y adaptaciones ecológicas asociadas a la divergencia entre especies y linajes del cloroplasto.

Hipótesis 4.1: existen fuerzas selectivas adaptativas que operan para mantener la divergencia entre linajes intraespecíficos y entre distintas especies aun en presencia de flujo génico potencial entre linajes y las distintas especies.

Predicción 4.1: las distintas especies muestran diferencias para SNP atípicos y no asociados producto de fuerzas adaptativas y neutrales, respectivamente.

Predicción 4.2: los perfiles de SNP atípicos asociados a haplotipos de cloroplasto mostrarán fuertes restricciones al flujo genético reflejando la estructuración geográfica de los linajes Norte y Sur.

Predicción 4.3: los perfiles SNP atípicos asociados a variaciones fenológicas en simpatria reflejarán el agrupamiento de los individuos analizados en especies y sus respectivos nichos ecológico-climáticos.

Predicción 4.4: los perfiles de SNP neutrales (no asociados a fenotipos) analizados a nivel de haplotipos dentro de cada especie reflejan elevadas tasas de flujo génico contemporáneo mientras que las secuencias neutrales del cloroplasto reflejan el quiebre por vicarianza geográficamente concordante para las tres especies.

FIGURAS

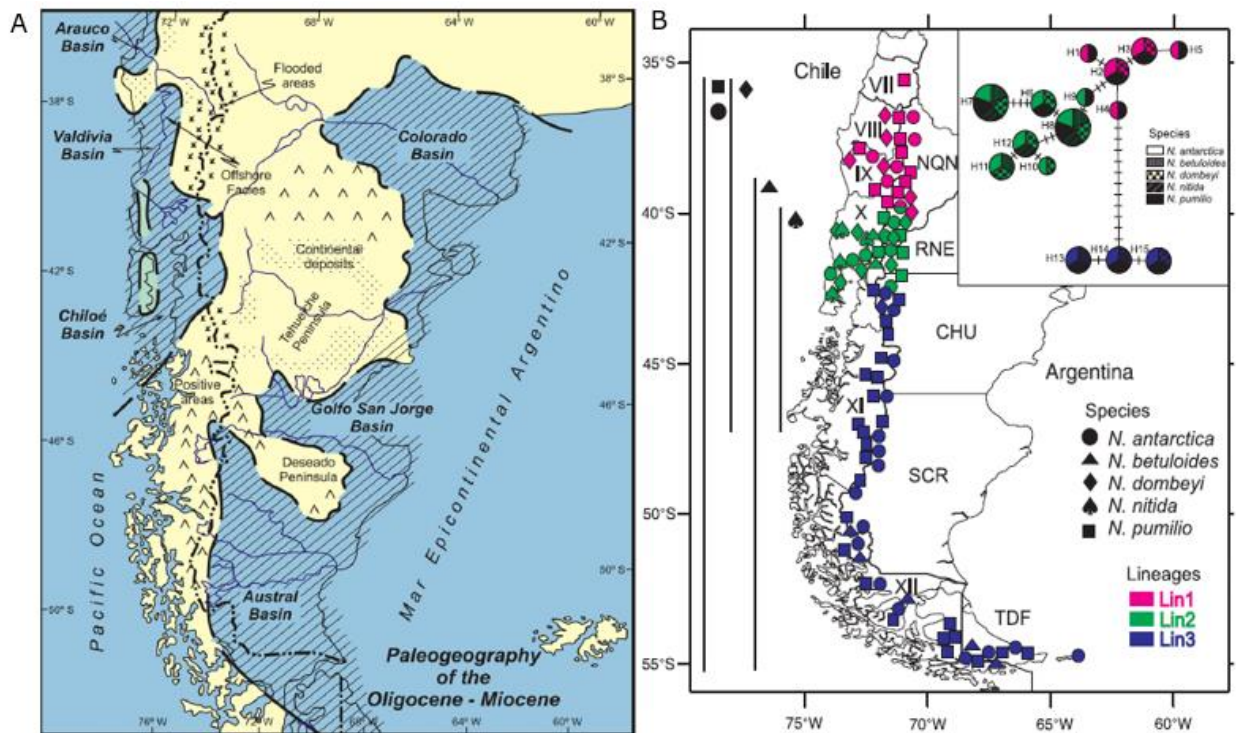


Figura 1. 1: caracterización del sistema de trabajo.

Las figuras fueron tomadas de Premoli et al., 2012. **A:** Paleogeografía del sur Sudamérica durante el Oligoceno-Mioceno. Se muestra la extensión propuesta para la barrera filogeográfica ocasionada por ingresiones marinas (modificado de Ramos, 1982). **B:** Distribución geográfica de los haplotipos de cloroplasto estudiados por las autoras. Las formas indican especies y los colores, linajes de cloroplasto. El color azul se corresponde con nuestro linaje Sur y el color verde se corresponde con nuestro linaje Norte

Capítulo 2: Alocronía de especies ecológicas vecinas: ¿Puede el aislamiento temporal mantener la divergencia interespecífica? El experimento natural de los *Nothofagus* simpátricos.

INTRODUCCIÓN

La divergencia y potencial especiación implica el aislamiento reproductivo de un grupo de individuos dentro de una población inicialmente panmíctica. La aparición de apareamientos preferenciales parece fácil de comprender bajo un escenario de divergencia alopátrica en el que las barreras al flujo génico son geográficas de tal forma que la reproducción tendrá lugar principalmente entre individuos cercanos, pero resulta desafiante cuando se produce en simpatria y sin interrupción al intercambio genético entre los individuos de las poblaciones en vías de divergencia (Coyne & Orr, 2004). Las regiones montañosas de zonas templadas son muy heterogéneas y pequeñas distancias geográficas pueden representar fuertes diferencias ambientales. La composición y textura del suelo, la humedad relativa, el tipo y duración de precipitaciones (nieve o lluvia), la velocidad y temperatura del viento, las temperaturas mínimas y máximas diarias, son algunas de las muchas variables que cambian drásticamente con pequeños cambios de elevación o pendiente y con la latitud. Aunque una mayor especialización de los individuos en diferentes nichos o recursos podría conducir a una divergencia simpátrica (Dieckmann & Doebeli, 1999; Servedio *et al.*, 2011), la polinización entre poblaciones o especies cercanas o incluso distantes puede tener efectos homogeneizadores y por lo tanto limitar la divergencia en taxones polinizados por el viento.

Bajo una fuerte selección natural, la adaptación local a entornos ambientales contrastantes puede reflejarse en barreras postpolinización contra los híbridos entre poblaciones en vías de divergencia. Así, los híbridos pueden tener una aptitud biológica reducida debido a fenotipos intermedios poco adaptados a cualquiera de los entornos parentales (Arista *et al.*, 1997; Cabral Vilas Boas *et al.*, 2013). No obstante, pueden

estar en juego otros mecanismos selectivos, en particular los que se ven afectados por las variaciones ambientales que provocan la divergencia entre poblaciones y especies. Estos pueden incluir la selección heterogénea, en la que la aptitud biológica puede diferir en el tiempo y el espacio; la interacción genotipo-ambiente, en la que la expresión de los genotipos depende del entorno; la pleiotropía antagonista, cuando los componentes de la aptitud están correlacionados negativamente; diferentes niveles de selección (por ejemplo, selección gamética frente a selección cigótica), y la selección dependiente de la frecuencia, en la que la aptitud es una función de la frecuencia de un fenotipo o genotipo en una población (Mojica *et al.*, 2012).

La adaptación local a entornos ambientalmente distintos puede considerarse una fase temprana y crítica de la especiación (Orr & Smith, 1998). Sin embargo, el cambio evolutivo adaptativo es necesario pero no suficiente para que se produzca la divergencia. Esto se debe a que la divergencia entre poblaciones surge de un equilibrio entre el efecto homogeneizador del flujo génico y el efecto de diversificación de la selección (Lenormand, 2002). Un flujo génico mínimo suele ser suficiente para evitar que poblaciones adaptadas a distintos hábitats (ecotipos) cercanos diverjan si la selección ecológica es débil (Baack *et al.*, 2015), y evidencia de varias especies vegetales y animales respaldan esta última afirmación (Rundell & Price, 2009). Del mismo modo, las poblaciones dispuestas a lo largo de gradientes ambientales están sometidas a regímenes de selección continuamente cambiantes que pueden dar lugar a una variación intraespecífica de tipo continua (clinal) si se produce una adaptación local en cada punto del gradiente y el cambio espacial es suficientemente gradual en relación con la distancia de flujo de los genes (Bachmann *et al.*, 2020). Así, para que se produzca la independencia evolutiva de poblaciones simpátricas es necesaria la aparición de barreras reproductivas intrínsecas que puedan sostener y acelerar la acumulación de características diferenciales (Baack *et al.*, 2015).

Muchos rasgos morfológicos y fisiológicos de las especies vegetales se ven afectados por las condiciones ambientales; los modelos muestran que la supervivencia y el éxito reproductivo de las plantas dependen significativamente de la correspondencia entre sus ciclos de vida y las fluctuaciones estacionales locales del clima. El desacoplamiento entre ellos, particularmente bajo climas templados y

boreales, puede resultar en lesiones por heladas tardías durante la primavera, que afectan el desarrollo de hojas y flores, así como heladas tempranas hacia el final del verano que afectan o detienen la maduración de frutos durante el otoño. Muchos estudios han documentado que las variaciones fenológicas clinales en diferentes especies de plantas a menudo se correlacionan con variables climáticas como la temperatura, la precipitación, la latitud o la altitud (Vitasse *et al.*, 2009; Dantec *et al.*, 2014), aunque se han pasado por alto otros factores como el fotoperiodo (Chmura *et al.*, 2019). El acople estacional de la fenología con el clima tiene un impacto significativo en el crecimiento y los rendimientos reproductivos que afectan a las relaciones competitivas y los ajustes adaptativos. Por lo tanto, la fenología se considera un componente importante de la aptitud de las plantas (Primack, 1980) y los cambios fenológicos dentro y entre grupos taxonómicos pueden tener un impacto significativo en la supervivencia de las especies y la función del ecosistema (Chmura *et al.*, 2019).

La variación en la fenología de la floración es una barrera reproductiva previa a la polinización y es muy frecuente en las plantas. En una población con variabilidad fenológica los individuos de floración temprana tenderán a cruzarse entre sí quedando aislados de los individuos de floración tardía. Esto resulta en una alta heredabilidad y variación genética de esos rasgos fenológicos dentro y entre poblaciones de plantas (Premoli & Brewer, 2007; Chuine, 2010). Sin embargo, incluso si la época de floración puede considerarse un rasgo principal que induce el aislamiento reproductivo (Fox, 2003), es necesaria una selección que actúe directamente sobre esos rasgos para favorecer la divergencia (Kirkpatrick, 2000). La alocronía, es decir el desfase entre las fenologías de dos grupos de individuos, puede actuar en diferentes escalas temporales, ya sea a lo largo del día, entre estaciones o entre años, lo que puede dar lugar a apareamientos preferenciales, es decir la reproducción entre individuos que comparten dicho rasgo funcional. Este desfase puede derivar en aislamiento reproductivo y reforzar procesos de adaptación local permitiendo la divergencia entre individuos simpátricos y, por tanto, puede ser el motor inicial de la especiación (Taylor & Friesen, 2017b). Por el contrario, existirán oportunidades para el flujo de genes entre individuos con fenologías sincrónicas. Aunque los taxones ecológicamente divergentes a menudo muestran diferentes fenologías (Levin, 2006), el cambio de cualquier rasgo fenológico

puede inducir cambios en el apareamiento selectivo para otros rasgos (Fox, 2003). Por lo tanto, se necesitan comparaciones cuantitativas de fenologías completas a lo largo de la estación de crecimiento y de distintas estaciones. Sin embargo, hasta la fecha no se ha realizado ningún examen exhaustivo de la fenología de taxones leñosos simpátricos que pueda arrojar luz sobre las adaptaciones climáticas que mantienen la cohesión de las especies e impiden el mestizaje a pesar de la proximidad espacial.

Las especies de subgénero *Nothofagus* comparten el mismo tipo de polen fusca (tipo f1 *N. fusca sensu* Hill & Read 1991 o también considerado fusca b por Dettmann et al 1990) lo que resulta en la formación de híbridos interespecíficos principalmente entre las especies deciduas (Quiroga et al., 2005) y entre la decidua *N. antarctica* y la siempre verde *N. dombeyi* (Stecconi et al., 2004). Estas tres especies poseen morfologías diagnósticas distintivas (Hill & Read, 1991). Generalmente forman rodales puros que coexisten en simpatría/alopatría pero tienen nichos ecolimáticos diferentes generalmente asociados a distintos pisos altitudinales (Veblen et al., 1996) que brindan una excelente oportunidad para poner a prueba los modelos de aislamiento temporal y su relevancia para comprender la divergencia simpátrica. A su vez, las tres especies se han visto afectadas por ingresiones marinas pacíficas que afectaron la región norpatagónica del paralelo 42°S durante el eoceno-mioceno (Bertels-Psotka & Cusminsky, 2014; Bechis et al., 2014) y que han actuado como barreras reproductivas extrínsecas en un proceso de aislamiento alopátrico por vicarianza que hoy se refleja en la estructuración geográfica Norte-Sur de los genomas de cloroplasto (Premoli et al., 2012; Acosta et al., 2014). Si bien los linajes del cloroplasto fueron determinados en base a secuencias de regiones no codificantes del cloroplasto, y por lo tanto neutrales, un análisis geográfico reciente de los mismos en combinación con técnicas genómicas en base a polimorfismos de nucleótidos simples pudo determinar que poseen una asociación significativa con variables bioclimáticas y de base genética adaptativa (Fasanella et al., 2023).

Objetivos

Nuestro objetivo es analizar, mediante registros de floración a campo, las barreras fenológicas prepolinización al flujo génico entre poblaciones simpátricas de las tres especies de *Nothofagus* subgénero *Nothofagus* que dominan la parte oriental más seca de los bosques norpatagónicos: las deciduas *N. antarctica* y *N. pumilio* y la siempre verde *N. dombeyi*.

Hipótesis y predicciones

Pretendemos demostrar que (a) las barreras fenológicas son fuertes pero incompletas y que (b) la especialización ecoclimática se traduce en adaptaciones fenológicas entre poblaciones de cada especie y entre especies simpátricas.

Trabajamos con las siguientes hipótesis y predicciones

H2.1: La adaptación climática de especies de *Nothofagus* simpátricas resulta en un aislamiento temporal debido a la asincronía fenológica que provoca divergencia en simpatría, actuando así como una barrera eficaz previa a la polinización y fomentando la adaptación temporal.

H2.2: Esta barrera alocrónica es dinámica y permeable ya que permite el intercambio interespecífico episódico evidenciado por la existencia de híbridos naturales.

Bajo estas hipótesis proponemos las siguientes predicciones:

Predicción 2.1.1: Esperamos encontrar fuertes desfasajes fenológicos entre poblaciones simpátricas de distintas especies y entre poblaciones de una misma especie desarrollándose en sitios de elevación contrastante.

Predicción 2.1.2: Esperamos encontrar desfasajes sutiles o ausentes entre las fenologías de individuos de una misma especie y situados a elevaciones similares pero pertenecientes a distintos linajes de cloroplasto.

Predicción 2.2.1: Esperamos que el desfase fenológico registrado a campo entre especies simpátricas varíe entre años más fríos o más cálidos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies y diseño de muestreo

El monitoreo de fenología se realizó en cinco sitios ubicados en cercanías de la localidad de El Bolsón (Río Negro) y cuatro sitios ubicados en la localidad de Cholila (Chubut) en los que se solapan los rangos de distribución de las tres especies estudiadas, *N. antarctica*, *N. pumilio* y *N. dombeyi*. Las localidades se eligieron por su ubicación en los extremos Norte y Sur de la zona de contacto secundario entre los linajes de ADN de cloroplasto descritos para el subgénero *Nothofagus* (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). Estos linajes de ADN plastidial están asociados a un evento de divergencia alopátrica favorecido por una barrera geográfica histórica (Premoli *et al.*, 2012) que produjo un quiebre filogeográfico concordante entre las tres especies (Figura 2.1; Tabla 2.1).

Debido a sus particulares adaptaciones ecológicas, *N. pumilio* y *N. dombeyi* raramente coexisten en simpatría en las latitudes seleccionadas. Sin embargo, es posible encontrar poblaciones simpátricas de *N. dombeyi* y *N. antarctica* a elevaciones bajas (400-600 msnm), así como sitios simpátricos de *N. pumilio* y *N. antarctica* a elevaciones medias y altas (900-1300 msnm). Por esta razón registramos poblaciones de *N. antarctica* en elevaciones altas, medias y bajas, ya que esta especie podría servir (o haber servido) como conexión reproductiva entre las otras dos especies (Acosta & Premoli, 2010), permitiendo que ocurriera el flujo genético. Concentramos nuestros esfuerzos en bosques de elevación alta y media, donde *N. pumilio* tiene el límite altitudinal inferior de su distribución y *N. antarctica* su límite altitudinal superior. También estudiamos los bosques de baja elevación donde la distribución de *N. antarctica* se solapa con la de *N. dombeyi*. Omitimos el límite altitudinal superior de *N. pumilio* porque, a esas elevaciones, raramente coexiste con otras especies del subgénero dentro del área de estudio. En total relevamos cinco sitios simpátricos para *N. antarctica*

y *N. pumilio* (elevación media o alta), un sitio simpátrico para *N. antarctica* y *N. dombeyi* y tres sitios exclusivos de *N. dombeyi* en bosques de baja elevación, y un sitio exclusivo de *N. antarctica* (elevación media) (Tabla 2.1).

Realizamos un seguimiento de la fenología de brotación foliar y floral durante tres primaveras consecutivas (2016, 2017 y 2018). Las observaciones comenzaron a mediados del mes de septiembre y finalizaron entre fines de noviembre y principios de diciembre, dependiendo de la finalización de cada estación de brotación de hojas y flores de cada año. Cada sitio se visitó una vez por semana, dependiendo de la disponibilidad de árboles en floración en cada uno de ellos (Tabla 2.1) en cada año. En 2016 visitamos los sitios Cerro y Lago Cholila (CHO), Cerro Puntiagudo (CPU) y Mallín Delgado (MDE); en 2017, los sitios sureños CHO y MDE y las poblaciones norteñas Cerro Perito Moreno (CPM) y Cerro Hielo Azul (CHA); en 2018, las poblaciones CPM, Cerro Piltriquitrón (CPI), Río Azul Norte (RAN) y Sur (RAS). Elegimos cinco árboles fértiles por sitio, distanciados entre 30 y 40 m, y con altura y diámetro similares. En cada árbol marcamos al azar tres ramas fértiles de aproximadamente la misma altura y orientación de la planta. Utilizando un GPS Garmin® etrex20 registramos las coordenadas geográficas y elevación de cada árbol. Colectamos material foliar para la determinación de haplotipos de cloroplasto siguiendo la metodología de secuenciación por el método de Sanger propuesta por Premoli y colaboradoras (Premoli *et al.*, 2012). Para más detalles sobre este procedimiento ver materiales y métodos del capítulo 3 de esta tesis. Los árboles de CPM seleccionados durante 2017 no florecieron al año siguiente por lo que las observaciones fenológicas se llevaron a cabo en árboles diferentes. Lo mismo ocurrió con los ejemplares de *N. dombeyi* de CHO. El experimento de seguimiento tuvo lugar en un total de ocho sitios y se monitorearon en total 40 individuos de *N. antarctica*, 30 de *N. dombeyi* y 35 de *N. pumilio* (Tabla 2.1).

Consideramos como simpátricas a las poblaciones de distintas especies de una dada zona de estudio que comparten la misma elevación. Consideramos como alopátricas a las poblaciones de una misma especie ubicadas a distintas elevaciones en un mismo sitio, y a las poblaciones de una misma especie ubicadas a distintas latitudes en sitios de elevación similar.

Observaciones fenológicas

La variación de la fenología de brotación foliar y floral es indicadora de ajustes potencialmente adaptativos de las especies a las fluctuaciones del clima, y particularmente la fenología floral permite analizar las barreras reproductivas precigóticas entre poblaciones y especies. Registramos ambas categorías en los mismos árboles y ramas lo que nos permite describir, de forma cualitativa, la relación entre ambas fenologías. La brotación, la expansión foliar y la floración son procesos continuos que se dividieron en distintas etapas para poder cuantificarlas (Figura 2.2). La foliación se dividió en cuatro etapas siguiendo a Premoli et al. (2007): yemas en reposo (Leaf1), yemas hinchadas (Leaf2), hojas brotadas (Leaf3) y hojas completamente expandidas (Leaf4). El desarrollo de las flores estaminadas se dividió en cuatro etapas definidas para *N. nervosa* y *N. obliqua* (subgénero *Lophozonia*) por Torres & Puntieri (2013): primordios florales visibles (Flol), flores con perigonio abierto (Floll), elongación de filamentos (Flolll) y liberación de polen (FlolV). Para estudiar la emergencia de flores pistiladas (PA) categorizamos cada rama de cada árbol como florecida o no florecida dependiendo de la presencia de flores visibles. Durante cada visita, contamos el número total de yemas, hojas o flores de cada rama marcada y las clasificamos en el estado fenológico correspondiente dado por la presencia de al menos un brote foliar o floral en alguna de las categorías anteriormente descritas.

Para describir los ritmos fenológicos de las tres especies analizamos la variación de la proporción de yemas, flores u hojas en cada fase fenológica a lo largo del tiempo. Transformamos los conteos hechos a campo sobre cada rama en proporciones de flores en cada fase fenológica y promediamos, para cada fecha de observación, entre individuos de la misma especie y sitio. Para manipular y visualizar nuestros datos utilizamos los paquetes de R *tidyr*, *dplyr*, *ggplot2* y *ggpubr* (Wickham et al., 2019; Kassambara, 2020; R Core Team, 2022).

Inicio de la floración y análisis de requerimientos térmicos

Las etapas FloIV y PA son las más relevantes para el estudio de barreras reproductivas y fueron analizadas de forma independiente a las demás etapas. Para esto definimos la fecha de inicio de fase (DP) para cada árbol como la primera fecha en la que se registró una flor en fase FloIV o PA en alguna de sus ramas. Calculamos los requerimientos térmicos necesarios para el inicio de una etapa fenológica particular (inicio de fase) como acumulación diaria de calor sin la inclusión de temperaturas negativas. Los métodos utilizados para evaluar los requisitos térmicos suelen probar la acumulación de temperatura a partir de temperaturas base, por ejemplo 5°C o 10°C (Dantec *et al.*, 2014). Nuestros lugares de estudio se encuentran bajo un clima templado con influencia oceánica, por lo que se pueden registrar temperaturas superiores a 5°C incluso durante todo el invierno, periodo durante el cual las especies de *Nothofagus* no muestran ningún desarrollo foliar o floral. Por lo tanto, para cada individuo, calculamos el número de días (DP) desde el primero de septiembre hasta el inicio de las fases FloIV (liberación de polen) y PA (apertura de flores pistiladas), y la temperatura acumulada hasta dicho momento (DD).

Los datos climáticos usados para la construcción de los requerimientos térmicos (DD) se obtuvieron de las estaciones del Sistema Meteorológico Nacional (Servicio Meteorológico Nacional <https://www.smn.gob.ar/>). Analizamos la influencia de la temperatura a lo largo de los tres años de monitoreo en base a las temperaturas diarias registradas en los aeropuertos de Bariloche y Esquel, uniformemente distantes de nuestros sitios de estudio norte y sur, respectivamente (Tabla 2.1, Figura 2.1). Las temperaturas diarias se corrigieron por elevación añadiendo o restando 0,65°C cada 100 m de diferencia altitudinal entre la elevación de un sitio y la estación climatológica correspondiente.

Anomalías térmicas

Las anomalías térmicas hacen referencia a la diferencia entre el valor medio observado o previsto por un modelo para un día concreto respecto a la climatología de un periodo de referencia dado. Caracterizamos cada año en base a anomalías de temperatura durante las estaciones de crecimiento monitoreadas (septiembre a diciembre de 2016,

2017 y 2018). Estas anomalías se evaluaron calculando la desviación estándar de las temperaturas medias anuales en comparación con la media regional de la década basada en una serie de temperatura de 10 años 2009-2019 compuesta por datos de temperatura diaria (Tabla 2.2). Se utilizó una serie temporal de 10 años para realizar una caracterización ecoclimática de los años de monitoreo fenológico. Los datos climáticos se obtuvieron de las estaciones del Sistema Meteorológico Nacional (Servicio Meteorológico Nacional <https://www.smn.gob.ar/>) ubicadas en los Aeropuertos de Bariloche y Esquel y por lo tanto representativos de las condiciones que habitan los linajes de cloroplasto norte y sur, respectivamente en la zona de estudio.

Análisis estadístico

Estimamos y contrastamos las medias de acumulación de calor (DD) y días necesarios para alcanzar una fase determinada (DP) con dos modelos lineales independientes que construimos usando el paquete *glmmTMB* (Brooks *et al.*, 2017). Construimos un modelo lineal general (distribución normal) para el análisis de DP y un modelo lineal generalizado (distribución gamma y logaritmo como función de enlace) para el análisis de DD. Los efectos fijos incluyeron especie (*N. pumilio*, *N. antarctica* y *N. dombeyi*), año como variable cualitativa (2016, 2017 y 2018), fase fenológica (FloIV y PA), linaje (Norte y Sur) y la elevación como variable cuantitativa continua. En ambos modelos pusimos a prueba las interacciones entre especie-año, especie-elevación, especie-linaje y especie-fase. Los supuestos estadísticos de ambos modelos se verificaron utilizando el enfoque de simulación propuesto por el paquete *DHARMA* (Hartig, 2020) y mediante el análisis gráfico de residuales en el caso del modelo lineal general. Los contrastes *a posteriori* se realizaron utilizando el método de comparación por pares de Tukey proporcionado por el paquete *emmeans* R (Lenth, 2020). Estimamos diferencias entre especies para cada año y en tres clases de elevación (500, 800 y 1100 msnm) promediando entre linajes y fases, entre años para cada especie y clase de elevación, y entre elevaciones para cada especie y año. Contrastamos también las medias de cada especie entre linajes y fases, promediando entre años y elevaciones. Para el modelo gamma (DD), las diferencias de medias se convirtieron en cocientes de medias con su

intervalo de confianza del 95% cuando se transformaron de la escala del predictor lineal (escala logarítmica). Estos valores pueden transformarse en diferencias temporales si los multiplicamos por el valor medio estimado para el ítem en el denominador de una proporción dada.

RESULTADOS

Descripción de los ritmos fenológicos

La elongación de los brotes anuales, el desarrollo de las flores y hojas comienzan con la hinchazón de las yemas en los brotes parentales (Figura 2.2, B y C). Durante la expansión, las yemas florales y vegetativas se transforman en estructuras maduras siguiendo una dirección de la base al ápice: flores estaminadas hacia la base y flores pistiladas hacia el ápice. La progresión va seguida, en algunos casos, de unas pocas hojas estériles (no portadoras de flores) que producirán yemas para la futura temporada de crecimiento. Las yemas florales se distinguen claramente de las yemas vegetativas por el engrosamiento causado por los órganos florales que empiezan a madurar antes de que se abran las catáfilas, entendiéndose como tales a las hojas modificadas que cubren las yemas antes de su apertura. Las flores estaminadas axilares y las hojas comienzan a emerger de las yemas al mismo tiempo. A lo largo del proceso de expansión de las hojas, las flores crecen y se alargan hasta su completa madurez (Figura 2.2). Cuando las hojas han alcanzado su forma totalmente expandida, todo el polen ha sido liberado. Esta sincronía entre el desarrollo foliar y floral es consistente en las tres especies y a lo largo de todas las estaciones de crecimiento que monitoreamos.

Las figuras 2.3 a 2.5 muestran los registros del seguimiento de la fenología floral y foliar para cada sitio, clase de elevación y año. Estas figuras nos permitieron identificar patrones interesantes para definir los análisis estadísticos y las comparaciones relevantes. A nivel individual y en cada brote anual, el desarrollo de las flores estaminadas precede al de las pistiladas. A nivel poblacional, es decir en un sitio y una clase de elevación la maduración de ambos tipos de flores parece no seguir la

secuencia esperada del desarrollo morfológico de estas estructuras fértiles (paneles FloIV y PA).

La comparación de poblaciones alopátricas muestra que los ritmos fenológicos de cada especie varían con la elevación pero no parecen ser muy sensibles a variaciones en el linaje de ADN plastidial (Norte o Sur). Las poblaciones de sitios con elevaciones similares exhibieron poca o ninguna variación en la progresión temporal de las distintas etapas fenológicas estudiadas. En todos los casos, las poblaciones de sitios de menor elevación comenzaron a desarrollar hojas y flores más temprano que las poblaciones de sitios más elevados.

La comparación de los ritmos fenológicos entre especies en sitios simpátricos muestra patrones consistentes a lo largo de los años. En sitios de elevación alta (EA) y media-alta (EMA) la floración de *N. pumilio* precede a la de *N. antarctica* mientras que en sitios de baja elevación (EB) la floración de *N. antarctica* precede a la de *N. dombeyi*. Este desfase temporal entre las floraciones de especies simpátricas varía con cada año y tiende a acortarse en años fríos y alargarse en años cálidos. También es posible observar una superposición fenológica entre poblaciones alopátricas de distintas especies que se evidencia en las fases fenológicas florales terminales FloIV y PA. Estas dos etapas fueron sincrónicas entre poblaciones de *N. antarctica* de alta elevación (EA) y poblaciones de *N. dombeyi* de baja elevación (EB), y entre poblaciones de *N. antarctica* de baja elevación (EB) y *N. pumilio* de alta elevación (EA).

Inicio de la floración, requerimientos térmicos y anomalías térmicas

La evaluación de las anomalías climáticas de cada estación de crecimiento monitoreada comparada con la serie climática regional media para 2009-2019 arrojó desviaciones estándar de 1,33 y 0,23 por encima de la media para 2016 y 2017 y de -0,31 por debajo de la media para 2018 (Tabla 2.2). Esto muestra que 2016 y 2017 fueron estaciones anómalamente más cálidas, mientras que 2018 fue más fría que la media. Como

resultado, todas las especies experimentaron cierta variación fenológica entre estaciones.

El diseño de nuestro monitoreo no nos permitió poner a prueba todas las interacciones posibles pero pudimos evaluar la interacción entre la variable especies y todas las otras variables usadas (año, linaje, fase y elevación) y entre las variables año y elevación (Tabla 2.3) en los dos modelos (DP y DD). Las interacciones entre las variables mencionadas fueron significativas con valores $p < 0.05$ con excepción de la interacción entre las variables especie y fase que no fue significativa. Las interacciones significativas ($p < 0.001$) entre especie-elevación y especie-año sugieren que la elevación modifica el inicio de la floración y los requerimientos térmicos para ello de forma diferencial para cada especie y que las variaciones climáticas interanuales también repercuten en la fenología de estas plantas de manera especie-específica. Las interacciones entre especie-fase resultaron no significativas para ambos modelos (DP: $p = 0.579$; DD: $p = 0.068$) indicando que desfase entre el inicio de las fases FloIV y PA no varía significativamente entre especies. La interacción entre especie y linaje fue significativa para ambos modelos (DP: $p=0.039$; DD: $p<0.001$) indicando que el tiempo necesario (DP) y requerimientos térmicos (DD) para la liberación de polen (FloIV) y para la apertura de las flores pistiladas (PA) de cada linaje varían de forma diferente para cada especie.

Las comparaciones entre linajes (Tabla 2.4, Figura 2.6 A) muestran que el inicio de fase (DP) es más tardío para los haplotipos Norte. Estos contrastes solo fueron significativos para *N. dombeyi* que experimentó una diferencia de entre 1 y 12 días en el inicio de fase ($p=0.018$). Los requerimientos térmicos medios para el inicio de las etapas FloIV y PA (DD) en las tres especies fueron menores para linaje de cloroplasto Norte que para el linaje Sur (Tabla 2.4, Figura 2.7 A). La mayor diferencia entre linajes corresponde a *N. pumilio* (entre 33% y 51% menores para linaje Norte; $p<0.001$), seguida por *N. antarctica* y *N. dombeyi* que mostraron valores 10% a 28% ($p<0.001$) y 6% a 23% ($p=0.02$) menores para el linaje Norte respectivamente. En cuanto a la comparación de los inicios de las fases de liberación de polen (FloIV) y apertura de flores pistiladas (PA), esta última parece ocurrir antes en las tres especies, pero esta tendencia solo fue significativa para *N. pumilio* ($p=0.011$) con una diferencia de entre 1 y

5 días. La diferencia fue de entre 0 y 4 días para *N. antarctica* ($p=0.083$) (Tabla 2.4, Figura 2.6 B). Los requerimientos térmicos para el inicio de FloIV también fueron mayores que para el inicio de PA. Los requerimientos térmicos para el inicio de la liberación de polen (FloIV) fueron hasta 25% mayores que para el inicio de PA en el caso de *N. pumilio* ($p=0.005$) pero esta tendencia no se pudo verificar para *N. antarctica* y *N. dombeyi* (Tabla 2.4, Figura 2.7 B).

El número medio de días (DP) hasta el inicio de una fase (Tabla 2.5; Figura 2.8) y sus requerimientos térmicos (DD), promediados entre fases (FloIV y PA) y linajes (Norte y Sur), mostraron diferencias entre especies, elevaciones y años (Tabla 2.6; Figura 2.9). En todos los casos y en todos los años encontramos que a mayores elevaciones, poblaciones alopátricas de una misma especie requieren más días para iniciar la liberación de polen y apertura de flores pistiladas. No obtuvimos diferencias significativas entre las elevaciones testeadas para *N. pumilio* probablemente porque esta especie se monitoreó en un rango de elevaciones mucho menor que las otras dos. Algunas poblaciones alopátricas de especies distintas mostraron una fuerte sincronía en el inicio de fase. Durante el año 2017, térmicamente similar a la media regional, *N. pumilio* en bosques elevados y *N. antarctica* en su límite altitudinal inferior, que están distantes unos 600 m en elevación y mostraron fenologías muy sincrónicas (Figura 2.4. Panel Cerro Cholila). De forma similar, y para todos los años, *N. antarctica* de sitios elevados y *N. dombeyi* de sitios bajos compartieron ritmos fenológicos sincrónicos a pesar de la diferencia de altitud mencionada anteriormente (Figuras 2.3-5).

Los requerimientos térmicos de las tres especies disminuyeron con el aumento de la elevación: poblaciones de sitios bajos mostraron requerimientos térmicos mayores que sus contrapartes en sitios elevados. La variación interanual de estos requerimientos térmicos (DD), fue en todos los casos, menor que la variación temporal (DP). *N. pumilio*, la especie menos variable para DD, se mostró más exigente durante los años más fríos (2017 y 2018) y en particular a elevaciones media y alta, con un ligero aumento en sus requerimientos térmicos. En sitios de baja elevación no detectamos diferencias significativas entre años. *N. dombeyi* y *N. antarctica*, por el contrario, disminuyeron sus requerimientos térmicos durante años más fríos como el 2017 y el 2018 en todas las elevaciones (Figuras 2.8 y 2.9).

Contrastamos los valores de DP y DD entre especies para tres elevaciones distintas (500, 800 y 1100 msnm) elegidas en base a las elevaciones medias de los sitios monitoreados (Tablas 2.5 y 2.6, Figuras 2.8 y 2.9). Durante el año relativamente cálido 2016, los individuos de *N. pumilio* situados a gran altitud iniciaron en promedio la floración de 20 a 29 días antes que *N. antarctica* ($p < 0.001$). Esta diferencia se amplió durante el año con temperaturas regionales promedio como el 2017 en el que *N. pumilio* floreció con una media de 27 a 33 días antes que los de *N. antarctica* ($p < 0.001$). Por el contrario, el desfasaje entre *N. pumilio* y *N. antarctica* se acortó durante el año frío 2018, tomando valores entre 5 y 15 días ($p < 0.001$). En sitios de elevación media (800 msnm) las diferencias entre estas dos últimas especies disminuyeron. Por ejemplo para los años 2016 y 2017 se estimaron diferencias de 5 a 23 días ($p < 0.001$) y 11 a 28 días ($p < 0.001$) respectivamente. Esta asincronía entre poblaciones simpátricas de *N. pumilio* y *N. antarctica* disminuye dramáticamente en años fríos como el 2018 para el que no detectamos diferencias significativas (Tabla 2.5, $p = 0.999$). Asimismo, el modelo construido para DP permite ver como se comportarían poblaciones simpátricas de *N. antarctica* y *N. pumilio* en sitios de baja elevación en los que rara vez se encuentran ejemplares de esta última, al menos en nuestra región de estudio. Nuestro modelo propone que *N. pumilio* y *N. antarctica* podrían sincronizar sus fenologías en sitios simpátricos de baja elevación (500 msnm) (Figura 2.8). En sitios simpátricos de alta elevación *N. antarctica* tuvo requerimientos térmicos más altos que *N. pumilio* con una diferencia máxima de entre 100% y 250% durante el año cálido 2016 ($p < 0.001$) y mínima de hasta un 50% durante el año más frío, el 2018 ($p = 0.012$). Nuestro modelo no nos permitió detectar variaciones en los requerimientos térmicos de estas dos especies en sitios de baja elevación (Figura 2.9; Tabla 2.6).

En bosques de baja elevación es posible encontrar poblaciones simpátricas de *N. antarctica* y *N. dombeyi*. Para todos los años analizados *N. antarctica* comenzó a florecer antes que *N. dombeyi* con una diferencia media de 29 y 26 días en 2017 y 2018, respectivamente (Tabla 2.5; $p < 0.001$). Esta relación de valores, con medias ligeramente menores para 2018, se mantuvo para los sitios de elevación media (800msnm) y alta (1100 msnm). Las diferencias estimadas para este par simpátrico no fueron significativas para el año cálido 2016 en las tres elevaciones testeadas. El

modelo estimado nos permite especular sobre el comportamiento de *N. pumilio* en estos sitios de baja elevación: durante los años más fríos (2017 y 2018) *N. pumilio* se comportaría de forma similar a *N. antarctica*, adelantándose en promedio entre 16 y 57 al inicio de la floración de *N. dombeyi*. En años cálidos como el 2016 su floración podría acercarse más a la de *N. dombeyi* e incluso sincronizarse con esta en sitios de baja elevación (Figura 2.8). Los requerimientos térmicos de *N. dombeyi* y *N. antarctica* son muy similares o ligeramente mayores para esta última en sitios simpátricos de baja elevación. Durante el año 2017, térmicamente neutro, los requerimientos de *N. dombeyi* superaron a los de *N. antarctica* en un 70% (Tabla 2.6; $p < 0.001$).

La diferencias de medias entre pares de especies en los distintos años y en los tres puntos de elevación analizados (500, 800 y 1100 msnm) exhibieron variaciones interanuales (Figura 2.10). Los ritmos fenológicos de *N. dombeyi* y *N. antarctica* tienden a sincronizarse en años cálidos, independientemente de la elevación del sitio simpátrico. En años promedio como el 2017 o fríos como el 2018 las fenologías de estas dos especies se desfasan. Durante años fríos como el 2018 las fenologías de *N. antarctica* y *N. pumilio* se asemejan y en sitios de elevación media podrían incluso superponerse. En sitios de baja elevación, análogos a escenarios futuros de aumento de las temperaturas medias, las fenologías de estas especies se superponen e incluso podrían invertir su secuencia temporal durante años más fríos. Por otro lado, durante años relativamente anómalos como 2016 (cálido) o 2018 (fríos), los requerimientos térmicos de *N. antarctica* son iguales o mayores que los de *N. dombeyi* (Figura 2.11). Durante años térmicamente neutros como el 2017 la relación entre *N. dombeyi* y *N. antarctica* varía fuertemente con las elevaciones: *N. dombeyi* es la especie con mayores requerimientos térmicos en sitios bajos, en sitios de elevación media no parece haber diferencias entre ellas y el cociente se invierte en sitios de alta elevación en los que los requerimientos de *N. antarctica* superarían a los de *N. dombeyi*. El cociente de medias para DD entre *N. pumilio* y *N. antarctica* también varía entre años. Tanto a media como alta elevación, la diferencia entre los requerimientos térmicos de estas dos especies disminuye durante años más fríos, llegando incluso a desdibujarse en sitios de media elevación.

DISCUSIÓN

Nuestros resultados dan cuenta de que las especies simpátricas de *Nothofagus* mantienen sus respectivas características especie-específicas por divergencia alocrónica que genera el desfasaje de sus ciclos reproductivos a causa de poseer distintos ritmos fenológicos. Estos ritmos están asociados a sus nichos térmicos y también reflejan sus afinidades filogenéticas. La adaptación local a ambientes contrastantes se ha traducido en barreras de aislamiento temporales intrínsecas y permeables, más que físicas. Acontecimientos climáticos poco frecuentes, como la estación más fría de 2018, parecen reducir el desfasaje entre el par simpátrico *N. pumilio*/*N. antarctica*. Por el contrario, estaciones anómalamente cálidas como el año 2016 distancian las fenologías del par antes mencionado pero disminuyen el desfasaje entre el par simpátrico *N. antarctica*/*N. dombeyi*. Esto puede permitir el flujo de genes entre árboles de floración tardía de una especie y árboles de floración temprana de la otra. Además, la polinización anemófila descrita para el subgénero *Nothofagus* podría permitir la polinización a larga distancia entre poblaciones alopátricas con fenologías florales sincrónicas de diferentes elevaciones y sitios favoreciendo potencialmente las cruces interespecíficas.

La liberación de polen y la antesis femenina se produjeron de forma sincronizada durante los tres años. En el caso de *N. pumilio* se registró cierto grado de dicogamia, con la antesis femenina ocurriendo antes que la liberación de polen. Las especies de *Nothofagus* poseen, en su mayoría, polinización cruzada y son autoincompatibles (Rusch, 1993; Riveros *et al.*, 1995; Torres & Puntieri, 2013). Según Torres & Puntieri (2013), la máxima receptividad estigmática se alcanza entre cuatro y cinco días después de la antesis, en cuyo caso el pequeño desfasaje entre estos dos estadios podría asegurar la existencia de flores femeninas receptivas cuando se libere polen conspecífico y, por tanto, la polinización. Variaciones intrapoblaciones en el inicio de la fase fenológica y su duración favorecen el mantenimiento de altas tasas de entrecruzamiento y de diversidad genética (Premoli, 1996) y la polinización cruzada intraespecífica asegurando la producción de semillas.

Los nichos ambientales de cada especie de *Nothofagus* están altamente conservados a lo largo de la extensión de los bosques templados de la Patagonia. Las fenologías foliares y florales están sincronizadas regionalmente dentro de cada especie de *Nothofagus* y son características de cada especie pura, incluso en poblaciones distintas separadas por hasta 100 km. Sin embargo, especies ecológicamente distintas presentaron diferencias fenológicas significativas, dando lugar a la siguiente secuencia temporal: *N. pumilio* < *N. antarctica* < *N. dombeyi*. Los estudios fenológicos detallados a nivel de comunidad son escasos. El análisis de 11 especies simpátricas pioneras de *Macaranga* (Euphorbiaceae) en Borneo mostró fenologías florales uniformes. Esta reproducción sincronizada a nivel de comunidad sugiere que las especies simpátricas están sometidas a presiones abióticas similares y, por tanto, responden a señales de floración comunes (Davies & Ashton, 1999). Nuestro estudio se centró en el análisis de sitios simpátricos a lo largo de gradientes de temperatura pronunciados donde cada especie se encuentra en elevaciones distintas y donde forman rodales casi puros distantes unos cientos de metros unos de otros que en muchos casos entran en contacto formando límites abruptos altitudinales. *N. pumilio*, que tolera el frío, ocupa ambientes montañosos, principalmente como bosques puros en las altas elevaciones de los Andes orientales. Se considera tolerante al frío y por lo tanto se necesita una menor acumulación de calor para florecer. Como especie caducifolia, el desarrollo temprano del follaje y de las flores garantiza un desarrollo completo durante los cortos veranos de las zonas templadas, particularmente a gran altitud. *N. antarctica*, más polimórfica (Steinke *et al.*, 2008), se encuentra en distintos ambientes. Se encuentra en fondo de valles, en hábitats inundables, en bosques óptimos de baja altitud y también en bosques achaparrados de gran altitud (Veblen *et al.*, 1996). En los lugares simpátricos más fríos y de mayor altitud, *N. antarctica* haya su límite altitudinal superior y muestra un fuerte retraso fenológico en comparación con *N. pumilio* que se encuentra, en estos sitios altos, en su límite altitudinal inferior y por lo tanto relativamente más cálido. Las especies mesotérmicas, mejor adaptadas a sitios con mayores temperaturas, como *N. dombeyi* necesitan una mayor acumulación de calor en primavera para iniciar el desarrollo de hojas y flores. Esto es útil para evitar posibles heladas primaverales tardías que son muy frecuentes en la zona de estudio (Hadad *et*

al., 2019). Esta especie de hoja perenne ocupa bosques de baja elevación en los que raramente ocurre en simpatría con la especie de altura *N. pumilio*. Por lo tanto, nuestros datos muestran que las especies que se distribuyen a lo largo de gradientes ambientales están sometidas a fuerzas selectivas divergentes que actúan sobre los ritmos fenológicos y dificultan el potencial entrecruzamiento.

El monitoreo de fenología a campo permite registrar los patrones de crecimiento y desarrollo foliar y floral en sitios y de linajes y especies particulares (Mazer *et al.*, 2013). Aunque se considera un método tradicional sigue siendo muy útil ya que proporciona pruebas directas de los cambios fenológicos y permite estudiar la variación individual además de los patrones poblacionales (Piao *et al.*, 2019). Si bien las técnicas de teledetección y el uso de los eventos fenológicos en la calibración temporal de los índices de vegetación relacionados con el índice de verde han contribuido a ampliar la escala de las observaciones fenológicas, dichos avances metodológicos no sustituyen a las observaciones a campo como las utilizadas aquí, especialmente cuando entra en juego la fenología reproductiva (Mazer *et al.*, 2013). En bosques perennifolios con pocos cambios estacionales en el índice de verde, la aplicación de técnicas de teledetección para describir la fenología de las plantas puede ser limitada (Piao *et al.*, 2019). Los registros a campo son especialmente útiles para estudiar especies con flores efímeras y poco llamativas como las de *Nothofagus*. No obstante, el acoplamiento de la fenología foliar y floral que observamos en todas las especies estudiadas muestra que los cambios en el índice de verde de las especies caducifolias pueden utilizarse como proxy de la fenología reproductiva a escala de paisaje mediante teledetección. Las limitaciones de nuestro monitoreo están relacionadas con el hecho de que las observaciones de campo se realizaron durante la primavera, cuando la acumulación de nieve dificulta el monitoreo de poblaciones de altura y la sincronización de las visitas a lugares alejados entre sí y, por tanto, el alcance (por ejemplo, el número de lugares monitoreados) de nuestro análisis.

Las fenologías foliares y florales dentro de cada especie de *Nothofagus* son variables a lo largo de los gradientes de elevación: las poblaciones de menor elevación comienzan antes que las de mayor elevación. Esto se documentó anteriormente para *N. pumilio* a campo (Rusch, 1993), en condiciones de jardín común (Premoli & Brewer,

2007) y utilizando un diseño de trasplante recíproco (Mathiasen & Premoli, 2016). Aunque no se realizaron estudios controlados ambientalmente en *N. antarctica* y *N. dombeyi*, las pruebas presentadas aquí sugieren que las diferencias fenológicas dentro de una misma especie y entre especies con la elevación son probablemente genéticas y de valor adaptativo. Las poblaciones de *N. pumilio* analizadas a lo largo de diferentes gradientes de elevación en distintas latitudes mostraron diferencias genéticas clinales y restricciones significativas al flujo genético entre elevaciones (Premoli, 2003). Por otro lado, las diferencias entre poblaciones de *N. antarctica* que habitan sitios ambientalmente contrastantes arrojaron diferencias de moderadas a altas para marcadores moleculares ($F_{ST} = 18\%$) y caracteres cuantitativos ($Q_{ST} = 15-28\%$) (Steinke *et al.*, 2008). Nuestros resultados sobre *N. antarctica* apoyan estos hallazgos: es muy poco probable que las poblaciones en los extremos del gradiente de elevación puedan cruzarse lo cual mantiene la divergencia intraespecífica. Es posible, sin embargo, que los bosques de altitud media puedan servir como "puentes reproductivos" que conecten los extremos del gradiente altitudinal y mantengan la cohesión de las poblaciones de una misma especie. Esperaríamos encontrar clinas más suaves para el inicio de los estadios FlIV y PA donde existan estas poblaciones de altitud media. Los gradientes de altitud también definen la sincronía interespecífica. *N. antarctica* de baja altitud fue sincrónica con *N. pumilio* de alta altitud, aunque se encuentra 600 m ladera abajo de esta última. Asimismo, los *N. antarctica* de floración tardía en altitud fueron sincrónicos con los *N. dombeyi* de altitud baja situados al menos 600 m ladera abajo. Como resultado, las poblaciones simpátricas de diferentes especies tienen fenologías distintas, pero las que están separadas espacialmente pueden ser sincrónicas. Esto está relacionado con sus nichos térmicos específicos. En particular la ambientalmente polimórfica *N. antarctica*, que puede ser simpátrica con cualquiera de las otras dos especies, mostró fenología intermedia respecto de ellas. Así pues, unos requisitos térmicos propios de cada especie y significativamente diferentes impiden el flujo genético al desacoplar los ritmos fenológicos de poblaciones simpátricas. Esta asincronía probablemente se acentúa durante años cálidos en los cuales las especies caducifolias microtérmicas (afines a bajas temperaturas) como *N. pumilio* y *N. antarctica* pueden aprovechar las temperaturas primaverales relativamente más elevadas para

adelantar la floración respecto de su par simpátrico (*N. antarctica* y *N. dombeyi* respectivamente). Por el contrario, las temporadas más frías (2018) pueden favorecer la superposición de las fenologías de *N. pumilio* y *N. antarctica*. En estos casos, la sincronía entre ambas floraciones podría potencialmente propiciar la hibridación interespecífica en sitios de simpatria. Por lo tanto, la hibridación puede ocurrir entre especies simpátricas de *Nothofagus* bajo condiciones geográficas y climáticas particulares.

Hasta la fecha, se han documentado en la naturaleza híbridos naturales entre *N. antarctica* y *N. pumilio* (Quiroga *et al.*, 2005) y entre *N. antarctica* y *N. dombeyi* (Stecconi *et al.*, 2004). Aún no se han descrito híbridos entre *N. pumilio* y *N. dombeyi*, probablemente porque habitan en extremos de elevación opuestos y tienen nichos térmicos muy distintos que impiden su solapamiento fenológico y su intercambio genético. Sin embargo, este intercambio puede producirse de forma indirecta, ya que *N. antarctica*, ecológicamente diversa, actúa como especie puente entre *N. dombeyi* y *N. pumilio*. La potencial hibridación entre *Nothofagus* siempre verdes como *N. betuloides* y la decidua *N. pumilio* fue propuesta en base a registros de polen fósil y modelado de nicho ecológico durante el Último Máximo Glaciar en la Patagonia austral (McCulloch *et al.*, 2022). Si bien los desacoples fenológicos impiden la hibridación, condiciones climáticas particulares como las bajas temperaturas darían lugar al flujo génico interespecífico. La potencial hibridación entre especies del subgénero *Nothofagus*, permite explicar los haplotipos del cloroplasto compartidos entre distintas especies que habitan una dada región.

Las relaciones filogenéticas muestran que *N. antarctica* es hermana de un clado que contiene las especies perennifolias que incluye a *N. dombeyi*, mientras que *N. pumilio* es la especie más basal y, por tanto, la más diferenciada del subgénero *Nothofagus* (Acosta & Premoli, 2010). Premoli y colaboradoras (Premoli *et al.*, 2012) elaboraron redes de haplotipos de cloroplasto que les permitieron identificar los dos grandes linajes plastidiales representados por nuestro muestreo. Estos linajes de cloroplasto son producto de un evento de vicarianza alopatrica probablemente causado por intrusiones marinas extensas y duraderas que dominaron la zona del paralelo 42° durante el Eoceno-Mioceno. No detectamos desfase fenológico entre linajes de una

misma especie, como es esperable ante un evento de divergencia causado por restricciones externas al flujo génico. Estudios basados en diseños geográficamente explícitos con muestreos a lo largo de toda la distribución latitudinal del subgénero *Nothofagus* muestran captura de cloroplastos generalizada que se explica mediante ciclos locales de hibridación e introgresión entre especies bien diferenciadas (Acosta & Premoli, 2010). Estos patrones fueron reforzados por el análisis de 330 individuos de 200 poblaciones de las cinco especies existentes del subgénero *Nothofagus*, mostrando que la existencia de cloroplastos compartidos es común y geográficamente extendida (Premoli *et al.*, 2012). También se documentaron pruebas de hibridación e introgresión generalizadas mediante la captura de cloroplastos en el subgénero *Lophozonia*, en particular en especies de Australia (Worth *et al.*, 2009). Entonces, ¿por qué las especies de *Nothofagus* son tan claramente diferentes a pesar del flujo genético interespecífico pasado y potencialmente actual?

Creemos que una combinación de alta especialización ecológica y fuertes barreras prepolinización operan conjuntamente para mantener las diferencias entre especies, frente al efecto homogeneizador de un flujo génico ocasional o incluso persistente. Los datos presentados refuerzan por lo tanto la hipótesis que la coexistencia de las especies simpátricas de *Nothofagus* es posible debido al aislamiento temporal de la polinización ya que cada especie posee distintos nichos climáticos que se reflejan en fenologías de la floración asíncronas. Encontramos ciertos desfases fenológicos entre linajes del cloroplasto, principalmente entre el linaje norte que mostró un inicio de fase más tardío que el del sur en *N. dombeyi* y menores requerimientos térmicos que el sur en las tres especies. Proponemos que estos desfases reproductivos juntamente con condiciones ambientalmente diferenciales (Fasanella *et al.*, 2023) mantienen la divergencia entre linajes que habría surgido por un evento antiguo de vicarianza (Premoli *et al.*, 2012).

La divergencia ecológica se considera clave para entender las barreras precigóticas o prepolinización entre taxones simpátricos en el proceso temprano de divergencia. Aquí hemos querido demostrar que la divergencia ecológica es un proceso dinámico. Mientras que bajo climas particulares las especies pueden mantenerse como unidades ecológicas puras y distinguibles, también pueden fusionarse por hibridación,

favoreciendo la persistencia del subgénero bajo cambios en el clima como el enfriamiento y por otro lado divergir durante el calentamiento. Los mecanismos de fusión y divergencia no pueden interpretarse como divergencia reciente o especiación incipiente. En cambio, la existencia de tipos de polen similares dentro de los subgéneros de *Nothofagus*, que a su vez pueden considerarse linajes antiguos en las Nothofagaceae (Premoli *et al.*, 2012), puede considerarse una estrategia antigua de taxones puros con nichos ecológicos contrastantes, pero con barreras reproductivas débiles entre especies. La capacidad de hibridación transitoria y divergencia por introgresión adaptativa en los diferentes entornos ocupados por cada taxón les ha permitido persistir a lo largo de su historia evolutiva en condiciones físicas cambiantes. Se ha sugerido que la alocronía, más que la alopatría, puede considerarse una fuerza poderosa que promueve la especiación (Quintero *et al.*, 2014). Si bien se ha argumentado el papel de la alocronía fomentando la divergencia, sobre todo cuando la especiación es completa, puede contribuir en gran medida a la diferenciación de las poblaciones mientras estas se adaptan a microclimas distintos (Taylor & Friesen, 2017b). Nuestro objetivo es contribuir a este tema aportando pruebas de que la alocronía puede ser una fuerza importante una vez que la especiación se ha completado y que el aislamiento temporal como resultado de gradientes de temperatura contrastantes puede impedir el flujo génico interespecífico temporario entre especies ecológicas en simpatría a tan solo pocos metros de distancia.

TABLAS

Tabla 2.1: Resumen del muestreo y ubicación de los aeródromos.

Detalles de cada sitio: coordenadas geográficas, elevación media, especies presentes y temporadas de monitoreo. C = cerro, L= lago. La columna "Código" muestra la abreviatura usada para cada sitio. La columna "Linaje" se refiere a los haplotipos de cloroplasto de los individuos de cada sitio. N = número de individuos. Lat: latitud. Long: Longitud. Elev: elevación media del sitio.

Sitio	Código	Lat	Long	Elev (msnm)	Año	Especies	Linaje	N
Aeródromo Bariloche	BRC	-41,15	-71,17	846	-	-	-	-
C. Perito Moreno	CPM	-41,79	-71,57	1015	2017/ 2018	<i>N. pumilio</i>	Norte	10
C. Perito Moreno	CPM	-41,79	-71,57	980	2017/ 2018	<i>N. antarctica</i>	Norte	10
Río Azul Norte	RAN	-41,83	-71,55	652	2018	<i>N. dombeyi</i>	Norte	5
C. Hielo Azul	CHA	-41,88	-71,58	1150	2017	<i>N. antarctica</i>	Norte	5
C. Hielo Azul	CHA	-41,88	-71,58	1145	2017	<i>N. pumilio</i>	Norte	5
C. Hielo Azul	CHA	-41,88	-71,58	500	2017	<i>N. dombeyi</i>	Norte/ Sur	5
Río Azul Sur	RAS	-41,94	-71,54	381	2018	<i>N. dombeyi</i>	Norte	4
C. Piltriquitrón	CPI	-41,97	-71,48	1275	2018	<i>N. pumilio</i>	Norte	5
C. Piltriquitrón	CPI	-41,97	-71,48	1270	2018	<i>N. antarctica</i>	Norte	5
C. Piltriquitrón	CPI	-41,97	-71,48	1000	2018	<i>N. antarctica</i>	Norte	5
C. Cholila	CHO	-42,42	-71,62	1170	2016/ 2017	<i>N. antarctica</i>	Sur	5
C. Cholila	CHO	-42,42	-71,62	1170	2016/ 2017	<i>N. pumilio</i>	Sur	5
L. Cholila	CHO	-42,46	-71,59	550	2017	<i>N. antarctica</i>	Norte	5
L. Cholila	CHO	-42,46	-71,59	530	2016/ 2017	<i>N. dombeyi</i>	Sur	10
C. Punttiagudo	CPU	-42,52	-71,57	1012	2016	<i>N. pumilio</i>	Sur	5
C. Punttiagudo	CPU	-42,52	-71,57	634	2016	<i>N. dombeyi</i>	Sur	5
Mallín Delgado	MDE	-42,6	-71,44	1190	2016/ 2017	<i>N. pumilio</i>	Sur	5
Mallín Delgado	MDE	-42,6	-71,44	1170	2016/ 2017	<i>N. antarctica</i>	Norte/ Sur	5
Aeródromo Esquel	ESQ	-42,93	-71,15	799	-	-	-	-

Tabla 2.2: Análisis de las variables climáticas y de las anomalías de temperatura.

T: temperatura media anual. TM: temperatura máxima media. Tm: temperatura mínima media. T anomalía: desviación típica de las temperaturas medias anuales con respecto a la media regional del decenio.

Año	Aeródromo Esquel (clase Sur)				Aeródromo Bariloche (clase Norte)			
	T (°C)	TM (°C)	Tm (°C)	T anomalía	T (°C)	TM (°C)	Tm (°C)	T anomalía
2009	8,18	12,93	3,73	-2,35	7,78	15,18	0,85	-2,26
2010	9,83	16,58	2,88	-0,18	9,38	17,58	2,28	-0,02
2011	10,93	18,25	4,00	1,26	10,33	18,28	2,55	1,30
2012	10,30	16,58	4,40	0,44	9,53	16,88	3,05	0,19
2013	10,38	17,75	3,55	0,54	9,95	17,53	2,60	0,78
2014	9,73	16,48	3,75	-0,31	9,15	16,65	2,13	-0,34
2015	9,60	16,88	3,63	-0,48	8,90	17,03	1,58	-0,69
2016	10,95	18,13	4,85	1,30	10,38	18,68	2,83	1,37
2017	10,28	16,80	3,73	0,41	9,43	17,08	2,55	0,05
2018	9,73	16,80	3,38	-0,31	9,18	16,88	2,40	-0,30
2019	9,73	16,88	3,58	-0,31	9,33	17,08	2,95	-0,09
Media	9,96	16,73	3,77	-	9,39	17,16	2,34	-
SD	0,76	1,41	0,52	-	0,72	0,91	0,64	-

Tabla 2.3: Resultados ANOVA de los modelos lineales DD y DP.

F de V: fuente de variación. DP: modelo para días hasta el inicio de la floración. DD: modelo para requerimientos térmicos para la floración. GR: grados de libertad. SC: suma de cuadrados. CM: cuadrados medios. F: estadístico F. Chi2 estadístico chi cuadrado. p: valor p de la prueba.

F de V	GL	Modelo DP - R2 (ajustado) = 0.87				Modelo DD - R2 (pseudo) = 0.95	
		SC	CM	F	p	Chi2	p
Especie	2	31478,40	15739,20	564,56	< 0.001	755,08	< 0.001
Año	2	6020,17	3010,08	107,97	< 0.001	198,74	< 0.001
Elevación	1	5186,95	5186,95	186,06	< 0.001	895,06	< 0.001
Fenofase	1	246,25	246,25	8,83	0,003	6,86	0,009
Linaje	1	465,19	465,19	16,69	< 0.001	40,56	< 0.001
Especie:Año	4	2761,79	690,45	24,77	< 0.001	120,71	< 0.001
Especie:Elevación	2	1920,14	960,07	34,44	< 0.001	22,58	< 0.001
Año:Elevación	2	229,88	114,94	4,12	0,017	44,96	< 0.001
Especie:Fase	2	30,52	15,26	0,55	0,579	5,39	0,068
Especie:Linaje	2	183,65	91,82	3,29	0,039	20,54	< 0.001
Residual	222	6189,04	27,88	NA	NA	NA	NA

Tabla 2.4: Comparaciones de medias entre linajes y fases para las tres especies.

Contrastes de Tukey entre niveles de las variables Linaje o Fase para los modelos DP (días hasta el inicio de una fase terminal) y DD (requerimientos térmicos para el inicio de una fase terminal).

Modelo	DP: días hasta inicio de fase			DD: requerimientos térmicos para el inicio de fase		
Contraste	Entre Linajes: Norte - Sur			Entre Linajes: Norte / Sur		
	N. antarctica	N. dombeyi	N. pumilio	N. antarctica	N. dombeyi	N. pumilio
IC95% (LI)	-2,530	1,152	-1,961	0,719	0,773	0,486
Estimador	0,512	6,638	1,841	0,806	0,854	0,572
IC95% (LS)	3,554	12,125	5,642	0,903	0,943	0,673
p	0,740	0,018	0,341	< 0.001	0,002	< 0.001
Contraste	Entre Fases: FloIV - PA			Entre Fases: FloIV / PA		
Especie	N. antarctica	N. dombeyi	N. pumilio	N. antarctica	N. dombeyi	N. pumilio
IC95% (LI)	-0,248	-1,581	0,684	0,995	0,977	1,041
Estimador	1,897	1,233	2,960	1,079	1,020	1,142
IC95% (LS)	4,042	4,046	5,237	1,170	1,065	1,252
p	0,083	0,389	0,011	0,066	0,372	0,005

Tabla 2.5: Días (DP) hasta el inicio de una fase terminal (FloIV o PA). Diferencia de medias.

Contraste entre pares de especies para distintas combinaciones de elevación y año. Nant: *N. antarctica*. Npum= *N. pumilio*. Ndom: *N. dombeyi*. LI y LS: límites inferior y superior del intervalo de confianza (95%). Dif medias: estimador de la diferencia de medias entre pares de especies. Los contrastes en gris muestran poblaciones simpátricas monitoreadas a campo.

Contraste	Elevación (msnm)	Año	LI	Dif Medias	LS	p
Nant - Npum	500	2016	-11,58	3,97	19,51	0,819
Nant - Npum	500	2017	-6,12	9,37	24,87	0,329
Nant - Npum	500	2018	-27,94	-10,56	6,81	0,325
Nant - Npum	800	2016	5,56	14,32	23,09	<0.001
Nant - Npum	800	2017	11,32	19,73	28,13	<0.001
Nant - Npum	800	2018	-10,68	-0,21	10,26	0,999
Nant - Npum	1100	2016	20,24	24,68	29,11	<0.001
Nant - Npum	1100	2017	27,14	30,08	33,03	<0.001
Nant - Npum	1100	2018	5,16	10,15	15,15	<0.001
Ndom - Nant	500	2016	-11,42	9,40	30,22	0,536
Ndom - Nant	500	2017	23,80	29,46	35,13	<0.001
Ndom - Nant	500	2018	14,24	26,60	38,96	<0.001
Ndom - Nant	800	2016	-10,66	8,17	27,00	0,563
Ndom - Nant	800	2017	18,54	28,23	37,92	<0.001
Ndom - Nant	800	2018	16,27	25,37	34,47	<0.001
Ndom - Nant	1100	2016	-12,75	6,93	26,62	0,684
Ndom - Nant	1100	2017	10,64	26,99	43,34	<0.001
Ndom - Nant	1100	2018	12,98	24,13	35,28	<0.001
Ndom - Npum	500	2016	-1,93	13,37	28,66	0,100
Ndom - Npum	500	2017	22,50	38,83	55,17	<0.001
Ndom - Npum	500	2018	0,80	16,04	31,28	0,037
Ndom - Npum	800	2016	7,31	22,49	37,68	0,002
Ndom - Npum	800	2017	33,40	47,95	62,51	<0.001
Ndom - Npum	800	2018	14,14	25,16	36,19	<0.001
Ndom - Npum	1100	2016	12,85	31,61	50,37	<0.001
Ndom - Npum	1100	2017	40,29	57,08	73,86	<0.001
Ndom - Npum	1100	2018	22,64	34,28	45,92	<0.001

Tabla 2.6: Requerimientos térmicos (DD) para el inicio de una fase terminal (FloIV y PA). Cociente de medias.

Contraste entre pares de especies para distintas combinaciones de elevación y año. Nant: *N. antarctica*. Npum= *N. pumilio*. Ndom: *N. dombeyi*. LI y LS: límites inferior y superior del intervalo de confianza (95%). Coc medias: estimador del cociente de medias entre pares de especies. Los contrastes en gris muestran poblaciones simpátricas monitoreadas.

Contraste	Elevación (msnm)	Año	LI	Coc Medias	LS	p
Nant / Npum	500	2016	0,96	1,70	3,01	0,073
Nant / Npum	500	2017	0,61	1,10	1,96	0,926
Nant / Npum	500	2018	0,28	0,54	1,04	0,068
Nant / Npum	800	2016	1,91	2,62	3,61	<0.001
Nant / Npum	800	2017	1,23	1,69	2,32	<0.001
Nant / Npum	800	2018	0,55	0,83	1,23	0,503
Nant / Npum	1100	2016	3,41	4,05	4,81	<0.001
Nant / Npum	1100	2017	2,32	2,61	2,92	<0.001
Nant / Npum	1100	2018	1,04	1,27	1,55	0,012
Ndom / Nant	500	2016	0,42	0,74	1,33	0,449
Ndom / Nant	500	2017	1,30	1,56	1,87	<0.001
Ndom / Nant	500	2018	0,47	0,71	1,08	0,130
Ndom / Nant	800	2016	0,32	0,51	0,82	0,003
Ndom / Nant	800	2017	0,83	1,07	1,39	0,802
Ndom / Nant	800	2018	0,37	0,49	0,64	<0.001
Ndom / Nant	1100	2016	0,23	0,35	0,55	<0.001
Ndom / Nant	1100	2017	0,48	0,74	1,13	0,218
Ndom / Nant	1100	2018	0,27	0,34	0,42	<0.001
Ndom / Npum	500	2016	0,77	1,27	2,09	0,510
Ndom / Npum	500	2017	0,94	1,71	3,10	0,089
Ndom / Npum	500	2018	0,22	0,38	0,67	<0.001
Ndom / Npum	800	2016	0,90	1,34	2,00	0,185
Ndom / Npum	800	2017	1,13	1,81	2,90	0,009
Ndom / Npum	800	2018	0,28	0,40	0,58	0,000
Ndom / Npum	1100	2016	0,94	1,43	2,18	0,116
Ndom / Npum	1100	2017	1,23	1,93	3,01	0,002
Ndom / Npum	1100	2018	0,33	0,43	0,55	<0.001

FIGURAS

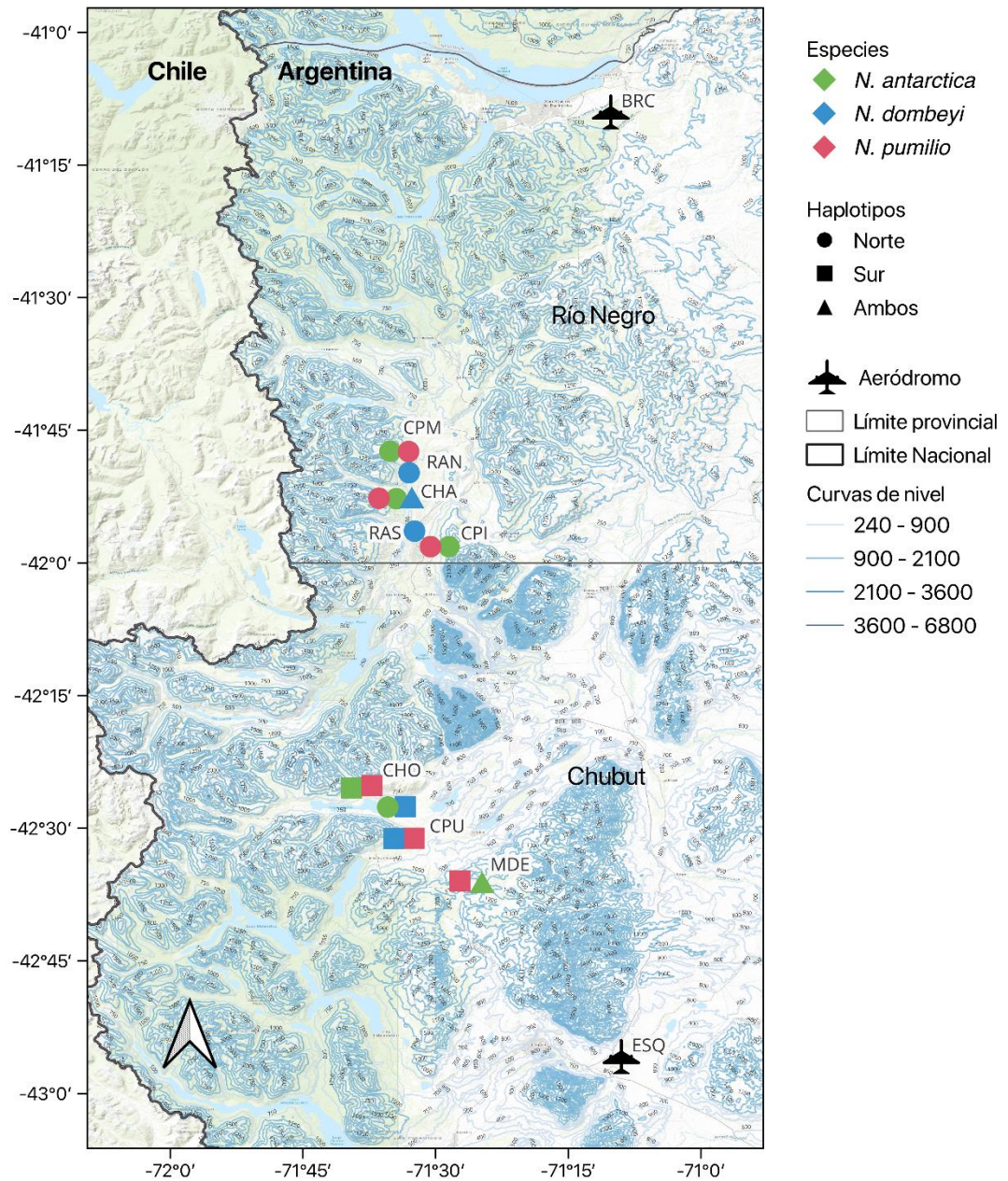


Figura 2.1: Mapa de la zona de estudios.

BRC: Bariloche. CPM: Cerro Perito Moreno. RAN: Río Azul norte. CHA: Cerro Hielo Azul. RAS: Río Azul sur. CPI: Cerro Piltriquitrón. CHO: Cholila. CPU: Cerro Puntiangudo. MDE: Mallín Delgado. ESQ: Esquel.

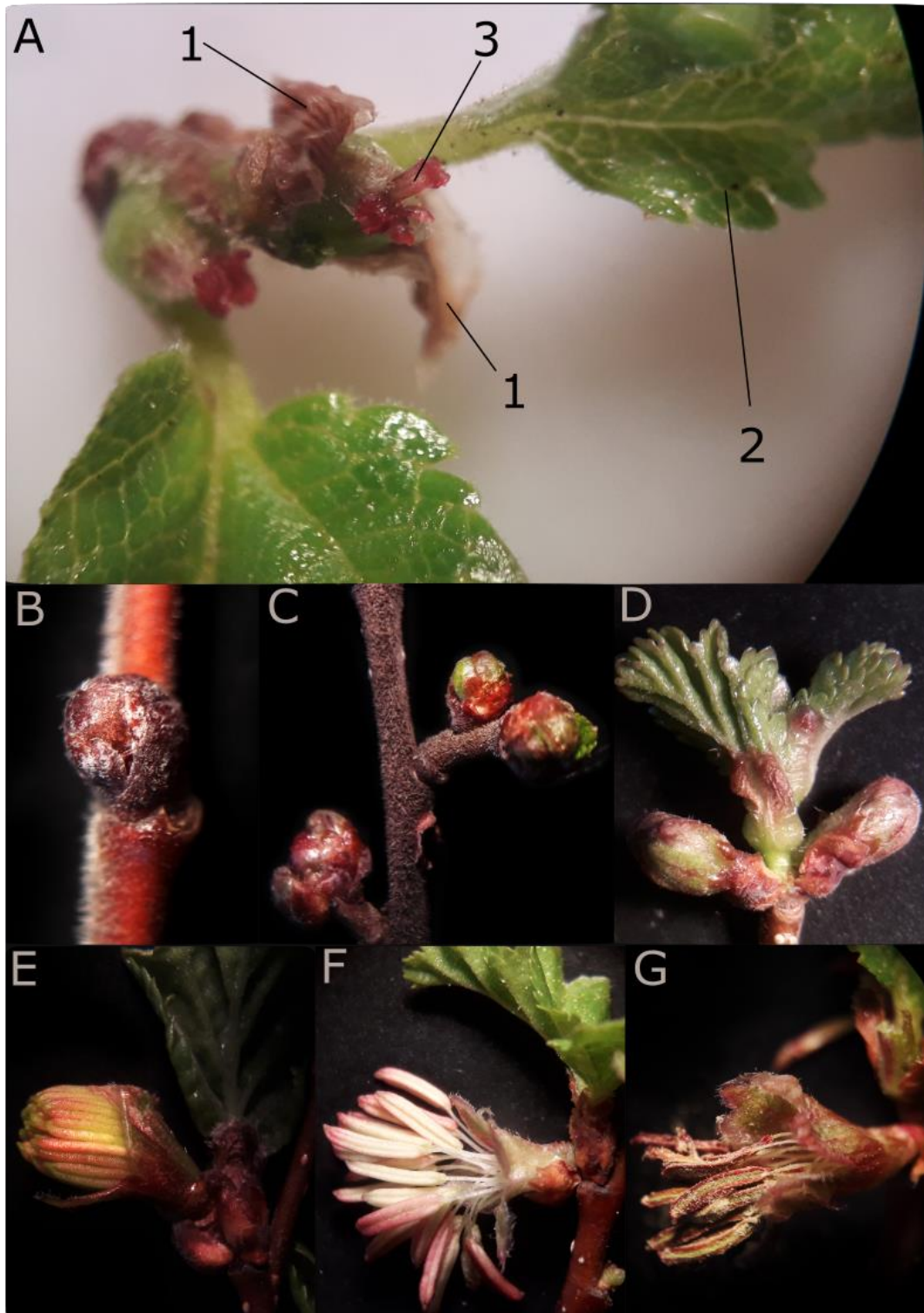


Figura 2.2: Fases fenológicas ejemplificadas para *N. antarctica*

A: inflorescencia pistilada (1: estípulas, 2: hojas, 3: estigmas). **B:** yema en reposo (Leaf1). **C:** yema fértil hinchada a la izquierda (Flol) y dos yemas vegetativas hinchadas a la derecha (Leaf2). **D:** dos flores en estado Flol y hojas en expansión (Leaf3). **E:** Floll. **F:** Flolll. **G:** Flollv. Fotografías tomadas y editadas por Alejandro Movia (alejmovia@gmail.com).

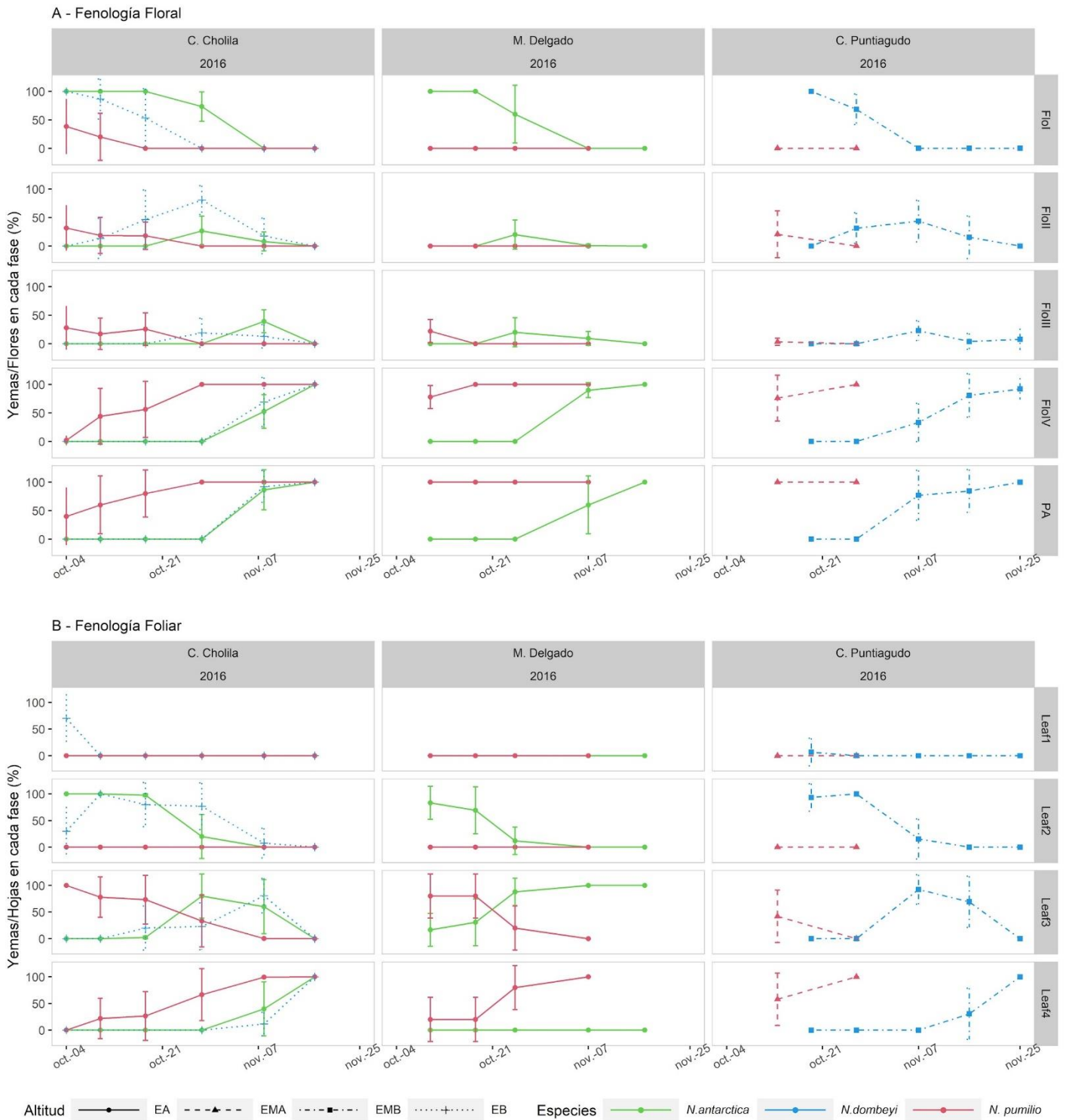


Figura 2.3: Serie cronológica de la fenología de la floración floral (A) y foliar (B) durante la primavera de 2016.

Proporción media de yemas o flores/hojas en cada fase fenológica en función del tiempo para cada sitio. Los colores identifican las especies: verde para *N. antarctica*, celeste para *N. dombeyi* y rojo para *N. pumilio*. El tipo de línea y la forma de los puntos indican la elevación de cada sitio. EA: alta elevación, EMA: elevación media-alta, EMB: elevación media-baja, EB: baja elevación. FloI a FloIV, PA y Leaf1 a Leaf4 corresponden a los estadios fenológicos descritos en la sección de métodos y en la figura 2.2.

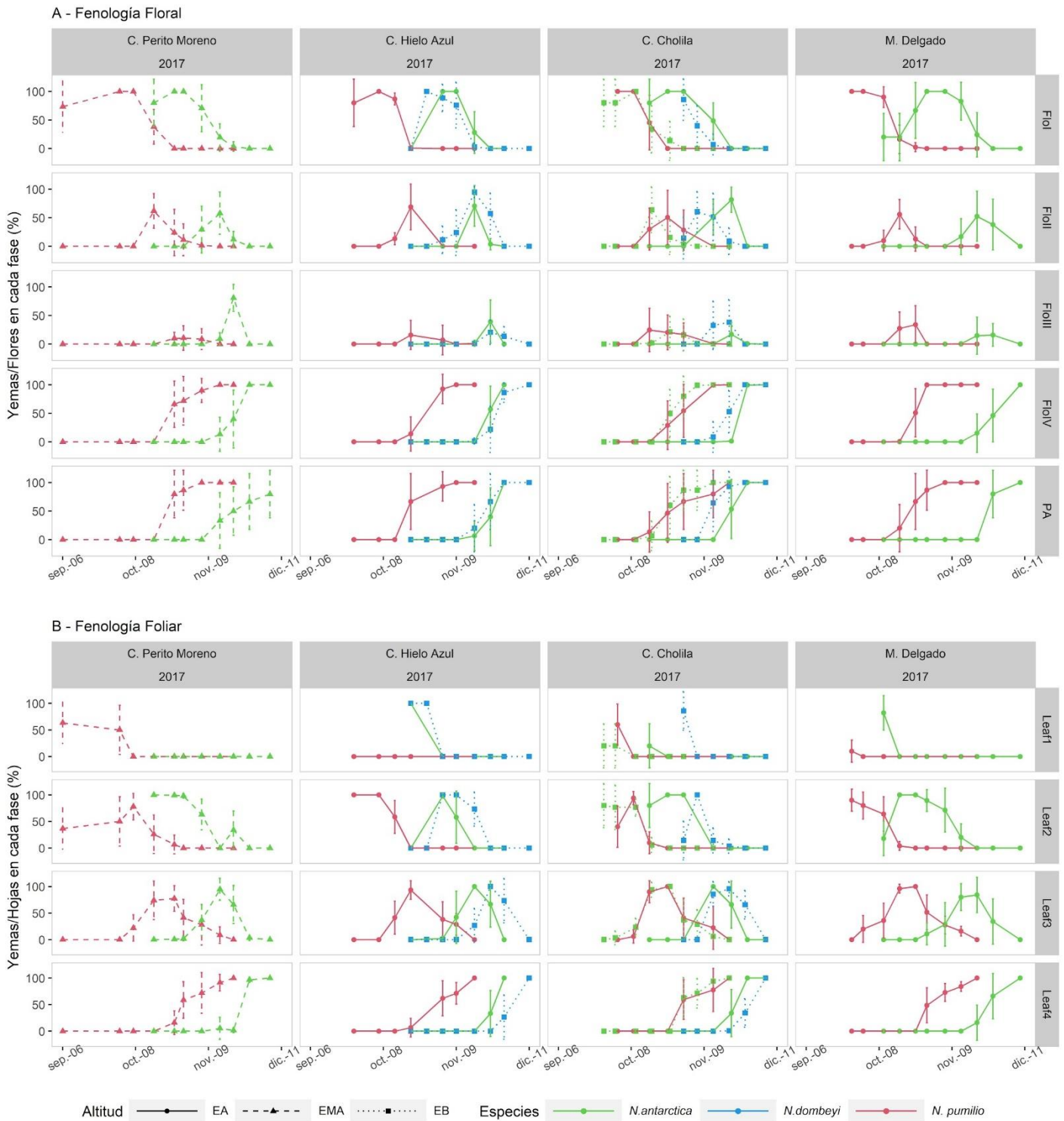


Figura 2.4: Serie cronológica de la fenología de la floración floral (A) y foliar (B) durante la primavera de 2017.

Proporción media de yemas o flores/hojas en cada fase fenológica en función del tiempo para cada sitio. Los colores identifican las especies: verde para *N. antarctica*, celeste para *N. dombeyi* y rojo para *N. pumilio*. El tipo de línea y la forma de los puntos indican la elevación de cada sitio. EA: alta elevación, EMA: elevación media-alta, EB: baja elevación. FloI a FloIV, PA y Leaf1 a Leaf4 corresponden a los estadios fenológicos descritos en la sección de métodos y en la figura 2.2.

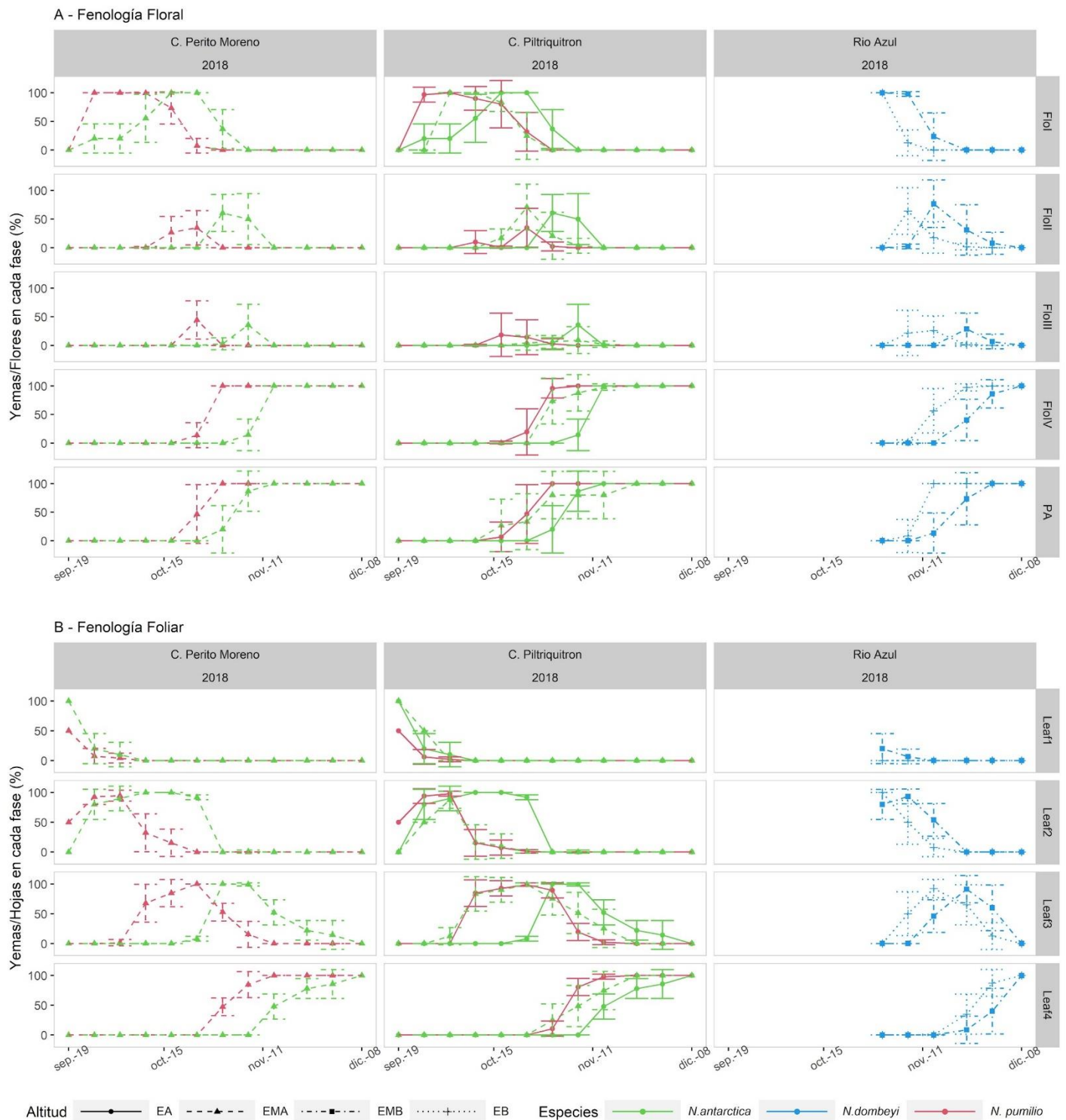


Figura 2.5: Serie cronológica de la fenología de la floración floral (A) y foliar (B) durante la primavera de 2018.

Proporción media de yemas o flores/hojas en cada fase fenológica en función del tiempo para cada sitio. Los colores identifican las especies: verde para *N. antarctica*, celeste para *N. dombeyi* y rojo para *N. pumilio*. El tipo de línea y la forma de los puntos indican la elevación de cada sitio. EA: alta elevación, EMA: elevación media-alta, EMB: elevación media-baja, EB: baja elevación. FloI a FloIV, PA y Leaf1 a Leaf4 corresponden a los estadios fenológicos descritos en la sección de métodos y en la figura 2.2.

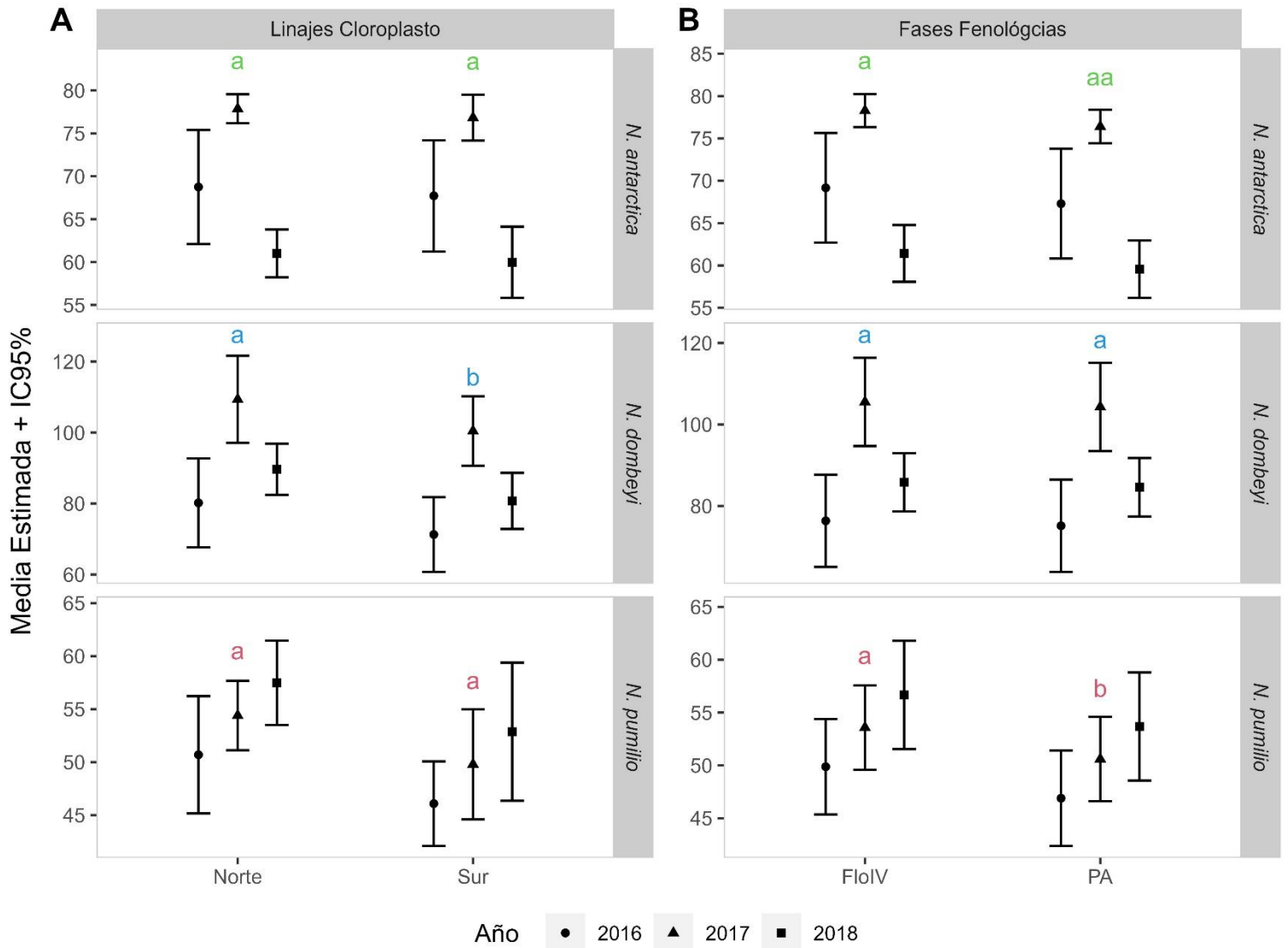


Figura 2.6: Medias + IC95% estimadas para el inicio la floración (DP) para cada especie.

A: comparación entre linajes Norte y Sur para cada especie. B: Comparación entre fases FloIV y PA para cada especie. Los resultados se promediaron entre elevación y año. Las letras de un mismo color muestran los resultados de los contrastes a posteriori. Letras iguales representan diferencias no significativas, letras distintas para diferencias significativas con $p < 0.05$ y distintas cantidades de la misma letra para $p < 0.1$.

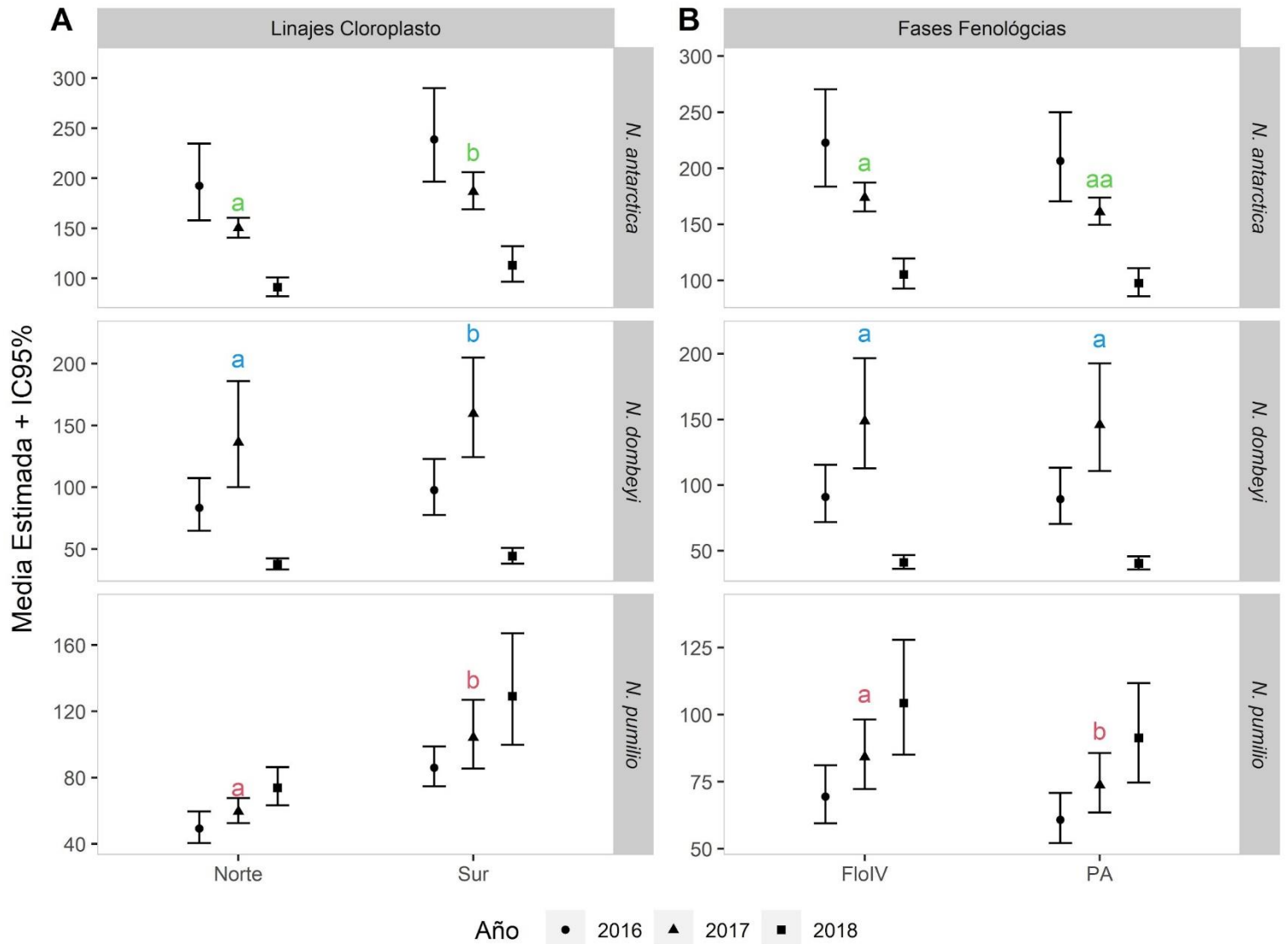


Figura 2.7: Medias + IC95% estimadas para los requerimientos térmicos para el inicio la floración (DD) de cada especie.

A: comparación entre linajes Norte y Sur para cada especie. B: Comparación entre fases FloIV y PA para cada especie. Los resultados se promediaron entre elevación y año. Las letras de un mismo color muestran los resultados de los contrastes a posteriori. Letras iguales representan diferencias no significativas, letras distintas para diferencias significativas con $p < 0.05$ y distintas cantidades de la misma letra para $p < 0.1$.

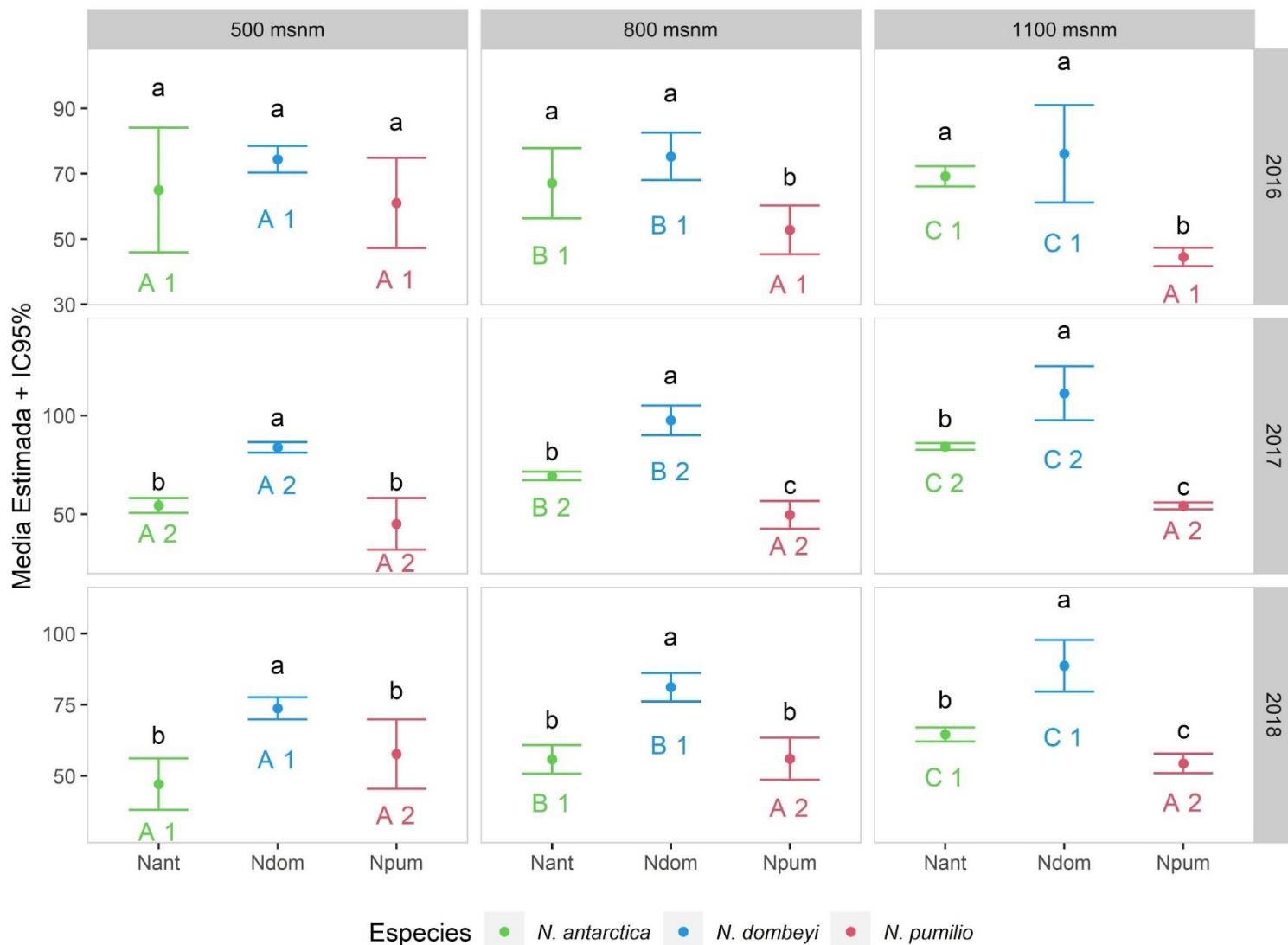


Figura 2.8: Número medio de días para el inicio de una fase (DP).

Número medio de días hasta el inicio de una fase (DP), promediado entre fenofases (FloIV y PA) y linajes (Norte y Sur) para distintas combinaciones de elevación y año. Las letras negras representan los contrastes entre especies simpátricas en cada clase de elevación para distintos años. Letras y números de colores indican contrastes independientes para cada especie. Las letras en mayúscula representan los contrastes entre elevaciones para un año promedio y los números representan contrastes entre años para una elevación promedio.



Figura 2.9: Requerimientos térmicos medios para el inicio de una fase (DD).

Requerimientos térmicos medios para el inicio de una fase (DD), promediado entre fenofases (FloIV y PA) y linajes (Norte y Sur) para distintas combinaciones de elevación y año. Las letras negras representan los contrastes entre especies simpátricas en cada clase de elevación para distintos años. Letras y números de colores indican contrastes independientes para cada especie. Las letras en mayúscula representan los contrastes entre elevaciones para un año promedio y los números representan contrastes entre años para una elevación promedio.

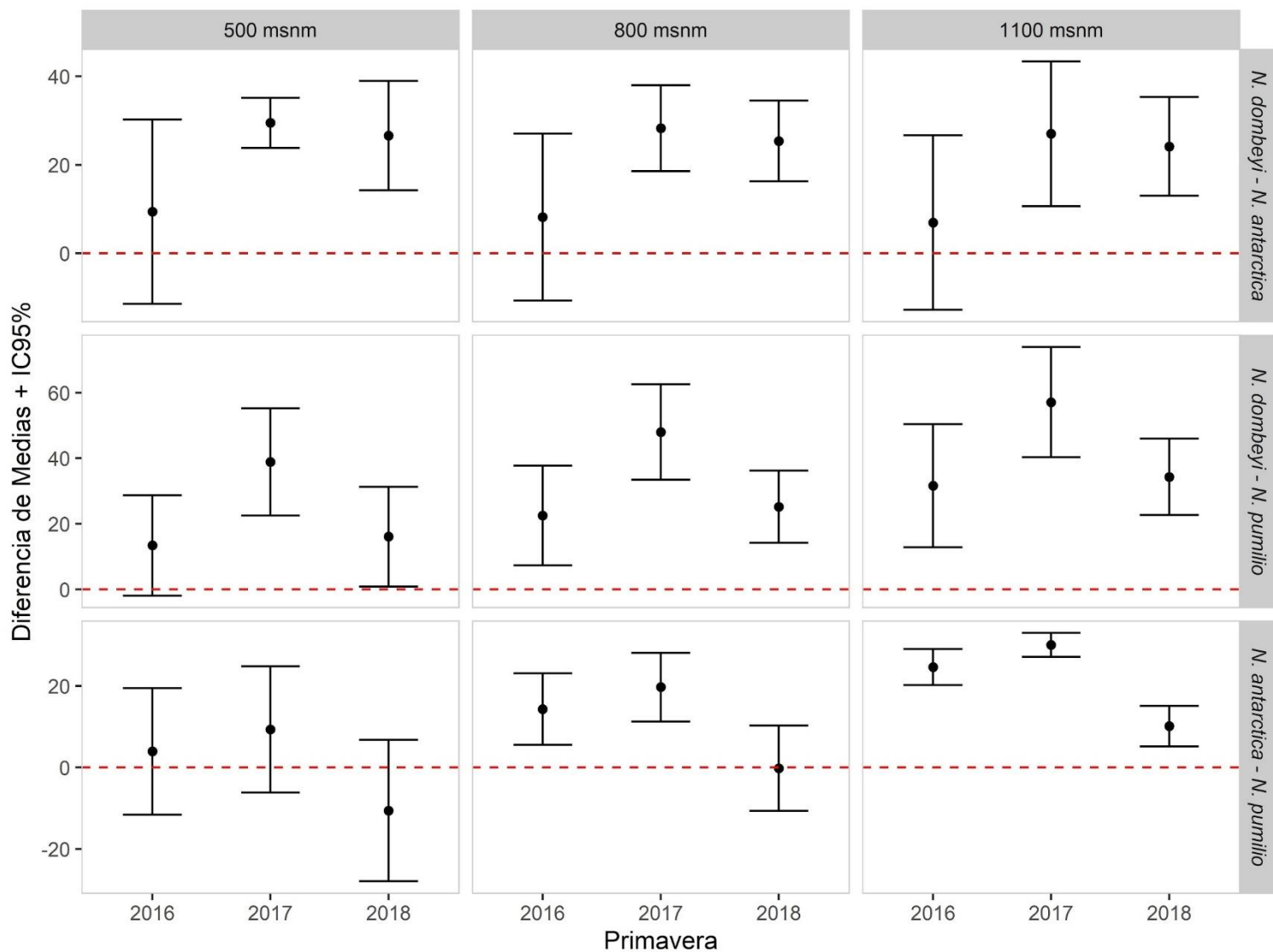


Figura 2.10: Variación del desfase fenológico entre especies medido en días hasta el inicio de una fase (DP)

Diferencia de medias (DP) y sus intervalos de confianza (95%) estimados entre pares de especie simpátricas mediante comparaciones de Tukey a posteriori.

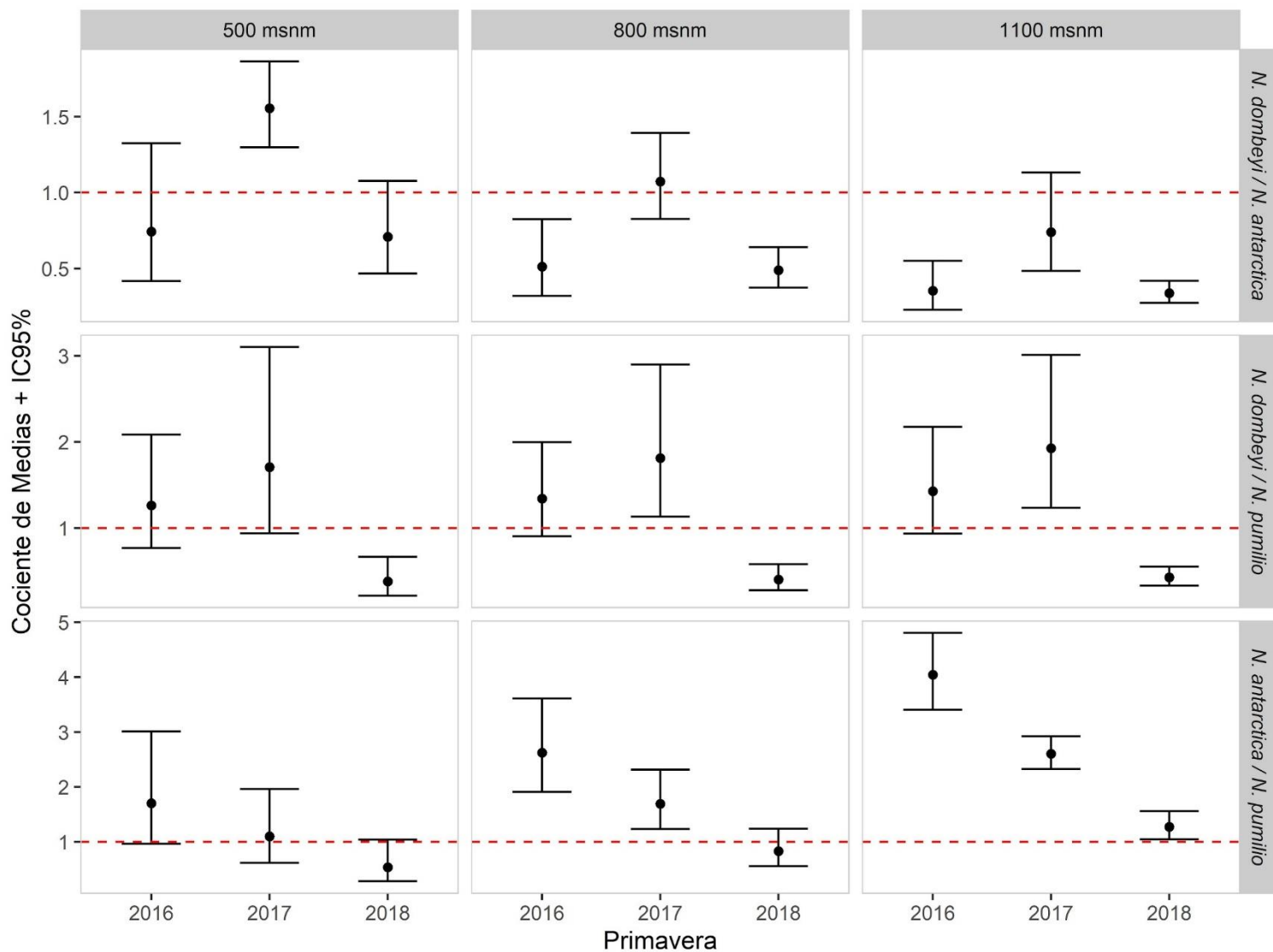


Figura 2.11: Variación del desfase fenológico entre especies medido en calor acumulado hasta el inicio de una fase (DD)

Cociente de medias (DD) y sus intervalos de confianza del 95% estimados entre pares de especie simpátricas mediante comparaciones de Tukey a posteriori.

Capítulo 3: Señales filogenéticas y efectos de la geografía sobre distintos genomas de *Nothofagus*

INTRODUCCIÓN

Los estudios filogenéticos son herramientas útiles para reconstruir la historia evolutiva de los seres vivos y en particular, los enfoques filogenómicos ofrecen nuevas formas de examinar las relaciones entre linajes antiguos (Van Damme *et al.*, 2022).

Tradicionalmente, las filogenias de plantas se basaban en el ADN ribosómico, genes plastidiales y sus regiones intergénicas, con fuentes de error como problemas de alineación por la acumulación de inserciones/delecciones, errores de secuenciación o alguna combinación de estos fenómenos (Álvarez & Wendel, 2003). Durante la última década, se han publicado muchos genomas plastidiales y nucleares que permiten la reconstrucción filogenética basada en muchos genes e incluso filogenias moleculares de genomas o plastomas completos (Shaw *et al.*, 2014). Los genomas del cloroplasto se han utilizado ampliamente en estudios sistemáticos debido principalmente a su modo de herencia uniparental, su baja frecuencia de sustituciones nucleotídicas y su reducida variación estructural en comparación con los genomas nucleares. Los genomas mitocondriales (mitogenomas), ampliamente utilizados para estudios filogenéticos y filogeográficos de animales, no son los preferidos para este tipo de estudios en plantas por varias razones.

Se cree que ambos orgánulos vegetales se heredan por vía materna (Corriveau & Coleman, 1988). Bajo este supuesto, los plastomas y los mitogenomas deberían estar bajo un severo desequilibrio de ligamiento, dando información redundante. Aunque la herencia materna parece ser el modo predominante, se están acumulando pruebas de otros modos de herencia (herencia biparental o paterna y fuga paterna) que dan sentido a la idea que plastomas y mitogenomas pueden ofrecer información complementaria (Birky, 2001; Greiner *et al.*, 2015). El ADN heredado por vía materna lleva las marcas de dispersión por semillas y puede ser muy útil para reconstruir la estructura filogeográfica e inferir la historia demográfica de un taxón (Avise *et al.*, 1987; Palmer *et*

al., 1988). Es probable que las especies con distancias cortas de dispersión por semillas conserven la estructura filogeográfica mucho después de que desaparezcan las barreras físicas que las han generado (Irwin, 2002; Kuo & Avise, 2005). El ADN heredado paternal o bipaternalmente está bajo la influencia de la dispersión del polen y del síndrome de polinización. Las especies polinizadas por el viento pueden mantener la coherencia genética a lo largo de grandes distancias y producir poblaciones de amplio rango con estructuras genéticas blandas y bajas tasas de flujo genético (Premoli, 2003). El mitogenoma de las plantas terrestres evoluciona muy lentamente (Wolfe *et al.*, 1987; Knoop, 2004). Las tasas globales de sustitución sinónima de mitogenomas, plastomas y genomas nucleares mantienen una relación de 1:3:10 en las plantas con semilla, de 1:2:4 en las gimnospermas y de 1:3:16 en las angiospermas (Drouin *et al.*, 2008). Otros estudios muestran que las tasas de sustitución pueden ser muy variables entre genes mitocondriales o entre especies (Van de Paer *et al.*, 2018; Duminil & Besnard, 2021). Las tasas evolutivas más lentas suelen considerarse un rasgo indeseable para un marcador filogenético porque conllevan una menor variación genética entre taxones, principalmente a menores niveles taxonómicos como especie y población. Sin embargo, los genes o genomas de evolución lenta pueden utilizarse para estudiar eventos antiguos (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014) o para trabajar a un nivel taxonómico superior (Yang *et al.*, 2021). Más que conflictivas, las diferencias en los modos de herencia de los genomas organelar y nuclear pueden ser útiles para dilucidar diversos aspectos de la evolución de un taxón dado (Hu *et al.*, 2023).

El ADN del cloroplasto (ADNcp) consiste en moléculas de doble cadena relativamente pequeñas en comparación con los genomas nuclear y mitocondrial. En las angiospermas, su tamaño oscila entre 35 y 217 kilobases (kb) y en la mayoría de los organismos fotosintéticos, entre 115 y 165 kb. Cada célula contiene entre 1.000 y 10.000 copias de ADNcp y sólo una parte es circular, en contra de lo que se pensaba anteriormente (Bendich, 2004). La estructura del ADNcp suele consistir en dos copias de repeticiones invertidas (IRA e IRB), separadas por una región grande y otra pequeña de una sola copia (LSC y SSC, respectivamente). Los genes de los cloroplastos pueden clasificarse en tres grandes categorías. La primera categoría comprende los genes del aparato fotosintético. Esta categoría incluye el fotosistema I (*psaA*, *psaB*, etc.), el

fotosistema II (*psbA*, *psbB*, etc.), el citocromo *b6f* (*petA*, *petB*, etc.), la ATP sintasa (*atpA*, *atpB*, etc.), RuBisCo (*rbcl*) y los genes de la NAD(P)H deshidrogenasa (*ndhA*, *ndhB*, etc.). La segunda categoría comprende los genes ARN y los genes del aparato genético. Esto incluye ARN de transferencia (*trnH*, *trnK*, etc.), ARN ribosómico (*rrn16*, *rrn5*, etc.), ARN polimerasa (*rpoA*, *rpoB*, etc.) y genes de subunidades ribosómicas (*rps2*, *rps3*, *rpl2*, *rpl16*, etc.). La tercera categoría comprende ORF conservados denominados *ycfs* (marcos hipotéticos de lectura abierta del cloroplasto) y genes potenciales codificadores de proteínas como *matK* y *cemA*. Los genes que se encuentran en los cpDNA generalmente conservan el contenido de la secuencia, pero la forma en que están ordenados puede diferir entre organismos, y algunas variantes asociadas con el tamaño o los arreglos estructurales pueden incluso tener valor adaptativo (Hu *et al.*, 2015; Piot *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2019).

A diferencia de los cloroplastos y las mitocondrias animales, los genomas mitocondriales de las plantas con flor son grandes (de 222 kb a varias megabases) y complejos (Mower *et al.*, 2012; Van de Paer *et al.*, 2018). Son muy variables en longitud, contenido génico y disposición de secuencias (sintenia) incluso entre especies estrechamente relacionadas (Mower *et al.*, 2012; Cole *et al.*, 2018; Dong *et al.*, 2020). Los mitogenomas también tienen una arquitectura muy dinámica que se aleja del modelo clásico del cromosoma circular único: varias moléculas coexisten organizadas en múltiples configuraciones genómicas con estequiometrías variables (Mower *et al.*, 2012; Gandini & Sanchez-Puerta, 2017; Gualberto & Newton, 2017). Las diferencias de tamaño son consecuencia de un contenido génico diferente pero también, y principalmente, de diferencias en regiones intergénicas y no codificantes como intrones o grandes repeticiones susceptibles de recombinación homóloga (Gualberto & Newton, 2017). Por último, pero no menos importante, los mitogenomas contienen cantidades variables de ADN extraño, nuclear y derivado de plástidos (MTPTs). Estas secuencias extrañas pueden obtenerse mediante transferencia génica intracelular u horizontal, y normalmente no son codificantes, pero pueden recombinarse (Gandini & Sanchez-Puerta, 2017) y desdibujar los patrones filogenéticos. Por estas razones, el ensamblaje representa una tarea desafiante y se dispone de pocos mitogenomas de referencia. Los genomas de cloroplastos, por el contrario, son compactos, tienen muy pocas

secuencias extrañas y presentan poca variación entre especies relacionadas (Shaw *et al.*, 2007, 2014).

Las diferencias en el modo de herencia de los genomas organelares y nucleares pueden producir señales filogenéticas aparentemente contradictorias. La segregación incompleta de linajes y los eventos de captura de cloroplastos que siguen a la hibridación, la introgresión y el flujo génico, particularmente entre taxones estrechamente relacionados son fenómenos que pueden dar lugar a que se compartan cloroplastos que producen filogenias no resueltas. Esto se ha documentado en algunos géneros arbóreos como *Eucalyptus*, que muestran señales de hibridación potencial a distintos niveles taxonómicos (Nevill *et al.*, 2014; Healey *et al.*, 2018), *Quercus* (Petit *et al.*, 2002), *Juniperus* (Terry *et al.*, 2000) y *Betula* (Palme *et al.*, 2004). En Fagales, por ejemplo, la abundancia de genomas de cloroplasto disponibles permitió la identificación de señales conflictivas entre secuencias codificantes y no codificantes revelando que la topología de las filogenias de cloroplastos es altamente sensible a la composición génica (Yang *et al.*, 2021). Yang *et al.*, (2021) revisaron la posición taxonómica de varias familias de Fagales y algunas relaciones intergenéricas. Proponen que un mecanismo de captura de cloroplastos podría haber estado implicado en la evolución y diversificación de los miembros de la subfamilia *Quercoidae*. Estos cloroplastos compartidos pueden ser el resultado de hibridación y retrocruzamientos posteriores, es decir introgresión, que puede ocurrir entre linajes a distintos niveles taxonómicos y dificultar así las reconstrucciones filogenéticas (Yang *et al.*, 2021). A un nivel taxonómico inferior, dentro de *Quercus*, la delimitación de especies basada en secuencias de cloroplastos se ha visto obstaculizada debido a la reducida divergencia interespecífica dentro del género y a los frecuentes eventos de hibridación (Hubert *et al.*, 2014). Como resultado, los estudios anteriores no lograron resolver sin ambigüedades las relaciones filogenéticas entre y dentro de los seis grupos principales de *Quercus*, cinco de los cuales (*Protobalanus*, *Quercus-Lobatae*, *Cerris*, *Ilex* y *Cyclobalanopsis*) se pueden reconocer sobre la base de la ornamentación del polen (Hubert *et al.*, 2014). Se pueden destacar varias cuestiones como problemas principales relacionados a las incoherencias encontradas entre los estudios que pretenden resolver topologías infragenéricas dentro de *Quercus*. Entre ellas destacamos el efecto que un

muestreo inadecuado a nivel de especies (diversidad geográfica), genes (diversidad de tasas evolutivas) y selección de grupos externos que generalmente produce una señal filogenética débil (Hubert *et al.*, 2014).

La limitación en el número de genes muestreados ha sido potencialmente superada por el desarrollo de tecnologías de secuenciación de nueva generación que permiten la obtención de genomas nucleares, de cloroplasto o de mitocondria incluso en organismos no modelo con relativa facilidad. Aun así, existen algunas incongruencias en la reconstrucción filogenética de muchos taxones, ya que las grandes cantidades de datos producidos por la secuenciación del genoma completo pueden dar lugar a relaciones evolutivas sesgadas, incluso topologías fuertemente apoyadas pero inexactas, si el muestreo de taxones es inadecuado (Soltis *et al.*, 2004). Así, se destacó que una incongruencia sólo será identificada como tal si el muestreo de taxones es lo suficientemente amplio como para abarcar una amplia gama de diversidad morfológica y de linajes geográficos (Soltis *et al.*, 2004). Los esquemas de muestreo son cruciales, sobre todo en taxones de raíces profundas con linajes de divergencia temprana. Debido a la naturaleza no recombinante del genoma del cloroplasto, es posible que conserve polimorfismos antiguos (Yang *et al.*, 2021). En tales casos, los polimorfismos del plastoma pueden ser más un reflejo de la geografía y la historia biogeográfica que de las relaciones filogenéticas entre taxones.

El género *Nothofagus* (Nothofagaceae) ofrece un caso especial para analizar señales filogenéticas vinculadas al modo de herencia de sus distintos genomas. Nothofagaceae es una familia monotípica de antiguas raíces gondwánicas con distribución actual a lo largo de los bosques templados del hemisferio sur. Su distribución pasada y presente le ha valido a esta familia una posición privilegiada entre los estudios filogeográficos y biogeográficos. El género *Nothofagus* muestra una divergencia temprana en cuatro subgéneros monofiléticos: *Lophozonia*, *Fuscospora*, *Nothofagus* y *Brassospora*. Las relaciones filogenéticas entre las Nothofagaceae se han estudiado intensamente utilizando la morfología de hojas, cúpulas y polen de especies fósiles y existentes (Hill & Read, 1991; Hill & Jordan, 1993; Manos, 1997; Fernández *et al.*, 2016)) así como secuencias de ADN de cloroplasto y nuclear de especies actuales (Setoguchi *et al.*, 1997; Acosta & Premoli, 2010; Sauquet *et al.*, 2012; Premoli *et al.*,

2012; Acosta *et al.*, 2014). Los datos morfológicos, palinológicos y genéticos, tanto nucleares como plastidiales, confirman la monofilia de los cuatro subgéneros existentes y sus relaciones [*Lophozonia* [*Fuscospora* [*Nothofagus*, *Brassospora*]]. Este antiguo género tiene una notable historia de divergencia que incluye eventos vicariantes, eventos de dispersión y divergencia simpátrica y alopátrica. A nivel de subgénero, la estructura filogenética no está tan clara. *Nothofagus* subgénero *Nothofagus* son árboles amantes del frío endémicos de los Andes meridionales en la región de la Patagonia (sur de Chile y Argentina). Durante los últimos diez años, la filogenia y la historia demográfica de este subgénero han sido intensamente estudiadas y han surgido algunas controversias a partir del contraste entre las filogenias cloroplástica y nuclear.

De estos estudios se desprenden dos características muy interesantes. En primer lugar, el ADN nuclear (secuencias ITS) agrupa a los individuos en clados recíprocamente monofiléticos que reflejan las especies morfológicas aceptadas. También muestra claras relaciones filogenéticas entre especies que concuerdan con los datos morfológicos y paleobiológicos: [*Nothofagus pumilio* [*N. antarctica* [*N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida*]]]. A pesar de la existencia de buenas especies morfológicas y filogenéticas, se han reportado evidencias de hibridación entre las especies perennifolias (*N. dombeyi*, *N. betuloides* y *N. nitida*) (Premoli, 1996), entre *N. pumilio* y *N. antarctica* (Quiroga *et al.*, 2005) y entre *N. antarctica* y *N. dombeyi* (Stecconi *et al.*, 2004). Las especies de este subgénero ocupan ambientes ecológicamente contrastantes pero sus rangos de distribución se superponen en sus extremos y existen numerosos sitios de simpatría, particularmente entre las siempre verdes y entre las caducas. Se ha propuesto un mecanismo de aislamiento temporal a través de la asincronía de las fenologías de parejas de especies simpátricas para explicar por qué las especies permanecen como entidades distintas. Las barreras reproductivas precigóticas (fenológicas) relajadas aíslan a las especies simpátricas permitiendo la hibridación ocasional bajo condiciones climáticas particulares (Juri & Premoli, 2021). En segundo lugar, el ADN del cloroplasto agrupa a los individuos según haplotipos delimitados geográficamente y compartidos por especies simpátricas (Figura 1.1). Las filogenias basadas en secuencias de tres regiones no codificantes de cloroplastos y calibradas usando registro fósil muestran que esta es una divergencia profunda y

ancestral de aproximadamente 32 MA de antigüedad (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). Este quiebre filogeográfico, concordante para especies distintas (Mathiasen & Premoli, 2010; Fasanella *et al.*, 2023), coincide espacial y temporalmente con un evento geológico de gran magnitud, una ingesión del Océano Pacífico localizada alrededor de los 42°S que actuó como una barrera duradera al flujo génico durante el Eoceno medio (Acosta *et al.*, 2014). Estas incongruencias entre las señales de ADN nuclear y cloroplástico son explicadas a través de un mecanismo de captura del cloroplasto sostenido por ciclos de introgresión (Acosta & Premoli, 2010).

Objetivos

Hasta donde sabemos, el subgénero *Nothofagus* no cuenta con genomas de cloroplasto o mitocondria publicados. Debido a la falta de datos genómicos completos, las filogenias mencionadas se basan en secuencias cortas que pueden mostrar sólo una señal parcial. Otras secuencias y genes no codificantes podrían apoyar o disolver las discrepancias señaladas entre las señales filogenéticas. Aquí presentamos el mitogenoma parcial (genes codificantes) y el ensamblaje y anotación del plastoma completo de seis especies de *Nothofagus*, cinco pertenecientes al subgénero *Nothofagus* (*N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. pumilio*) y una perteneciente al subgénero *Lophozonia* (*N. obliqua*).

Nuestros objetivos son: (1) describir la distribución geográfica de la variación haplotídica en la zona de contacto secundario entre linajes de ADN del cloroplasto; (2) describir, a partir de la comparación de genomas plastidiales completos, marcadores de ADNcp de secuencias codificantes y no codificantes que pueden ser útiles para investigar las discrepancias entre las señales filogenéticas nucleares y plastidiales con mayor profundidad; (3) explorar las diferentes contribuciones del ADN nuclear y organelar (plastidial y mitocondrial) para reconstruir la historia evolutiva de Fagales, centrándonos en el caso particular del subgénero *Nothofagus* y las definiciones de clado relacionadas con el origen geográfico.

Hipótesis y predicciones

H3.1: Los genomas nucleares están afectados por las barreras al flujo génico polínico mientras que los de herencia materna reflejarán la divergencia histórica por vicarianza.

Predicción 3.1: Las filogenias en base a genomas nucleares agruparán individuos pertenecientes a una misma especie morfológica en clados, independiente del origen geográfico de las muestras.

Predicción 3.2: Las filogenias en base a los genomas de herencia materna producirán clados controlados por la geografía que mezclan individuos de distintas especies morfológicas.

Predicción 3.3: La divergencia intraespecífica para los genomas del cloroplasto será concordante entre distintas especies y tan ancestral como la obtenida a nivel de géneros de distintas familias del orden Fagales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Especies de estudio

Trabajamos con cinco especies del subgénero *Nothofagus* (*N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. pumilio*) y una perteneciente al subgénero *Lophozonia* (*N. obliqua*). Enriquecimos nuestro conjunto de datos para los análisis filogenéticos con genomas de cloroplasto publicados en bases de datos (Tabla S3.1) de *Nothofagus moorei*, una especie australiana de *Nothofagus* subgénero *Lophozonia*, y de otras especies de Fagales.

Los árboles del género *Nothofagus* son especies diclinomonoicas, con ambos tipos de inflorescencias unisexuales creciendo en el mismo brote anual. Las flores pistiladas son estructuras axilares muy pequeñas y sésiles y las flores estaminadas son más grandes y colgantes. El género *Nothofagus* es polinizado por el viento y la morfología del polen es diagnóstica para cada subgénero. El subgénero *Nothofagus* comparte el mismo tipo polínico fusca-b y el subgénero *Lophozonia* comparte el tipo polínico menziesii (Fernández *et al.*, 2016). *Nothofagus obliqua* (subgénero *Lophozonia*) son árboles grandes que pueden alcanzar hasta 40 m de altura. Estos árboles caducifolios son típicos de los bosques templado-cálidos del norte de la Patagonia que

crecen desde elevaciones bajas a medias en ambas vertientes de los Andes de Chile y Argentina. En esta región, las especies del subgénero *Lophozonia* están restringidas geográficamente al norte de los bosques australes, mientras que la mayoría de las especies del subgénero *Nothofagus* están muy extendidas. El subgénero *Nothofagus* está formado por cinco especies que dominan los bosques templados del sur de Sudamérica, pero que tienen diferentes distribuciones geográficas y preferencias microambientales. Las tres especies perennifolias *Nothofagus dombeyi*, *N. nitida* y *N. betuloides*, con copas que pueden alcanzar de 30 a 40 m de altura y hasta 2 m de diámetro, ocupan bosques mésicos y ribereños de altitud baja a media. *N. dombeyi* es la especie perennifolia más abundante a ambos lados de la cordillera andina, mientras que *N. nitida* es más común en las laderas occidentales y *N. betuloides* se extiende hacia la distribución meridional de los bosques templados australes. Las otras dos especies del subgénero son caducifolias. *Nothofagus pumilio* es una especie muy extendida que domina los ambientes de gran altitud de los bosques templados. Se presenta en rodales casi puros en lugares más fríos y secos donde la mayor parte de las precipitaciones caen en forma de nieve (Veblen *et al.*, 1996). Domina los bosques montanos a lo largo de todo el sur de los Andes, desde la zona subalpina hasta el límite arbóreo superior. En elevaciones bajas, los árboles pueden alcanzar hasta 30 m de altura pero, en el límite arbóreo superior, crecen como pequeños arbustos. También domina los bosques más secos en el ecotono con la estepa patagónica (Donoso Zegers, 2006). *Nothofagus antarctica* se da en los ambientes más diversos. Estas plantas crecen como árboles bien formados de 10 a 15 m de altura en sitios de baja elevación; como árboles arbustivos (2 a 3 m de altura) en sitios rocosos, xéricos o expuestos, y como pequeños arbustos (<1 m de altura) en sitios de alta elevación y ciénagas (Veblen *et al.*, 1996).

Lugares de estudio y plan de muestreo

La Patagonia puede definirse como una región templada o templado-fría. El bosque patagónico se extiende a lo largo de 2500 km desde el centro de Chile y el sur de Argentina (35°S) hasta la isla de Tierra del Fuego (55°S). Los ambientes de bosque se caracterizan por gradientes ambientales abruptos, de temperatura (latitud) y

precipitación (longitud), en los que cualquier especie de amplia distribución encontraría condiciones altamente heterogéneas (Donoso, 1987). Además, los acervos genéticos de taxones antiguos como *Nothofagus* se vieron afectados por la compleja tectónica (Ramos, 1989) y el clima (Zachos *et al.*, 2008) pasados. Para capturar la variación geográfica de los cloroplastos, nuestro esquema de muestreo se centra en la región alrededor de los 42° de latitud sur, donde tuvieron lugar las intrusiones marinas del Pacífico. Se propone que estas transgresiones marinas son responsables de un evento de vicarianza que produjo una divergencia norte-sur significativa sobre los acervos genéticos de especies de amplia distribución a ambos lados de la barrera (Acosta *et al.*, 2012).

Para la obtención del genoma completo de cloroplasto y parcial de mitocondria colectamos tres individuos de *N. antarctica*, tres de *N. dombeyi* y tres de *N. pumilio* (dos de la región Norte y uno la Sur para cada especie), y un individuo de cada una de las otras dos especies, *N. nitida* y *N. betuloides*, restringidas geográficamente a la región sur. Además, se muestreó un individuo de *N. obliqua* en un jardín de la administración del Servicio de Parques Nacionales ubicado en la ciudad de Bariloche para ser utilizado como grupo externo en los estudios filogenéticos (Tabla 3.1).

Nuestro muestreo para el análisis de la distribución geográfica de los haplotipos de cloroplasto se extendió desde los 41.18°S (Lago Gutiérrez en el Parque Nacional Nahuel Huapi, Río Negro) hasta los 43°S (Lago Futalaufquen en el Parque Nacional Los Alerces, Chubut) e incluyó 190 individuos incluidos los individuos de *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* mencionados anteriormente (Tabla 3.2). Algunos de estos 190 individuos fueron seleccionados para obtención de marcadores SNP (polimorfismos de nucleótido simple) y pueden ser consultados en la tabla 4.1 del capítulo siguiente.

Colecta de material vegetal y extracción de ADN

Recolectamos hojas frescas de cada árbol durante las primaveras de 2016 a 2019 y las almacenamos en un *freezer* ubicado en el instituto de Investigaciones en Recursos Naturales, Agroecología y Desarrollo Rural (IRNAD-UNRN-CONICET) hasta su procesamiento. Todas las extracciones de ADN fueron realizadas en el Laboratorio Ecotono de la Universidad Nacional del Comahue en Bariloche. Para la obtención de

plastomas, mitogenomas y marcadores de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) extrajimos ADN total a partir de 100mg de hojas frescas o congeladas, siguiendo el protocolo propuesto para *N. dombeyi* (Fasanella *et al.*, 2020). Este protocolo de extracción de ADN de alta calidad se basa en el propuesto por Doyle y Doyle (Doyle, 1990) con algunas modificaciones: 1) ATMAB (Sigma M7635- 100g) en lugar de CTAB; 2) lavado con polyvinylpyrrolidone o PVP (Sigma P5288-500 g, para biología molecular), que permite remover compuestos fenólicos típicos de plantas, y Dithiothreitol DTT (Bio-Rad), un agente reductor que mantiene proteínas en su estado reducido; 3) incubación durante 30 minutos a 65°C, luego 30 minutos en hielo y finalmente reposo durante la noche a temperatura ambiente (22°C aproximadamente); 4) incubación durante 30 minutos a 37°C con 1 µl de RNasa (Machere and Nagel Laboratories) por extracto. La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Pasado este primer control, las muestras fueron seleccionadas en base a su concentración y pureza usando un fluorómetro Qubit (Invitrogen) en el laboratorio de genética forestal del INTA-EEA Bariloche. Para la determinación de los haplotipos de cloroplasto extrajimos ADN total a partir de 100mg de hojas frescas o congeladas, siguiendo el protocolo propuesto por Mathiasen & Premoli (2010). Este protocolo también se basa en el propuesto por Doyle y Doyle (1990) y comparte las modificaciones 1, 2 y 3 para plantas con alto contenido de polisacáridos. La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

PCR, obtención de secuencias y determinación del haplotipo del cloroplasto

Clasificamos los individuos en haplotipos del cloroplasto Norte y Sur utilizando el par de cebadores *trnH-psbA* (Hamilton, 1998) siguiendo a Acosta y colaboradoras (2014). Con este par de cebadores en particular, podemos distinguir entre tres haplotipos de cloroplasto geográficamente estructurados, dos septentrionales (Norte 1 y Norte 2) y uno meridional (Sur). Tratamos nuestras muestras con GeneReleaser® (BioVentures Inc., Murfreesboro, TN, EE.UU.) para facilitar la liberación del ADN antes de la reacción de PCR (2µL de extracto de ADN + 6µL de GeneReleaser. Condiciones de incubación:

15 minutos a 85°C). Preparamos la mezcla de PCR con 2 µl de extracto de ADN, 0.625U de GoTaq ADN polimerasa (Promega, Madison, WI, EE.UU.), 5 µl de *buffer* de reacción 5x Green GoTaq® (Promega), 0.25 mM de cada dNTP y 0.3 µM de cada cebador en un volumen total de 25µL. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Applied Bio-systems 2720 (Applied Biosystems, EE.UU.). Las condiciones de los ciclos fueron las siguientes: una desnaturalización inicial (95 °C y 4 minutos); 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C durante 1 minuto, temperaturas de anillamiento (*annealing* en inglés) a 56 °C durante 1 minuto, extensión a 72 °C durante 1.5 minutos; una extensión final a 72 °C durante 7 minutos y un mantenimiento final a 15 °C (Acosta & Premoli, 2010). Verificamos los productos de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa al 1% teñido con Sybr Safe (Invitrogen, EE.UU.) y revelado en un transiluminador UV. Limpiamos los productos de PCR con exonucleasa I (USB) y fosfatasa alcalina de camarón (USB). Enviamos las muestras a Macrogen Sequencing Facilities (Seúl, Corea) para su secuenciación.

Para determinar los haplotipos del cloroplasto (Tabla 3.2), alineamos manualmente las secuencias utilizando Mega 11 (Tamura et al., 2021) y las comparamos con las secuencias publicadas en GeneBank (números de accesión: GU125878-GU152885 and GQ863388-GQ863396) por Premoli et al. (2012). Analizamos un total de 190 muestras, 62 individuos de *N. antarctica*, 74 individuos de *N. dombeyi* y 54 individuos de *N. pumilio* y pudimos identificar 28 individuos con el haplotipo Norte 1 (16 *N. antarctica*, 11 *N. dombeyi* y 1 *N. pumilio*), 66 individuos con el haplotipo Norte 2 (13 *N. antarctica*, 24 *N. dombeyi* y 29 *N. pumilio*) y 96 individuos con el haplotipo Sur (33 *N. antarctica*, 39 *N. dombeyi* y 24 *N. pumilio*) (Tabla 3.2).

Obtención de marcadores SNP y filtrado de los datos

Para 121 de las 190 muestras obtuvimos también marcadores de polimorfismo de nucleótido simple (SNP) (ver capítulo 4. Tabla 4.1). Enviamos las extracciones de ADN de alta calidad a las instalaciones de secuenciación del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin (Wisconsin, EE.UU.) para la preparación de bibliotecas y la secuenciación de alto rendimiento. El protocolo GBS (Genotyping By Sequencing o genotipado por secuenciación) puede utilizarse para genotipar muchas muestras para

un gran número de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) a bajo costo. Utiliza enzimas de restricción para obtener bibliotecas de representación reducida. El uso de enzimas sensibles a la metilación (ApeKI en nuestro caso) ayuda a evitar las regiones repetitivas típicas de los genomas vegetales y aumenta las posibilidades de capturar regiones de copia única (Elshire *et al.*, 2011). La tabla suplementaria S3.3 muestra los valores de los estadísticos descriptivos de los resultados de la secuenciación usada para GBS.

Realizamos la búsqueda de SNP *de novo* utilizando el proceso UNEAK (Lu *et al.*, 2013) en la plataforma CYVERSE (Merchant *et al.*, 2016). Este proceso no requiere el uso de un genoma de referencia y ya ha sido probado en *N. dombeyi* (Hasbún *et al.*, 2016; Fasanella *et al.*, 2020). Para minimizar el descubrimiento de falsos SNP, fijamos la tasa de tolerancia al error en 0,01 y un mínimo de cinco 5 recuentos para cada etiqueta. Para más detalles sobre esta técnica revisar el capítulo 4.

Usamos el software *Tassel* (Bradbury *et al.*, 2007) para filtrar los SNPs e imputar los datos faltantes. Eliminamos los individuos con más del 95% de datos faltantes, seleccionamos marcadores presentes en el 90% de las muestras analizadas y finalmente imputamos los datos faltantes. En una segunda etapa de filtrado eliminamos marcadores que retuvieron datos faltantes luego de la imputación y marcadores monomórficos. La imputación de datos faltantes se realizó con la aplicación LinkImpute (Money *et al.*, 2015) dentro del software *Tassel*. Esta estrategia de imputación se basa en el método de k-vecinos más cercanos (*k-nearest neighbor* o KNN) y fue especialmente diseñado para trabajar con datos de genotipado por secuenciación en especies sin genoma de referencia.

Con el fin de obtener una base de datos de SNPs enriquecida en secuencias nucleares (i.e. limpiando secuencias de organelas), realizamos una anotación funcional putativa de todos los loci Blast2GO v6.0.3 (Conesa y Götz, 2008) limitando la base de datos a plantas terrestres (taxa: 3193, Embryophyta). En el software Blast2GO realizamos búsquedas BLASTX contra la base de datos de proteínas NCBI Non-Redundant (NR) con un valor E <0,001. Asignamos términos de ontología génica (GO) relacionados con procesos biológicos, función molecular y componente celular a los hits

obtenidos tras la búsqueda BLASTX. La lista de términos GO relacionados con procesos biológicos se enriqueció mediante búsquedas BLASTN contra la base de datos de la colección de nucleótidos del NCBI (nr/nt), y la herramienta de búsqueda de similitud de secuencias de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI, Madeira et al., 2019). Con toda esta información se descartaron aquellas secuencias relacionadas a estructuras o funciones de cloroplasto y mitocondria. Esta base de datos, si bien no está absenta de marcadores organelares, está fuertemente enriquecida en genes nucleares.

Secuenciación, ensamblado y anotado de los genomas de completos de cloroplasto y parciales de mitocondria.

Las secuencias del genoma completo se generaron en BGI genomics (www.bgi.com) utilizando Illumina HiSeq4000 (construcción de biblioteca y secuenciación). Se construyeron bibliotecas de inserciones cortas (150 pb) para la secuenciación Illumina HiSeq siguiendo el protocolo del fabricante (Illumina). El ADN de las distintas muestras se indexó por etiquetas y se agrupó en un carril del analizador de genomas Illumina para su secuenciación. Las lecturas en bruto se filtraron primero para conservar los datos de alta calidad (valor Q > 20) y se limpiaron para eliminar las secuencias adaptadoras.

Las secuencias de los cloroplastos y mitocondrias se ensamblaron utilizando el software NOVOPlasty (v3.7), en la plataforma Cyverse (Merchant *et al.*, 2016). Utilizamos el gen RuBP como secuencia de partida para cloroplasto y NAD1 como secuencia de partida para mitocondria y los demás parámetros se ajustaron a los valores predeterminados. Los resultados se ensamblaron localmente y se optimizaron utilizando relaciones por pares y superposición de lecturas. Anotamos los genomas de cloroplastos y mitocondria utilizando GeSeq (Tillich *et al.*, 2017) y CPGAVAS2 con los parámetros predeterminados (Shi *et al.*, 2019). Dibujamos un mapa físico de cloroplasto utilizando el programa OGDRAWv1.2 (Greiner *et al.*, 2019) y confeccionamos una lista de genes mitocondriales.

Uso de codones, repeticiones de secuencias simples (SSR) y comparación estructural de los genomas de cloroplasto

Analizamos la frecuencia de uso de codones y de aminoácidos de las doce muestras de Nothofagaceae utilizando MEGA11 (Tamura *et al.*, 2021). Graficamos la frecuencia de uso de cada aminoácido en los genomas de cloroplasto y evaluamos la significación estadística de las diferencias entre linajes y especies con modelo lineal generalizado y mixto (distribución beta y función de enlace logit) tomando especie y haplotipo de CP como variables de efectos fijos, el aminoácido como variable aleatoria. El modelado se realizó con *glmmTMB* (Brooks *et al.*, 2017) y la verificación de supuestos con el paquete *DHARMA* (Hartig, 2020) ambos en el entorno R. Calculamos el Uso Relativo de Codones Sinónimos (RSCU) para determinar si los genes del cloroplasto están bajo selección. El RSCU se define como la relación entre la frecuencia observada de codones sinónimos y la frecuencia esperada bajo el supuesto de que todos los codones sinónimos se utilizan por igual. Si el valor relativo de RSCU es igual a uno, el codón no es preferido (no sesgado). Si el valor de RSCU es mayor que uno indica que el codón se utiliza más a menudo de lo esperado, y es menos preferido si los valores son inferiores a uno (Sharp & Li, 1986). Utilizamos un modelo lineal simple con aminoácido, especie y linaje de cloroplasto como variables de efectos fijos para comprobar las diferencias en los valores de RSCU entre especies o linajes (R Core Team, 2022).

Buscamos repeticiones de secuencias simples (SSR) en los genomas del cloroplasto utilizando el software MISA (MicroSATellite) con los ajustes de diez unidades de repetición para mononucleótidos, cinco para dinucleótidos y trinucleótidos, y tres para repeticiones de tetranucleótidos, pentanucleótidos y hexanucleótidos (Beier *et al.*, 2017). Utilizamos el programa mVISTA en el modo Shuffle-LAGAN para comparar los genomas completos de los cloroplastos (Brudno *et al.*, 2003). Además, en el análisis de reordenamiento, utilizamos el programa MAUVE para alinear y construir genomas de cloroplasto (Darling *et al.*, 2004). Aquí también consideramos el genoma del cloroplasto de otro miembro del subgénero *Lophozonia*, *Nothofagus moorei* del que se informó previamente en Yang *et al.*, (2021).

Análisis filogenético

Realizamos análisis filogenéticos a partir de secuencias nucleares, plastidiales y mitocondriales. Descargamos de la base de datos del NCBI 41 genomas de CP que representaban a 23 géneros de Fagales (Tabla S3.1). Para los géneros con más de una especie con plastoma secuenciado publicado, elegimos dos al azar. También descargamos los genomas del cloroplasto de *Hamamelis mollis* (Hamamelidaceae, Saxifragales) y *Celtis australis* (Cannabaceae, Rosales) para utilizarlos como grupos externos. Realizamos un alineamiento múltiple de las cuarenta y tres secuencias completas del genoma del cloroplasto utilizando MAFFT v7.308 (Kato & Standley, 2013) con los parámetros por defecto. Preparamos otros cinco subconjuntos de secuencias organelares para trabajar con la familia Nothofagaceae por separado: el genoma cloroplasto completo, las regiones de cloroplasto IR, LSC y SSC, y se secuencias codificante de mitocondria. Estas últimas cinco bases de datos de cloroplasto y mitocondria fueron alineadas manualmente usando el programa Mega 11. Por último, y solo para *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio*, trabajamos con los marcadores SNP cuyo objetivo es representar al genoma nuclear. Seguimos el mismo protocolo para cada uno de los siete alineamientos mencionados (cinco para cloroplasto, uno para mitocondria y uno para SNPs).

La reconstrucción filogenética se basó en métodos de máxima verosimilitud (Felsenstein, 1981). El método de máxima verosimilitud busca maximizar la probabilidad de obtener cierto conjunto de datos (nuestro alineamientos), dada una hipótesis particular. En el caso de los estudios filogenéticos la hipótesis se compone de un árbol inicial y un modelo de evolución molecular. Para la construcción del árbol inicial empleamos el algoritmo *neighbor-joining* (NJ) (Saitou & Nei, 1987). Este método parte de una matriz de distancias genéticas calculadas en base a los datos y asumiendo un modelo de evolución molecular “K80” también conocido como Kimura 2 parámetros (Kimura, 1980) que distingue entre transiciones y transversiones pero asume que todas las bases tienen la misma frecuencia. El algoritmo NJ comienza uniendo los dos individuos que tengan la menor distancia. En el paso siguiente, este grupo inicial se considera como una unidad y se busca el siguiente individuo, nuevamente buscando minimizar la distancia entre ellos. El procedimiento continúa de esta manera hasta unir a todos los individuos al árbol. Este árbol de distancia junto con un modelo de evolución

molecular seleccionado en base a los datos conforman la hipótesis inicial para encontrar un nuevo árbol (topología más largo de ramas) que maximice la función de verosimilitud. La búsqueda del árbol más verosímil se realizó con el algoritmo heurístico de recorte y reubicación de ramas *ratchet* (Vos, 2003) y el soporte de ramas se obtuvo con 1000 réplicas bootstrap. Este método reduce significativamente el tiempo computacional del proceso y es recomendado para árboles con gran número de terminales como el que construimos. Utilizamos los paquetes de R *ggtree* y *ggplot2* para visualizar y refinar el árbol (Yu *et al.*, 2017; Wickham *et al.*, 2019; R Core Team, 2022; RStudio Team, 2022).

AMOVA

Realizamos un Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) para conocer la organización de la variación genética del cloroplasto dentro y entre los distintos niveles taxonómicos. El conjunto de datos de Fagales (OF) contiene todas las secuencias de Fagaceae, Betulaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Casuarinaceae y *Nothofagus moorei* descargadas de GeneBank, y las doce secuencias de Nothofagaceae obtenidas para este trabajo. El conjunto de datos de la familia Nothofagaceae (FN) contiene todos los genomas de *Nothofagus* secuenciados recientemente, incluidas las seis especies y sus linajes intraespecíficos en el caso del subgénero *Nothofagus*, y el genoma de *N. moorei* descargado de GeneBank (Tabla S3.1). Por último, el conjunto de datos del subgénero *Nothofagus* (SN) contiene sólo las nueve secuencias de las especies para las que contamos con diversidad de haplotipos, *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio*. Realizamos los análisis de varianza con los paquetes *poppr* (Kamvar *et al.*, 2014) y *adegenet* (Jombart & Ahmed, 2011); manipulamos los datos y calculamos los estadísticos de resumen utilizando *Tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019).

RESULTADOS

Haplotipos del cloroplasto y su distribución geográfica

Utilizando el par de cebadores *trnH-psbA*, identificamos dos haplotipos del linaje Norte (Norte 1 y Norte 2) y un haplotipo del linaje Sur en todas las muestras del subgénero

Nothofagus. No hemos estudiado la diversidad de haplotipos de cloroplasto dentro del subgénero *Lophozonia* (Tabla 3.1). Construimos los mapas de la figura 3.1 que muestra la distribución geográfica de la diversidad de haplotipos de los 190 individuos analizados con marcadores del cloroplasto. Usando este mapa pudimos delimitar la zona de contacto secundario entre linajes del Norte y del Sur para cada especie, precisar la posición de la barrera y su zona de influencia para cada especie. La tabla 3.3 muestra los individuos que marcan los límites latitudinales norte y sur de la zona de contacto secundario entre linajes de cloroplasto norte y sur. Elegimos como límite Norte para *N. antarctica* y *N. dombeyi* al individuo más septentrional de linaje sur; tomamos como límite Sur al individuo más austral del linaje Norte 1 o 2. En el caso de *N. pumilio* detectamos un único sitio (Laguna de la Yegua). Nuestro muestreo para esta especie fue menos exhaustivo y es posible que la zona de contacto secundario real para esta especie sea más extensa de modo que definimos los límites Norte y Sur por cercanía con este sitio. Definimos los límites de la barrera comunes a las tres especies entre los 41.86° y 42.65° grados de latitud Sur (entre CS0NAT01 perteneciente a *N. dombeyi* y NS0NEI06 un *N. antarctica*, marcados en gris en la tabla 3.3).

Caracterización de los genomas de cloroplasto y lista de genes mitocondriales

La tabla suplementaria S3.4 muestra información provista por BGI genomics sobre los datos crudos de la secuenciación usada para el ensamblado de los genomas de cloroplasto y obtención de genes mitocondriales. Los genomas de cloroplasto secuenciados *de novo* para las seis especies de *Nothofagus* son similares en tamaño y estructura (Tabla 3.4; Figuras 3.2 y S3.1). Todos ellos contienen las cuatro regiones principales: la LSC (copia única larga), la SSC (copia única corta) y un par de regiones de repetición invertida (IRA e IRB). La variación del largo de los genomas muestra patrones sutiles pero interesantes. El largo total del genoma y de la región LSC permite distinguir dos grupos de similitud, uno más diverso que incluye a los haplotipos Norte y otro casi homogéneo que engloba a los individuos Sur y a *N. obliqua*. Las regiones IR y SSC presentan tamaños similares dentro del subgénero *Nothofagus* y sólo *N. obliqua* del subgénero *Lophozonia* presenta ligeras diferencias de tamaño (Tabla 3.4; Figuras

3.2 y S3.1). La proporción global guanina-citosina (GC %) fue de 37,1% en los doce genomas de cloroplasto sin diferencias entre subgéneros, haplotipos de cloroplasto o especies. El número de genes también fue similar en las 6 especies analizadas, sin diferencias entre los haplotipos del cloroplasto. Detectamos un total de 108 genes únicos en los genomas plastidiales de *Nothofagus* que incluyen 4 genes ARN ribosomal (ARNr), 28 genes ARN de transferencia (ARNt), 4 marcos de lectura abierta (ORFs u Open Reading Frame) desconocidos y 72 genes que codifican para proteínas (PCGs) incluyendo el complejo ATP sintasa, los fotosistemas I y II, cadena de transporte de electrones, enzimas del ciclo de Calvin, proteínas ribosómicas, ARN polimerasas, proteínas de procesamiento de ARNm y proteínas de membrana y transporte. Encontramos 13 genes que contienen intrones, 11 de los cuales tienen un intrón (trnA-UGC, trnE-UUC, ndhB, rps19, rpl2, trnK-UUU, rps16, atpF, rpoC1, trnL-UAA, trnC-ACA, ndhA) mientras que sólo dos genes (ycf3 y clpP) contienen dos intrones. En total, 8 de estos 13 genes son PCGs y cinco son genes ARNt (Tabla 3.5).

En relación a los mitogenomas, la complejidad estructural de las mitocondrias vegetales y la falta de un genoma nuclear de referencia nos impidieron ensamblar y anotar genomas mitocondriales, pero pudimos obtener una serie de contigs (unidad de ensamblado compuesta por secuencias con extremos coincidentes) de los que extrajimos una lista de genes comunes a las 12 muestras. Identificamos 14 genes de ARNt, 3 genes de ARNr y 30 PCGs incluidos 22 genes relacionados con la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, 6 genes vinculados a la autorreplicación y 2 genes vinculados con el procesamiento de ARN mensajero y con el tránsito de proteínas a la mitocondria (Tabla 3.6)

Detectamos un rango de entre 52003 y 52101 codones en los genomas de cloroplasto de las cinco especies del subgénero *Nothofagus* y 52016 codones para *N. obliqua* del subgénero *Lophozonia*. Los genomas de las cinco especies del haplotipo Sur tienen la misma cantidad de codones. *N. antarctica* y *N. dombeyi*, idénticas en el número de codones dentro de cada haplotipo CP, tienen su número mínimo de codones en el haplotipo Sur y máximo en el haplotipo Norte 2. Los haplotipos del linaje Norte de *N. pumilio* se diferencian de las otras especies, pero son idénticos entre sí (Tabla 3.4). La leucina fue el aminoácido más frecuente en los doce genomas del cloroplasto

(utilizada en un rango de 9,92-10,49% en las seis especies y tres haplotipos), seguida de la serina (utilizada en un rango de 8,8-9,3%) y la isoleucina (utilizada en un rango de 8,4-8,9%). El triptófano fue el aminoácido menos utilizado, con sólo un 1,3-1,4% de uso entre todas las especies, seguido de la metionina (~1,7%) y la cisteína (2,0-2,2%) (Figura 3.3). No encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las frecuencias de uso de AA de los distintos linajes y especies. Pese a esto *N. antarctica* y *N. dombeyi* muestran un patrón de diferencias entre haplotipos similares entre sí y distinto al de *N. pumilio*. Casi todos los codones de aminoácidos en los genomas del cloroplasto de *Nothofagus* tienen un uso preferente (es decir, RSCU es diferente de 1) (Figura 3.4, Tabla S3.2). Algunos codones muestran uso preferencial en al menos una especie o haplotipo: arginina-AGG en *N. antarctica* haplotipo Norte 1, arginina-GCA en *N. pumilio* y *N. dombeyi* Norte 2, glicina-GGG *N. antarctica* y *N. pumilio* Norte 1). Arginina-AGA tiene los valores más altos de RSCU en todas las especies y haplotipos (1,85-2,02). Los resultados, además, mostraron que la mayoría de los codones sinónimos preferidos (RSCU > 1) tienen una A o U en la tercera posición del codón, y la mayoría de los no preferidos tienen una C o G en la tercera posición (Figura 3.4, Tabla S3.2).

Detectamos un número variable de SSR en distintas especies y haplotipos del cloroplasto (Tabla 3.7). Encontramos un total de 81 SSR en el haplotipo Sur de las cinco especies del subgénero *Nothofagus* sin diferencias entre especies en la cantidad de repeticiones de los distintos motivos. Para el linaje Norte las diferencias entre especies son menores que las diferencias entre haplotipos. Dentro de cada haplotipo norte *N. antarctica* y *N. dombeyi* tienen igual distribución de repeticiones con un total de 83 SSR en el haplotipo Norte 1 y 85 en el haplotipo Norte 2. La especie *N. pumilio* se diferencia de las demás en la cantidad de repeticiones del mononucleótido A/T en ambos haplotipos norte y en la cantidad de repeticiones de C/G y AAAT/ATTT en el haplotipo Norte 2. Por último, *N. obliqua* tiene un total de 85 repeticiones SSR dentro de las cuales están los motivos AAT/ATT, AAAAT/ATTTT, AAAC/AGTTT, AATAG/ATTCT y AATTC/AATTG que están ausentes dentro del subgénero *Nothofagus*. También los motivos AAT/ATT, AAAAT/ATTTT, AAAC/AGTTT y AATCCT/AGGATT presentes en *Nothofagus* y ausentes en *Lophozonia* permiten distinguir entre subgéneros. Los

motivos compartidos entre subgéneros acercan a *N. obliqua* a los miembros del haplotipo Sur del subgénero *Nothofagus*. Los SSR mononucleótidos son los más variables en todas las especies, seguidos de los dinucleótidos y los tetranucleótidos. En todas las especies estudiadas, las repeticiones mononucleotídicas A/T fueron el tipo más abundante en todos los genomas de CP (Tabla 3.7).

El estudio comparativo basado en el alineamiento de MAUVE (Figuras 3.5 y 3.6) muestra la conservación del orden de los genes dentro y entre subgéneros. Los resultados revelaron que los genomas de las especies están muy conservados (Figura 3.5) dentro de del subgénero *Nothofagus*. En la comparación con los miembros del subgénero *Lophozonia*, *N. obliqua* y *N. moorei*, la variación entre subgéneros es máxima. Dentro de este subgénero la variación entre especies es mucho mayor, pero es importante recordar que estas pertenecen a regiones geográficas muy distantes, *N. obliqua* norte de la Patagonia y *N. moorei* del este de Australia. Las regiones CNS (secuencias no codificantes conservadas) están en general menos conservadas que las regiones codificantes. Algunas de las regiones CNS altamente divergentes se concentran en las regiones entre 10 y 18 k, 26 - 38 k, 54 - 62 k, 70 - 76 k, 84 - 112 k y 136 - 154 k. Asimismo, las regiones codificantes menos conservadas fueron *matK*, *rpoC2*, *ndhK*, *accD* y *rps3*, entre otras (Figura 3.5). Al comparar los diferentes linajes dentro de una especie (Figura 3.6) también encontramos un alto nivel de conservación; con las regiones del CNS menos conservadas en las regiones entre 30 - 34 k, 54 - 62 k, 70 - 72 k, 102 - 104 k y 152 - 154k. Asimismo, las regiones codificantes menos conservadas entre los tres haplotipos fueron *ycf2*, *matK*, *psbA*, *rpoC2*, *rpoB*, *psbT*, *psbI*, *rpl22* e *ycf1*, entre otras (Figura 3.6).

Análisis filogenético

El análisis filogenético basado en el genoma completo de los miembros del orden Fagales muestra la posición basal de Nothofagaceae dentro Fagales con altos valores de soporte bootstrap (100%) (Figura 3.7). Las especies del subgénero *Nothofagus* se agrupan en un clado monofilético y hermano al grupo de las especies del subgénero *Lophozonia*, *N. obliqua* y *N. moorei*. El subgénero *Nothofagus* se organiza en dos clados recíprocamente monofiléticos, cada uno formado por individuos de diferentes

especies, pero del mismo linaje de haplotipos de cloroplastos, ya sea Norte o Sur (Figura 3.8). Cada subclado muestra distintas topologías para la taxonomía de especies. Dentro del linaje Norte, los individuos forman otros dos clados monofiléticos consistentes en los haplotipos Norte 1 y Norte 2. La topología del clado Sur propone a las especies siempre verdes (*N. betuloides*, *N. nitida* y *N. dombeyi*) como un clado monofilético, hermano a *N. pumilio* con *N. antarctica* como especie basal. El clado Norte 1, por el contrario, propone a *N. antarctica* y a *N. dombeyi* como especies más cercanas y *N. pumilio* como especie basal; el clado Norte 2 muestra una politomía que no permite establecer relaciones filogenéticas entre especies (Figura 3.8 A).

Las filogenias basadas en las regiones IR, LSC y SSC resuelven los linajes Norte y Sur pero por si solas no son capaces de reconstruir las relaciones mencionadas de forma clara (Figura 3.8 B-D). La región IR (Figura 3.8 A) separa los clados septentrional y meridional, pero muestra politomías en su interior que no aportan información sobre las relaciones evolutivas entre especies. La región LSC (Figura 3.8 C) es la región más informativa para el clado sur ya que muestra la misma topología y soporte de rama que se obtuvieron con todo el conjunto de datos de cloroplastos. En base a esta región los grupos Norte 1 y Norte 2 parecen ser parafiléticos ya que el haplotipo Norte 2 de *N. pumilio* aparece como basal a las otras muestras del haplotipo Norte 1. La región SSC (Figura 3.8 D) separa los clados Norte 1 de Norte 2. En base a esta región se ve que *N. pumilio* es la especie basal en el clado Norte 2 pero no permite resolver las relaciones entre especies dentro de los clados Norte 1 o Sur.

Las filogenias basadas en genes codificantes para proteínas de cloroplasto y de mitocondria (Figura 3.9, derecha) muestran topologías compatibles y similares a lo visto anteriormente. La filogenia mitocondrial muestra al subgénero *Nothofagus* como un grupo monofilético y hermano a *N. obliqua*. El clado Sur se diferencia del linaje Norte con un buen soporte (96%) pero las relaciones dentro cada clado no están bien respaldadas (< 50%). La filogenia plastidial separa con muy buen soporte (>95%) los tres haplotipos de cloroplasto. Ambas filogenias muestran a *N. pumilio* como especie basal del linaje Norte pero se diferencian en la especie basal del clado Sur: *N. pumilio* para los genes mitocondriales y *N. antarctica* para los genes plastidiales. La filogenia basada en marcadores SNP está enriquecida en marcadores del genoma nuclear

(Figura 3.9, izquierda). Esta filogenia se construyó con representantes de los tres haplotipos de *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* y separa a las tres especies con excelente soporte (100%). Las relaciones entre especies coinciden con las propuestas por las filogenias de caracteres moleculares o morfológicas mencionadas en la introducción: *N. pumilio* aparece como un grupo monofilético y hermano al clado que propone a *N. antarctica* y *N. dombeyi* como especies más cercanamente emparentadas. Dentro de cada especie el soporte de rama es muy bajo y no nos fue posible reconocer grupos relacionados con haplotipos de cloroplasto, elevación o ubicación geográfica de los sitios de colecta.

Análisis Molecular de la Varianza

El análisis de la varianza muestra diferencias significativas en todos los niveles jerárquicos analizados (Tabla 3.8). El 70,9% de la variación encontrada dentro del orden Fagales puede explicarse como diferencias entre familias, el 20,2% corresponde a variación entre géneros dentro de cada familia, y sólo el 8,9% de los polimorfismos del cloroplasto corresponden a divergencia dentro de géneros. Dentro de Nothofagaceae, el 91% de la variación total puede explicarse por el componente entre subgéneros. Dentro del subgénero *Nothofagus* la agrupación de individuos por especies no resultó informativa, mientras que la agrupación por linaje de cloroplasto explica el 99,1% de la variación total. Los valores jerárquicos de phi (Tabla 3.9), una medida de diferenciación entre genomas de cloroplasto a distintos niveles taxonómicos, arrojan una divergencia del 91,1% entre géneros dentro de Fagales, así como una divergencia del 70% y el 69% entre familias y géneros dentro de familias, respectivamente. Los subgéneros dentro del género *Nothofagus* mostraron una divergencia del 91% mientras que, dentro del subgénero *Nothofagus*, encontramos un 0% de divergencia entre especies y un 99,1% de divergencia entre linajes de cloroplasto aún mayor a la encontrada entre familias o géneros de Fagales.

DISCUSIÓN

Todas las especies de *Nothofagus* dentro del subgénero *Nothofagus* son similares en términos de tamaño, reordenamientos y número de genes, lo que aboga por la naturaleza conservada de los genomas de cloroplasto. Aunque la estructura y secuencia de los plastomas de nuestros subgéneros están relativamente conservadas, en otras especies se han encontrado variaciones en la estructura, tamaño y tasas evolutivas de los genes (Chang *et al.*, 2021). La reconstrucción filogenética y el análisis AMOVA muestran que la mayor parte de la variación dentro de Nothofagaceae se produce entre subgéneros. Dentro del subgénero *Nothofagus* la máxima variación ocurre entre linajes del cloroplasto geográficamente estructurados y no entre especies. Nuestros resultados basados en las 156000 pb de todo el plastoma concuerdan con trabajos publicados que utilizan secuencias de tres regiones no codificantes del cloroplasto de un total de 1700 pb de longitud (Acosta & Premoli, 2010; Premoli *et al.*, 2012), en comparación con los aquí informado. Curiosamente, las filogenias nucleares basadas en ITS (Acosta & Premoli, 2010) y basadas en marcadores SNP nucleares agrupan a los individuos en clados recíprocamente monofiléticos que corresponden a las especies del subgénero *Nothofagus*. Las pruebas filogenéticas contradictorias plantean dudas sobre la monofilia de las especies de *Nothofagus*. ¿Son parafiléticas las especies de *Nothofagus*?

Las especies de *Nothofagus* se polinizan por el viento y pueden mantener el flujo genético a lo largo de grandes distancias. Los estudios sobre la estructura genética fina de *N. pumilio* (Mathiasen & Premoli, 2016) y la fenología de la floración de las especies de *Nothofagus* (Juri & Premoli, 2021) muestran que las diferencias de altitud y otras variables microambientales restringen el flujo genético a distancias espaciales cortas más que la variación latitudinal, manteniendo la coherencia de las especies a nivel del ADN nuclear. *Nothofagus dombeyi*, de hoja perenne, ocupa bosques mesófilos y ribereños de baja elevación (300-700 msnm) (Donoso Zegers, 2006). Experimentos de sequía inducida y trasplantes recíprocos en esta especie muestran una respuesta ecofisiológica, morfológica y arquitectural asociada a la humedad y régimen de precipitaciones de los sitios de origen de las semillas (Diaz *et al.*, 2022). La variación

intraespecífica de rasgos de *N. pumilio* a lo largo de la elevación (Premoli, 2003; Premoli & Brewer, 2007), incluyendo la fenología (Rusch, 1993) y los extremos de precipitación (Ignazi *et al.*, 2019), ha sido estudiada en profundidad y ha dado lugar a una combinación de respuestas adaptativas y plásticas, principalmente en relación con la temperatura y la precipitación, respectivamente. *Nothofagus pumilio*, caducifolia, domina los bosques de altura, más fríos y secos, donde la mayor parte de las precipitaciones caen en forma de nieve. También domina los bosques más secos en el ecotono con la estepa patagónica (Donoso Zegers, 2006). La variación intraespecífica de rasgos de *N. pumilio* a lo largo de la elevación (Premoli, 2003; Premoli & Brewer, 2007), incluyendo la fenología (Rusch, 1993) y los extremos de precipitación (Ignazi *et al.*, 2019) muestra una combinación de respuestas adaptativas y plásticas relacionadas con la temperatura y las precipitaciones respectivamente. *Nothofagus antarctica* también es caducifolia y aparece con hábito arbóreo o arbustivo en la más diversa gama de ambientes donde pueden alcanzar morfologías distintas que caracterizan a cada ecotipo (Ramírez *et al.*, 1985). Se ha sugerido que la plasticidad fenotípica y los efectos genotípicos son la base de esta variación (Steinke *et al.*, 2008).

Diferentes compartimentos genómicos como el ADN nuclear, mitocondrial y plastidial llevan las señales de sus diferentes modos de herencia y dispersión; por lo tanto, relatan diferentes partes de la historia evolutiva de un taxón. El ADN nuclear se transmite de forma biparental y puede mostrar un intenso flujo genético entre poblaciones, dependiendo del síndrome de polinización y su efecto en la dispersión del polen. Por otro lado, el ADN organelar de las angiospermas se hereda generalmente por vía materna y su distribución geográfica está limitada por la dispersión de semillas, la cual es espacialmente restringida en las especies de *Nothofagus*. A modo de ejemplo, la dispersión de semillas de *N. pumilio* rara vez supera los 110 m desde el árbol madre (Rusch, 1987; Cuevas, 2000). Por lo tanto, los genomas de cloroplasto no representan especies sino linajes geográficos (Acosta & Premoli, 2010) cuya divergencia latitudinal se interpretó en concierto con la hipótesis biogeográfica que propone un evento vicariante ocasionado por una transgresión marina (Premoli *et al.*, 2012).

Similares resultados han sido reportados para otras especies leñosas dentro y fuera de Fagales. La distribución geográfica de los polimorfismos del cloroplasto de los robles blancos europeos (*Quercus*, Fagales) permite la identificación de refugios glaciarios y posteriores rutas de colonización. La distribución de haplotipos sugiere que la asociación temprana entre haplotipos de cloroplasto y especies se pudo haber desdibujado gracias a introgresiones extensivas entre ellas (Petit *et al.*, 2002). En el género *Eucalyptus* (*Myrtaceae*), el uso de marcadores microsatélite del cloroplasto permite la separación de especies con distintas tolerancias ecológicas en dos clados que agrupan individuos según su región de origen sugiriendo una respuesta similar al cambio climático y la persistencia en múltiples refugios con menor expansión poblacional que la propuesta para el hemisferio norte (Nevill *et al.*, 2014). En *Corymbia*, antiguamente considerado un subgénero de *Eucalyptus*, las incongruencias entre filogenias nucleares (ITS), que agrupan individuos según su especie morfológica, y plastidiales, que agrupan individuos según su origen geográfico, también es explicada mediante eventos de hibridación/introgresión (Healey *et al.*, 2018). Es posible encontrar reportes de incongruencias filogenéticas entre las señales nucleares (que reconstruyen especies) y plastidiales (que describen historia biogeográfica) concordantes a nivel de género dentro de varias familias de plantas. En Saxifragaceae la incongruencia dentro del grupo *Heuchera* se explica por eventos de introgresión intra e incluso intergenérica que resultaron en polimorfismos plastidiales compartidos entre especies (Soltis & Kuzoff, 1995). Conclusiones similares se han sacado sobre las incongruencias entre las señales nucleares y organelares para el género *Chrysanthemoides* (*Calendulae*, *Asteraceae*) (Barker *et al.*, 2009), para las especies americanas del género *Osmorhiza* (*Apiaceae*) (Yoo *et al.*, 2002) y para el género *Pedicularis* (*Orobanchaceae*) (Yu *et al.*, 2013) entre otros ejemplos. También se documentaron genomas de cloroplasto geográficamente estructurados para especies dentro de *Quercoideae*, caso en el que los autores explican las secuencias compartidas de cloroplastos en términos de ciclos, a nivel local, de hibridación/introgresión transitorias que resultaron en la captura de cloroplastos entre especies (Yang *et al.*, 2021). Esto también se ha propuesto para explicar la existencia de haplotipos compartidos entre especies del subgénero *Nothofagus* (Acosta & Premoli, 2010).

Los genomas organelares de las angiospermas, especialmente cuando las tasas de dispersión por semillas son bajas y las especies en cuestión son interfértiles, son más adecuados para el estudio de eventos de introgresión pasados y para la reconstrucción de la historia biogeográfica de los géneros o taxa superiores que para la delimitación filogenética de las especies y sus relaciones infragenéricas. Las especies de *Nothofagus* pueden hibridar en la actualidad y lo hicieron ampliamente a lo largo de su historia evolutiva, lo que ha asegurado su persistencia y recuperación post-disturbio durante largos periodos hasta el presente. De ahí que los genomas de cloroplasto puedan ser extremadamente útiles para desentrañar hipótesis geográficas y basadas en procesos espacialmente explícitos a nivel intraespecífico, como los ciclos de hibridación-introgresión potencial entre taxones que coexisten en simpatría, así como la divergencia de linajes debida a sucesos pasados como la vicarianza.

En el subgénero *Nothofagus*, un análisis reciente (Fasanella *et al.*, 2023) demostró que la estructura geográfica norte y sur medida por los linajes de cloroplastos concuerda geográficamente con los marcadores SNPs adaptativos asociados con los distintos ambientes habitados por *N. dombeyi*. La conservación a largo plazo de la barrera filogeográfica en las latitudes medias de la Patagonia, evidenciada por las filogeografía del cloroplasto, fue mantenida por fuerzas selectivas divergentes. Por lo tanto, la información de los genomas de cloroplasto no sólo puede utilizarse en reconstrucciones filogenéticas, sino también en estudios relativos a la adaptación al medio ambiente (Chumley *et al.*, 2006; Hu *et al.*, 2017; Piot *et al.*, 2018; Gao *et al.*, 2019; Shrestha *et al.*, 2019; Zang *et al.*, 2019; Gruzdev *et al.*, 2019). Esto es coherente con los valores de RSCU que muestran si un codón en particular se está utilizando más de lo esperado solo por azar. Casi todos los valores fueron diferentes de uno, lo que puede interpretarse como un sesgo selectivo en el uso de codones asociado a la selección natural, en este caso, asociada a los linajes de cloroplastos.

No obstante, los genomas de cloroplasto pueden resolver relaciones filogenéticas a altos niveles taxonómicos, como se informa para Fagales en la literatura (Yang *et al.*, 2021) y en nuestro trabajo. Dentro de Nothofagaceae, las especies del subgénero *Nothofagus* difieren de *N. obliqua* y *N. moorei* del subgénero *Lophozonia*. *Nothofagus obliqua* es endémica del norte de la Patagonia y comparte partes de su

área de distribución con algunas especies del subgénero *Nothofagus*. Sin embargo, forma un clado monofilético con *N. moorei*, endémica de Australia, y no con sus parientes vecinos pero evolutivamente distantes de otro subgénero. Nuestros resultados coinciden con análisis filogenéticos previos que muestran que las especies se agrupan por subgénero en clados monofiléticos distintos (Sauquet *et al.*, 2012; Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014) y con las incompatibilidades reproductivas reportadas entre subgéneros que pueden estar asociadas a diferencias en su tipo de polen. Los subgéneros *Nothofagus* y *Lophozonia* difieren en regiones no codificantes, por lo que un número y tipo variable de microsatélites (SSR) de cloroplasto pueden utilizarse para delimitar subgéneros dentro de Nothofagaceae. De forma similar, los linajes intraespecíficos y geográficamente estructurados muestran alguna variación en los SSR de cloroplasto permitiendo separar el linaje Sur del linaje Norte con el número de repeticiones AT/AT o AAAT/ATTT. Sin embargo, dentro de cada linaje estructurado geográficamente, las distintas especies son indistinguibles con la excepción de *N. pumilio*, que mostró una ligera variación en el número de repeticiones de algunos SSR para el linaje Norte.

Nuestros resultados basados en genomas completos de cloroplasto muestran una posición basal de Nothofagaceae en Fagales, tal y como apoya un reciente análisis filogenético de plástidos (Yang *et al.*, 2021). Además la evidencia presentada muestra que la divergencia entre subgéneros y distintos linajes intraespecíficos delimitados geográficamente se produjo tempranamente en la historia evolutiva de *Nothofagus* y en sincronía con la diversificación a niveles taxonómicos superiores, como géneros dentro de Fagales. A principios del Campaniano, el polen de *Nothofagus* ya estaba presente, por lo que se considera uno de los géneros de angiospermas existentes más antiguos del registro fósil (Weston & Hill, 2013). Además, a principios del Maastrichtense, los cuatro subgéneros modernos de *Nothofagus*, que a su vez corresponden a los cuatro tipos de polen (Hill & Read, 1991) ya se habían diversificado en la Antártida occidental y poco después en Sudamérica (Fernández *et al.*, 2016). Por lo tanto, los resultados de nuestro genoma de cloroplasto son consistentes con la evolución temprana en subgéneros distintos y la estasis morfológica de los tipos polínicos de *Nothofagus* desde su aparición en los registros.

El análisis filogenético del subgénero *Nothofagus* (en particular del clado Sur para el que disponemos de secuencias de las cinco especies) muestra topologías diferentes en función de la región del genoma del cloroplasto utilizada para la reconstrucción. Análisis anteriores basados en secuencias cortas sugieren que el ADN del cloroplasto no es indicativo de las relaciones filogenéticas entre las especies de *Nothofagus*. Sin embargo, las regiones completas y LSC (Figura 3.8 A y C) muestran a los taxones perennifolios (*N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. betuloides*) como hermanos de los caducifolios (*N. antarctica* y *N. pumilio*) de forma similar a nuestra filogenia de marcadores SNPs y a lo reportado usando secuencias ITS que incluyeron un muestreo exhaustivo de especies y poblaciones (Acosta & Premoli, 2010; Premoli *et al.*, 2012). Por lo tanto, nuestro análisis y los anteriores apuntan al carácter caducifolio como primitivo dentro del subgénero *Nothofagus*, tal como se sugirió previamente para todo el género (Hill & Read, 1991). Las especies basales difieren cuando se consideran distintos linajes intraespecíficos, regiones de cloroplastos y genes mitocondriales. Dentro del linaje meridional, *N. antarctica* aparece como el taxón basal tanto en el genoma completo como en la reconstrucción basada en la región LSC (Figura 3.8) y genes codificantes del cloroplasto (Figura 3.9). En cambio, *N. pumilio* es la especie basal para ambos linajes geográficos en las filogenias mitocondriales. Esta especie también es basal en el clado Norte 1 para la reconstrucción filogenética de genoma completo y en el clado Norte 2 para el análisis basado en la región LSC (Figura 3.8). La posición basal de *N. pumilio* dentro de los linajes Norte coincide con la evidencia de las secuencias ITS (Acosta & Premoli, 2010; Premoli *et al.*, 2012) y con nuestra reconstrucción basada en marcadores SNPs. Además, su carácter distintivo en términos de SSR del genoma de cloroplasto concuerda con la clasificación infragenérica propuesta por Hill y Read (Hill & Read, 1991) en la que *N. pumilio* fue la única especie que se colocó en una sección distinta dentro del subgénero *Nothofagus* basándose en características morfológicas distintivas. Por otro lado, la posición basal de *N. antarctica* dentro del linaje Sur es consistente con la hipótesis propuesta por Acosta y colaboradores (2010, 2014) que postulan a esta especie como donante de citoplasma para los fenómenos de captura de cloroplastos. Proponemos, como posible explicación a las discrepancias entre clados de cloroplasto y mitocondria, que la

especie donantes de citoplasma pueden cambiar entre regiones geográficas. La adición de genomas completos de cloroplasto de *N. nitida* y *N. betuloides* de linajes intraespecíficos septentrionales, ausentes en el análisis actual, puede ayudar a desentrañar la validez de los genomas completos de cloroplasto para resolver las relaciones filogenéticas entre especies dentro de cada linaje geográficamente estructurado.

La secuencia completa del cloroplasto de seis especies de *Nothofagus* y sus linajes intraespecíficos se obtuvo con la tecnología de secuenciación Illumina. Estos son los primeros genomas de cloroplasto secuenciados entre los miembros sudamericanos de la familia Nothofagaceae. Los seis genomas de cloroplasto tienen tamaños, estructuras y organización muy similares, sin embargo, evidencian una estructura geográfica significativa dentro del subgénero *Nothofagus* y son claramente distintos del subgénero *Lophozonia*. Esperamos que nuestras contribuciones puedan enriquecer nuestro conocimiento de la evolución de Nothofagaceae y nuestra comprensión de mecanismos transversales como la captura del cloroplasto y sus implicaciones para los análisis filogenéticos y filogenómicos. Para taxones basales como *Nothofagus*, nuestros resultados destacan la necesidad de un esquema de muestreo geográficamente exhaustivo (Soltis *et al.*, 2004) para desmenuzar las señales filogenéticas debidas a la ascendencia común y las señales asociadas a historias y procesos biogeográficos compartidos. Las discordancias entre genomas nucleares y organelares no pueden explicarse únicamente mediante la segregación incompleta de linajes. La evolución reticulada (hibridación/introgresión, captura de cloroplastos) debe ser tomada en cuenta mediante un diseño de muestreo que contemple la distribución geográfica de las especies estudiadas (Rose *et al.*, 2021). Asimismo, la formación de grupos monofiléticos en base a genomas de cloroplasto que muestran a las especies como grupos parafiléticos sugiere que el uso exclusivo de los genomas organelares de las plantas para describir especies no es adecuado.

TABLAS

Tabla 3. 1: Esquema de muestreo para secuenciación de genoma de cloroplasto completo y mitocondria parcial.

Coordenadas geográficas de cada población y especie de *Nothofagus* muestreada, determinación del linaje intraespecífico del cloroplasto y posición taxonómica. CP: cloroplasto.

Especie	Código	Subgénero	Haplotipo CP	Linaje CP	Latitud	Longitud
<i>N. antarctica</i>	Na	<i>Nothofagus</i>	Norte 2	Norte	-41.98	-71.48
<i>N. antarctica</i>	Na	<i>Nothofagus</i>	Norte 1	Norte	-42.21	-71.73
<i>N. antarctica</i>	Na	<i>Nothofagus</i>	Sur	Sur	-43	-71.52
<i>N. betuloides</i>	Nb	<i>Nothofagus</i>	Sur	Sur	-43.22	-71.95
<i>N. dombeyi</i>	Nd	<i>Nothofagus</i>	Norte 2	Norte	-41.94	-71.56
<i>N. dombeyi</i>	Nd	<i>Nothofagus</i>	Norte 1	Norte	-42.1	-71.72
<i>N. dombeyi</i>	Nd	<i>Nothofagus</i>	Sur	Sur	-42.11	-71.72
<i>N. nitida</i>	Nn	<i>Nothofagus</i>	Sur	Sur	-43.01	-72.5
<i>N. pumilio</i>	Np	<i>Nothofagus</i>	Norte 2	Norte	-41.88	-71.58
<i>N. pumilio</i>	Np	<i>Nothofagus</i>	Norte 1	Norte	-42.03	-71.67
<i>N. pumilio</i>	Np	<i>Nothofagus</i>	Sur	Sur	-42.21	-71.73
<i>N. obliqua</i>	No	<i>Lophozonia</i>	-	-	-41.14	-71.31

Tabla 3. 2: Detalle de los individuos analizados mediante secuencias *trnH-psbA* de cloroplasto.

HAP CP: haplotipo del cloroplasto. Las filas marcadas con gris muestran los individuos usados para la secuenciación de genoma plastidial completo y para el análisis de genes mitocondriales.

Individuo	Especie	Hap CP	Longitud	Latitud	Sitio	Región
NN2PMO15	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,57	-41,79	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
NN2PMO14	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,57	-41,79	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
NN2NAT05	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
NN2NAT04	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
NN2NAT03	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
NN2NAT02	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
NN2NAT01	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
NN2PIL07	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,48	-41,98	Cerro Piltriquitron	El Bolsón
NN2PIL05	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,48	-41,98	Cerro Piltriquitron	El Bolsón
NN2CEN03	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,24	-42,07	Cañadon del Ensueño	Maiten
NN2CEN08	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,24	-42,07	Cañadon del Ensueño	Maiten
NN2COI01	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,31	-42,16	Cerro Coihue	Maiten
NN2COI08	<i>N. antarctica</i>	Norte 2	-71,31	-42,16	Cerro Coihue	Maiten
NN1YEG10	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,72	-42,21	Laguna de la Yegua	PNLP
NN1YEG09	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,73	-42,21	Laguna de la Yegua	PNLP
NS0SIL06	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,22	Arroyo Silva	PNLP
NS0SIL07	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,22	Arroyo Silva	PNLP
NS0TUC01	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,67	-42,22	Río Turbio	PNLP
NN1TUF04	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,68	-42,24	Río Turbio	PNLP
NS0CHO04	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
NS0CHO03	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
NS0CHO02	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
NS0CHO01	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
NS0CHO05	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila

NN1LEZ08	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,51	-42,46	Laguna Lezana	Cholila
NN1LEZ14	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,51	-42,46	Laguna Lezana	Cholila
NN1LEZ16	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,51	-42,46	Laguna Lezana	Cholila
NN1LEZ21	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,51	-42,46	Laguna Lezana	Cholila
NN1CHO01	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,59	-42,46	Lago Cholila	Cholila
NN1CHO02	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,59	-42,46	Lago Cholila	Cholila
NN1CHO03	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,59	-42,47	Lago Cholila	Cholila
NN1CHO04	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,59	-42,47	Lago Cholila	Cholila
NN1LEZ29	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,51	-42,47	Laguna Lezana	Cholila
NN1CHO05	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,59	-42,47	Lago Cholila	Cholila
NS0MOM26	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,60	-42,58	Cerro La Momia	La Bolsa
NS0MOM22	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,60	-42,58	Cerro La Momia	La Bolsa
NS0MOM17	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,60	-42,58	Cerro La Momia	La Bolsa
NS0MOM06	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,60	-42,58	Cerro La Momia	La Bolsa
NS0MLE05	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
NS0MLE02	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
NN1MLE04	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
NN1MLE03	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
NN1MLE01	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
NS0NEI01	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,67	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NS0NEI06	<i>N. antarctica</i>	Norte 1	-71,66	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NS0NEI09	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NS0NEI10	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NS0NEI13	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NS0NEI12	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NS0NEI18	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,65	Laguna Neira	PNLA
NN1NEI23	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,66	Laguna Neira	PNLA

NS0NEI25	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,66	-42,66	Laguna Neira	PNLA
NS0ESC08	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,73	-42,75	Laguna Escondida	PNLA
NS0ESC13	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,73	-42,75	Laguna Escondida	PNLA
NS0ESC20	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,73	-42,75	Laguna Escondida	PNLA
NS0ESC29	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,73	-42,76	Laguna Escondida	PNLA
NS0FUT02	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,58	-42,94	Futalaufquen	PNLA
NS0FUT14	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,58	-42,94	Futalaufquen	PNLA
NS0FUT04	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,58	-42,94	Futalaufquen	PNLA
NS0FUT03	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,54	-43,00	Futalaufquen	PNLA
NS0FUT05	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,53	-43,00	Futalaufquen	PNLA
NS0FUT17	<i>N. antarctica</i>	Sur	-71,52	-43,00	Futalaufquen	PNLA
CN4GUTS1	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTS2	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTS3	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTS4	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTS5	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTV1	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTV2	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTV3	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTV4	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CN4GUTV5	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,42	-41,18	Lago Gutiérrez	PNNH
CS0VIL01	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,49	-41,59	Villegas	El Manso
CS0VIL02	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,49	-41,59	Villegas	El Manso
CS0VIL03	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,49	-41,59	Villegas	El Manso
CN2PMO13	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,54	-41,79	Cerro Perito Moreno	El Bolsón
CN2PMO14	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,54	-41,79	Cerro Perito Moreno	El Bolsón
CS0NAT01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,55	-41,86	Cerro Natacion	ANPRALE

CS0NAT03	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,56	-41,86	Cerro Natacion	ANPRALE
CN2KEL02	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,56	-41,94	Pozones Kelly	El Bolsón
CN1KEL04	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,56	-41,94	Pozones Kelly	El Bolsón
CN1KEL14	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,56	-41,95	Pozones Kelly	El Bolsón
CS0MOT05	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,61	-42,03	Cerro Motoco	Lago Puelo
CS0MOT10	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,60	-42,03	Cerro Motoco	Lago Puelo
CN2COB04	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,50	-42,05	Cascada Corbata Blanca	El Hoyo
CN2COB07	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,50	-42,05	Cascada Corbata Blanca	El Hoyo
CN2CEN09	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,23	-42,07	Cañadon del Ensueño	Maiten
CN2CEN04	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,23	-42,07	Cañadon del Ensueño	Maiten
CS0OVI02	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,69	-42,10	Los Ovillos	PNLP
CS0OVI01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,69	-42,10	Los Ovillos	PNLP
CN1HIT02	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,72	-42,10	Los Hitos	PNLP
CN1HIT01	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,72	-42,10	Los Hitos	PNLP
CN1PUES4	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CN1PUEV3	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CN1PUEV4	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CS0PUES1	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CS0PUES2	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CS0PUES3	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CS0PUEV1	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CS0PUEV2	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,72	-42,11	Lago Puelo	PNLP
CS0MEL01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,70	-42,12	Bahía Melo	PNLP
CS0MEL02	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,70	-42,12	Bahía Melo	PNLP
CN1ELM06	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,40	-42,16	El Monje	El Hoyo
CN2COI04	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,31	-42,16	Cerro Coihue	Maiten
CN2COI07	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,30	-42,16	Cerro Coihue	Maiten

CN1ELM01	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,40	-42,16	El Monje	El Hoyo
CN1BUE01	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,65	-42,17	Puerto Bueno	PNLP
CN1BUE02	<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	-71,65	-42,17	Puerto Bueno	PNLP
CN2ALM07	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,34	-42,21	Arroyo La Mina	El Hoyo
CN2ALM02	<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	-71,34	-42,21	Arroyo La Mina	El Hoyo
CS0CHO01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,62	-42,45	Lago Cholila	Cholila
CS0CHO21	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,61	-42,45	Lago Cholila	Cholila
CS0LEZ14	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,50	-42,46	Laguna Lezana	Cholila
CS0LEZ08	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,50	-42,46	Laguna Lezana	Cholila
CS0LEZ01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,51	-42,46	Lago Lezana	Cholila
CS0PUN04	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,57	-42,52	Cerro Puntiajudo	Cholila
CS0PUN05	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,57	-42,52	Cerro Puntiajudo	Cholila
CS0PUN03	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,57	-42,52	Cerro Puntiajudo	Cholila
CS0PUN02	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,57	-42,52	Cerro Puntiajudo	Cholila
CS0PUN01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,57	-42,52	Cerro Puntiajudo	Cholila
CS0COR05	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,56	Cerro Coronado	PNLA
CS0COR01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,56	Cerro Coronado	PNLA
CS0COR14	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,56	Cerro Coronado	PNLA
CS0COR20	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,56	Cerro Coronado	PNLA
CS0COR30	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,57	Cerro Coronado	PNLA
CS0RIV01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,60	Lago Rivadavia	PNLA
CS0RIV02	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,60	Lago Rivadavia	PNLA
CS0RIV18	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,65	-42,61	Lago Rivadavia	PNLA
CS0NEI01	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,67	-42,65	Laguna Neira	PNLA
CS0NEI10	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,67	-42,65	Laguna Neira	PNLA
CS0PET05	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA
CS0PET07	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA

CS0PET08	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,76	-42,71	Cerro Petizo	PNLA
CS0ESC19	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,74	-42,74	Laguna Escondida	PNLA
CS0ESC20	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,74	-42,74	Laguna Escondida	PNLA
CS0ESC08	<i>N. dombeyi</i>	Sur	-71,73	-42,75	Laguna Escondida	PNLA
LN2PMO14	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO18	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO60	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO12	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO10	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO70	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO20	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO06	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO24	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO22	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO26	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO28	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO30	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO34	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO36	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO40	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2PMO38	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,78	Cerro Perito Moreno	ANPRALE
LN2NAT04	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
LN2NAT03	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
LN2NAT01	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
LN2NAT22	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
LN2NAT29	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,59	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE
LN2NAT02	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,58	-41,88	Cerro Natacion	ANPRALE

LN2PIL13	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,73	-41,98	Cerro Piltriquitron	El Bolsón
LN2PIL15	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,73	-41,98	Cerro Piltriquitron	El Bolsón
LN2MOF01	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,66	-42,03	Cerro Morrudo	Lago Puelo
LN2MOR02	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,67	-42,03	Cerro Morrudo	Lago Puelo
LN2MOR05	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,67	-42,03	Cerro Morrudo	Lago Puelo
LN1MOR01	<i>N. pumilio</i>	Norte 1	-71,67	-42,03	Cerro Morrudo	Lago Puelo
LN2YEG01	<i>N. pumilio</i>	Norte 2	-71,73	-42,21	Laguna de la Yegua	PNLP
LS0YEG02	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,73	-42,21	Laguna de la Yegua	PNLP
LS0YEG04	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,74	-42,21	Laguna de la Yegua	PNLP
LS0CHO02	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
LS0CHO03	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
LS0CHO04	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
LS0CHO01	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
LS0CHO05	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,62	-42,42	Cerro Cholila	Cholila
LS0MLE10	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,43	-42,60	Mallín del León	Cholila
LS0MLE01	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
LS0MLE05	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
LS0MLE04	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,44	-42,60	Mallín del León	Cholila
LS0NEI28	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,64	-42,65	Laguna Neira	PNLA
LS0NEI11	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,65	-42,66	Laguna Neira	PNLA
LS0NEI08	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,65	-42,66	Laguna Neira	PNLA
LS0NEI07	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,65	-42,66	Laguna Neira	PNLA
LS0NEI04	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,65	-42,66	Laguna Neira	PNLA
LS0PET06	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA
LS0PET11	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA
LS0PET12	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA
LS0PET13	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA

LS0PET18	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,75	-42,69	Cerro Petizo	PNLA
LS0ESC08	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,73	-42,75	Laguna Escondida	PNLA
LS0ESC04	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,73	-42,76	Laguna Escondida	PNLA
LS0ESC01	<i>N. pumilio</i>	Sur	-71,73	-42,76	Laguna Escondida	PNLA

Tabla 3. 3: Zona de contacto secundario entre linajes de cloroplasto Norte y Sur.

Individuos ubicados en los extremos geográficos de la zona de contacto secundario entre linajes para cada especie y su latitud. Los individuos marcados con gris fueron elegidos como límites norte y sur comunes a las tres especies.

Especie	Límite Norte		Límite Sur	
	Individuo	Latitud	Individuo	Latitud
<i>N. antarctica</i>	NS0SIL06	-42,16	NS0NEI06	-42,65
<i>N. dombeyi</i>	CS0NAT01	-41,86	CN2ALM02	-42,21
<i>N. pumilio</i>	LN2MOF01	-42,03	LS0YEG04	-42,21

Tabla 3. 4: Principales características de los genomas del cloroplasto de las seis especies de *Nothofagus* analizadas.

Na: *N. antarctica*. Nb: *N. betuloides*. Nd: *N. dombeyi*. Nn: *N. nitida*. Np: *N. pumilio*. No: *N. obliqua*. PCG: genes codificantes. ARNt: ARN de transferencia. ARNr: ARN ribosomal. Unk: ORFs no caracterizados.

Haplotipo	Especie	Longitud (pb)				%GC	Número de genes				Número OR F codones	
		Total	LSC	SSC	IR		Total	PCG	ARNt	ARNr		
Sur	Na	156009	85353	18111	26220	37.1	108	72	28	4	4	52003
Sur	Nb	156010	85354	18111	26220	37.1	108	72	28	4	4	52003
Sur	Nd	156009	85353	18111	26220	37.1	108	72	28	4	4	52003
Sur	Nn	156010	85354	18111	26220	37.1	108	72	28	4	4	52003
Sur	Np	156009	85353	18111	26220	37.1	108	72	28	4	4	52003
Norte 1	Na	156247	85467	18139	26268	37.1	108	72	28	4	4	52082
Norte 1	Nd	156248	85467	18140	26268	37.1	108	72	28	4	4	52082
Norte 1	Np	156228	85448	18139	26268	37.1	108	72	28	4	4	52076
Norte 2	Na	156305	85523	18141	26268	37.1	108	72	28	4	4	52101
Norte 2	Nd	156305	85523	18141	26268	37.1	108	72	28	4	4	52101
Norte 2	Np	156228	85444	18143	26268	37.1	108	72	28	4	4	52076
Lophozonia	No	156049	85323	18529	26046	37.1	108	72	28	4	4	52016

Tabla 3. 5: Genes presentes en los genomas secuenciados *de novo* para las seis especies del género *Nothofagus*.

* Genes con un intrón ** genes con dos intrones *** ausentes en el haplotipo Sur.		
Categoría	Grupo	Nombre
Fotosíntesis	Subunidades de la ATP sintasa	atpA, atpB, atpE, atpF*, atpH, atpI
	Subunidades del fotosistema II	psbA, psbB, psbC, psbD, psbE,
		psbF, psbI, psbJ, psbK, psbL,
		psbM, psbN, psbT, psbZ, ycf3**
	Subunidades de la NADH deshidrogenasa	ndhA*, ndhB*, ndhB, ndhC, ndhD,
		ndhE, ndhF***, ndhG, ndhH, ndhI,
		ndhJ, ndhK
Subunidades del complejo citocromo b/f	petA, petB, petD, petG, petL, petN	
Subunidades del fotosistema I	psaA, psaB, psaC, psal, psaJ	
Subunidades de la Rubisco	rbcL	
Autorreplicación	Subunidad ribosómica mayor	rpl2*, rpl14, rpl16*, rpl20, rpl23, rpl33, rpl36
	ARN polimerasa dependiente del ADN	rpoA, rpoB, rpoC1*, rpoC2
	Subunidad ribosómica menor	rps2, rps3, rps4, rps7, rps8, rps11,
rps14, rps15, rps16*, rps18, rps19		
Otros genes	Acetil-CoA-carboxilasa	accD
	Gen de síntesis del citocromo de tipo C	ccsA
	Proteína de la membrana envolvente	cemA
	Proteasa	clpP**
	Maturase	matK
Desconocido	ORF conservado	ycf1, ycf2, ycf4, ycf15
Genes ARN	ARNr	rrn4.5S, rrn5S, rrn16S, rrn23S

	ARNt	trnA-UGC*, trnC-GCA, trnC-ACA*, trnD-GUC, trnE-UUC*, trnE-UUC, trnF- GAA, trnG-GCC, trnH-GUG, trnK- UUU*, trnL-CAA, trnL-UAA*, trnL-UAG, trnM-CAU, trnM-CAU, trnN-GUU, trnP- UGG, trnQ-UUG, trnR-ACG, trnR-UCU, trnS-GCU, trnS-GGA, trnS-UGA, trnT- GGU, trnT-UGU, trnV-GAC, trnW-CCA, trnY-GUA
--	------	---

Tabla 3. 6: Genes mitocondriales identificados a partir de los contigs (o grupos de secuencias ensambladas) de ADNmt para las seis especies del género *Nothofagus*.

Categoría	Grupo	Nombre
Respiración	Subunidades de la ATP sintasa	atp1, atp4, atp6, atp8, atp9
	Subunidades de la NADH deshidrogenasa	nad1, nad2, nad3, nad4, nad4L, nad5, nad6, nad7, nad9
	Maduración citocromo c	ccmB, ccmC, ccmFC, ccmFN1, ccmFN2
	Subunidades del complejo citocromo c	cox1, cox2, cox3
	Subunidades del complejo citocromo b	cob
Autorreplicación	Subunidad ribosómica mayor	rpl2, rpl5, rpl16
	Subunidad ribosómica menor	rps3, rps4, rps12
Otros genes	TAT translocasa	mttB
	Maturase	matR
Genes ARN	ARNr	rrn18, rrn26, rrn5
	ARNt	tRNAI-CAT, trnD-GUC, trnE-UUC, trnG-GCC, trnH-GUG, trnK-UUU, trnM-CAU, trnN-GUU, trnP-UGG, trnQ-UUG, trnS-GCU, trnS-UGA, trnW-CCA, trnY-GUA

Tabla 3. 7: Descripción de las repeticiones de secuencias simples (SSR) del cloroplasto en distintas especies de *Nothofagus*.

Na: <i>N. antarctica</i> . Nn: <i>N. betuloides</i> . Nd: <i>N. dombeyi</i> . Nn: <i>N. nitida</i> . Np: <i>N. pumilio</i> . No: <i>N. obliqua</i> .													
Tipo	Unidad de repetición	Haplotipo Sur					Haplotipo Norte 1			Haplotipo Norte 2			No
		Na	Nb	Nd	Nn	Np	Na	Nd	Np	Na	Nd	Np	
Mononucleótido	A/T	54	54	54	54	54	56	56	55	57	57	58	55
	C/G	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	3
Dinucleótido	AG/CT	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
	AT/AT	10	10	10	10	10	9	9	9	9	9	9	10
Trinucleótido	AAT/ATT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Tetranucleótido	AAAG/CTTT	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
	AAAT/ATTT	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	6	4
	AAGT/ACTT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	AATG/ATTC	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	2
Pentanucleótido	AAAAT/ATTTT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
	AAACT/AGTTT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	AACTT/AAGTT	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	-
	AATAG/ATTCT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
	AATTC/AATTG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Hexanucleótido	AATCCT/AGGATT	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	-
Total	-	81	81	81	81	81	83	83	82	85	85	86	85

Tabla 3. 8: Análisis AMOVA para distintos subconjuntos de especies del orden Fagales.

Porcentaje de Varianza analizado a distintos niveles jerárquicos. Fagales (OF) contiene todas las secuencias descargadas de GeneBank de Fagaceae, Betulaceae, Juglandaceae, Myricaceae, Casuarinaceae, *Nothofagus moorei* y las 12 secuencias de Nothofagaceae obtenidas para este capítulo. Nothofagaceae (FN) contiene todas las 12 secuencias nuevas de *Nothofagus* y *N. moorei* descargado de GeneBank. *Nothofagus* (SN) contiene sólo las tres especies para las que tenemos diversidad de haplotipos del cloroplasto (*N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* con sus haplotipos Norte 2, Norte 1 y Sur).

Base de datos	Fuente de variación	g.l	Desvío	% Total Var	p-valor
Fagales	Entre familias	2	1.869	70.9	< 0,001
(OF)	Entre géneros	16	0.784	20.2	< 0,001
	Dentro de géneros	16	0.153	8.9	< 0,001
	Total (Orden)	34	2.806	100	-
Nothofagaceae	Entre subgéneros	1	0.094	91	< 0,001
(FN)	Dentro de subgéneros	11	0.029	9	-
	Total (Familia)	12	0.123	100	-
<i>Nothofagus</i>	Entre especies	2	0	0	0.95
(SN)	Dentro de especies	6	0.014	100	-
	Entre linajes	1	0.014	99.1	< 0,001
	Dentro de linajes	7	0	0.9	-
	Total (Subgénero)	8	0.014	100	-

Tabla 3. 9: Valores Phi jerárquicos para distintos niveles taxonómicos.

Phi proporcional a las estadísticas de diferenciación de la población considerando distintos niveles jerárquicos, en este caso corresponden a las bases de datos Fagales, Nothofagaceae y *Nothofagus* como las usadas en la tabla 3.8.

Base de datos	Nivel	Phi
Fagales (OF)	Género - Orden	0.911
	Familia - Orden	0.709
	Género - Familia	0.693
Nothofagaceae (FN)	Subgénero - Género	0.91
<i>Nothofagus</i> (SN)	Especie - Subgénero	0
	Linajes - Subgénero	0.991

FIGURAS

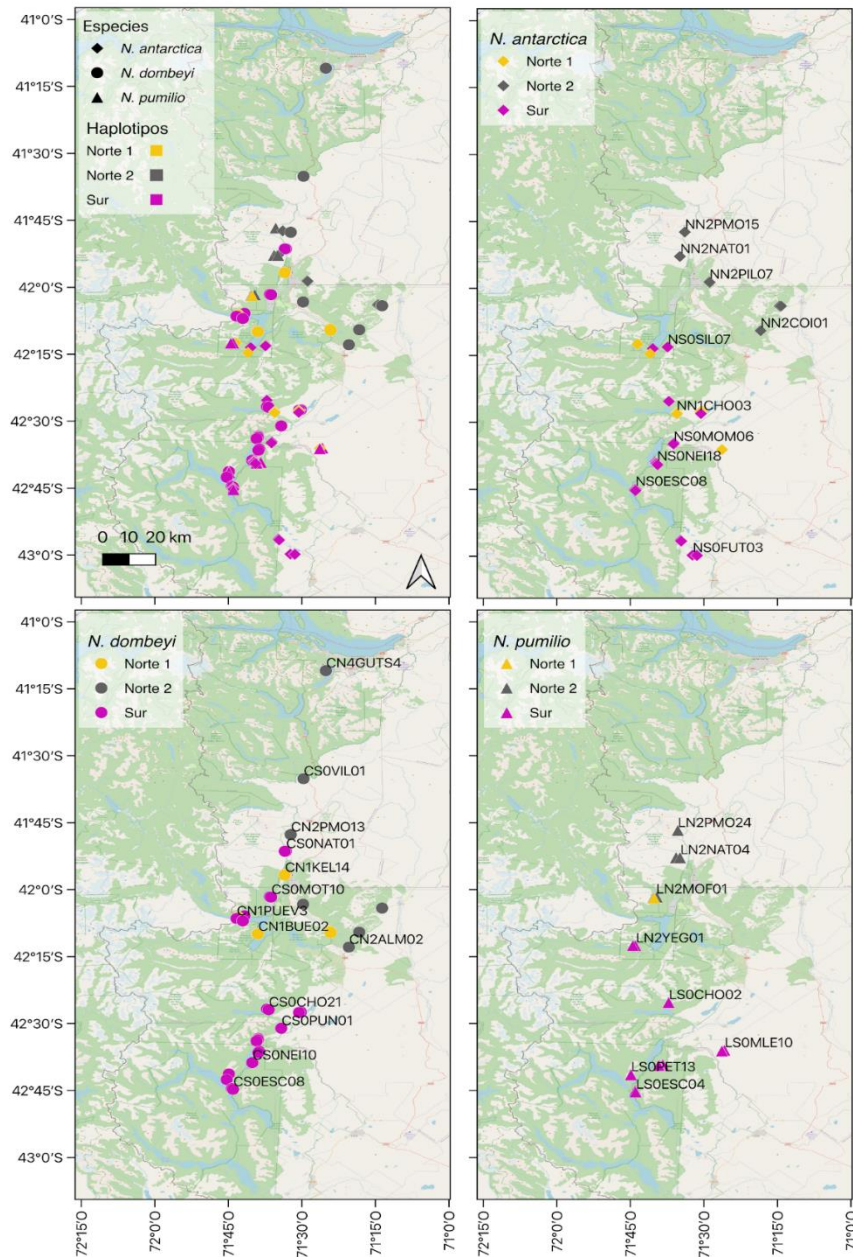


Figura 3. 1: Distribución geográfica de los haplotipos de cloroplasto identificados.

Los colores rosa, amarillo y gris identifican a los haplotipos Sur, Norte 1 y Norte 2 respectivamente. Las formas rombo, círculo y triángulo identifican a las especies *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* respectivamente. Panel superior izquierdo: Mapa general. Panel superior derecho: Haplotipos de *N. antarctica*. Panel inferior izquierdo: Haplotipos de *N. dombeyi*. Panel inferior derecho: Haplotipos de *N. pumilio*.

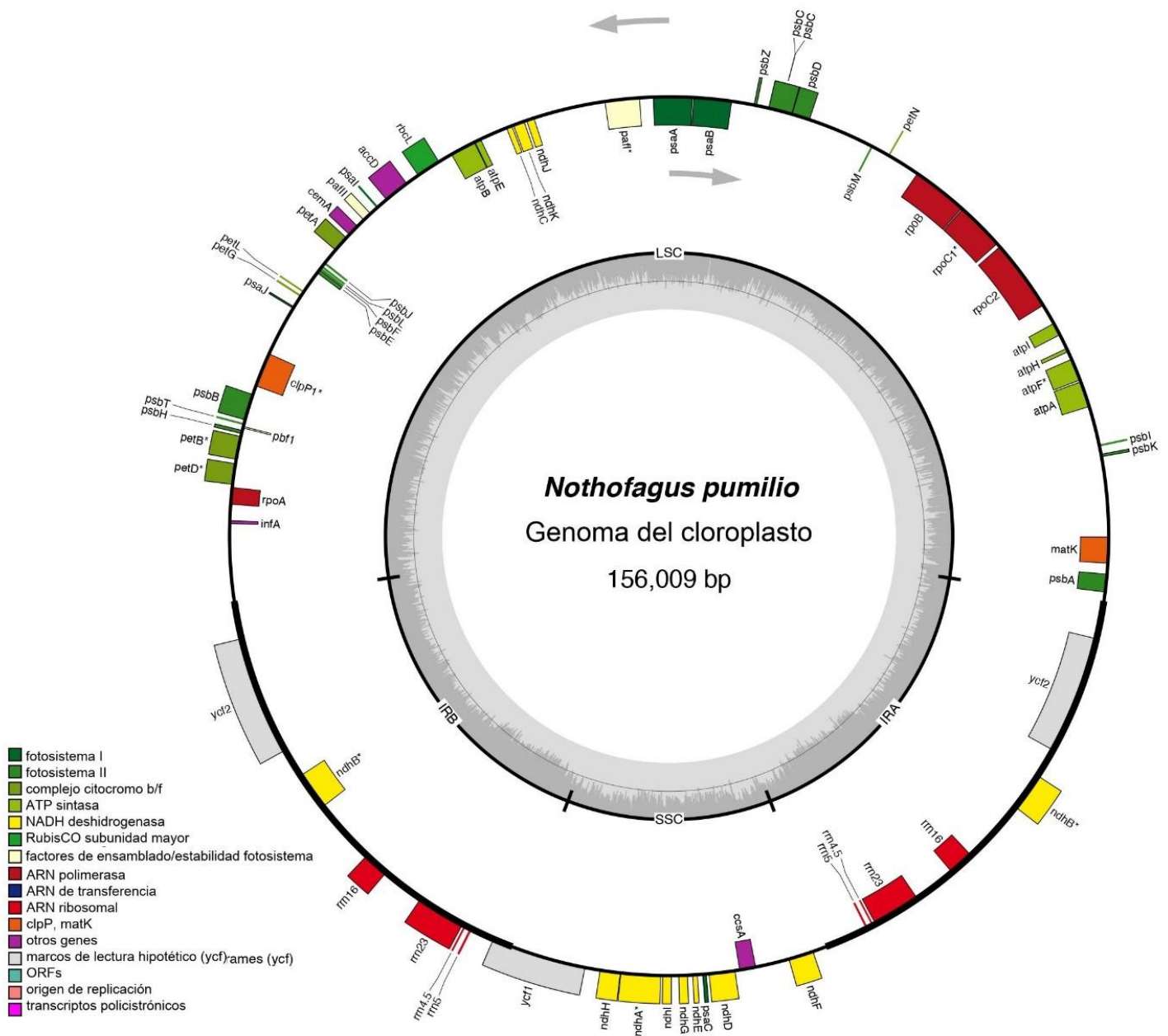


Figura 3. 2: Mapa del genoma del cloroplasto del haplotipo Sur de *Nothofagus pumilio*. Los genes dentro del círculo se transcriben en el sentido de las agujas del reloj, los genes fuera se transcriben en sentido contrario. El círculo interior gris claro corresponde al contenido de AT y el gris oscuro al contenido de GC. Los genes pertenecientes a distintos grupos funcionales se muestran en colores diferentes. También se indica la posición de la región de copia única grande (LSC), la región de copia única pequeña (SSC) y las dos repeticiones invertidas (IRa e IRb).

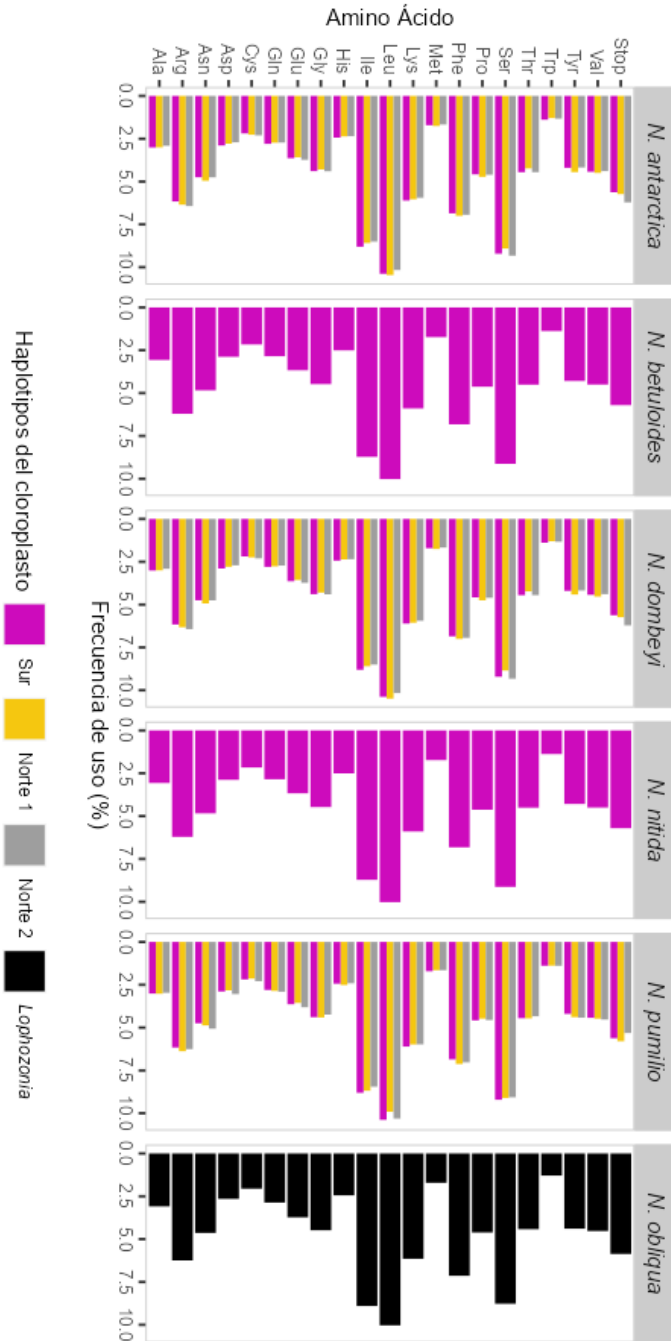


Figura 3. 3: Frecuencias de aminoácidos en el genoma plastidial de las seis especies de Nothofagus.

Para *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* se muestran los linajes Sur (haplotipo Sur) y Norte (haplotipos Norte 1 y Norte 2). Para *N. betuloides* y *N. nitida* sólo se muestra el haplotipo Sur.

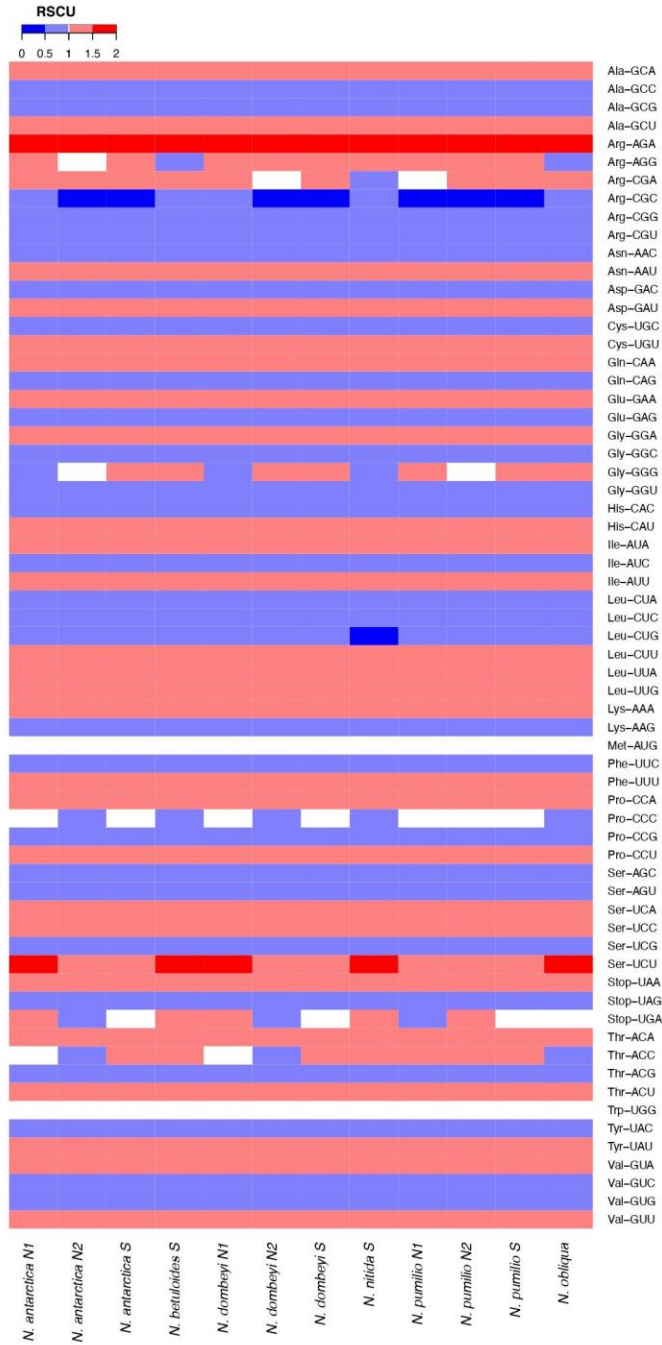


Figura 3. 4: Uso relativo de codones sinónimos (RSCU).

Mapa de calor del uso relativo de codones sinónimos (RSCU) para distintas especies del subgénero *Nothofagus* y sus linajes intraespecíficos de cloroplasto. La especie *N. obliqua* corresponde al subgénero *Lophozonia*.

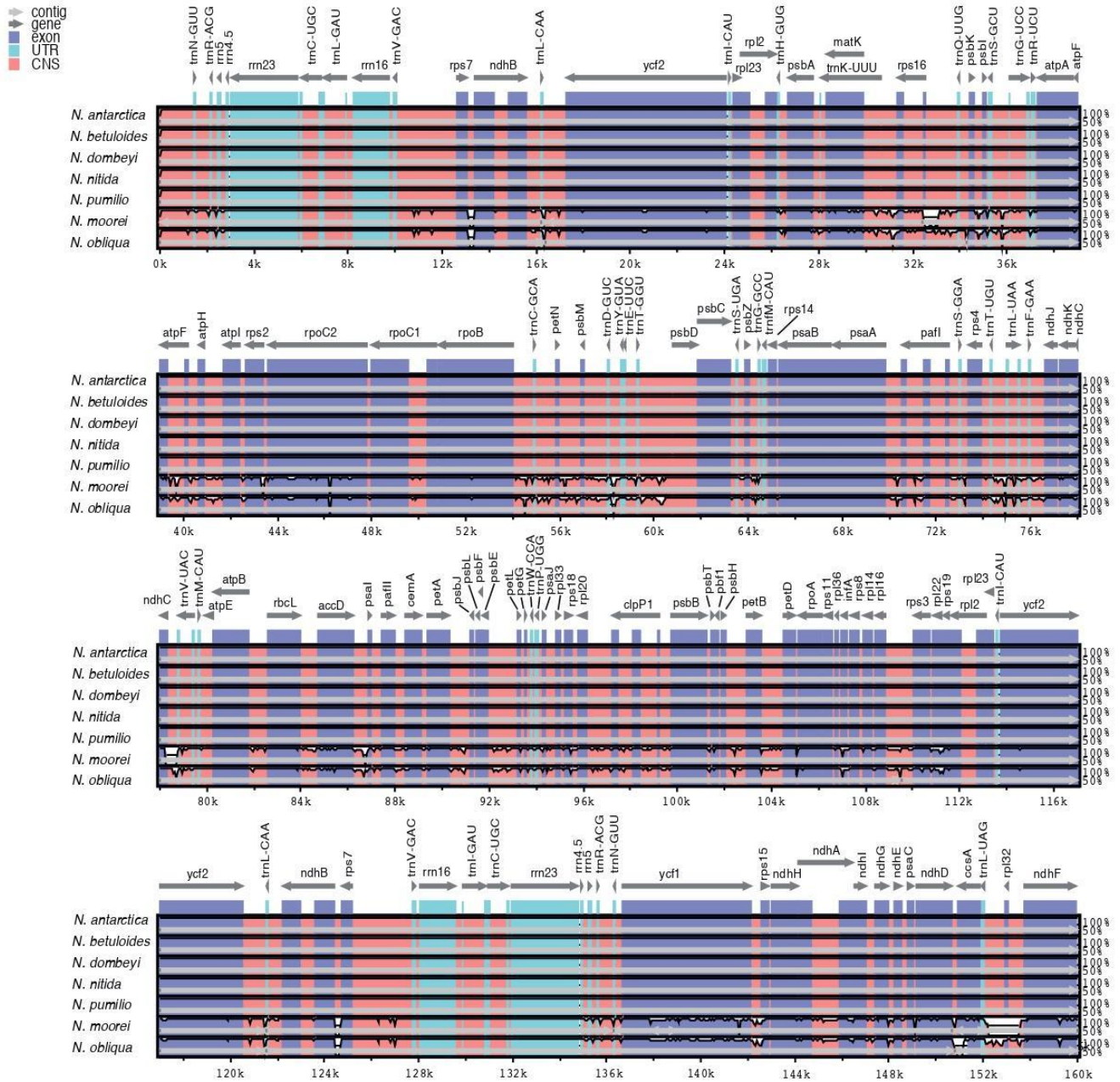


Figura 3. 5: Comparación de los genomas CP de siete especies de Nothofagaceae. Alineamiento comparativos para las especies del linaje Sur del subgénero *Nothofagus* (*N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. pumilio*). El subgénero *Lophozonia* incluye *N. moorei* y *N. obliqua*. La escala vertical muestra el porcentaje de identidad, que varía del 50% al 100%.

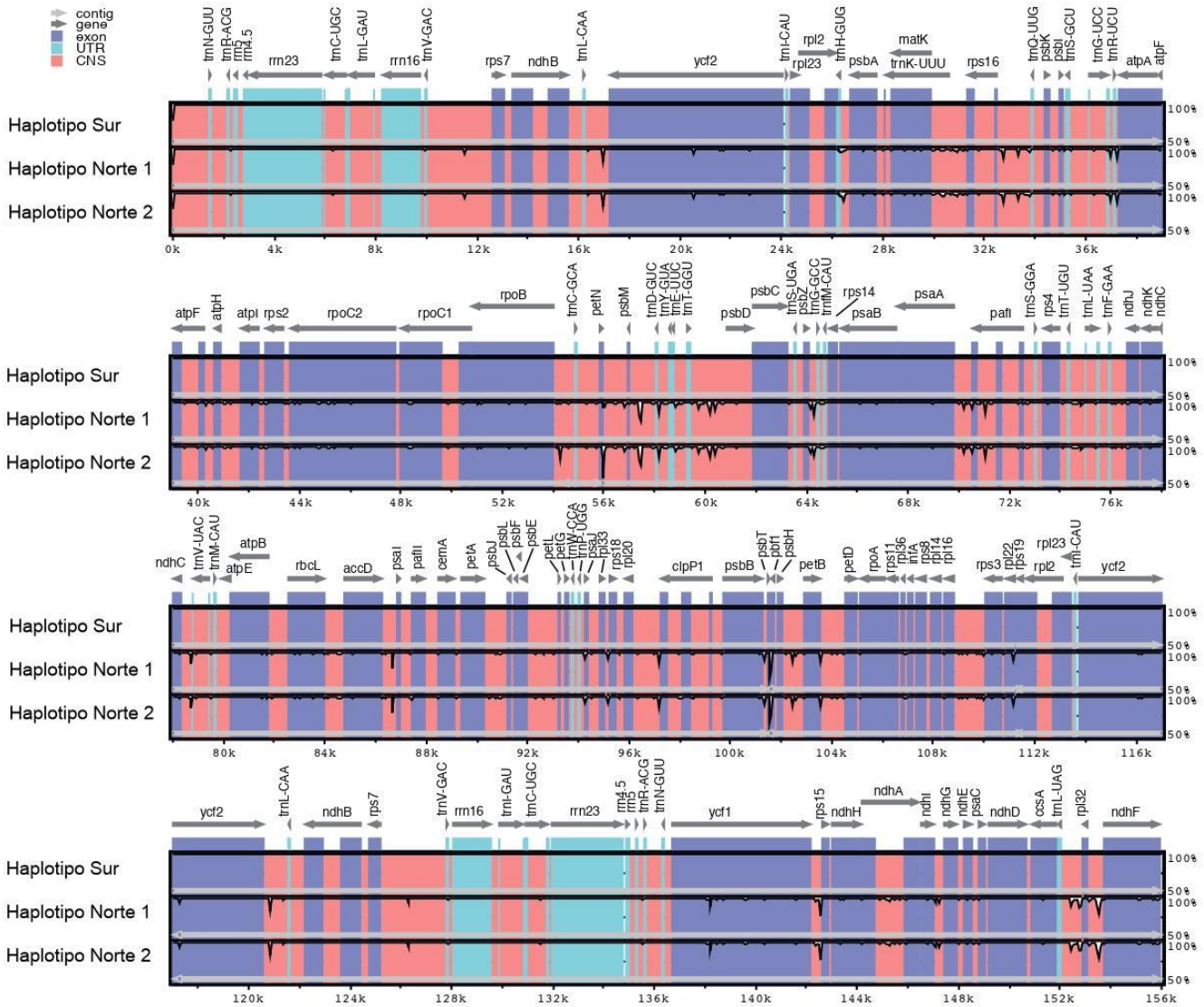


Figura 3. 6: Comparación de los genomas CP de los tres haplotipos de *N. antarctica*.

La escala vertical muestra el porcentaje de identidad, que varía del 50% al 100%.

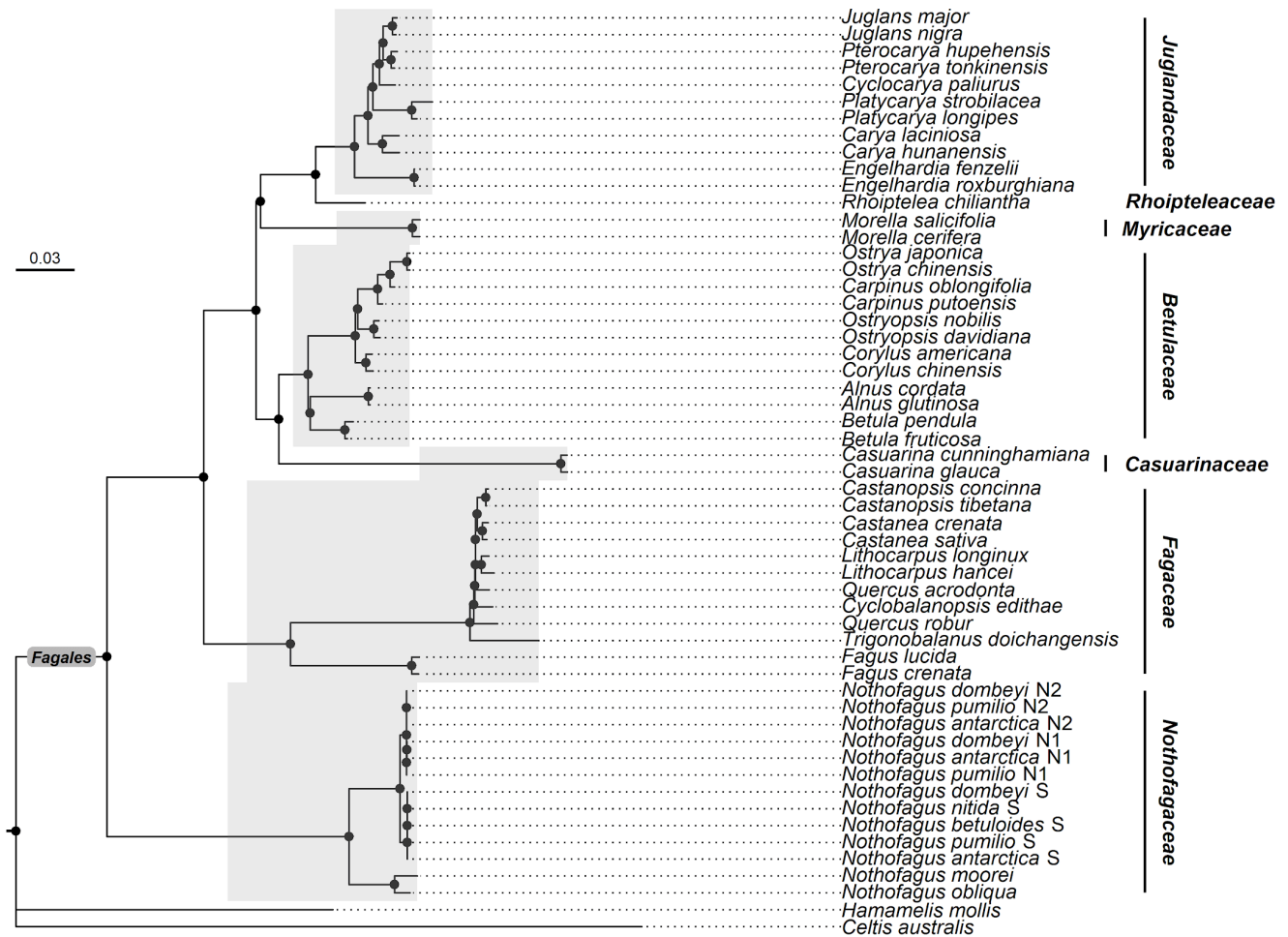
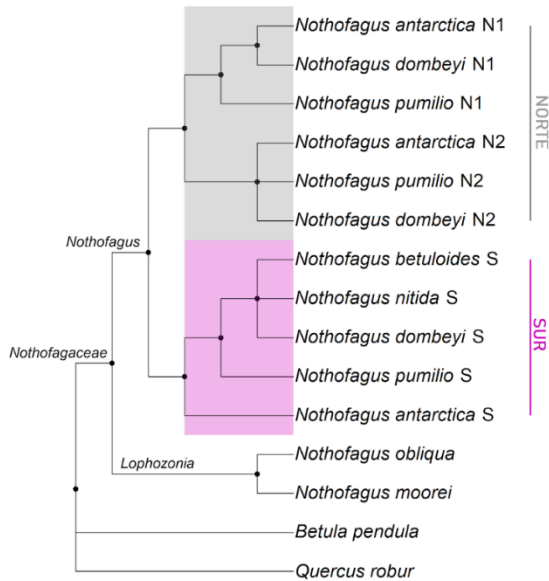


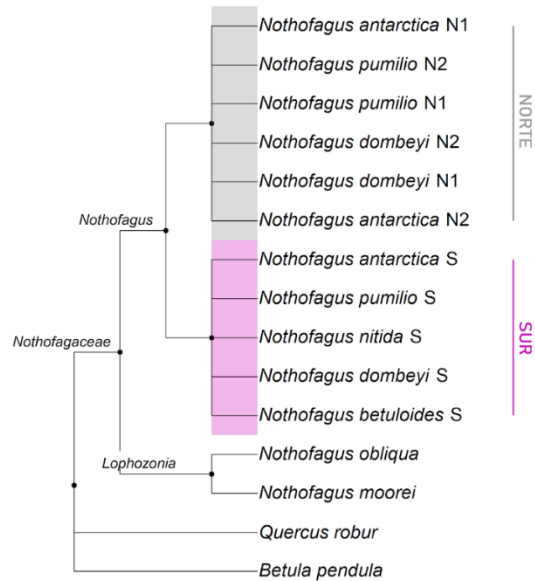
Figura 3. 7: Árbol filogenético del orden Fagales basado en genomas completos de cloroplasto.

Árbol filogenético del orden Fagales basado en secuencias completas del genoma del cloroplasto, incluyendo las doce muestras de Nothofagaceae recientemente secuenciadas correspondientes a distintos subgéneros (*Nothofagus* y *Lophozonia*), especies (*N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. pumilio*) y haplotipos intraespecíficos de cloroplasto. N1: Norte 1, N2: Norte 2 y S: Sur.

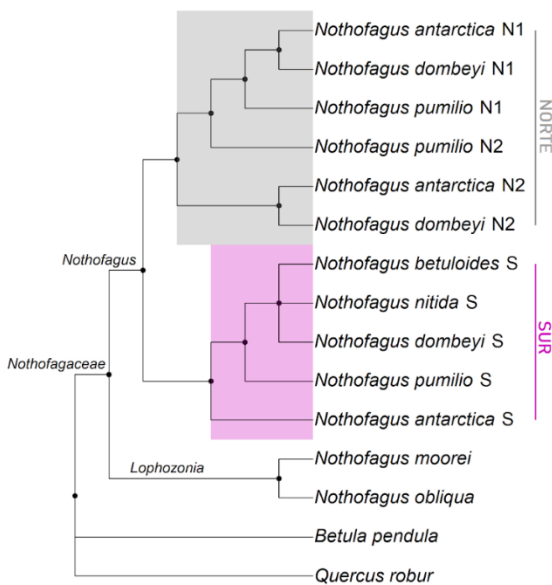
(A) Genoma completo



(B) Región IR



(C) Región LSC



(D) Región SSC

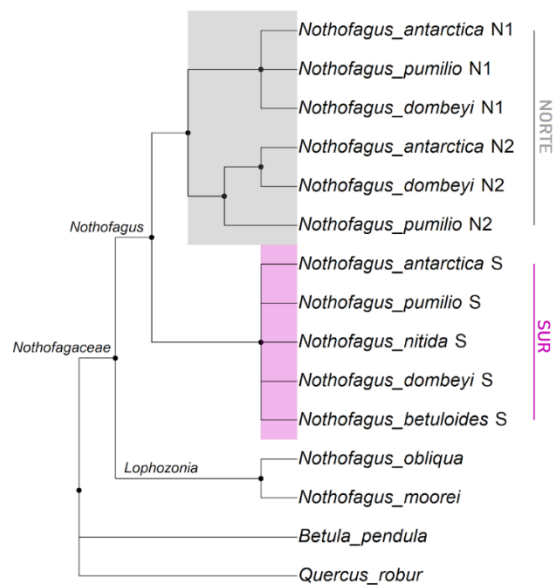
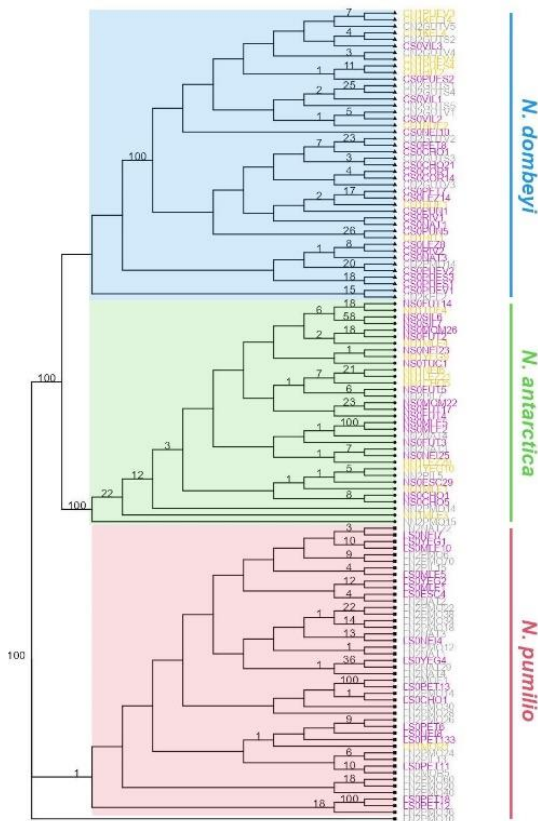


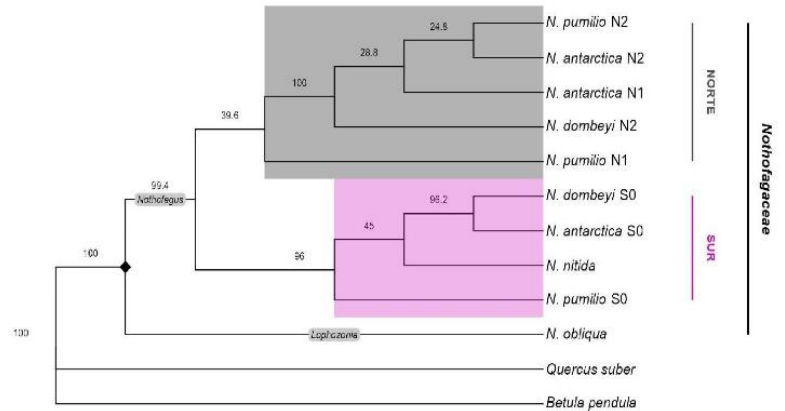
Figura 3. 8: Árboles filogenéticos de la familia Nothofagaceae usando distintas regiones del genoma del cloroplasto.

Árboles filogenéticos de la familia Nothofagaceae que incluyen distintos subgéneros (*Nothofagus* y *Lophozonia* como grupo externo), especies (*N. antarctica*, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, *N. nitida* y *N. pumilio*) y haplotipos intraespecíficos de cloroplasto basados en distintas regiones genómicas: A. genoma completo del cloroplasto, B. repetición invertida (IR), C. copia única larga (LSC) y D. copia única corta (SSC). N1: Norte 1, N2: Norte 2 y S: Sur.

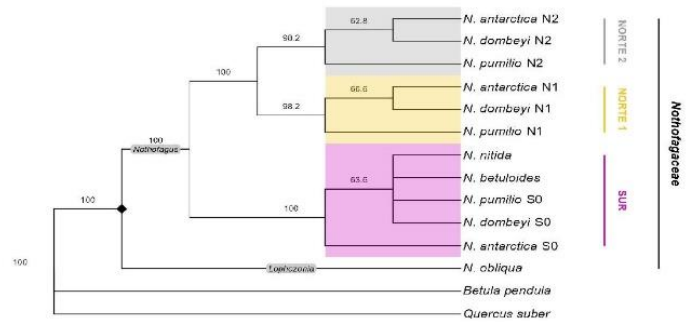
Marcadores SNP



Mitocondria - CDS



Cloroplasto - CDS



● N. antarctica ▲ N. dombeyi ■ N. pumilio Haplotipo del cloroplasto
 a Sur a Norte 1 a Norte 2

Figura 3. 9: comparación de las señales filogenéticas de distintos compartimentos genómicos.

Árboles filogenéticos de las poblaciones y especies del subgénero *Nothofagus* *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* basados en marcadores SNPs (principalmente nucleares) (izquierda) y genes codificantes de los genomas organelares (derecha).

Capítulo 4: Geografía de la divergencia entre especies hermanas de *Nothofagus*

INTRODUCCIÓN

Uno de los temas centrales en la divergencia entre poblaciones y potencial especiación es la geografía de la divergencia. Esto se refiere a si los linajes se diferencian bajo aislamiento geográfico, es decir en alopatría, y en qué medida el flujo de genes impide la divergencia (Coyne & Orr, 2004). Sin embargo, la divergencia puede también ocurrir en simpatría, es decir sin impedimentos al flujo génico, y representa uno de los aspectos más controvertidos de la biología evolutiva (Coyne, 2007; Nosil, 2008). La simpatría deriva del griego 'mismo lugar' es decir en ausencia de aislamiento geográfico e implica la división a partir de un mismo ancestro común en dos o más grupos reproductivamente aislados. Las barreras reproductivas que ocurren previamente a la fertilización se conocen como precigóticas mientras que las que tienen lugar luego de la misma se denominan postcigóticas. Dentro de las primeras se pueden mencionar las barreras de tipo ecológicas como diferencias de hábitat, comportamentales, mecánicas (ej. diferencias en estructuras reproductivas), incompatibilidades gaméticas; entre las postcigóticas se podrían mencionar la esterilidad e inviabilidad híbridas (Matute & Cooper, 2021). Los linajes simpátricos poseen contacto físico entre sí y por lo tanto son potencialmente capaces de cruzarse e intercambiar genes a menos que existan barreras reproductivas de algún tipo como las mencionadas anteriormente. Por lo tanto, el aislamiento geográfico y reproductivo son temas centrales en la divergencia entre linajes y la potencial especiación.

La divergencia simpátrica ha sido estudiada en relación con mecanismos de especiación. En esta tesis, se analizan procesos dinámicos de mantenimiento de barreras reproductivas entre poblaciones de especies que se encuentran en simpatría. Es decir, no nos enfocamos en el surgimiento de nuevas especies, sino en analizar las fuerzas evolutivas que promueven la divergencia y el mantenimiento de las características especie-específicas de taxones simpátricos con la potencialidad de hibridar en condiciones naturales. La divergencia entendida en este contexto requiere

cumplir cuatro condiciones (Coyne & Orr, 2004). Primero, las poblaciones (y/o especies) debe ser en gran parte o completamente simpátricas. En segundo lugar, las poblaciones simpátricas deben mostrar aislamiento reproductivo sustancial, preferiblemente basado en diferencias de base genética. En tercer lugar, los taxones simpátricos deben ser especies hermanas ya que si hubieran hibridado en el pasado podrían ser genéticamente similares, aunque no estén estrechamente emparentados. Cuarto, que la historia de las poblaciones o grupos de poblaciones no incluya situaciones de alopatría, incluso para un período relativamente corto como de miles o millones de años necesarios para alcanzar el aislamiento reproductivo.

La evidencia empírica sugiere que ciertas condiciones facilitan la divergencia simpátrica (aunque ninguna condición es completamente necesaria o suficiente): (a) las poblaciones naturales experimentan una selección disruptiva, (b) la selección opera directamente sobre los patrones de apareamiento de las poblaciones naturales, y (c) los patrones de apareamiento preferencial tiene costos débiles o nulos (Bolnick & Fitzpatrick, 2007). Quizás el consenso más claro que emerge de esta evidencia es que la selección disruptiva puede promover la divergencia cuando los rasgos seleccionados confieren directamente aislamiento reproductivo (Gavrilets, 2004). Tal es el caso de la divergencia ecológica que puede resultar en aislamiento reproductivo temporal, porque muchas especies programan su reproducción para que coincida con la disponibilidad máxima de recursos (Bolnick & Fitzpatrick, 2007). La divergencia ecológica entre poblaciones es clave para facilitar la diferenciación bajo flujo génico. Así, los niveles de diferenciación genética entre poblaciones pueden ser muy variables a lo largo del genoma, con una selección divergente que contribuye a tal divergencia genómica heterogénea. Por ejemplo, los loci bajo selección divergente y los estrechamente vinculados físicamente a ellos exhiben una diferenciación más fuerte que las regiones neutras con enlace débil o nulo a dichos loci. En este último caso, se espera una correlación positiva entre el grado de divergencia poblacional a nivel de adaptación fenotípica y niveles de diferenciación genética neutral, independiente de la distancia geográfica. Esto se debe a que la selección divergente también puede aumentar la diferenciación neutral en todo el genoma al reducir el flujo de genes

promoviendo así la divergencia a través de efectos estocásticos debido a la deriva genética (Nosil *et al.*, 2009).

La familia Nothofagaceae tiene un registro fósil muy extenso y completo. La evolución y la biogeografía histórica de esta familia han sido intensamente estudiadas gracias a la abundancia y la ubicuidad de sus registros palinopólicicos (Hill, 1991; Hill & Jordan, 1993; Fernández *et al.*, 2016). Tradicionalmente, la ausencia de un taxón en una sección estratigráfica no puede ser considerada como indicador de ausencia de ese taxón en la biota y sitio en estudio. Sin embargo *Nothofagidites*, el polen fósil de Nothofagaceae, es tan abundante y su dispersión por viento a larga distancia es tan frecuente que su ausencia en el registro fósil de un lugar y en un momento determinado puede interpretarse como ausencia de la familia (Hill & Dettmann, 1996). Este tipo de microfósiles se puede clasificar según su morfología en tipos ancestrales (ancestral a y b), que no muestran afinidad con ningún morfotipo de polen actual, y tipos derivados. Dentro de estos últimos, algunos presentan afinidad con subgéneros actuales: *brassi a*, afín al subgénero *Brassospora*, *brassi c y b* que no muestran afinidad con subgéneros actuales, el tipo *menziesii* afín a *Lophozonia*, *fusca a* (también conocido como f1 tipo *fusca 1*) afín al subgénero *Fuscospora* y *fusca b* o f2 tipo *fusca 2* del subgénero *Nothofagus*. Su distribución geo-temporal permite reconstruir los procesos de diversificación y colonización de esta familia. Los macrofósiles (hojas, maderas y estructuras reproductivas) son menos abundantes y, sobre todo en el caso de las hojas, no suelen estar bien conservados. A pesar de esto, brindan información suficiente que permitió delimitar la clasificación infragenérica de Nothofagaceae (Hill & Read, 1991) y para esbozar la historia de la expansión y diversificación de la familia en Sudamérica (Pujana *et al.*, 2021).

El estudio del registro fósil nos muestra que la familia Nothofagaceae ha dejado atrás su pico de diversidad y distribución (Hill, 2001). Los primeros registros de *Nothofagidites* del tipo ancestral aparecen en la Antártida durante el Santoniense (Cretácico superior) hace aproximadamente 86 millones de años. Estudios moleculares fechan la divergencia de Nothofagaceae del resto de las *Fagales* en esta misma época (Cook & Crisp, 2005). Los fósiles de Nothofagaceae (polen y hojas) aparecen por primera vez en Oceanía y Sudamérica durante el Cretácico Tardío en coincidencia con

el enfriamiento propuesto para el Campaniense-Maastrichtiense (Dettmann *et al.*, 1990; Hill & Dettmann, 1996). La evidencia basada en microfósiles (maderas y hojas) propone a la Antártida como centro de origen de la familia y sugiere que la expansión hacia América y Oceanía fue posterior a la aparición de los subgéneros actuales. La ausencia de *Nothofagidites* en India y África sugiere que Nothofagaceae nunca habitó estas regiones.

El género *Nothofagus* se ha dividido en cuatro subgéneros (*Nothofagus*, *Brassospora* Philipson y M. N. Philipson, *Lofozonia* Turcz. y *Fuscospora* R.S.Hill & J.Read) basado principalmente en el tipo de polen (Hill & Read, 1991). Análisis de sistemática molecular de las especies existentes de la familia apoyan firmemente la monofilia de los cuatro subgéneros (Martin & Dowd, 1993; Manos, 1997; Setoguchi *et al.*, 1997; Acosta & Premoli, 2010; Sauquet *et al.*, 2012; Premoli *et al.*, 2012).

La divergencia dentro del género *Nothofagus* comenzó durante el Eoceno (Pujana *et al.*, 2021), probablemente acompañando los cambios climáticos y orogénicos que se dieron en la región. Estos incluyeron el enfriamiento que inicia luego del máximo térmico del Paleoceno-Eoceno hace 55 Ma (Payros *et al.*, 2022) y culmina con las glaciaciones del Eoceno-Oligoceno, hace aproximadamente 34 millones de años (34 Ma), que representa una de las principales transiciones climáticas en los últimos 65 Ma (Zachos *et al.* 2008). Si bien en la región oeste de los Andes patagónicos ya existía una elevación significativa hace 80 Ma, a principios del Eoceno se alcanzaron las elevaciones actuales y un segundo pulso de levantamiento y migración hacia el este del frente orogénico ocurrió durante el Mioceno temprano-medio (Boschman, 2021). Estos efectos tectónicos y climáticos de Patagonia produjeron el cambio hacia climas más fríos y áridos. La biota de la Patagonia respondió a estos nuevos ambientes: sus bosques subtropicales perdieron densidad y extensión, y su vegetación fue lentamente reemplazada por especies adaptadas a climas más fríos y áridos; el bosque templado se retrajo a la zona cordillerana cediendo espacio a la vegetación típica de la estepa patagónica (Graham, 2009; Folguera *et al.*, 2011). Los depósitos marinos de la Patagonia muestran que antes y durante el levantamiento de los Andes, la región estuvo fragmentada por intrusiones marinas y cuencas internas que restringieron el espacio disponible para el establecimiento de plantas (Ramos, 1982; Bechis *et al.*,

2014). Estudios filogeográficos basados en ADN de cloroplasto muestran que las ingresiones marinas del Eoceno-Mioceno también moldearon el acervo genético de las especies del subgénero (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). Los trabajos de Premoli (2012) y Acosta (2014) recientemente mencionados describen un quiebre filogeográfico intraespecífico muy profundo que separa las cinco especies actuales del subgénero en dos grupos cuyo centro de diversidad se encuentran al Norte y al Sur de la franja 41°S a 43° S ocupada por una ingesión antigua del Océano Pacífico.

Este escenario geológicamente dinámico y complejo que acompañó la divergencia intraespecífica dentro de las especies del subgénero *Nothofagus* ofrece un experimento natural para el estudio comparativo de procesos de divergencia simpátrica y alopátrica. Por un lado, el proceso de especiación, potencialmente simpátrico, en el contexto del levantamiento de los andes y el inicio de la transición hacia climas más fríos; por otro lado, la divergencia alopátrica, causada por las transgresiones marinas que podrían haber funcionado como una barrera física de aislamiento reproductivo. En la actualidad, tanto especies como linajes de ADN del cloroplasto coexisten en simpatría pero la historia evolutiva y demográfica puede esbozarse en base al estudio del tipo y de la distribución de la variación genética. Las especies ampliamente distribuidas del subgénero *Nothofagus*, las deciduas *N. antarctica* y *N. pumilio* y la siempreverde *N. dombeyi* y sus características autoecológicas diferenciales las convierten en estudios de caso ideales para analizar distintos escenarios de divergencia geográfica.

La diferenciación simpátrica, en presencia de flujo génico, requiere el surgimiento de algún tipo de barrera reproductiva intrínseca previa o posterior a la polinización que actúe en contra de los efectos homogeneizadores del intercambio genético. En ambientes heterogéneos, la especialización ecológica es un mecanismo que puede permitir la diferenciación simpátrica. La divergencia alopátrica, por el contrario, permite la acumulación de diferencias neutras ya que el flujo génico se ve impedido por la distancia o por la presencia de algún ente físico que controla la intensidad del flujo génico. Incluso cuando se sostiene durante periodos prolongados, el aislamiento alopátrico puede finalizar sin generar barreras de aislamiento intrínsecas.

La obtención de marcadores moleculares abundantes y con buena cobertura del genoma genera datos que pueden emplearse para poner a prueba la hipótesis del surgimiento de barreras de aislamiento intrínsecas asociadas a la divergencia simpátrica. El trabajo con especies no modelo se dificulta por la falta de genomas completos publicados. Sin embargo, la tecnología de genotipado por secuenciación (GBS) permite trabajar con especies que no poseen genomas de referencia (Elshire *et al.*, 2011; Hasbún *et al.*, 2016; Fasanella *et al.*, 2020, 2023). Se basa en la reducción de la complejidad de los genomas mediante el uso de enzimas de restricción sensibles a la metilación. Es altamente multiplexable y produce una enorme cantidad de marcadores SNP (polimorfismos de un solo nucleótido). Permite trabajar con genomas complejos, como suelen ser los genomas vegetales, ya que evita zonas repetitivas y aumenta la eficiencia de captura de regiones de copia única.

Objetivos

Nuestros objetivos fueron: (a) analizar mediante marcadores moleculares SNP (Polimorfismos de Nucleótido Simple) y secuencias del cloroplasto (ADNcp) procesos de divergencia simpátrica y/o alopatría dentro y entre especies del subgénero *Nothofagus* (*N. pumilio*, *N. antarctica* y *N. dombeyi*). Buscamos conocer la naturaleza de barreras que mantienen a las especies como entidades ecológicas diferenciadas, incluso cuando habitan en simpatria y ante evidencias de potencial flujo génico interespecífico por tener el mismo tipo de polen y haberse descrito híbridos entre ellas. Para tal fin estudiamos los patrones de flujo genético pasado y actual, entre y dentro de las especies, para comparar la estructuración de la variación genética en los escenarios de divergencia geográfica por simpatria y alopatría. (b) Comprender los mecanismos que sostienen el quiebre filogeográfico intraespecífico antiguo y geográficamente concordante en tres especies hermanas. Identificar cuáles son las fuerzas evolutivas involucradas en el mantenimiento de la diferenciación dentro (linajes) y entre especies simpátricas. (c) Analizar, mediante el anotado funcional de marcadores SNP relevantes, los procesos biológicos y adaptaciones ecológicas asociadas a la divergencia entre especies y linajes del cloroplasto.

Hipótesis y Predicciones.

H4.1: existen fuerzas selectivas adaptativas que operan para mantener la divergencia entre linajes intraespecíficos y entre distintas especies aun en presencia de flujo génico potencial entre linajes y las distintas especies.

P4.1: las distintas especies muestran diferencias para SNP atípicos y no asociados producto de fuerzas adaptativas y neutrales, respectivamente.

P4.2: los perfiles de SNP atípicos asociados a haplotipos en alopatria reflejarán la estructuración geográfica de los linajes Norte y Sur.

P4.3: los perfiles SNP atípicos asociados a variaciones fenológicas en simpatria reflejarán el agrupamiento de los individuos analizados en especies y sus respectivos nichos ecológico-climáticos.

P4.4: los perfiles de SNP neutrales (no asociados a fenotipos) analizados a nivel de haplotipos dentro de cada especie reflejan elevadas tasas de flujo génico contemporáneo mientras que las secuencias neutrales del cloroplasto reflejan el quiebre por vicarianza geográficamente concordante para las tres especies.

MATERIALES Y METODOS

Área de estudio

Nuestro estudio se centró en las zonas de bosque templado de Patagonia Norte. En particular, el área de muestreo para este análisis se extendió desde la localidad de Río Villegas en la provincia de Río Negro hasta la portada centro del Parque Nacional Los Alerces en la provincia de Chubut (Figura 4.1; Tabla 4.1). El muestreo se de forma balanceada con el objetivo de cubrir toda la variedad de combinaciones de especie y haplotipo de tal forma de incluir variantes al norte y sur de la barrera geográfica. Las muestras pertenecientes a un mismo sitio fueron colectadas respetando un mínimo de 50m de distancia entre individuos de la misma especie para minimizar el riesgo de tomar muestras de árboles cercanamente emparentados. Las muestras de hojas fueron rotuladas (sitio e individuo), geo-referenciadas con un GPS Garmin Etrex 20 y conservadas en un freezer doméstico en las instalaciones del IRNAD-UNRN-CONICET

hasta su procesamiento en el Laboratorio Ecotono (Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue).

Extracción de ADN

Todas las extracciones de ADN fueron realizadas en el Laboratorio Ecotono de la Universidad Nacional del Comahue en Bariloche. Para la obtención de marcadores de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) extrajimos ADN total a partir de 100mg de hojas frescas o congeladas, siguiendo el protocolo propuesto por Fasanella *et al.* (2020). Este protocolo de extracción de ADN de alta calidad se basa en el propuesto por Doyle y Doyle (1990) con algunas modificaciones: 1) ATMAB (Sigma M7635- 100g) en lugar de CTAB; 2) lavado con polyvinylpyrrolidone o PVP (Sigma P5288-500 g, para biología molecular), que permite remover compuestos fenólicos típicos de plantas, y Dithiothreitol DTT (Bio-Rad), un agente reductor que mantiene proteínas en su estado reducido; 3) incubación durante 30 minutos a 65°C, luego 30 minutos en hielo y finalmente reposo durante la noche a temperatura ambiente (22°C aproximadamente); 4) 1 incubación durante 30 minutos a 37°C con 1 µL de RNasa (Machere and Nagel Laboratories) por extracto. La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Pasado este primer control, las muestras fueron seleccionadas en base a su concentración y pureza usando un fluorómetro Qubit (Invitrogen) en el laboratorio de genética forestal del INTA-EEA Bariloche. Para la determinación de los haplotipos de cloroplasto extrajimos ADN total a partir de 100mg de hojas frescas o congeladas, siguiendo el protocolo propuesto por Mathiasen & Premoli (2010). Este protocolo (apéndice 2) también se basa en el propuesto por Doyle y Doyle (1990) y comparte las modificaciones 1, 2 y 3 para plantas con alto contenido de polisacáridos. La integridad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

PCR, secuenciación y obtención de haplotipos de cloroplasto

La determinación de haplotipos consistió en la obtención por PCR de fragmentos de ADN de cloroplasto usando el par de cebadores *trnH-psbA* (Hamilton, 1998) y su secuenciación por el método de Sanger en Macrogen Corea. La identificación de

haplotipos del cloroplasto se realizó por comparación con las secuencias publicadas por Premoli et al. (2012). Para más detalles consultar la metodología del capítulo 3.

Secuenciación de alto rendimiento

Las muestras de ADN para obtención de SNP fueron enviadas a la central de secuenciación de ADN del Centro de Biotecnología de la Universidad de Wisconsin (USA) para la construcción de una librería para genotipado por secuenciación (GBS) y posterior secuenciación de alto rendimiento. La secuenciación de la librería se realizó mediante el sistema de secuenciación HiSeq 2000 de Illumina, que produce lecturas single-end de 100pb y la detección de bases fue realizada con Casava v1.8 (Illumina, San Diego, CA).

El procedimiento para la construcción de librerías GBS (Elshire *et al.*, 2011) se basa en la reducción de la complejidad de los genomas empleando enzimas de restricción. De este modo se logra obtener una muestra del genoma, reduciendo los costos de secuenciación y análisis obteniendo numerosos SNPs que permiten realizar estudios de genómica poblacional y asociaciones genotipo-fenotipo. La utilización de enzimas sensibles a metilación permite evitar zonas repetitivas y de este modo aumenta la posibilidad de detectar regiones de copia única. La enzima de restricción ApeKI es una endonucleasa tipo II que reconoce secuencias degeneradas de 5pb (GCWGC, donde W puede corresponder a A o T), crea un extremo cohesivo 5' de 3pb y es parcialmente sensible a la metilación (no corta si la tercera base nitrogenada del sitio de reconocimiento está metilada en ambas hebras). La técnica GBS permite trabajar con genomas diversos y complejos como los de las plantas, incluso en ausencia de un genoma de referencia y fue probada con éxito en *Nothofagus dombeyi* (Hasbún *et al.*, 2016; Fasanella *et al.*, 2020).

Obtención de SNP en especies sin genoma de referencia

La identificación *de novo* de marcadores SNP se llevó a cabo usando la *pipeline* o línea de comandos UNEAK (Lu *et al.*, 2013) en la plataforma CYVERSE (Merchant *et al.*, 2016). UNEAK, gracias a su enfoque basado en redes, permite trabajar sin genoma de referencia. Como primer paso, las lecturas se podan a un largo de 64pbs para eliminar

los extremos finales que suelen estar enriquecidos en errores de secuenciación. Las lecturas idénticas son unificadas en una etiqueta o *tag*. El alineamiento entre pares de etiquetas permite identificar aquellas que se diferencian en un único nucleótido, candidato a ser un SNP. Dada la complejidad de los genomas, muchos pares de etiquetas forman redes. El programa UNEAK aplica un filtro de redes para descartar las que son muy complejas ya que usualmente son una combinación de repeticiones, parálogos y errores de secuenciación. El efecto de los errores de secuenciación puede ser muy notorio en regiones de alta cobertura. Para reducir el número de SNPs descartados la *pipeline* o línea de comandos ofrece un parámetro a controlar, la tasa de tolerancia de error (error tolerance rate, ETR), que permite eliminar errores de secuenciación, simplificar las redes y reducir la pérdida de información. También es posible regular el número mínimo de copias que debe tener una etiqueta para ser incluida dentro de la salida del programa.

Usando el protocolo mencionado obtuvimos cuatro bases de datos crudos distintas. La base de datos general (BDG), se generó analizando en simultáneo las secuencias de las tres especies. BDA (*N. antarctica*), BDD (*N. dombeyi*) y BDP (*N. pumilio*) se generaron para cada especie por separado. De este modo pudimos obtener un conjunto de marcadores SNP comunes a las tres especies que nos permitieron llevar adelante las comparaciones interespecíficas, el análisis filogenético y la detección de marcadores asociados a diferencias entre especies, entre haplotipos del cloroplasto (divergencia histórica en alopatría) y a variables fenológicas (divergencia contemporánea en simpatría). Las otras tres bases de datos crudos se confeccionaron para cada especie por separado y fueron usadas para comparaciones interespecíficas. En los cuatro casos se trabajó con un valor ETR=0.01 y un número mínimo de 5 copias por etiqueta.

Filtrado de las bases de datos

Las cuatro bases de datos obtenidas con *UNEAK* (BDG y para cada una de las tres especies BDA, BDP Y BDD) fueron filtradas en el software Tassel (Bradbury *et al.*, 2007) siguiendo siempre el mismo criterio: eliminar los individuos con más del 95% de datos faltantes, seleccionar marcadores presentes en el 90% de las muestras

analizadas, imputar datos faltantes, eliminar marcadores que retengan datos faltantes luego de la imputación, eliminar marcadores monomórficos. La imputación de datos faltantes se realizó con la aplicación LinkImpute (Money *et al.*, 2015) dentro del software Tassel. Esta estrategia de imputación se basa en el método de k-vecinos más cercanos (k-nearest neighbor o KNN) y fue especialmente diseñado para trabajar con datos de genotipado por secuenciación en especies sin genoma de referencia. Luego del filtrado, procedimos con los análisis poblacionales y de asociación.

Asociaciones genotipo-fenotipo

Trabajamos con cuatro “fenotipos” distintos: especies y haplotipos del cloroplasto, que representan divergencias históricas, y las variables de la fenología reproductiva que representan divergencias ecológicas como los días transcurridos hasta el inicio de la floración (DP) y grados día de temperatura requeridos para el inicio de la floración (DD). Tanto DP como DD corresponden a las fases terminales de la floración FloIV y PA (Capítulo 2). Los fenotipos “especie” y “haplotipo” fueron tratados como variables cualitativas en el caso del análisis de componentes principales y para los cálculos de índices F_{ST} , o cuantitativas en el caso de las asociaciones realizadas mediante modelos lineales mixtos. El fenotipo “especie” fue convertido a valores numéricos estimando distancias genéticas de Nei (Nei, 1972) entre las secuencias de los espaciadores transcriptos internos de las subunidades pequeñas y grandes de ITS (por sus siglas en inglés *Internal Transcribed Spacers*) que permiten la identificación inequívoca de las tres especies (Acosta & Premoli 2010, descargadas de GeneBank). Para el fenotipo “haplotipo de ADN de cloroplasto” los valores se obtuvieron de las distancias genéticas de Nei entre las secuencias de las regiones espaciadoras intergénicas *trnH-psbA* obtenidas para cada individuo analizado. Ambos tipos de distancia genética fueron calculados usando el paquete *ape* del entorno R (Paradis, 2019; R Core Team). Los fenotipos DP y DD se estimaron usando los valores predichos por respectivos modelos lineales construidos en base a los datos del análisis fenológico (Capítulo 2). Construimos todos los modelos en el entorno R usando el paquete *glmmTMB* (Brooks *et al.*, 2017). Tomamos especie, elevación, haplotipo del cloroplasto (Norte o Sur) y fase fenológica como variables explicativas de efectos fijos, usamos una distribución normal

para el modelo DP y distribución gamma con enlace logarítmico para el modelo DD. Verificamos por métodos gráficos el cumplimiento de los supuestos distribucionales (normalidad y homocedasticidad para el modelo de distribución normal; ausencia de sobre o sub dispersión para el modelo de distribución gamma) usando el paquete *DHARMA* (Hartig, 2020). Los tres tipos de análisis de asociación se realizaron con las cuatro bases de datos: general o BDG, *N. antarctica* o BDA, *N. dombeyi* o BDD y *N. pumilio* o BDP. Para la base de datos general se emplearon los 4 fenotipos (especie, haplotipo, DP y DD) y para las bases de datos de cada especie se analizaron los fenotipos haplotipo, DP y DD.

Las asociaciones genotipo-fenotipo se realizaron siguiendo tres métodos con enfoques distintos: modelos lineales mixtos usando el programa Tassel (Bradbury *et al.*, 2007), análisis de componentes principales usando el paquete *pcadapt* de R (Privé *et al.*, 2020) y la identificación de loci con valores atípicos de F_{ST} usando el paquete *fsthet* de R (Flanagan & Jones, 2017). Los fenotipos DP y DD se analizaron únicamente usando el enfoque de modelos lineales mixtos debido a que las otras metodologías de análisis requieren el agrupamiento de individuos en grupos y estos dos fenotipos son variables numéricas continuas. El modelo lineal mixto propuesto para el análisis de asociaciones genotipos-fenotipo incluyó los genotipos y los cinco ejes de un análisis de componentes principales como variables explicativas de efectos fijos y una matriz de parentesco estimada a partir del número de alelos de cada locus como variable de efectos aleatorios. Estas nuevas variables (PCA y matriz de parentesco) aumentan el poder del análisis ya que dan cuenta de los parecidos debidos al parentesco entre los individuos. Cada fenotipo fue analizado de forma independiente como variable respuesta de un modelo distinto. El paquete *pcadapt* usado para el enfoque PCA convierte los genotipos a números asignando valores de 0 y 1 a los dos tipos de homocigota y 0.5 a los heterocigotas. Los componentes principales de interés se seleccionaron buscando que el ordenamiento de las muestras recupere los grupos “especie” o “haplotipo”. Finalmente se seleccionaron los marcadores SNP que se correlacionan de forma significativa con estos ejes. Para corregir por el efecto de las comparaciones múltiples, los valores p proporcionados por los programas *Tassel* y *pcadapt* fueron convertidos a valores q ($\alpha=0.1$) usando el paquete *q-value* de R (Storey

et al., 2022). El paquete *fsthet* usa los cuartiles suavizados de la distribución empírica de F_{ST} -heterocigosis para detectar *loci* con valores atípicos. El método tiene la desventaja de que permite identificar loci en base a un umbral de confianza (5% de los valores serán atípicos con un nivel de confianza del 95%) pero no requiere asumir ningún tipo de distribución o modelo de evolución. Los valores de F_{ST} se calcularon usando la metodología de Wright (Wright, 1943) y se fijó un umbral del 95% de confianza. Unificamos los resultados de las tres estrategias buscando marcadores detectados por al menos dos métodos usando el paquete de R *VennDiagram* (Chen & Boutros, 2011). Finalmente, confeccionamos una base de datos de marcadores “neutrales” o no asociados a fenotipos filtrando todos los marcadores detectados por cualquier método para todos los fenotipos usando un umbral de significación más permisivo ($\alpha=0.3$). Este procedimiento se llevó a cabo con las cuatro bases de datos originales (general y para las tres especies) y se generaron nuevas matrices de marcadores SNP asociados a cada fenotipo en formato VCF (*Variant Call Format*) que fueron usadas para los análisis de genómica de poblaciones y para el anotado funcional.

Diversidad genética y estructuración poblacional

Los análisis de diversidad genética y estructuración poblacional se llevaron a cabo en paralelo con los marcadores asociados a los cuatro fenotipos con los que trabajamos (especies, haplotipos, DP y DD) y los no asociados a ninguno de ellos. Los análisis se repitieron con los marcadores derivados de las cuatro bases de datos: general, *N. pumilio*, *N. antarctica* y *N. dombeyi*. Definimos especies o haplotipos como poblaciones según la relevancia del tipo de agrupamiento para cada conjunto de marcadores. Para trabajar con los paquetes diseñados para estudios poblacionales convertimos los archivos en formato VCF a formato *genind*, empleado para almacenar genotipos de individuos junto con información sobre la estructuración poblacional de la muestra, ploidía y los nombres de individuos y loci (*adegenet*; Jombart & Ahmed, 2011).

Estimamos parámetros de diversidad y equitatividad usando la función *poppr* del paquete homónimo (Kamvar *et al.*, 2014). Los parámetros de diversidad combinan medidas de riqueza (número de genotipos por locus en una población) y equitatividad

(grado de uniformidad de las frecuencias de los genotipos de una población). Una mayor diversidad implica una mayor riqueza o una mayor equitatividad: más genotipos y/o menor dominancia de algunos de ellos. Para evaluar la diversidad calculamos diversidad de Nei o heterocigosis esperada (Nei, 1978) y diversidad de Shannon-Weiner (Shannon, 1948). El índice de Shannon-Weiner permite distinguir entre poblaciones que poseen el mismo número de genotipos por locus pero difieren en su dominancia (equitatividad) y es más sensible a la pérdida de variantes raras que la heterocigosis y es más informativo que las medidas de riqueza para describir la variabilidad genética de las poblaciones. Para estudiar la equitatividad calculamos un parámetro conocido como E5 (Ludwig & Reynolds, 1988). Este estimador de la equitatividad se calcula como el cociente de dos índices de diversidad: G (Stoddart & Taylor, 1988), que da más peso a los genotipos más abundantes, y $N1=e^H$ donde H es el índice de Shannon y Weiner, que da más peso a los genotipos más raros. Este índice E5 es menos sensible al tamaño poblacional que otros estimadores de la equitatividad porque al ser un cociente entre estimadores de diversidad, el efecto del tamaño poblacional se cancela. Los valores de E5 convergen en cero a medida que algún genotipo se hace más dominante. Todos los índices anteriormente mencionados fueron calculados dentro de cada población y para el conjunto total de individuos. Los marcadores derivados de la base de datos general fueron evaluados agrupando a los individuos en poblaciones según su especie y según su haplotipo. En el caso de los marcadores derivados de las bases de datos especie-específicas, los individuos fueron combinados en grupos de poblaciones según su haplotipo, es decir grupo norte y sur.

La estructuración poblacional fue analizada usando el índice de fijación F_{ST} de Wright (1948). Este índice cuantifica la reducción de la heterocigosis respecto de lo esperado para poblaciones panmícticas en un nivel de la jerarquía poblacional relativo a otro más inclusivo. Establecimos la significación estadística de los valores de este índice mediante intervalos de confianza de bootstrap (1000 réplicas) del 95%. Los valores del estadístico F_{ST} y sus intervalos de confianza se estimaron usando el paquete de R *hierfstat* (Goudet, 2005). Los marcadores derivados de la base de datos general fueron evaluados agrupando a los individuos en poblaciones según su especie

y según su haplotipo. En el caso de los marcadores derivados de las bases de datos especie-específicas, los individuos fueron agrupados según su haplotipo.

Análisis Multivariado

Analizamos los marcadores asociados a especies, a haplotipos del cloroplasto y los no asociados o neutrales usando una técnica de ordenamiento multivariado llamada Análisis Discriminante Lineal. Esta técnica requiere la existencia de grupos definidos *a priori*, especie y haplotipo en este caso, y construye nuevos ejes (funciones discriminantes) que maximizan la separación entre los grupos propuestos. Este tipo de análisis tiene la ventaja de que, a partir de las mencionadas funciones discriminantes, permite estimar la probabilidad de cada individuo de ser asignado a cada grupo en base a su genotipo para un conjunto de marcadores dado. Analizamos los marcadores asociados a las variables fenológicas DP y DD mediante un Análisis de Correspondencia que realiza un ordenamiento de las muestras basado en los datos genéticos, pero no requiere agrupamientos *a priori*. Usamos los paquetes *MASS* (Venables & Ripley, 2002) para el análisis discriminante, *FactoMineR* (Lê *et al.*, 2008) para el análisis de correspondencia y *Tidyverse* (Wickham *et al.*, 2019) para manipulación de tablas de datos y confección de gráficos.

Anotado funcional

Realizamos un anotado funcional putativo de todos aquellos loci detectados como asociados a un fenotipo particular. Este anotado se realizó utilizando Blast2GO v6.0.3 (Conesa *et al.*, 2005). En el software Blast2GO realizamos búsquedas BLASTX contra la base de datos de proteínas del NCBI *Non-Redundant* (NR) con un valor E <0,001. A continuación, realizamos un mapeo para asignar términos de ontología génica (GO) relacionados con procesos biológicos, función molecular y componente celular a los aciertos obtenidos tras la búsqueda BLASTX (Gotz *et al.*, 2008). La lista de términos GO relacionados con procesos biológicos asociados a los loci bajo selección se enriqueció mediante búsquedas BLASTN contra la base de datos de la colección de nucleótidos del NCBI (nr/nt), y la herramienta de búsqueda de similitud de secuencias de la base de datos del Instituto Europeo de Bioinformática EMBL-EBI (Madeira *et al.*,

2019). Construimos una nueva serie de términos asociados a funciones biológicas sumando búsquedas manuales en la literatura científica y en bases de datos funcionales y de expresión como *uniprot.org* y *arabidopsis.org* (Berardini *et al.*, 2015). Todos los gráficos fueron realizados con el paquete de R *ggplot2* en el entorno R (Wickham *et al.*, 2019).

RESULTADOS

Obtención de SNP y filtrado de las bases de datos

La secuenciación GBS de tipo single-end rindió un total de 248901409 lecturas (2592723 lecturas/individuo) con un largo promedio de 101pb y una calidad promedio de 35.68 (phred score) y un 95.21% de lecturas con phred score mayor o igual a 30 (Tabla S3.3). Obtuvimos un total de 146642 marcadores SNP para BDG, 67763 para BDA, 96515 para BDD y 71112 para BDP. Los filtros y la imputación empleados nos permitieron retener el 28.7% de los SNPs obtenidos para *N. antarctica* (19452 SNPs), un 16.7% de los obtenidos para *N. dombeyi* (16102 SNPs) y un 27.3% de los obtenidos para *N. pumilio* (19420). La pérdida de información durante el filtrado probablemente sea consecuencia de la aleatoriedad del muestreo del genoma de cada individuo en el que se basa la técnica y a variaciones entre individuos en la calidad de la secuencia de cada fragmento. La base de datos general que combina las 3 especies retuvo únicamente un 7.2% (10530 SNPs) de los marcadores identificados ya que gran parte de ellos, al ser especie específicos, no pasaron nuestro filtro de estar presente en al menos el 90% de las muestras (Tabla 4.2).

Asociaciones genotipo-fenotipo

Utilizando las secuencias ITS, el par *N. pumilio-N. dombeyi* mostró la máxima distancia (0.0139) seguido por el par *N. antarctica-N. dombeyi* con una distancia 50% menor que el anterior (Tabla S4.1). La distancia máxima entre pares de haplotipos mediante secuencias del cloroplasto se obtuvo entre los haplotipos Sur y Norte 1 (0.0166), seguida por la distancia entre haplotipos del norte que resultó ser un 60% menor. Es interesante remarcar que la distancia máxima entre haplotipos es casi un 20% mayor

que la distancia máxima entre especies. Los valores numéricos predichos para inicio de las fases terminales de la floración FloIV y PA (DP) y sus requerimientos térmicos (DD) se muestran en la tabla suplementaria S4.2. Los individuos resaltados en gris claro y marcados con un asterisco en dicha tabla fueron incluidos en los relevamientos fenológicos a campo y en la construcción de los modelos de DP y DD del capítulo 2. Comparamos los valores predichos para estos individuos con los obtenidos por el modelo para verificar la validez de los modelos predictivos usados.

Las figuras suplementarias S4.2 y S4.3 muestran los gráficos *Manhattan* por los valores p de las asociaciones por MLM y PCA respectivamente. En el caso de la base de datos general (BDG), los métodos MLM y PCA detectaron la mayor cantidad de marcadores en común y gran cantidad de marcadores fueron detectados únicamente por el método F_{ST} que podría estar detectando marcadores asociados a estructuración poblacional no relacionada con los fenotipos elegidos. En el caso de BDA y BDP, el método F_{ST} permitió detectar una gran cantidad de marcadores que no fueron identificados por los otros métodos. Esto puede deberse a que la densidad de nuestro muestreo de la zona de contacto secundario entre linajes fue un poco menor para *N. pumilio* y a la alta tasa de reproducción asexual que exhibe *N. antarctica* gracias a su capacidad de rebrote. Por estos motivos decidimos trabajar con marcadores seleccionados por al menos dos de los tres métodos (Figura 4.2; Tabla 4.3). Seleccionamos 739 (7% del total) marcadores de la base de datos general asociados a especies, 46 marcadores asociados a haplotipos de cloroplasto, 52 asociados a días hasta el inicio de una fase (DP) y 149 (1.42% del total) asociados a sus requerimientos térmicos (DD). Dentro de BDA (*N. antarctica*) identificamos el mayor número de marcadores asociados a nuestros fenotipos con un 3.8% del total (747 de 19452) asociados al número de días necesarios para el inicio de la floración (DP). Para BDD y BDP los marcadores asociados representaron entre un 0.04% del total (BDP asociados a DD) y un 0.97% del total (BDD asociados a DP) (Tabla 4.4). Para BDG, 19 de los SNPs asociados a variables fenológicas son comunes entre DD y DP y 5 fueron detectados como asociados a especies, pero solamente uno de ellos resultó asociados a linajes de cloroplasto. No detectamos marcadores simultáneamente asociados a linajes de cloroplasto y a variables fenológicas en las bases de datos especie-

específicas. En el caso de BDG, la base de datos de *N. pumilio*, tampoco detectamos marcadores comunes a los fenotipos DP y DD (Figura S4.1).

Diversidad genética y estructuración poblacional

Los valores de los índices de diversidad y equitatividad calculados a partir de BDG anticipan la estructuración poblacional esperada para una muestra compuesta de individuos pertenecientes a distintas especies y linajes de cloroplasto (Figura 4.3). Detectamos una equitatividad de casi el 90% para los marcadores asociados a especies y a haplotipos del cloroplasto, indicando que las frecuencias de cada genotipo tienen distribución uniforme. En el caso de los marcadores asociados a especies, la equitatividad dentro de cada especie disminuyó fuertemente tomando valores de 0.44, 0.45 y 0.50 para *N. antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio* respectivamente, comparables a los valores obtenidos para cada especie y para la muestra total con los SNPs no asociados a fenotipos. Lo mismo ocurre con el índice de Shannon y la diversidad de Nei que muestran valores muy altos para la población total (0.69 y 0.47 respectivamente) pero valores muy bajos (<0.05) para cada especie con máximos para *N. pumilio* indicando la gran uniformidad de los genotipos dentro de cada especie. Los marcadores asociados a haplotipos del cloroplasto muestran un patrón similar, pero con valores más altos para todos los indicadores medidos, con valores dentro de cada haplotipo en el rango de 0.17 a 0.4 para los parámetros de diversidad y cercanos a 0.6 para la equitatividad, con valores mayores para los haplotipos Norte. Los marcadores no asociados a los fenotipos estudiados no muestran diferencias entre la población total y los agrupamientos por especie o haplotipo de cloroplasto, con valores máximos de diversidad y equitatividad para *N. antarctica* o para los individuos de haplotipo Norte (Figura 4.3).

Los parámetros de diversidad estimados a partir de las bases de datos de cada especie muestran valores del índice de Shannon, diversidad de Nei y equitatividad mayores a los obtenidos con BDG para las tres especies. Para este conjunto de marcadores no asociados a fenotipos *N. antarctica* es la especie más variable, *N. pumilio* es la menos variable, seguida por *N. dombeyi* con valores muy similares *N. pumilio*. Este conjunto de marcadores neutrales tampoco permite distinguir diferencias

en la diversidad o equitatividad de las subpoblaciones Norte o Sur ni respecto de la población total. Los marcadores asociados a haplotipos CP muestran diferencias entre poblaciones Norte y Sur principalmente las poblaciones norte de *N. dombeyi* que muestran mayor diversidad. Por otro lado, *N. antarctica* y *N. pumilio* resultaron igualmente diversas con valores intermedios a los haplotipos norte y sur de *N. dombeyi* (Figura 4.4).

Los valores máximos de divergencia se obtuvieron con los marcadores asociados a especies y con los marcadores asociados a haplotipos del cloroplasto (BDG). Estos marcadores muestran una divergencia media del 98% entre especies y del 82% entre haplotipos de cloroplasto. Las asociaciones con la fenología indican una divergencia significativamente más alta que cero en todos los casos a nivel especie y nula o muy cercana a cero a nivel de haplotipos. Los marcadores no asociados a fenotipos muestran una divergencia entre especies significativamente mayor que cero pero mucho menor que la obtenida con los marcadores asociados a especies pero muestran conectividad casi total entre haplotipos de cloroplasto ($F_{ST}=0.0042$) (Tabla 4.5). El análisis de estructuración poblacional basado en las bases de datos especie específicas muestra una estructuración poblacional Norte-Sur alta, aunque menor a la obtenida con BDG, para los marcadores asociados a haplotipos ADNcp con valores máximos para *N. pumilio* y *N. dombeyi* (67% y 60% respectivamente) y mínimo para *N. antarctica* (47%). Los marcadores asociados a variables fenológicas muestran que no hay límites al flujo génico ($F_{ST}=0$) entre linajes del Norte y del Sur y de la misma manera los marcadores no asociados a fenotipos muestran máxima conectividad entre poblaciones Norte y Sur.

Ordenamiento Multivariado

El análisis discriminante de los marcadores asociados a especies muestra tres grupos bien definidos, sin individuos de posición intermedia y ampliamente separados (Figura 4.5). La función discriminante 1 (79% de la variación) establece la máxima distancia entre *N. pumilio* y *N. dombeyi*, dejando a *N. antarctica* en una posición intermedia mientras que la función discriminante 2 (21% de la variación) muestra gran similitud entre *N. dombeyi* y *N. pumilio*. En el caso de los marcadores no asociados a fenotipos

devuelve grupos también definidos pero con individuos intermedios y distancias entre grupos dos órdenes de magnitud menores que en el caso de los marcadores asociados a especies. Las probabilidades de asignación a cada especie nos permitieron identificar, en base a marcadores no asociados a fenotipos, individuos con una probabilidad alta de asignación a una especie distinta a la asignada en base a caracteres diagnósticos no ambiguos que se emplearon durante el muestreo. Esta probabilidad de asignación se puede interpretar como proporciones de hibridación y pudimos encontrar 10 individuos cuyos genotipos no asociados a fenotipos muestran señales fuertes de hibridación a pesar de que sus genotipos asociados a especies los muestran fenotípicamente como individuos no híbridos (Figura 4.6). Cinco individuos de *N. antarctica* mostraron una alta probabilidad de asignación a especies distintas a la propia. Los individuos NN1TUF04 y NN1YEG10 muestran una probabilidad de asignación muy alta a *N. dombeyi* y *N. pumilio*, pero una probabilidad de asignación a *N. antarctica* baja e incluso nula en el caso NN1YEG10. NS0FUT02 puede ser asignado a *N. dombeyi* con la misma probabilidad que a *N. antarctica*. NS0MLE02 y NS0NEI25 tienen una probabilidad de asignación a *N. pumilio* alta que supera la probabilidad de asignación a la especie que pertenecen. Dos individuos de *N. dombeyi*, CN1PUEV4 y CN4GUTV5 tienen probabilidad cero de asignación a la especie a la que pertenecen. El primero tiene una probabilidad de asignación a *N. antarctica* mayor al 75% y el segundo, una probabilidad de asignación a *N. pumilio* mayor al 75%. Tres individuos de *N. pumilio* poseen muy bajas o nulas probabilidades de asignación a dicha especie. LN2MOR05 y LN2NAT22 tiene una probabilidad de pertenencia a *N. antarctica* mayor al 70%; LN1MOR01 puede ser asignado a *N. dombeyi* o *N. antarctica* con igual probabilidad (Figura 4.6, panel inferior).

Los marcadores asociados a haplotipos del cloroplasto separan dos grupos bien definidos, uno correspondiente al haplotipo Sur y otro que agrupa los haplotipos Norte 1 y Norte 2. Estos grupos están bien definidos, su distancia es comparable a la obtenida entre especies para marcadores neutrales y aparecen algunos individuos de distribución intermedia. Dentro del grupo de haplotipos Norte se distinguen los grupos Norte 1 y Norte 2, difusos y con individuos intermedios. Los marcadores no asociados a fenotipos muestran grupos aún más difusos y cercanos que lo descrito más arriba

(Figura 4.7 A, C). En análisis hecho con los marcadores derivados de BDA (*N. antarctica*) la primera función discriminante explica el 95% de la variación y separa dos grupos que se ven difusos y con individuos de posición intermedia: uno mezcla haplotipo del cloroplasto Norte 1 y Sur, y otro grupo que reúne a los individuos Norte 2. Para BDD (*N. dombeyi*) identificamos dos grupos, uno Norte y otro Sur, similares o los obtenidos para BDG pero con una separación entre grupos varios ordenes de magnitud mayor. Finalmente, en el análisis hecho sobre BDP (*N. pumilio*) la función discriminante 1 (90% de la variación) agrupa a los individuos Norte 2 por un lado y a los Sur por el otro, y la función discriminante 2 (10% de la variación) aísla al único individuo con haplotipo Norte 1 (Figura 4.7, B).

El análisis derivado de BDG para asociación con haplotipos CP muestra cero hibridaciones en los individuos de haplotipo Sur, la presencia de genotipos típicos del haplotipo Norte 1 en los individuos Norte 2, y una mezcla de alelos típicos de Norte 1 y Norte 2 en la mayoría de los individuos del haplotipo Norte 1. Excepciones a este patrón general son el *N. pumilio* LN2YEG01 y el *N. antarctica* NN1MLE04, haplotipos Norte 2 y Norte 1 respectivamente, ambos asignados al grupo Sur y ubicados en la región de contacto secundario entre haplotipos particulares de sus respectivas especies. Los marcadores no asociados a fenotipos muestran que la especie con mayor hibridación entre linajes es *N. dombeyi*, particularmente en la región de Lago Puelo (Chubut) en donde se ubica la región de contacto secundario entre haplotipos Norte y Sur, pero también en la zona del Lago Gutiérrez (Río Negro) en la que individuos pertenecientes al haplotipo Norte 2 exhiben altas probabilidades de asignación al haplotipo Sur. Estos marcadores “neutrales” brindan más información sobre algunos de los individuos identificados como híbridos interespecíficos en el párrafo anterior. NS0FUT02 (hibridado con *N. dombeyi*) y NS0MLE02 (hibridado con *N. pumilio*), ambos pertenecientes al haplotipo Sur, muestran hibridación con los haplotipos del Norte; CN1PUEV4, un *N. dombeyi* Norte 1 asignado a *N. antarctica*, muestra una probabilidad de asignación a Norte 2 de casi el 100%; NN1TUF04 (coihue lenga) y NN1YEG10, ambos *N. antarctica* Norte 1 asignados a *N. dombeyi* y *N. pumilio*, fueron asignados al grupo Sur con una probabilidad mayor al 90%; CN4GUTV5, un *N. dombeyi* Norte 2 asignado a *N. pumilio*, fue asignado al grupo Sur y en segundo lugar al grupo Norte 1

(Figura 4.8). Los patrones generales descritos para BDG se mantiene al analizar asignación a grupos de cloroplasto con las bases de datos especie específicas con la excepción de LN2YEG01 que con este conjunto de datos aparece bien clasificado y NS0SIL07, un *N. antarctica* de la región de Lago Puelo, que aparece clasificado como Norte 1 (Figura 4.9).

El análisis de correspondencia de los marcadores asociados a las variables fenológicas ordena los individuos según su especie (Figura 4.10). En el caso de los marcadores asociados a los días hasta el inicio de la floración (DP), las dimensiones 1 y 3 suman un 46% de la variación y permiten resolver las especies; las dimensiones 2 y 3 (20% de la variación) resuelven, aunque de manera difusa, los haplotipos de cloroplasto (Figura 4.10, A-D). El ordenamiento para los marcadores asociados a requerimientos térmicos (DD) resuelve especies con sus dimensiones 1 y 2 (64% de la variación) pero no permite distinguir haplotipos de cloroplasto (Figura 4.10, E y F). En concordancia con los marcadores derivados de BDG, el ordenamiento por análisis de correspondencia de los marcadores asociados a fenología (DP y DD) tampoco agrupa individuos según haplotipos de cloroplasto (Figura 11).

Análisis Funcional

Logramos identificar funciones moleculares, procesos biológicos y localización subcelular del producto génico para aproximadamente un tercio de los marcadores asociados a los fenotipos estudiados. La base de SNPs BDG cuenta con un 40% y 50% de marcadores informativos asociados a DP y DD respectivamente, y pudimos obtener información sobre el 33% de los marcadores asociados a especies. En cuanto a los marcadores asociados a haplotipos del cloroplasto, pudimos identificar funciones biológicas para 35% de los marcadores de BDG, 20% de los marcadores de BDA, 37% de los marcadores de BDD y 23% de los marcadores de BDP (Tabla 4.7). Realizamos un curado manual del anotado automático de todos los marcadores asociados a fenotipos de BDG y de los marcadores asociados a haplotipos de cloroplasto de las tres bases de datos especie específicas BDA, BDD y BDP. A partir del curado manual de los procesos biológicos creamos una serie de nuevos términos con dos niveles jerárquicos en el que el nivel interno detalla lo que resume el externo. Entonces, por ejemplo,

dentro de la categoría “Desarrollo” encontramos subcategorías como desarrollo vegetativo, desarrollo floral o germinación entre otras (Tablas 4.8 a 4.11).

Las funciones biológicas más relevantes para explicar la divergencia entre especies muestran una clara dominancia de la percepción de estímulos y el desarrollo (Figura 4.12, panel superior). Dentro de esta categoría se destacan en primer lugar los genes relacionados con las respuestas desencadenadas por hormonas, generalmente relacionadas con procesos de desarrollo y con la integración de las señales producidas por diversos estímulos externos e internos. Los genes relacionados con la percepción de estímulos externos (bióticos y abióticos) ocupan una posición también importante junto con los genes involucrados en la respuesta al estrés. En segundo lugar, se encuentran los genes relacionados con el desarrollo, tanto celular como morfológico. En esta categoría destacan los genes relacionados a la diferenciación celular y el desarrollo vegetativo pero también genes relacionados con el desarrollo floral y el desarrollo post-embriionario (primeras etapas del desarrollo luego de la germinación). También encontramos genes relacionados con la vernalización y con la germinación. Tercera en importancia según su frecuencia está la regulación de la expresión genética dentro de la que encontramos principalmente mecanismos de regulación a nivel de proteína (modificación de proteínas) pero también regulación post transcripcional por mecanismos de degradación de ARN mensajero (PTGS) y genes relacionados con la regulación epigenética de la expresión del ADN que se basa en el bloqueo de la transcripción mediante reordenamientos de la cromatina o metilación de bases nitrogenadas. Detectamos también, en menor abundancia pero aun así importantes, genes relacionados con la autoincompatibilidad reproductiva y con la polinización, y genes relacionados con la progresión de ritmos circadianos. Finalmente detectamos funciones de transporte de productos (nutrientes, organelas, vesículas), organización celular (homeostasis de calcio, génesis de membrana y organelas) y vinculados al metabolismo energético a través de la fotosíntesis y la respiración. La distribución de frecuencias de las funciones asociadas a haplotipos del cloroplasto es uniforme y no aparece dominada por ninguna función particular. Encontramos una mayor cantidad de productos génicos de función desconocida y relacionados con el metabolismo energético (energía) que en el caso de asociaciones a especie. La frecuencia de

funciones asociadas a desarrollo, percepción de estímulos, expresión genética y fotoperiodicidad es al menos un orden de magnitud menor que en el caso de asociaciones a especies. Para este conjunto de marcadores no identificamos ninguna función relacionada con la reproducción (Figura 4.12, panel inferior). Las funciones predominantes en los marcadores asociados a fenología son la percepción de estímulos y el desarrollo, con una marcada dominancia de estas dos funciones en las asociaciones a días hasta el inicio de una fase (DP) (Figura 4.13). Identificamos también genes con funciones vinculadas a la fotoperiodicidad específicamente con el mantenimiento de ritmos circadianos, es decir con la percepción del fotoperíodo.

DISCUSIÓN

Las especies que habitan un paisaje común a menudo se enfrentan a ambientes selectivos similares. En contextos de simpatría, la capacidad de los organismos para adaptarse a estos entornos puede ser en gran medida específica de la especie y se vincula con los límites que su nicho ecológico establece a la norma de reacción de los fenotipos bajo selección. Cuantificar las respuestas adaptativas únicas y compartidas entre especies dentro de los paisajes puede mejorar nuestra comprensión de los patrones de biodiversidad moderados por el paisaje. Aquí probamos en qué medida las poblaciones de tres especies coexistentes y filogenéticamente relacionadas difieren en la fuerza y la naturaleza de la divergencia neutral y adaptativa a lo largo de gradientes ambientales de elevación y cuya estructura genética ha sido modelada en el pasado por fuerzas de vicarianza antiguas. *Nothofagus antarctica*, *N. dombeyi* y *N. pumilio*, especies del subgénero *Nothofagus*, se muestran como entidades claramente diferenciadas cuando se las analiza en base a marcadores adaptativos vinculados a fenómenos selectivos relacionados con sus nichos altamente diferenciados. Proponemos que los marcadores asociados a variables fenológicas permiten estimar el grado de divergencia entre especies debido a barreras reproductivas previas a la polinización causadas por variaciones en el número de días transcurridos hasta el inicio de las etapas de liberación de polen y la antesis de flores pistiladas ($F_{ST}(DP)=0.54$) y los requerimientos térmicos para esto ($F_{ST}(DD)=0.42$). Los marcadores asociados a

especies, por el contrario, podrían reflejar el efecto total de las barreras al flujo génico entre especies ($F_{ST}=0.98$). La comparación entre estos valores se puede interpretar como el peso relativo del aislamiento pre y post polinización en la divergencia entre especies. De este modo, podemos pensar que entre un 43% y un 55% de la divergencia total entre especies se debe a los efectos de barreras de aislamiento reproductivo previas a la polinización, específicamente barreras fenológicas. Esto concuerda con las fuertes asincronías fenológicas en términos de días y de tiempo térmico reportadas entre poblaciones simpátricas de *N. pumilio* y *N. antarctica* en bosques de altura y entre *N. antarctica* y *N. dombeyi* en bosques de menor elevación (Capítulo 2). El aislamiento reproductivo fenológico, una barrera intrínseca pre-polinización, es frecuente en otros sistemas de plantas simpátricas que comparten polinizadores. La competencia polínica, especialmente cuando limita el desarrollo de semillas y frutos, puede favorecer el desplazamiento fenológico en simpatría. En regiones donde la estacionalidad muestra menores variaciones en el fotoperiodo y la temperatura, el régimen de precipitaciones juega un rol central en el control ambiental de la fenología. Por ejemplo, en poblaciones simpátricas de especies de cactus columnares que comparten el ensamble de polinizadores, el desacople de las fenologías florales se asocia al impacto diferencial de la lluvia sobre la producción de flores en cada especie (Petit, 2001). La variación estacional de las precipitaciones actúa como una fuerza selectiva que modela el comportamiento fenológico de las distintas especies. Especies de leguminosas simpátricas de Brasil muestran una asociación fuerte entre el desacople de las fenologías de las distintas especies y sus hábitos, especialmente por su efecto sobre la capacidad de retención de agua y nutrientes. (Madeira & Fernandes, 1999).

El desplazamiento de caracteres, es decir la modificación de caracteres reproductivos en poblaciones de especies simpátricas filogenéticamente cercanas o muy similares, es aceptado como un mecanismo que facilita la coocurrencia, el aislamiento reproductivo y la divergencia ecológica y evolutiva (Coyne & Orr, 2004). El desplazamiento fenológico normalmente se asocia con el distanciamiento de las fenologías en simpatría pero también se puede manifestar como convergencia fenológica dependiendo de la naturaleza de las interacciones interespecíficas y de la

aptitud de los híbridos (Grant, 1972). Nuestros resultados, tanto de este capítulo como del capítulo 2, en concordancia con lo mostrado para otros complejos de especies simpátricas en otros ambientes, muestran que la diversidad de respuestas fenológicas a nivel de género y de especie puede ser muy alta. Esto sugiere que el comportamiento fenológico de una especie es una respuesta adaptativa temprana a presiones ambientales que permite la divergencia simpátrica. Esto se opone drásticamente a la propuesta de que los patrones fenológicos son conservados en géneros ampliamente distribuidos y que la variación fenológica que se observa se debe a la relajación de la selección natural esperable en fenotipos neutrales (Ollerton & Lack, 1992). Por otro lado, el aislamiento fenológico puede ser irrelevante y tal vez selectivamente neutro cuando existen fuertes barreras reproductivas extrínsecas pre-polinización como puede ser el aislamiento ecogeográfico por diferenciación de nicho o la especialización de polinizadores (Baack *et al.*, 2015). Una revisión basada en el análisis 110 especies de polinización zoófila del este de Estados Unidos evidencia una señal filogenética asociada el tiempo para la floración y la sensibilidad de las especies a la temperatura (Park *et al.*, 2022). Es interesante el hallazgo de que el desplazamiento fenológico es poco común entre angiospermas zoófilas simpátricas, pero la convergencia fenológica es típicamente más fuerte entre pares de especies que florecen en fechas cercanas. En especies zoófilas, la convergencia fenológica en simpatría puede favorecer la acumulación de polinizadores o la reducción del impacto de la herbivoría sobre las estructuras reproductivas, especialmente si las barreras reproductivas post polinización son fuertes (Park *et al.*, 2022). Las especies de *Nothofagus*, interfértiles, de polinización anemófila y baja capacidad de dispersión por semillas, podrían verse favorecidas por la divergencia fenológica en simpatría. Como ocurre con el par simpátrico *N. pumilio*/*N. antarctica*, los sitios de simpatría para estas especies suelen ser ecoclimáticamente más adecuados para una de las especies (*N. pumilio*) y extremo para su compañera (*N. antarctica*). En este contexto de aislamiento reproductivo incompleto, la divergencia fenológica podría evitar la formación de híbridos mal adaptados en comparación con sus parentales, reduciendo así el gasto reproductivo de los individuos con fenologías más extremas que no se superponen con la de los individuos de la especie vecina.

El análisis funcional de la diferenciación entre especies se puede utilizar para encontrar firmas de la selección natural. Las especies de *Nothofagus* poseen nichos ecológicos bien diferenciados que se traducen en propiedades fisiológicas, fenológicas y morfológicas muy distintivas de cada especie (Rusch, 1993; Veblen *et al.*, 1996; Premoli & Brewer, 2007). Apoyando la propuesta de adaptación ecológica y alocronía como mecanismos de divergencia en simpatria (Juri & Premoli, 2021; capítulo 2) las funciones biológicas principalmente responsables de la divergencia entre especies son la percepción de estímulos externos, la resistencia a patógenos, la regulación de la expresión genética, el control hormonal del desarrollo y la regulación de la respuesta fotoperiódica. Todas estas funciones se pueden relacionar con el desarrollo de barreras fenológicas pre-polinización y con la sincronización de los ciclos de vida de las distintas especies en contexto de sus nichos ecológicos. Detectamos, con menor peso relativo, pero de gran importancia biológica, SNPs relacionados con el control de la autoincompatibilidad, la polinización y el desarrollo de gametas. Funciones biológicas relacionadas con la formación de la cutícula de las hojas, vinculable a la caducidad/no caducidad de las hojas de cada especie ya que en esta tesis incluimos el análisis de especies deciduas como *N. antarctica* y *N. pumilio* y la siempreverde *N. dombeyi*. Funciones biológicas relacionadas con el transporte de metales típicos de los cursos de agua de la zona, vinculables con el hábito ripario de *N. dombeyi* (Juárez *et al.*, 2016) y funciones relacionadas con la nodulación de simbiontes de raíz se podrían relacionar con las diferencias en el tipo de suelo y las interacciones diferenciales de cada especie con sus microorganismos (Fernández *et al.*, 2022).

Los marcadores “neutrales”, es decir no asociados a fenología, especies o linajes de cloroplasto, muestran el aislamiento mínimo, aunque significativamente distinto de cero ($F_{ST}=0.24$) entre nuestros conjuntos de datos. Esta divergencia neutral moderada podría reflejar otros causantes de estructuración poblacional no vinculados con procesos selectivos como pueden ser el aislamiento por distancia o simplemente el efecto de la deriva genética dentro de grupos reproductivamente aislados, esperable para especies de alta especialización de nicho y baja dispersión por semilla como ocurre dentro de subgénero *Nothofagus*. En contraste con nuestros resultados, dos subespecies reproductivamente compatibles de la orquídea *Gymnadenia conopsea* que

pueden ocurrir en simpatria, comparten algunos componentes de su ensamble de polinizadores, pero se diferencian por poseer floración temprana o tardía. Estudios basados en marcadores neutrales isoenzimáticos muestran muy bajas tasas de flujo genético entre subespecies indicando la fuerza de las barreras fenológicas (Soliva & Widmer, 1999). Como se menciona en el capítulo 2, las barreras fenológicas entre especies del subgénero *Nothofagus* son permeables y flexibles, es decir las distancias temporales entre pares de especies simpátricas varían con la temperatura y con la elevación. Esta permeabilidad podría estar reflejada en el moderado flujo genético neutral entre especies detectado a partir de marcadores SNP neutrales.

El aislamiento neutral medio reportado aquí entre las tres especies de *Nothofagus* ($F_{ST}=0.24$) es menor al reportado entre *N. pumilio* y *N. antarctica* a partir de marcadores neutrales de microsatélite ($G_{ST}=0.335$) (Soliani *et al.*, 2015), probablemente dada la mayor cercanía filogenética entre el par *N. antarctica/N. dombeyi* que entre el par *N. pumilio/N. antarctica* ya que *N. pumilio* sería especie hermana del grupo formado por *N. antarctica* y las especies siempreverdes (Acosta & Premoli, 2010). Existen estudios que evidencian estructuración poblacional significativa dentro de cada especie del subgénero *Nothofagus*, incluso a escala geográfica reducida, con valores de divergencia intraespecífica similares a o incluso mayores a nuestro F_{ST} entre especies ($F_{ST}=0.24$, SNP neutrales). Por ejemplo, se reportaron valores de F_{ST} de 0.18 entre ecotipos de *N. antarctica* (isoenzimas, Steinke *et al.*, 2008); G_{ST} de 0.303 entre poblaciones alopátricas de *N. antarctica* y valores de G_{ST} de 0.296 para *N. pumilio* (microsatélites, Soliani *et al.*, 2015). La literatura sobre *N. dombeyi*, especie restringida a ambientes riparios de baja elevación, muestra valores de aislamiento entre poblaciones de F_{ST} entre 0 y 0.087 a partir de isoenzimas (Premoli, 1996; Diaz, 2018) y de 0.039 a partir de SNP neutrales (Diaz, 2018) que indicarían que no habrían restricciones al flujo génico entre poblaciones. Las especies caducifolias, *N. antarctica* y *N. pumilio* habitan un gradiente ambiental extremo con grandes cambios de temperatura y precipitaciones en sus extremos altitudinales superior e inferior que explicarían los mayores valores de divergencia intraespecífica calculados para estas especies deciduas que para la siempreverde *N. dombeyi*.

Estos niveles de aislamiento intraespecífico reportados en la literatura del subgénero *Nothofagus*, altos para marcadores neutrales en especies de polinización anemófila, sugieren que la adaptación ecológica local juega un rol muy importante en el desarrollo de las barreras reproductivas dentro del subgénero *Nothofagus* y motoriza la divergencia tanto de especies como de poblaciones. La divergencia entre especies del subgénero *Nothofagus* es antigua y profunda, tanto que los marcadores neutrales permiten diferenciar especies (Figura 4.5). Sin embargo, se observan distintos niveles de mezcla entre especies en algunos individuos, especialmente para *N. antarctica* sugiriendo que el aislamiento reproductivo entre especies es incompleto y tal vez sea esta especie quien más eventos de hibridación ha vivido a lo largo de su historia evolutiva. La ecofisiología de *N. antarctica*, que le permite coexistir en simpatria con *N. pumilio* en el extremo altitudinal superior de su distribución (900-1000 msnm) y con *N. dombeyi* en el extremo altitudinal inferior (200-600 msnm), sumada a su permeabilidad genética dan apoyo a la hipótesis de Acosta y coautoras (2014) de que esta especie podría funcionar como una suerte de puente reproductivo entre *N. pumilio* y *N. dombeyi*, cuyas fenologías florales muestran máximo desplazamiento temporal y rara vez coexisten en simpatria (Juri & Premoli, 2021; capítulo 2). La divergencia entre haplotipos de cloroplasto tiene una componente adaptativa que se evidencia por la existencia de 46 marcadores SNP asociados a la variable haplotipo (BDG, $F_{ST}=0.8$ entre haplotipos de ADNcp), 16 de los cuales corresponden a regiones codificantes de distintos genes. Algunos de estos genes no tienen funciones biológicas conocidas que hayan sido reportadas en bases de datos (Tabla S4.5) pero en su mayoría (10/16) los productos génicos se localizan dentro de las mitocondrias y sus funciones biológicas se relacionan con la respiración celular pero también con la reparación del ADN y la homeostasis de Ca^{2+} que se vincula, entre otros procesos, con el crecimiento del tubo polínico (Steinhorst & Kudla, 2013). Entre los marcadores asociados a la variable “haplotipo” de las tres bases de datos especie-específicas pudimos detectar 82 con funciones biológicas conocidas: 17 de ellos con productos génicos en cloroplasto (relacionados con la fotosíntesis, el metabolismo de carbohidratos y el desarrollo plastidial), 22 con productos génicos de localización mitocondrial (principalmente relacionados a la respiración, la homeostasis de Ca^{2+} y el desarrollo mitocondrial) y 43

de ellos con localización distinta a cloroplastos y mitocondrias. Los genomas organelares (cloroplasto y mitocondria) incluyen muchos genes que tienen un efecto directo sobre el crecimiento de las plantas como pueden ser los relacionados con la respiración o con la fotosíntesis. El efecto de la selección natural sobre estos genes podría extenderse a todo el genoma organelar e incluso extenderse a lo largo de los genomas de especies capaces de hibridar como las del subgénero *Nothofagus*. Esta falta de neutralidad de cloroplastos y mitocondrias podría afectar de forma significativa la topología de los árboles filogenéticos y sesgar los estudios biogeográficos si se usa únicamente marcadores organelares, especialmente si el muestreo no es representativo del rango de distribución de las especies (Muir & Filatov, 2007). El complejo de especies interfértiles y parcialmente simpátricas *Silene latifolia* y *S. dioica* (Caryophyllaceae) es un ejemplo del efecto de estas barridas selectivas transespecíficas asociadas a mutaciones selectivas plastidiales en el que la divergencia entre especies no se recupera a partir de genes del cloroplasto pero si a partir de genes nucleares. A nivel de cada especie, la divergencia intraespecífica entre haplotipos usando marcadores asociados fue menor que con BDG (entre 46% y 67%) evidenciando una estructuración poblacional fuerte que no se recupera a partir de los marcadores SNP neutrales o no asociados a fenotipos lo que podría reflejar que la barrera por vicarianza antigua está siendo reforzada por la selección natural actuando sobre algunos genes plastidiales como fue demostrado en poblaciones de *N. dombeyi* a lo largo de su distribución geográfica completa (Fasanella *et al.*, 2023). El análisis funcional de los marcadores asociados a haplotipos de cloroplasto dentro de cada especie (Tabla S4.5) apoya esta propuesta ya que la gran mayoría de genes de localización organelar se vinculan con la respiración celular y la fotosíntesis, pero también aparecen funciones relacionadas con el desarrollo embrionario y postembrionario. Si obviamos la distinción por localización subcelular, el análisis funcional muestra el predominio de genes relacionados a la percepción de estímulos externos como la temperatura y humedad ambiente, ambas muy variables en el paisaje profundamente heterogéneo de los bosques cordilleranos de Patagonia norte. Están ausentes genes relacionados con la polinización y el desarrollo de gametas. Sin embargo, las fenologías reproductivas de cada especie están altamente sincronizadas

ya que los F_{ST} entre haplotipos de cloroplasto para sus loci asociados no difirieron significativamente de cero, manteniendo así la identidad de cada especie. Esto último concuerda con la alta sincronía fenológica encontrada entre poblaciones conespecíficas de elevación similar (Juri & Premoli, 2021; capítulo 2).

Aunque tan antigua y profunda como la divergencia entre especies, la divergencia entre haplotipos de cloroplasto no se recupera usando los marcadores SNP neutrales, correspondientes en su mayoría al genoma nuclear. Los valores de F_{ST} entre haplotipos de cloroplasto usando marcadores SNP no asociados a fenotipos o neutrales fueron nulos (BDA, BDD y BDP) o muy cercanos a cero usando la base de datos general (BDG). La pérdida de la señal filogeográfica del cloroplasto en los genomas nucleares ocurre en otros taxa de Fagales. Estudios orientados a la identificación de especies de *Quercus*, un género con taxonomía controvertida que también se caracteriza por tener haplotipos de cloroplasto compartidos entre especies y asociados a regiones particulares, propone el uso de marcadores nucleares obtenidos por técnicas de genotipado de secuenciación ya que estos permiten la diferenciación de especies mientras que los plastidiales, si bien permiten la diferenciación de secciones, no resuelven bien las especies (Yan *et al.*, 2018).

Es esperable que, al romperse el aislamiento geográfico entre poblaciones, es decir al retirarse la ingresión marina propuesta como barrera biogeográfica histórica, se diluya la variación neutral entre grupos si el aislamiento reproductivo entre linajes es incompleto y más aún si tiene lugar el flujo génico interespecífico. Esto concuerda, a nivel de subgénero, con el relativamente bajo número de marcadores selectivos detectados en comparación con los asociados a especies o fenología (BDG: 46 asociados a haplotipos de ADNcp vs 940 asociados a pertenecer a una determinada especie morfológica), con los valores de F_{ST} altos pero menores a 1 y con el hecho de no es posible recuperar la estructuración latitudinal a partir de los marcadores asociados a aislamiento pre-polinización (DP y DD) incluso a nivel de especie. Esto último sugiere, en concordancia con lo propuesto en el capítulo 2, que la divergencia alopatrica responsable del establecimiento de los linajes de cloroplasto no ha facilitado ni reforzado el aislamiento fenológico prepolinización. También, considerando los resultados de los análisis funcionales de la divergencia, es posible pensar que la

componente adaptativa de la divergencia entre linajes de cloroplasto se relaciona con la adaptación local de procesos centrales para el desarrollo como son la respiración y la fotosíntesis, que pueden tener un rol clave en el aislamiento reproductivo post-polinización pero no impiden de forma efectiva la mezcla inter o intra específica de los linajes de ADNcp, aunque tal vez sí limite su dispersión por fuera de su área geográfica de mayor aptitud.

TABLAS

Tabla 4. ¡Error! Utilice la pestaña Inicio para aplicar 0 al texto que desea que aparezca aquí..1: **Individuos analizados.**

Individuos de las distintas especies de *Nothofagus* analizadas, el linaje del cloroplasto al que pertenece cada uno (Hap) y su ubicación geográfica (Long y Lat). Norte 1 (N1) y Norte 2 (N2) son los dos haplotipos obtenidos para el linaje Norte. Sur (S) es el haplotipo obtenido para el linaje Sur. Individuos con genoma de cloroplasto secuenciados para el capítulo 3 llevan (*) junto al nombre y están resaltados en gris.

Individuo	Especie	Hap CP	Long	Lat	Individuo	Especie	Hap CP	Long	Lat
NN2PMO15	<i>N. antarctica</i>	N2	-71,57	-41,79	CS0PUEV1	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,72	-42,11
NN2PMO14	<i>N. antarctica</i>	N2	-71,57	-41,79	CS0PUEV2*	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,72	-42,11
NN2NAT04	<i>N. antarctica</i>	N2	-71,58	-41,88	CN1BUE01	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,65	-42,17
NN2NAT03	<i>N. antarctica</i>	N2	-71,58	-41,88	CN1BUE02	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,65	-42,17
NN2PIL07*	<i>N. antarctica</i>	N2	-71,48	-41,98	CS0CHO01	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,62	-42,45
NN2PIL05	<i>N. antarctica</i>	N2	-71,48	-41,98	CS0CHO21	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,61	-42,45
NN1YEG10	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,72	-42,21	CS0LEZ14	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,50	-42,46
NN1YEG09*	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,73	-42,21	CS0LEZ08	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,50	-42,46
NS0SIL06	<i>N. antarctica</i>	S	-71,62	-42,22	CS0PUN05	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,57	-42,52
NS0SIL07	<i>N. antarctica</i>	S	-71,62	-42,22	CS0PUN01	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,57	-42,52
NS0TUC01	<i>N. antarctica</i>	S	-71,67	-42,22	CS0COR01	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,65	-42,56
NN1TUF04	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,68	-42,24	CS0COR14	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,65	-42,56
NS0CHO01	<i>N. antarctica</i>	S	-71,62	-42,42	CS0RIV01	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,65	-42,60
NS0CHO05	<i>N. antarctica</i>	S	-71,62	-42,42	CS0RIV02	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,65	-42,60
NN1LEZ21	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,51	-42,46	CS0NEI10	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,67	-42,65
NN1LEZ29	<i>N. antarctica</i>	S	-71,51	-42,47	CS0PET07	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,75	-42,69
NN1CHO05	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,59	-42,47	CS0PET08	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,76	-42,71
NS0MOM26	<i>N. antarctica</i>	S	-71,60	-42,58	LN2PMO14	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0MOM22	<i>N. antarctica</i>	S	-71,60	-42,58	LN2PMO18	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0MLE05	<i>N. antarctica</i>	S	-71,44	-42,60	LN2PMO60	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0MLE02	<i>N. antarctica</i>	S	-71,44	-42,60	LN2PMO12	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NN1MLE04	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,44	-42,60	LN2PMO10	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NN1MLE03	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,44	-42,60	LN2PMO70	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NN1MLE01	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,44	-42,60	LN2PMO20	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0NEI06	<i>N. antarctica</i>	N1	-71,66	-42,65	LN2PMO06	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NN1NEI23	<i>N. antarctica</i>	S	-71,66	-42,66	LN2PMO24	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0NEI25	<i>N. antarctica</i>	S	-71,66	-42,66	LN2PMO22	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0ESC29	<i>N. antarctica</i>	S	-71,73	-42,76	LN2PMO26	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0FUT02	<i>N. antarctica</i>	S	-71,58	-42,94	LN2PMO28	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0FUT14	<i>N. antarctica</i>	S	-71,58	-42,94	LN2PMO30	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0FUT04	<i>N. antarctica</i>	S	-71,58	-42,94	LN2PMO34	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0FUT03	<i>N. antarctica</i>	S	-71,54	-43,00	LN2PMO36	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78

NS0FUT05	<i>N. antarctica</i>	S	-71,53	-43,00	LN2PMO40	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
NS0FUT17*	<i>N. antarctica</i>	S	-71,52	-43,00	LN2PMO38	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,78
CN4GUTS1	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2NAT04	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,58	-41,88
CN4GUTS2	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2NAT03	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,58	-41,88
CN4GUTS3	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2NAT01*	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,58	-41,88
CN4GUTS4	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2NAT22	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,88
CN4GUTS5	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2NAT29	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,59	-41,88
CN4GUTV1	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2NAT02	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,58	-41,88
CN4GUTV2	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2PIL13	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,73	-41,98
CN4GUTV3	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2PIL15	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,73	-41,98
CN4GUTV4	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2MOF01	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,66	-42,03
CN4GUTV5	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,42	-41,18	LN2MOR05	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,67	-42,03
CS0VIL01	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,49	-41,59	LN1MOR01*	<i>N. pumilio</i>	N1	-71,67	-42,03
CS0VIL02	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,49	-41,59	LN2YEG01	<i>N. pumilio</i>	N2	-71,73	-42,21
CS0VIL03	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,49	-41,59	LS0YEG02*	<i>N. pumilio</i>	S	-71,73	-42,21
CN2PMO14	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,54	-41,79	LS0YEG04	<i>N. pumilio</i>	S	-71,74	-42,21
CS0NAT01	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,55	-41,86	LS0CHO01	<i>N. pumilio</i>	S	-71,62	-42,42
CS0NAT03	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,56	-41,86	LS0MLE10	<i>N. pumilio</i>	S	-71,43	-42,60
CN2KEL02*	<i>N. dombeyi</i>	N2	-71,56	-41,94	LS0MLE01	<i>N. pumilio</i>	S	-71,44	-42,60
CN1KEL04	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,56	-41,94	LS0MLE05	<i>N. pumilio</i>	S	-71,44	-42,60
CN1KEL14	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,56	-41,95	LS0NEI08	<i>N. pumilio</i>	S	-71,65	-42,66
CN1HIT02*	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,72	-42,10	LS0NEI07	<i>N. pumilio</i>	S	-71,65	-42,66
CN1HIT01	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,72	-42,10	LS0NEI04	<i>N. pumilio</i>	S	-71,65	-42,66
CN1PUES4	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,72	-42,11	LS0PET06	<i>N. pumilio</i>	S	-71,75	-42,69
CN1PUEV3	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,72	-42,11	LS0PET11	<i>N. pumilio</i>	S	-71,75	-42,69
CN1PUEV4	<i>N. dombeyi</i>	N1	-71,72	-42,11	LS0PET12	<i>N. pumilio</i>	S	-71,75	-42,69
CS0PUES1	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,72	-42,11	LS0PET18	<i>N. pumilio</i>	S	-71,75	-42,69
CS0PUES2	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,72	-42,11	LS0ESC04	<i>N. pumilio</i>	S	-71,73	-42,76
CS0PUES3	<i>N. dombeyi</i>	S	-71,72	-42,11					

Tabla 4.2: Bases de datos de marcadores polimorfismo de nucleótido simple (SNP) totales

Número de individuos y conteo de marcadores SNP (#SNP) obtenidos usando la pipeline o línea de comandos UNEAK antes (Cruda) y después de filtrar (Filtrada) las bases de datos e imputar datos faltantes. BDG: base de datos general. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*. Nant: *N. antarctica*. Ndom: *N. dombeyi*. Npum: *N. pumilio*.

Base de datos	Especies	Cruda		Filtrada	
		Individuos	#SNP	Individuos	#SNP
BDG	Nant, Ndom, Npum	128	146642	121	10530
BDA	Nant	36	67763	34	19452
BDD	Ndom	44	96515	44	16102
BDP	Npum	48	71112	43	19420

Tabla 4.3: Número de marcadores SNP detectados por los distintos métodos de asociación fenotipo-genotipo.

BDG: base de datos general. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*. Nant: *N. antarctica*. Ndom: *N. dombeyi*. Npum: *N. pumilio*. MLM: método basado en modelos lineales, PCA: método basado en componentes principales. F_{ST} : método basado en valores atípicos de F_{ST} . Umbral de significación $q < 0.05$.

Base de datos	Especies	Fenotipo	MLM	PCA	F_{ST}
BDG	Nant, Ndom, Npum	Especies	735	1289	797
BDG	Nant, Ndom, Npum	Haplotipos	82	121	355
BDA	<i>N. antarctica</i>	Haplotipos	966	102	2686
BDD	<i>N. dombeyi</i>	Haplotipos	229	446	370
BDP	<i>N. pumilio</i>	Haplotipos	41	385	2672

Tabla 4.4: Marcadores SNP asociados a cada fenotipo.

Número de marcadores asociados a distintos fenotipos y no asociados o neutrales. DP: días hasta el inicio de la floración. DD: requerimientos térmicos para el inicio de la floración. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*.

Base de datos	Fenotipos				No asociados
	Especies	Haplotipos CP	DP	DD	
BDG	739	46	52	149	2834
BDA	-	172	747	329	2592
BDD	-	147	156	97	4375
BDP	-	82	13	7	2952

Tabla 4.5: Estadísticos F_{ST} de estructuración poblacional para la base de datos general (BDG).

Media e intervalo de confianza (95%) para los valores de F_{ST} estimados a partir de frecuencias genotípicas de los marcadores asociados a los distintos fenotipos para BDG. El panel de la izquierda muestra valores para los individuos agrupados por especie. El panel de la derecha muestra valores para los individuos agrupados según haplotipos del cloroplasto (haplotipos CP). DP: días hasta el inicio de las fases FloIV y PA. DD: requerimientos térmicos para el inicio de las fases FloIV y PA. * valores significativamente distintos de cero.

Poblaciones = especies		Poblaciones = haplotipos CP	
Fenotipos	FST	Fenotipos	FST
Especie	0.9809 * [0.9775, 0.9838]	Haplotipos CP	0.8163 * [0.7642, 0.8555]
Fenología - DP	0.5418 * [0.4545, 0.6142]	Fenología - DP	0.0062 * [0.0009, 0.0114]
Fenología - DD	0.4253 * [0.2771, 0.5691]	Fenología - DD	0,0895 [-0.0005, 0.2427]
No asociados	0.2403 * [0.2219, 0.2605]	No asociados	0.0042 * [0.0033, 0.0052]

Tabla 4.6: Estadísticos F_{ST} de estructuración poblacional para la base de datos especie-específicas (BDA, BDD y BDP).

Media e intervalo de confianza (95%) para los valores de F_{ST} estimados a partir de frecuencias genotípicas de los marcadores asociados a los distintos fenotipos para cada base de datos. Los individuos fueron agrupados en poblaciones según su linaje de cloroplasto. DD: requerimientos térmicos para el inicio de las fases FloIV y PA. * valores significativamente distintos de cero. * valores significativamente distintos de cero.

Fenotipos	BDA : <i>N. antarctica</i>	BDD : <i>N. dombeyi</i>	BDP : <i>N. pumilio</i>
Haplotipos CP	0.4663 * [0.3868, 0.5361]	0.6054 * [0.5341, 0.6636]	0.6707 * [0.6043, 0.723]
Fenología - DP	0.0026 [-0.0025; 0.0081]	6.00E-04 [-0.0068, 0.0089]	0.0474 [-0.0137, 0.101]
Fenología - DD	-8.00E-04 [-0.0042, 0.0025]	0.0018 [-0.0047, 0.0092]	-0.004 [-0.0215, 0.0193]
No asociados	-0.0053 [-0.0068, -0.0038]	-6.00E-04 [-0.0017, 0.0005]	-0.0019 [-0.0033, -0.0005]

Tabla 4.7: Número de marcadores con información funcional.

Las columnas "BLAST" y "GO" muestran la cantidad de marcadores con información funcional tomada de la base de datos de BLAST o con términos GO asociados. La columna "Total" muestra el número de marcadores asociados al respectivo fenotipo para cada base de datos. La columna "Sin hit" muestra el número de marcadores sin información en base de datos. La columna "Con hit (%)" muestra el porcentaje de marcadores asociados a cada fenotipo que cuenta con información funcional. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*.

Base de datos	Fenotipo	BLAST	GO	Total	Sin hit	Con hit (%)
BDG	Especies	245	224	739	492	33.4
BDG	Haplotipos CP	16	12	46	30	34.8
BDG	Fenología - DP	21	20	52	31	40.4
BDG	Fenología - DD	74	68	149	74	50.3
BDA	Haplotipos CP	35	30	172	137	20.3
BDA	Fenología - DP	159	138	747	587	21.4
BDA	Fenología - DD	85	78	329	244	25.8
BDD	Haplotipos CP	54	44	147	93	36.7
BDD	Fenología - DP	42	37	156	114	26.9
BDD	Fenología - DD	19	18	97	78	19.6
BDP	Haplotipos CP	19	15	82	63	23.2
BDP	Fenología - DP	4	3	13	9	30.8
BDP	Fenología - DD	2	2	7	5	28.6

FIGURAS

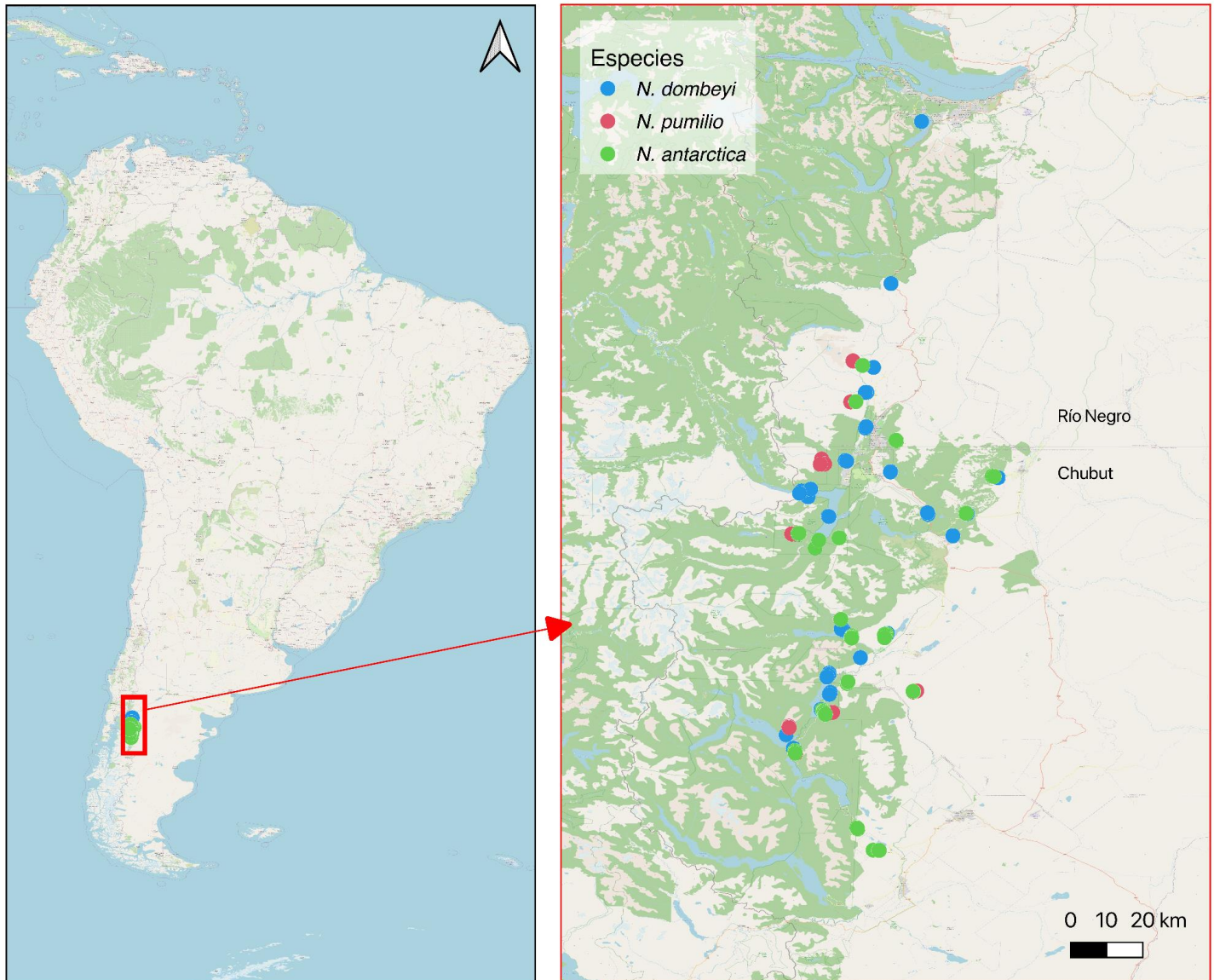


Figura 4.1: Mapa del área de estudio

Localización del área de trabajo y distribución de las muestras. El área de trabajo se extiende desde el Sur de la provincia de Río Negro hasta el Norte de la provincia de Chubut (Patagonia Argentina). Los puntos muestran individuos analizados. Verde: *N. antarctica*. Azul: *N. dombeyi*. Rojo: *N. pumilio*

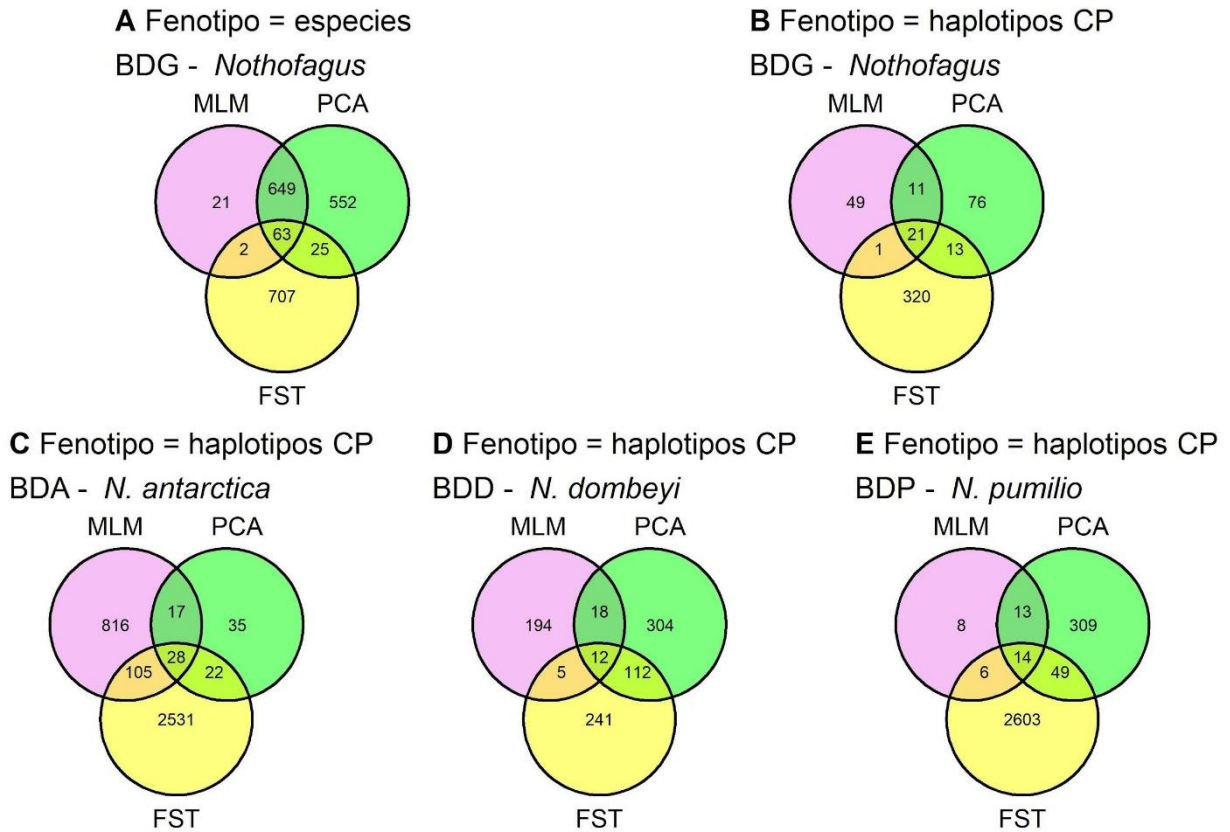


Figura 4.2: comparación de los tres métodos usados para asociación entre marcadores y fenotipos

Diagramas de Venn mostrando el número de marcadores comunes a los tres métodos, comunes a dos métodos y único de cada método. BDG: base de datos general de las tres especies. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*. MLM: modelos lineales mixtos. PCA: análisis de componentes principales. FST: valores atípicos de F_{ST} .

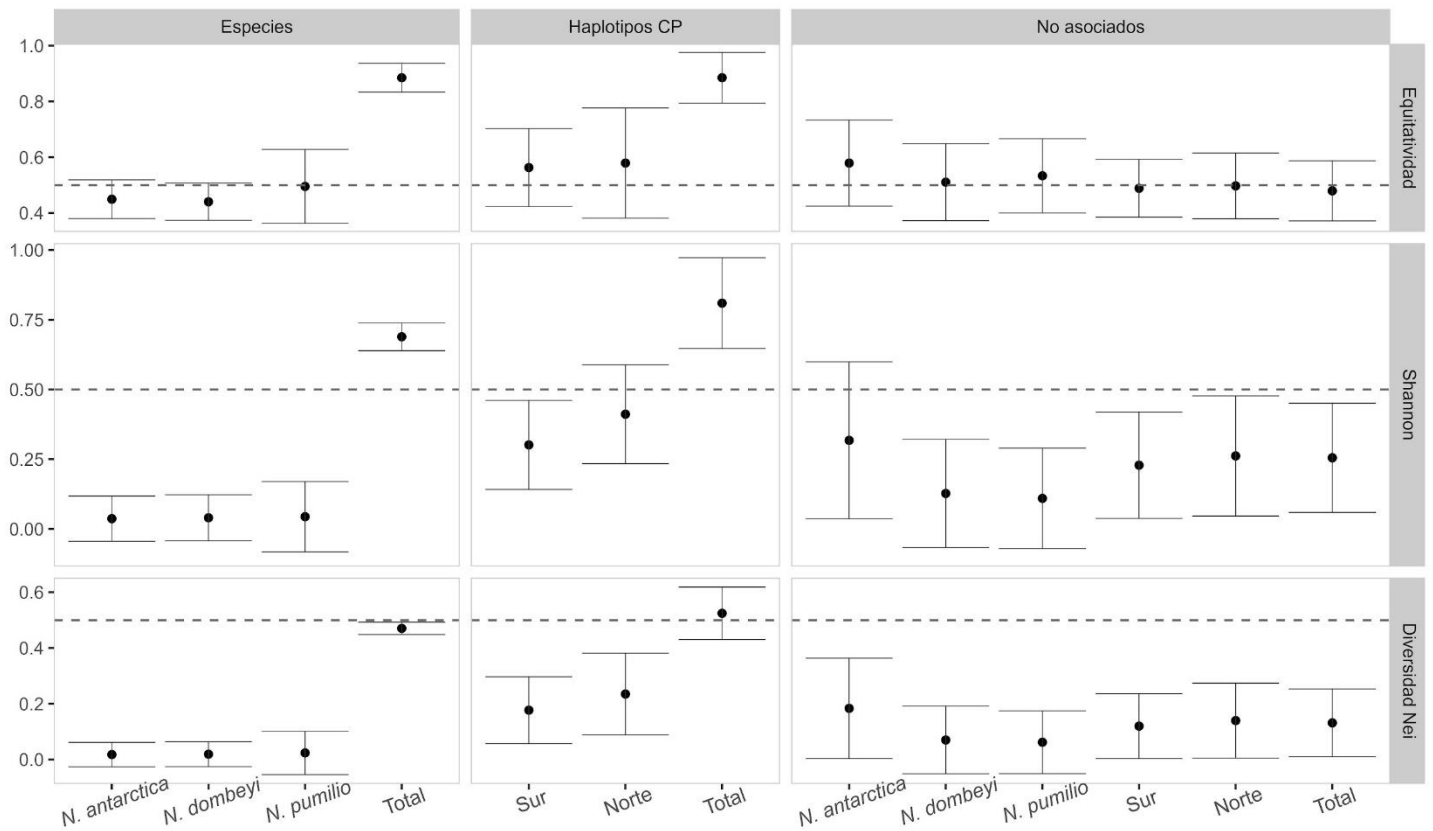


Figura 4.3: Estadísticos de diversidad y equitatividad (BDG)

Estadísticos de diversidad (índice de Shannon, diversidad de Nei) y equitatividad medios más desvío estándar calculados con los marcadores asociados a las variables especie o haplotipo de cloroplasto de la base de datos general (BDG). Individuos agrupados por especie (SNPs asociados a especies), por linaje de cloroplasto (SNPs asociados a haplotipos del cloroplasto) o ambos (SNPs no asociados a ningún fenotipo)

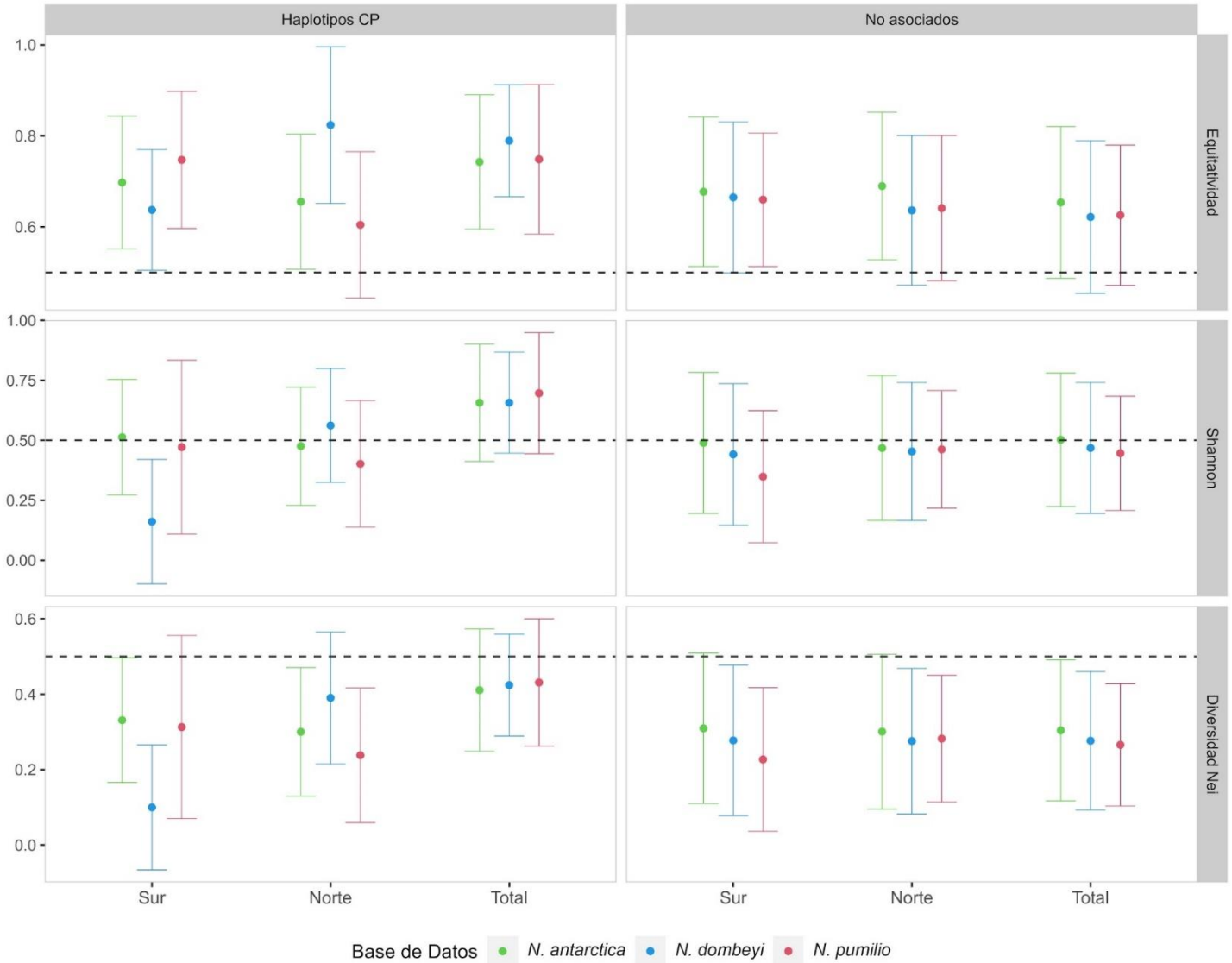


Figura 4.4: Estadísticos de diversidad y equitatividad para las bases de datos especie-específicas (BDA, BDD y BDP).

Estadísticos de diversidad (índice de Shannon, diversidad de Nei) y equitatividad medios más desvío estándar calculados con los marcadores asociados a la variables haplotipo de cloroplasto de las bases de datos especie-específicas. Individuos agrupados por linaje de cloroplasto. BDA: *N. antarctica* (verde). BDA: *N. dombeyi* (azul). BDP: *N. pumilio* (rojo).

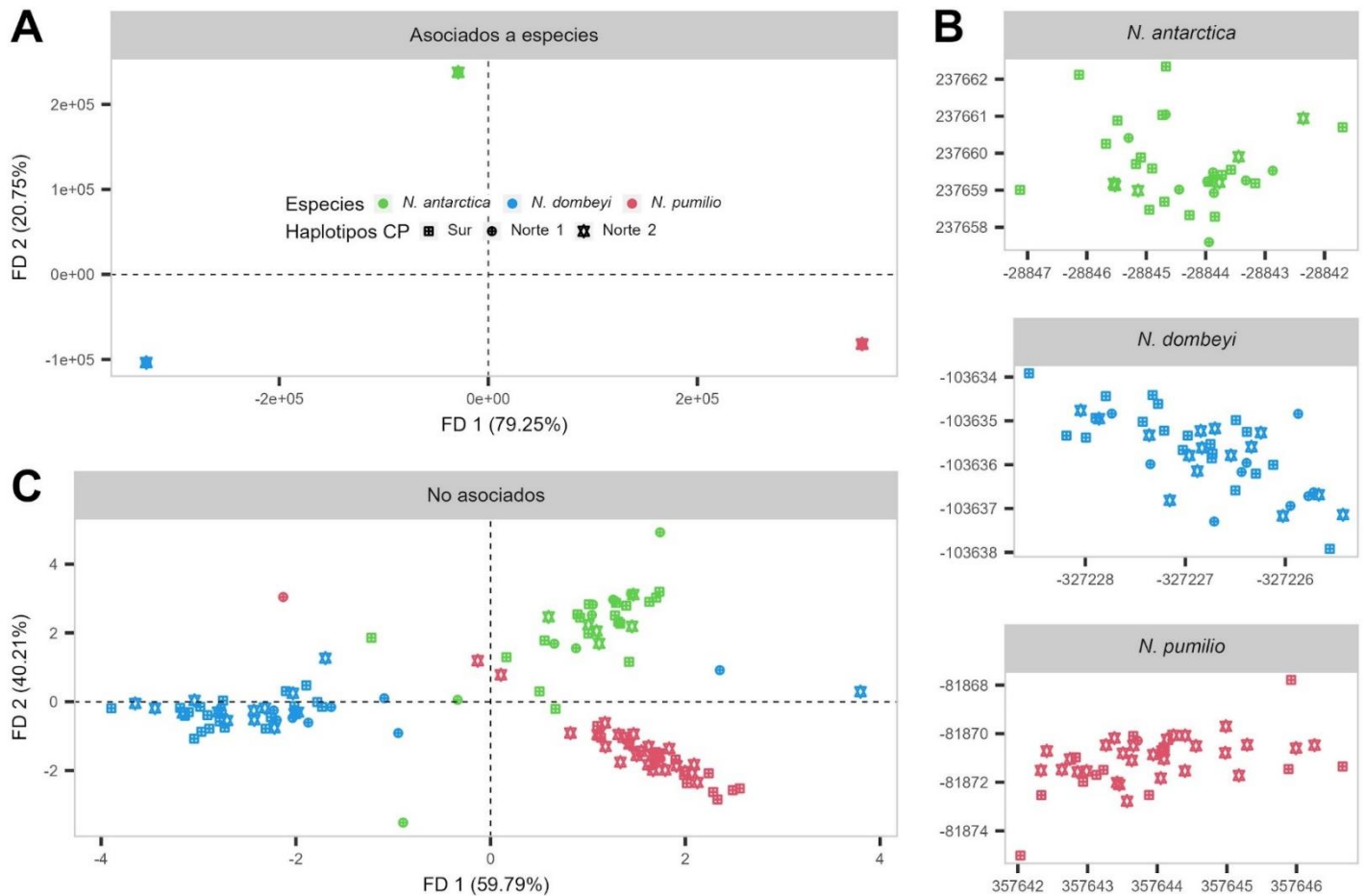


Figura 4.5: Ordenamiento multivariado de las muestras por análisis discriminante (especies).

La figura muestra el ordenamiento de los individuos en el espacio de los genotipos realizado a partir del análisis discriminante de los marcadores asociados a especies (A,B) y no asociados a fenotipos (C). El panel (B) es una ampliación del panel (A). Colores marcan especies (Verde: *N. antarctica*; Azul: *N. dombeyi*; Rojo: *N. pumilio*). Formas marcan haplotipos del cloroplasto (cuadrado: Sur; círculo: Norte 1; estrella: Norte 2).

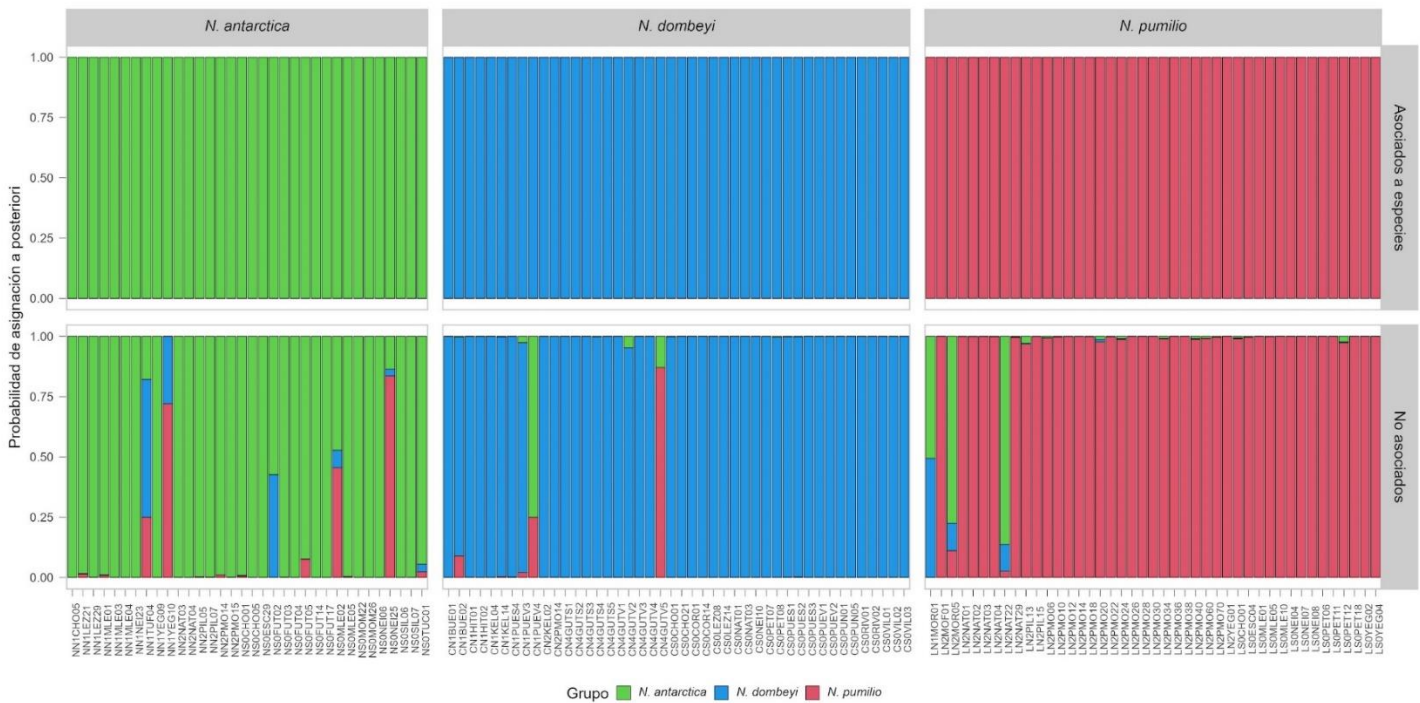


Figura 4.6: Probabilidad de asignación de un individuo a cada especie, calculada por análisis discriminante (BDG).

El panel superior muestra los resultados del análisis discriminante de los marcadores asociados a la variable especies y el panel inferior el de los marcadores no asociados a fenotipos. Cada barra apilada muestra la probabilidad de asignación de un individuo a cada especie (grupo) con un color distinto. Verde: *N. antarctica*; Azul: *N. dombeyi*; Rojo: *N. pumilio*.

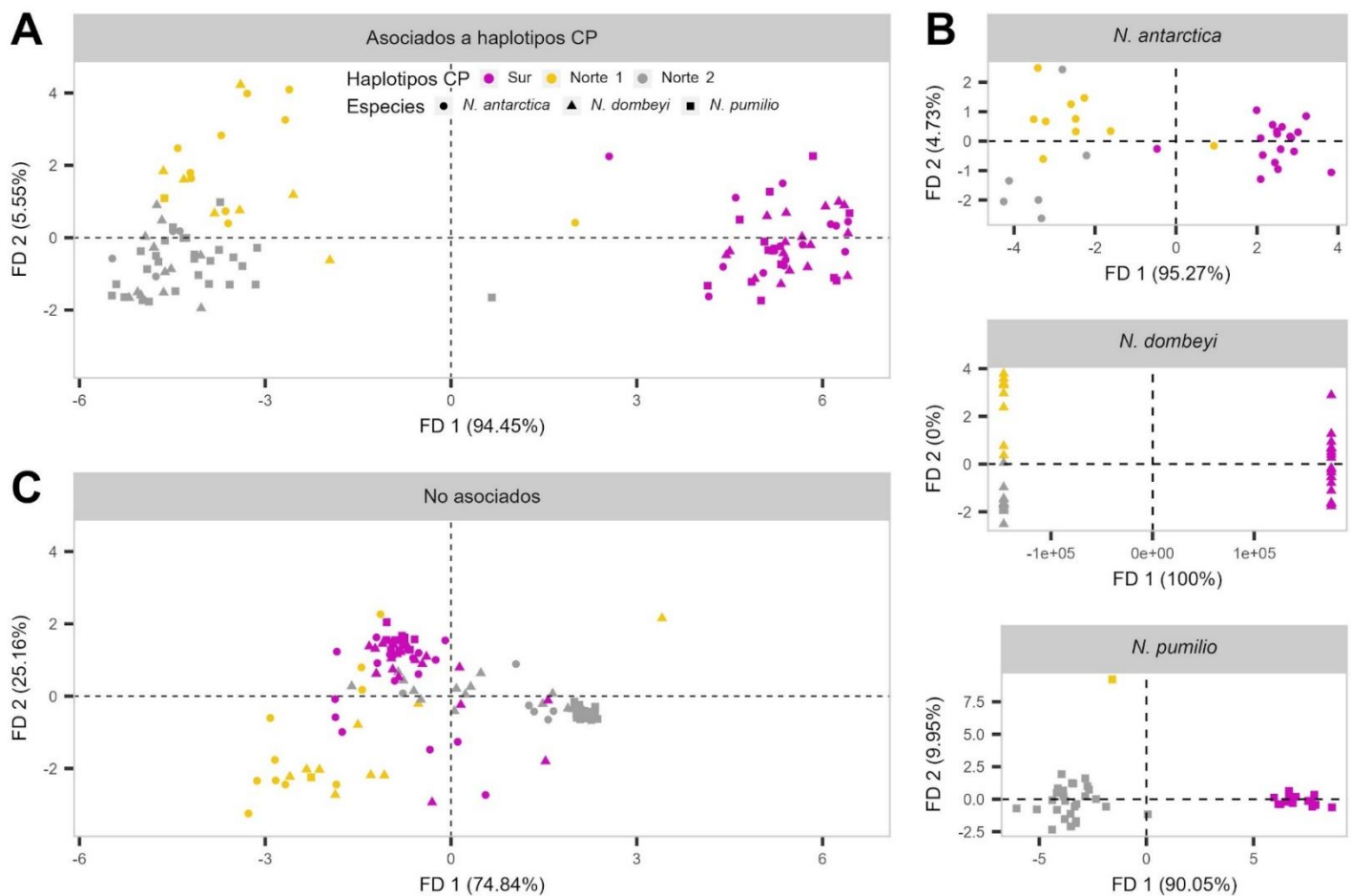


Figura 4.7: Ordenamiento multivariado de las muestras por análisis discriminante (haplotipos del cloroplasto).

Individuos clasificados según haplotipos (A) usando marcadores de BDG asociados a haplotipos del cloroplasto, (B) usando marcadores de BDA, BDD y BDP asociados a haplotipos del cloroplasto y (C) usando marcadores de BDG no asociados a fenotipos. Colores marcan haplotipos del cloroplasto (violeta: Sur; amarillo: Norte 1; gris: Norte 2). Formas marcan especies (círculo: *N. antarctica*; triángulo: *N. dombeyi*; cuadrado: *N. pumilio*).

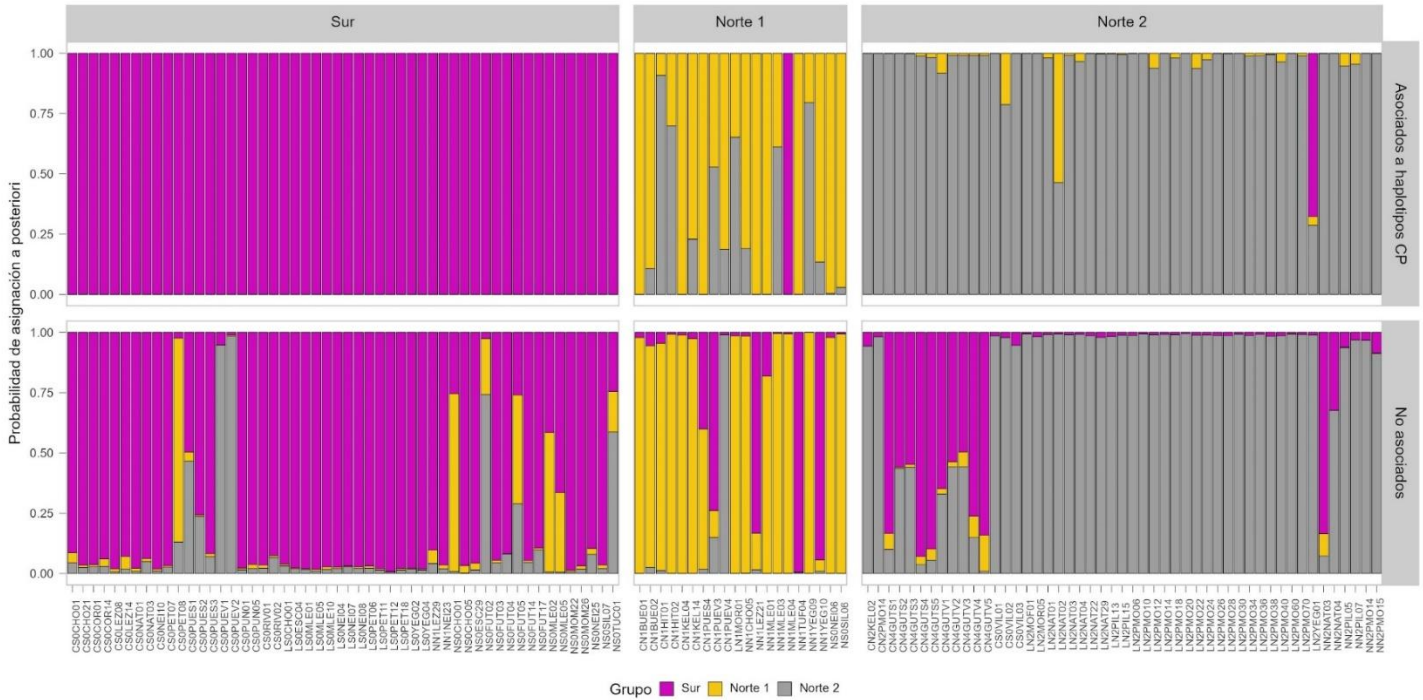


Figura 4.8: Probabilidad de asignación de un individuo a cada haplotipo del cloroplasto, calculada por análisis discriminante (BDG).

El panel superior muestra los resultados del análisis discriminante de los marcadores asociados a la variable haplotipos del cloroplasto y el panel inferior muestra el de los marcadores no asociados a fenotipos. Cada barra apilada muestra la probabilidad de asignación de un individuo a cada haplotipo del cloroplasto (grupo) con un color distinto. Violeta: Sur; amarillo: Norte 1; gris: Norte 2.

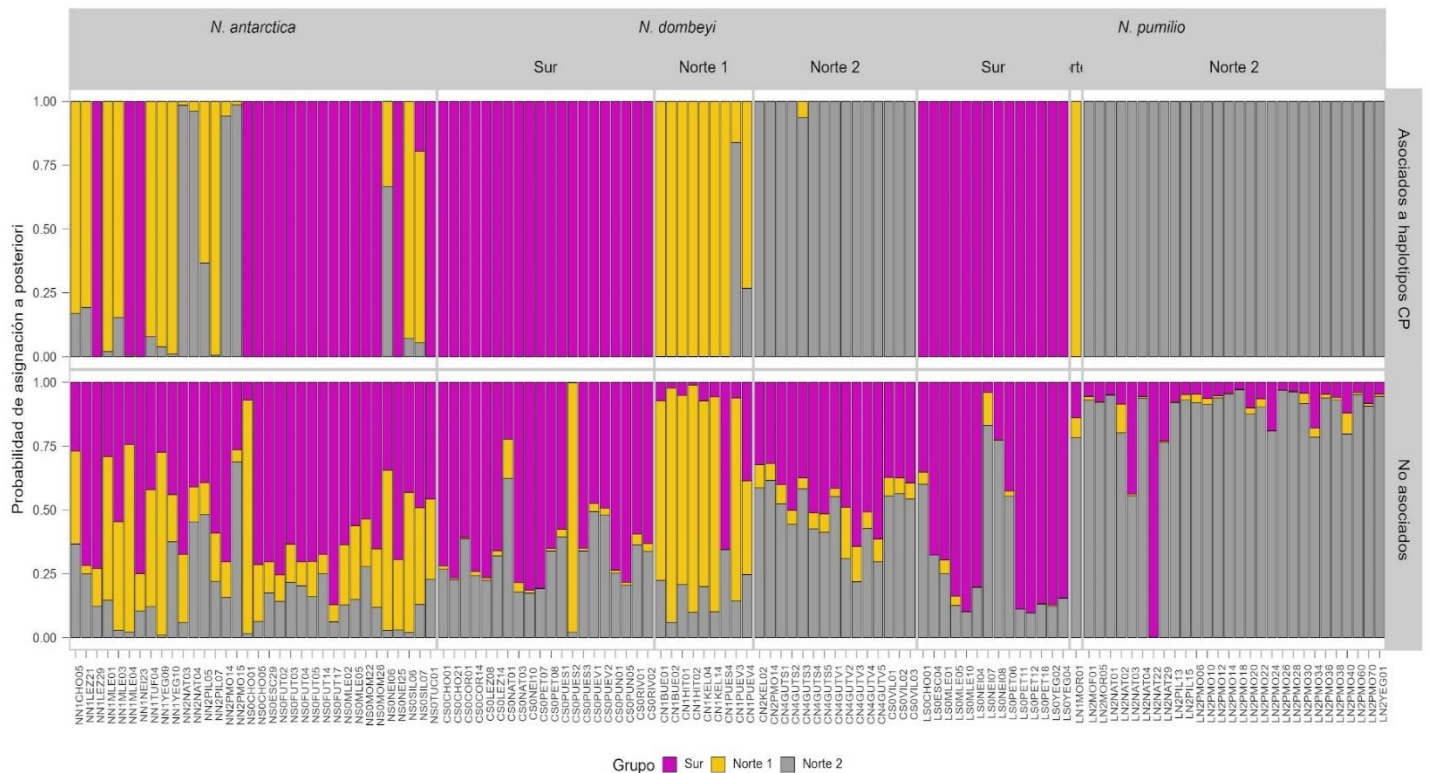


Figura 4.9: Probabilidad de asignación de un individuo a cada haplotipo del cloroplasto, calculada por análisis discriminante (BDA, BDD Y BDP).

El panel superior muestra los resultados del análisis discriminante de los marcadores asociados a la variable haplotipos del cloroplasto y el panel inferior muestra el de los marcadores no asociados a fenotipos. Cada especie se analizó por separado. Cada barra apilada muestra la probabilidad de asignación de un individuo a cada haplotipo del cloroplasto (grupo) con un color distinto. Violeta: Sur; amarillo: Norte 1; gris: Norte 2.

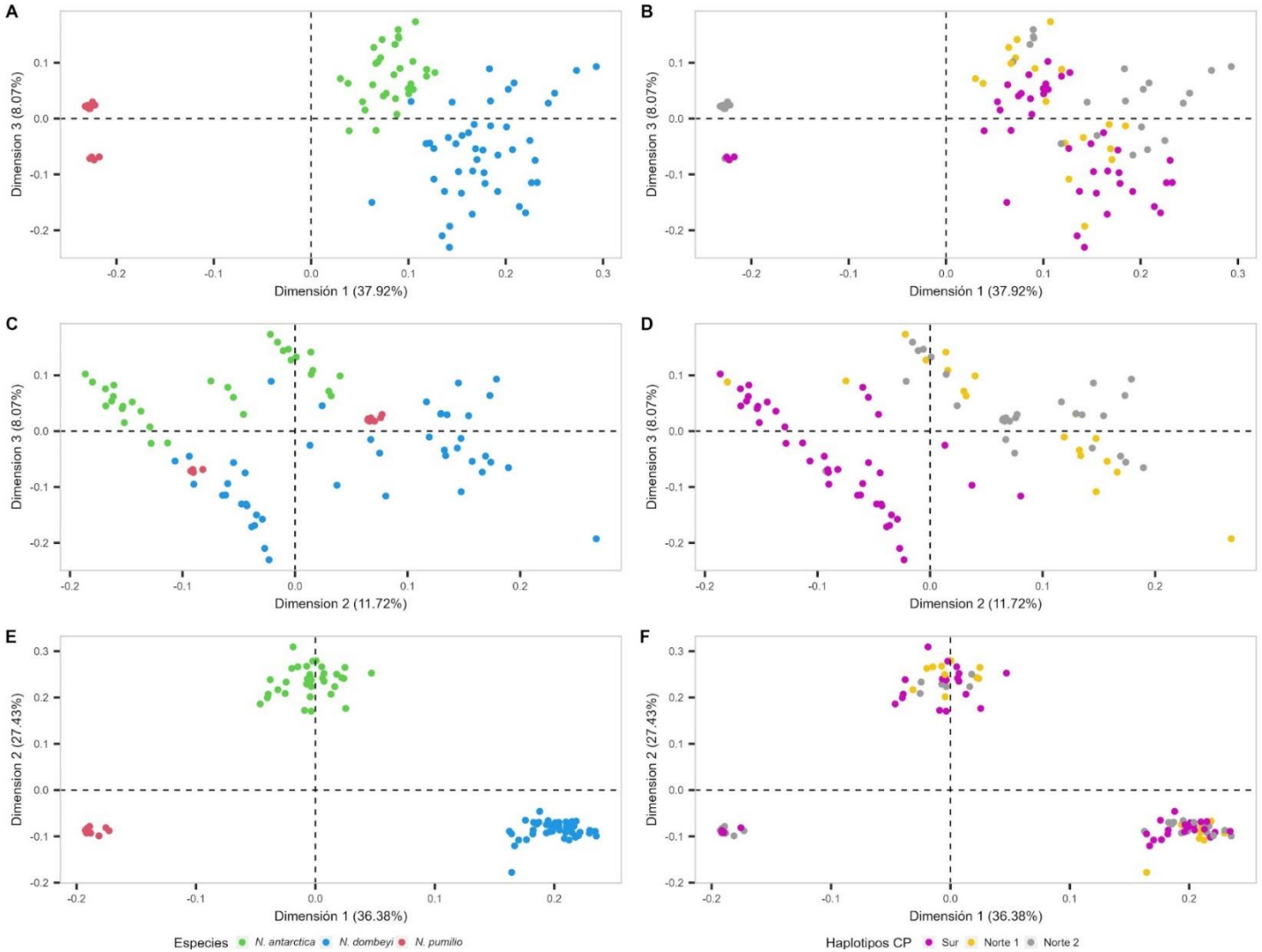


Figura 4.10: Ordenamiento multivariado de las muestras por análisis de correspondencia (fenología - BDG).

Análisis de correspondencia basado en marcadores SNP de la base de datos general BDG. (A,C) Asociados a DP y colores marcando especies; (B,D) asociados a DP y colores marcando haplotipos de cloroplasto; (E) asociados a DD y colores marcando especies; (F) asociados a DD y colores marcando haplotipos de cloroplasto. Verde: *N. antarctica*; celeste: *N. dombeyi*; rojo: *N. pumilio*; violeta: Sur; amarillo: Norte 1; gris: Norte 2.

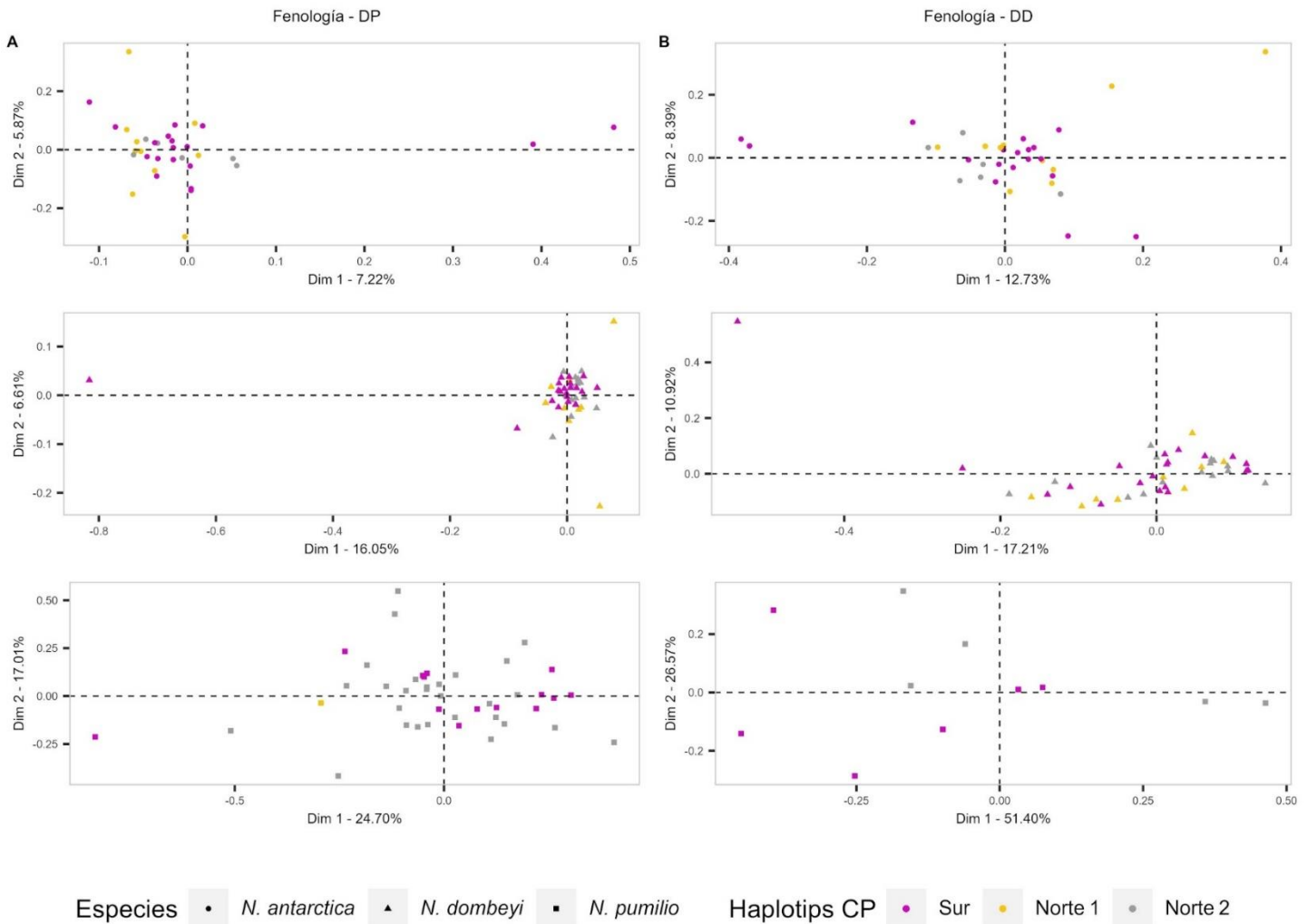


Figura 4.11: Ordenamiento multivariado de las muestras por análisis de correspondencia (fenología - BDA, BDD y BDP).

Análisis de correspondencia basado en marcadores SNP de la base de datos especie específicas. (A) Asociados a DP y colores marcando haplotipos del cloroplasto; (B) asociados a DD y colores marcando haplotipos de cloroplasto. Violeta: Sur; amarillo: Norte 1; gris: Norte 2. Las formas indican la base de datos. Círculos: *N. antarctica* (BDA); triángulos: *N. dombeyi* (BDD); cuadrados: *N. pumilio* (BDP).

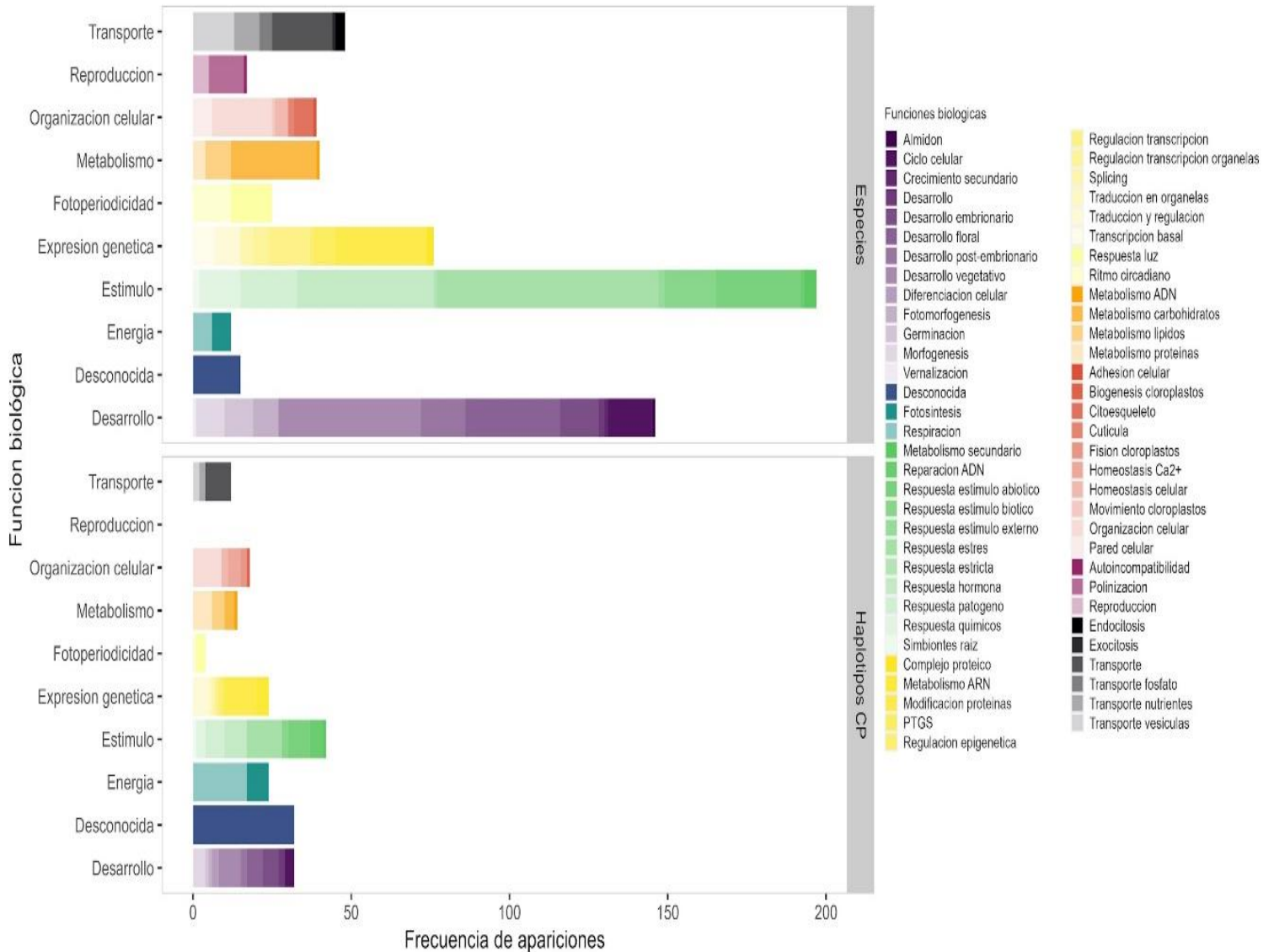
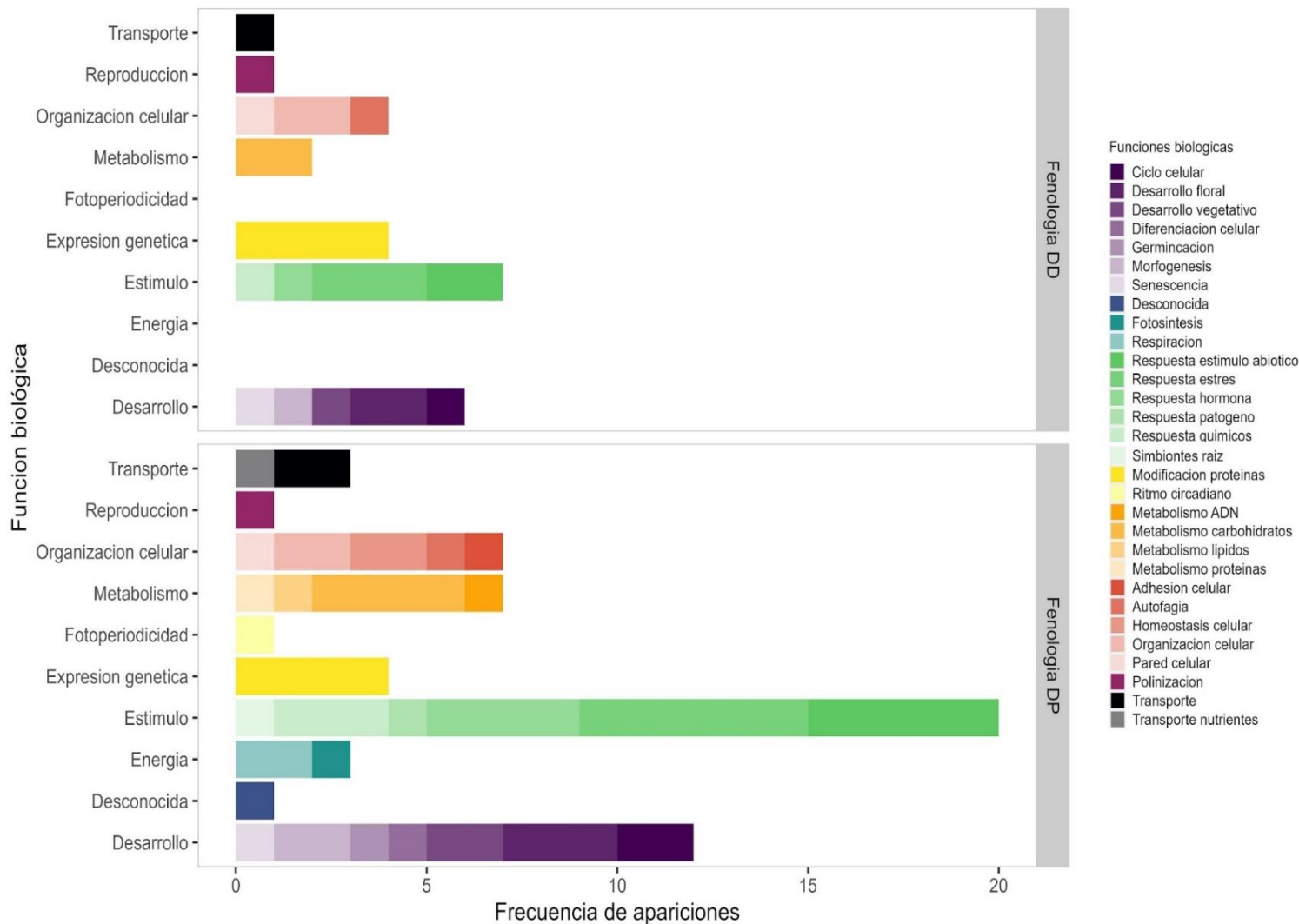


Figura 4.12: Funciones biológicas asociadas a la divergencia entre especies y entre haplotipos del cloroplasto

Histograma de frecuencia de aparición de cada término entre las funciones moleculares identificadas para cada marcador SNP. Las tonalidades de un mismo color representan un grupo de funciones más específicas (lista) relacionadas a alguna función más general (eje y).



Capítulo 5: Discusión general

La divergencia interespecífica y el mantenimiento de las barreras al entrecruzamiento, principalmente en simpatría y entre taxones capaces de hibridar es uno de los temas centrales en biología evolutiva. La transición de “variedades bien marcadas” de una sola especie a “variedades bien definidas” o especies, especialmente en ausencia de barreras geográficas para el flujo de genes (especiación y/o divergencia simpátrica), ha desconcertado a los biólogos evolutivos desde Darwin. Aunque Darwin nunca se refirió al proceso como especiación simpátrica, explicó que dentro de la misma área las variedades del mismo animal pueden permanecer distintas durante mucho tiempo, ya sea por tener diferentes estaciones de caza, por reproducirse en estaciones ligeramente diferentes o debido al apareamiento reproductivo diferencial dentro de variedades del mismo tipo (Darwin, 1859).

Ernst Mayr, impulsor del concepto biológico de especie, propuso dos escenarios extremos para la especiación: en alopatría (con aislamiento geográfico) o en simpatría (sin aislamiento geográfico) (Mayr, 1942). Argumentó contundentemente que el aislamiento geográfico (alopatría) es un primer paso necesario para facilitar la divergencia en los animales (Mayr, 1949, 1954). Bajo esta propuesta, las especies se entienden como grupos cuya cohesión se mantiene por selección natural operando para proteger conjuntos bien integrados de complejos genéticos coadaptados. La naturaleza coadaptada del genoma requiere la influencia de procesos externos como la alopatría o el efecto fundador para romper las cadenas cohesivas del flujo de genes y permitir que las poblaciones diverjan de forma independiente. En contraste, Guy Bush, defendió la importancia de la adaptación ecológica en la especiación. Propuso que la dificultad para aceptar la posibilidad de la especiación en simpatría y sin restricciones al flujo génico radicaba en la gran abundancia de experimentos controlados basados en especies relevantes para cultivos agrícolas y la escasa cantidad de estudios basados en poblaciones naturales (Bush Guy L., 1969).

Las dicotomías que imaginamos con respecto a los modos de divergencia, la división cladística de taxones y las categorías sistemáticas de organismos pueden desdibujarse durante la formación de especies. Por ejemplo, el aislamiento geográfico

puede no ser absoluto o completo durante las etapas activas de formación de especies. Esto puede tener lugar no solamente durante la formación de las especies. Las poblaciones en diferentes etapas de divergencia pueden experimentar períodos de aislamiento espacial intercalados con episodios de contacto con hibridación y/o introgresión diferencial, es decir cruzamiento preferencial en dirección de una especie parental. Algunas veces, la nueva variación genética introducida por la introgresión puede habilitar nuevos entornos para las poblaciones, facilitando la divergencia adaptativa local (Arnold *et al.*, 1992). Otras veces, el flujo de genes homogeneizará gran parte del genoma, dejando atrás un núcleo de genes coadaptados que evolucionaron diferencialmente entre poblaciones y/o especies. Cuando estos complejos de genes persisten (debido a una fuerte selección y su probable vinculación en regiones con bajas tasas de recombinación, por ejemplo, en inversiones) forman un núcleo a partir del cual una mayor divergencia se puede generar en simpatria, por medio del reforzamiento, proceso mediante el cual la selección natural fortalece el aislamiento precigótico entre taxones simpátricos conocido también como efecto Wallace (Marshall *et al.*, 2002), o la especialización ecológica (Rieseberg, 2001). Por lo tanto, en las últimas décadas, ha habido un interés creciente en comprender que la recombinación puede ocurrir más allá de los límites taxonómicos (Carson, 1975) y que la introgresión entre especies que hibridan puede tener lugar en algunas partes de sus genomas pero no en otras (Rieseberg *et al.*, 1999). Además, aunque se pueden construir filogenias bifurcadas para grupos taxonómicos vistos desde la perspectiva del tiempo evolutivo profundo, forzar tal patrón en la divergencia de la población puede tergiversar un proceso de especiación más dinámico y reticulado (Hewitt, 1997) y, por lo tanto, las relaciones evolutivas entre taxones (Feder *et al.*, 2005).

La teoría de la divergencia y/o especiación geográfica plantea inicialmente dos escenarios extremos para la divergencia, superposición geográfica total y apareamientos inicialmente panmícticos (simpatria) vs disyunción geográfica total sin intercambio genético ni migraciones (alopatria). Engloba a todo escenario intermedio bajo el nombre de divergencia parapátrica que se ejemplifica con el caso de un subconjunto pequeño de la población original que se aísla geográficamente del resto de la población. Las poblaciones naturales exhiben numerosos casos de situaciones

intermedias entre estas definiciones en las que existe la simpatría geográfica pero la magnitud del intercambio genético es variable (Mallet *et al.*, 2009). La adaptación a nichos ecológicos diferentes o microalopatría (Mayr, 1947), la especialización para distintos recursos dentro de una misma área (simpatría en mosaico) o las diferencias en el tiempo de emergencia o tiempos reproductivos (alocronía) son situaciones que pueden ser consideradas simpátricas en un sentido geográfico pero no lo son en el sentido démico (Gavrilets & Waxman, 2002) derivado de la genética de poblaciones que redefine alopatría y simpatría en base a las distancias de flujo genético. La dificultad principal con la dicotomía alopatría/simpatría no pareciera estar en la definición de simpatría sino en decidir cuándo se ha alcanzado la etapa crítica de la especiación, es decir cuándo razas ecológicas o ecotipos pueden dejar de ser considerados como tales para considerarse especies que ocasionalmente hibridan (Mallet *et al.*, 2009).

En esta tesis no discutimos el surgimiento de nuevos linajes o la especiación en simpatría sino el mantenimiento de límites entre especies simpátricas que pueden potencialmente hibridar. El peso relativo de la influencia de la selección natural, la deriva genética y el flujo génico sobre un proceso de divergencia y su mantenimiento depende principalmente de la fuerza de la selección natural en relación a la magnitud del intercambio genético (Nosil *et al.*, 2009). Para cada especie de *Nothofagus*, poblaciones alopátricas en el sentido geográfico (por ejemplo habitando distintos cerros) exhiben altos niveles de conectividad y sincronía fenológica, posiblemente favorecidos o potenciados por la similitud ambiental y ecológica de los sitios que habitan. Bajo este escenario el intercambio genético entre poblaciones alopátricas pesaría más que la adaptación a diferencias sutiles entre ambientes similares, permitiendo la acumulación de variación neutral pero manteniendo la cohesión ecológica entre dichas poblaciones (Wright, 1943). *Nothofagus antarctica*, *N. pumilio* y *N. dombeyi*, como muestra este trabajo y otros focalizados en distintos aspectos de la biología del subgénero *Nothofagus*, son especies claramente diferenciadas a nivel ecológico (Veblen *et al.*, 1996; Donoso Zegers, 2006) y esto se refleja en la alocronía fenológica que muestran los pares de especies en simpatría. La selección natural fuerte puede tener un potente efecto divergente incluso en presencia de flujo génico (Haldane, 1930).

Proponemos que la divergencia simpátrica en un ambiente heterogéneo sometido a fuertes cambios geológicos (por ejemplo el levantamiento de la cordillera de los andes) y climáticos (por ejemplo la formación de la estepa patagónica y la retracción de los bosques a la zona montañosa) acompañó y acompaña la radiación del género *Nothofagus* en Sudamérica austral. Este escenario de adaptación ecológica a un ambiente de heterogeneidad creciente es compatible con la existencia de fuertes presiones selectivas en simpatría y ofrece muchas oportunidades para la divergencia y la continuidad del aislamiento reproductivo. Las adaptaciones ecológicas pueden actuar como “caracteres mágicos” que reducen de forma pleiotrópica el flujo génico entre poblaciones divergentes gracias a que los recursos ecológicos en ambientes naturales suelen tener distribución fragmentada en una escala comparable con las distancias de dispersión, en este caso del polen (Mallet *et al.*, 2009). Así, la adaptación a ambientes heterogéneos y divergentes propicia apareamientos selectivos entre individuos ecológicamente similares y reproductivamente compatibles permitiendo el sostenimiento de la divergencia en presencia de flujo genético (Nosil *et al.*, 2009). La cordillera de los Andes, gracias a su disposición Norte-Sur y al gradiente climático que se establece en relación con la elevación, ofrece un escenario geográfico apropiado para el surgimiento y mantenimiento de especies en condiciones de simpatría. A escala latitudinal reducida, sitios de similar elevación están sometidos a regímenes de precipitación y temperatura similares que los hacen ecológicamente similares. De esta forma, pequeños cambios en las condiciones ambientales relacionadas con la elevación pueden producir variaciones fenotípicas y genotípicas.

El concepto de evolución paralela (Schluter & Nagel, 1995; Johannesson, 2001), propone el establecimiento independiente de adaptaciones similares a ambientes similares. Ofrece un buen marco teórico para comprender el surgimiento y mantenimiento de las barreras reproductivas dentro y entre especies del subgénero *Nothofagus*. La especialización de cada especie a distintas regiones del gradiente de elevación favorece la asociación entre los ritmos fenológicos y los patrones climáticos locales y es posible que una región dada sea óptima para una especie y subóptima para otra. Por ejemplo, los sitios de simpatría entre *N. antarctica* y *N. pumilio* en el norte de la Patagonia se localizan en bosques de entre 900 y 1200 msnm que representan

ambientes fríos para el rango de distribución de la primera, pero ambientes cálidos dentro del rango de distribución de la segunda. *Nothofagus pumilio* se presenta como especie de floración temprana y *N. antarctica* como especie de floración tardía, pero la magnitud de este desfasaje, que depende de las características intrínsecas de cada especie, no es constante y depende al menos en parte de las temperaturas medias de cada temporada. La alocronía entre especies simpátricas es, entonces, una barrera reproductiva muy relevante pero no es cien por ciento efectiva. El flujo genético entre poblaciones conoespecíficas cercanas y adaptadas a ambientes muy similares podría ser el elemento clave en el mantenimiento de la divergencia entre las especies del subgénero. Este intercambio genético entre poblaciones alopátricas ecológicamente afines de la misma especie podría operar en contra de la introgresión de genotipos/fenotipos de baja aptitud provenientes de la especie simpátrica.

El concepto de “clina” (Huxley, 1938) explica la existencia de gradientes de variación fenotípica intraespecífica continua, con o sin base genética, asociada a gradientes de variación ambiental. Esta teoría provee un marco teórico conceptual apropiado para el entendimiento de la dinámica de las barreras reproductivas en presencia de flujo genético (Abbott *et al.*, 2013). Las especies de *Nothofagus*, particularmente *N. pumilio* pero también *N. antarctica* y *N. dombeyi*, muestran variación intraespecífica de algunos fenotipos y genotipos en asociación con los gradientes ambientales que caracterizan los bosques que habitan. En los tres casos las especies transicionan desde hábito arborescente en el límite altitudinal inferior de su distribución hacia hábito arbustivo en el límite altitudinal superior de su distribución (Veblen *et al.*, 1996; Donoso Zegers, 2006). En el caso de *N. pumilio* se ha documentado variación clinal continua en el gradiente altitudinal y de base genética para distintos caracteres (Premoli, 2003; Premoli & Brewer, 2007; Mathiasen & Premoli, 2016). La polimórfica *N. antarctica* muestra variación ecotípica asociada a ambientes contrastantes (Steinke *et al.*, 2008). De la misma manera, *N. dombeyi* posee variación genecológica como el peso de la semilla que disminuye gradualmente con mayor latitud, es decir, menor temperatura (Veblen *et al.*, 1996). Además, experimentos de jardín común y estrés hídrico manipulativo provenientes de regímenes de precipitación contrastantes arrojaron variaciones de base genética en varios caracteres fenotípicos y genómicos adaptativos

de *N. dombeyi* (Diaz *et al.*, 2022). Si bien los requerimientos térmicos para la floración de las tres especies son relativamente estables, el número de días necesarios para la liberación de polen o la apertura de las flores pistiladas también muestra variación clinal desde poblaciones de floración temprana en el límite altitudinal inferior a poblaciones de floración tardía en el límite superior (Juri & Premoli, 2021; capítulo 2). En este sentido, el desplazamiento fenológico protege a las especies simpátricas de la introgresión de características que podrían disminuir directa o indirectamente su aptitud biológica pero a la vez afecta la dinámica de las barreras reproductivas intraespecíficas (Ortiz-Barrientos *et al.*, 2009), especialmente en el caso de especies con variación clinal. En los sitios de simpatría con *N. pumilio*, *N. antarctica* podría verse favorecida por el retraso de su desarrollo floral respecto de *N. pumilio*, quien a su vez podría verse favorecida por el adelantamiento de su desarrollo. En bosques de baja elevación en los que *N. antarctica* es la especie de floración temprana y *N. dombeyi* es la especie de floración tardía, la primera podría verse favorecida por el adelantamiento de su fenología. Esta doble interacción de *N. antarctica* con sus especies hermanas podría fortalecer la asincronía fenológica entre poblaciones conespecíficas ubicadas en los extremos del gradiente altitudinal de cada especie, contribuyendo así al fortalecimiento de barreras reproductivas pre polinización dentro de las especies.

El concepto ecológico de especies (Van Valen, 1976) propone que las especies son un linaje o conjunto de linajes cercanamente emparentados que ocupan una zona adaptativa diferente a la ocupada por otros linajes, entendiendo por zona adaptativa como un conjunto de recursos e interacciones ecológicas particulares. Van Valen propone que el aislamiento reproductivo entre poblaciones alopátricas no es de importancia evolutiva y que, en condiciones de simpatría, es necesaria la diferenciación de las zonas adaptativas para que se mantenga la diferenciación. Así, el aislamiento reproductivo es incidental y no es necesario para el mantenimiento de las especies ya que estas se mantienen diferenciadas principalmente por su aislamiento ecológico. Este concepto ecológico de especie ofrece un marco teórico muy interesante para el estudio de la divergencia en simpatría y del mantenimiento de la identidad de las especies. Las especies del subgénero *Nothofagus* están especializadas en distintos nichos ecológicos y sus ciclos reproductivos están sincronizados con la variación de la temperatura y el

fotoperiodo (Rusch, 1993). La sensibilidad de cada especie y sus requerimientos térmicos para el inicio de la floración son diferentes de modo que en sitios de simpatria, cuando están expuestas al mismo fotoperiodo y régimen climático, cada especie responde en función de sus ritmos intrínsecos y propiedades ecológicas. Por este motivo la floración de *N. pumilio* se adelanta a la de *N. antarctica* y la de esta última precede a la de *N. dombeyi* en sus respectivos sitios de simpatria. Por otro lado, las poblaciones alopátricas conespecíficas analizadas se pueden separar en dos categorías: poblaciones de la misma elevación y poblaciones en extremos opuestos del gradiente altitudinal de la especie. Los sitios de igual elevación, a similar longitud y a escala latitudinal pequeña, son ecológicamente similares, sus fenologías están altamente sincronizadas (capítulo 2) y muestran altas tasas de flujo genético (capítulo 4), especialmente si se estudian marcadores nucleares neutrales. Los extremos de la distribución altitudinal de cada especie son ecológicamente diferentes ya que las diferencias en la elevación afectan las temperaturas mínimas, máximas y medias, la cantidad y tipo de precipitaciones, la humedad ambiente, la intensidad del viento entre muchas otras variables. Las poblaciones de estos extremos muestran una fuerte alocronía. Cuando las poblaciones se extienden de forma continua entre los extremos de elevación se observa la variación clinal de la fenología y la morfología de las hojas y el hábito de crecimiento.

Nuestro trabajo no permite analizar el rol del reforzamiento en la divergencia y su mantenimiento ya que todos nuestros sitios de monitoreo fenológico son simpátricos. No documentamos pares de especies alopátricas de igual elevación que nos permitan detectar el desplazamiento diferencial de caracteres en simpatria. Pero nuestro trabajo sí permite comenzar a entender la fisiología y la ecología de la divergencia entre especies y entre linajes de cloroplasto. La adaptación ecológica está en el centro de todas las funciones biológicas asociadas a las especies y su fenología. También encontramos funciones relacionadas de forma directa con la reproducción (gametogénesis, crecimiento del tubo polínico, por ejemplo) pero la gran mayoría de las funciones se relacionan con la percepción de estímulos externos (bióticos y abióticos), con el transporte de nutrientes (nodulación, interacción con simbioses, transporte de metales pesados), con la regulación hormonal de la floración, la embriogénesis, el

desarrollo vegetativo y la duración del fotoperiodo. La divergencia entre las especies del subgénero *Nothofagus* se sostiene, al menos en parte, gracias a una combinación de divergencia fenológica (alocronía) y adaptación ecológica que podría reducir la aptitud biológica de híbridos entre parentales de distintas especies o conespecíficos con distintas zonas adaptativas.

La hibridación es un fenómeno normal en la biología de las especies, tal vez sea un extremo de la variación natural de sus hábitos reproductivos, pero es más que un mecanismo poco común asociado a la ruptura del aislamiento (Mallet, 2007). A nivel poblacional los híbridos interespecíficos son poco frecuentes y han sido caracterizados en la literatura como “monstruos esperanzados” (*hopeful monsters*) ya que se diferencian fenotípicamente de ambas especies parentales, no cuentan con una historia adaptativa asociada a ningún nicho ecológico y tienen bajo potencial de supervivencia. Incluso en el caso de que los híbridos sean viables y fértiles su singularidad suele perderse por retrucruzamiento con las especies parentales. Como resultado, se espera que los híbridos sean transitorios y no conduzcan a la creación de nuevas taxas (Coyne & Orr, 2004). Pese a esto la hibridación puede actuar como una macromutación que permite la colonización de nichos ecológicos desocupados. El hecho de que existan especies híbridas implica que en un mismo paisaje adaptativo existen muchos picos adaptativos y que muchos de ellos están desocupados (Mallet, 2007). Esto es especialmente cierto para ambientes heterogéneos en divergencia como el que habitan las especies del subgénero *Nothofagus*. La hibridación puede diferir en cuanto al contexto temporal, por ejemplo puede darse en una zona de contacto secundario luego de un periodo de evolución independiente, como en el caso del contacto secundario entre linajes de cloroplasto del subgénero *Nothofagus*, o puede darse en contexto de contacto continuo bajo un escenario de evolución divergente (Abbott *et al.*, 2013). También puede ocurrir hibridación como respuesta a disturbios ambientales, expansiones de rango de distribución o ambos, como se propuso para el subgénero *Nothofagus* (Acosta & Premoli, 2010; Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014). La hibridación y la introgresión, gracias a su rol en la adaptación y colonización de nuevos nichos, pueden contribuir a la especiación y la divergencia (Abbott *et al.*, 2013).

En las plantas, los eventos de hibridación del pasado se observan en los fenómenos de captura y secuencias compartidas del cloroplasto. Generalmente se considera que la hibridación es una señal de especiación o divergencia incompleta de linajes (en inglés *incomplete lineage sorting*) pero para las plantas, especialmente entre especies cercanamente emparentadas como las especies de *Nothofagus*, la hibridación es habitual (Mallet, 2007). Se necesita reconsiderar a la hibridación y en particular la hibridación transitoria (Worth *et al.*, 2016) como mecanismo para persistir en el tiempo bajo climas o ambientes cambiantes. La hibridación, aunque transitoria, puede derivar en la introgresión de fenotipos parentales que podrían permitir la conquista de nuevos ambientes e incluso la especiación por hibridación homoploide, en la que una especie nueva se forma sin modificaciones en la ploidía (Mallet, 2007). Además la divergencia entre linajes del cloroplasto, tan basal como la divergencia entre distintas especies, da cuenta del fenómeno de hibridación como parte fundamental de la evolución de las especies de *Nothofagus* lo cual se ha observado en otros linajes de leñosas como los eucaliptus (Nevill *et al.*, 2014) y los robles (Petit *et al.*, 2002).

Las plantas leñosas poseen altas tasas de exogamia y las especies de *Nothofagus* no son una excepción: la literatura propone que estas especies de polinización cruzada son altamente autoincompatibles (Riveros *et al.*, 1995). Algunas características de su desarrollo floral presentadas en esta tesis apoyan esta propuesta, por ejemplo en cada brote anual las flores estaminadas comienzan a desarrollarse primero que las pistiladas. A nivel poblacional el inicio de la liberación de polen precede por pocos días a la apertura de las flores pistiladas (capítulo 2) lo que asegura la superabundancia del polen conoespecífico en el momento en el que las flores pistiladas son receptivas. Esta sincronización fortalece las barreras interespecíficas al desfavorecer la polinización de individuos de una especie con polen proveniente de individuos de otra especie simpátrica con floración atípica. Nuestros resultados (F_{ST}) obtenidos a partir de marcadores SNP neutrales muestran flujo génico total (o ausencia de restricciones al flujo génico) entre poblaciones de una misma especie (capítulo 4). Por otro lado, para que poblaciones que no están completamente aisladas progresen hacia la divergencia es necesario que se establezcan asociaciones entre “loci barrera” (loci bajo selección divergente, que contribuyen a la reducción de la aptitud de los

híbridos o que favorecen los apareamientos selectivos) lo que implica que el flujo genético se verá reducido en estos loci o a lo largo de regiones del genoma asociadas por ligamiento. Es más probable que los loci neutrales o no ligados a los loci barrera muestren introgresión entre poblaciones interfértiles (Abbott *et al.*, 2013). A nivel de subgénero, los marcadores neutrales muestran un 25% de aislamiento, que indica un grado alto de divergencia en relación a lo que ocurre dentro de cada especie pero relativamente bajo en relación al aislamiento cercano al 100% detectado con los asociados a especies o a fenología, es decir los “loci barrera” (capítulo 4). Cuando dos especies están completamente aisladas, es esperable encontrar divergencia en los loci neutrales pero esta divergencia puede ocurrir mucho tiempo después de establecida la divergencia en base a loci barrera (Abbott *et al.*, 2013). En especies con una historia evolutiva atravesada por la hibridación, el aislamiento total con altos valores de F_{ST} a lo largo de todo el genoma podría incluso ser imposible. El escenario se complica aún más cuando se agregan los genomas citoplasmáticos al planteo ya que fenómenos como captura de cloroplasto están altamente extendidos entre plantas. En particular en el caso de *Nothofagus* (Acosta & Premoli, 2010) y otras Fagales (Yang *et al.*, 2021), la divergencia interespecífica de los genomas de cloroplasto es casi nula ya que los genomas citoplasmáticos representan linajes geográficos que trascienden las barreras de las especies (capítulo 3).

La hibridación puede ser frecuente y ubicua, puede estar circunscripta a un tiempo o lugar específicos, aunque también puede ser poco frecuente a escala global. Sus efectos no son simétricos y puede afectar de forma diferente a las poblaciones involucradas dependiendo de su tamaño, su historia demográfica y su ecología. La evolución del aislamiento reproductivo completo, si es que eso es posible, puede tardar muchísimo tiempo y durante ese proceso los cambios en los patrones climáticos, geológicos y ecológicos afectan la naturaleza y la permeabilidad de las barreras al intercambio genético (Mallet 2005). Nuestro trabajo y la revisión bibliográfica que lo apoya nos hablan de la necesidad de incluir el factor temporal en el concepto de especie. Las especies del subgénero *Nothofagus* son entidades dinámicas y no fijas. Sus barreras reproductivas precigóticas son permeables y plásticas, su fuerza depende fuertemente de las condiciones ambientales. Las especies poseen características

fenológicas diferenciales que fomentan el flujo génico intraespecífico y mantienen la cohesión entre poblaciones de una misma especie. Sin embargo, climas cambiantes pueden afectar el grado de solapamiento fenológico y por lo tanto las oportunidades para el flujo génico interespecífico y por lo tanto la hibridación (capítulo 2).

Si bien el desplazamiento fenológico en simpatria no es común a escala global (Park *et al.*, 2022), suele ser más notorio entre pares de especies que florecen en fechas cercanas. La asincronía entre especies simpátricas de *Nothofagus* es sensible a la variación térmica. El solapamiento fenológica aumenta en años fríos o sitios elevados y disminuye en años cálidos. La variación del desfasaje fenológico entre especies simpátricas con el régimen térmico anual y con la elevación del sitio podría brindar una estrategia de permanencia y recuperación o expansión de rango del subgénero por hibridación entre especies genéticamente compatibles pero ecológicamente divergentes. Por el contrario, bajo climas más cálidos tendría lugar un aumento de la asincronía, el aislamiento reproductivo interespecífico y la diversificación. Estas asincronías o desplazamientos fenológicos entre especies son dinámicas, sensibles a la variación climática natural y particularmente sensibles a la variación climática acelerada por efecto antrópico. Está predicho que, en promedio, el efecto del cambio climático aumentará la asincronía fenológica entre especies emparentadas con efectos fuertes sobre las interacciones ecológicas entre especies y el flujo genético interespecífico (Park *et al.*, 2022). Nuestros resultados sobre la variación anual de la asíncrona apoyan la propuesta y abren preguntas sobre la respuesta al cambio climático de los bosques dominados por las especies amantes del frío de *Nothofagus*.

Es sabido que la divergencia entre pares de especies puede generar incompatibilidades genéticas (aislamiento postcigótico intrínseco) y se cree que este tipo de aislamiento, a diferencia del aislamiento precigótico, es permanente (Coyne & Orr, 2004). Pero estudios recientes muestran que la hibridación continua a lo largo del tiempo puede colapsar las incompatibilidades de forma dependiente del grado de redundancia genética: incompatibilidades redundantes (por ejemplo por genes o rutas metabólicas duplicadas) son más sensibles al colapso del aislamiento intrínseco y las incompatibilidades pueden terminar transformadas en polimorfismos interespecífico cuasi-neutrales (Xiong & Mallet, 2022). Los valores de F_{ST} entre especies con SNP

neutrales informados en esta tesis y otros trabajos (capítulo 4), las evidencias de la permeabilidad de las barreras reproductivas prepolinización (Juri & Premoli, 2021; capítulo 2) y la existencia de polimorfismos neutrales y adaptativos del cloroplasto compartidos entre especies (Premoli *et al.*, 2012; Acosta *et al.*, 2014; capítulo 3) se pueden relacionar con esta última propuesta: una historia de divergencia con intercambio genético continuo entre especies simpátricas en amplio rango que ha transformado las incompatibilidades genéticas en polimorfismos casi neutrales. Por otro lado, la adaptación ecológica tiene un importante papel en el control del intercambio genético entre poblaciones intra e interespecíficas (Premoli & Brewer, 2007; Diaz *et al.*, 2022; capítulo 4) del subgénero *Nothofagus*. Independientemente de su redundancia genética, los alelos de incompatibilidad responsables de los fenotipos que favorecen la adaptación local serán difíciles de homogeneizar o eliminar. En ambientes de divergencia creciente, las presiones selectivas sobre la adaptación local también son crecientes o al menos variables aumentando la estabilidad de incompatibilidades en los híbridos. Las especies que dependen solamente de la selección ecológica son muy vulnerables al cambio ambiental y podrían perder su identidad por hibridación (Xiong & Mallet, 2022). Aunque no se demuestra de forma directa, nuestro trabajo sugiere que las barreras reproductivas postpolinización entre especies de *Nothofagus* tienen una base genética que podría resultar en incompatibilidades en los híbridos (barreras intrínsecas) además de producir fenotipos mal adaptados a un ambiente parental dado (barreras extrínsecas). La fuerte heterogeneidad ambiental y ecológica que marca la cordillera de los Andes y la migración de genotipos desde poblaciones alopátricas conespecíficas podría proteger la identidad de especies simpátricas potencialmente interfértiles ante escenarios de cambio climático moderado, especialmente en el caso de barreras reproductivas prepolinización permeables y variables como en el caso del subgénero *Nothofagus*.

En las plantas, la especiación ecológica y la especiación parapátrica son más comunes de lo que antiguamente se creía (Anacker & Strauss, 2014). La naturaleza sésil de las plantas, en contraste con los modelos animales usados para el estudio de la especiación geográfica, las hace muy sensibles a la heterogeneidad ambiental aun cuando es sutil o a escala geográfica reducida. Incluso se espera que las especies

hermanas con superposición de rango diverjan ecológica además de genéticamente (Anacker & Strauss, 2014). Nuestro trabajo resalta la importancia de la segregación ecológica en la especiación gracias a la identificación de funciones biológicas (percepción del ambiente abiótico y ecológico, desarrollo y la regulación hormonal del crecimiento, floración) relevantes para la identidad de las especies y que se pueden asociar con la segregación de sus nichos. Las variaciones en la fenología pueden ser consecuencia de la aparición de nuevas oportunidades ecológicas, cambios ambientales o incluso el reforzamiento. Cuando esta variación fenológica es heredable, puede ser suficiente para generar aislamiento reproductivo incluso en ausencia de procesos selectivos (“aislamiento temporal”). Experimentos en jardín común muestran que los ritmos fenológicos en ambientes contrastantes poseen base genética en *Nothofagus* (Premoli *et al.*, 2007). También es posible la “adaptación temporal” si los individuos se adaptan a las condiciones ambientales predominantes durante sus periodos reproductivos (Taylor & Friesen, 2017). La fuerte alocronía que detectamos entre especies simpátricas o entre poblaciones conoespecíficas ecológicamente divergentes también tiene base genética y no se debe exclusivamente a la plasticidad fenológica de las especies. La combinación de alocronía, que reduce las oportunidades de intercambio genético entre especies, y divergencia ecológica que reduce la aptitud de genotipos migrantes o híbridos, cooperan en el mantenimiento de entidades reconocibles como especies en presencia de flujo génico.

CONCLUSIONES

- Las barreras reproductivas precigóticas entre especies hermanas simpátricas del subgénero *Nothofagus* son permeables y plásticas, su fuerza depende fuertemente de las condiciones ambientales.
- La alocronía de la fenología floral es, en la actualidad, una fuerte barrera pre polinización al flujo genético entre especies simpátricas y entre poblaciones ecológicamente diferentes de una misma especie. Esta barrera fenológica es muy sensible a las variaciones de la temperatura (ya sea por la elevación o la variación interanual).
- La divergencia ecológica restringe la capacidad de migración efectiva (con intercambio genético) entre poblaciones simpátricas de especies distintas.
- Las especies del subgénero *Nothofagus* son entidades dinámicas y no fijas. Su historia evolutiva está atravesada por eventos de hibridación interespecíficos que han ayudado a moldear sus acervos genéticos, su distribución geográfica y su aptitud frente a distintos ambientes.
- Los genomas nucleares y organelares cuentan distintos aspectos de la historia evolutiva de las especies. Los genomas nucleares muestran el registro de la alocronía y la adaptación ecológica que conduce a la divergencia entre especies y los genomas organelares evidencian una historia biogeográfica delineada por la alta tasa de hibridación histórica y la baja capacidad de dispersión de las semillas.

Bibliografía

- Abbott R, Albach D, Ansell S, Arntzen JW, Baird SJE, Bierne N, Boughman J, Brelsford A, Buerkle CA, Buggs R, et al. 2013.** Hybridization and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **26**: 229–246.
- Acosta MC, Mathiasen P, Premoli AC. 2012.** Predominant regeneration strategy results in species-specific genetic patterns in sympatric *Nothofagus* s.s. congeners (Nothofagaceae). *Australian Journal of Botany* **60**: 319–327.
- Acosta CM, 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.
- Acosta CM, Premoli AC. 2010.** Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 235–242.
- Álvarez I, Wendel JF. 2003.** Ribosomal ITS sequences and plant phylogenetic inference. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **29**: 417–434.
- Anacker BL, Strauss SY. 2014.** The geography and ecology of plant speciation: Range overlap and niche divergence in sister species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **281**.
- Arista M, Ortiz PL, Talavera S. 1997.** Reproductive isolation of two sympatric subspecies of *Juniperus phoenicea* (Cupressaceae) in southern Spain. *Plant Systematics and Evolution* **208**: 225–237.
- Arnold ML, Robinson JJ, Buckner CM, Bennet BD. 1992.** Pollen dispersal and interspecific gene flow in Louisiana irises. *Heredity* **68**: 399–404.
- Avise JC. 2009.** Phylogeography: Retrospect and prospect. *Journal of Biogeography* **36**: 3–15.
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987.** Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* **18**: 489–522.
- Baack E, Melo MC, Rieseberg LH, Ortiz-Barrientos D. 2015.** The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytologist* **207**: 968–984.
- Bachmann JC, Jansen van Rensburg A, Cortazar-Chinarro M, Laurila A, Van Buskirk J. 2020.** Gene Flow Limits Adaptation along Steep Environmental Gradients. *The American Naturalist* **195**: E67–E86.
- Barker NP, Howis S, Nordenstam B, Källersjö M, Eldenäs P, Griffioen C, Linder HP. 2009.** Nuclear and chloroplast DNA-based phylogenies of *Chrysanthemoides Tourn. ex Medik.* (Calenduleae; Asteraceae) reveal extensive incongruence and generic paraphyly, but support the recognition of infraspecific taxa in *C. monilifera*. *South African Journal of Botany* **75**: 560–572.
- 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.

Beier S, Thiel T, Münch T, Scholz U, Mascher M. 2017. MISA-web: A web server for microsatellite prediction. *Bioinformatics* **33**: 2583–2585.

Bendich AJ. 2004. Circular chloroplast chromosomes: The grand illusion. *Plant Cell* **16**: 1661–1666.

Berardini TZ, Reiser L, Li D, Mezheritsky Y, Muller R, Strait E, Huala E. 2015. The arabidopsis information resource: Making and mining the “gold standard” annotated reference plant genome. *genesis* **53**: 474–485.

Bertels-Psotka A, Cusminsky GC. 2014. Nuevas especies de ostrácodos de la Formación Ñirihuau (Oligoceno) en su área tipo (alrededores de San Carlos de Bariloche), provincia de Río Negro, República Argentina. *Ameghiniana* **36**: 71–81.

Birky CW. 2001. The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annual Review of Genetics* **35**: 125–148.

Bolnick DI, Fitzpatrick BM. 2007. Sympatric speciation: Models and empirical evidence. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **38**: 459–487.

Boschman LM. 2021. Andean mountain building since the Late Cretaceous: A paleoelevation reconstruction. *Earth-Science Reviews* **220**: 103640.

Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* **23**: 2633–2635.

Brooks ME, Kristensen K, Benthem KJ Van, Magnusson A, Berg CW, Nielsen A, Skaug HJ, Mächler M, Bolker BM. 2017. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal* **9**: 378–400.

Brudno M, Malde S, Poliakov A, Do CB, Couronne O, Dubchak I, Batzoglou S. 2003. Glocal alignment: Finding rearrangements during alignment. *Bioinformatics* **19**.

Bush Guy L. 1969. Sympatric host race formation and speciation in frugivorous flies of the genus. *Evolution*: 237–251.

Cabral Vilas Boas J, Fava WS, Laroca S, Sigrist MR. 2013. Two sympatric Byrsonima species (Malpighiaceae) differ in phenological and reproductive patterns. *Flora* **208**: 360–369.

Carson HL. 1975. The genetics of speciation at the diploid level. *American Naturalist* **109**: 83–92.

Chang H, Zhang L, Xie H, Liu J, Xi Z, Xu X. 2021. The Conservation of Chloroplast Genome Structure and Improved Resolution of Intrafamilial Relationships of Crassulaceae. *Frontiers in Plant Science* **12**.

Charlesworth B. 2009. Effective population size and patterns of molecular evolution and variation. *Nature Reviews Genetics* **10**: 195–205.

- Chen H, Boutros PC. 2011.** VennDiagram: a package for the generation of highly-customizable Venn and Euler diagrams in R. *BMC Bioinformatics* **12**: 35.
- Chmura HE, Kharouba HM, Ashander J, Ehlman SM, Rivest EB, Yang LH. 2019.** The mechanisms of phenology: the patterns and processes of phenological shifts. *Ecological Monographs* **89**: e01337.
- Chuine I. 2010.** Why does phenology drive species distribution? *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **365**: 3149–3160.
- Chumley TW, Palmer JD, Mower JP, Fourcade HM, Calie PJ, Boore JL, Jansen RK. 2006.** The Complete Chloroplast Genome Sequence of *Pelargonium x hortorum*: Organization and Evolution of the Largest and Most Highly Rearranged Chloroplast Genome of Land Plants. *Molecular Biology and Evolution* **23**: 2175–2190.
- Clausen J. 1951.** *Stages in the evolution of plant species*. Ithaca, Nueva York: Cornell University Press.
- Cole LW, Guo W, Mower JP, Palmer JD. 2018.** High and Variable Rates of Repeat-Mediated Mitochondrial Genome Rearrangement in a Genus of Plants. *Molecular biology and evolution* **35**: 2773–2785.
- Conesa A, Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Talon M, Robles M. 2005.** Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**: 3674–3676.
- Cook LG, Crisp MD. 2005.** Not so ancient: The extant crown group of *Nothofagus* represents a post-Gondwanan radiation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **272**: 2535–2544.
- Corriveau JL, Coleman AW. 1988.** Rapid Screening Method To Detect Potential Biparental Inheritance of Plastid Dna and Results for Over 200 Angiosperm Species. *American Journal of Botany* **75**: 1443–1458.
- Coyne JA. 2007.** Sympatric speciation. *Current Biology* **17**: 787–788.
- Coyne JA, Orr AH. 2004.** *Speciation*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc.
- Cuevas JG. 2000.** Tree recruitment at the *Nothofagus pumilio* alpine timberline in Tierra del Fuego, Chile. *Journal of Ecology* **88**: 840–855.
- Van Damme K, Cornetti L, Fields PD, Ebert D. 2022.** Whole-Genome Phylogenetic Reconstruction as a Powerful Tool to Reveal Homoplasy and Ancient Rapid Radiation in Waterflea Evolution (J Bond, Ed.). *Systematic Biology* **71**: 777–787.
- Dantec CF, Vitasse Y, Bonhomme M, Louvet JM, Kremer A, Delzon S. 2014.** Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range. *International Journal of Biometeorology* **58**: 1853–1864.
- Darling ACE, Mau B, Blattner FR, Perna NT. 2004.** Mauve: Multiple alignment of conserved genomic sequence with rearrangements. *Genome Research* **14**: 1394–1403.
- Darwin C. 1859.** *On the Origin of Species by Means of Natural Selection, or*

Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life (J Murray, Ed.). London.

Davies SJ, Ashton PS. 1999. Davies, S.J. and Ashton, P.S. (1999), Phenology and fecundity in 11 sympatric pioneer species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Borneo. *America* **86**: 1786–1795.

Dettmann ME, T. PD, Romero EJ, Zamaloza M del C. 1990. *Nothofagidites Erdtman ex Potonie 1960; a catalogue of species with notes on the paleogeographic distribution of Nothofagus B1 (Southern Beech)*. New Zealand Geological Survey Palaeontological Bulletin.

Diaz DG. 2018. Potenciales respuestas diferenciales a la sequía y su base genética en *Nothofagus dombeyi*.

Diaz DG, Ignazi G, Mathiasen P, Premoli AC. 2022. Climate-driven adaptive responses to drought of dominant tree species from Patagonia. *New Forests* **53**: 57–80.

Dieckmann U, Doebeli M. 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* **400**: 354–357.

Dong S, Chen L, Liu Y, Wang Y, Zhang S, Yang L, Lang X, Zhang S. 2020. The draft mitochondrial genome of *Magnolia biondii* and mitochondrial phylogenomics of angiosperms. *PLoS ONE* **15**: 1–18.

Donoso C. 1987. Variación natural en especies de *Nothofagus* en Chile. *Bosque* **8**: 85–97.

Donoso Zegers C. 2006. *Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina: autoecología*. Valdivia, Chile: Marisa Cuneo Ediciones,.

Doyle JJ. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**: 13–15.

Drouin G, Daoud H, Xia J. 2008. Relative rates of synonymous substitutions in the mitochondrial, chloroplast and nuclear genomes of seed plants. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **49**: 827–831.

Duminil J, Besnard G. 2021. Utility of the Mitochondrial Genome in Plant Taxonomic Studies. *Methods in Molecular Biology* **2222**: 107–118.

Elshire RJ, Glaubitz JC, Sun Q, Poland JA, Kawamoto K, Buckler ES, Mitchell SE. 2011. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* **6**: 1–10.

Fasanella M, Mathiasen P, Juri G, Díaz DG, Hasbún R, Premoli AC. 2023. Ancient vicariance is reinforced by adaptive divergence in the southern beech: Contributions from geogenomics. *Journal of Biogeography* **50**: 564–575.

Fasanella M, Suarez ML, Hasbún R, Premoli AC. 2020. Individual-based dendrogenomic analysis of forest dieback driven by extreme droughts. *Canadian Journal of Forest Research* **51**.

Feder JL, Xie X, Rull J, Velez S, Forbes A, Leung B, Dambroski H, Filchak KE, Aluja M. 2005. Mayr, dobzhansky, and bush and the complexities of sympatric speciation in rhabdomyia. *Systematics and the Origin of Species: On Ernst Mayr's 100th Anniversary* **102**: 162–181.

- Felsenstein J. 1981.** Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. *Journal of Molecular Evolution* **17**: 368–376.
- Fernández N, Fontenla S, Fioroni F, Soto-Mancilla M, Carron A, Moguilevsky D, Marchelli P, Marín C, Mestre MC. 2022.** Mycorrhizas in Nothofagus From South America: What Do We Know From Nursery and Field Experiences? In: 281–304.
- Fernández DA, Santamarina PE, Tellería MC, Palazzesi L, Barreda VD. 2016.** Pollen morphology of Nothofagus (Nothofagaceae, Fagales) and its phylogenetic significance. *Acta Palaeobotanica* **56**: 223–245.
- Fitzpatrick BM, Fordyce JA, Gavrillets S. 2008.** What, if anything, is sympatric speciation? *Journal of Evolutionary Biology* **21**: 1452–1459.
- Flanagan SP, Jones AG. 2017.** Constraints on the F_{ST}-Heterozygosity Outlier Approach. *Journal of Heredity* **108**: 561–573.
- Folguera A, Orts D, Spagnuolo M, Vera ER, 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.
- Fox GA. 2003.** Assortative mating and plant phenology: Evolutionary and practical consequences. *Evolutionary Ecology Research* **5**: 1–18.
- Gandini CL, Sanchez-Puerta M V. 2017.** Foreign plastid sequences in plant mitochondria are frequently acquired via mitochondrion-to-mitochondrion horizontal transfer. *Scientific Reports* **7**: 1–8.
- Gao LZ, Liu YL, Zhang D, Li W, Gao J, Liu Y, Li K, Shi C, Zhao Y, Zhao YJ, et al. 2019.** Evolution of *Oryza* chloroplast genomes promoted adaptation to diverse ecological habitats. *Communications Biology* **2**: 1–13.
- Gavrillets S. 2004.** *Fitness landscapes and the origin of species*. Princeton, New Jersey: Princeton University Press.
- Gavrillets S, Waxman D. 2002.** Sympatric speciation by sexual conflict. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 10533–10538.
- Gotz S, Garcia-Gomez JM, Terol J, Williams TD, Nagaraj SH, Nueda MJ, Robles M, Talon M, Dopazo J, Conesa A. 2008.** High-throughput functional annotation and data mining with the Blast2GO suite. *Nucleic Acids Research* **36**: 3420–3435.
- Goudet J. 2005.** HIERFSTAT, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes* **5**: 184–186.
- Graham A. 2009.** The andes: A geological overview from a biological perspective. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **96**: 371–385.
- Grant PR. 1972.** Convergent and divergent character displacement. *Biological Journal of the Linnean Society* **4**: 39–68.
- Greiner S, Lehwark P, Bock R. 2019.** OrganellarGenomeDRAW (OGDRAW) version 1.3.1: Expanded toolkit for the graphical visualization of organellar genomes. *Nucleic Acids Research* **47**: W59–W64.
- Greiner S, Sobanski J, Bock R. 2015.** Why are most organelle genomes transmitted

maternally? *BioEssays* **37**: 80–94.

Gruzdev E V., Kadnikov V V., Beletsky A V., Mardanov A V., Ravin N V. 2019. Extensive plastome reduction and loss of photosynthesis genes in *Diphelypaea coccinea*, a holoparasitic plant of the family Orobanchaceae. *PeerJ* **7**: e7830.

Gualberto JM, Newton KJ. 2017. Plant Mitochondrial Genomes: Dynamics and Mechanisms of Mutation. *Annual Review of Plant Biology* **68**: 225–252.

Gupta PK, Roy JK, Prasad M. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Current Science* **80**: 524–535.

Hadad MA, Arco Molina J, Roig Juñent FA, Amoroso MM, Müller G, Araneo D, Tardif JC. 2019. Frost record in tree rings linked to atmospheric circulation in northern Patagonia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **524**: 201–211.

Haldane JBS. 1930. A mathematical theory of natural and artificial selection. (Part VI, Isolation.). *Mathematical Proceedings of the Cambridge Philosophical Society* **26**: 220–230.

Hamilton MB. 1998. Four primer pairs for the amplification of chloroplast intergenic regions with intraspecific variation. *Molecular Ecology* **8**: 521–523.

Hartig F. 2020. DHARMA: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level / Mixed) Regression Models.

Hasbún R, González J, Isturra C, Fuentes G, Alarcón D, Ruiz E. 2016. Using genome-wide SNP discovery and genotyping to reveal the main source of population differentiation in *Nothofagus dombeyi* (Mirb.) Oerst. in Chile. *International Journal of Genetics*: 10.

Healey A, Lee DJ, Furtado A, Henry RJ. 2018. Evidence of inter-sectional chloroplast capture in *Corymbia* among sections *Torellianae* and *Maculatae*. *Australian Journal of Botany* **66**: 369–378.

Heenan PB, Smissen RD. 2013. Revised circumscription of *Nothofagus* and recognition of the segregate genera *Fuscospora*, *Lophozonia*, and *Trisyngyne* (*Nothofagaceae*). *Phytotaxa* **146**: 1–31.

Hewitt G. 1997. The Subdivision of Species by Hybrid Zones. In: Otte D, Endler JA, eds. *Speciation and its consequences*.

Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF, Yoder AD. 2010. Phylogeography's past, present, and future: 10 years after *Avice*, 2000. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **54**: 291–301.

Hill RS. 1991. Tertiary *Nothofagus* (*Fagaceae*) macrofossils from Tasmania and Antarctica and their bearing on the evolution of the genus. *Botanical Journal of the Linnean Society* **105**: 73–112.

Hill RS. 2001. Biogeography, evolution and palaeoecology of *Nothofagus* (*Nothofagaceae*): The contribution of the fossil record. *Australian Journal of Botany* **49**: 321–332.

- Hill RS, Dettmann ME. 1996.** Origin and diversification of the genus *Nothofagus*. In: Veblen TT, Hill RS, Read J, eds. *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. New Haven: Yale University Press, 11–24.
- Hill RS, Jordan GJ. 1993.** The evolutionary history of *nothofagus* (Nothofagaceae). *Australian Systematic Botany* **6**: 111–126.
- Hill RS, Read J. 1991.** A revised infrageneric classification of *Nothofagus* (Fagaceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* **105**: 37–72.
- Hu S, Sablok G, Wang B, Qu D, Barbaro E, Viola R, Li M, Varotto C. 2015.** Plastome organization and evolution of chloroplast genes in Cardamine species adapted to contrasting habitats. *BMC Genomics* **16**: 1–14.
- Hu H, Sun P, Yang Y, Ma J, Liu J. 2023.** Genome-scale angiosperm phylogenies based on nuclear, plastome, and mitochondrial datasets. *Journal of Integrative Plant Biology*: 1–4.
- Hu Y, Woeste KE, Zhao P. 2017.** Completion of the Chloroplast Genomes of Five Chinese Juglans and Their Contribution to Chloroplast Phylogeny. *Frontiers in Plant Science* **7**.
- Hubert F, Grimm GW, Jousselin E, Berry V, Franc A, Kremer A. 2014.** Multiple nuclear genes stabilize the phylogenetic backbone of the genus *Quercus*. *Systematics and Biodiversity* **12**: 405–423.
- Huxley J. 1938.** Clines: An auxiliary taxonomic principle. *Nature* **142**: 219–220.
- Ignazi G, Mathiasen P, Premoli AC. 2019.** Climatic gradients model genetic diversity in widespread woody trees: The case of *Nothofagus pumilio* in the southern Andes. *Ecosistemas* **28**: 35–47.
- Irwin DE. 2002.** Phylogeographic Breaks Without Geographic Barriers To Gene Flow. *Evolution* **56**: 2383–2394.
- Johannesson K. 2001.** Parallel speciation: A key to sympatric divergence. *Trends in Ecology and Evolution* **16**: 148–153.
- Jombart T, Ahmed I. 2011.** adegenet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. *Bioinformatics* **27**: 3070–3071.
- Juárez A, Arribére MA, Arcagni M, Williams N, Rizzo A, Ribeiro Guevara S. 2016.** Heavy metal and trace elements in riparian vegetation and macrophytes associated with lacustrine systems in Northern Patagonia Andean Range. *Environmental Science and Pollution Research* **23**: 17995–18009.
- Juri G, Premoli AC. 2021.** Allochrony of neighbour ecological species: Can isolation by time maintain divergence? The natural experiment of sympatric *Nothofagus*. *Forest Ecology and Management* **497**: 119466.
- Kamvar ZN, Tabima JF, Grünwald NJ. 2014.** Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction. *PeerJ* **2**: 1–14.
- Kassambara A. 2020.** ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots.

- Katoh K, Standley DM. 2013.** MAFFT multiple sequence alignment software version 7: Improvements in performance and usability. *Molecular Biology and Evolution* **30**: 772–780.
- Kimura M. 1980.** A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution* **16**: 111–120.
- Kirkpatrick M. 2000.** Reinforcement and divergence under assortative mating. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **267**: 1649–1655.
- Knoop V. 2004.** The mitochondrial DNA of land plants: Peculiarities in phylogenetic perspective. *Current Genetics* **46**: 123–139.
- Kumar R, Kumar V. 2018.** A review of phylogeography: biotic and abiotic factors. *Geology, Ecology, and Landscapes* **2**: 268–274.
- Kuo CH, Avise JC. 2005.** Phylogeographic breaks in low-dispersal species: The emergence of concordance across gene trees. *Genetica* **124**: 179–186.
- Lê S, Josse J, Husson F. 2008.** FactoMineR : An R Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software* **25**: 253–258.
- Leaché AD, Oaks JR. 2017.** The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* **48**: 69–84.
- Lenormand T. 2002.** Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution* **17**: 183–189.
- Lenth R. 2020.** emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. **0**: 0.
- Levin DA. 2006.** Flowering Phenology in Relation to Adaptive Radiation. *Systematic Botany* **31**: 239–246.
- Lu F, Lipka AE, Glaubitz J, Elshire R, Cherney JH, Casler MD, Buckler ES, Costich DE. 2013.** Switchgrass Genomic Diversity, Ploidy, and Evolution: Novel Insights from a Network-Based SNP Discovery Protocol. *PLoS Genetics* **9**.
- Ludwig JA, Reynolds JF. 1988.** *Statistical Ecology. A Primer on Methods and Computing*. New York USA: John Wiley and Sons, Inc.
- Madeira JA, Fernandes GW. 1999.** Reproductive phenology of sympatric taxa of Chamaecrista (Leguminosae) in Serra do Cipo, Brazil. *Journal of Tropical Ecology* **15**: 463–479.
- Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, et al. 2019.** The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Research* **47**: W636–W641.
- Mallet J. 2007.** Hybrid speciation. *Nature* **446**: 279–283.
- Mallet J, Meyer A, Nosil P, Feder JL. 2009.** Space, sympatry and speciation. *Journal of Evolutionary Biology* **22**: 2332–2341.
- Manos PS. 1997.** Systematics of Nothofagus (Nothofagaceae) based on rDNA spacer sequences (ITS): Taxonomic congruence with morphology and plastid sequences.

American Journal of Botany **84**: 1137–1155.

Marshall JL, Arnold ML, Howard DJ. 2002. Reinforcement: The road not taken. *Trends in Ecology and Evolution* **17**: 558–563.

Martin P, Dowd J. 1993. Using Sequences of rbcL to Study Phylogeny and Biogeography of Nothofagus Species. *Australian Systematic Botany* **6**: 441.

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.

Mathiasen P, Premoli AC. 2016. Living on the edge: adaptive and plastic responses of the tree Nothofagus pumilio to a long-term transplant experiment predict rear-edge upward expansion. *Oecologia* **181**: 607–619.

Matute DR, Cooper BS. 2021. Comparative studies on speciation: 30 years since Coyne and Orr. *Evolution* **75**: 764–778.

Mayr E. 1942. *Systematics And The Origin Of Species*. New York: Columbia University Press.

Mayr E. 1947. Ecological Factors in Speciation Author (s): Ernst Mayr Published by : Society for the Study of Evolution Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/2405327> . *Evolution* **1**: 263–288.

Mayr E. 1949. Speciation and selection. *Proceedings of the American Philosophical Society* **93**: 514–519.

Mayr E. 1954. Geographic Speciation in Tropical Echinoids. *Evolution* **8**: 1.

Mazer SJ, Travers SE, Cook BI, Davies TJ, Bolmgren K, Kraft NJB, Salamin N, Inouye DW. 2013. Flowering date of taxonomic families predicts phenological sensitivity to temperature: Implications for forecasting the effects of climate change on unstudied taxa. *American Journal of Botany* **100**: 1381–1397.

McCulloch RD, Mathiasen P, Premoli AC. 2022. Palaeoecological evidence of pollen morphological changes: A climate change adaptation strategy? *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* **601**: 1–10.

Merchant N, Lyons E, Goff S, Vaughn M, Ware D, Micklos D, Antin P. 2016. The iPlant Collaborative: Cyberinfrastructure for Enabling Data to Discovery for the Life Sciences. *PLoS Biology* **14**: 1–9.

Moczek AP. 2008. On the origins of novelty in development and evolution. *BioEssays* **30**: 432–447.

Mojica JP, Lee YW, Willis JH, Kelly JK. 2012. Spatially and temporally varying selection on intrapopulation quantitative trait loci for a life history trade-off in *Mimulus guttatus*. *Molecular Ecology* **21**: 3718–3728.

Money D, Gardner K, Migicovsky Z, Schwaninger H, Zhong GY, Myles S. 2015. LinkImpute: Fast and accurate genotype imputation for nonmodel organisms. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **5**: 2383–2390.

Mower JP, Sloan DB, Alverson AJ. 2012. Plant Mitochondrial Genome Diversity: The

Genomics Revolution. In: Plant Genome Diversity Volume 1. Vienna: Springer Vienna, 123–144.

Muir G, Filatov D. 2007. A selective sweep in the chloroplast DNA of dioecious silene (Section *Elisanthe*). *Genetics* **177**: 1239–1247.

Narum SR, Hess JE. 2011. Comparison of *F_{ST}* outlier tests for SNP loci under selection. *Molecular Ecology Resources* **11**: 184–194.

Nei M. 1972. Genetic Distance between Populations. *The American Naturalist* **106**: 283–292.

Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* **89**: 583–590.

Nevill PG, Després T, Bayly MJ, Bossinger G, Ades PK. 2014. Shared phylogeographic patterns and widespread chloroplast haplotype sharing in *Eucalyptus* species with different ecological tolerances. *Tree Genetics & Genomes* **10**: 1079–1092.

Nosil P. 2008. Speciation with gene flow could be common. *Molecular Ecology* **17**: 2103–2106.

Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D. 2009. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**: 375–402.

Nosil P, Vines TH, Funk DJ. 2005. Perspective: Reproductive isolation caused by natural selection against immigrants from divergent habitats. *Evolution* **59**: 705–719.

Ollerton J, Lack AJ. 1992. Flowering phenology: An example of relaxation of natural selection? *Trends in Ecology & Evolution* **7**: 274–276.

Orr MR, Smith TB. 1998. Ecology and speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **13**: 502–506.

Ortiz-Barrientos D, Grealy A, Nosil P. 2009. The genetics and ecology of reinforcement: Implications for the evolution of prezygotic isolation in sympatry and beyond. *Annals of the New York Academy of Sciences* **1168**: 156–182.

Van de Paer C, Bouchez O, Besnard G. 2018. Prospects on the evolutionary mitogenomics of plants: A case study on the olive family (Oleaceae). *Molecular Ecology Resources* **18**: 407–423.

Palme AE, Su Q, Palsson S, Lascoux M. 2004. Extensive sharing of chloroplast haplotypes among European birches indicates hybridization among *Betula pendula*, *B. pubescens* and *B. nana*. *Molecular Ecology* **13**: 167–178.

Palmer JD, Jansen RK, Michaels HJ, Chase MW, Manhart JR. 1988. Chloroplast DNA Variation and Plant Phylogeny. *Annals of the Missouri Botanical Garden* **75**: 1180.

Park DS, Breckheimer IK, Ellison AM, Lyra GM, Davis CC. 2022. Phenological displacement is uncommon among sympatric angiosperms. *New Phytologist* **233**: 1466–1478.

Payros A, Pujalte V no, Schmitz B. 2022. *Mid- latitude alluvial and hydroclimatic changes during the Paleocene–Eocene Thermal Maximum as recorded in the Tremp-Graus Basin, Spain.*

- Petit S. 2001.** The reproductive phenology of three sympatric species of columnar cacti on Curaçao. *Journal of Arid Environments* **49**: 521–531.
- Petit RJ, Brewer S, Bordács S, Burg K, Cheddadi R, Coart E, Cottrell J, Csaikl UM, Van Dam B, Deans JD, et al. 2002.** Identification of refugia and post-glacial colonisation routes of European white oaks based on chloroplast DNA and fossil pollen evidence. In: *Forest Ecology and Management*. 49–74.
- Piao S, Liu Q, Chen A, Janssens IA, Fu Y, Dai J, Liu L, Lian X, Shen M, Zhu X. 2019.** Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges. *Global Change Biology* **25**: 1922–1940.
- Piot A, Hackel J, Christin P-A, Besnard G. 2018.** One-third of the plastid genes evolved under positive selection in PACMAD grasses. *Planta* **247**: 255–266.
- Premoli AC. 1996.** Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hybridization of South American *Nothofagus*. *Genetica* **97**: 55–64.
- Premoli AC. 2003.** Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *Journal of Heredity* **94**: 218–226.
- Premoli AC, Brewer CA. 2007.** Environmental v. genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Australian Journal of Botany* **55**: 585–591.
- Premoli AC, Mathiasen P. 2011.** Respuestas ecofisiológicas adaptativas y plásticas en ambientes secos de montaña: *Nothofagus pumilio*, el árbol que acaparó los andes australes. *Ecología Austral* **21**: 251–269.
- Premoli AC, Mathiasen P, Cristina Acosta M, Ramos VA. 2012.** Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be? *New Phytologist* **193**: 261–275.
- Premoli AC, Raffaele E, Mathiasen P. 2007.** Morphological and phenological differences in *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations: Evidence from a common garden. *Austral Ecology* **32**: 515–523.
- Primack RB. 1980.** Variation in the Phenology of Natural Populations of Montane Shrubs in New Zealand. *Journal of Ecology* **68**: 849–862.
- Privé F, Luu K, Vilhjálmsson BJ, Blum MGB, Rosenberg M. 2020.** Performing Highly Efficient Genome Scans for Local Adaptation with R Package padapt Version 4. *Molecular Biology and Evolution* **37**: 2153–2154.
- Pujana RR, Fernández DA, Panti C, Caviglia N. 2021.** The micro-and megafossil record of *Nothofagaceae* from South America. *Botanical Journal of the Linnean Society* **196**: 1–20.
- Pyron RA, Burbrink FT. 2010.** Hard and soft allopatry: Physically and ecologically mediated modes of geographic speciation. *Journal of Biogeography* **37**: 2005–2015.
- Quintero I, González-Caro S, Zalamea PC, Cadena CD. 2014.** Asynchrony of seasons: Genetic differentiation associated with geographic variation in climatic seasonality and reproductive phenology. *American Naturalist* **184**: 352–363.

- Quiroga MP, Castello L, Quipildor V, Premoli AC. 2019.** Biogeographically significant units in conservation: A new integrative concept for conserving ecological and evolutionary processes. *Environmental Conservation*: 1–9.
- Quiroga MP, Vidal Rusell R, Premoli AC. 2005.** Evidencia morfológica e isoenzimática de hibridación natural entre *Nothofagus antarctica* y *N. pumilio* en el noroeste patagónico. *Bosque (Valdivia)* **26**: 25–32.
- R Core Team. 2022.** R: A language and environment for statistical computing.
- Ramírez C, Correa M, Figueroa H, San Martín J. 1985.** Variación del hábito y el habitat de *Nothofagus antarctica* en el Centro Sur de Chile. *Bosque* **6**: 55–73.
- Ramos VA. 1982.** Ingresiones pacíficas del norte de la Patagonia. In: III Congreso Geológico Chilena. Concepción, Chile: Departamento de Geociencias Universidad de Concepción, 226–288.
- Ramos VA. 1989.** Andean Foothills Structures in Northern Magallanes Basin, Argentina. *AAPG Bulletin* **73**: 887–903.
- Rieseberg LH. 2001.** Chromosomal rearrangements and speciation. *Trends in Ecology & Evolution* **16**: 351–358.
- Rieseberg LH, Whitton J, Gardner K. 1999.** Hybrid zones and the genetic architecture of a barrier to gene flow between two sunflower species. *Genetics* **152**: 713–727.
- Riveros M, Parades MA, Rosas MT, Cardenas E, Armesto J, Arroyo MTK, Palma B. 1995.** Reproductive biology in species of the genus *Nothofagus*. *Environmental and Experimental Botany* **35**: 519–524.
- Rose JP, Toledo CAP, Lemmon EM, Lemmon AR, Sytsma KJ. 2021.** Out of Sight, Out of Mind: Widespread Nuclear and Plastid-Nuclear Discordance in the Flowering Plant Genus *Polemonium* (Polemoniaceae) Suggests Widespread Historical Gene Flow Despite Limited Nuclear Signal (B Carstens, Ed.). *Systematic Biology* **70**: 162–180.
- RStudio Team. 2022.** RStudio: Integrated Development for R.
- Rundell RJ, Price TD. 2009.** Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends in Ecology and Evolution* **24**: 394–399.
- Rusch VE. 1987.** *Estudio sobre la regeneración de la lenga en la Cuenca del Río Manso Superior, Río Negro. Informa del.* Buenos Aires, Argentina.
- Rusch VE. 1993.** Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Revista Chilena de Historia Natural* **66**: 131–141.
- Saitou N, Nei M. 1987.** The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* **4**: 406–425.
- Sauquet H, Ho SYW, Gandolfo MA, Jordan GJ, Wilf P, Cantrill DJ, Bayly MJ, Bromham L, Brown GK, Carpenter RJ, et al. 2012.** Testing the impact of calibration on molecular divergence times using a fossil-rich group: The case of *nothofagus* (Fagales). *Systematic Biology* **61**: 289–313.
- Schluter D, Nagel L. 1995.** Parallel Speciation by Natural Selection. *The American Naturalist* **146**: 292–301.

- Servedio MR, Van Doorn GS, Kopp M, Frame AM, Nosil P. 2011.** Magic traits in speciation: ‘magic’ but not rare? *Trends in Ecology and Evolution* **26**: 389–397.
- Setoguchi H, Ono M, Doi Y, Koyama H, Tsuda M. 1997.** Molecular phylogeny of *Nothofagus* (Nothofagaceae) based on the atpB-rbcL intergenic spacer of the chloroplast DNA. *Journal of Plant Research* **110**: 469–480.
- Shannon CE. 1948.** A Mathematical Theory of Communication. *Bell System Technical Journal* **27**: 379–423.
- Sharp PM, Li WH. 1986.** An evolutionary perspective on synonymous codon usage in unicellular organisms. *Journal of Molecular Evolution* **24**: 28–38.
- Shaw J, Lickey EB, Schilling EE, Small RL. 2007.** Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: The Tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* **94**: 275–288.
- Shaw J, Shafer HL, Rayne Leonard O, Kovach MJ, Schorr M, Morris AB. 2014.** Chloroplast DNA sequence utility for the lowest phylogenetic and phylogeographic inferences in angiosperms: The tortoise and the hare IV. *American Journal of Botany* **101**: 1987–2004.
- Shi L, Chen H, Jiang M, Wang L, Wu X, Huang L, Liu C. 2019.** CPGAVAS2, an integrated plastome sequence annotator and analyzer. *Nucleic Acids Research* **47**: W65–W73.
- Shrestha B, Weng ML, Theriot EC, Gilbert LE, Ruhlman TA, Krosnick SE, Jansen RK. 2019.** Highly accelerated rates of genomic rearrangements and nucleotide substitutions in plastid genomes of *Passiflora* subgenus *Decaloba*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **138**: 53–64.
- Soliani C, Tsuda Y, Bagnoli F, Gallo LA, Vendramin GG, Marchelli P. 2015.** Halfway encounters: Meeting points of colonization routes among the southern beeches *Nothofagus pumilio* and *N. antarctica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **85**: 197–207.
- Soliva M, Widmer A. 1999.** Genetic and Floral Divergence among Sympatric Populations of *Gymnadenia conopsea* s.l. (Orchideaceae) with Different Flowering Phenology. *International Journal of Plant Sciences* **160**: 897–905.
- Soltis DE, Albert VA, Savolainen V, Hilu K, Qiu Y, Chase MW, Farris JS, Rice DW, Palmer JD, Soltis PS. 2004.** Genome-scale data , angiosperm relationships , and ‘ending incongruence’’: a cautionary tale in phylogenetics. *Trends in Plant Science* **9**: 477–483.
- Soltis DE, Kuzoff RK. 1995.** Discordance between Nuclear and Chloroplast Phylogenies in the *Heuchera* Group (Saxifragaceae). *Evolution* **49**: 727.
- Sork VL. 2016.** Gene flow and natural selection shape spatial patterns of genes in tree populations: Implications for evolutionary processes and applications. *Evolutionary Applications* **9**: 291–310.
- Stecconi M, Marchelli P, Puntieri J, Picca P, Gallo L. 2004.** Natural hybridization between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, Nothofagaceae) and an evergreen (*N.*

- dombeyi) forest tree species: Evidence from morphological and isoenzymatic traits. *Annals of Botany* **94**: 775–786.
- Steinhorst L, Kudla J. 2013.** Calcium - a central regulator of pollen germination and tube growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**: 1573–1581.
- Steinke LR, Premoli AC, Souto CP, Hedrén M. 2008.** Adaptive and Neutral Variation of the Resprouter *Nothofagus antarctica* Growing in Distinct Habitats in North-Western Patagonia. *Silva Fennica* **42**: 177–188.
- Stoddart JA, Taylor JF. 1988.** Genotypic diversity: estimation and prediction in samples. *Genetics* **118**: 705–711.
- Storey JD, Bass AJ, Dabney A, Robinson D. 2022.** value: Q-value estimation for false discovery rate control. R package. : 1–4.
- Tamura K, Stecher G, Kumar S. 2021.** MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution* **38**: 3022–3027.
- Taylor RS, Friesen VL. 2017a.** The role of allochry in speciation. *Molecular Ecology* **26**: 3330–3342.
- Taylor RS, Friesen VL. 2017b.** The role of allochry in speciation. *Molecular Ecology* **26**: 3330–3342.
- Terry RG, Nowak RS, Tausch RJ. 2000.** Genetic variation in chloroplast and nuclear ribosomal DNA in Utah juniper (*Juniperus osteosperma*, Cupressaceae): evidence for interspecific gene flow. *American Journal of Botany* **87**: 250–258.
- Tillich M, Lehwark P, Pellizzer T, Ulbricht-Jones ES, Fischer A, Bock R, Greiner S. 2017.** GeSeq - Versatile and accurate annotation of organelle genomes. *Nucleic Acids Research* **45**: W6–W11.
- Torres C, Puntieri J. 2013.** Pollination and self-interference in *Nothofagus*. *Flora* **208**: 412–419.
- Van Valen L. 1976.** Ecological species, multispecies, and oaks. *TAXON* **25**: 233–239.
- Veblen TT, Donoso C, Kitzberger T, Rebertus AJ. 1996.** Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. In: Veblen TT, ed. *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. New Haven, Connecticut, United States of America: Yale University Press, 293–353.
- Venables WN, Ripley BD. 2002.** *Modern Applied Statistics with S*. New York: Springer.
- Vitasse Y, Delzon S, Bresson CC, Michalet R, Kremer A. 2009.** Altitudinal differentiation in growth and phenology among populations of temperate-zone tree species growing in a common garden. *Canadian Journal of Forest Research* **39**: 1259–1269.
- Vos RA. 2003.** Accelerated Likelihood Surface Exploration: The Likelihood Ratchet. *Systematic Biology* **52**: 368–373.
- Wang IJ, Bradburd GS. 2014.** Isolation by environment. *Molecular Ecology* **23**: 5649–5662.

- Weston PH, Hill RS. 2013.** Southern (Austral) Ecosystems. In: Encyclopedia of Biodiversity. Elsevier, 612–619.
- Wickham H, Averick M, Bryan J, Chang W, McGowan L, François R, Golemund G, Hayes A, Henry L, Hester J, et al. 2019.** Welcome to the Tidyverse. *Journal of Open Source Software* **4**: 1686.
- Wolfe KH, Li WH, Sharp PM. 1987.** Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **84**: 9054–9058.
- Worth JRP, Jordan GJ, McKinnon GE, Vaillancourt RE. 2009.** The major Australian cool temperate rainforest tree *Nothofagus cunninghamii* withstood Pleistocene glacial aridity within multiple regions: Evidence from the chloroplast. *New Phytologist* **182**: 519–532.
- Worth JRP, Larcombe MJ, Sakaguchi S, Marthick JR, Bowman DMJS, Ito M, Jordan GJ. 2016.** Transient hybridization, not homoploid hybrid speciation, between ancient and deeply divergent conifers. *American Journal of Botany* **103**: 246–259.
- Wright S. 1943.** Isolation by distance. *Genetics* **28**: 114–138.
- Xiong T, Mallet J. 2022.** On the impermanence of species: The collapse of genetic incompatibilities in hybridizing populations. *Evolution* **76**: 2498–2512.
- Yan M, Xiong Y, Liu R, Deng M, Song J. 2018.** The application and limitation of universal chloroplast markers in discriminating east Asian evergreen oaks. *Frontiers in Plant Science* **9**: 1–15.
- Yang YY, Qu XJ, Zhang R, Stull GW, Yi TS. 2021.** Plastid phylogenomic analyses of Fagales reveal signatures of conflict and ancient chloroplast capture. *Molecular Phylogenetics and Evolution* **163**: 107232.
- Yu W-B, Huang P-H, Li D-Z, Wang H. 2013.** Incongruence between Nuclear and Chloroplast DNA Phylogenies in Pedicularis Section Cyathophora (Orobanchaceae) (JH Badger, Ed.). *PLoS ONE* **8**: e74828.
- Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TTY. 2017.** Ggtree: an R Package for Visualization and Annotation of Phylogenetic Trees With Their Covariates and Other Associated Data. *Methods in Ecology and Evolution* **8**: 28–36.
- Zachos JC, Dickens GR, Zeebe RE. 2008.** An early Cenozoic perspective on greenhouse warming and carbon-cycle dynamics. *Nature* **451**: 279–283.
- Zang M, Su Q, Weng Y, Lu L, Zheng X, Ye D, Zheng R, Cheng T, Shi J, Chen J. 2019.** Complete chloroplast genome of *Fokienia hodginsii* (Dunn) Henry et Thomas: Insights into repeat regions variation and phylogenetic relationships in Cupressophyta. *Forests* **10**: 1–15.

Material Suplementario

CAPÍTULO 3

Tablas suplementarias

Tabla S3.1: Lista genomas de cloroplasto usados para la reconstrucción filogenética.

Nombre de la especie y número de accesión en NCBI.			
Especie	Número de accesión	Especie	Número de accesión
<i>Alnus cordata</i>	NC_036751	<i>Fagus lucida</i>	NC_061574
<i>Alnus glutinosa</i>	NC_039930	<i>Hamamelis mollis</i>	NC_037881.1
<i>Betula fruticosa</i>	NC_064122	<i>Juglans major</i>	NC_035966
<i>Betula pendula</i>	LT855378	<i>Juglans nigra</i>	NC_035967
<i>Carpinus oblongifolia</i>	NC_038092	<i>Lithocarpus hancei</i>	NC_060413
<i>Carpinus putoensis</i>	NC_033503	<i>Lithocarpus longinux</i>	NC_062048
<i>Carya hunanensis</i>	NC_046435	<i>Lophozonia moorei</i>	KT716499.1
<i>Carya laciniosa</i>	NC_056375	<i>Morella cerifera</i>	NC_050831
<i>Castanea crenata</i>	NC_054203	<i>Morella salicifolia</i>	NC_050270
<i>Castanea sativa</i>	NC_054204	<i>Ostrya chinensis</i>	NC_039817
<i>Castanopsis concinna</i>	NC_033409	<i>Ostrya japonica</i>	NC_039816
<i>Castanopsis tibetana</i>	NC_065324	<i>Ostryopsis davidiana</i>	NC_039130
<i>Casuarina cunninghamiana</i>	NC_058688	<i>Ostryopsis nobilis</i>	NC_040001
<i>Casuarina glauca</i>	NC_042681	<i>Platycarya longipes</i>	NC_063924
<i>Celtis australis</i>	NC_062418.1	<i>Platycarya strobilacea</i>	NC_035413
<i>Corylus americana</i>	NC_045287	<i>Pterocarya hupehensis</i>	NC_046431
<i>Corylus chinensis</i>	NC_032351	<i>Pterocarya tonkinensis</i>	NC_046427
<i>Cyclobalanopsis edithae</i>	NC_059007	<i>Quercus acrodonta</i>	NC_059815
<i>Cyclocarya paliurus</i>	NC_034315	<i>Quercus robur</i>	NC_046388
<i>Engelhardia fenzelii</i>	NC_053704	<i>Rhoiptelea chiliantha</i>	NC_053773
<i>Engelhardia roxburghiana</i>	NC_046434	<i>Trigonobalanus doichangensis</i>	NC_023959
<i>Fagus crenata</i>	NC_041252		

Tabla S3.2: Valores de RSCU para las especies estudiadas y sus haplotipos de ADNcp.

AA: aminoácido. C: codón. Na: N. antarctica. Nb: N. betuloides. Nd: N. dombeyi. Nn: N. nitida. Np: N. pumilio. No: N. obliqua

AA	C	Haplotipo Sur					Haplotipo Norte 1			Haplotipo Norte 2			No
		Na	Nb	Nd	Nn	Np	Na	Nd	Np	Na	Nd	Np	

Ala	GCA	1,08	1,07	1,08	1,07	1,1	1,24	1,25	1,16	1,03	1,03	1,1	1,13
Ala	GCC	0,95	0,96	0,95	0,96	1	0,96	0,96	0,88	0,95	0,95	0,9	0,93
Ala	GCG	0,64	0,63	0,64	0,63	0,6	0,64	0,65	0,67	0,69	0,69	0,7	0,69
Ala	GCU	1,33	1,34	1,33	1,34	1,3	1,15	1,14	1,3	1,34	1,34	1,3	1,25
Arg	AGA	1,85	1,92	1,85	1,92	1,9	1,9	1,89	1,98	2,02	2,02	1,9	1,92
Arg	AGG	1,05	1,02	1,05	1,02	1,1	1,11	1,1	1,03	0,97	0,97	1,1	1,01
Arg	CGA	1,08	1,07	1,08	1,07	1,1	1	1,01	1,09	1,09	1,09	1	1,08
Arg	CGC	0,5	0,51	0,5	0,51	0,5	0,47	0,47	0,5	0,51	0,51	0,5	0,48
Arg	CGG	0,8	0,74	0,8	0,74	0,8	0,82	0,82	0,71	0,74	0,74	0,8	0,76
Arg	CGU	0,72	0,74	0,72	0,74	0,7	0,7	0,71	0,69	0,68	0,68	0,7	0,74
Asn	AAC	0,62	0,61	0,62	0,61	0,6	0,59	0,59	0,59	0,6	0,6	0,6	0,63
Asn	AAU	1,38	1,39	1,38	1,39	1,4	1,41	1,41	1,41	1,4	1,4	1,4	1,37
Asp	GAC	0,54	0,53	0,54	0,53	0,5	0,6	0,6	0,55	0,57	0,57	0,6	0,55
Asp	GAU	1,46	1,47	1,46	1,47	1,5	1,4	1,4	1,45	1,43	1,43	1,5	1,45
Cys	UGC	0,75	0,75	0,75	0,75	0,8	0,78	0,76	0,76	0,73	0,73	0,8	0,81
Cys	UGU	1,25	1,25	1,25	1,25	1,3	1,22	1,24	1,24	1,27	1,27	1,2	1,19
Gln	CAA	1,39	1,43	1,39	1,43	1,4	1,36	1,36	1,43	1,44	1,44	1,4	1,39
Gln	CAG	0,61	0,57	0,61	0,57	0,6	0,64	0,64	0,57	0,56	0,56	0,6	0,61
Glu	GAA	1,36	1,41	1,36	1,41	1,4	1,36	1,36	1,38	1,4	1,4	1,4	1,4
Glu	GAG	0,64	0,59	0,64	0,59	0,6	0,64	0,64	0,62	0,6	0,6	0,6	0,6
Gly	GGA	1,39	1,45	1,39	1,45	1,4	1,36	1,36	1,41	1,4	1,4	1,4	1,4
Gly	GGC	0,6	0,61	0,6	0,61	0,6	0,62	0,62	0,59	0,58	0,58	0,7	0,61
Gly	GGG	1,03	0,99	1,03	0,99	1	1,05	1,04	1,01	1,03	1,03	1	1,01
Gly	GGU	0,98	0,95	0,98	0,95	1	0,97	0,97	0,99	0,98	0,98	1	0,98
His	CAC	0,61	0,57	0,61	0,57	0,6	0,61	0,61	0,61	0,62	0,62	0,6	0,58
His	CAU	1,39	1,43	1,39	1,43	1,4	1,39	1,39	1,39	1,38	1,38	1,4	1,42
Ile	AUA	1,12	1,09	1,12	1,09	1,1	1,08	1,09	1,04	1,06	1,06	1,1	1,05
Ile	AUC	0,68	0,68	0,68	0,68	0,7	0,72	0,72	0,74	0,71	0,71	0,7	0,73
Ile	AUU	1,2	1,23	1,2	1,23	1,2	1,2	1,2	1,22	1,23	1,23	1,2	1,21
Leu	CUA	0,96	0,89	0,96	0,89	1	0,94	0,94	0,86	0,88	0,88	0,9	0,87
Leu	CUC	0,66	0,67	0,67	0,67	0,7	0,73	0,74	0,72	0,75	0,75	0,7	0,73
Leu	CUG	0,52	0,53	0,52	0,53	0,5	0,51	0,51	0,54	0,51	0,51	0,5	0,53
Leu	CUU	1,19	1,23	1,19	1,23	1,2	1,2	1,2	1,17	1,17	1,17	1,3	1,25
Leu	UUA	1,44	1,5	1,44	1,5	1,4	1,39	1,39	1,45	1,43	1,43	1,4	1,37
Leu	UUG	1,22	1,18	1,22	1,18	1,2	1,23	1,22	1,27	1,26	1,26	1,2	1,25
Lys	AAA	1,37	1,39	1,37	1,39	1,4	1,38	1,37	1,37	1,39	1,39	1,4	1,37
Lys	AAG	0,63	0,61	0,63	0,61	0,6	0,62	0,63	0,63	0,61	0,61	0,6	0,63
Met	AUG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Phe	UUC	0,77	0,76	0,77	0,76	0,8	0,76	0,76	0,8	0,78	0,78	0,8	0,75

Phe	UUU	1,23	1,24	1,23	1,24	1,2	1,24	1,24	1,2	1,22	1,22	1,2	1,25
Pro	CCA	1,2	1,17	1,2	1,17	1,2	1,24	1,24	1,15	1,19	1,19	1,2	1,21
Pro	CCC	1	0,97	1	0,97	1	0,98	0,97	1,01	1	1	1	0,96
Pro	CCG	0,74	0,77	0,74	0,77	0,7	0,71	0,71	0,72	0,74	0,74	0,7	0,73
Pro	CCU	1,07	1,08	1,07	1,08	1,1	1,07	1,08	1,12	1,07	1,07	1,1	1,1
Ser	AGC	0,57	0,61	0,57	0,61	0,6	0,59	0,57	0,61	0,6	0,6	0,6	0,61
Ser	AGU	0,84	0,82	0,84	0,82	0,8	0,81	0,82	0,8	0,76	0,76	0,8	0,84
Ser	UCA	1,24	1,19	1,24	1,19	1,2	1,31	1,31	1,18	1,3	1,3	1,2	1,26
Ser	UCC	1,12	1,1	1,12	1,1	1,1	1,11	1,11	1,13	1,11	1,11	1,1	1,07
Ser	UCG	0,73	0,72	0,73	0,72	0,7	0,76	0,76	0,78	0,7	0,7	0,8	0,7
Ser	UCU	1,5	1,56	1,5	1,56	1,5	1,43	1,43	1,49	1,53	1,53	1,4	1,52
Stop	UAA	1,22	1,19	1,22	1,19	1,2	1,21	1,2	1,24	1,22	1,22	1,2	1,21
Stop	UAG	0,78	0,78	0,78	0,78	0,8	0,8	0,81	0,73	0,76	0,76	0,8	0,79
Stop	UGA	1	1,03	1	1,03	1	0,99	0,99	1,02	1,02	1,02	1	1
Thr	ACA	1,23	1,2	1,23	1,2	1,2	1,29	1,29	1,21	1,2	1,2	1,2	1,16
Thr	ACC	1,02	1,03	1,02	1,03	1	0,95	0,94	1,02	1,01	1,01	1	0,97
Thr	ACG	0,59	0,61	0,59	0,61	0,6	0,67	0,67	0,65	0,63	0,63	0,7	0,66
Thr	ACU	1,16	1,17	1,16	1,17	1,2	1,09	1,1	1,12	1,15	1,15	1,1	1,21
Trp	UGG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Tyr	UAC	0,62	0,63	0,62	0,63	0,6	0,63	0,64	0,66	0,63	0,63	0,6	0,63
Tyr	UAU	1,38	1,37	1,38	1,37	1,4	1,37	1,36	1,34	1,37	1,37	1,4	1,37
Val	GUA	1,26	1,21	1,26	1,21	1,3	1,28	1,27	1,19	1,23	1,23	1,2	1,2
Val	GUC	0,66	0,71	0,66	0,71	0,7	0,69	0,69	0,73	0,7	0,7	0,7	0,74
Val	GUG	0,71	0,69	0,71	0,69	0,7	0,71	0,71	0,72	0,69	0,69	0,7	0,68
Val	GUU	1,36	1,39	1,36	1,39	1,4	1,33	1,32	1,36	1,39	1,39	1,4	1,38

Tabla S3.3: Estadísticos descriptivos de los resultados de la secuenciación usada para GBS.

Tipo de secuenciación	single-end
Lecturas totales	248901409
Lecturas/individuo	2592723
Largo medio de fragmentos (pb)	101
Calidad media (PF)	35,68
%>=Q30	95,21
GC(%)	51

Tabla S3.4: Estadísticos provistos por BGI genomics para la secuenciación usada para obtención de genomas de cloroplasto y genes de mitocondria

Especie	Haplotipo CP	Lecturas totales	Bases totales	Largo fragmentos	Q20(%)	GC(%)
<i>N. antarctica</i>	Norte 1	13046582	1956987300	150	96.82	37.40
<i>N. antarctica</i>	Norte 2	13193478	1979021700	150	96.54	37.13
<i>N. antarctica</i>	Sur	12984274	1947641100	150	97.09	37.30
<i>N. betuloides</i>	Sur	14380906	2157135900	150	97.39	37.81
<i>N. dombeyi</i>	Norte 1	13178436	1976765400	150	97.18	37.35
<i>N. dombeyi</i>	Norte 2	13334180	2000127000	150	96.40	37.12
<i>N. dombeyi</i>	Sur	13212446	1981866900	150	97.13	37.66
<i>N. nitida</i>	Sur	13132642	1969896300	150	97.34	38.30
<i>N. obliqua</i>	NA	13074076	1961111400	150	97.30	36.63
<i>N. pumilio</i>	Norte 1	13051788	1957768200	150	97.04	37.50
<i>N. pumilio</i>	Norte 2	14491628	2173744200	150	97.83	38.17
<i>N. pumilio</i>	Sur	12814618	1922192700	150	97.08	37.53

Figuras suplementarias



Figura S3.1: Mapas de cloroplasto de genoma de cloroplasto

Mapas de cloroplasto de *N. antarctica* (N1, N2 y S), *N. betuloides*, *N. dombeyi* (N1, N2 y S), *N. nitida*, *N. pumilio* (N1, N2 y S) y *N. obliqua*.

CAPÍTULO 4:

Tablas suplementarias

Tabla S4.1: Distancias genéticas entre pares de especies y haplotipos del cloroplasto de Nei y relativos a la distancia máxima encontrada

Distancias de Nei entre especies mediante secuencias ITS publicadas en GeneBank y entre haplotipos del cloroplasto trH-psbA propias.

Comparación		Distancia Nei	Distancia Relativa
<i>N. antarctica</i>	<i>N. dombeyi</i>	0,0139	0,5485
<i>N. dombeyi</i>	<i>N. dombeyi</i>	0,0003	0,0119
<i>N. pumilio</i>	<i>N. dombeyi</i>	0,0254	1,0000
Sur	Norte 1	0,0166	1,0000
Norte 1	Norte 1	0,0000	0,0000
Norte 2	Norte 1	0,0071	0,4269

Tabla S4.2: Número de días transcurridos para el inicio de la floración (DP) y sus requerimientos térmicos (DD) predichos para cada individuo en base a los modelos fenológicos del capítulo 2.

Los valores de DP y DD se obtuvieron a partir de los datos de elevación, especie y linaje de todos los individuos analizados promediando los valores para las fases liberación de polen (FloV) y apertura de las flores pistiladas (PA). Los individuos (IND) resaltados fueron usados para la construcción de los modelos que fueron incluidos en el análisis de marcadores SNP.

IND	DP	DD	IND	DP	DD	IND	DP	DD
CN1BUE01	68,61	474,88	CS0VIL01	102,5	372,08	LS0PET11	56,79	61,25
CN1BUE02	68,42	477,22	CS0VIL02	102,39	372,81	LS0PET12	56,48	61,86
CN1HIT01	66,62	478,9	CS0VIL03	102,29	373,54	LS0PET18	55,98	62,92
CN1HIT02	67,11	472,42	LN1MOR01	63,58	38,65	LS0YEG02	50	80,22
CN1KEL04*	79,33	394,19	LN2MOF01	60,52	42,59	LS0YEG04	49,79	80,38
CN1KEL14*	79,06	396,28	LN2MOR05	64,73	37,35	NN1CHO05*	58,08	247,25
CN1PUES4	68,16	457,96	LN2NAT01*	58,55	48,28	NN1LEZ21	63,19	224,75
CN1PUEV3	68,16	457,96	LN2NAT02*	58,48	48,38	NN1LEZ29	63,29	224,2
CN1PUEV4	68,16	457,96	LN2NAT03*	58,4	48,51	NN1MLE01*	84,23	138,95
CN2KEL02*	79	397,49	LN2NAT04*	58,21	48,8	NN1MLE03*	84,2	138,95
CN2PMO14*	93,09	300,78	LN2NAT22	NA	NA	NN1MLE04*	84,15	139,08
CN4GUTS1	128,27	188,5	LN2NAT29	NA	NA	NN1NEI23	67,05	179,47
CN4GUTS2	128,27	188,5	LN2PIL13	NA	NA	NN1TUF04	49,33	316,14
CN4GUTS3	128,27	188,5	LN2PIL15	NA	NA	NN1YEG09	67,61	172,54
CN4GUTS4	128,27	188,5	LN2PMO06	75,67	30,21	NN1YEG10	66,19	179,74
CN4GUTS5	128,27	188,5	LN2PMO10	75,47	30,35	NN2NAT03*	87,91	120,55
CN4GUTV1	128,27	188,5	LN2PMO12	75,43	30,38	NN2NAT04*	88	120,31

CN4GUTV2	128,27	188,5	LN2PMO14	75,19	30,56	NN2PIL05	84,78	137,81
CN4GUTV3	128,27	188,5	LN2PMO18	75,23	30,53	NN2PIL07	84,85	137,49
CN4GUTV4	128,27	188,5	LN2PMO20	75,81	30,09	NN2PMO14	79,71	148,22
CN4GUTV5	128,27	188,5	LN2PMO22	75,89	30,03	NN2PMO15	79,67	148,37
CS0CHO01*	83,35	475,52	LN2PMO24	75,82	30,09	NS0CHO01*	86,14	167,27
CS0CHO21	83,42	475,14	LN2PMO26	75,97	29,97	NS0CHO05*	85,94	167,94
CS0COR01	80,51	491,3	LN2PMO28	76,03	29,94	NS0ESC29	67,09	239,04
CS0COR14	87,94	417,28	LN2PMO30	76,1	29,89	NS0FUT02	59,17	332,47
CS0LEZ08	91,74	431,92	LN2PMO34	76,11	29,89	NS0FUT03	60,16	331,13
CS0LEZ14	91,86	430,92	LN2PMO36	76,07	29,92	NS0FUT04	58,91	335,69
CS0NAT01	93,5	415,5	LN2PMO38	76,07	29,92	NS0FUT05	60,17	334,1
CS0NAT03*	88,03	462,65	LN2PMO40	76,27	29,77	NS0FUT14	59,13	333,25
CS0NEI10*	87,55	414,66	LN2PMO60	75,23	30,53	NS0FUT17	60,38	332,49
CS0PET07	90,33	366,19	LN2PMO70	75,63	30,24	NS0MLE02*	89,32	176,41
CS0PET08	89,1	374,95	LN2YEG01	47,05	63,49	NS0MLE05*	89,36	176,22
CS0PUES1	72,34	580,92	LS0CHO01*	57,37	66,93	NS0MOM22	70,48	242,35
CS0PUES2	72,34	580,92	LS0ESC04	44,6	96,12	NS0MOM26	70,5	242,31
CS0PUES3	72,34	580,92	LS0MLE01*	59,65	70,33	NS0NEI06	67,06	253,17
CS0PUEV1	72,34	580,92	LS0MLE05*	59,87	69,79	NS0NEI25	76,13	201,3
CS0PUEV2	72,34	580,92	LS0MLE10*	59,92	70,15	NS0SIL06	76,06	211,83
CS0PUN01*	87,89	443,8	LS0NEI04	52,07	76,97	NS0SIL07	81,35	187,31
CS0PUN05*	88,78	435,58	LS0NEI07	53,14	74,23	NS0TUC01	51,73	413,01
CS0RIV01	79,99	497,14	LS0NEI08	53,35	73,72			
CS0RIV02	80,03	496,69	LS0PET06	58,67	57,75			

Tabla S4.3: Índices de diversidad para marcadores asociados a fenotipos

Índices de diversidad calculados para los SNPs asociados fenotipos de las cuatro bases de datos. BDG: base de datos general. BDA: Base de datos de *N. antarctica*. BDD: Base de datos de *N. dombeyi*. BDP: Base de datos de *N. pumilio*.

Fenotipo	Base de datos	Población	Equitatividad	Shannon	Diversidad Nei
Especie	BDG	<i>N. antarctica</i>	0,449	0,037	0,018
Especie	BDG	<i>N. dombeyi</i>	0,440	0,040	0,019
Especie	BDG	<i>N. pumilio</i>	0,495	0,044	0,024
Especie	BDG	Total	0,885	0,689	0,471
Haplotipos CP	BDG	Sur	0,563	0,301	0,177
Haplotipos CP	BDG	Norte	0,579	0,411	0,235
Haplotipos CP	BDG	Total	0,885	0,810	0,525
No asociados	BDG	<i>N. antarctica</i>	0,579	0,318	0,184
No asociados	BDG	<i>N. dombeyi</i>	0,511	0,127	0,070
No asociados	BDG	<i>N. pumilio</i>	0,534	0,109	0,062
No asociados	BDG	Sur	0,489	0,228	0,120
No asociados	BDG	Norte	0,497	0,262	0,140
No asociados	BDG	Total	0,480	0,255	0,132
Haplotipos CP	BDA	Sur	0,698	0,513	0,331

Haplotipos CP	BDA	Norte	0,656	0,476	0,300
Haplotipos CP	BDA	Total	0,743	0,657	0,411
No asociados	BDA	Sur	0,677	0,489	0,309
No asociados	BDA	Norte	0,690	0,468	0,301
No asociados	BDA	Total	0,654	0,502	0,304
Haplotipos CP	BDD	Sur	0,638	0,161	0,100
Haplotipos CP	BDD	Norte	0,824	0,562	0,390
Haplotipos CP	BDD	Total	0,789	0,657	0,424
No asociados	BDD	Sur	0,665	0,441	0,277
No asociados	BDD	Norte	0,637	0,453	0,276
No asociados	BDD	Total	0,622	0,468	0,276
Haplotipos CP	BDP	Sur	0,747	0,472	0,313
Haplotipos CP	BDP	Norte	0,605	0,402	0,238
Haplotipos CP	BDP	Total	0,749	0,696	0,431
No asociados	BDP	Sur	0,660	0,348	0,227
No asociados	BDP	Norte	0,641	0,462	0,282
No asociados	BDP	Total	0,626	0,446	0,266

Tabla S4.4: Anotado de los marcadores asociados a especies.

F: función molecular. P: procesos biológicos. P curado: procesos biológicos manualmente curados y renombrados. C curado: localización del producto génico manualmente curada

[Link a la tabla en Google Drive](#)

Tabla S4.5: Anotado de los marcadores asociados a haplotipos del cloroplasto

F: función molecular. P: procesos biológicos. P curado: procesos biológicos manualmente curados y renombrados. C curado: localización del producto génico manualmente curada. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*.

[Link a la tabla en Google Drive](#)

Tabla S4.6: Anotado de los marcadores asociados a requerimientos térmicos para la floración (DD).

F: función molecular. P: procesos biológicos. P curado: procesos biológicos manualmente curados y renombrados. C curado: localización del producto génico manualmente curada

[Link a la tabla en Google Drive](#)

Tabla S4.7: Anotado de los marcadores asociados a días transcurridos hasta la floración (DP).

F: función molecular. P: procesos biológicos. P curado: procesos biológicos manualmente curados y renombrados. C curado: localización del producto génico manualmente curada

[Link a la tabla en Google Drive](#)

Figuras suplementarias

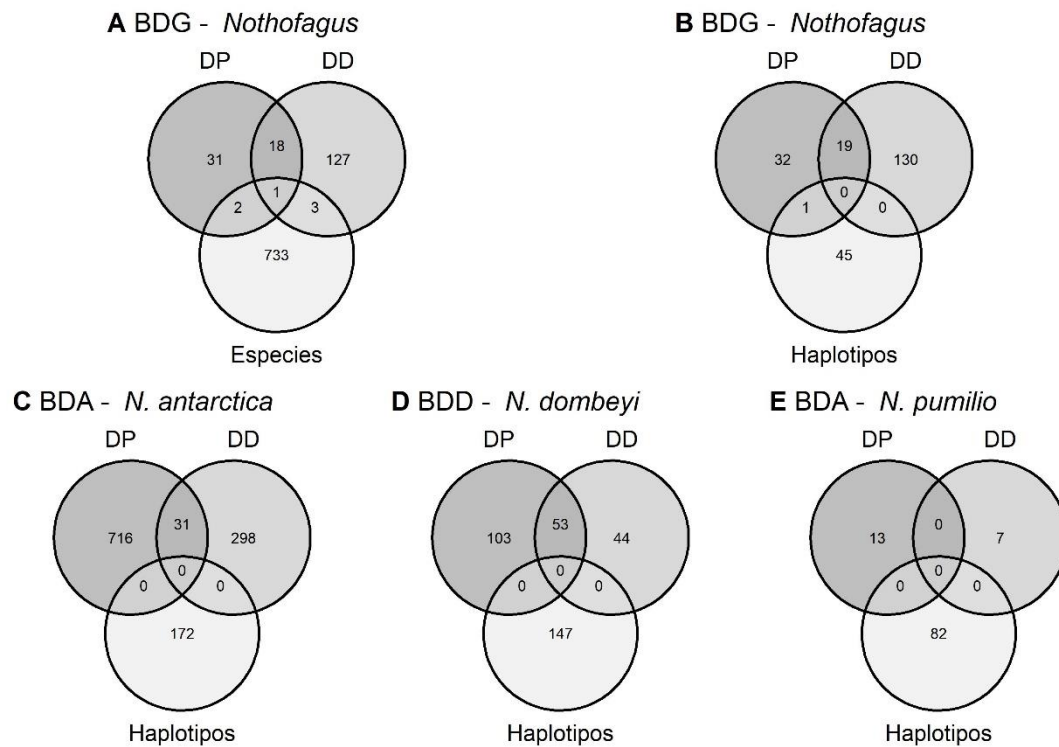


Figura S4.2: Comparacion de marcadores asociados a distintos fenotipos
 BDG: base de datos general. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*. DP: días hasta el inicio de la floración. DD. Requerimientos térmicos para el inicio de la floración.

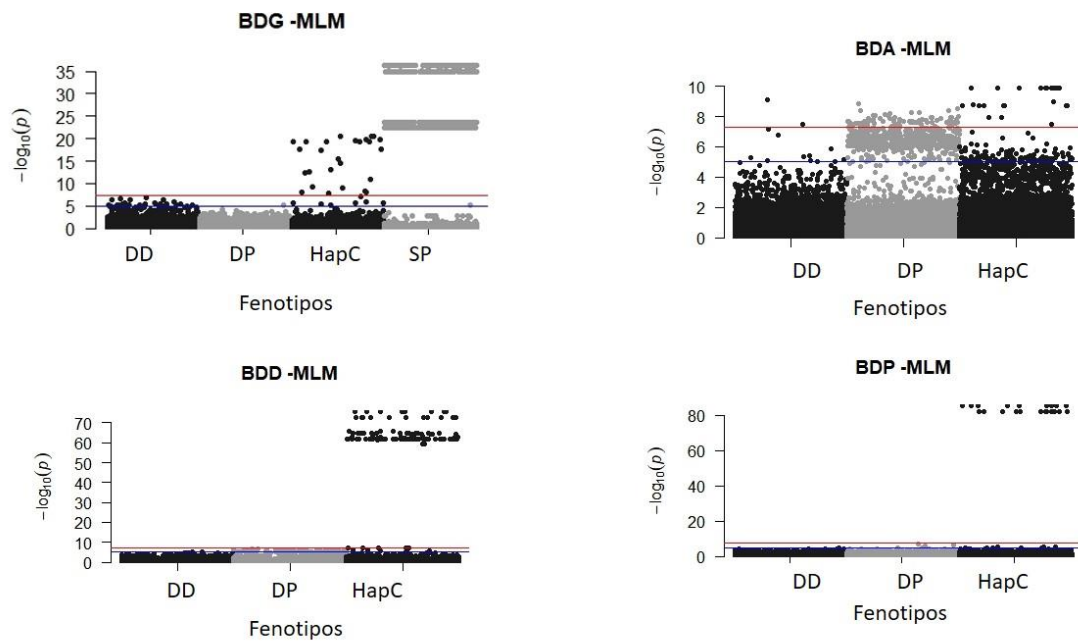


Figura S4.2: Manhattan plot para el análisis de asociación por modelos lineales mixtos

BDG: base de datos general. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*. DP: días hasta el inicio de la floración. DD. Requerimientos térmicos para el inicio de la floración. HapC: haplotipo de cloroplasto. SP: especie.

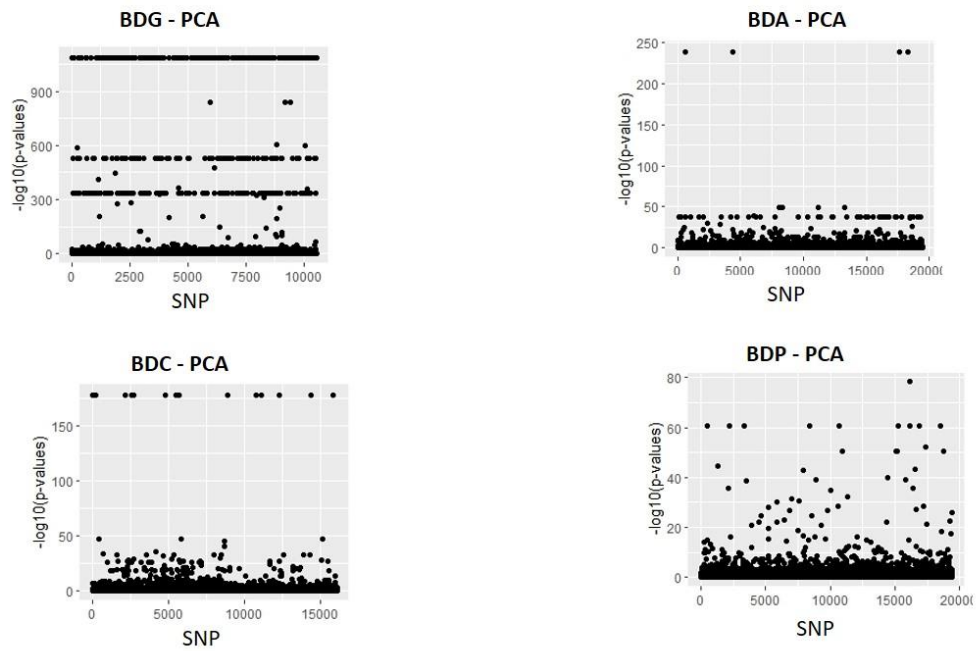
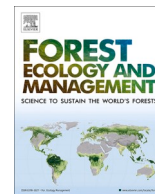


Figura S4.3: Manhattan plot para el análisis de asociación por componentes principales.

BDG: base de datos general. BDA: base de datos de *N. antarctica*. BDD: base de datos de *N. dombeyi*. BDP: base de datos de *N. pumilio*.

**Trabajo de respaldo: Allochrony of neighbour
ecological species: Can isolation by time
maintain divergence? The natural experiment of
sympatric *Nothofagus*.**



Allochrony of neighbour ecological species: Can isolation by time maintain divergence? The natural experiment of sympatric *Nothofagus*

Gabriela Juri^{a,b,c}, Andrea C. Premoli^{a,*}

^a CRUB Universidad Nacional del Comahue, INIBIOMA CONICET, Argentina

^b Universidad Nacional de Río Negro. Instituto de Investigaciones en Recursos Naturales, Agroecología y Desarrollo Rural. Río Negro, Argentina

^c IRNAD, UNRN, CONICET, San Carlos de Bariloche, Argentina

ARTICLE INFO

Keywords:
Allopatry
Divergence
Evolution
Gene flow
Nothofagus
Phenology
Sympatry

ABSTRACT

Ecological mechanisms that maintain species identity between potentially interfertile sympatric populations are puzzling. Local adaptation to a particular environment by means of phenology may confine plants to very specific habitats that may result in assortative mating within an initially panmictic population. *Nothofagus pumilio*, *N. antarctica* and *N. dombeyi* are sister species. They can occur in sympatry and are known to interbreed but they are morphologically and ecologically different. We recorded leafing and flowering phenologies and their thermal requirements to reach each phenophase at distinct locations during three growing seasons (2016–2018). We compared data for sympatric and allopatric populations of different species, sites and elevations. Sympatric populations of different species have contrasting thermal requirements and thus uncoupled phenologies. Temperature, through differences in elevation, is the main driver of intraspecific phenological differences at the population level. Low elevation populations flower earlier than high elevation ones. Allopatric populations of each species are synchronic and reproductively linked to some degree. A combination of high ecological specialization and strong phenological pre-pollination barriers operate together to temporally isolate distinct species, against the homogenizing effect of the occasional or even persistent gene flow. The eventual hybrid formation could be negatively selected by strong local selection to contrasting environments.

1. Introduction

The study of divergence in allopatry seems straightforward, yet mechanistic and theoretical explanations challenge evolutionary theory when it occurs in sympatry, i.e. in the face of potential interspecific gene flow. Reproductive isolation requires the development of assortative mating within an initially panmictic population, in the absence of physical drivers (Coyne and Orr, 2004). Although further specialization of individuals to different niches or resources could lead to sympatric divergence (Dieckmann and Doebeli, 1999; Servedio et al., 2011) the pollination and fertilization that can occur between nearby or even distant populations or species in wind-pollinated taxa may have opposing effects.

Mountainous regions are very heterogeneous, and small geographic distances may represent strong environmental differences. Soil composition and texture, relative humidity, type of precipitations (snow or rain), speed and temperature of the wind, minimum and maximum daily temperatures, are some of the many variables that change drastically

with small changes in elevation or slope. Under strong selection, local adaptation to contrasting settings maybe reflected in post-pollination barriers against hybrids. Thus hybrids may have reduced fitness due to intermediate phenotypes poorly adapted to either parental environment (Arista et al., 1997; Cabral Vilas Boas et al., 2013). Nonetheless, other selective mechanisms may be at play, particularly those affected by environmental variations prompting among-populations and species' divergence. These can include heterogeneous selection in which fitness may differ in time and space; genotype-by-environment interaction such that the expression of genotypes is environmentally dependent; antagonistic pleiotropy when fitness components are negatively correlated; different levels of selection (e.g. gametic versus zygotic selection), and frequency dependent selection such that fitness is a function of the frequency of a phenotype or genotype in a population (Mojica et al., 2012). Local adaptation to distinct environments may be considered an early and critical stage in speciation (Orr and Smith, 1998). However, adaptive evolutionary change is necessary but not sufficient for a divergence to occur. This is because among-population divergence arises from a

* Corresponding author at: CRUB INIBIOMA Quintral 1250, 8400 Bariloche, Argentina.

E-mail address: andrea.premoli@gmail.com (A.C. Premoli).

<https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119466>

Received 20 April 2021; Received in revised form 13 June 2021; Accepted 15 June 2021

Available online 30 June 2021

0378-1127/© 2021 Elsevier B.V. All rights reserved.

balance between the homogenizing effect of gene flow and the diversifying effect of selection (reviewed in [Lenormand, 2002](#)). Ecotypes are populations within species that are adapted to different habitats. Minimum gene flow is often sufficient to keep nearby ecotypes from diverging if the ecological selection is weak ([Baack et al., 2015](#)) and several plant and animal species give support to the latter assertion ([Rundell and Price, 2009](#)). Similarly, populations arranged along environmental gradients are under continuously changing selection regimes that may result in clinal (i.e. continuous) intraspecific variation if local adaptation at each point of the gradient occur as the spatial change is sufficiently gradual relative to gene dispersal distance ([Bachmann et al., 2020](#)). Thus, the evolutionary independence of sympatric populations requires the appearance of reproductive barriers that can sustain and accelerate the accumulation of trait differences ([Baack et al., 2015](#)). Many traits of plant species are affected by environmental conditions; models showed that survival and reproductive success are a function of the match between a plant's life cycle and local seasonal fluctuations in climate ([Chuine and Beaubien, 2001](#); [Bertin, 2008](#); [Kelly and Goulden, 2008](#); [Shen et al., 2015](#); [Arzac et al., 2019](#); [Huang et al., 2021](#)). Uncoupling between them, particularly under temperate and boreal climates, may result in late frost injuries on leaf and flower development during the spring as well as early freezing on fruit maturation during the fall. Many studies have documented clinal phenological variations in different plant species, including trees, which are often correlated to climate variables such as temperature, precipitation, latitude or altitude ([Savolainen et al., 2004](#); [Vitasse et al., 2014](#)) although some other drivers as photoperiod have been overlooked ([Chmura et al., 2019](#)). Seasonal coordination of phenology to climate has a significant impact on growth and reproductive performances that affect competitive relationships and adaptive adjustments. Therefore, phenology is considered a major component of plant fitness ([Primack, 1980](#)) and phenological shifts within and among taxonomic groups may significantly impact on species survival and ecosystem function ([Chmura et al., 2019](#)). Variance in flowering phenology, and thus temporal assortative mating, is ubiquitous in plants: early flowering individuals will tend to cross among themselves. This results in high heritability and genetic variation of those phenological traits within and among plant populations ([Chuine, 2010](#)). However, even if flowering time can be considered a prime trait inducing reproductive isolation ([Fox, 2003](#)), selection acting directly on those traits is needed to favor divergence ([Kirkpatrick, 2000](#)). Allochrony, differences in breeding time or phenology, can potentially cause reproductive isolation and reinforce adaptation leading to divergence among individuals in sympatry. Allochrony can act over different timescales – over the day, between seasons or between years – which can result in assortative mating and thus may be the initial driver of speciation ([Taylor and Friesen, 2017](#)). On the contrary, opportunities for gene flow will exist among individuals with synchronous phenologies. Although ecologically divergent taxa often show different phenologies ([Levin, 2006](#)), changing any phenological trait may certainly induce changes in assortative mating for other traits ([Fox, 2003](#)). Therefore, quantitative comparisons of entire phenologies throughout the growing season are needed. However, up to date no thorough examination of the phenology of sympatric woody taxa has been performed which may shed light on the climate adaptations that maintain species' cohesion and impede interbreeding despite spatial proximity. We worked under the hypothesis that climate adaptation of sympatric *Nothofagus* results in isolation by time due to phenological asynchrony that prompts divergence in sympatry, although allowing episodic interspecific exchange, thus acting as an effective pre-pollination barrier and fostering adaptation by time. Our goal is to analyze the pre-pollination phenological barriers to gene flow between sympatric populations of the three *Nothofagus* species that dominate the driest eastern side of North Patagonian forests: *N. antarctica*, *N. pumilio* and *N. dombeyi*. These three *Nothofagus* congeners coexist in sympatry yet have distinct eco-climatic niches and diagnostic morphologies ([Veblen et al., 1996](#)) that provide an excellent opportunity to test for

Isolation By Time (IBT) and sympatric divergence models. We seek to show that (1) phenological barriers are strong but incomplete and that (2) eco-climatic specialization translates into phenological adaptations between sympatric populations and species.

2. Materials and methods

2.1. Study species

Nothofagaceae is a family of Gondwanan roots with an early divergence into distinct monophyletic subgenera. Extant species within subgenus *Nothofagus* are all endemic to Patagonia. They have highly distinctive ecological ([Veblen et al., 1996](#)), morphological ([Hill and Read, 1991](#)), molecular ([Acosta and Premoli, 2010](#); [Premoli et al., 2012](#)), and chromosomal characteristics ([Acosta and Premoli, 2019](#)) that can be undoubtedly identified. *Nothofagus* taxa within subgenus *Nothofagus*, although closely related, have different microenvironmental preferences.

The evergreen *N. dombeyi* occupy mesic low elevation (300–700 masl) and riparian forests with canopies that can reach 30 to 40 m tall. They are massive trees and, under the proper conditions, they can grow up to a 2 m diameter ([Veblen et al., 1996](#)). Intraspecific variation of *N. dombeyi* at contrasting precipitation regimes was studied by common garden and manipulative experiments together with genomic analyses that yielded ecotypic variation for whole-plant architecture, leaf features, and ecophysiological responses to induced drought ([Diaz et al., 2020](#)).

The deciduous *N. pumilio* is one of the most widespread species of temperate forests of South America. It occurs as pure forests at cooler and drier sites where most precipitations fall in form of snow. It dominates montane forests along the entire southern Andes from the sub-alpine zone to the upper tree limit. At the lower extreme of its elevation gradient (900–1000 at its northern range) trees can reach up to 30 m height but, they grow as small shrubs at the upper tree limit. It also dominates the driest forests at the ecotone with the Patagonian steppe. Intraspecific trait variation of *N. pumilio* along elevation ([Premoli, 2003](#); [Premoli and Brewer, 2007](#)) including phenology ([Rusch, 1993](#)) and precipitation extremes ([Ignazi et al., 2020](#)) has been thoroughly studied that yielded a combination of adaptive and plastic responses mostly in relation to temperature and precipitation, respectively. The genetic basis of *N. pumilio* leaf burst phenology was documented under common garden and reciprocal transplant trials ([Premoli et al., 2007](#); [Mathiasen and Premoli, 2016](#)).

The polymorphic *N. antarctica* is also deciduous and consists of trees and shrubs that occur in the most diverse range of environments where they can attain distinct morphologies that characterize each ecotype ([Ramírez et al., 1985](#)). They can grow as well-formed trees (10–15 m tall) at low-elevation sites, as shrubby trees (2–3 m tall) on rocky, xeric or exposed sites, and as small shrubs (<1 m tall) at high elevation sites and bogs ([Veblen et al., 1996](#)). Phenotypic plasticity plus genotypic effects were suggested as the basis of this variation ([Steinke et al., 2008](#)). The three species mostly form pure stands although mixed forests may be found at some locations, e.g. in contact areas along elevation, i.e. at low and mid-elevations between *N. dombeyi* and *N. antarctica* and further up between the latter and *N. pumilio*.

Nothofagus antarctica, *N. pumilio* and *N. dombeyi* are wind-pollinated. They are mast seeding species and the abundance of flowering trees can vary drastically between populations and seasons. Trees are monocious, with both types of unisexual inflorescences growing on the same annual shoot. Pistillate flowers are very small and sessile axillary structures. They are achlamydeous and have very short styles and stigmas that may limit pollen capture ([Torres and Puntieri, 2013](#)). Staminate flowers are bigger and pendant. They have a simple, fused perigonium and usually 10 to 15 stamens with long filaments and basifixed anthers. Both types of inflorescences are solitary in the case of *N. pumilio* but they can form groups of three flowers in *N. antarctica* and *N. dombeyi*.

Many morphological traits can be used to identify species in the field. Some examples are bark texture and color, ramification pattern and height of the plant (Veblen et al. 1996). Leaf architecture, together with the previously mentioned traits, offer the most effective way to identify *Nothofagus* species based on morphology (Hill and Read, 1991) due to the presence of diagnostic characters. In spite of all these “good species” qualities they are known to locally hybridize. Natural interspecific hybrids are very rare and have been found only in a few locations, under particular environmental conditions. They exhibit intermediate morphologies and appear as “rare trees” with atypical morphologies and trait combinations. Interspecific hybrids were described among all evergreen species, *N. betuloides*, *N. dombeyi*, and *N. nitida* (Premoli, 1996); the deciduous *N. antarctica* and *N. pumilio* (Quiroga et al., 2005), and between the deciduous *N. antarctica* and the evergreen *N. dombeyi* (Stecconi et al., 2004).

2.2. Site and tree selection

The study was conducted at the Northeastern portion of Patagonia Argentina, where the distribution ranges of the three species under study, *N. antarctica*, *N. pumilio* and *N. dombeyi*, overlap. Due to their particular ecological adaptations, *N. pumilio* and *N. dombeyi* rarely coexist at the same location at these latitudes. However, it is possible to find sympatric stands of *N. dombeyi* and *N. antarctica* at low-elevations (400–600 masl), as well as sympatric sites of *N. pumilio* and *N. antarctica* at mid and high elevations (900–1300 masl). For this reason, we registered high, mid and low elevation populations of *N. antarctica*, as this species could serve (in the present or the past) as a connection between the other two species, allowing gene flow to occur. To evaluate the existence of pre-pollination barriers among species, we chose six sympatric sites at five different locations, where populations of two species coexist at a given elevation. Three of the five locations were distributed north and two to the south of a historical barrier (Premoli et al., 2012) that produced a phylogeographic break of the three species at c. 42° S latitude (Table 1, Fig. 1). We monitored leaf and flower phenology for three consecutive years (2016, 2017 and 2018). Observations started at each austral spring, lasted until the end of each growing season (September–December) and were repeated in different locations depending on flowering trees availability: on 2016, southern populations Cerro Cholila (CHO) and Mallín Delgado (MDE); in 2017, southern CHO and MDE and northern Cerro Perito Moreno (CPM) and Cerro Hielo Azul (CHA) populations; and on 2018 northern populations CPM, CHA, and Cerro Piltriquitrón (CPI). We concentrated our efforts at high and mid-elevation forests, where low-elevation *N. pumilio* and high-elevation *N. antarctica* distribution limits overlap forming mixed forests. We also studied low elevation forests where *N. antarctica* overlaps with *N. dombeyi*. We omitted the high-most elevation limit of *N. pumilio* because it rarely coexists with other *Nothofagus* species within the study area. At each location, pairs of sympatric species were studied, either

N. antarctica with *N. pumilio* at mid or high elevation sites (five locations) or *N. antarctica* with *N. dombeyi* at one low-elevation location. To minimize the confounding effects of environmental variation within populations we chose five fertile trees distant 30–40 m from each other, of similar height, diameter and substrate type. Given that at the northern CPM site the same individuals did not flower in the two studied consecutive years, phenological observations were carried out on different trees, as a result, a total of 10 individuals of *N. antarctica* and *N. pumilio* were monitored at CPM. The monitoring experiment took place in a total of six sympatric sites: 35 individuals of *N. antarctica* at all six locations, 30 *N. pumilio* at five locations, and five *N. dombeyi* individuals at one location (Table 1). To take account of individual variation we randomly selected and tagged three fertile branches per tree. Each tree was labelled, georeferenced and assigned to an elevation class using a Garmin® etrex20 GPS. Populations of different species were considered sympatric when sharing location and elevation class. Populations of the same species were considered allopatric when belonging to different elevation classes or locations.

2.3. Phenology observations

We monitored leaf and flower phenology because both phenological rhythms are indicators of potentially adaptive adjustments to variations in climate, whereas flowering phenology is used to analyze among-populations and species' reproductive barriers. We recorded both categories on the same trees and branches and this allows us to describe, in qualitative way, the relationship between the two phenologies. Also knowledge of the degree of phenological coupling may be valuable given that the leafing process can be used as proxy of flower phenology particularly in deciduous species by remote sensing techniques. Budburst, leafing and flowering are continuous processes that were categorized into distinct stages that can be identified following Premoli et al. (2007) and Torres and Puntieri, (2013). Leafing was divided into four stages following Premoli et al. (2007): resting buds (Leaf1), swollen buds (Leaf2), outbreaking leaves (Leaf3) and fully expanded leaves (Leaf4). Staminate flowering was divided into stages recognized for *N. nervosa* and *N. obliqua* (subgenus *Lophozonia*) by Torres and Puntieri (2013): visible flower primordia (FloI), flowers with open perigonium (FloII), filament elongation (FloIII) and pollen release (FloIV). During each visit, we counted the total number of buds, emerging leaves or flowers and classify them into the corresponding phenological stage. To study the emergence of pistillate flowers (PA) we counted the number of shoots with visible flowers (Fig. S1). When a branch containing leaf and/or flower buds entered a particular phenophase we considered it as if the entire tree had reached that particular phenophase and was classified accordingly. The same criterion was applied to determine the starting date of pistillate anthesis for every tree.

Table 1

Sampling summary. Lat: latitude; Long: longitude; # Indiv: number of individuals monitored per location; Elev. Class: elevation class of the sympatric populations.

Location	Location Class	Lat	Long	Elevation (m asl)	Sympatric Species	# Indiv	Elev Class	Seasons
BRC Aerodrome	North	−41.15	−71.17	846	–	–	–	–
CPM	North	−41.79	−71.57	1018	<i>N. pumilio</i>	10	Mid	2017
C. Perito Moreno				1020	<i>N. antarctica</i>	10		2018
CHA	North	−41.88	−71.58	1145	<i>N. pumilio</i>	5	High	2017
C. Hielo Azul				1150	<i>N. antarctica</i>	5		
CPI	North	−41.97	−71.48	1275	<i>N. pumilio</i>	5	High	2018
C. Piltriquitrón				1270	<i>N. antarctica</i>	5		
CHO	South	−42.42	−71.62	1170	<i>N. pumilio</i>	5	High	2016
				1170	<i>N. antarctica</i>	5		2017
C. Cholila	South	−42.46	−71.59	550	<i>N. antarctica</i>	5	Low	2017
				530	<i>N. dombeyi</i>	5		
MDE	South	−42.60	−71.44	1190	<i>N. pumilio</i>	5	High	2016
Mallín Delgado				1170	<i>N. antarctica</i>	5		2017
ESQ Aerodrome	South	−42.93	−71.15	799	–	–	–	–

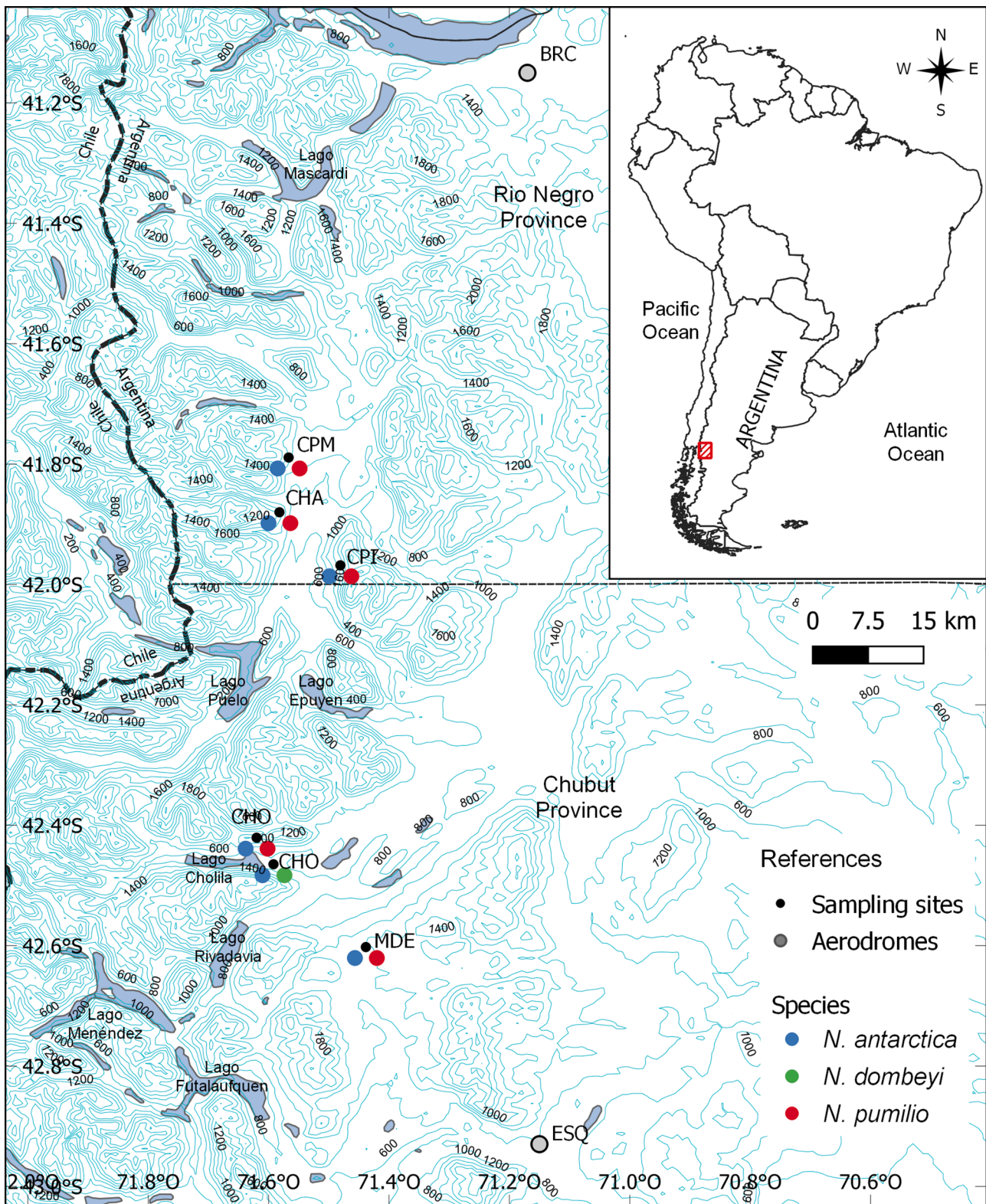


Fig. 1. Map of the study area. Small red dots show sampling locations. Big gray dots show the aerodromes. Colours identify species: red for *N. pumilio*, light blue for *N. antarctica* and green for *N. dombeyi*. Dashed line at 42°S depicts a historical barrier that produced a phylogeographic break of the three species (Premoli et al., 2012). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

2.4. Data analysis

To visually inspect the overall phenology development, we plotted the mean proportion of buds, flowers, leaves or shoots on each phase versus time for each monitoring season. For every branch, count data

was transformed into proportions dividing the number of flowers at a particular phase over the total number of flowers counted during a particular observation date. Mean values expressed as percentages were computed for each observation date, grouping individuals of the same species, location and elevation class (population). Dates were

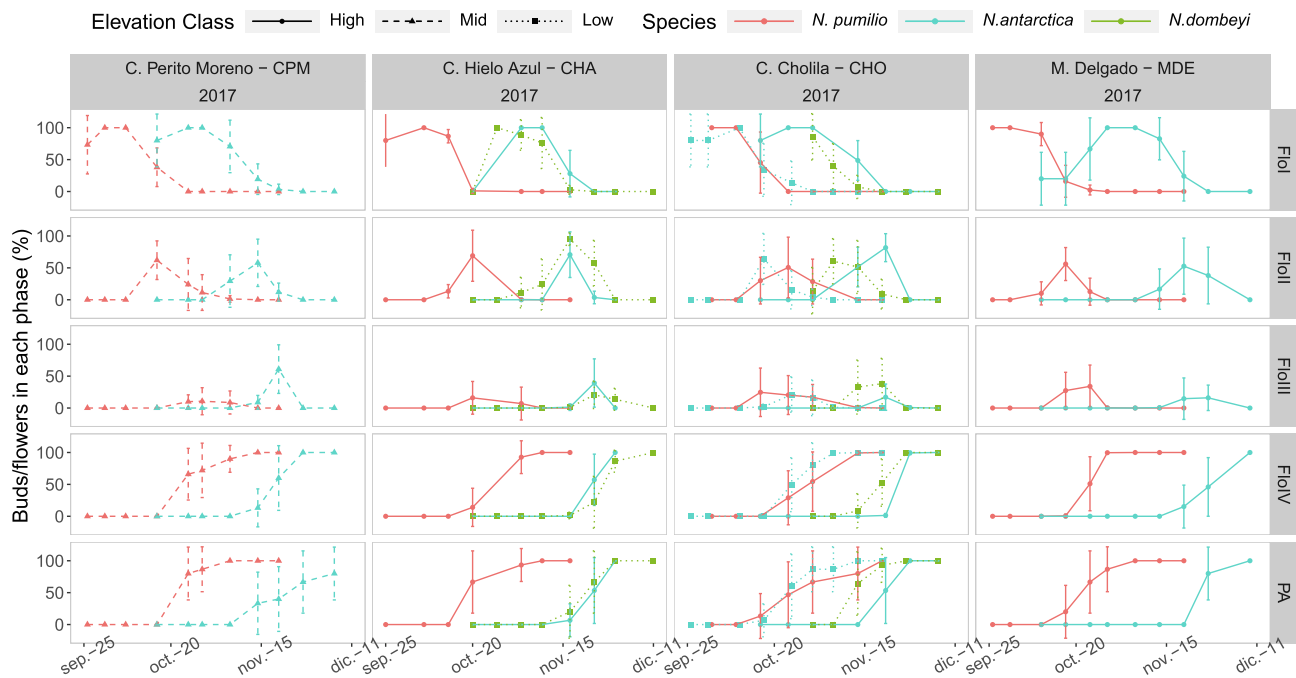


Fig. 2. Flowering phenology time series for the 2017 growing season. Mean proportion of buds or flowers on each phase versus time. Values, expressed as percentages, were computed for each observation date, grouping individuals of the same species, location and elevation class. Dates were transformed into numerical data counting days since mid-September. Colours identify species: red for *N. pumilio*, light blue for *N. antarctica* and green for *N. dombeyi*. Line type and shape indicate forest elevation: solid lines and circles for high elevation, dashed lines and triangles for mid elevation, dotted lines and squares for low elevation. FloI to FloIV and PA correspond to the phenological stages described in the methods section and figure S1. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

transformed into numerical data counting days since mid-September, i. e. the earliest observation date throughout the 3 years. To manipulate and visualize our data we used *tidyr*, *dplyr* and *ggplot2*, R packages from the *TidyVerse Universe* and *ggpubr* package (Wickham et al., 2019; Kassambara, 2020; R core team, 2020).

To address the question on pre-pollination barriers to gene flow between sympatric populations of different species, we focused our attention on the three phenological stages most relevant to reproduction: fully expanded leaves (Leaf4), pollen release (FloIV) and the pistillate anthesis (PA). We analyzed the influence of temperature throughout the three-year monitoring experiment by extracting daily temperatures of northern and southern study sites at Bariloche and Esquel airports which are evenly distant from our northern and southern study sites, respectively (Table 1, Fig. 1). Climatic data was obtained from the National Meteorological System stations (Servicio Meteorológico Nacional <https://www.smn.gov.ar/>). We computed species-specific thermal requirements necessary for the start of a particular phenological stage (phase onset) as daily heat accumulation without the inclusion of negative temperatures. Methods used to assess thermal requirements usually test temperature accumulation from base temperatures, e.g. 5 or 10 °C (Dantec et al., 2014). Our study sites are under a temperate climate with oceanic influence, and thus temperatures above 5 °C can be recorded even throughout the winter, during which *Nothofagus* species do not show any foliar or flower development. Therefore, for each individual we calculated the accumulated temperature (degree days, DD) and the number of days (DP) from September 1st until the onset of Leaf4, FloIV, or PA phases. Daily temperatures were corrected for elevation by adding or subtracting 0.65 °C every 100 m in altitudinal difference of each study site below or above the elevation of each climatological station respectively. Potential temperature anomalies during monitored growing seasons (September through December 2016, 2017, and 2018) were evaluated by calculating the standard deviation of mean annual temperatures compared to the regional mean of the decade based on a 10-year temperature series 2009–2019 composed of daily

temperature data (Table 2).

Mean values of heat accumulation (DD) and days needed to reach a particular phase (DP) for a typical location were estimated using generalized mixed-effects models (distribution = Gaussian; link = log). Fixed effects included species (*N. pumilio*, *N. antarctica* and *N. dombeyi*), elevation class (high, mid and low) and phenological stage (Leaf4, FloIV and PA). We estimated four independent models: (a) high elevation sympatric sites in 2016, (b) high and mid-elevation sympatric sites in 2018 and (c) 2017 and (d) low elevation sympatric sites in 2017. Each year was modelled separately. Data from all locations were analyzed together and locations (Table 1) were included as a random-effect variable to account for the lack of independence imposed by our design to study sympatric sites (*glmmTMB*, Brooks et al., 2017). Assumptions were verified using the simulation approach proposed by DHARMA package (Hartig, 2020). Statistical significance of the fixed effects was tested with *drop1* and *Anova* function on *car* R package (Fox et al., 2019). We compared mean DD and DP values among sympatric species pairs, averaged by elevation class and phenological stage. We contrasted *N. pumilio* and *N. antarctica* sympatric pair on all monitored seasons and *N. antarctica* and *N. dombeyi* sympatric pair in 2017. We also contrasted mean DD and DP values among allopatric populations of *N. pumilio* or *N. antarctica* at high and mid-elevations (2017, 2018). Finally, we compared PA and FloIV mean DP and DD values for each species present at a given location and elevation class. Contrasts were performed using Tukey pairwise comparison method provided by *emmeans* R package (Lenth, 2020). Mean differences became mean ratios with their 95% confidence interval when back-transformed from the linear predictor scale (log scale). These values can be transformed into time differences if we multiply them by the mean value estimated for the item in the denominator of a given ratio.

3. Results

Flower and leaf development and annual shoot expansion start with

Table 2

Analysis of climatic variables and temperature anomalies. T: mean annual temperature. TM: mean maximum temperature. Tm: mean minimum temperature. T anomaly: standard deviation of mean annual temperatures compared to the regional mean of the decade.

Aerodrome	Esquel (Southern class)				Bariloche (Northern class)			
	T (°C)	TM (°C)	Tm (°C)	T anomaly	T (°C)	TM (°C)	Tm (°C)	T anomaly
2009	8.175	12.925	3.725	-2.349	7.775	15.175	0.850	-2.255
2010	9.825	16.575	2.875	-0.182	9.375	17.575	2.275	-0.022
2011	10.925	18.250	4.000	1.263	10.325	18.275	2.550	1.304
2012	10.300	16.575	4.400	0.442	9.525	16.875	3.050	0.187
2013	10.375	17.750	3.550	0.540	9.950	17.525	2.600	0.780
2014	9.725	16.475	3.750	-0.313	9.150	16.650	2.125	-0.336
2015	9.600	16.875	3.625	-0.478	8.900	17.025	1.575	-0.685
2016	10.950	18.125	4.850	1.295	10.375	18.675	2.825	1.373
2017	10.275	16.800	3.725	0.409	9.425	17.075	2.550	0.048
2018	9.725	16.800	3.375	-0.313	9.175	16.875	2.400	-0.301
2019	9.725	16.875	3.575	-0.313	9.325	17.075	2.950	-0.092
Mean	9.964	16.730	3.768	-	9.391	17.164	2.341	-
SD	0.761	1.412	0.518	-	0.717	0.908	0.642	-

the swelling of buds on the parent shoots. During the expansion, floral and vegetative buds transform into mature structures following a base to apex direction: staminate flowers towards the base and pistillate flowers to the apex. The progression is followed, in some cases, by a few sterile leaves that will produce buds for the future growing season. Floral buds can be clearly distinguished from vegetative buds because of the enlargement caused by floral organs starting to mature before cataphylls open. Axillary staminate flowers and leaves start emerging from buds at the same time. Along the process of leaf expansion, flowers grow and elongate until they are fully mature. By the time leaves have reached their fully expanded form, all pollen had been released. This synchronicity between foliar and flower development is consistent in the three species and throughout all monitored growing seasons (Figs. 2, 3, S2, and S3). At the individual level and on each annual shoot, the development of staminate flowers precedes the development of pistillate

flowers. At the population level, i.e. at a given location and elevation class, flower maturation progress doesn't follow the sequence expected from the morphological development of these fertile structures. It varies over years (Table S2). During warmer seasons 2016 and 2017 pollen release (FloIV) and the anthesis of pistillate flowers (PA) occurred synchronously for all species (Tukey pairwise contrast method, $p > 0.05$) (Figure 2 and S2a, see FloIV and PA panels). Yet during colder 2018, anthesis of pistillate flowers started earlier than pollen release ($p < 0.05$) (Fig. S2b, see FloIV and PA panels).

Climate anomaly assessment of each monitored growing season, compared to the average regional climate series for 2009–2019, yielded standard deviations of 1.33 and 0.23 above the mean for 2016 and 2017 and of -0.31 below the mean for 2018 (Table 2). This shows that 2016 was an anomalous warmer season while 2018 was colder than average. As a result, all species experienced some phenological variation among



Fig. 3. Leafing phenology time series for the 2017 growing season. Mean proportion of buds or leaves on each phase versus time. Values, expressed as percentages, were computed for each observation date, grouping individuals of the same species, location and elevation class. Dates were transformed into numerical data counting days since mid-September. Colours identify species: red for *N. pumilio*, light blue for *N. antarctica* and green for *N. dombeyi*. Line type and shape indicate forest elevation: solid lines and circles for high elevation, dashed lines and squares for mid elevation, dotted lines and triangles for low elevation. Leaf1 to Leaf4 correspond to the phenological stages described in the methods section and figure S1. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

seasons (described below).

The mean number of Days to a Phase onset (DP), averaged over phenophases (FloIV, Leaf4 and PA) and locations, shows differences among species, elevations, and years. At high and mid-elevation sites where *N. pumilio* and *N. antarctica* coexist in sympatry, the former starts developing first (Fig. 4a,b,c). During 2016, high elevation *N. pumilio* individuals started flowering on average 21 to 29 days earlier than *N. antarctica* (Table 3, Fig. 4a, Fig. S2, $p < 0.0001$). Likewise, during 2017 *N. pumilio* individuals flowered on average 25 to 30 days earlier than *N. antarctica*. In contrast, the phase shift between early *N. pumilio* and *N. antarctica* shortened during the colder 2018, taking values between 10 and 14 days (Table 3, Fig. 4b-c, Fig. S2, $p < 0.0001$). At the low elevation site, *N. antarctica* started blooming first, followed by *N. dombeyi*, with a phase shift of 22 to 29 days during 2017 (Fig. 4d, Fig. 2, $p < 0.0001$). Some variations were detected among conspecific populations: flowering starts earlier at relatively lower elevations (Table S2). During the season of 2017, phase onset of both species took an average of 2% to 10% more days at high elevation than at mid-elevation sympatric sites for both species (Fig. 4b, $p < 0.005$). During the colder 2018, no significant differences were detected between high and mid-elevation populations of any species at any location (Fig. 4c, $p < 0.001$). Noteworthy, some allopatric populations showed strong synchronicity during 2017 at Cerro Cholila location (Figs. 2 and 3. Cerro Cholila panel). This was the case of high elevation *N. pumilio* and low elevation *N. antarctica*, which are distant c. 600 m in elevation and showed very synchronous phenologies. Similarly, high elevation *N. antarctica* and low elevation *N. dombeyi* shared synchronous phenological rhythms despite the elevation difference mentioned above. The phase shift pattern between sympatric populations of different species and the

Table 3

Tukey pairwise contrasts between sympatric species. “Ratio” column represents the quotient specified in the “Species Contrast” column. Values averaged over elevation class. Confidence intervals containing the number 1 represent no significant difference between the contrasted mean values.

Days to a Phase (DP)					
Species Contrast	Elevation Class	Year	Ratio	95% Confidence Limits	
				Lower	Upper
<i>N. antarctica</i> / <i>N. pumilio</i>	High	2016	1,55	1,46	1,64
<i>N. antarctica</i> / <i>N. pumilio</i>	High - Mid	2017	1,47	1,42	1,52
<i>N. antarctica</i> / <i>N. pumilio</i>	High - Mid	2018	1,21	1,18	1,25
<i>N. antarctica</i> / <i>N. dombeyi</i>	Low	2017	0,69	0,65	0,73

Accumulated temperature in °C (DD)					
Species Contrast	Elevation Class	Year	Ratio	95% Confidence Limits	
				Lower	Upper
<i>N. antarctica</i> / <i>N. pumilio</i>	High	2016	2,45	2,14	2,80
<i>N. antarctica</i> / <i>N. pumilio</i>	High - Mid	2017	2,45	2,18	2,76
<i>N. antarctica</i> / <i>N. pumilio</i>	High - Mid	2018	1,71	1,56	1,86
<i>N. antarctica</i> / <i>N. dombeyi</i>	Low	2017	0,56	0,50	0,63

synchronicity between the allopatric conspecific ones was constant throughout all locations and seasons. Sympatric individuals of each species at a given location had different thermal requirements (Fig. 5, Table 3). At high and mid-elevations, early blooming *N. pumilio* needed a smaller accumulation of temperature than *N. antarctica* to reach full foliar and flower maturation (Fig. 5a-c). During the warmest 2016 at high elevation sympatric locations, heat accumulation to phase onset for the later blooming *N. antarctica* was, on average, between 2.14 and 2.8

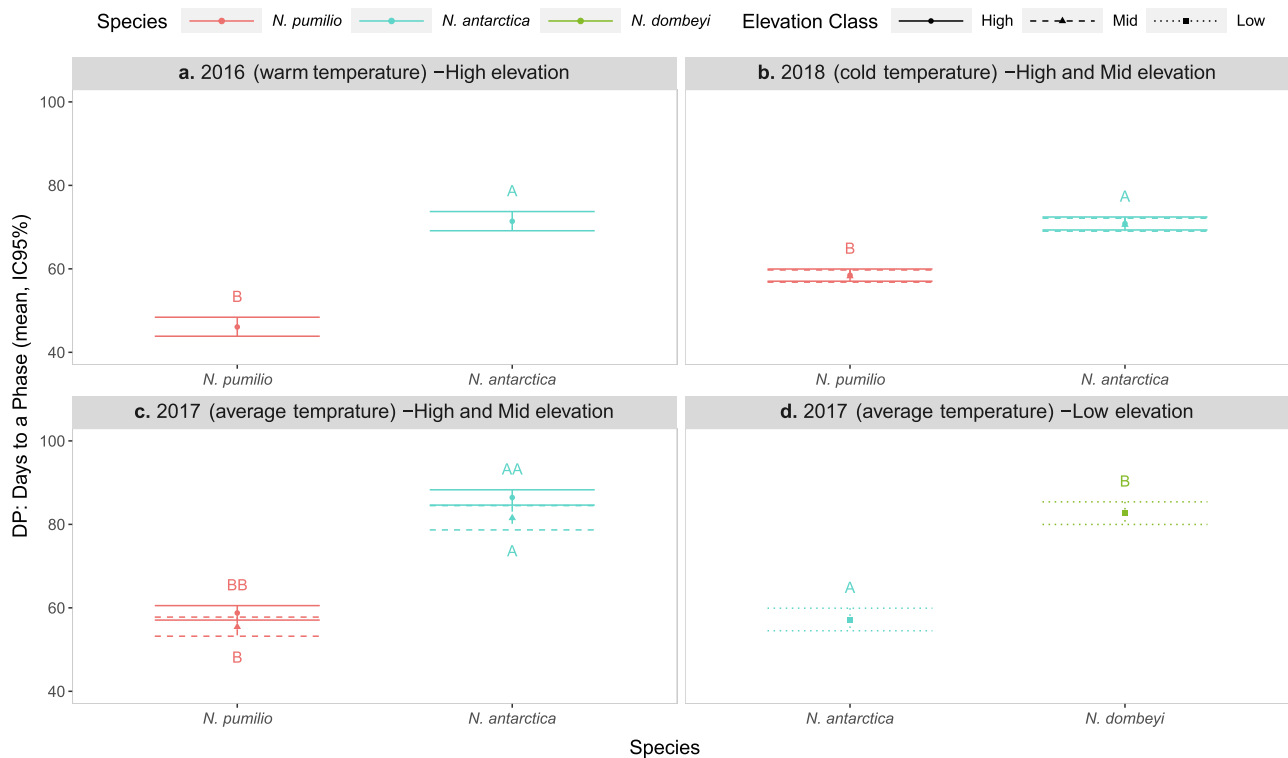


Fig. 4. Comparative analysis of days required to phase onset (DP) on sympatric sites. Mean estimated values for a typical tree of a given species and elevation class. Colours identify species: red for *N. pumilio*, light blue for *N. antarctica* and green for *N. dombeyi*. Line type and shape indicate forest elevation: solid lines and circles for high elevation, dashed lines and triangles for mid elevation, dotted lines and squares for low elevation. Y axis shows mean values estimated for a typical location and their 95% confidence intervals. Letters represent the results of Tukey pairwise comparison. a. Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at high elevation sites (2016). b. Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at high and mid elevation sites (2018). c. Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at high and mid elevation sites (2017). d. Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. dombeyi* at low elevation sites (2017). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

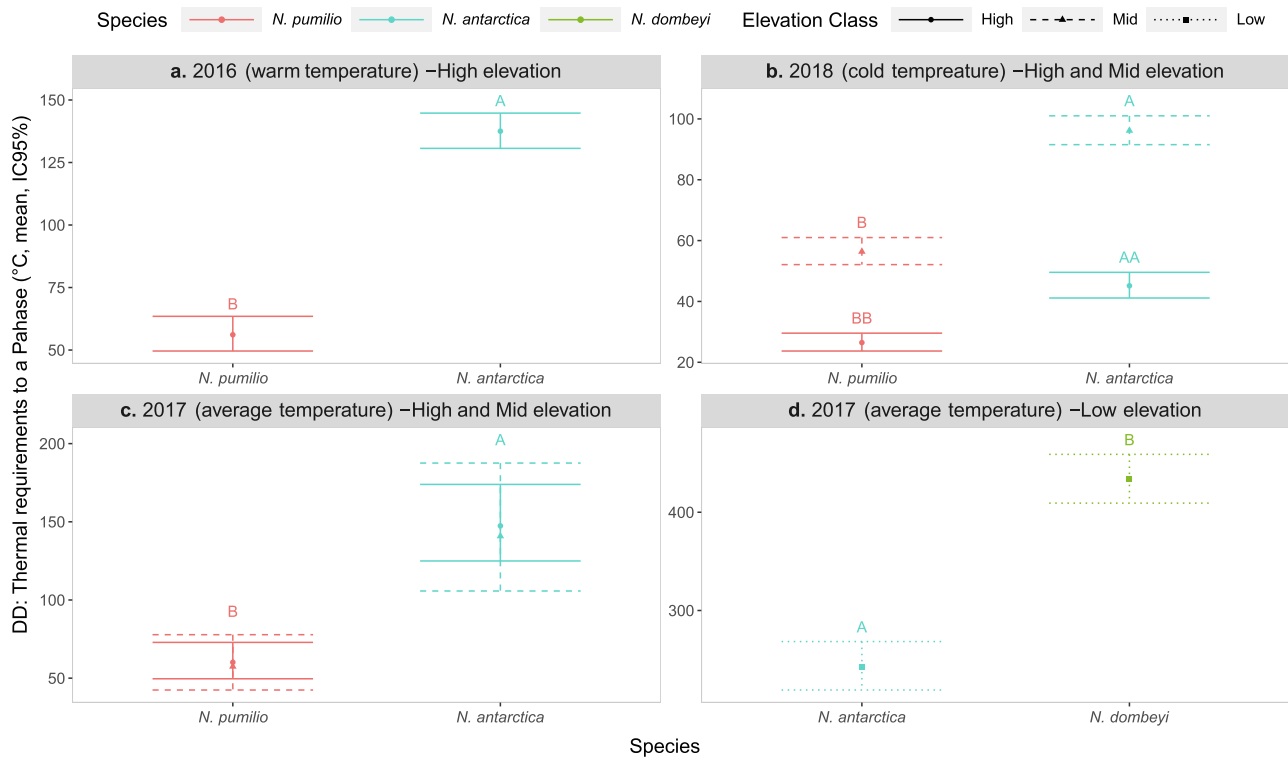


Fig. 5. Comparative analysis of heat accumulation required to phase onset (DD) on sympatric sites. Mean estimated values for a typical tree of a given species and elevation class. Colours identify species: red for *N. pumilio*, light blue for *N. antarctica* and green for *N. dombeyi*. Line type and shape indicate forest elevation: solid lines and circles for high elevation, dashed lines and triangles for mid elevation, dotted lines and squares for low elevation. Y axis shows mean values estimated for a typical location and their 95% confidence intervals. Letters represent the results of Tukey pairwise comparison. **a.** Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at high elevation sites (2016). **b.** Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at high and mid elevation sites (2018). **c.** Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at high and mid elevation sites (2017), **d.** Sympatric populations of *N. antarctica* and *N. dombeyi* at low elevation sites (2017). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

times longer than for *N. pumilio*, with a total temperature accumulation difference of 64 to 101 °C (Fig. 5a, $p < 0.001$). During 2017, which can also be considered a warm season, average heat accumulation required to phase onset at a typical sympatric location was between 2.18 and 2.76 times longer for *N. antarctica* (71 °C to 97 °C; Fig. 5c, $p < 0.001$), fairly similar to the previous season. Yet non-significant differences between elevation classes of a given species were detected during warmer 2017 (Fig. 5c, Table S2). Also in 2017, allopatric conspecific populations of *N. antarctica* and *N. pumilio* at mid and high elevations showed similar thermal requirements (Fig. 5c, Table S2, $p > 0.05$). Phenological differences between sympatric species shortened during the cooler 2018: mean thermal requirements of *N. antarctica* were 1.18 to 1.25 times longer than those of the early blooming *N. pumilio*. During this season, differences between elevations were wider. Mean differences of temperature accumulation were between 15 °C and 22 °C, at high elevation sympatric sites and between 31 °C and 49 °C, at mid-elevation sites (Fig. 5b, $p < 0.0001$).

Low elevation sympatric populations showed the most demanding thermal requirements (Fig. 5d) and the smallest between-species difference. Thermal requirements of *N. dombeyi* doubled that of *N. antarctica* (Table 3, $p < 0.001$). The cold-tolerant *N. pumilio* needed 7-fold smaller heat accumulation than *N. dombeyi* to complete phenological development. We can propose a thermal requirements gradient starting with *N. pumilio*, followed by *N. antarctica* from high elevations at an intermediate position between *N. pumilio* and low elevation populations of *N. antarctica*, ending with the warm-loving *N. dombeyi*.

4. Discussion

Our results show that sister sympatric species maintain their

morphological identity by allochronic divergence caused by the phase shift between reproductive cycles, which is produced by distinct phenological rhythms. These rhythms are associated with their thermal niches and also reflect their phylogenetic affinities. Local adaptation to contrasting environments has translated into strong, yet permeable, temporal rather than physical isolation barriers. Rare climatic events like colder season 2018 seem to reduce the offset between sympatric pairs. This can allow gene flow between late-blooming trees from one species and early blooming trees from the other. In particular, wind-pollination facilitates potential long-distance pollination and interspecific crosses could also occur between synchronic allopatric populations from different elevations.

Ground-based phenology observations record the timing of patterns of growth and development for specific sites and species, and although considered a traditional method is still highly useful and provides first-hand direct evidence of phenological changes (Piao et al., 2019). Citizen science, with the aid of a smartphone and wireless communication technology, provides the opportunity to expand the recording of phenological events over a large area and for many more species. However, data quality may be dubious given that observations often involve different observers and methods (Mayer, 2010). On the other hand, remote sensing techniques and their use of phenological events in the temporal calibration of greenness-related vegetation indices, have also contributed to track plant phenology observations at larger spatial scales.

Those aforementioned methodological advances do not replace ground-based observations like the ones used here, especially when reproductive phenology comes into play. In evergreen forests with little seasonal changes in satellite greenness the application of remote sensing techniques to retrieve plant phenology may be limited (Piao et al.,

2019). Ground-based methods are particularly useful to study species with ephemeral and inconspicuous flowers as those of *Nothofagus*. Nonetheless, the coupling of leaf and flower phenology we observed in all species show that changes in the greenness of deciduous species may be used as a proxy of reproductive phenology in the study of landscape-scale plant phenology by satellite remote sensing.

Limitations of our ground-based study relate to the fact that field observations were performed during the spring, when snow accumulation complicates synchronous site visitation and thus the scope (e.g. number of monitored locations) of our analysis. We focused on leaf and flower initiation that occurs early in the spring and trigger distinct physiological and developmental processes in both evergreen and deciduous taxa, whereas leaf senescence in the fall will be restricted mainly to the latter taxa.

Pollen release and female anthesis occurred synchronously within each species during warmer years (2016 and 2017). Some degree of dichogamy was recorded, with female anthesis occurring earlier than pollen release, during the colder season of 2018. *Nothofagus* trees are mostly out-crossed and self-incompatible (Rusch, 1993; Riveros et al., 1995; Torres and Puntieri, 2013). According to Torres and Puntieri (2013), maximum stigmatic receptivity is achieved four to five days after anthesis, in which case the small offset between these two stages could ensure the existence of receptive female flowers when conspecific pollen is released and thus, pollination. Phenological stage onset and length variation among individuals work in favour of the maintenance of high outcrossing rates and genetic diversity (Premoli, 1996). It also favours intraspecific cross-pollination ensuring seed production.

Environmental niches of each *Nothofagus* species are highly conserved throughout the extension of the temperate forests of Patagonia. Leaf and floral phenologies are regionally synchronized within each *Nothofagus* and are characteristic of each pure species, even in distinct populations 100 km apart. Yet ecologically distinct species had significant phenological differences, rendering the following temporal sequence: *N. pumilio* < *N. antarctica* < *N. dombeyi*. Detailed phenological studies at the community level are scarce. The analysis of 11 sympatric pioneer species of *Macaranga* (Euphorbiaceae) in Borneo yielded uniform flower phenologies. Such synchronized community-level reproduction suggests that sympatric species are subjected to similar abiotic pressures and thus they respond to common flowering cues (Davies and Ashton, 1999). Our study focused on the analysis of sympatric locations along steep temperature gradients where each pure species is found at distinct elevations as almost pure stands distant a few hundred meters from each other. The cold-tolerant *N. pumilio* occupies mountain environments mostly occurring as pure forests on the high-elevation eastern Andes. It is considered cold tolerant and thus a lesser accumulation of degree days is needed to flower. As a deciduous species, early foliar and flower development guarantees complete development during the short summers of temperate areas, particularly at high elevation. The more polymorphic *N. antarctica* occurs in variable environmental types. It is found at valley bottoms, waterlogged habitats, under optimal low-elevation forests and also at high elevations forests. At colder high-elevation sympatric sites, *N. antarctica*'s intermediate thermal requirements are responsible for the phenological delay compared to *N. pumilio*. Warm-loving species as *N. dombeyi* need a greater accumulation of heat in the spring to initiate leaf and flower development. This is useful to avoid potential late spring frosts which are very frequent in the study area. Such evergreen sister species occupies low elevation forests, rarely occurring in sympatry with the highlander *N. pumilio*. Therefore, our data show that sympatric species inhabiting environmental gradients are under divergent selective forces acting on phenological rhythms that hamper potential interbreeding.

Leaf and flowering phenologies within each *Nothofagus* species are variable along elevation gradients: lower elevation populations start earlier than high elevation ones. This was previously documented for *N. pumilio* in the field (Rusch, 1993), under common garden conditions (Premoli et al., 2007), and using a reciprocal transplant design

(Mathiasen and Premoli, 2016). While no environmentally controlled studies were performed in *N. antarctica* and *N. dombeyi* the evidence presented here suggest that within and among-species phenological differences with elevation are probably genetic and of adaptive value. Populations of *N. pumilio* analyzed along different elevation gradients at distinct latitudes yielded clinal genetic differences and significant restrictions to gene flow between elevations (Premoli, 2003). Our results on *N. antarctica* support those findings: it is highly unlikely that populations at the extremes of the elevation gradient can interbreed. It is possible, nonetheless, that mid-elevation forests could serve as "reproductive bridges" connecting the extremes of the altitudinal gradient and maintaining species coherence between them. We would expect to find softer clines for the onset of these two stages (FloIV and PA) where these mid-elevation populations exist.

Elevation gradients define interspecific synchronicity as well. Low elevation *N. antarctica* were synchronic with high elevation *N. pumilio* yet they were 600 m downslope to the latter. Also, late-blooming high elevation *N. antarctica* were synchronic to low elevation *N. dombeyi* located at least 600 m downslope. As a result, sympatric populations of different species have distinct phenologies, but those spatially apart may be synchronic. This relates to their species-specific thermal niches. Particularly the polymorphic *N. antarctica*, which inhabits distinct environments, was intermediate in terms of the number of days needed to reach leaf and flower maturation than the other two species. Thus significantly different thermal requirements prevent gene flow by uncoupling phenological rhythms between sympatric populations. This is probably accentuated during anomalous warm years during which cold-loving deciduous species as *N. antarctica* and *N. pumilio* may take advantage of higher temperatures to flower earlier. In contrast, colder seasons as 2018 that registered below mean temperatures may result in merging phenologies of distinct species that may foster potential interbreeding. Therefore, hybridization may occur between sympatric *Nothofagus* species under particular geographic and climatic conditions. To date, natural hybrids between *N. antarctica* and *N. pumilio* (Quiroga et al., 2005) or *N. antarctica* and *N. dombeyi* (Stecconi et al., 2004) have been documented in nature. No hybrids have yet been found between *N. pumilio* and *N. dombeyi*, probably because they inhabit opposite elevation extremes and have the most distinct thermal niches that preclude their phenological overlap and thus their genetic exchange. However, this exchange may occur indirectly with the ecologically diverse *N. antarctica* serving as a bridge species between *N. dombeyi* and *N. pumilio*.

Phylogenetic relations show that *N. antarctica* is sister to a clade containing the evergreen species that includes *N. dombeyi*, whereas *N. pumilio* is the most basal and thus the most distinct species of *Nothofagus* subgenus (Acosta and Premoli, 2010). A population-based sampling design along the entire latitudinal distribution of subgenus *Nothofagus* showed widespread chloroplast capture that resulted from local cycles of hybridization/introgression among well-differentiated species (Acosta and Premoli, 2010). These patterns were further reinforced by the analysis of 330 individuals from 200 populations of the five extant species of subgenus *Nothofagus* showing that chloroplast sharing is common and geographically extended (Premoli et al., 2012). Evidence of widespread hybridization and introgression was also documented by chloroplast capture in *Lophozonia* subgenus from Australia (Worth et al., 2009). Why, then, are *Nothofagus* species so clearly different despite past and potentially current interspecific gene flow?

We believe that a combination of high ecological specialization and strong pre-pollination barriers operate together to maintain species differences, against the homogenizing effect of occasional or even persistent gene flow. Ecological divergence is considered key to understand prezygotic/prepollination barriers between sympatric taxa in the early process of divergence. We here wished to show that ecological divergence is a dynamic process. While under particular climates species may be maintained as pure and distinguishable ecological units, they

can also merge by hybridization, favoring persistence under changes in climate such as cooling. Mechanisms of merging and divergence cannot be interpreted as recent divergence, incipient speciation or incomplete lineage sorting. Instead, similar pollen types within the *Nothofagus* subgenera, which in turn can be considered ancient lineages in the *Nothofagaceae* (Premoli et al., 2012), can be thought of as a long-lasting strategy of pure taxa with contrasting ecological niches yet with weak among-species reproductive barriers. The ability to hybridize and diverge by adaptive introgression at different environments occupied by each taxon has enabled them to persist throughout their evolutionary history under changing physical conditions.

It was suggested that allochrony, rather than allopatry, can be considered a powerful force fostering speciation (Quintero et al., 2014). However, it has been argued that the role of allochrony in prompting divergence is challenging, particularly when speciation is complete, although it may greatly contribute to population differentiation while adapting to distinct climates (Taylor and Friesen, 2017). We aim to contribute further to this topic by providing evidence that allochrony may be a strong force once speciation is complete and that isolation by time as a result of contrasting temperature gradients may prevent ecological species from interbreeding in sympatry as close as several hundred meters away.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

It would have been impossible to carry out these titanic field trips without the invaluable help of Dr. Silvia Ortubay, Daniel Werzing, Dr. Karin Heineman and Gonzalo Rodriguez. Silvia and Daniel are in charge of the restoration plan of the portion of Cholina's forests burnt during the last massive forest fire. They hosted us in their house during two seasons, helped us with transportation when needed and guided us to our sites. Karin and Gonzalo were our field assistants during the sampling. Karin's intense love and knowledge of *Nothofagus* forests were very important to understand the dynamics of our study species. Gonzalo Rodriguez, a local artist and close friend, made our field trips an adventure with his joyful manners and his ability to see nature through a more holistic perspective. We also want to thank Alejandro Movia for the beautiful pictures and the field technicians, Pablo Alvear and Ariel Mayoral, for their invaluable assistance during fieldwork. Last but not least, a very special and warm thank you to T. Kitzberger for assisting with temperature anomaly calculations and to P. Mathiasen for helping us with Fig. 1. This research was supported by funds from the Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica from Argentina project PICT 2015-1563 to ACP and the Rufford Foundation Small Grant 29211-1 to G.J. G.J. and A.C.P. are members of CONICET (National Research Council of Argentina).

Author contributions

This work is the result of the collaborative work of both authors. Funding sources for all stages of the research were provided by Andrea Premoli, and field work was carried out by Gabriela Juri and the field assistants mentioned in acknowledgements. All other aspects of this work (design, data analysis and writing), were carried out by the two authors as a team.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119466>.

References

- Acosta, C.M., Premoli, A.C., 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, *Nothofagaceae*). *Mol. Phylogenet. Evol.* 54, 235–242. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.008>.
- Arista, M., Ortiz, P.L., Talavera, S., 1997. Reproductive isolation of two sympatric subspecies of *Juniperus phoenicea* (*Cupressaceae*) in southern Spain. *Plant Syst. Evol.* 208, 225–237. <https://doi.org/10.1007/BF00985443>.
- Arzac, A., Llambí, L.D., Dulhoste, R., Olano, J.M., Chacón-Moreno, E., 2019. Modelling the effect of temperature changes on plant life-form distribution across a treeline ecotone in the tropical Andes. *Plant Ecol. Divers.* 12, 619–631. <https://doi.org/10.1080/17550874.2019.1655108>.
- Baack, E., Melo, M.C., Rieseberg, L.H., Ortiz-Barrientos, D., 2015. The origins of reproductive isolation in plants. *New Phytol.* 207, 968–984. <https://doi.org/10.1111/nph.13424>.
- Bachmann, J.C., van Rensburg, A.J., Cortazar-Chinarro, M., Laurila, A., Buskirk, J.V., 2020. Gene flow limits adaptation along steep environmental gradients. *Am. Nat.* 195, E67–E86. <https://doi.org/10.1086/707209>.
- Bertin, R.I., 2008. Plant phenology and distribution in relation to recent climate change. *J. Torrey Bot. Soc.* 135, 126–146. <https://doi.org/10.3159/07-RP-035R.1>.
- Brooks, M.E., Kristensen, K., Benthem, K.J., Van, Magnusson, A., Berg, C.W., Nielsen, A., Skaug, H.J., Mächler, M., Bolker, B.M., 2017. glmmTMB balances speed and flexibility among packages for zero-inflated generalized linear mixed modeling. *R J.* 9, 378–400.
- Cabral Vilas Boas, J., Fava, W.S., Laroça, S., Sigrist, M.R., 2013. Two sympatric Byrsonima species (Malpighiaceae) differ in phenological and reproductive patterns. *Flora* 208, 360–369. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.05.003>.
- Chaine, I., 2010. Why does phenology drive species distribution? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 3149–3160. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0142>.
- Chaine, I., Beaubien, E.G., 2001. Phenology is a major determinant of tree species range. *Ecol. Lett.* 4, 500–510. <https://doi.org/10.1046/j.1461-0248.2001.00261.x>.
- Chmura, H.E., Kharouba, H.M., Ashander, J., Ehman, S.M., Rivest, E.B., Yang, L.H., 2019. The mechanisms of phenology: the patterns and processes of phenological shifts. *Ecol. Monogr.* 89, e01337 <https://doi.org/10.1002/ecm.1337>.
- Coyne, J.A., Orr, H.A., 2004. Speciation. Sunderland, MA.
- Dantec, C.F., Vitasse, Y., Bonhomme, M., Louvet, J.M., Kremer, A., Delzon, S., 2014. Chilling and heat requirements for leaf unfolding in European beech and sessile oak populations at the southern limit of their distribution range. *Int. J. Biometeorol.* 58, 1853–1864. <https://doi.org/10.1007/s00484-014-0787-7>.
- Davies, S.J., Ashton, P.S., 1999. Davies, S.J., Ashton, P.S., 1999. Phenology and fecundity in 11 sympatric pioneer species of Macaranga (*Euphorbiaceae*) in Borneo. *America (NY)*. 86, 1786–1795. <https://doi.org/10.2307/2656675>.
- Diaz, D.G., Mathiasen, P., Premoli, A.C., 2020. Subtle precipitation differences yield adaptive adjustments in the mesic *Nothofagus dombeysi*. *For. Ecol. Manage.* 461, 117931. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2020.117931>.
- Dieckmann, U., Doebeli, M., 1999. On the origin of species by sympatric speciation. *Nature* 400, 354–357. <https://doi.org/10.1038/22521>.
- Fox, G.A., 2003. Assortative mating and plant phenology: evolutionary and practical consequences. *Evol. Ecol. Res.* 5, 1–18.
- Fox, J., Weisberg, S., 2019. CAR - An R Companion to Applied Regression, Third. ed, Thousand Oaks CA: Sage, Sage, thousand Oaks (CA).
- Hartig, F., 2020. DHARMa: Residual Diagnostics for Hierarchical (Multi-Level // Mixed) Regression Models.
- Hill, R.S., Read, J., 1991. A revised infrageneric classification of *Nothofagus* (Fagaceae). *Bot. J. Linn. Soc.* 105, 37–72. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8339.1991.tb00199.x>.
- Huang, E., Chen, Y., Fang, M., Zheng, Y., Yu, S., 2021. Environmental drivers of plant distributions at global and regional scales. *Global Ecol. Biogeogr.* 30, 697–709. <https://doi.org/10.1111/geb.13251>.
- Ignazi, G., Bucci, S.J., Premoli, A.C., 2020. Stories from common gardens: Water shortage differentially affects *Nothofagus pumilio* from contrasting precipitation regimes. *For. Ecol. Manage.* 458, 117796 <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2019.117796>.
- Kassambara, A., 2020. ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots.
- Kelly, D.A., Goulden, M.L., 2008. Rapid shifts in plant distribution with recent climate change. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 11823–11826. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802891105>.
- Kirkpatrick, M., 2000. Reinforcement and divergence under assortative mating. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 267, 1649–1655. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1191>.
- Lenormand, T., 2002. Gene flow and the limit to natural selection. *Trends Ecol. Evol.* 17, 183–189. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(02\)02497-7](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(02)02497-7).
- Lenth, R., 2020. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. <https://doi.org/10.1080/00031305.1980.10483031>. License.
- Levin, D.A., 2006. Flowering Phenology in Relation to Adaptive Radiation. *Syst. Bot.* 31, 239–246. <http://www.jstor.org/stable/25064147>.
- Mathiasen, P., Premoli, A.C., 2016. Living on the edge: adaptive and plastic responses of the tree *Nothofagus pumilio* to a long-term transplant experiment predict rear-edge upward expansion. *Oecologia* 181, 607–619. <https://doi.org/10.1007/s00442-016-3568-7>.
- Mayer, A., 2010. Phenology and citizen science: Volunteers have documented seasonal events for more than a century, and scientific studies are benefiting from the data. *Bioscience* 60, 172–175. <https://doi.org/10.1525/bio.2010.60.3.3>.
- Mojica, J.P., Lee, Y.W., Willis, J.H., Kelly, J.K., 2012. Spatially and temporally varying selection on intrapopulation quantitative trait loci for a life history trade-off in *Mimulus guttatus*. *Mol. Ecol.* 21, 3718–3728. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05662.x>.

- Orr, M.R., Smith, T.B., 1998. Ecology and speciation. *Trends Ecol. Evol.* 13, 502–506. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(98\)01511-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(98)01511-0).
- Piao, S., Liu, Q., Chen, A., Janssens, I.A., Fu, Y., Dai, J., Liu, L., Lian, X., Shen, M., Zhu, X., 2019. Plant phenology and global climate change: Current progresses and challenges. *Glob. Chang. Biol.* 25, 1922–1940. <https://doi.org/10.1111/gcb.14619>.
- Premoli, A.C., 1996. Allozyme polymorphisms, outcrossing rates, and hybridization of South American *Nothofagus*. *Genetica* 97, 55–64. <https://doi.org/10.1007/BF00132581>.
- Premoli, A.C., 2003. Isozyme polymorphisms provide evidence of clinal variation with elevation in *Nothofagus pumilio*. *J. Hered.* 94, 218–226. <https://doi.org/10.1093/jhered/egs052>.
- Premoli, A.C., Brewer, C.A., 2007. Environmental v. genetically driven variation in ecophysiological traits of *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations. *Aust. J. Bot.* 55, 585–591. <https://doi.org/10.1071/BT06026>.
- Premoli, A.C., Mathiasen, P., Acosta, C.M., Ramos, V.A., 2012. Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be? *New Phytol.* 193, 261–275. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03861.x>.
- Premoli, A.C., Raffaele, E., Mathiasen, P., 2007. Morphological and phenological differences in *Nothofagus pumilio* from contrasting elevations: Evidence from a common garden. *Austral Ecol.* 32, 515–523. <https://doi.org/10.1111/j.1442-9993.2007.01720.x>.
- Primack, R.B., 1980. Variation in the Phenology of Natural Populations of Montane Shrubs in New Zealand. *J. Ecol.* 68, 849–862. <https://doi.org/10.2307/2259460>.
- Quintero, I., González-Caro, S., Zalamea, P.C., Cadena, C.D., 2014. Asynchrony of seasons: Genetic differentiation associated with geographic variation in climatic seasonality and reproductive phenology. *Am. Nat.* 184, 352–363. <https://doi.org/10.1086/677261>.
- Quiroga, P., Vidal Russell, R., Premoli, A.C., 2005. Morphological and isozyme evidence of natural hybridization between *Nothofagus antarctica* and *N. pumilio* in north-western Patagonia. *Bosque* 26, 25–32. <https://doi.org/10.4067/s0717-92002005000200004>.
- R Core Team, 2020. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
- Ramírez, C., Correa, M., Figueroa, H., San Martín, J., 1985. Variación del hábito y el hábitat de *Nothofagus antarctica* en el Centro Sur de Chile. *Bosque* 6, 55–73.
- Riveros, M., Parades, M.A., Rosas, M.T., Cardenas, E., Armesto, J., Arroyo, M.T.K., Palma, B., 1995. Reproductive biology in species of the genus *Nothofagus*. *Environ. Exp. Bot.* 35, 519–524. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(95\)00022-4](https://doi.org/10.1016/0098-8472(95)00022-4).
- Rundell, R.J., Price, T.D., 2009. Adaptive radiation, nonadaptive radiation, ecological speciation and nonecological speciation. *Trends Ecol. Evol.* 24, 394–399. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.02.007>.
- Rusch, V.E., 1993. Altitudinal variation in the phenology of *Nothofagus pumilio* in Argentina. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 66, 131–141.
- Savolainen, P., Leitner, T., Wilton, A.N., Matisoo-Smith, E., Lundeberg, J., 2004. A detailed picture of the origin of the Australian dingo, obtained from the study of mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12387–12390. <https://doi.org/10.1073/pnas.0401814101>.
- Servedio, M.R., Van Doorn, G.S., Kopp, M., Frame, A.M., Nosil, P., 2011. Magic traits in speciation: “magic” but not rare? *Trends Ecol. Evol.* 26, 389–397. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.04.005>.
- Shen, M., Piao, S., Dorji, T., Liu, Q., Cong, N., Chen, X., An, S., Wang, S., Wang, T., Zhang, G., 2015. Plant phenological responses to climate change on the Tibetan Plateau: research status and challenges. *Natl. Sci. Rev.* 2, 454–467. <https://doi.org/10.1093/nsr/nwv058>.
- Stecconi, M., Marchelli, P., Puntieri, J., Picca, P., Gallo, L., 2004. Natural hybridization between a deciduous (*Nothofagus antarctica*, *Nothofagaceae*) and an evergreen (*N. dombeyi*) forest tree species: Evidence from morphological and isoenzymatic traits. *Ann. Bot.* 94, 775–786. <https://doi.org/10.1093/aob/mch205>.
- Steinke, L.R., Premoli, A.C., Souto, C.P., Hedrén, M., 2008. Adaptive and Neutral Variation of the Resprouter *Nothofagus antarctica* Growing in Distinct Habitats in North-Western Patagonia. *Silva Fenn.* 42, 177–188. <https://doi.org/10.14214/sf.251>.
- Taylor, R.S., Friesen, V.L., 2017. The role of allochryony in speciation. *Mol. Ecol.* 26, 3330–3342. <https://doi.org/10.1111/mec.14126>.
- Torres, C., Puntieri, J., 2013. Pollination and self-interference in *Nothofagus*. *Flora* 208, 412–419. <https://doi.org/10.1016/j.flora.2013.07.002>.
- Veblen, T.T., Donoso, C., Kitzberger, T., Rebertus, A.J., 1996. Ecology of southern Chilean and Argentinean *Nothofagus* forests. In: Veblen, T.T. (Ed.), *The Ecology and Biogeography of Nothofagus Forests*. Yale University Press, New Haven, Connecticut, United States of America, pp. 293–353.
- Vitasse, Y., Lenz, A., Körner, C., 2014. The interaction between freezing tolerance and phenology in temperate deciduous trees. *Front Plant Sci.* 5, 541. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00541>.
- Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., Takahashi, K., Vaughan, D., Wilke, C., Woo, K., Yutani, H., 2019. Welcome to the Tidyverse. *J. Open Source Softw.* 4, 1–6. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.
- Worth, J.R.P., Jordan, G.J., McKinnon, G.E., Vaillancourt, R.E., 2009. The major Australian cool temperate rainforest tree *Nothofagus cunninghamii* withstood Pleistocene glacial aridity within multiple regions: Evidence from the chloroplast. *New Phytol.* 182, 519–532. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02761.x>.