



Universidad Nacional del Nordeste  
Facultad de Ciencias Agrarias

**ESTUDIOS FILOGEOGRÁFICOS EN EL  
COMPLEJO *TURNERA SIDOIDES* L.  
(PASSIFLORACEAE)**

Tesis presentada para optar por el grado de Doctor  
de la Universidad Nacional del Nordeste en el Área  
de Recursos Naturales

**Lic. Ercilia María Sara Moreno**

Directora: Dra. Viviana Griselda Solís Neffa  
(UNNE-CONICET)

Co-Directora: PhD. Loreta Brandão de Freitas  
(Departamento de Genética, UFRGS)

Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE-CONICET)

Corrientes-Argentina

2014

*A Mami, Papi y Jessi,  
los amo.*



## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas por permitir dedicarme enteramente a la tesis mediante el otorgamiento de las becas tipo I y II.

Al Doctorado de la Universidad Nacional del Nordeste en el Área de recursos Naturales por haberme permitido desarrollar la tesis en su programa.

A la Secretaria General de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional del Nordeste por otorgarme un subsidio para la realización de estudios de posgrado.

A las autoridades de Posgrado de la Facultad de Agronomía, por otorgarme una bonificación de parte de los aranceles del doctorado.

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste por haberme brindado el espacio físico para la realizar esta Tesis.

Al Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE - CONICET) por brindarme las instalaciones y el instrumental para realizar la tesis.

A mi directora, la Dra. Viviana Solís Neffa (IBONE), por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, introducirme al estudio de la genética de poblaciones y brindarme su apoyo y conocimiento en todo momento. Por la paciencia y los consejos.

A mi codirectora, la Dra. Loreta Brandão de Freitas (UFRGS), por permitirme trabajar en su laboratorio, enseñarme las bases de la filogeografía y responder a todas mis dudas.

Al Ing. Agr. Aveliano Fernández (IBONE) por haberme invitado a trabajar en el IBONE y por su buena predisposición y “empuje” de todos los días para que sigamos realizando logros en la carrera.

Al Dr. Guillermo Seijo (IBONE), por darme ánimos a su manera y más de una vez cuestionarme conceptos y demás, lo cual me llevaba a buscar más información hasta sacarme la duda.

Al Dr. Pablo Speranza (Universidad de la República), por enseñarme que el estudio en plantas en Sudamérica debe trascender límites, por abrirme las puertas de su laboratorio, aconsejarme y ser de inmensa ayuda en las colecciones de plantas en Uruguay.

A las secretarías del IBONE, Carmen, Susana y Cecilia, porque siempre se mostraron amables y predispuestas a ayudarme a resolver cualquier problema o duda que tuviera.

A los bibliotecarios, Ilene, Sergio y Matías, por ayudarme a encontrar toda la bibliografía que necesité.

A José Giudici, por tenerme siempre una enorme paciencia y ayudarme con los trámites y dudas administrativas del doctorado, por convertirse en consejero y amigo.

A Jorge, por escucharme y brindarme su visión siempre positiva de las cosas, por estar siempre cuando algo se rompía y necesitaba ser arreglado ya.

A Heather Machado, por haber impulsado en mí el cuestionamiento y la búsqueda de soluciones a los protocolos que no salían.

A Germán, por haberme enseñado con toda la paciencia y perseverancia del mundo protocolos, manejo de instrumental, y demás trucos de laboratorio, por haberse quedado a mi lado todo el tiempo necesario cuando estaba iniciando mis actividades en lo molecular hasta que las cosas salieran, y por siempre tener una anécdota para contar y reírnos un rato.

A mis compañeros del IBONE, por preguntarme cómo voy, darme ánimos, ofrecer su ayuda y por las muchas reuniones de cumpleaños más de una vez compartidas.

A Andrea Panseri, por enseñarme a manejarme en el laboratorio de cito y por las tantas tardes compartidas en el trabajo.

A Seba y Diego, por siempre estar dispuestos a brindarme ayuda y darme sus explicaciones bioquímicas en el laboratorio.

A mis amigos del IBONE, Cele, Gaby, Gise, Naty, Yani, Juanma, Jony, Eve, Ale, Lau, Danilo, Germán, Marina, Álvaro, por darme fuerzas y hacerme el aguante en todo, lo mejor de llegar al Instituto fue conocerlos.

A Lau, porque junto a ella pudimos sobrellevar el tiempo fuera de casa, por las extensas charlas, por su amistad.

A mis amigas, del trabajo y de la vida, Ceci, Naty, Gaby, Gise, Cele, Yani y Noe, porque de una u otra forma siempre lograron levantarme el ánimo, por tantas charlas de catarsis y por su amistad.

A Naty y Ceci, por estar siempre cuando las necesité, por su amistad.

A Ceci, por escucharme largas horas y calmarme en momentos de crisis "tesística".

A Noe, por entender mis tiempos y prioridades y siempre alentarme a seguir.

A mi familia, por apoyarme en todo y siempre brindarme su amor.

A mi mamá, mi papá y mi hermana, por celebrar mis logros y ayudarme en los tropiezos, por ser mi cable a tierra.

A mi ángel guardián, Carli, por cuidarme siempre.

A mi mamá y mi papá, por enseñarme a no bajar los brazos nunca, a ser responsable en todo y a relajarme también, por estar siempre cuando los necesité y ayudarme en los momentos difíciles, por entenderme y aguantarme.

A Jessi, por enseñarme todo lo que se de arte, por entenderme y ayudar a relajarme, por sacarme una sonrisa en momentos de agotamiento, por estar para mí siempre.

A todos (si es que me olvidé de alguien mil perdones, ya conocen mi memoria), un gracias infinito y de corazón.

# ÍNDICE GENERAL

	<b>PÁGINA</b>
<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>SUMMARY</b> .....	5
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	9
HIPÓTESIS.....	15
OBJETIVOS.....	16
FILOGEOGRAFÍA.....	17
MARCO TEÓRICO.....	17
MARCADORES MOLECULARES EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS FILOGEOGRÁFICOS EN PLANTAS.....	18
EL COMPLEJO <i>TURNERA SIDOIDES</i> (PASSIFLORACEAE).....	20
DESCRIPCIÓN DEL ÁREA GEOGRÁFICA DEL COMPLEJO <i>TURNERA SIDOIDES</i> .....	32
CAMBIOS CLIMÁTICOS Y GEOLÓGICOS OCURRIDOS EN EL DOMINIO FITOGEOGRÁFICO CHAQUEÑO DURANTE EL CUATERNARIO.....	35
MODELO EVOLUTIVO PROPUESTO PARA <i>TURNERA SIDOIDES</i> .....	38
<b>MATERIAL DE ESTUDIO</b> .....	40
ADN CLOROPLÁSTICO.....	50
ADN NUCLEAR.....	50
<b>MÉTODOS</b> .....	53
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO.....	54
ADN CLOROPLÁSTICO.....	55
AMPLIFICACIÓN DE REGIONES NO CODIFICANTES DE ADN CLOROPLÁSTICO.....	55

ALINEAMIENTO Y EDICIÓN DE LAS SECUENCIAS.....	59
CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN CLOROPLÁSTICO Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA.....	60
RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE HAPLOTIPOS.....	62
FILOGENIA INTRAESPECÍFICA.....	63
ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS.....	63
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	67
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	68
ADN NUCLEAR.....	69
POLIMORFISMO EN EL ADN AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD).....	69
CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	70
ESTRUCTURACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	71
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>73</b>
ADN CLOROPLÁSTICO.....	74
CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN CLOROPLÁSTICO Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA.....	74
RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE HAPLOTIPOS.....	84
FILOGENIA INTRAESPECÍFICA.....	88
ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS.....	91
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	97
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	101
ADN NUCLEAR.....	106
CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	106
ESTRUCTURACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	112
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>119</b>

ADN CLOROPLÁSTICO.....	120
CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN CLOROPLÁSTICO Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA.....	120
VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL.....	120
VARIACIÓN DEL ADNCP ENTRE LAS SUBESPECIES.....	121
VARIACIÓN DEL ADNCP DENTRO DE LAS SUBESPECIES.....	123
RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE HAPLOTIPOS Y FILOGENIA INTRAESPECÍFICA.....	125
ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS.....	127
ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL.....	128
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA.....	129
ADN NUCLEAR.....	131
IMPLICANCIAS BIOGEOGRÁFICAS Y EVOLUTIVAS.....	132
IMPLICANCIAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD.....	142
CONCLUSIONES GENERALES.....	143
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>147</b>
<b>ANEXO.....</b>	<b>173</b>

# ÍNDICE DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
1	Información de las poblaciones de <i>Turnera sidoides</i> analizadas.....	42
2	Regiones de ADNcp analizadas.....	57
3	Protocolo de amplificación para el espaciador intergénico cloroplástico <i>trnL</i> - <i>trnF</i> .....	58
4	Protocolo de amplificación para el espaciador intergénico cloroplástico <i>matK5'</i> - <i>matK6</i> .....	59
5	Cebadores RAPD empleados en este estudio.....	69
6	Protocolo de amplificación para los marcadores RAPD.....	70
7	Características de las regiones de ADNcp analizadas y estadísticos de resumen calculados para cada región de ADNcp analizada y la secuencia concatenada.....	74
8	Estadísticos de resumen calculados para las subespecies / morfotipos de <i>Turnera sidoides</i> .....	75
9	Constitución haplotípica de los haplogrupos.....	78
10	Estadísticos de resumen para cada haplogrupo.....	88
11	Estadísticos de neutralidad calculados para el complejo <i>Turnera sidoides</i> y para cada uno de los haplogrupos.....	91
12	Resultados del análisis de la varianza molecular basado en datos de secuencias de ADNcp de <i>Turnera sidoides</i> .....	98
13	Matriz de distancias genéticas entre las subespecies de <i>Turnera sidoides</i> .....	99
14	Matriz de distancias genéticas entre los haplogrupos hallados en <i>Turnera sidoides</i> .....	99

<b>15</b>	Estadísticos de resumen calculados en base a las secuencias de ADNcp para cada una de las regiones geográficas identificadas.....	105
<b>16</b>	Resumen de la diversidad genética basado en marcadores RAPD para las poblaciones de <i>Turnera sidoides</i> .....	107
<b>17</b>	Resumen de la diversidad genética basado en marcadores RAPD para las regiones geográficas de <i>Turnera sidoides</i> definidas en base a la variabilidad del ADNcp.....	111
<b>18</b>	Resultados del análisis de la varianza molecular basado en datos de ADNn de <i>Turnera sidoides</i> .....	113
<b>19</b>	Matriz de distancias genéticas entre las subespecies de <i>Turnera sidoides</i> obtenida a partir de RAPD.....	114
<b>20</b>	Matriz de distancias genéticas entre regiones geográficas obtenida a partir de RAPD.....	114
<b>21</b>	Resultados del análisis de coordenadas principales basado en los patrones de bandas RAPD de <i>Turnera sidoides</i> .....	115
<b>22</b>	Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para los individuos de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>carnea</i> .....	118
<b>23</b>	Análisis de coordenadas principales basado en los patrones RAPD de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>carnea</i> .....	119

# ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
1	Mapa de distribución del complejo <i>Turnera sidoides</i> .....	21
2	<i>Turnera sidoides</i> . Flores, semillas, rizoma.....	22
3	Área de distribución de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>carnea</i> .....	25
4	Área de distribución de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>holosericea</i> .....	26
5	Área de distribución de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>integrifolia</i> .....	27
6	Área de distribución de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>pinnatifida</i> .....	30
7	Área de distribución de <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>sidoides</i> .....	31
8	Distribución de las poblaciones del complejo <i>Turnera sidoides</i> analizadas.....	51
9	Red de haplotipos mostrando las relaciones evolutivas entre los haplotipos hallados en <i>Turnera sidoides</i> .....	86
10	Red de haplotipos que muestra las relaciones evolutivas entre los haplotipos hallados en <i>Turnera sidoides</i> y su representación en las cinco subespecies.....	87
11	Árbol filogenético bayesiano mostrando las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de <i>Turnera sidoides</i> y el grupo externo obtenido a partir de secuencias de ADNcp.....	90
12	Distribución de diferencias de a pares ( <i>mismatch distribution</i> ) observadas en el complejo <i>Turnera sidoides</i> .....	92
13	Distribución de diferencias de a pares ( <i>mismatch distribution</i> ) en cada haplogrupo.....	93
14	Perfil demográfico obtenido a partir del análisis bayesiano del ADNcp de <i>Turnera sidoides</i> .....	95

<b>15</b>	Perfil demográfico obtenido a partir del análisis bayesiano del ADNcp de cada uno de los haplogrupos de <i>Turnera sidoides</i> .....	96
<b>16</b>	Relación entre la distancia genética obtenida a partir de las secuencias de ADNcp y la distancia geográfica (Km) entre las poblaciones analizadas de <i>Turnera sidoides</i> .....	100
<b>17</b>	Distribución geográfica de los haplotipos hallados en <i>Turnera sidoides</i> .....	103
<b>18</b>	Gráfico resultante del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores RAPD de los individuos de <i>Turnera sidoides</i> .....	116
<b>19</b>	Relación entre la distancia genética obtenida a partir de los marcadores RAPD y la distancia geográfica (Km) entre las poblaciones de <i>Turnera sidoides</i> .....	117
<b>20</b>	Gráfico resultante del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores RAPD de los individuos pertenecientes a <i>Turnera sidoides</i> subsp. <i>carnea</i> .....	119

# LISTA DE ABREVIATURAS

a. A. P. – años antes del presente

ADN – ácido desoxirribonucleico

ADNcp – ácido desoxirribonucleico cloroplástico

ADNm – ácido desoxirribonucleico mitocondrial

ADNn – ácido desoxirribonucleico nuclear

com pers – comunicación personal

dNTP – desoxirribonucleótido trifosfato

EDTA – ácido etilendiaminotetra-acético

h – hora

km – kilómetros

M – molar

m – metros

m.a. – millón de años

mg – miligramos

min – minutos

ml – mililitros

mM – milimolar

m.s.m. – metros sobre el nivel del mar

Ne – tamaño poblacional efectivo

ng – nanogramos

pb – pares de bases

p / v – peso en volumen

PCoA – Análisis de Coordenadas Principales

PCR – reacción en cadena de la ADN polimerasa

RAPD – polimorfismos de ADN amplificado al azar (*random amplified polymorphic DNA*)

rcf – fuerza centrífuga relativa (*relative centrifugal force*)

RFLP – polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (*restriction fragment length polymorphisms*)

rpm – revoluciones por minuto

S – sitios polimórficos

s – segundos

s/n – sin número

TAE – tampón Tris-ácido acético-EDTA

Tris – N-Tris-(hidoximetil)-aminoetano

U – unidades

UMG – último máximo glacial

UV – ultravioleta

v/v – volumen en volumen

× - proporción de concentración en soluciones

x - número cromosómico básico de una especie

μg - microgramos

μl - microlitros

μM - micromolar

2n - número cromosómico somático

2x - diploide

3x - triploide

4x - tetraploide

6x - hexaploide

8x - octoploide

# RESUMEN

Los actuales patrones de biodiversidad y distribución geográfica de las especies son el producto de historias evolutivas complejas relacionadas, al menos en parte, a cambios geológicos y eventos históricos. En particular, las fluctuaciones en el clima global ocurridas durante el Cuaternario han tenido importantes consecuencias para la mayoría de los seres vivos, influyendo tanto en la distribución de las especies como en la diversidad y en la estructura genética de sus poblaciones. Los cambios en la distribución geográfica ofrecieron oportunidades para la especiación a través del aislamiento y la hibridación luego de un contacto secundario

El Hemisferio Sur, aunque no estuvo sujeto a extensas glaciaciones como el Hemisferio Norte, sufrió considerables cambios geomorfológicos y climáticos históricos. En el Dominio Fitogeográfico Chaqueño, los eventos más importantes que dieron lugar al escenario geomorfológico actual están relacionados con el emplazamiento de los cratones o escudos Brasileño y Andino, la orogenia andina, el relleno de la cuenca intracratónica, el redireccionamiento de los grandes ríos de la región y la formación de una gran llanura aluvial xérica a partir de los antiguos abanicos aluviales de los ríos. Además, en este período una secuencia de climas secos y húmedos ocurrió entre los 22°S y 39°S, en correspondencia con los ciclos de glaciación en los Andes. Estos cambios pudieron ser críticos en la determinación de los actuales patrones de distribución de las especies. Los escasos datos paleopalinológicos así como los estudios geomorfológicos y estratigráficos sugieren que, durante el Pleistoceno y Holoceno, la vegetación xerofítica y los tipos de vegetación tropical y subtropical habrían sufrido, alternativamente, desplazamientos con una dirección NE-SW.

Las modificaciones en la vegetación, debido a estos cambios geomorfológicos y climáticos históricos, pudieron interrumpir el área de las especies, causar la extinción local de poblaciones y cambiar las presiones de selección, produciendo una considerable reorganización genética la cual puede reflejarse en los acervos génicos de las especies modernas. Sin embargo, los datos disponibles para probar las hipótesis planteadas en relación con la respuesta de los organismos a los cambios climáticos ocurridos en el Dominio Chaqueño son todavía escasos. Los estudios filogeográficos (i.e. el análisis de

la distribución espacial de los linajes genealógicos) y evolutivos en especies clave pueden, por lo tanto, ser muy informativos y contribuir a la interpretación de los cambios en la biota del Dominio Fitogeográfico Chaqueño en respuesta a los procesos históricos.

Algunas de la hipótesis propuestas para el Dominio Chaqueño han sido analizadas utilizando al complejo *Turnera sidoides* L., ya que constituye un modelo biogeográfico muy informativo y su distribución coincide en casi toda su extensión con la de este Dominio. Este complejo de hierbas perennes presenta una gran diversidad morfológica y ecológica y, además, posee una alta incidencia de la poliploidía. A partir de las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento, se ha propuesto que la diferenciación morfológica de *T. sidoides*, así como la distribución actual de los citotipos, habrían estado influenciadas por procesos históricos. Los diploides habrían tenido una distribución ancestral continua a lo largo de los cordones montañosos que limitan la llanura Chaco-Pampeana. Los procesos geomorfológicos y los ciclos de sequía/humedad ocurridos en la región, habrían determinado la fragmentación del área de los diploides, interrumpiendo el flujo génico y conduciendo a la diferenciación de los mismos en alopatria. Los valles y las laderas de las montañas habrían mantenido condiciones ambientales más estables, ofreciendo refugios para la supervivencia de los diploides. Los tetraploides se habrían originado en múltiples eventos de poliploidización, ocupando los ambientes resultantes de los pulsos de expansión/contracción de la vegetación en la llanura Chaco-Pampeana, estableciendo contactos secundarios entre morfotipos y subespecies.

A fin de probar estas hipótesis, el objetivo general de esta tesis es analizar los patrones filogeográficos del complejo *Turnera sidoides* en relación a los procesos geomorfológicos y climáticos históricos ocurridos en el Dominio Fitogeográfico Chaqueño. A tal fin, se analizó la variabilidad genética intraespecífica en dos regiones no codificantes de ADNcp en 160 individuos de 97 poblaciones representativas de la variabilidad morfológica y la distribución geográfica de *T. sidoides*. Se analizó la variabilidad genética y la historia demográfica de las poblaciones y, se analizaron las relaciones evolutivas entre haplotipos mediante la elaboración de una red de haplotipos y la realización de inferencias bayesianas. La estructuración de la variabilidad genética y la correlación entre las distancias genéticas y las distancias geográficas de las

poblaciones fueron analizadas mediante un AMOVA y un test de Mantel, respectivamente. Además, se caracterizó la variabilidad genética intraespecífica del complejo a escala regional mediante el empleo de marcadores de ADNn. Finalmente se analizó la distribución geográfica de las variantes genéticas detectadas.

Los análisis llevados a cabo en esta tesis constituyen el primer estudio filogeográfico del complejo *Turnera sidoides* y es también el primero realizado en una especie ampliamente distribuida en el Dominio Fitogeográfico Chaqueño.

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica detectados en el complejo *Turnera sidoides* sugieren que, durante su historia evolutiva, habría ocurrido un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral con pequeño tamaño poblacional efectivo, donde el tiempo fue suficiente para recuperar la variación haplotípica pero muy corto como para una gran acumulación de diferencias en las secuencias.

El hallazgo de haplotipos exclusivos en poblaciones diploides de las diferentes subespecies y morfotipos sustenta la hipótesis que propone que la diferenciación de las subespecies / morfotipos de *Turnera sidoides* habría ocurrido a nivel diploide. Por otra parte, la discordancia parcial entre los haplotipos de ADNcp y los límites subespecíficos observada en el complejo sería el resultado de uno o más procesos diferentes como el polimorfismo ancestral, la introgresión y la captura de cloroplastos.

Los análisis de la red de haplotipos y bayesianos revelaron una clara división de los haplotipos en cuatro haplogrupos o clados, los cuales representan cuatro unidades evolutivas que habrían permanecido estables a lo largo del tiempo, sugiriendo la ocurrencia de extensos períodos de aislamiento entre dichos haplogrupos en *T. sidoides*. Estos resultados fueron sustentados por los obtenidos de los análisis demográficos y los valores de distancia genética entre los haplogrupos. Asimismo, los resultados del AMOVA demostraron que tanto las subespecies como las regiones geográficas difieren en los niveles de variabilidad genética detectada tanto a partir del análisis de las secuencias de ADNcp como por RAPDs. Finalmente, la falta de correlación entre la divergencia genética y la distancia geográfica de las poblaciones *T. sidoides* revelada por el test de Mantel, sugiere que la variación genética en este complejo no está

distribuida clinalmente, por lo que la diferenciación genética actual entre las poblaciones de *T. sidoides* no puede ser explicada bajo un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia.

A partir de los resultados obtenidos, se proponen posibles centros de diversificación y fijación de los haplotipos para el complejo *Turnera sidoides* asociados con los mayores sistemas orográficos en la región: Valles interandinos; Chaco Boliviano y salteño, Sierras de Córdoba, Mesopotamia, Cuchilla de Haedo, Serranías del Este y Rio Grande do Sul. El hallazgo del haplotipo ancestral en poblaciones diploides y poliploides de *T. sidoides* distribuidas en las regiones más elevadas del área del complejo, sustenta la hipótesis que sugiere que los diploides habrían ocupado un área más continua que la actual a lo largo del arco peripampásico, el que habría constituido una vía de migración de las poblaciones. Asimismo, el hallazgo de este haplotipo y de haplotipos de punta en poblaciones tetraploides de los morfotipos chaqueño (tanto del Chaco Oriental como del Occidental) y pampeano sustenta la hipótesis que propone que los tetraploides, que están distribuidos a lo largo de la llanura Chaco-Pampeana, habrían expandido su distribución a partir de las áreas de refugio hasta alcanzar los límites actuales.

Las áreas de mayor diversidad específica y genética detectadas en *Turnera sidoides* representarían reservorios de la variabilidad genética de ésta como de otras especies; mientras que el arco serrano constituiría un importante corredor que mantendría la conectividad biológica entre dichos reservorios. El análisis de la congruencia de los patrones filogeográficos y de la distribución de las variantes genéticas de *Turnera sidoides* y de otros taxones codistribuidos en relación a patrones de variación ambiental y uso de la tierra a escala regional podría, por lo tanto, contribuir a la identificación de áreas prioritarias para la conservación de la diversidad vegetal de la región y a realizar predicciones para el estudio de otras especies.

# SUMMARY

Current patterns of biodiversity and species distribution are the results of complex evolutionary histories related, at least in part, to geological changes and historical events. Particularly, Quaternary fluctuations of global climate had important consequences for most organisms, influencing not only biodiversity and species distribution but the genetic structure of populations as well. Such changes would offer opportunities for speciation by isolation and hybridization after secondary contact.

The Southern Hemisphere, although was not subject to extensive glaciations, suffered considerable geomorphologic and climatic changes. The most important events that gave rise the currents landscapes are related to the emplacement of the Brazilian and Andean cratons, the Andes orogeny, the mobilization and deposition of sediments transported by northerly winds, the intensive migration of the fluvial belts of the main rivers and the formation of a great xeric alluvional plain. Moreover, in this period a sequence of dry and wet climates occurs between the 22°S and 39°S, in correspondence with the glaciations cycles in the Andes. These changes would be critical in the determination of the currents patterns of species distribution. The scarce paleopalynological data as well as the geomorphologic and stratigraphical studies suggest that, during Pleistocene and Holocene, the xerophytic vegetations and the tropical and subtropical vegetation types would have suffered, alternatively, NE-SW displacements.

Vegetation changes resulted of such geomorphologic and climatic changes must have disrupted species ranges, caused the extinction of local populations, and changed selective pressures, producing a considerable genetic reorganization that may be reflected in the gene pools of the modern species. Notwithstanding, the information available to test hypotheses related to the biological response to the historical changes occurred in the Chaqueño Phytogeographical Domain is still scarce. Therefore, phylogeographic (i.e. the analysis of spatial distribution of genealogical lineages) and evolutionary studies in key species would be informative and may contribute to the interpretation of biota changes in response to the historical events of the Chaqueño Phytogeographical Domain.

Some hypotheses proposed for the Chaqueño Domain have been analyzed using *Turnera sidoides* L., since it constitute an informative biogeographical model and its distribution almost coincides with the area of this Domain. This complex of perennial herbs presents a great morphologic and ecological diversity and, it also has a high incidence of polyploidy. From the investigations so far performed, it has been proposed that the morphological differentiation of *T. sidoides*, as well as the current patterns of cytotypes distribution, would have been influenced by historical processes. Diploids should have a continuous distribution along the elevations that limit the Chaco-Papean plain. The geomorphologic and climatic changes occurred in the region, should fragment the diploids area, interrupting gene flow and determining their differentiation in allopatry. The valleys and ravines should have maintained stable environmental conditions, offering refugia to diploids survival. Tetraploids should have originated in multiple polyploidization events, occupying the environments resulted from the expansion/contraction pulses of vegetation in the Chaco-Pampean plain, establishing secondary contacts among subspecies and morphotypes.

To test these hypotheses, the objective of this thesis is to analyze the phylogeographic patterns of *Turnera sidoides* complex in relation to the geomorphologic and climatic events occurred in the Chaqueño Phytogeographical Domain. To do this, intraspecific variability of two non-coding regions of cpDNA was analyzed in 160 individual from 97 populations representative of the morphologic and geographical variability of *T. sidoides*. Genetic variability and demographical history of populations were analyzed. Evolutionary relationships among haplotypes were analyzed by the construction of a network and a Bayesian analysis. The structuring of genetic variability and the correlation between genetic and geographical distances were analyzed by AMOVA and Mantel tests, respectively. In addition, intraspecific genetic variability was analyzed at a geographical scale using molecular markers of nDNA. Finally, the geographic distribution of the genetic variants detected was also analyzed.

The analyses performed in this thesis constitute the first phylogeographic study in *Turnera sidoides* complex and in a widely distributed species in the Chaqueño Phytogeographical Domain.

The values of haplotypic and nucleotidic diversity indices detected in *Turnera sidoides* complex suggest that, during its evolutionary history, would occur a fast population grow from an ancestral population with a low effective population size, being the time sufficient to recover haplotypic variation but not to accumulate great differences among sequences.

The finding of private haplotypes in diploid populations of the different subspecies / morphotypes supports the hypothesis of subspecies / morphotypes of *Turnera sidoides* differentiation at diploid level. Moreover, the partial disagreement among the cpDNA haplotypes and subspecific limits would result from different processes such as ancestral polymorphisms, introgression and chloroplast capture.

The network and the Bayesian analysis showed a clear haplotype division in four haplogroups or clades, which would represent four evolutionary units that may have remained stable for a long time, suggesting the occurrence of extensive isolation periods among such haplogroups of *T. sidoides*. These results were supported by those obtained from demographic analyses and the genetic distance among haplogroups. Moreover, the results of AMOVA showed that both subspecies and geographical regions differed in the levels of genetic variability detected from the analyses of cpDNA sequences and RAPD markers. Finally, the results of Mantel test suggest that the genetic variation is not clinally distributed and, thus, the genetic differentiations among populations of *T. sidoides* cannot be explained under an isolation by distance model.

From the results here obtained, putative centers of diversification and haplotype fixation were proposed for *Turnera sidoides* complex associated to the main orographic systems of the region: Interandean Valleys; Chaco Boliviano and salteño, Sierras de Córdoba, Mesopotamia, Cuchilla de Haedo, Serranías del Este and Rio Grande do Sul. The finding of the ancestral haplotype in diploid and polyploidy populations of *T. sidoides* distributed along the higher regions in the complex area, supports the hypothesis that diploids would have occupied a more continuous area than today along the peripampasic arc, which would have constituted a path for populations migration. In addition, the finding of the ancestral and derived haplotypes in tetraploid populations of the chaqueño (from both Western and Eastern Chaco) and pampeano morphotypes support the hypothesis that tetraploids, that are currently distributed along the Chaco-

Pampean plain, would have expanded their distribution from such refuges to their current limits.

The areas with a major specific and genetic diversity detected in *Turnera sidoides* would represent reservoirs of genetic variability for this and other species; while the peripampasic arc would constitute an important corridor that would maintain the biological connectivity among such reservoirs. Therefore, the analysis of the congruence of the phylogeographic and genetic patterns of *Turnera sidoides* and other co-distributed taxa in relation to the patterns of environmental change and management at a regional scale, would contribute to the identification of priority areas for conservation of the flora biodiversity of the region and to make predictions for the study of other species.

# INTRODUCCIÓN

*“Los seres vivos llevan su historia en sí mismos... se mueven  
en el tiempo seguidos de sus sombras.”*

*J. V. Crisci*

# INTRODUCCIÓN

Los actuales patrones de biodiversidad y de distribución geográfica de las especies son el producto de historias evolutivas complejas, las cuales incluyen procesos de diversificación de los organismos en el tiempo y el espacio relacionados, al menos en parte, a cambios geológicos y eventos históricos (ej. episodios climáticos del Cuaternario) ocurridos en el área de distribución de las especies (Avice 1994; Comes & Kadereit 1998; Hewitt 2000; Vargas 2003; Pielou 2008).

Asimismo, la estructuración genética de una especie es el resultado de procesos microevolutivos y demográficos que actúan entre y dentro de las poblaciones, así como de la historia biogeográfica de los linajes genéticos (Wenink *et al.* 1996). Estos procesos influyen en el flujo génico, la recombinación genética, la selección natural y la deriva génica, impactando en la estructura genética de la especie (Avice 1998). La estructura social, el sistema de apareamiento, la capacidad de dispersión, la cohesión de los parentales con su descendencia y la fragmentación del hábitat son otras causas por las cuales las poblaciones de una especie que difieren en su distribución geográfica pueden exhibir algún grado de diferenciación genética entre sí (Avice 1994).

Los cambios ambientales en gran escala han tenido un impacto fundamental en los patrones de distribución de las especies así como en la composición de las comunidades y los ecosistemas (ej. Hewitt 1999; Schweiger *et al.* 2009). En particular, las fluctuaciones en el clima global ocurridas durante las eras de hielo del Cuaternario han tenido importantes consecuencias para la mayoría de los seres vivos, influyendo tanto en la distribución de las especies como en la diversidad y en la estructura genética de sus poblaciones (Hewitt 1996). Los estudios paleoclimáticos y paleoecológicos del Hemisferio Norte han revelado una serie de contracciones de las áreas geográficas de los organismos durante el último período glacial, seguido por una rápida expansión de dichas áreas luego de la retirada de los glaciares. Estos cambios en la distribución geográfica ofrecieron oportunidades para la especiación a través del aislamiento y la hibridación luego de un contacto secundario (Hewitt 1996).

El Hemisferio Sur, aunque no estuvo sujeto a extensas glaciaciones, sufrió considerables cambios climáticos (Damuth & Fairbridge 1970; Ab`Sáber 1977, 1982; Markgraf & Bradbury 1982; Clapperton 1993; Iriando 1999). Los diferentes tipos de vegetación fueron intercalándose durante los períodos interglaciales y glaciales, entre aquellos asociados a condiciones húmedas y cálidas, y aquellos asociados a condiciones más secas y relativamente frías, respectivamente. Al mismo tiempo que la glaciación Wisconsin-Würm en el Hemisferio Norte, en Sudamérica, los períodos glaciales y las corrientes frías del este provocaron la expansión general de condiciones secas y frías, lo cual llevó a una predominancia de formaciones abiertas de diferentes tipos por sobre las grandes masas boscosas que se conocen en la actualidad (Ab`Sáber 1977). Las consecuencias de estos cambios climáticos sobre la biota han sido discutidas en relación con la retracción y expansión de la flora andina (Simpson & Todzia 1990; Pastorino & Gallo 2002; Premoli *et al.* 2000; Pastorino *et al.* 2004; Bull-Hereñu *et al.* 2005; Muellner *et al.* 2005; Quiroga & Premoli 2007), la contracción de la selva Amazónica a “islas” o “refugios” (Ab`Sáber 1977; Ledru 1993; van der Hammen & Absy 1994; Colinvaux *et al.* 1996 a, b; Prance 1996; Pennington *et al.* 2000), la expansión de las sabanas tropicales y subtropicales (Markgraft 1991; Soubies *et al.* 1991; Behling 1995, 1997, 2002) y la expansión de los bosques secos estacionales (Prado & Gibbs 1993; Pennington *et al.* 2000).

Los análisis filogeográficos, i.e. el análisis de la distribución espacial de los linajes genealógicos (Avice 1998), han realizado importantes contribuciones para interpretar las respuestas bióticas a los cambios ambientales del pasado. Dichos estudios han permitido, mediante el empleo de marcadores moleculares, inferir eventos históricos a través de la identificación de patrones geográficos de variación genética, la localización de refugios glaciales, la reconstrucción de rutas de colonización post glacial, la comparación de resultados de taxones no relacionados y la evaluación de las consecuencias genéticas de la dispersión post glacial versus la supervivencia en refugios durante largos períodos (Hewitt 1996; Avice 1998; Comes & Kadereit 1998).

Los primeros estudios filogeográficos fueron realizados principalmente en especies de animales a partir del análisis de la variación de las regiones de evolución rápida del genoma mitocondrial. Los estudios filogeográficos en plantas fueron realizados con posterioridad, debido a las dificultades para encontrar un marcador que

detecte la suficiente variación intraespecífica neutral requerida para la construcción de los árboles génicos (Schaal & Olsen 2000). A pesar de esta dificultad, los estudios filogeográficos en plantas han aportado abundante información sobre los cambios históricos de los patrones de la vegetación (ej. Aleixo & Rossetti 2007; Beheregaray 2008; Antonelli *et al.* 2010; Sérsic *et al.* 2011; Fregonezi *et al.* 2012; Turchetto-Zolet *et al.* 2012; Turchetto *et al.* 2014). A su vez, los estudios de filogeografía comparada han constituido la base para la comprensión de la evolución de biomas complejos y permitieron ponderar la influencia de la dispersión y la vicarianza en la evolución de especies codistribuidas (Birmingham *et al.* 1977; Soltis *et al.* 1997; Avise 1998, 2000; Comes & Kadereith 1998; Cunningham & Collins 1998; Schaal *et al.* 1998; Brunsfeld *et al.* 2001; Hewitt 2001; Knowles & Maddison 2002; Petit *et al.* 2002).

Por otra parte, desde la popularización del concepto de filogeografía, este enfoque ha sido aplicado con éxito en el Hemisferio Norte, abarcando casi todos los grupos de plantas y animales. De acuerdo con una revisión bibliográfica realizada por Beheregaray (2008), sólo el 15 % de las publicaciones en filogeografía se centraba en especies del Hemisferio Sur y, de éstas, sólo el 6,3 % involucraba a especies sudamericanas. Con respecto a los estudios filogeográficos en plantas, el 88 % de los mismos se realizaron en especies del Hemisferio Norte. No obstante, el número de estudios filogeográficos en Sudamérica ha ido incrementándose desde los últimos años (Turchetto-Zolet *et al.* 2012).

La interpretación de los cambios en la biota sudamericana en respuesta a los procesos geomorfológicos y climáticos históricos ha comenzado a ser abordada recientemente desde una perspectiva filogeográfica. A modo de ejemplo, se pueden citar los trabajos realizados en especies de los bosques secos estacionales (Grazziotin *et al.* 2006), de la cuenca del río de la Plata (Márquez *et al.* 2006; Poljack *et al.* 2010), de las Pampas (Fregonezi *et al.* 2012; Turchetto *et al.* 2014), de Argentina central (Ojeda 2010; Werneck *et al.* 2012); de los bosques andino-patagónicos (Marchelli *et al.* 1998; Palma *et al.* 2005; Arana *et al.* 2010; Quiroga & Premoli 2010; Premoli *et al.* 2012; Soliani *et al.* 2012), de la Patagonia (Johnson *et al.* 1999; Tremetsberger *et al.* 2009; Cosacov *et al.* 2010, 2012; Fontanella *et al.* 2011; Ruzzante *et al.* 2011; Sérsic *et al.* 2011), del Amazonas (Elmer *et al.* 2007; Walker & Ribero 2011), del nordeste de Brasil (Novaes *et al.* 2010), de la cuenca del Rio Doce en Brasil (Dergam *et al.* 2002), de las

tierras altas en el sudeste de Brasil (Lorenz-Lemke *et al.* 2010), de la Mata Atlántica (Lorenz-Lemke *et al.* 2005; Palma-Silva *et al.* 2009; Ribeiro *et al.* 2011), del Cerrado brasileiro (Collevatti *et al.* 2009) y de la llanura costera del Atlántico Sur (Mäder *et al.* 2013).

El Dominio Fitogeográfico Chaqueño (Cabrera 1971; Cabrera & Willink 1973) también estuvo sujeto a una sucesión de períodos secos y húmedos (Iriondo 1992; Iriondo & García 1993). Estos cambios pudieron ser críticos en la determinación de los actuales patrones de distribución de las especies (Ab`Sáber 1977; Burnham & Graham 1999). Los datos paleopalinológicos de esta región son escasos, y la información disponible sobre los cambios ambientales del Pleistoceno y Holoceno proviene principalmente de estudios geomorfológicos y estratigráficos incluyendo maderas fósiles, fitolitos y vertebrados fósiles (Tonni & Fidalgo 1978; Iriondo 1981, 1991, 1992; Iriondo & García 1993; Zárata & Blasi 1993; Prieto 1996; Zucol *et al.* 2005; Iriarte 2006). Estos estudios sugieren que, durante dichos períodos, la vegetación xerofítica y los tipos de vegetación tropical y subtropical habrían sufrido, alternativamente, desplazamientos con una dirección NE-SW (Popolizio 1970, 1982, 2003; Iriondo 1992). Las modificaciones en la vegetación, debido a los cambios geomorfológicos y climáticos transcurridos desde el inicio del Cuaternario, pudieron interrumpir el área de las especies, causar la extinción local de poblaciones y cambiar las presiones de selección, produciendo una considerable reorganización genética la cual puede reflejarse en los acervos génicos de las especies modernas. Sin embargo, los datos disponibles para probar las hipótesis planteadas en relación con la respuesta de los organismos a los cambios climáticos ocurridos en el Dominio Chaqueño son todavía escasos. Los estudios filogeográficos y evolutivos en especies clave pueden, por lo tanto, ser muy informativos y contribuir a la realización de inferencias sobre las consecuencias biogeográficas de los cambios climáticos en esta región de Sudamérica. En particular, las especies herbáceas ofrecen excelentes modelos para interpretar el papel de los cambios del pasado en la diversificación y especiación, ya que experimentan un mayor número de ciclos de vida en un período dado de tiempo, responden más rápidamente a los cambios ambientales en la escala de tiempo del Cuaternario, además de predominar en ellas los mecanismos de evolución reticulada y poliploidía (Comes & Kadereit 1998).

Algunas de la hipótesis propuestas para la región comprendida en el Dominio Fitogeográfico Chaqueño (Rambo 1954; De la Sota 1967; Crisci *et al.* 2001; Grela 2004) han sido analizadas utilizando al complejo *Turnera sidoides* L., ya que constituye un modelo biogeográfico muy informativo (Solís Neffa 2000, 2010; Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa *et al.* 2004; Speranza *et al.* 2007). La distribución de este complejo de hierbas perennes coincide en casi toda su extensión con el Dominio Fitogeográfico Chaqueño propuesto por Cabrera (1971). Se extiende desde el sur de Bolivia, Paraguay y Brasil hasta Uruguay y Argentina, donde alcanza los 39°S (Arbo 1985; Solís Neffa 2000).

En este complejo se analizó la variación de la región intergénica *trnL-trnF* del ADN cloroplástico (ADNcp) y se investigaron las implicancias biogeográficas de la estructuración geográfica detectada en los haplotipos (Speranza *et al.* 2007). Se identificaron 3 haplotipos que luego fueron detectados por PCR-RFLP en individuos de 75 poblaciones representativas de las 5 subespecies y que cubren el área de distribución del complejo en Argentina y Uruguay. Dicho estudio mostró que en *T. sidoides* los cloroplastos se heredan por vía materna; no se encontró variabilidad dentro de las poblaciones, sólo tres subespecies (*carnea*, *holosericea* e *integrifolia*) presentaron más de un haplotipo y, en la subespecie *carnea*, no existió una correspondencia entre los haplotipos cloroplásticos y los distintos citotipos (Speranza *et al.* 2007). Como este patrón podría ser el resultado de la introgresión del ADNcp entre subespecies, se analizó una zona de contacto entre dos subespecies que poseen diferentes haplotipos cloroplásticos y se diferencian fácilmente por su morfología. Los resultados del análisis de la variación de caracteres morfológicos y genéticos obtenidos hasta el momento son consistentes con la hibridación natural entre dichas subespecies. Sin embargo, los genotipos y morfología de los individuos intermedios sugieren que se trataría de híbridos recientes (Solís Neffa & Speranza 2006; Solís Neffa *et al.* 2008; Moreno *et al.* inéd.). Asimismo, el análisis conjunto de los haplotipos para todo el complejo reveló una clara estructuración geográfica.

A partir de estos resultados se ha sugerido que, independientemente de su distribución entre y dentro de las subespecies, la estructuración geográfica de los haplotipos sería el resultado de procesos históricos de retracción y expansión de las poblaciones. La estructuración geográfica que muestran los datos obtenidos hasta el

momento, sugiere que *T. sidoides* es un modelo apropiado para inferir el papel de los posibles refugios, vicarianza y rutas de migración en el área (Speranza *et al.* 2007). Dicho estudio constituyó uno de los primeros aportes para tratar de interpretar la influencia de los eventos históricos en la flora de las llanuras subtropicales y templadas de América del Sur empleando ADNcp. Sin embargo, aún se requieren estudios adicionales que incluyan el análisis de la variación de otras regiones del ADN cloroplástico y nuclear, así como material representativo de toda el área de *T. sidoides*. El análisis filogeográfico intraespecífico en el complejo *T. sidoides* permitirá, por lo tanto, realizar interpretaciones claras acerca de los patrones biogeográficos y proveerá información acerca de las relaciones filogenéticas entre grupos de poblaciones estrechamente relacionadas.

En el marco de los antecedentes citados, en esta tesis se plantea la siguiente hipótesis y los correspondientes objetivos:

## **HIPÓTESIS**

La estructura filogeográfica de *Turnera sidoides* es el resultado de procesos históricos de deriva genética y migración, que habrían dado lugar a la fijación de los haplotipos de ADN cloroplástico y ADN nuclear en centros asociados a los sistemas orográficos de la región (Sierras Subandinas y Pampeanas, Sistemas de Tandilia y Ventana, Cuchillas de Haedo y Grande así como el extremo sur del Macizo brasileiro) y a la Mesopotamia, a partir de los cuales los individuos portadores de diferentes haplotipos habrían recolonizado el área actual estableciendo contactos secundarios.

## **OBJETIVOS**

### **GENERAL**

Analizar los patrones filogeográficos del complejo *Turnera sidoides* en relación a los procesos geomorfológicos y climáticos históricos ocurridos en el Dominio Fitogeográfico Chaqueño.

### **ESPECÍFICOS**

Caracterizar la variación genética intraespecífica de *Turnera sidoides* mediante la utilización de marcadores genéticos cloroplásticos (fragmentos amplificados de secuencias no codificantes de ADN de cloroplastos).

Analizar las relaciones filogenéticas y la distribución geográfica de los haplotipos de ADNcp de *Turnera sidoides* a escala regional.

Caracterizar la variabilidad genética intraespecífica de *Turnera sidoides* a escala regional mediante el empleo de marcadores de ADN nuclear.

## FILOGEOGRAFÍA

### MARCO TEÓRICO

La filogeografía es el campo de estudio concerniente a la distribución geográfica de los linajes genealógicos. El análisis de la distribución espacial de dichos linajes es realizado en un contexto causal, buscando identificar los patrones y procesos históricos (ej. vicarianza y dispersión) y demográficos (ej. patrones de flujo génico y cuellos de botella poblacionales) responsables de la distribución de la variabilidad genética observada en la actualidad (Avice 2000). Esta disciplina permite probar hipótesis biogeográficas, describir la evolución del aislamiento reproductivo de unidades poblacionales, inferir los procesos que subyacen al origen, distribución y mantenimiento de la biodiversidad y realizar inferencias acerca de los cambios temporales en el ambiente físico y biótico de una población empleando los datos genéticos actuales (Avice 2000; Schaal & Olsen 2000).

La teoría de la coalescencia es el marco teórico subyacente de la filogeografía (Kingman 1982; Hudson 1990). De acuerdo con este modelo, en una población de tamaño constante, nuevos alelos aparecen continuamente por medio de mutación y otros se extinguen a lo largo de sucesivas generaciones (asumiendo neutralidad). Por lo tanto, los alelos actuales de un gen presentes en una población son todos derivados de (o coalescen a) un único alelo ancestral común que existió en algún punto en el pasado. La teoría de la coalescencia provee un marco para el estudio de los efectos de los procesos a nivel poblacional, como ser las fluctuaciones en el tamaño poblacional y el flujo génico. La aplicación de esta teoría a datos de secuencias de ADN hace posible trazar la historia compartida por los genes en el pasado, al tiempo en que dichos genes se unen y alcanzan un ancestro común (Emerson *et al.* 2001). La teoría de la coalescencia permite realizar diferentes predicciones, las cuales pueden resumirse en cinco (Posada & Crandall 2001):

- Los alelos más antiguos (aquellos con elevada frecuencia en la población) tienen una mayor probabilidad de ser haplotipos internos (aquellos haplotipos que tienen más de una conexión mutacional), que los alelos más jóvenes.

- En general, los alelos más antiguos tendrán una distribución geográfica más amplia.
- Los haplotipos con mayor frecuencia tenderán a tener más conexiones mutacionales.
- Las mutaciones presentes en un solo individuo (*singletons*) tienen una mayor probabilidad de conectarse a mutaciones presentes en más de un individuo, que a otras mutaciones presentes en un solo individuo.
- Las mutaciones presentes en un solo individuo tienen una mayor probabilidad de estar conectados a haplotipos de la misma población que a haplotipos de poblaciones diferentes.

#### **MARCADORES MOLECULARES EMPLEADOS EN LOS ESTUDIOS FILOGEOGRÁFICOS EN PLANTAS**

Las regiones de ADN no codificante pueden acumular cambios mutacionales de manera neutral de modo tal que únicamente la deriva génica influye en los niveles de polimorfismo en una población (Parker *et al.* 1998), motivo por el cual se las prefiere para llevar a cabo estudios filogeográficos.

Mientras que el empleo de la variación en el ADN mitocondrial (ADNmt) ha sido exitoso en estudios filogeográficos en animales, en las plantas el ADNmt no es lo suficientemente variable como para llevar a cabo análisis intraespecíficos. Actualmente, el marcador molecular más empleado en plantas es el ADNcp. En la mayoría de las angiospermas el ADNcp es heredado por vía materna, este hecho puede limitar el flujo génico interpoblacional, contribuyendo a mantener la estructura genética establecida durante la supervivencia en refugios y/o la colonización de nuevos hábitats. Por lo tanto, junto con su baja tasa mutacional, es probable que el ADNcp retenga estructuras históricas, como rutas de migración pasadas o dinámicas de colonización, por largos períodos de tiempo, a diferencia de los marcadores nucleares los cuales son heredados biparentalmente (Petit *et al.* 1993; Comes & Kadereit 1998).

Por otra parte, los marcadores basados en ADN nuclear (ADNn) han permitido detectar elevados niveles de variabilidad genética, lo cual permite reflejar una historia

más reciente (ej. Magri *et al.* 2006; Eidesen *et al.* 2007). Por lo tanto, para una mejor comprensión de la historia poblacional de un organismo, es necesario llevar a cabo análisis conjuntos con marcadores genéticos independientes (Ballard & Whitlock 2004). La combinación de secuencias de ADNcp con marcadores nucleares, permite analizar procesos demográficos en diferentes escalas de tiempo, debido a los diferentes modos de herencia, el tamaño poblacional efectivo y las tasas de mutación (Hewitt 2001).

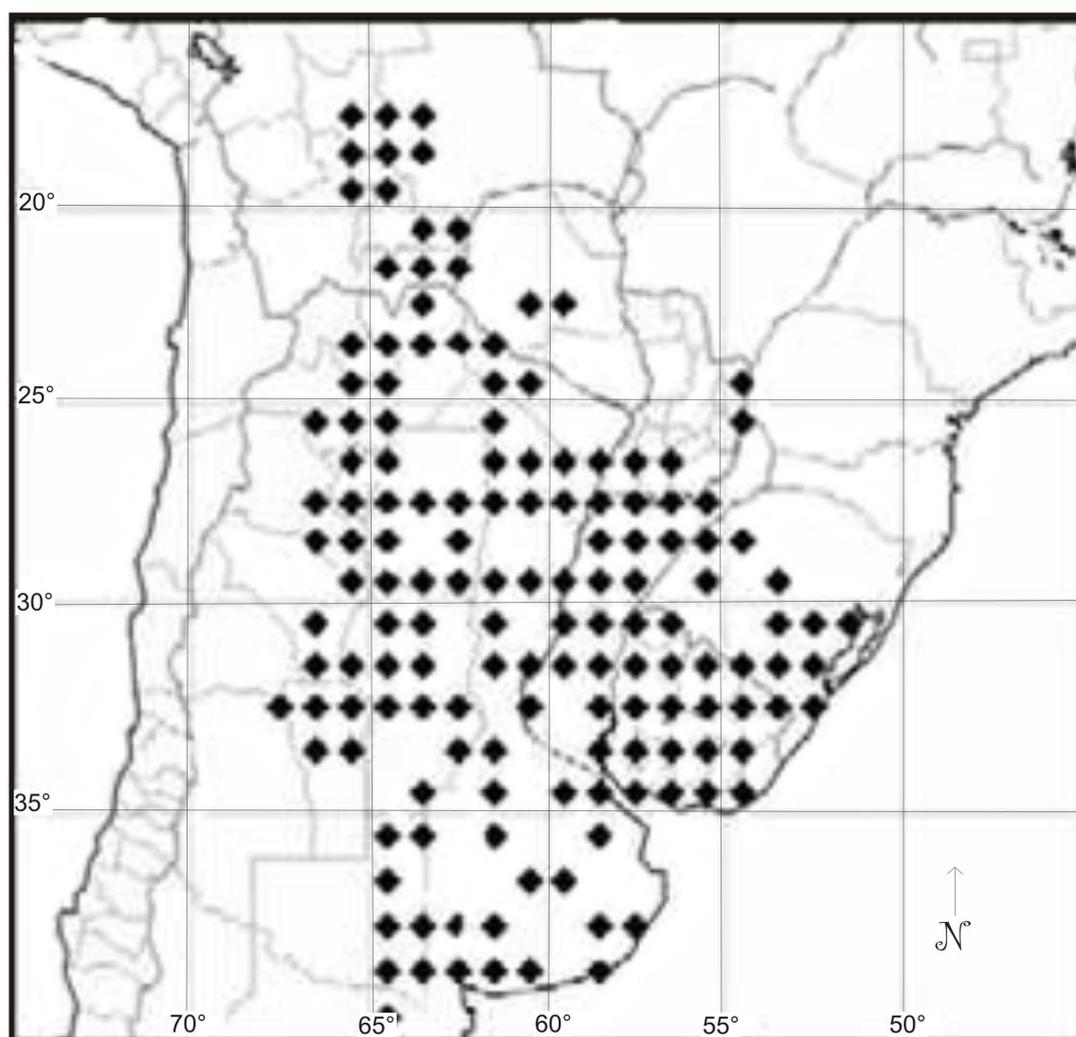
**EL COMPLEJO *TURNERA SIDOIDES* (PASSIFLORACEAE)**

La familia Turneraceae (Urban 1883) comprende aproximadamente 200 especies distribuidas en diez géneros (Arbo 2007; Arbo & Espert 2009) entre los cuales se encuentra el género *Turnera* L. con cerca de 140 especies, distribuidas en América tropical y África. En un estudio molecular basado en secuencias *rbcL* (Chase *et al.* 2002) *Turnera* resultó grupo hermano de *Malesherbia* Ruíz & Pavón, quedando ambos géneros incluidos en un mismo clado junto a tres géneros de Passifloraceae, formando así el “Clado Passifloraceae”. Basados en estos resultados y en otros estudios (Davis & Chase 2004; Korotkova *et al.* 2009; Wurdack & Davis 2009), se propuso una circunscripción más amplia de Passifloraceae, con la inclusión de Turneraceae y Malesherbiaceae (APG III 2009).

El género *Turnera* es el más numeroso y el más avanzado de la familia *Turneraceae* en muchos aspectos. En América se distribuyen desde el sur de los Estados Unidos hasta el centro - sur de la Argentina, algunas especies se han extendido como plantas ruderales a Asia y Oceanía. Las especies de este género se agrupan en 9 series: *Annulares*, *Anomalae*, *Capitatae*, *Leiocarphae*, *Microphyllae*, *Papilliferae*, *Salicifoliae*, *Stenodictyae* y *Turnera* (= *Canaligeriae*). Las mismas se diferencian por caracteres bien marcados como la estructura floral, el desarrollo y grado de adnación del pedúnculo floral, el epicarpo y varios rasgos de la semilla como la forma, la ornamentación, la pubescencia y el desarrollo de la chalaza (Urban 1883).

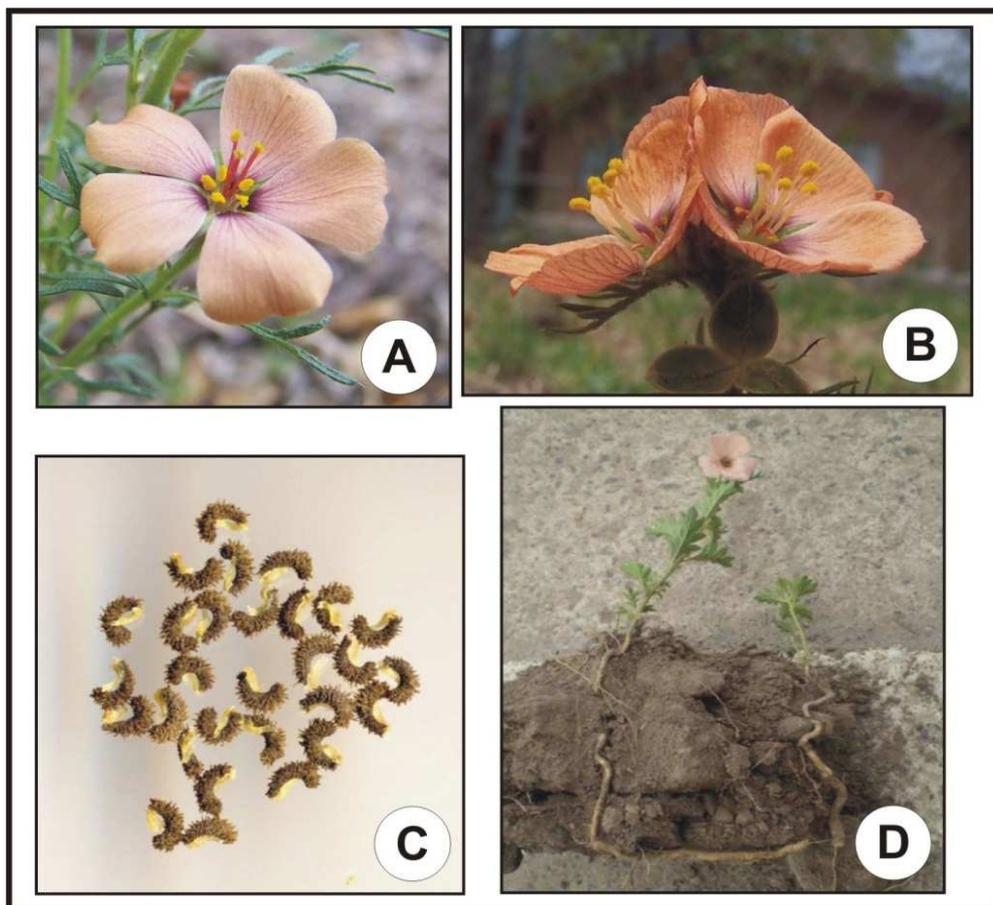
*Turnera sidoides* pertenece a la serie *Leiocarphae*, aunque presenta algunos caracteres diferentes de los que distinguen a la serie tales como las hojas sin nectarios, el fruto rugoso, las semillas crestadas y el pedúnculo floral generalmente libre en las flores basales (Arbo 2008). La semilla crestada es única en la familia, desde un punto de vista morfológico y ontogenético (González 2000). Es la única especie del género que alcanza los 39°S y es la única de la serie con una distribución tan amplia. Se extiende desde el sur de Bolivia, Paraguay y Brasil, por todo Uruguay hasta el sur de la región Pampeana en Argentina (Fig. 1). Los límites conocidos de su distribución son: al NW, el Cerro Punata, situado al N de Cochabamba, 17°33'S 65°50'W; al NE, Paraguay, Alto Paraná, Reserva Tati Yupi, 24°22'S 54°35'W; al E, el Cerro da Gloria, Porto Alegre (Brasil), 30°04'S 51°12'W; al W, Divisadero, San Luis, 32°24'S 67°15'W; al S, 50 km

al S de Rio Colorado, provincia de Rio Negro, aprox. 39°23'S 64°11'W. Por su vasta distribución, que abarca varias provincias fitogeográficas, crece en una variedad de ambientes y climas, desde la alta montaña, hasta el nivel del mar, tanto en bosques abiertos como en pastizales (Arbo 1985, 2008; Solís Neffa 2000, 2010; Solís Neffa *et al.* 2004).



**Figura 1.** Mapa de distribución del complejo *Turnera sidoides* (modificado de Arbo 2008).

*Turnera sidoides* (Fig. 2) es un complejo de hierbas rizomatozas, perennes. Crece en poblaciones discretas, constituidas por decenas hasta centenas de individuos, que pueden estar separadas por pocos o cientos de kilómetros (Solís Neffa 2000). Es una especie alógama ya que es distila (Arbo 1985) y además, posee un sistema de autoincompatibilidad que actuaría previniendo las polinizaciones ilegítimas. La polinización es llevada a cabo por mariposas, pequeñas avispas y abejas. Las semillas no presentan adaptaciones para la dispersión a grandes distancias y son diseminadas por gravedad y mirmecocoría (Fig. 2 C). Este tipo de dispersión tiende a concentrar las semillas en áreas localizadas favoreciendo el establecimiento de colonias de plantas (Solís Neffa 2000).



**Figura 2.** *Turnera sidoides*. **A.** Flor longistila. **B.** Flores brevistilas y fruto abierto. **C.** Semillas. **D.** Planta donde es posible observar el rizoma.

Arbo (1985) reconoció cinco subespecies morfológicas en *T. sidoides*, las mismas se distinguen por el grado de incisión de la lámina foliar, el indumento foliar y el color de las flores. Las poblaciones con fenotipo similar tienden a estar codistribuidas y han sido agrupadas en morfotipos (Solís Neffa 2010). Las subespecies difieren en su distribución geográfica, aunque en determinadas regiones las áreas se superponen parcialmente (Solís Neffa 2000). En algunas de las zonas de contacto se encontraron poblaciones simpátricas que coexisten sin perder su identidad, mientras que en otras se observaron poblaciones cuyos individuos presentan caracteres intermedios entre las subespecies (Solís Neffa 2000; Solís Neffa *et al.* 2008).

Estudios citogenéticos han demostrado la ocurrencia de diferentes niveles de ploidía en todas las subespecies, con un número básico de  $x = 7$ , encontrándose desde diploides ( $2n = 2x = 14$ ) hasta octoploides ( $2n = 8x = 56$ ) (Fernández 1987; Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa & Seijo 2003; Solís Neffa *et al.* 2004; Roggero Luque 2010; Elías *et al.* 2011; Kovalsky & Solís Neffa 2012). Los estudios citogenéticos aportaron evidencias del origen autoploiploide de los poliploides (Fernández 1987; Solís Neffa 2000), las que fueron sustentadas por los resultados del análisis del efecto de la poliploidía en algunos caracteres morfológicos, citológicos, isoenzimáticos y bioquímicos (Solís Neffa 2000; Solís Neffa & Fernández 2002; Solís Neffa *et al.* 2003).

Considerando al complejo como un todo, los citotipos diploide y hexaploide ( $2n = 6x = 42$ ) poseen actualmente áreas geográficas restringidas y disyuntas de modo que no existe flujo génico entre las poblaciones con el mismo nivel de ploidía. Los tetraploides ( $2n = 4x = 28$ ) poseen una amplia distribución, mientras que los octoploides ( $2n = 8x = 56$ ) y los citotipos impares son raros (Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa *et al.* 2004; Roggero Luque 2010; Elías *et al.* 2011). Teniendo en cuenta esta distribución de los citotipos y considerando el criterio de Stebbins (1971) se ha propuesto que la especie constituiría un complejo poliploide maduro (Solís Neffa & Fernández 2001). En un análisis de híbridos artificiales se demostró que las barreras reproductivas se encuentran mejor establecidas a nivel diploide que a nivel poliploide (Solís Neffa 2000).

***Turnera sidoides* subsp. *carnea* (Cambess.) Arbo (Fig. 3)**

Esta subespecie se caracteriza por presentar pelos simples curvado-antrorsos gruesos y pelos simples cortos, e indumento laxo. Posee hojas herbáceas y es muy variable morfológicamente.

Ocurre principalmente en el noreste de Argentina y Uruguay, con algunas poblaciones en el sur de Paraguay y Brasil. En Paraguay crece en campos y lomadas de suelo arenoso-gredoso, hasta los 265 m de altitud. Se adapta a lugares modificados como bordes de caminos. Florece y fructifica de septiembre a febrero (Arbo 2008).

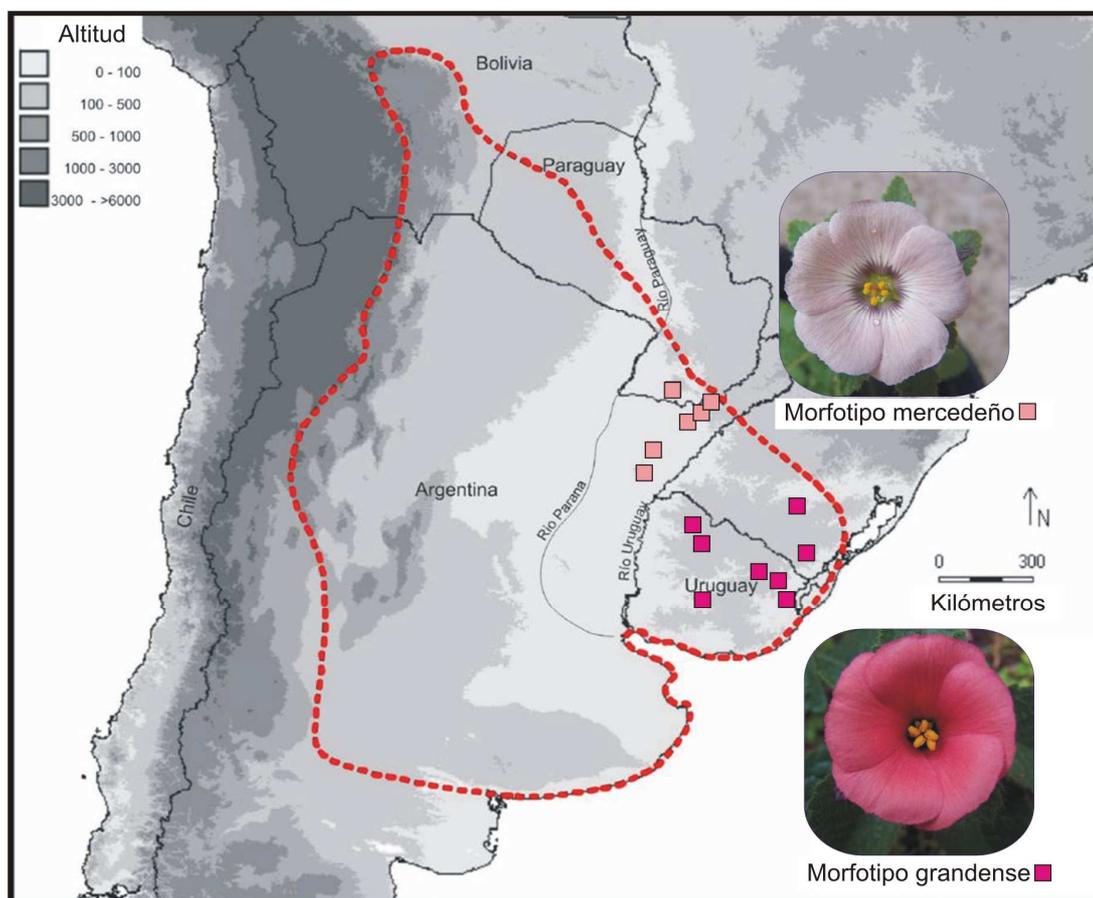
A partir del análisis de la variación morfológica, se detectaron dos morfotipos diferenciados por el color de las flores y su distribución geográfica (Fig. 3). El morfotipo grandense posee flores de color rosado oscuro y hojas membranosas. Se extiende al norte en los campos, en Uruguay y sur de Brasil, y crece en rocas lateríticas. El morfotipo mercedeno posee flores de color rosado claro y hojas más coriáceas y se encuentra en las provincias de Corrientes y Misiones, en la Mesopotamia argentina (Mola Moringa *et al.* 2011).

Presentan citotipos diploide, tetraploide y hexaploide (Fernández 1987; Solís Neffa & Fernández 2001; Speranza *et al.* 2007; Roggero Luque 2010; Kovalsky & Solís Neffa 2012). En el morfotipo mercedeno también se detectaron triploides ( $2n= 3x= 21$ , Kovalsky & Solís Neffa 2012).

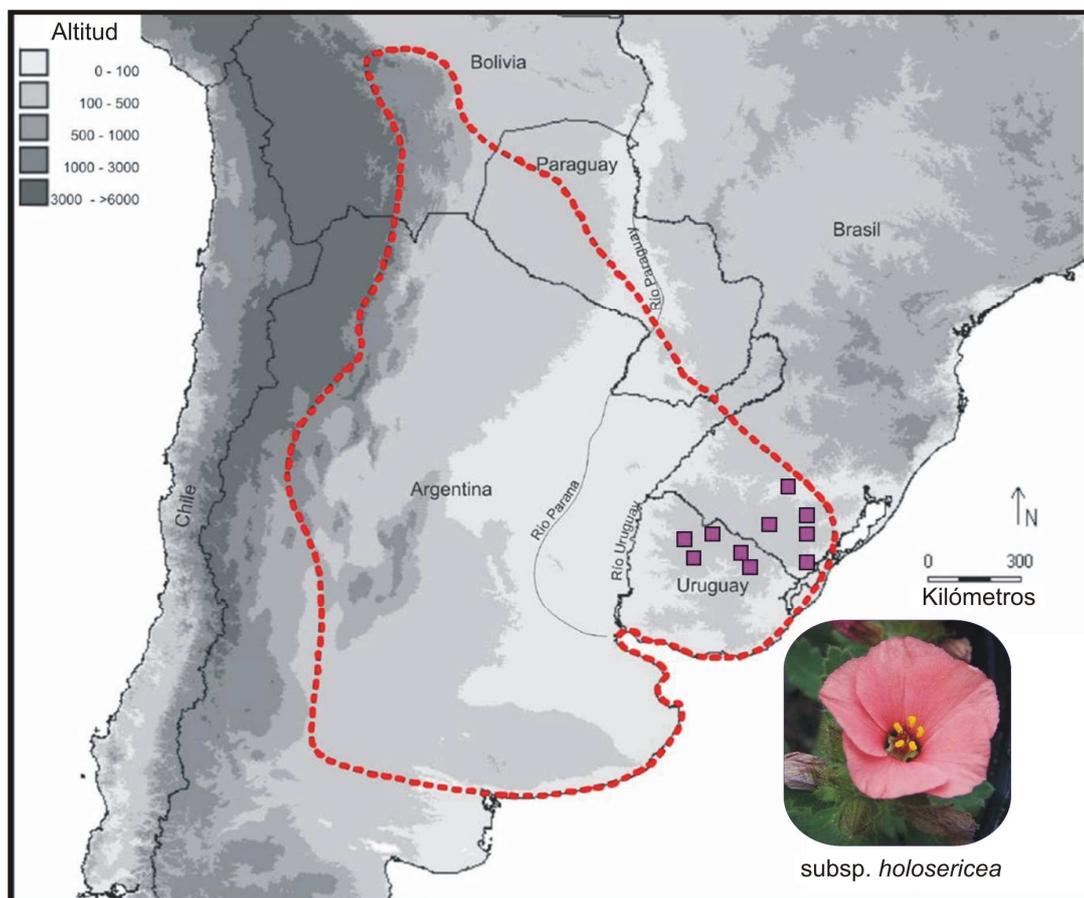
***Turnera sidoides* subsp. *holosericea* (Urb.) Arbo (Fig. 4)**

Posee pelos simples y crespos muy abundantes. Posee hojas lanoso-seríceas, indumento amarillo-rojizo, a veces glauco. Corola color rosado intenso o rojiza, base vellosa con mácula purpúrea, a veces con venas purpúreas. Ocupa un área restringida en el sur de Rio Grande do Sul, en Brasil, y noreste de Uruguay. Vive en serranías, en terreno pedregoso, la elevación máxima registrada es de 262 m (Arbo 2008).

Presenta citotipos diploide, tetraploide, pentaploide ( $2n= 5x= 35$ ) y hexaploide (Fernández 1987; Solís Neffa & Fernández 2001; Speranza *et al.* 2007; Roggero Luque 2010; Kovalsky & Solís Neffa 2012).



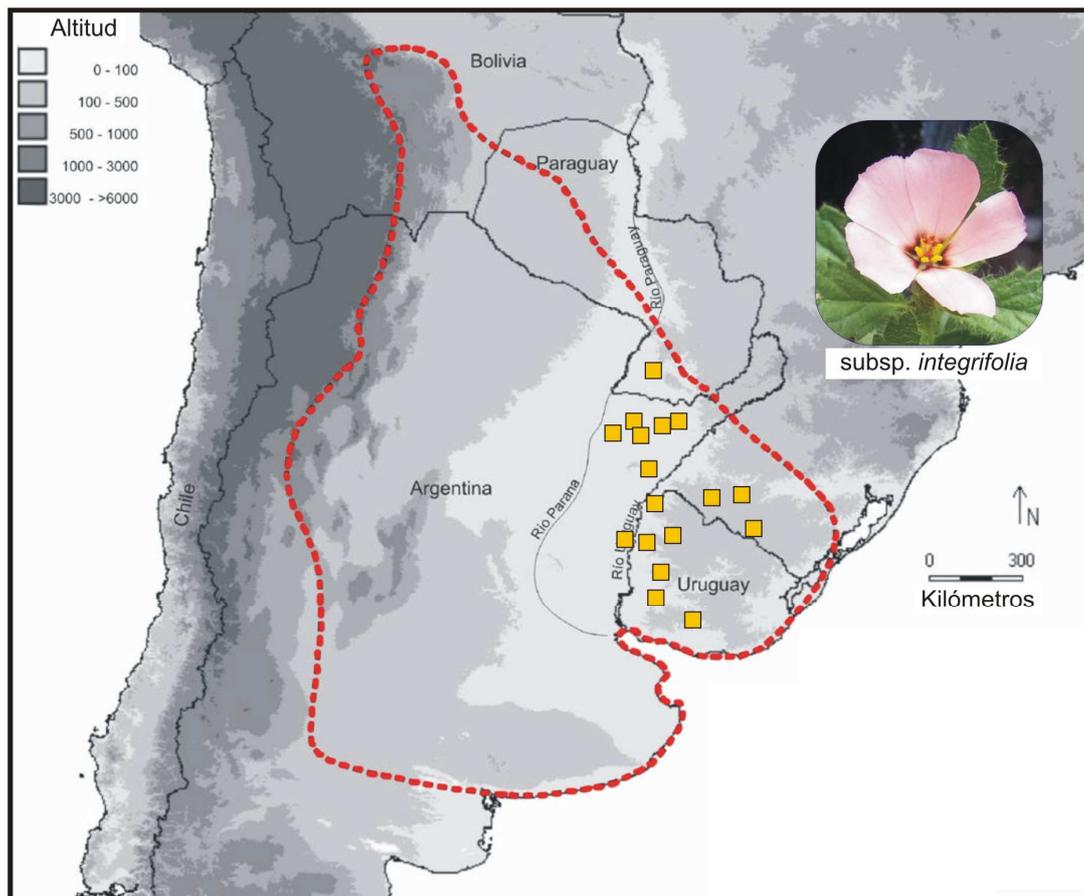
**Figura 3.** Área de distribución de *Turnera sidoides* subsp. *carnea*. La línea de puntos indica el rango de distribución del complejo. Los símbolos de color rosado claro representan al morfotipo mercedeño y los de color rosado oscuro al morfotipo grandense.



**Figura 4.** Área de distribución de *Turnera sidoides* subsp. *holosericea*. La línea de puntos indica el rango de distribución del complejo. Los símbolos de color violeta representan la distribución geográfica de las poblaciones de esta subespecie.

***Turnera sidoides* subsp. *integrifolia* (Griseb.) Arbo (Fig. 5)**

Se caracteriza por presentar hojas obovadas con márgenes serrados, envés arenáceo, a veces casi glabro, con pelos largos especialmente sobre las venas, e indumento hirsuto. Flores rosadas, salmón, lila o fucsia. Presenta una serie poliploide desde diploide hasta octoploide ( $2n=8x=56$ ). Habita en el sur de Paraguay, Brasil (Rio Grande do Sul), Argentina (Corrientes y Entre Ríos) y Uruguay. Vegeta en praderas y campos altos con *Butia yatay* o isletas de bosque higrófilo, en tierra colorada, suelo arenoso o pedregoso. La altitud máxima registrada es de 217 m. Se adapta a lugares modificados como bordes de caminos y céspedes urbanos. Florece desde septiembre a mayo. Nombre vulgar: «lamacelita» (Pedersen 17) (Arbo 2008).



**Figura 5.** Área de distribución de *Turnera sidoides* subsp. *integrifolia*. La línea de puntos indica el rango de distribución del complejo. Los símbolos de color amarillo representan la distribución geográfica de las poblaciones de esta subespecie.

***Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Juss. ex Poir.) Arbo** (Fig. 6)

Se distingue del resto de las subespecies por poseer la lámina pinnatifida a pinnatisecta; la corola amarilla, rosa pálido, salmón, rosado-lila o anaranjado-rojiza. Es la subespecie más variable en cuanto a morfología y ecología, con una amplia distribución geográfica, extendiéndose desde el sur de Bolivia (Cochabamba), Chaco paraguayo, Argentina (hasta el norte de la Patagonia) y Uruguay, desde 15 m.s.m. a 2800 m.s.m. de altitud. Crece en el chaco serrano, en el bosque chaqueño, en laderas y en campos, en suelos arcillosos, arenosos o pedregosos. Se adapta a lugares modificados. Nombres vulgares: Argentina: «amapolita», «yerba del ciervo» (*Hunziker 20784, Schikendantz 140*), «malvita crespá» (*Bordón s.n.*); Bolivia: «verbenita» (*Teran BM109*) (Arbo 2008).

A partir de la evaluación detallada de la variación morfológica de *T. sidoides* subsp. *pinnatifida*) se describieron cinco morfotipos que se diferencian en el color de las flores, el grado de incisión de la lámina foliar y su distribución geográfica (Solís Neffa 2010):

**Morfotipo andino:** Posee flores amarillas y hojas pinnatifidas angostas. Se encuentra en el sur de Bolivia y noroeste de Argentina. Se distribuye en el bosque pedemontano subandino, en los valles y quebradas limitados por la Cordillera Oriental y las Sierras Subandinas, y en los pastizales de altura, desde los 591 m.s.m. hasta los 2.638 m.s.m.

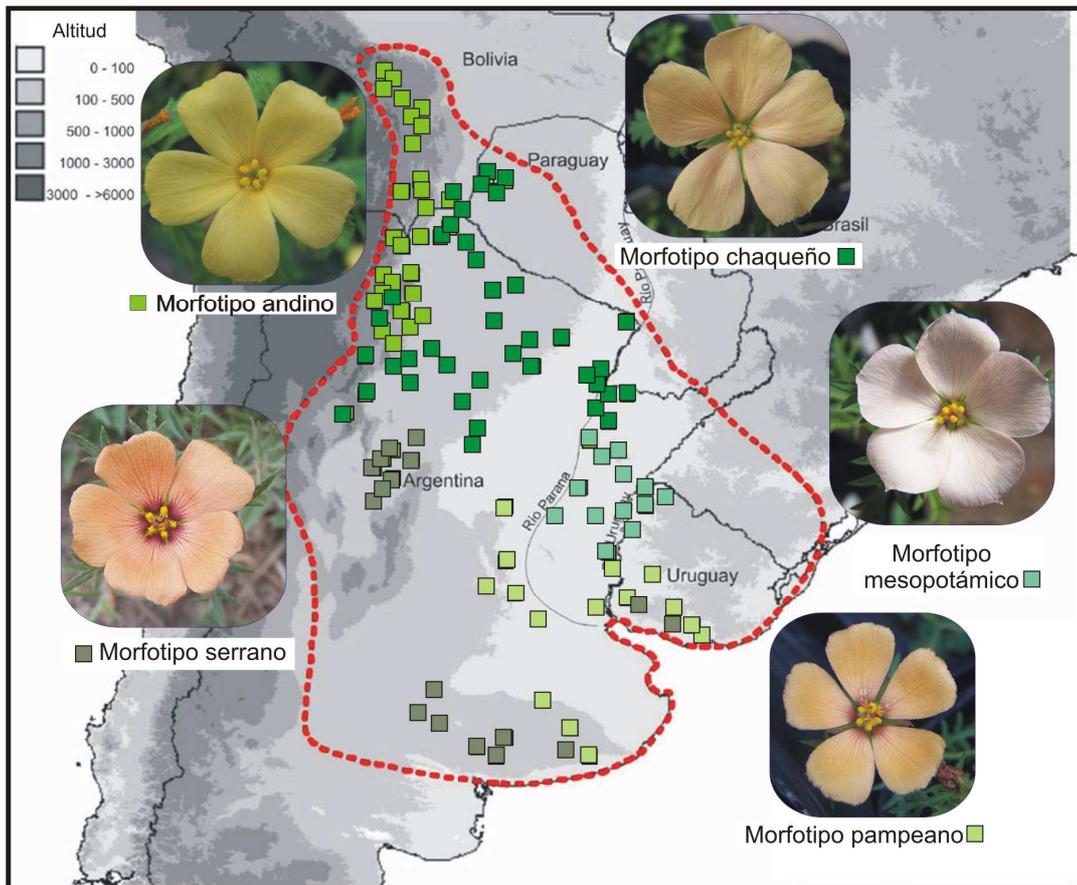
**Morfotipo chaqueño:** crece en bosques de quebracho de la Planicie Chaqueña. Posee hojas pinnatifidas anchas y flores de color salmón. Al norte del río Pilcomayo se encontró una gran diversidad de colores de flores en diferentes poblaciones. Estas poblaciones ocurren en parches del bosque Chaqueño, separadas por pequeñas sierras que cubren las áreas más altas y medias de los paleocauces del río Pilcomayo. A pesar de la variación en el color de las flores, todas las poblaciones tienen similar grado de incisión de la lámina foliar y preferencias ecológicas lo que justifica su tratamiento como el mismo morfotipo (Solís Neffa com. pers.).

**Morfotipo mesopotámico:** sólo conocido en el límite noreste de la subespecie, se caracteriza por poseer hojas pinnatipartidas y flores rosado claras.

***Morfotipo pampeano:*** restringido a la planicie Pampeana. Tiene hojas pinnatifidas y flores salmón-anaranjado.

***Morfotipo serrano:*** común en sitios rocosos de las Sierras Pampeanas y los sistemas de Ventania y Tandilia. Es fácilmente reconocible por sus hojas pinnatisectas y flores de color salmón.

En *T. sidoides* subsp. *pinnatifida* se detectaron citotipos diploide, tetraploide, triploide y hexaploide (Fernández 1987; Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa *et al.* 2004; Elías *et al.* 2011).

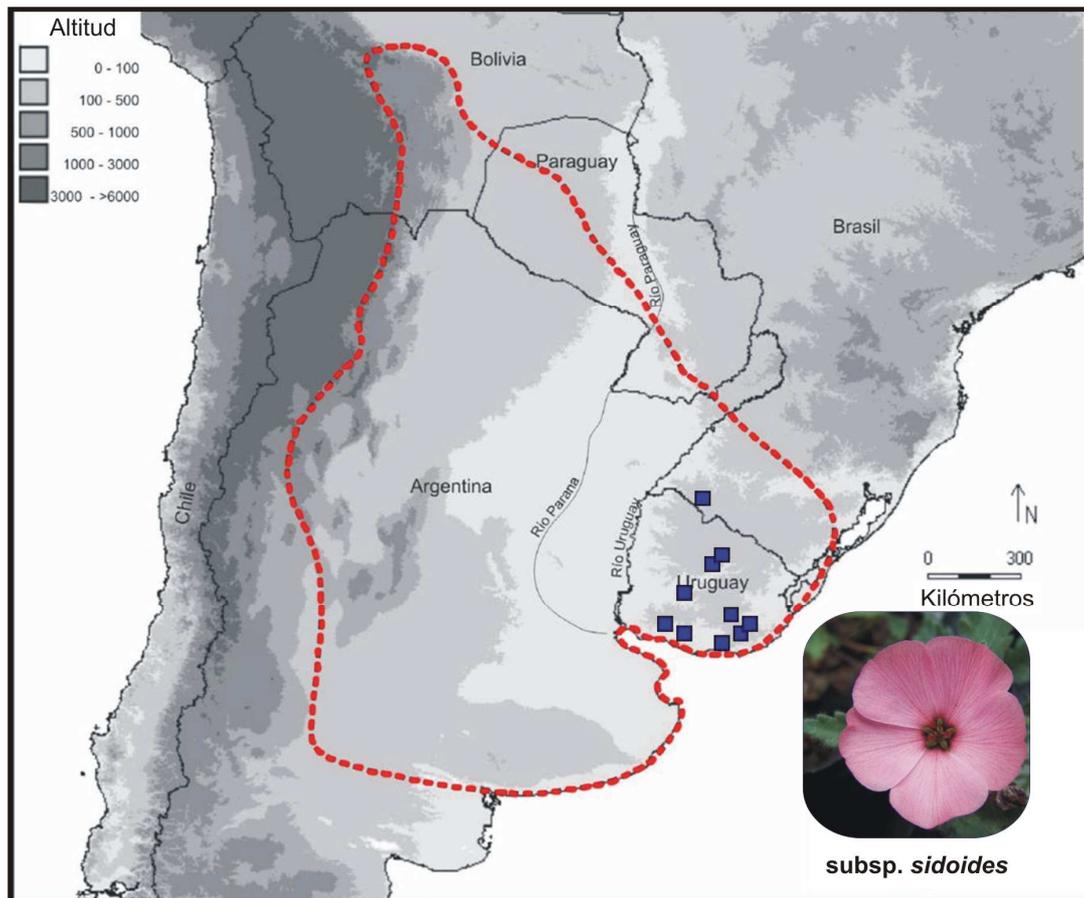


**Figura 6.** Área de distribución de *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida*. La línea de puntos indica el rango de distribución del complejo. Los símbolos de distintos tonos de color verde representan la distribución geográfica de los distintos morfotipos de esta subespecie.

***Turnera sidoides* L. subsp. *sidoides*** (Fig. 7)

Presenta pelos estrellados y flores de color salmón oscuro o rosadas. Crece en un estrecho rango de hábitats. Se encuentra principalmente en las colinas rocosas del sur de la Cuchilla Grande, y algunas poblaciones en el noreste de la Cuchilla de Haedo, al sur y centro de Uruguay. Es exclusiva de Uruguay y Rio Grande do Sul (Brasil), donde vive en campos y laderas de cerros, entre 54 y 225m de altitud (Arbo 2008).

Todas las poblaciones analizadas hasta el momento son tetraploides, excepto un posible pentaploide ( $2n=5x=35$ ) encontrado en el sur de Brasil (Fernández 1987; Solís Neffa & Fernández 2001; Speranza *et al.* 2007).



**Figura 7.** Área de distribución de *Turnera sidoides* subsp. *sidoides*. La línea de puntos indica el rango de distribución del complejo. Los símbolos de color azul representan la distribución geográfica de las poblaciones de esta subespecie.

**DESCRIPCIÓN DEL ÁREA GEOGRÁFICA DEL COMPLEJO *TURNERA SIDOIDES***

El área de distribución de *Turnera sidoides* abarca las siguientes provincias fitogeográficas pertenecientes al Dominio Chaqueño: Chaqueña, del Espinal y Pampeana, así como parte de la provincia Paranense perteneciente al Dominio Amazónico propuesto por Cabrera (1971) y Cabrera & Willink (1973). Su área de distribución comprende la llanura Chaco-Pampeana que se encuentra rodeada por cadenas montañosas conocidas localmente como sierras y cuchillas. Al oeste su límite es un arco formado, de norte a sur, por el Piedemonte Andino y las Sierras Subandinas, las Sierras Pampeanas y el Sistema de Mahuidas. Al sur el área alcanza las Sierras de Ventania y Tandilia, aproximadamente hasta los 39 °S. Al este limita con la Cuchilla Grande y el Planalto al sur de Brasil. El límite norte incluye, hacia el este, la porción occidental del Planalto a los 30 °S y, hacia el oeste, el área se extiende hacia el sur de Paraguay y Bolivia, hasta los 20 °S.

La llanura Chaco-Pampeana es una cuenca sedimentaria rellena por sedimentos Cuaternarios, aunque hacia el este del río Uruguay los sedimentos son de origen desde Devónicos hasta Holocénicos, y están depositados entre y sobre el Escudo Brasileiro. El paisaje resultante es conocido en Brasil y Uruguay como Campos. La parte austral del Escudo Brasileiro se hunde hacia el oeste bajo las planicies de Argentina, las cuales son conocidas como Pampa y Chaco.

La planicie Chaco-Pampeana, presenta en la actualidad un clima subtropical, el cual varía de húmedo en el este a árido en el oeste y suroeste; condiciones húmedas subtropicales prevalecen en el extremo noreste de la región. Los patrones climáticos resultan principalmente de la influencia del océano. El Anticiclón del Atlántico Sur introduce vientos cálidos y húmedos desde el norte y el noreste, mientras que el Anticiclón del Pacífico Sur introduce masas de aire frías y secas desde el sur (Iriondo & García 1993).

Dentro del Dominio Amazónico, la Provincia Paranense abarca el sur de Brasil, al oeste de la Serra do Mar, hasta el centro de Rio Grande do Sul, la provincia de Misiones y el nordeste de Corrientes en Argentina, y se continúa por el este de Paraguay. Al sudoeste limita con el Dominio Chaqueño formando un amplio ecotono

donde se mezclan y alternan selvas higrófilas, bosques xerófilos, sabanas, esteros, lagunas, etc. Las selvas marginales se extienden hacia el sur formando angostas galerías a lo largo de los ríos Paraná y Uruguay. También siguen los cursos de los ríos de Formosa, Chaco, Santa Fe, Corrientes y Entre Ríos. El terreno es montañoso, con serranías de poca altura que van elevándose hacia el este. Los suelos son lateríticos, rojos, ácidos, formados por partículas finas. El clima es cálido y húmedo, con precipitaciones durante todo el año. La temperatura media anual varía entre los 20 y 21 °C, siendo los inviernos suaves y los veranos no excesivamente cálidos debido a las frecuentes lluvias. En general las laderas de los cerros suelen estar libres de heladas, que son más frecuentes en el fondo de los valles. El tipo de vegetación predominante es la selva subtropical, sobre el Planalto se hallan bosques de *Araucaria* y sabanas serranas; en las zonas más bajas también hay sabanas, algunas edáficas y otras inducidas por el hombre. En esta Provincia es posible diferenciar tres Distritos, dentro de los cuales se encuentra el Distrito de los Campos, el cual forma parte del área de distribución de *Turnera sidoides*. Este Distrito se extiende por el sur de Misiones y el nordeste de Corrientes. Está caracterizado por sabanas de gramíneas, alternando con matorrales o bosquecillos. Estas sabanas se hacen más extensas en el extremo sur, formando un ecotono con el Dominio Chaqueño. La vegetación de esta Provincia se encuentra muy alterada por la acción del hombre (Cabrera & Willink 1973).

El Dominio Chaqueño ocupa un área disyunta, la Provincia de la Caatinga se extiende por el nordeste de Brasil, mientras que las restantes Provincias ocupan la mayor parte de Argentina al este de los Andes, el sur de Bolivia, oeste y centro de Paraguay y una estrecha faja del Estado de Mato Grosso en Brasil y todo Uruguay. El clima es variado, con predominancia del tipo continental, con lluvias entre moderadas y escasas, inviernos suaves y veranos cálidos. En general predomina la vegetación xerófila. Sólo junto a los ríos o lagunas aparecen las formas higrófilas (Cabrera & Willink 1973). Desde un punto de vista evolutivo, el Dominio Chaqueño puede ser considerado como un ambiente secundario, evolucionado a partir de la interacción de los dos polos neotropicales: Patagonia y Amazonia. Considerando que los patrones climáticos y genealógicos actuales de Sudamérica se establecieron en el Mioceno (y consecuentemente los Dominios Patagónico y Amazónico), se puede postular una edad pliocena para la identidad biogeográfica del Chaco (Iriando 1992).

La Provincia Chaqueña abarca el sur de Bolivia, el oeste de Paraguay y el norte de Argentina, desde Formosa, Chaco, este de Salta, de Jujuy, de Tucumán, de Catamarca y de La Rioja, todo Santiago del Estero, norte de San Luis, de Córdoba y de Santa Fe, y noroeste de Corrientes. Al sur limita con la provincia Pampeana, al norte con la Planicie Amazónica, al oeste con las Sierras Subandinas, y al este con la Mesopotamia argentina y el Planalto brasileño. Comprende llanuras y serranías de poca elevación. El clima varía de tropical semiárido en el oeste (Chaco Seco u Occidental) a tropical húmedo en el este (Chaco Húmedo u Oriental); está caracterizado por un intercambio permanente de masas de aire tropical y austral. Las lluvias son intensas, existe una estación húmeda que comienza en octubre y finaliza en marzo; los inviernos son secos. Las amplitudes diurnas son grandes en el oeste; las condiciones son más suaves en el este, debido a la mayor humedad relativa del aire. El tipo de vegetación predominante es el bosque xerófilo caducifolio, con un estrato herbáceo de gramíneas y numerosas cactáceas y bromeliáceas; también hay palmares, sabanas y estepas halófilas. El Chaco Occidental está dominado por la dinámica de grandes ríos alóctonos que poseen una fuerte tendencia a la divagación lateral. La vegetación está representada por algunas especies de árboles xerófilos, cactus y matorrales. El Chaco Oriental comprende las regiones distales de los abanicos aluviales de los grandes ríos y está compuesto por áreas pantanosas atravesadas por las antiguas fajas fluviales de dichos ríos. En el Chaco Oriental los bosques tienen mayor diversidad específica. Los desbordes de los cauces de los principales ríos alóctonos provocan la formación de pantanos permanentes y temporarios, densamente cubiertos por vegetación palustre y flotante (Iriondo 1992). La Provincia Chaqueña se encuentra muy alterada por la explotación forestal, la ganadería y la agricultura. En muchas zonas han desaparecido el bosque primitivo y el estrato herbáceo, quedando sólo los arbustos espinosos, las bromeliáceas y las cactáceas (Cabrera & Willink 1973; Iriondo 1992).

La Provincia del Espinal se extiende por Argentina en forma de un arco irregular alrededor de la Provincia Pampeana, desde el centro de Corrientes y norte de Entre Ríos, por el centro de Santa Fe y de Córdoba, gran parte de San Luis, centro de La Pampa, hasta el sur de Buenos Aires. Está cubierta por llanuras, serranías bajas y medanales. Su clima es cálido y húmedo en la porción norte, y templado y seco en la parte oeste. Domina el tipo de vegetación de bosque xerófilo, parecido a la Provincia

Chaqueña, pero más bajo. Además hay palmares, sabanas de gramíneas, estepas, etc. (Cabrera & Willink 1973).

La Provincia Pampeana ocupa las llanuras del este de Argentina entre los 31 ° y 39 °S, cubriendo el sur de Entre Ríos, Santa Fe y Córdoba, casi toda Buenos Aires y el este de La Pampa, todo Uruguay y la mitad austral de Rio Grande do Sul, en Brasil. Al norte, oeste y sur limita con la Provincia del Espinal, y al este y sudeste con el Océano Atlántico. Comprende llanuras horizontales o muy poco onduladas, con algunas serranías de poca altura. El clima es templado cálido, con lluvias todo el año, que disminuyen de norte a sur, y de este a oeste. La vegetación dominante es la estepa de gramíneas, existiendo también praderas, estepas sammófilas, estepas halófilas, bosques marginales y diversos tipos de vegetación hidrófila. La mayoría de los elementos florísticos de la Provincia Pampeana pertenecen al Dominio Chaqueño y son frecuentes en los campos del Chaco y del Espinal, pero hay también especies procedentes del Dominio Andino-Patagónico o de las sabanas del Dominio Amazónico. La Provincia Pampeana constituye el territorio más adecuado para la agricultura y la ganadería de Argentina, los cultivos y los campos dedicados a la cría de vacunos cubren prácticamente toda la superficie de esta Provincia, de modo que la vegetación primitiva ha sido destruida o alterada casi en su totalidad (Cabrera & Willink 1973).

#### **CAMBIOS CLIMÁTICOS Y GEOLÓGICOS OCURRIDOS EN EL DOMINIO FITOGEOGRÁFICO CHAQUEÑO DURANTE EL CUATERNARIO**

En todo el Chaco existen evidencias geomorfológicas y sedimentológicas de épocas más secas que la actual, durante las cuales la acción del viento fue dominante. De acuerdo con los datos estratigráficos obtenidos, se han podido identificar dos períodos secos, en los últimos miles de años, uno de ellos ocurrido durante el Pleistoceno final, seguramente vinculado con el Último Máximo Glacial (UMG), y el otro durante el Holoceno Superior, más corto y menos severo. En cada uno de ellos se formaron dos sistemas de circulación de vientos, uno al sur y el otro al noroeste, paralelo a las Sierras Subandinas. Los vientos fuertes y secos de este último movilizaron

la arena y el limo proveniente del interior de la planicie amazónica (Iriondo 1992, 1995).

El cambio climático fue el resultado principalmente de los cambios en la influencia de los dos anticiclones oceánicos semipermanentes, y de la ocurrencia de anticiclones de bloque de segundo orden sobre las planicies. Dichos cambios habrían producido modificaciones en los límites de las provincias climáticas en la planicie Chaco-Pampeana (Iriondo & García 1993). El análisis de los depósitos eólicos y sedimentarios, de los suelos fósiles y de los accidentes geográficos, así como la información biogeográfica y las fuentes arqueológicas, permitieron llevar a cabo la reconstrucción del paleoclima de esta región (Iriondo & García 1993).

Las fases más secas y frías del Cuaternario propiciaron una predominancia de paisajes de “monte”, con cactáceas, y de estepa similares a la del norte patagónico, en detrimento de los paisajes de las praderas húmedas. El paisaje de “monte” estuvo en Rio Grande do Sul, mientras que la estepa patagónica invadió las áreas pampeanas húmedas (Ab’Sáber 1970).

#### **Período Seco Pleistoceno (18.000 a. A. P. hasta 8.500 a. A. P.)**

**Sistema Pampeano:** El campo de hielo localizado en los Andes Patagónicos durante el UMG generó un centro anticiclónico en el noroeste de la Patagonia. Este fenómeno dirigió los vientos hacia la Pampa, generando un clima seco y frío en la planicie Chaco-Pampeana. Grandes masas de limo y arena fina de origen periglacial fueron deflactadas y reposicionadas por causa de esta actividad eólica. En la mitad suroeste de la Pampa se formó un mar de arena, y en la mitad superior hacia el norte se formó una faja de loess de 300 km de ancho, alcanzando el sur del Chaco en las provincias de Santa Fe y Santiago del Estero, lo cual se puede evidenciar en las dunas longitudinales, además de la presencia de restos de mamíferos y asociaciones polínicas de tipo Patagónico encontradas en los sedimentos. Los límites de la provincia climática Patagónica se movieron hacia el NE, cubriendo por completo la planicie pampeana. Al mismo tiempo, en el noreste de Argentina, en Misiones, se encontraba una vegetación de tipo sabana (Iriondo 1992; Iriondo & García 1993).

**Sistema Noroeste:** En el oeste del Chaco un clima seco ocurrió también durante este período, con movilización y deposición de arena eólica y loess. En amplias superficies del Chaco boliviano y paraguayo aparecen campos de dunas disipadas. El campo de loess se extiende a las provincias de Salta y Chaco. Esta fase climática terminó en el Holoceno Inferior, como lo indican las evidencias faunísticas de la provincia de Buenos Aires y estudios sedimentológicos. El final de esta fase estuvo caracterizado por extinciones en masa de la megafauna del Pleistoceno, la interrupción de la sedimentación loésica y la ocupación humana de áreas antiguamente inhabitadas (Iriondo 1992; Iriondo & García 1993). Probablemente, durante este período el modelo de circulación sufrió una considerable reducción de la influencia del Anticiclón del Atlántico Sur y un correspondiente aumento en la influencia del Anticiclón del Pacífico Sur (Iriondo & García 1993).

#### **Holoceno Medio (8.500 a. A. P. hasta 3.500 a. A. P.)**

Hace aproximadamente 8.000 años se inició la retracción de las corrientes frías a su posición actual, hecho que habría sido acompañado del aumento de la humedad ambiente, la densificación de los bosques de araucarias, la expansión de los prados de altitud en sitios donde antiguamente se encontraban estepas y la tropicalización de los planaltos interiores de São Pablo y norte del estado de Paraná. Fenómenos que caracterizan a éste como un período en el que predominaron condiciones climáticas húmedas, subtropicales y tropicales, con la formación de suelos y el desarrollo de los cinturones fluviales. La evidencia de pedogénesis indica un cambio hacia condiciones tropicales en el suroeste durante el Holoceno Medio. Las evidencias biogeográficas indican la presencia de una estepa muy húmeda con elementos de bosque lluvioso en Buenos Aires (Ab'Sáber 1970; Iriondo & García 1993).

Un movimiento hacia el sur en la circulación zonal de los vientos del oeste sumado a una intensa circulación anticiclónica en todo el centro del Atlántico sur, la cual distribuyó la humedad, explicarían las condiciones antes mencionadas. En el noreste las precipitaciones incrementaron en un 100 %, mientras que la Provincia Climática del Noroeste se expandió hacia el sur y el oeste (Iriondo & García 1993).

**Período Seco del Holoceno Superior (3.500 a. A. P. hasta 1.000 a. A. P.)**

**Sistema Pampeano:** Durante el Holoceno Superior un clima seco semiárido reemplazó a las condiciones húmedas y cálidas presentes. Este cambio está relacionado con un anticiclón estacionario sobre la planicie argentina y regiones vecinas de Paraguay y Uruguay. Los vientos generados por este anticiclón provocaron la deflación de los suelos del Holoceno, depositando una fina capa de limo y arena la cual cubrió toda la región y formó campos de dunas. Dichas dunas reflejan una dirección del paleoviento en sentido contrario a las agujas del reloj.

**Sistema del Noroeste:** La arena pleistocena edafizada fue erodada y removilizada en varias regiones del noroeste de la región chaqueña, en territorio boliviano, formando dunas parabólicas.

La hipótesis más probable es que durante el Holoceno Superior el anticiclón Boliviano fue más fuerte que en la actualidad, permitiendo que el aire cálido descienda a la superficie de la planicie Chaco-Pampeana (Iriondo & García 1993).

**MODELO EVOLUTIVO PROPUESTO PARA *TURNERA SIDOIDES***

A partir de las investigaciones llevadas a cabo hasta el momento en *T. sidoides* (Solís Neffa 2000, 2007, 2010; Solís Neffa & Fernández 2001; Speranza *et al.* 2007; Elías *et al.* 2011), se ha propuesto que la diferenciación morfológica del complejo, así como la distribución actual de los citotipos, habrían estado influenciadas por los eventos geomorfológicos y climáticos del Pleistoceno-Holoceno ocurridos en Sudamérica en la región comprendida entre los 15°S y 39°S.

Los diploides habrían tenido una distribución ancestral continua a lo largo de los cordones montañosos que limitan la cuenca sedimentaria Chaco-Pampeana. Los procesos geomorfológicos y los ciclos de sequía/humedad ocurridos en la región, habrían determinado la fragmentación del área de los diploides, interrumpiendo el flujo génico y conduciendo a la diferenciación de los mismos en alopatria. Los valles y las

laderas de las montañas habrían mantenido condiciones ambientales más estables, ofreciendo refugios para la supervivencia de los diploides.

Los tetraploides se habrían originado en múltiples eventos de poliploidización, ocupando los ambientes resultantes de los pulsos de expansión/contracción de la vegetación en la llanura Chaco-Pampeana, estableciendo contactos secundarios entre morfotipos y subespecies. La condición perenne de esta especie y su capacidad de propagarse vegetativamente habrían favorecido el establecimiento de las poblaciones poliploides.

MATERIAL  
de  
ESTUDIO

*“Las cosas son semejantes: esto hace a la ciencia posible; las cosas son diferentes: esto hace a la ciencia necesaria.”*

*Levins & Lewontin*

# MATERIAL DE ESTUDIO

Se contó con material obtenido en colecciones previas, realizadas por Solís Neffa *et al.*, durante el período 1995-2008 y en nuevas colecciones realizadas en el transcurso de esta tesis, así como con material obtenido de individuos cultivados bajo condiciones homogéneas en el invernáculo del Instituto de Botánica del Nordeste (Tabla 1). Los ejemplares testigo del material analizado se encuentran incorporados al Herbario del Instituto de Botánica del Nordeste (CTES).

Se realizaron viajes de colección a las siguientes localidades:

Argentina, Corrientes, Dptos. Mercedes y Concepción.

Argentina, Córdoba, Dpto. Punilla, Capilla del Monte.

Uruguay, Dptos. Cerro Largo, Florida, Lavalleja, Maldonado y Treinta y Tres.

**Tabla 1.** Información de las poblaciones de *Turnera sidoides* analizadas. **Ncp** = Número de individuos analizados con marcadores cloroplásticos; **Nn** = número de individuos analizados con marcadores nucleares. Coleccionistas: E, Elías; H, Hosjsgaard; M, Moreno; P, Panseri; S, Seijo; SN, Solís Neffa.

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
<b><i>T. sidoides</i> subsp. <i>carnea</i> (Cambess.) Arbo</b>						
<b>Morfotipo mercedense</b>						
1	S s/n (P14)	Argentina, Corrientes, R147 entre colonia Garabí y Gobernador Virasoro	28°04'34,20"S 55°59'1,80"O	-	-	1/0
2	SN <i>et al.</i> s/n (S <sub>203</sub> )	Argentina, Corrientes, Ituzaingó	27°33'44"S 56°01'40,68"O	-	6x	1/0
3	SN & S 960 (S <sub>215</sub> )	Argentina, Corrientes, Mercedes	29°33'44"S 57°30'40"O	66	2x	3/5
4	SN <i>et al.</i> 2222 (S <sub>430</sub> )	Argentina, Corrientes, Mercedes	29°33'0,00"S 57°32'15,50"O	69	4x	1/5
5	SN <i>et al.</i> 2223 (S <sub>431</sub> )	Argentina, Corrientes, Mercedes	29°33'45,70"S 57°31'7,10"O	57	3x	1/5
6	P <i>et al.</i> 17 (Tur 1)	Argentina, Corrientes, San Martín	29°10'34"S 56°38'34"O	-	4x	1/0
7	S s/n (P11)	Argentina, Misiones, R105 entre Posadas y San José	27°41'56,01"S 55°48'0,80"O	-	-	1/0
8	SN <i>et al.</i> 986 (S <sub>208</sub> )	Argentina, Misiones, Profundidad	27°33'00"S 55°43'00"O	-	6x	2/0
9	S s/n (3.5)	Argentina, Misiones, Profundidad	27°27'33,80"S 55°49'18,10"O	-	-	1/0
<b>Morfotipo grandense</b>						
10	ICN 158608 (6_10 P1)	Brasil, RS, Cachoeira do Sul	30°17'46,90"S 52°57'56,70"O	106	4x	2/5
11	ICN 158569 (3_10 P10)	Brasil, RS, Encruzilhada do Sul	31°44'7,50"S 52°32'44,3"O	58	4x	2/5

Tabla 1 (continuación).

Nº de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
12	SN <i>et al.</i> 271 (S <sub>48</sub> )	Uruguay, Cerro Largo, Bañado de Medina	32°23'00"S 54°21'00"O	-	4x	1/0
13	SN <i>et al.</i> 278 (S <sub>49</sub> )	Uruguay, Cerro Largo, 20 km al N de Melo	32°23'08"S 54°22'08"O	-	4x	1/0
14	SN <i>et al.</i> 395 (S <sub>96</sub> )	Uruguay, Cerro Largo, Bañado de Medina	32°22'56"S 54°20'22"O	-	4x	1/0
15	SN & S 2109 (S <sub>390</sub> )	Uruguay, San José, R 23 km 129	34°20'0,00"S 56°42'0,00"O	179	-	2/0
16	SN 551 (S <sub>156</sub> )	Uruguay, Tacuarembó, R 5 km 257	32°45'9"S 56°30'57"O	101	2x	2/0
17	M <i>et al.</i> s/n (P4uru)	Uruguay, Treinta y Tres	33°9'39,20"S 54°23'6,80"O	-	-	1/5
<b><i>T. sidoides</i> subsp. <i>holosericea</i> (Urb.) Arbo</b>						
18	ICN 158603 (5_10 P11)	Brasil, RS, RS 473, desde Lavras do Sul a Sao Gabriel	30°39'40,50"S 54°05'44,20"O	315	4x	1/5
19	SN s/n (6_10 P4)	Brasil, RS, BR 290	30°07'17"S 51°51'34"O	-	4x	1/5
20	ICN 158579 (4_10 P5)	Brasil, RS, Bagé	31°18'24"S 54°01'52,60"O	254	6x	1/5
21	ICN 158594 (5_10 P6)	Brasil, RS, Caçapava do Sul	30°40'30,40"S 53°37'07"O	339	6x	2/5
22	ICN 1585555 (2_10 P1)	Brasil, RS, Camaquá	30°51'36,70"S 51°51'01,10"O	51	4x	2/0
23	ICN 158556 (3_10 P1)	Brasil, RS, Encruzilhada do Sul	30°32'22,30"S 52°30'56,90"O	390	4x	2/5
24	ICN 158568 (3_10 P9)	Brasil, RS, Pelotas	31°41'39,90"S 52°25'30,80"O	35	4x	1/5

Tabla 1 (continuación).

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
25	SN & S 2025 (S <sub>366</sub> )	Uruguay, Artigas, R 30 km 207,5	30°59'56,70``S 56°07'0,52``O	316	-	1/5
26	M <i>et al.</i> s/n (P10uru)	Uruguay, Florida	33°13'50,70``S 55°8'25,10``O	-	-	1/5
27	SN & S 2051 (S <sub>372</sub> )	Uruguay, Rivera, Cuñá Pirú	31°31'45``S 55°35'08``O	1321	6x	1/5
28	SN & S 2052 (S <sub>373</sub> )	Uruguay, Rivera, Cerro Miriñaque	31°32'15,50``S 55°38'17``O	180	4x	2/0
29	SN & S 2073 (S <sub>379</sub> )	Uruguay, Tacuarembó, R 5 y Arroyo Quebrada Grande	32°05'34``S 56°06'13``O	145	2x	2/0
30	M <i>et al.</i> s/n (P9uru)	Uruguay, Treinta y Tres	32°56'8,40``S 54°58'1,10``O	-	-	1/5
<b><i>T. sidoides</i> subsp. <i>integrifolia</i> (Griseb.) Arbo</b>						
31	SN s/n (P5)	Argentina, Corrientes, Santa Rosa, R 118 km 54	28°16'47,40``S 58°12'52,40``O	69	4x	1/0
32	SN s/n (P2)	Argentina, Corrientes, Santa Rosa, R 118 km 72	28°14'8,40``S 58°2'49,40``O	72	2x	3/5
33	SN s/n (P8)	Argentina, Corrientes, camino de Chavarría a Concepción	28°54'26,60``S 58°31'05``O	65	2x	1/0
34	SN & S 961 (S <sub>220</sub> )	Argentina, Corrientes, Monte Caseros	30°14'57,20``S 57°37'25``O	-	4x	1/0
35	SN s/n (P4)	Argentina, Corrientes, Santa Rosa, R 118 km 61	28°16'39,1``S 58°8'21,1``O	69	2x	4/5
36	SN s/n (Tabay)	Argentina, Corrientes, Tabay	28°19'4,20``S 58°16'59,50``O	75	2x	1/0
37	ICN 158583 (4_10 P9)	Brasil, RS, Rochas de Bagé	30°56'56,50``S 53°38'9,40``O	197	4x	1/5

Tabla 1 (continuación).

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
38	SN & S 2016 (S <sub>361</sub> )	Uruguay, Artigas, R 30 km 6	30°28'24``S 57°35'49``O	90	6x	1/0
39	SN & S 2141 (S <sub>403</sub> )	Uruguay, Paysandú, R 3 km 449	31°41'35,40``S 57°53'23,40``O	50	6x	1/0
40	SN & S 2040 (S <sub>368</sub> )	Uruguay, Rivera, R 30 y R 5	31°14'48``S 55°39'45``O	-	-	1/5
41	SN & S 2043 (S <sub>370</sub> )	Uruguay, Rivera, R 27 km 14	31°02'44``S 55°28'50``O	-	6x	1/0
42	M <i>et al.</i> s/n (P6uru)	Uruguay, Cerro Largo	32°41'3,50``S 54°12'35,10``O	-	-	1/5
43	M <i>et al.</i> s/n (P8uru)	Uruguay, Cerro Largo, A° Sarandí del Quebracho	32°42'51,10``S 54°37'19,30``O	-	-	2/5
44	M <i>et al.</i> s/n (P5uru)	Uruguay, Treinta y Tres	32°45'22,30``S 54°13'37,30``O	-	-	2/0
<b><i>T. sidoides</i> subsp. <i>pinnatifida</i> (Jus. Ex Poir.) Arbo</b>						
<b>Morfotipo andino</b>						
45	SN <i>et al.</i> 959 (S <sub>212</sub> )	Argentina, Jujuy, Capital, Palpalá	24°15'18``S 65°12'28``O	1104	2x	1/0
46	SN <i>et al.</i> 827 (S <sub>182</sub> )	Argentina, Jujuy, Yala	24°07'31``S 65°23'50``O	1467	2x	1/5
47	SN <i>et al.</i> 839 (S <sub>187</sub> )	Argentina, Salta, Capital, Barrio El Milagro	24°43'12``S 65°24'33``O	1246	2x	2/5
48	SN <i>et al.</i> 924 (S <sub>200</sub> )	Argentina, Salta, Metán	25°20'29,5``S 64°28'28``O	523	4x	2/0
49	SN <i>et al.</i> 1378 (S <sub>261</sub> )	Bolivia, Cochabamba, camino de Arani a Mizque	17°54'01``S 65°20'58``O	2124	2x	1/5

Tabla 1 (continuación).

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Nc p/ Nn
<b>Morfotipo chaqueño</b>						
50	SN s/n (S <sub>71</sub> )	Argentina, Catamarca, Ambato	27°51'40,09"S 65°56'44,84"O	-	4x	1/0
51	SN 306 (S <sub>32</sub> )	Argentina, Chaco, 1° de Mayo, Colonia Benítez	27°20'00"S 58°56'00"O	52	4x	6/5
52	SN 1994 (S <sub>315</sub> )	Argentina, Chaco, Las Breñas	27°05'11"S 61°05'09"S	103	4x	2/5
53	SN 496 (S <sub>86</sub> )	Argentina, Corrientes, San Cosme	27°19'00"S 58°35'00"O	50	4x	4/5
54	SN <i>et al.</i> 1986 (S <sub>311</sub> )	Argentina, Salta, Pluma de Pato	23°22'21"S 63°05'53"O	237	2x	1/5
55	SN <i>et al.</i> 1988 (S <sub>312</sub> )	Argentina, Salta, Estación Murillo (Solá)	23°28'23"S 62°53'29"O	222	2x	4/5
56	SN <i>et al.</i> 316 (S <sub>69</sub> )	Argentina, Santiago del Estero, Moreno	27°38'00"S 62°25'00"O	-	4x	1/0
57	SN <i>et al.</i> 332 (S <sub>70</sub> )	Argentina, Santiago del Estero, Guasayan	27°59'53,13"S 64°48'39,90"O	-	4x	1/0
58	SN <i>et al.</i> 1025 (S <sub>250</sub> )	Bolivia, Tarija, Gran Chaco	21°17'32"S 63°20'55"O	374	2x	4/5
59	SN <i>et al.</i> 1505 (S <sub>301</sub> )	Bolivia, Tarija, Gran Chaco	21°17'35"S 63°18'37"O	385	2x	4/0
60	SN <i>et al.</i> 1508 (S <sub>302</sub> )	Bolivia, Tarija, Gran Chaco	21°27'33"S 63°06'44"O	337	2x	1/5
61	SN <i>et al.</i> 1971 (S <sub>309</sub> )	Bolivia, Tarija, Gran Chaco	20°45'46"S 63°07'55"O	675	4x	2/0

Tabla 1 (continuación).

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
<b>Morfotipo mesopotámico</b>						
62	SN <i>et al.</i> 2140 (S <sub>415</sub> )	Argentina, Corrientes, pasando A° Batelito rumbo a Esquina	29°39'53,40"S 59°21'40,40"O	44	-	1/0
63	SN <i>et al.</i> 2141 (S <sub>223</sub> )	Argentina, Corrientes, Mercedes	29°14'7,4"S 58°07'28,6"O	80	6x	3/5
64	SN <i>et al.</i> 2138 (S <sub>314</sub> )	Argentina, Corrientes, Mercedes	29°01'37"S 58°29'15"O	-	4x	2/0
65	SN <i>et al.</i> s/n (S <sub>418</sub> )	Argentina, Corrientes, rumbo a Sauce	30°13'45,9"S 59°19'20,7"O	38	2x	2/0
66	- (S <sub>419</sub> )	Argentina, Corrientes, rumbo a Sauce	30°19'0,05"S 59°21'48,50"O	32	2x	1/0
67	SN & S 2140 (S <sub>402</sub> )	Uruguay, Paysandú, R 3 y A° Quebrada Grande	31°58'15,80"S 57°51'3,40"O	48	-	1/0
<b>Morfotipo pampeano</b>						
68	SN & S 2138 (S <sub>400</sub> )	Uruguay, Río Negro, R 24 km 44,5	32°50'38,20"S 57°57'19,20"O	43	-x	1/0
69	H 378 (S <sub>335</sub> )	Argentina, Buenos Aires, San Cayetano	38°20'00"S 59°37'00"O	98	2x	2/5
70	S s/n (S <sub>342</sub> )	Argentina, Buenos Aires, Tornquist, El Pantanoso	38°03'00"S 62°02'00"O	-	2x	1/0
<b>Morfotipo serrano</b>						
71	S 2915 (S <sub>248</sub> )	Argentina, Buenos Aires, Tornquist, Villa Arcadía	38°08'21,89"S 61°47'38,61"O	234	4x	1/0
72	E 11 (S <sub>328</sub> )	Argentina, Córdoba, La Cumbre	30°59'10,60"S 64°30'22"O	1133	4x	1/0
73	SN & S 966 (S <sub>234</sub> )	Argentina, Córdoba, Punilla, Capilla del Monte	30°51'45"S 64°30'40,7"O	1007	4x	4/0

Tabla 1 (continuación).

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
74	SN & S 967 (S <sub>235</sub> )	Argentina, Córdoba, Punilla, Capilla del Monte, C° Uritorco	30°51'57,50``S 64°29'30``O	1615	2x	4/5
75	E s/n (S <sub>319</sub> )	Argentina, Córdoba, Punilla, Capilla del Monte, base del C° Uritorco	30°51'45,10``S 64°29'42,71``O	1168	2x	3/5
76	E 6 (S <sub>326</sub> )	Argentina, Córdoba, Punilla, Capilla del Monte, C° Las Gemelas	30°53'12,30``S 64°29'52,10``O	1249	2x	1/0
77	SN 486 (S <sub>112</sub> )	Argentina, Córdoba, Carlos Paz	31°24'01,93``S 64°31'01,14``O	661	4x	1/0
78	SN & S 969 (S <sub>237</sub> )	Argentina, Córdoba, Capilla del Monte	30°50'39``S 64°28'34``O	979	4x	1/0
79	E s/n (S <sub>345</sub> )	Argentina, Córdoba, Cruz del Eje	30°44'00``S 64°48'00``O	449	6x	1/0
80	E 2 (S <sub>347</sub> )	Argentina, Córdoba, La Higuera	31°00'44,80``S 65°0,60'20,50``O	612	4x	1/0
81	E 4 (S <sub>349</sub> )	Argentina, Córdoba, Mina Clavero	31°44'0,40``S 65°00'26,10``O	890	4x	2/5
82	E 5 (S <sub>348</sub> )	Argentina, Córdoba, Nono	31°47'49``S 65°00'23``O	861	4x	1/0
83	E 1 (S <sub>346</sub> )	Argentina, Córdoba, San Marcos Sierra	30°47'0,35``S 64°38'34,20``O	635	4x	2/0
84	SN & S 2097 (S <sub>387</sub> )	Uruguay, Colonia	34°06'14,70``S 57°06'31,50``O	-	-	1/0
85	SN & S2117 (S <sub>393</sub> )	Uruguay, Colonia, Conchillas	34°10'03,70``S 58°02'33,20``O	27	4x	2/0
86	SN 2000 (S <sub>338</sub> )	Uruguay, Lavalleja, Aguas Blancas	34°30'46,70``S 55°20'53``O	-	2x	3/5
87	SN & S 2133 (S <sub>396</sub> )	Uruguay, Punta Gorda	33°54'42``S 58°25'04``O	2	4x	1/0

Tabla 1 (continuación).

N° de Población	Coleccionista y número de colección (código)	Localidad de procedencia	Coordenadas geográficas	Altitud (msm)	Nivel de ploidía	Ncp / Nn
88	SN & S 2009 (S <sub>355</sub> )	Uruguay, Salto	31°04'07``S 57°50'19``O	34	-	1/0
<b><i>T. sidoides</i> subsp. <i>sidoides</i></b>						
89	SN 2147 (S <sub>406</sub> )	Uruguay, Canelones	34°38'21``S 55°32'10``O	57	-	1/0
90	SN 1999 (S <sub>337</sub> )	Uruguay, Lavalleja, Aguas Blancas	34°30'46``S 55°21'15``O	-	4x	3/5
91	SN 2148 (S <sub>407</sub> )	Uruguay, Lavalleja	34°30'7``S 55°26'58``O	76	-	1/0
92	M <i>et al.</i> s/n (P3uru)	Uruguay, Lavalleja	33°32'55,20``S 54°34'58,60``O	-	-	1/0
93	SN <i>et al.</i> 51 (S <sub>101</sub> )	Uruguay, Maldonado	34°52'52,53``S 54°58'25,89``O	-	4x	1/0
94	M <i>et al.</i> s/n (P2uru)	Uruguay, Maldonado	34°32'44,20``S 55°15'17,70``O	-	-	1/5
95	SN 2175 (S <sub>411</sub> )	Uruguay, Rocha	34°27'19,40``S 54°10'58,60``O	59	-	1/0
96	SN 2175 (S <sub>412</sub> )	Uruguay, Rocha	34°03'17,70``S 53°53'26,70``O	28	4x	2/0
97	SN 2063 (S <sub>378</sub> )	Uruguay, Tacuarembó	31°31'08``S 56°2'13``O	206	4x	3/5

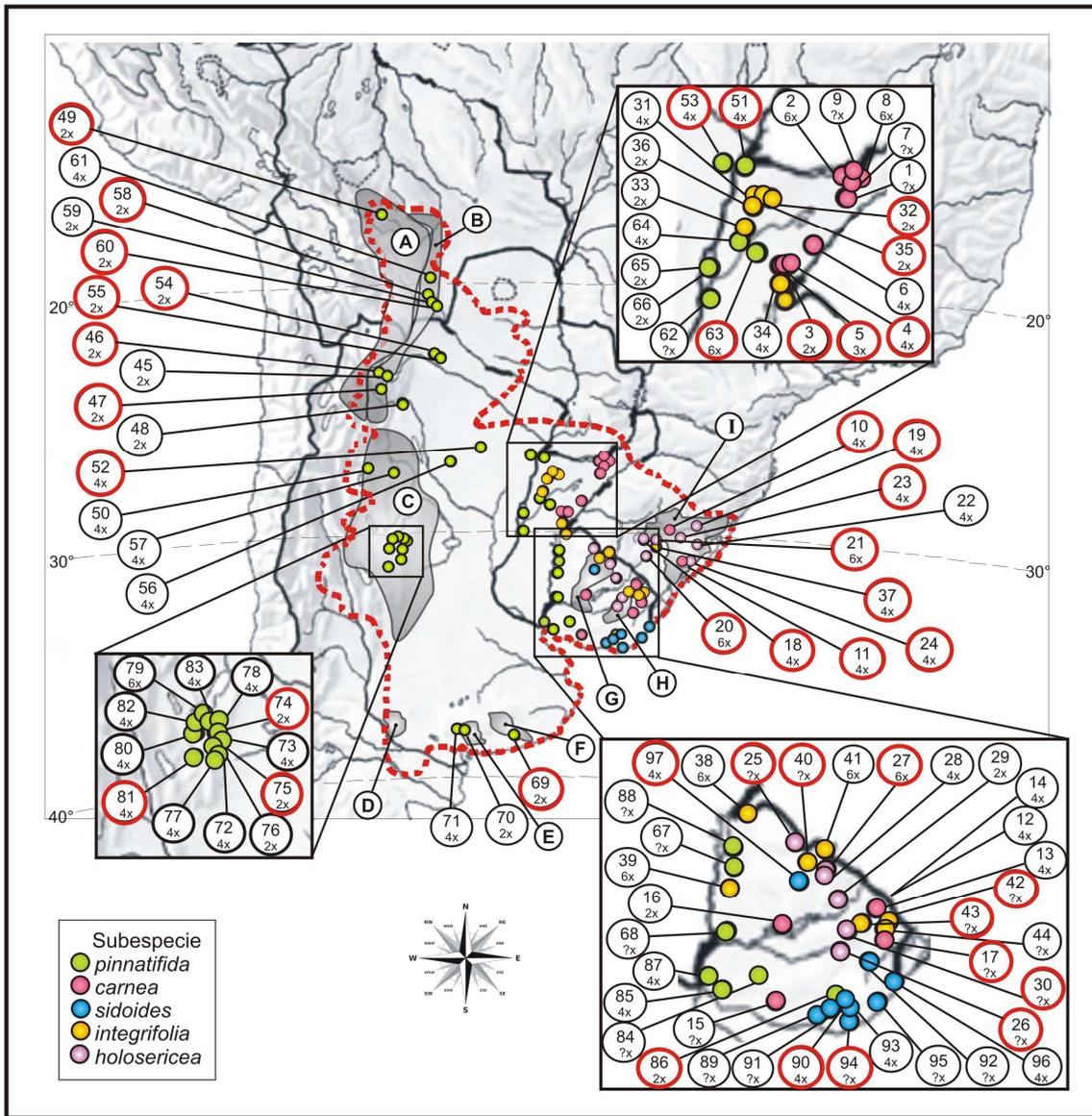
## **ADN CLOROPLÁSTICO**

Para estudiar la variabilidad genética a nivel de ADN cloroplástico (ADNcp) se analizaron un total de 160 individuos, provenientes de 97 poblaciones naturales representativas de la variabilidad morfológica y distribución geográfica del complejo *T. sidoides* (Fig. 8, Tabla 1). Se emplearon muestras de material foliar, el cual, cuando fue posible, se empleó fresco, caso contrario se deshidrató en sílica-gel y se conservó a -80 °C hasta su uso.

El tipo de dispersión seminal que presenta *T. sidoides*, por gravedad y mirmecocoría, tiende a concentrar las semillas en áreas localizadas favoreciendo el establecimiento de colonias de plantas, lo cual facilita la delimitación de poblaciones a la hora del muestreo (Solís Neffa 2000). Generalmente los genomas organelares presentan un elevado nivel de fijación de diversidad, lo cual los hace adecuados para estudios filogeográficos, por lo tanto, el esfuerzo de muestreo debe centrarse en coleccionar más poblaciones con menor número de individuos por población (Pons & Petit 1995). Con muchos puntos muestreados a lo largo del rango de distribución de la especie en estudio, se reconstruiría mejor la distribución espacial de los haplotipos, permitiendo una mejor reconstrucción de expansiones pasadas (Petit & Grivet 2002). Por estos motivos en esta tesis se analizó, en general y para los estudios de variabilidad genética del ADNcp, un individuo por población muestreada. No obstante, con el fin de descartar variabilidad genética intrapoblacional, al iniciar el estudio se tomó al azar 37 poblaciones representativas de las cinco subespecies del complejo, y se llevaron a cabo análisis de variabilidad genética en 2 a 6 individuos por población.

## **ADN NUCLEAR**

Para estudiar la variabilidad genética a nivel de ADN nuclear (ADNn), se analizaron un total de 205 individuos pertenecientes a 41 poblaciones (cinco individuos por población), representando las cinco subespecies del complejo (Fig. 8, Tabla 1).



**Fig. 8.** Distribución de las poblaciones del complejo *Turnera sidoides* analizadas. Los círculos representan las poblaciones estudiadas. Los colores de los círculos representan las distintas subespecies. En los círculos mayores se indican el número y el nivel de ploidía de cada población. Los círculos delineados con rojo identifican a las poblaciones con las cuales también se analizó la variabilidad en el ADNn. La línea de puntos rojos indica el área de distribución de la especie de acuerdo a Arbo (2008). Con letras se encuentran identificados los principales sistemas serranos del área de distribución de *T. sidoides*: A = Cordillera Oriental; B = Sierras Subandinas; C = Sierras Pampeanas; D = Mahuidas; E = Sierras Australes de Buenos Aires (Ventania); F = Sierras Septentrionales de Buenos Aires (Tandilia); G = Cuchilla de Haedo; H = Cuchilla Grande; I = Planalto Superior.

Para llevar a cabo los análisis de relaciones filogenéticas entre haplotipos, se emplearon como grupo externo dos especies cercanas a *T. sidoides*, las mismas fueron:

*Turnera fernandezii* Arbo (G 2908). Perteneciente a la Serie Turnera subserie Turnera. Especie aparentemente endémica del límite entre Mato Grosso do Sul (Brasil) y noreste de Paraguay (Amambay y Concepción). Vegeta en “cerrados” de suelos rojos, se adapta a lugares alterados como bordes de caminos. Florece y fructifica desde agosto a marzo (Arbo 2005).

*Turnera melochioides* Cambess (Quiroz 13612). Perteneciente a la Serie Leiocarpae al igual que la especie que se estudia en esta tesis. Especie de amplia distribución en el centro y este de Brasil (Alagoas, Amapá, Amazonas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Rondonia y Tocantins) norte y este de Bolivia y noreste de Paraguay. Vive en «cerrado», campo-cerrado y «campo rupestre», ocasionalmente en «caatinga», también en lugares arenosos inundables a orillas de ríos, en lugares rocosos y en dunas marítimas. Prospera bien en la vegetación secundaria y en lugares alterados como los bordes de caminos (Arbo 2008).

# MÉTODOS

*“La vida sólo puede ser vivida hacia adelante, pero debe ser entendida hacia atrás.”*

*S. Kierkegaard*

---

# MÉTODOS

## EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

La extracción de ADN genómico, tanto de las muestras de hojas secas como frescas, se llevó a cabo empleando el protocolo de extracción con CTAB de Doyle & Doyle (1987) y Cullings (1992) con algunas modificaciones. A continuación se detalla el protocolo utilizado.

1. Aproximadamente 20 mg del material foliar fresco, o 10 mg del material foliar seco fueron pulverizados de manera mecánica con nitrógeno líquido y un pilón de plástico en un tubo de polipropileno de 1,5 ml.
2. Se agregaron 600  $\mu$ l de buffer CTAB (Tris-HCl pH 8,0 0,1 M, NaCl 1,4 M, EDTA 0,02 M, CTAB 2 %  $\text{P}/\text{V}$ ) al material triturado y se suspendió la muestra girando el pilón con movimientos rápidos.
3. Las muestras fueron incubadas en baño maría a 65 °C durante 2 h, mezclándolas cada media hora.
4. A continuación, se llevó a cabo una extracción simple con 600  $\mu$ l de 24: 1 cloroformo: alcohol isoamílico ( $\text{V}/\text{V}$ ).
5. Las muestras fueron luego centrifugadas durante 10 min a temperatura ambiente a 12.500 r.p.m.
6. La centrifugación generó tres fases: en la parte superior una fase acuosa, en la parte media proteínas y en el fondo, cloroformo. La fase acuosa fue transferida a un nuevo tubo de 1,5 ml al cual se agregaron 0,08 volúmenes de acetato de amonio 7,5 M frío. Al volumen combinado de fase acuosa y acetato de amonio se agregaron 0,54 volúmenes de isopropanol frío. La muestra fue luego invertida varias veces para mezclarla.
7. Las muestras fueron puestas a enfriar a -20 °C por aproximadamente 20 min.
8. A continuación se centrifugaron las muestras durante 10 min a 4 °C a 14.000 r.p.m. con el fin de que el ADN precipite en el fondo del tubo formando un *pellet*.
9. El sobrenadante fue volcado en un vaso de precipitado teniendo especial cuidado de no despegar el *pellet*, las gotas restantes fueron secadas sobre una servilleta.

Luego se agregaron 600  $\mu$ l de etanol 70 % frío y se repitió la centrifugación bajo similares condiciones al paso anterior.

10. Finalizada la centrifugación con etanol 70 % se repitió el paso anterior pero empleando etanol 95 %. El etanol 95 % fue luego desechado, dejando secar el *pellet* a temperatura ambiente durante toda una noche.
11. El *pellet* seco fue resuspendido en 100  $\mu$ l de agua deionizada autoclavada.

La presencia y calidad del ADN extraído se verificó mediante geles horizontales de agarosa al 0,8 % en buffer TAE 1  $\times$  teñidos en bromuro de etidio.

La concentración de las extracciones se midió por espectrofotometría y luego se realizaron diluciones en agua deionizada autoclavada de aproximadamente 100 ng/ $\mu$ l para emplearlas como ADN molde en las reacciones de amplificación. Dichas diluciones se conservaron a -20 °C hasta su uso.

## **ADN CLOROPLÁSTICO**

### **AMPLIFICACIÓN DE REGIONES NO CODIFICANTES DE ADN CLOROPLÁSTICO**

Además de la expansión poblacional, otros procesos, como el aumento de la frecuencia de un alelo en virtud de estar ligado a un gen que es seleccionado de manera positiva (*arrastre* o *hitchhiking* genético: Maynard & Haigh 1974), pueden producir genealogías similares (es decir, desvíos de los test estadísticos en la misma dirección). Por ejemplo, debido a que el *arrastre* genético en regiones bajo recombinación puede afectar una fracción relativamente pequeña del genoma (cerca a la mutación ventajosa), emplear distintas regiones del genoma puede contribuir a discriminar entre éste fenómeno y un fenómeno de expansión poblacional (Ramos-Onsins & Rozas 2002). Además, cuanto mayor sea el número de nucleótidos que se incorporen al estudio menor será el error de muestreo asociado con el tamaño finito de las secuencias (Nei 1986). Es decir, cuanto mayor sea la secuencia, menor será la probabilidad de que la filogenia esté siendo determinada por sustituciones “raras”, que no reflejan la historia

filogenética de los organismos en cuestión. Por estos motivos, en esta tesis se analizaron dos regiones no codificantes del ADNcp.

Con el fin de poner a punto condiciones de amplificación e identificar las regiones de ADNcp variables, se llevaron a cabo experimentos de amplificación por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), probando 25 pares de cebadores universales (Tabla 2). Para este paso se seleccionaron al azar un grupo pequeño de individuos de diferentes poblaciones/morfotipos/subespecies. Del total de regiones probadas cuatro fueron enviadas a secuenciar, TabAB (*trnT-trnL*), TabEF (*trnL-trnF*), TabCD (*trnL-trnL*) y *matK5'* - *matK6*. Los espaciadores intergénicos secuenciados TabEF (*trnL<sup>UAA</sup> - trnF<sup>GAA</sup>*) y *matK5'* - *matK6* resultaron polimórficos por lo que se utilizaron para realizar los análisis.

**Tabla 2.** Regiones de ADNcp analizadas, temperatura de templado probada para cada región, tamaño del producto amplificado y fuente bibliográfica donde se encuentran los cebadores.

Región cloroplástica	Temperatura de templado	Tamaño aproximado del producto de PCR	Grado de variación	Fuente del cebador
TabAB ( <i>trnT-trnL</i> )	<i>touch down</i> 58 °C-52 °C	500 pb	muy poco polimorfismo	Taberlet <i>et al.</i> 1991
TabEF ( <i>trnL-trnF</i> )	<i>touch down</i> 58 °C-52 °C	300 pb	polimórfico	Taberlet <i>et al.</i> 1991
TabCD ( <i>trnL-trnL</i> )	<i>touch down</i> 58 °C-52 °C	500 pb	muy poco polimorfismo	Taberlet <i>et al.</i> 1991
<i>trnH - psbA</i>	50 °C	múltiples bandas	-	Sang <i>et al.</i> 1997
<i>psaA - trnS</i>	-	no amplificó	-	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>psbC - trnS</i>	-	no amplificó	-	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>trnS - trnT</i>	-	no amplificó	-	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>trnC - trnD</i>	<i>touch down</i> 58 °C-52 °C	3000 pb	producto muy grande	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>trnH - trnK</i>	-	no amplificó	-	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>trnD - trnT</i>	50 °C	1400 pb	-	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>trnS - trnfM</i>	-	no amplificó	-	Demesure <i>et al.</i> 1995
<i>trnS - trnG</i>	<i>touch down</i> 58 °C-52 °C	dos bandas	-	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>trnG</i>	-	no amplificó	-	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>matK5' - matK6</i>	50,2 °C	900 pb	polimórfico	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>rpS16</i>	-	no amplificó	-	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>trnC - ycf6</i>	50 °C y 55 °C	450 pb	amplificó sólo en algunos individuos	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>ycf6 - psbM</i>	50 °C y 55 °C	1600 pb	amplificó sólo en algunos individuos	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>psbM - trnD</i>	-	no amplificó	-	Shaw <i>et al.</i> 2005
<i>rpS16x2 - trnK</i>	50 °C	múltiples bandas	amplificó sólo en algunos individuos	Shaw <i>et al.</i> 2007
<i>rpL32 - trnL</i>	50 °C	700 pb	amplificó sólo en un individuo	Shaw <i>et al.</i> 2007
<i>psbJ - petA</i>	45 °C	1300 pb	producto muy grande	Shaw <i>et al.</i> 2007
<i>ndhF - rpL32</i>	-	no amplificó	-	Shaw <i>et al.</i> 2007
<i>psbD - trnT</i>	54 °C	1600 pb	producto muy grande	Shaw <i>et al.</i> 2007
<i>atpI - atpH</i>	52 °C	2060 pb	producto muy grande	Shaw <i>et al.</i> 2007
<i>petL - psbE</i>	-	no amplificó	-	Shaw <i>et al.</i> 2007

Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* para un volumen final de 25  $\mu$ l. A continuación se detalla el protocolo adaptado para cada región (Tablas 3 y 4).

**Tabla 3.** Protocolo de amplificación para el espaciador intergénico cloroplástico *trnL* - *trnF*.

<b>tabEF</b> ( <i>trnL</i> GGTCAAGTCCCTCTATCCC) ( <i>trnF</i> ATTTGAACTGGTGACACGAG)		
<b>Reactivo</b>	<b>Concentración final</b> (para 25 $\mu$ l)	<b>Programa</b>
Tampón	1 $\times$	<b>1)</b> 95 °C 5 min
MgCl	1,5 mM	<b>2)</b> 94 °C 1 min
dNTPs	100 $\mu$ M	<b>3)</b> 58 °C 1 min - 1 °C
<i>trnL</i>	0,8 $\mu$ M	<b>4)</b> 72 °C 2 min 30 seg
<i>trnF</i>	0,8 $\mu$ M	<b>5)</b> Ir a <b>2)</b> repetir 6 veces
Taq polimerasa	1 U	<b>6)</b> 94 °C 1 min
ADN	100 ng	<b>7)</b> 56 °C 1 min <b>8)</b> 72 °C 2 min 30 seg <b>9)</b> Ir a <b>6)</b> repetir 36 veces <b>10)</b> 72 °C 5 min

**Tabla 4.** Protocolo de amplificación para el espaciador intergénico cloroplástico *matK5'* - *matK6*.

<b>matK5'-matK6</b> ( <i>matK5'R GCATAAATATAYTCC</i> <i>YGAAARATAAGTGG</i> ) <i>(matK6 GGGTTGCTACTCAATGG)</i>		
Reactivo	Concentración final (para 25 µl)	Programa
Tampón	1 ×	<b>1)</b> 95 °C 5 min
MgCl	3 mM	<b>2)</b> 95 °C 1 min
dNTPs	200 µM	<b>3)</b> 50,2 °C 1 min
<i>matK5`R</i>	0,1 µM	<b>4)</b> 72 °C 1 min
<i>matK6</i>	0,1 µM	<b>5)</b> Ir a <b>2)</b> rep 30 veces
Taq polimerasa	2 U	<b>6)</b> 72 °C 4 min
ADN	150 ng	

Las amplificaciones fueron confirmadas por electroforesis en geles de agarosa 1,4% en tampón TAE 1 ×, teñidos en bromuro de etidio. Los productos de las amplificaciones fueron enviados a secuenciar a Macrogen © en Seúl, Corea del Sur.

### ALINEAMIENTO Y EDICIÓN DE LAS SECUENCIAS

Se secuenció la región directa (*forward*) y la reversa (*reverse*) para cada uno de los dos espaciadores intergénicos seleccionados, ambas regiones fueron luego ensambladas para cada espaciador. Debido a que el genoma cloroplástico es heredado como una unidad y no se encuentra sujeto a recombinación, las secuencias de ADNcp pueden ser combinadas (Soltis & Soltis 1998). Por lo tanto, ambos espaciadores se concatenaron en una secuencia y a partir de la misma se llevaron a cabo todos los análisis. Tanto el ensamblado de las regiones directa y reversa, como el concatenado de ambos espaciadores se llevaron a cabo empleando el programa Chromas 2.33 (<http://www.technelysium.com.au>), con este mismo programa las secuencias fueron leídas y editadas manualmente, cuando fue necesario. Las secuencias fueron alineadas

de manera automática por el método de ClustalW empleando el programa MEGA 5 (Tamura *et al.* 2011). Para alineamientos múltiples, ClustalW emplea métodos de alineamiento progresivo en los cuales las secuencias más similares, es decir aquellas con el mejor alineamiento, son alineadas primero. Luego, progresivamente grupos de secuencias más distantes son alineados hasta que es obtenido un alineamiento global (Higgins *et al.* 1994). Dicho alineamiento fue luego codificado y corregido manualmente con el mismo programa. Las posiciones variables en la matriz del alineamiento fueron chequeadas con los cromatogramas originales para asegurarse de que dichas bases constituyan realmente posiciones variables. Los eventos contiguos de inserción/ deleción (*indels*) fueron tratados como eventos de mutación únicos (Simons & Ochoterena 2000) y las polyT/ A fueron eliminadas (Kelchner 2000).

Las secuencias de ADNcp obtenidas serán enviadas a GenBank una vez que el manuscrito resultante de esta tesis sea aceptado para su publicación formal.

### **CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN CLOROPLÁSTICO Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA**

Una vez codificado, el alineamiento fue exportado al programa DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas 2009) en el cual se verificaron el tamaño del alineamiento, se generaron haplotipos (combinación única de alelos) y se determinó el número de individuos por haplotipo. Cada haplotipo fue nombrado con la letra H seguida de un número.

Con el fin de cuantificar la variabilidad genética intraespecífica de *T. sidoides* se calcularon los siguientes estadísticos con el programa Arlequín v. 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010):

**Número de sitios segregantes (*S*):** indica el número de *loci* que presentan más de un alelo por *locus*

**Índice de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ):** indica la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos tomados al azar sean diferentes dentro de la muestra (Tajima 1983; Nei 1987). Se calculó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\pi = \sum \frac{p_i \cdot p_j \cdot \pi_{ij}}{L}$$

Donde,  $p_i$  es la frecuencia de la secuencia  $i$ ,  $p_j$  es la frecuencia de la secuencia  $j$ ,  $\pi_{ij}$  es la proporción de nucleótidos distintos entre la secuencia  $i$  y la secuencia  $j$ , y  $L$  es el número de *loci*.

**Índice de diversidad haplotípica ( $h$ ):** indica la probabilidad de que dos haplotipos tomados al azar sean diferentes dentro de la muestra (Nei 1987). Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$h = \frac{n}{n-1} (1 - \sum p_i^2)$$

Donde  $n$  es el número de copias génicas en la muestra,  $p_i$  es la frecuencia del haplotipo  $i$  en la muestra.

Una población con baja diversidad haplotípica y nucleotídica pudo haber experimentado un prolongado o severo cuello de botella demográfico en tiempos recientes. Contrariamente, altos valores de diversidad haplotípica y nucleotídica se esperan en aquellas poblaciones que han permanecido estables con un tamaño efectivo grande por un largo tiempo; o en poblaciones mixtas con individuos provenientes de poblaciones históricamente separadas.

Altos niveles de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica sugieren un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral con pequeño tamaño efectivo, donde el tiempo fue suficiente para generar variación haplotípica por mutación pero muy corto para acumular grandes diferencias entre las secuencias. Contrariamente, bajos valores de diversidad haplotípica y altos de diversidad nucleotídica podrían resultar de un transitorio cuello de botella en una gran población ancestral; también podrían reflejar una mezcla de individuos provenientes de poblaciones pequeñas, subdivididas geográficamente (Avice 2000).

## RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE HAPLOTIPOS

Para realizar inferencias acerca de las relaciones evolutivas entre individuos de distintas especies, es preciso que los linajes se dispongan de manera jerárquica y no reticulada (filogenia *sensu stricto*). Sin embargo, las relaciones entre genes muestreados en individuos de una misma especie generalmente no cumplen estos supuestos, ya que son el resultado de flujo génico, mutaciones relativamente recientes y recombinación. Por lo tanto, los métodos tradicionales desarrollados para estimar relaciones interespecíficas no son adecuados para analizar las relaciones evolutivas entre individuos o poblaciones dentro de una misma especie. Los métodos filogenéticos que permiten la persistencia de nodos ancestrales, las multifurcaciones y las reticulaciones, tales como las redes de haplotipos, son preferibles a los árboles estrictamente dicotómicos para estimar relaciones cuando la divergencia entre los linajes es pequeña (Schaal *et al.* 1998; Posada & Crandall 2001). Es por esto que, en esta tesis, las relaciones evolutivas entre los haplotipos de *T. sidoides* fueron inferidas a través de la creación de una red de haplotipos (*network*) con el método *median-joining* ( $\epsilon = 0$ , Bandelt *et al.* 1999) empleando el programa NETWORK 4.5.1 (<http://www.fluxus-engineering.com>). Una red de haplotipos consiste de nodos y conexiones que los unen, los nodos representan los haplotipos y el tamaño de dicho nodo es proporcional a su frecuencia en las poblaciones. Además, el programa adiciona vértices, denominados *median vectors*, que representarían haplotipos extintos o no muestreados en la población (Bandelt *et al.* 1999).

Para cada haplogrupo (conjunto de haplotipos más relacionados entre sí que con los demás haplotipos) derivado de la red se determinó el número de haplotipos que conforman el haplogrupo, el número de poblaciones/individuos presentes en cada haplogrupo y el porcentaje de individuos pertenecientes a cada una de las cinco subespecies del complejo. También fueron calculados el número de sitios polimórficos, el índice de diversidad nucleotídica y el índice de diversidad haplotípica.

## FILOGENIA INTRAESPECÍFICA

Se analizó la filogenia entre haplotipos empleando métodos Bayesianos implementados en el programa BEAST v .1.0.8 (Drummond *et al.* 2012). Se corrieron dos cadenas independientes de un largo de  $10^5$ , con muestreo cada 5.000 generaciones. Se usaron los siguientes parámetros: árbol de Yule, el modelo de sustitución HKY con cuatro categorías gamma, y un reloj molecular estricto.

Debido a que no existen registros fósiles para la familia Turneraceae, ni tasas de sustitución disponibles a partir de las cuales calibrar un reloj molecular, se empleó una tasa de sustitución estándar de 1.0 / sustituciones / sitio / Ma. El mejor modelo de evolución de las secuencias fue identificado usando el programa jModeltest 2.1.4 (Guindon & Gascuel 2003; Darriba *et al.* 2012) empleando el criterio de información de Akaike (Kelchner & Thomas 2007). El programa Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond 2009) fue empleado para chequear la convergencia de las cadenas de Markov y los tamaños muestrales efectivos adecuados (ESS >200). Se obtuvo un árbol de máxima verosimilitud empleando el programa TreeAnnotator, el cual pertenece al paquete de BEAST. Se determinó el soporte estadístico para los clados mediante las probabilidades posteriores (PP) Bayesianas (Rannala & Yang 1996).

## ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS

Para estudiar la historia demográfica reciente del complejo *Turnera sidoides* se realizaron pruebas que detectan, en la diversidad genética observada, huellas de posibles eventos demográficos pasados. Emplear la variabilidad molecular para responder a cuestiones de historia demográfica requiere la suposición de que dicha variación se encuentra evolucionando de manera neutral, es decir, el *locus* en sí mismo no debe estar bajo presión de selección, ni genéticamente ligado a sitios bajo selección (*genetic swamping*) (Wayne & Simonsen 1998). En base al cálculo de pruebas de neutralidad, es posible estimar cambios en el tamaño poblacional histórico, evaluando si los datos empíricos se ajustan a un modelo de tamaño poblacional constante o no. Los estadísticos calculados en esta tesis se encuentran divididos en tres clases de acuerdo a Ramos-Onsins & Rozas (2002):

**Estadísticos Clase I:** emplean información de la frecuencia de las mutaciones (sitios segregantes). Estos estadísticos son apropiados para distinguir el crecimiento poblacional del tamaño poblacional constante, ya que el primero genera un exceso de mutaciones en las ramas externas de la genealogía (i.e. mutaciones recientes) y por lo tanto un exceso de sustituciones presentes en solo una muestra secuenciada (*singletons*). Dentro de esta clase se calculó el siguiente estadístico:

### *D de Tajima*

Compara dos estimadores de  $\theta$  (theta es una medida que cuantifica la diversidad genética de una población dada; está basada en el número de alelos o nucleótidos diferentes en una muestra.), uno de ellos está basado en el número de sitios segregantes ( $\theta s$ ) y el otro en el número medio de diferencias nucleotídicas entre los haplotipos comparados de a pares ( $\theta \pi$ ). Excluye del análisis a los sitios con gaps (espacios insertados por un programa al llevar a cabo el alineamiento con el fin de lograr la homología entre las bases) (Tajima 1989). Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$D = \frac{\widehat{\theta \pi} - \widehat{\theta s}}{\sqrt{\text{Var}(\widehat{\theta \pi} - \widehat{\theta s})}}$$

$D = 0$ : no se tiene evidencia de cambios en el tamaño poblacional o para ningún patrón en particular de selección.

$D < 0$ : el tamaño poblacional podría estar incrementándose o podría ser evidencia de selección purificadora.

$D > 0$ : la población podría haber sufrido un cuello de botella reciente (o estar decreciendo) o podría tenerse evidencia de selección sobredominante.

**Estadísticos Clase II:** emplean la información de la distribución haplotípica. Dentro de esta clase se calculó el siguiente estadístico:

***F<sub>s</sub> de Fu***

Basado en la probabilidad de observar un cierto número de haplotipos dado un valor particular de  $\theta$  (Fu 1997), a dicha probabilidad se la denomina  $\hat{S}$ . Este estadístico muestra valores bajos ante un exceso de mutaciones presentes en solo una muestra (*singleton*) causadas por la expansión poblacional. Se calcula de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$F_s = \ln \frac{\hat{S}}{1 - \hat{S}}$$

Un valor negativo de  $F_s$  es evidencia de un exceso de alelos, como se esperaría de una reciente expansión poblacional o de arrastre genético.

Un valor positivo de  $F_s$  es evidencia de una deficiencia de alelos, como se esperaría de un reciente cuello de botella poblacional o de selección sobredominante.

**Estadísticos clase III:** emplean información de la distribución de las diferencias de a pares entre secuencias. Dentro de esta clase se han calculado los siguientes estadísticos:

***Distribución de diferencias de a pares (Mismatch distribution)***

Se basa en la distribución de la frecuencia de diferencias observadas entre los haplotipos tomados de a pares (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992). Estas distribuciones se calcularon contando el número de diferencias en sitios nucleotídicos entre cada par de individuos y empleando un diagrama de barra para mostrar las frecuencias relativas de pares que difieren por cero sitios, por un sitio, etc.

Este análisis permite inferir si las poblaciones de una especie o la especie en su conjunto han experimentado una expansión de rango reciente o si se han mantenido estables. Se asume como hipótesis nula un crecimiento poblacional constante bajo el modelo neutral. Cuando una población ha sufrido una rápida

expansión poblacional, se espera observar en el análisis una distribución unimodal, mientras que cuando una población está subdividida o ha permanecido en equilibrio demográfico se espera que exhiba una distribución multimodal (Rogers & Harpending 1992).

### ***Índice de Raggedness (rg) de Harpending***

Mide la uniformidad de la distribución de a pares de las diferencias entre secuencias. Las poblaciones que han sufrido gran expansión poblacional se espera que exhiban una distribución suave, unimodal y bajo valor de rg, mientras que las poblaciones que se han mantenido estables se espera que exhiban una distribución más errática y multimodal, y valores altos de rg (Harpending *et al.* 1993; Harpending 1994). En este trabajo se calcularon las diferencias por pares utilizando 10.000 simulaciones coalescentes para poner a prueba la significancia del estadístico rg.

Los estadísticos  $D$  de Tajima y  $F_s$  de Fu fueron calculados empleando el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010), mientras que para calcular la distribución de diferencias por pares y el índice rg se empleó el programa DnaSP v.5.0 (Librado & Rozas 2009).

Una vez calculados los índices se realizaron inferencias acerca de la historia demográfica de las poblaciones de *T. sidoides* a partir de las pruebas estadísticas descritas anteriormente y la relación observada entre los índices de diversidad nucleotídica y haplotípica.

### ***Perfil demográfico bayesiano o Bayesian Skyline Plot (BSP)***

El perfil demográfico bayesiano (BSP) (Drummond *et al.* 2005), implementado en BEAST v.1.0.8 (Drummond *et al.* 2012), fue empleado para estimar la dinámica de los cambios en el tamaño poblacional a lo largo del tiempo, en el conjunto de secuencias de *T. sidoides*, sin una especificación *a priori* de algún modelo particular. El BSP

emplea datos de secuencias y un muestreo a partir de una Cadena de Markov de Monte Carlo (MCMC) para generar una distribución posterior de un tamaño poblacional efectivo a través del tiempo (Drummond *et al.* 2005). Los parámetros para el modelo de sustitución y la tasa de sustitución fueron los mismos que los empleados para el análisis filogenético, con una cadena de  $10^7$  de largo y muestreo cada 1.000 generaciones.

## ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

### *Análisis de la varianza molecular (AMOVA)*

El análisis de la varianza molecular (AMOVA, Excoffier *et al.* 1992) es un método que permite estimar la diferenciación poblacional y probar hipótesis de estructuración a partir de datos moleculares. Este método está basado en el cálculo de una matriz de distancia genética y evalúa la varianza dentro y entre grupos predefinidos. Produce estimaciones de los componentes de la varianza y análogos del estadístico  $F_{ST}$ , designados como estadístico  $\Phi_{ST}$ , reflejando la correlación entre la diversidad haplotípica y los diferentes niveles de subdivisión jerárquica (Excoffier *et al.* 1992). El estadístico  $\Phi_{ST}$  expresa la correlación de un par de haplotipos tomados al azar de un subgrupo particular del conjunto de datos, en relación a la correlación de un par de haplotipos tomados de un agrupamiento mayor, indicando la partición relativa de la diversidad entre los niveles jerárquicos que están siendo analizados (Excoffier *et al.* 1992; Lowe *et al.* 2004).

Con el fin de investigar los niveles jerárquicos de estructuración poblacional, se llevaron a cabo dos AMOVA, empleando el programa Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer 2010). En el primer análisis, las poblaciones se agruparon por subespecie: *carnea*, *holosericea*, *integrifolia*, *pinnatifida* y *sidoides*. En el segundo análisis, las poblaciones fueron agrupadas en los haplogrupos resultantes del análisis de relaciones evolutivas entre haplotipos. Los niveles de significancia de los componentes de la varianza fueron computados empleando un test no paramétrico con 10.000 permutaciones, según Excoffier *et al.* (1992).

### *Test de Mantel*

El límite en la dispersión de los organismos genera un patrón geográfico. El patrón denominado “aislamiento por distancia” (IBD por sus siglas en inglés) resulta de una habilidad de dispersión y flujo génico limitados, y es un fenómeno común de observar en las poblaciones naturales de una especie con amplia distribución geográfica (Wright 1943). El modelo de IBD asume que la distancia geográfica y la distancia genética están correlacionadas. Cuando existe IBD la distancia genética entre las poblaciones aumenta a medida que aumenta la distancia geográfica. Con el fin de determinar si la distancia genética se encuentra correlacionada con la distancia geográfica se llevó a cabo una prueba de Mantel (Mantel 1967). A tal fin se emplearon dos matrices, una de distancia genética (basada en  $\Phi_{ST}$ ) y la otra de distancia geográfica entre poblaciones. El cálculo de la distancia geográfica entre poblaciones se midió como la distancia lineal en kilómetros entre cada par de poblaciones. El valor del coeficiente de correlación de Pearson (R) se obtuvo a partir de la comparación entre la correlación observada y la esperada por el azar para 10.000 permutaciones aleatorias. Los datos fueron procesados con el programa Alleles in Space v 1.0 (AIS; Miller 2005).

### **DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA**

A fin de analizar la distribución espacial de los haplotipos encontrados, se generaron mapas de distribución geográfica con los programas GPS Trackmaker ver. 13.3.349 (<http://www.gpstm.com>) y DIVA GIS 7.5.0 ([http://www.DIVA\\_GIS.org](http://www.DIVA_GIS.org)) (Hijmans *et al.* 2011).

## ADN NUCLEAR

## POLIMORFISMO EN EL ADN AMPLIFICADO AL AZAR (RAPD)

Con el fin de analizar la variabilidad genética a nivel del ADN nuclear (ADNn) se emplearon marcadores RAPD (de la sigla en inglés *Random Amplified Polymorphism DNA*). Para las amplificaciones se emplearon las mismas extracciones de ADN genómico utilizadas para la amplificación de secuencias de ADNcp, y se extrajeron los individuos faltantes con el mismo protocolo de extracción detallado anteriormente.

Se emplearon cuatro cebadores arbitrarios (OPO-04, OPO-10, OPO-15, OPO-20) de *Operon Technologies* (Alameda, CA, USA) (Tabla 5). Estos cebadores fueron escogidos por haber resultado polimórficos en trabajos previos realizados en el complejo (Mola Moringa *et al.* 2011; Moreno *et al.* 2011; Panseri 2011; Moreno *et al.* 2013). Las amplificaciones fueron llevadas a cabo en un termociclador *Eppendorf Mastercycler Gradient* para un volumen final de 8  $\mu$ l (Tabla 6). En cada amplificación se incluyó un control negativo (una muestra con todos los reactivos necesarios para la amplificación pero sin ADN molde) para confirmar que los fragmentos obtenidos (bandas) no fueran artefactos de la técnica. Además, con el fin de probar la reproducibilidad de las bandas, las reacciones fueron realizadas por duplicado en algunos individuos tomados al azar de cada población. Los productos de amplificación fueron identificados visualmente en geles de agarosa 2% teñidos en una solución de bromuro de etidio y fotografiados bajo luz UV.

**Tabla 5.** Cebadores RAPD empleados en este estudio. Código del cebador y secuencia de bases.

Código del cebador	Secuencia de bases (5' a 3')
OPO-04	AAGTCCGCTC
OPO-10	TCAGAGCGCC
OPO-15	TGGCGTCCTT
OPO-20	ACACACGCTG

**Tabla 6.** Protocolo de amplificación para los marcadores RAPD.

Reactivo	Concentración final (para 8 $\mu$ l)	Programa
Tampón	1 $\times$	<b>1)</b> 94 °C 2 min <b>2)</b> 94 °C 30 seg <b>3)</b> 37 °C 1 min <b>4)</b> 72 °C 2 min <b>5)</b> Ir a <b>2)</b> repetir 35 veces <b>6)</b> 72 °C 5 min
MgCl	0,75 mM	
dNTPs	100 $\mu$ M	
cebador	0,20 $\mu$ M	
Taq polimerasa	2,5 U	
ADN	300 ng	

### CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Las bandas con la misma distancia de migración, amplificadas con el mismo cebador fueron consideradas homólogas. Cada banda fue considerada como un único *locus* bialélico, uno amplificable y el otro nulo. Los datos fueron registrados manualmente como presencia de la banda (0) o ausencia de la banda (1). Con los datos obtenidos se construyeron matrices de individuos  $\times$  caracteres.

La caracterización de la variabilidad genética se llevó a cabo a nivel específico, subespecífico y geográfico. Este último nivel de comparación fue adoptado con el fin de analizar si las regiones geográficas en donde se observó una mayor variabilidad genética con los marcadores cloroplásticos se corresponden con una mayor variabilidad a nivel de ADN nuclear. Para tal fin, las poblaciones fueron agrupadas de acuerdo con la estructura geográfica de los haplotipos de ADNcp.

Para cada uno de los niveles de comparación, a partir de las matrices de individuos  $\times$  caracteres, se calcularon los siguientes estadísticos descriptivos:

- *Número total de bandas* (NTB)

- *Número de bandas exclusivas* (NBE)
- *Porcentaje de loci polimórficos* (PLP)
- *Heterocigosis esperada* (He) con el factor de corrección para muestras pequeñas y siguiendo el método de corrección de Lynch & Milligan (1994) para marcadores dominantes.

Además, se calculó el *Índice de diversidad de Shannon (Sh)* (Shannon & Weaver 1949) para proporcionar una estimación relativa del grado de variación genética dentro de las poblaciones empleando la fórmula:

$$Sh = -1. \sum p_i . \ln (p_i) + q_i . \ln (q_i)$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia de la presencia y  $q_i$  la ausencia de cada banda RAPD (Legendre & Legendre 1998).

## ESTRUCTURACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

### *Análisis de la varianza molecular (AMOVA)*

El análisis de la varianza molecular, originalmente desarrollado para datos haplotípicos (Excoffier *et al.* 1992), actualmente se aplica en los datos basados en RAPD para estimar la variabilidad interpoblacional, mediante  $\Phi_{ST}$  que es análogo a los estadísticos jerárquicos  $F$  de Wright (Nybom & Bartish 2000; Nybom 2004). Mediante el AMOVA se estimó el grado de diferenciación genética entre los agrupamientos.

### *Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)*

Se calcularon los *índices de distancia y de identidad genética de Nei* (Nei 1973) entre las poblaciones. A partir de los valores de distancia genética obtenidos se realizó un PCoA.

Todos los análisis fueron realizados empleando el software GenAlEx 6.3 (Peakall & Smouse 2006).

***Test de Mantel***

A fin de probar la hipótesis de aislamiento por distancia se realizó un test de Mantel (Mantel 1967) entre las matrices de distancia genética y de distancia geográfica con 10.000 permutaciones al azar, empleando el programa Alleles in Space v 1.0 (AIS; Miller 2005).

***Turnera sidoides* subsp. *carnea***

Asimismo, a fin de evaluar si las diferencias morfológicas observadas entre los morfotipos de *T. sidoides* subsp. *carnea* difieren genéticamente entre sí, se llevó a cabo el AMOVA y el PCoA para esta subespecie únicamente, empleando el software GenAlEx 6.3 (Peakall & Smouse 2006).

# RESULTADOS

*“Con el conocimiento se acrecientan las dudas”.*

*Goethe*

# RESULTADOS

## ADN CLOROPLÁSTICO

### CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN CLOROPLÁSTICO Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA

El alineamiento de las regiones de ADNcp *trnL<sup>UAA</sup> – trnF<sup>GAA</sup>* y *matK5'-matK6* concatenadas, para los 160 individuos provenientes de 97 poblaciones analizados, resultó en una secuencia de 1.008 pares de bases (pb), incluyendo los eventos de inserción / deleción (*indels*).

De los 1.008 pb, 40 resultaron polimórficos (*S*). Todos los sitios polimórficos fueron localizados y confirmados en los cromatogramas. Teniendo en cuenta a los 160 individuos analizados, se observaron valores elevados de diversidad haplotípica (*h* 0,920) y valores más bajos de diversidad nucleotídica ( $\pi$  0,00569) (Tabla 7). En las subespecies, la diversidad haplotípica resultó mayor en la subespecie *pinnatifida* (*h* = 0,858) y menor en la subespecie *sidoides* (*h* = 0,473), mientras que la diversidad nucleotídica fue mayor en la subespecie *carnea* ( $\pi$  = 0,00508) y menor en la subespecie *pinnatifida* ( $\pi$  = 0,00214) (Tabla 8).

**Tabla 7.** Características de las regiones de ADNcp analizadas y estadísticos de resumen calculados para cada región de ADNcp analizada y la secuencia concatenada en *T. sidoides*. **Ts** = transiciones; **Tv** = transversiones; **S** =sitios polimórficos;  $\pi$  = diversidad nucleotídica; *h* = diversidad haplotípica; **DE** = desvío estándar.

Región	pb	Ts	Tv	Indels	S	$\pi$ (DE)	<i>h</i> (DE)	Número de Haplotipos
<i>trnL-trnF</i>	259	0	1	8	9	0,00076 (0,00015)	0,191 (0,038)	9
<i>matK5'-matK6</i>	749	20	9	2	31	0,00738 (0,00027)	0,906 (0,010)	25
<b>Secuencia concatenada</b>	1008	20	10	10	40	0,00569 (0,00019)	0,920 (0,00008)	34

**Tabla 8.** Estadísticos de resumen calculados para las subespecies / morfotipos de *Turnera sidoides*. **S** =sitios polimórficos;  $\pi$  = diversidad nucleotídica; **h** = diversidad haplotípica; **DE** = desvío estándar.

<i>T. sidoides</i>	<i>S</i>	$\pi$ (DE)	<i>h</i> (DE)	Haplotipos
<b>subsp. <i>carnea</i></b>	20	0,00508 (0,00055)	0,725 (0,065)	15 - 20 - 21 - 22 - 23 - 24
<b>Morfotipo <i>grandense</i></b>	11	0,00423 (0,00075)	0,691 (0,0086)	22 - 21 - 23
<b>Morfotipo <i>mercedeno</i></b>	15	0,00514 (0,00061)	0,621 (0,087)	24 - 20 - 23 - 15
<b>subsp. <i>holosericea</i></b>	12	0,00292 (0,00056)	0,739 (0,098)	- 20 - 23 - 27 - 31 - 32 - 33 - 36
<b>subsp. <i>integrifolia</i></b>	19	0,00453 (0,00058)	0,719 (0,069)	20 - 23 - 27 - 28 - 29 - 30 - 34 - 35
<b>subsp. <i>pinnatifida</i></b>	28	0,00214 (0,00022)	0,858 (0,022)	3 - 4 - 5 - 6 - 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 - 13 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18 - 19
<b>Morfotipo <i>andino</i></b>	2	0,00095 (0,00021)	0,762 (0,115)	3 - 8
<b>Morfotipo <i>chaqueño</i></b>	12	0,00168 (0,00034)	0,654 (0,076)	3- 4- 5 - 6 - 12 - 13
<b>Morfotipo <i>mesopotámico</i></b>	5	0,00020 (0,00015)	0,200 (0,154)	9 - 14 - 15
<b>Morfotipo <i>pampeano</i></b>	3	0,00183 (0,00053)	0,833 (0,222)	3 - 11 - 15 - 19
<b>Morfotipo <i>serrano</i></b>	13	0,00172 (0,00026)	0,731 (0,0070)	3 - 7 - 10 - 11 - 14 - 15 - 16 - 17 - 18
<b>subsp. <i>sidoides</i></b>	10	0,00303 (0,00103)	0,473 (0,136)	21 - 25 - 26

Se obtuvieron 36 haplotipos, de los cuales los haplotipos 1 y 2 fueron encontrados únicamente en las especies empleadas como grupo externo, *Turnera fernandezii* y *T. melochioides*. En el Anexo 1 se muestran las secuencias correspondientes a cada haplotipo indicando únicamente los sitios polimórficos. Los haplotipos 3 y 23 fueron los más frecuentes y se observaron en un 13,54 % de las poblaciones. El haplotipo 20 también fue muy frecuente, observándose en el 10,41 % de las poblaciones. Los 31 haplotipos restantes fueron observados entre el 1,42 % y el 7,29 % de las poblaciones (Tabla 9). La mayoría de las poblaciones presentó un único haplotipo. Del total de poblaciones, 19 (18,75 %) presentaron un haplotipo exclusivo, es decir, presente sólo en esa población. Las poblaciones 22 (haplotipos 23 y 32), 44 (haplotipos 23 y 34), 51 (haplotipos 3 y 4), 55 (haplotipos 3 y 13), 61 (haplotipos 3 y 12), 74 (haplotipos 7 y 10), 75 (haplotipos 7 y 10), y 81 (haplotipos 3 y 17), fueron las únicas en las que se detectaron dos haplotipos.

Muchos haplotipos fueron exclusivos de una única subespecie (Tablas 8 y 9, Fig. 10). Del total de haplotipos hallados en *T. sidoides*, 16 fueron exclusivos de la subespecie *pinnatifida* (H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H16, H17, 18 y H19), 5 de la subespecie *integrifolia* (H28, 29, 34 y 35), 4 de la subespecie *holosericea* (H31, 32, 33, y 36) y 2 de las subespecies *carnea* (H22 detectado en el morfotipo grandense y H24 en el morfotipo mercedeño) y *sidoides* (H25 y 36). Dentro de la subespecie *pinnatifida* los morfotipos andino, mesopotámico y pampeano presentaron un haplotipo exclusivo (H8, H9 y H19, respectivamente), mientras que los morfotipos chaqueño (H4, H5, H6, H12 y H13) y serrano (H7, H10, H16 y H17) los que presentaron el mayor número de haplotipos exclusivos.

Asimismo, algunos haplotipos fueron compartidos por una o más subespecies. El haplotipo H15 fue compartido por las subespecies *carnea* (morfotipo mercedeño) y la subespecie *pinnatifida* (morfotipos mesopotámico, pampeano y serrano); los haplotipos H20 y H23 fueron compartidos por las subespecies *holosericea*, *integrifolia* y *carnea*; el haplotipo H21 por las subespecies *carnea* (morfotipo grandense) y *sidoides* mientras que el haplotipo H27 es compartido por las subespecies *holosericea* e *integrifolia*. Las subespecies *holosericea* e *integrifolia* son las subespecies que comparten un mayor número de haplotipos (H20, 23 y 27). Contrariamente, las subespecies *pinnatifida* y *sidoides* comparte un solo haplotipo (H15 y H21, respectivamente) con la subespecie

*carnea.*

**Tabla 9.** Constitución haplotípica de los haplogrupos. **Ha** = haplogrupo (porcentaje de poblaciones que se incluyen en dicho haplogrupo); **H** = haplotipo (porcentaje de poblaciones en las que se observó dicho haplotipo); **N°** = número de población; **N<sub>p</sub>** = total de poblaciones; **N<sub>i</sub>** = total de individuos; **car** = subsp. *carnea*; **hol** = subsp. *holosericea*; **int** = subsp. *integrifolia*; **pin** = subsp. *pinnatifida*; **sid** = subsp. *sidoides*.

Ha	H	N° (N <sub>p</sub> / N <sub>i</sub> )	Porcentaje haplotipo / subespecie	Porcentaje haplogrupo / subespecies	Ubicación geográfica
			<i>car</i> (100 %)		
	<b>H22</b> (1,42 %)	<b>15</b> (1 / 2)	<i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (0 %) <i>pin</i> (0 %) <i>sid</i> (0 %)		Uruguay (San José)
	<b>H25</b> (1,42 %)	<b>93</b> (1 / 1)	<i>car</i> (0 %) <i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (0 %) <i>pin</i> (0 %) <i>sid</i> (100 %)		Uruguay (Maldonado)
		<b>89</b>		<i>car</i> (8,33 %)	
		<b>90</b>	<i>car</i> (0 %)	<i>hol</i> (8,33 %)	
		<b>91</b>	<i>hol</i> (0 %)	<i>int</i> (16,67 %)	Uruguay (Canelones, Lavalleja, Maldonado y Rocha)
<b>A</b> (12,37 %)	<b>H26</b> (7,29 %)	<b>92</b>	<i>int</i> (0 %)	<i>pin</i> (0,00 %)	
		<b>94</b>	<i>pin</i> (0 %)	<i>sid</i> (66,67 %)	
		<b>95</b>	<i>sid</i> (100 %)		
		<b>96</b> (7 / 10)			
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (50 %)		
	<b>H27</b> (2,08 %)	<b>28</b> <b>34</b> (2 / 3)	<i>int</i> (50 %) <i>pin</i> (0 %) <i>sid</i> (0 %)		Uruguay (Riviera) y Argentina (Corrientes)
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (0 %)		
	<b>H35</b> (1,42 %)	<b>43</b> (1 / 2)	<i>int</i> (100 %) <i>pin</i> (0 %) <i>sid</i> (0 %)		Uruguay (Cerro Largo)

Tabla 9 (continuación).

Ha	H	N° (N <sub>p</sub> / N <sub>i</sub> )	Porcentaje haplotipo / subespecie	Porcentaje haplogrupo / subespecies	Ubicación geográfica
		<b>12</b>	<i>car</i> (80 %)		
		<b>13</b>	<i>hol</i> (0 %)		
	<b>H21</b>	<b>14</b>	<i>int</i> (0 %)		Uruguay (Cerro Largo y Tacuarembó)
	(5,21 %)	<b>16</b>	<i>pin</i> (0 %)		
		<b>97</b>	<i>sid</i> (20 %)		
		(5 / 8)			
			<i>car</i> (100 %)		
			<i>hol</i> (0 %)		
	<b>H24</b>	<b>1</b>	<i>int</i> (0 %)		Argentina (Corrientes)
	(1,42 %)	(1 / 1)	<i>pin</i> (0 %)		
			<i>sid</i> (0 %)		
			<i>car</i> (0 %)		
		<b>32</b>	<i>hol</i> (0 %)		
	<b>H28</b>	<b>33</b>	<i>int</i> (100 %)	<i>car</i> (38,46 %)	Argentina (Corrientes)
	(3,13 %)	<b>36</b>	<i>pin</i> (0 %)	<i>hol</i> (23,08 %)	
		(3 / 5)	<i>sid</i> (0 %)	<i>int</i> (30,77 %)	
				<i>pin</i> (0,00 %)	
<b>B</b>			<i>car</i> (0 %)	<i>sid</i> (7,69 %)	
(13,40 %)			<i>hol</i> (0 %)		
	<b>H29</b>	<b>35</b>	<i>int</i> (100 %)		Argentina (Corrientes)
	(1,42 %)	(1 / 4)	<i>pin</i> (0 %)		
			<i>sid</i> (0 %)		
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (100 %)		
	<b>H31</b>	<b>29</b>	<i>int</i> (0 %)		Uruguay (Tacuarembó)
	(1,42 %)	(1 / 2)	<i>pin</i> (0 %)		
			<i>sid</i> (0 %)		
			<i>car</i> (0 %)		
		<b>26</b>	<i>hol</i> (100 %)		
	<b>H36</b>	<b>30</b>	<i>int</i> (0 %)		Uruguay (Florida)
	(2,08 %)	(2 / 2)	<i>pin</i> (0 %)		
			<i>sid</i> (0 %)		

Tabla 9 (continuación).

Ha	H	N° (N <sub>p</sub> / N <sub>i</sub> )	Porcentaje haplotipo / subespecie	Porcentaje haplogrupo / subespecies	Ubicación geográfica
		<u>2</u>			
		<u>7</u>			
		<u>8</u>			
		<u>9</u>	<i>car</i> (40 %)		
		<u>25</u>	<i>hol</i> (20 %)		Argentina
	<b>H20</b>	<u>27</u>	<i>int</i> (30 %)		(Corrientes y
	(10,42 %)	<u>38</u>	<i>pin</i> (10 %)		Misiones) y
		<u>39</u>	<i>sid</i> (0 %)		Uruguay (Artigas,
		<u>40</u>			Rivera y
		<u>41</u>			Paisandú)
		(10 / 11)			
		<u>6</u>			
		<u>10</u>			
		<u>11</u>			Argentina
		<u>17</u>			(Corrientes),
		<u>18</u>	<i>car</i> (30,77 %)		Brasil (RS,
		<u>19</u>	<i>hol</i> (46,15 %)		Cachoeira do Sul,
	<b>H23</b>	<u>20</u>	<i>int</i> (23,08 %)		Encruzilhada do
	(13,54 %)	<u>22</u>	<i>pin</i> (0 %)	<i>car</i> (33,33 %)	Sul, Bagé,
		<u>23</u>	<i>sid</i> (0 %)	<i>hol</i> (37,50 %)	Camaquá, Pelotas
		<u>24</u>		<i>int</i> (25,00 %)	y Rochas de Bagé)
		<u>37</u>		<i>pin</i> (4,17 %)	y Uruguay (Cerro
	<b>C</b>	<u>42</u>		<i>sid</i> (0,00 %)	Largo y Treinta y
	(24,74 %)	<u>44</u>			Tres)
		(13 / 16)			
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (100 %)		
	<b>H32</b>	<u>22</u>	<i>int</i> (0 %)		Brasil (RS,
	(1,42 %)	(1 / 1)	<i>pin</i> (0 %)		Camaquá)
			<i>sid</i> (0 %)		
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (100 %)		
	<b>H33</b>	<u>21</u>	<i>int</i> (0 %)		Brasil (RS,
	(1,42 %)	(1 / 2)	<i>pin</i> (0 %)		Caçapava do Sul)
			<i>sid</i> (0 %)		
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (0 %)		
	<b>H34</b>	<u>44</u>	<i>int</i> (100 %)		Uruguay (Treinta
	(1,42 %)	(1 / 1)	<i>pin</i> (0 %)		y Tres)
			<i>sid</i> (0 %)		

Tabla 9 (continuación).

Ha	H	N° (N <sub>p</sub> / N <sub>i</sub> )	Porcentaje haplotipo / subespecie	Porcentaje haplogrupo / subespecies	Ubicación geográfica
		45			
		46			
		49			
		51			
		54	<i>car</i> (0 %)		Argentina
		55	<i>hol</i> (0 %)		(Buenos Aires,
	<b>H3</b>	58	<i>int</i> (0 %)		Chaco, Córdoba,
	(13,54 %)	59	<i>pin</i> (100 %)		Jujuy y Salta) y
		60	<i>sid</i> (0 %)		Bolivia
		61			(Cochabamba y
		70			Tarija)
		81			
		<u>82</u>			
		(13 / 23)			
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (0 %)		
		51	<i>int</i> (0 %)		
	<b>H4</b>	<u>53</u>	<i>pin</i> (100 %)		Argentina (Chaco
	(2,08 %)	(2 / 7)	<i>sid</i> (0 %)		y Corrientes)
			<i>car</i> (0 %)	<i>car</i> (6,25 %)	
			<i>hol</i> (0 %)	<i>hol</i> (0,00 %)	
		52	<i>int</i> (0 %)		Argentina (Chaco
	<b>H5</b>	<u>56</u>	<i>pin</i> (100 %)	<i>int</i> (2,08 %)	y Santiago del
<b>D</b>	(2,08 %)	(2 / 3)	<i>sid</i> (0 %)	<i>pin</i> (91,67 %)	Estero)
(50,51 %)				<i>sid</i> (0,00 %)	
			<i>car</i> (0 %)		
		48	<i>hol</i> (0 %)		Argentina
	<b>H6</b>	50	<i>int</i> (0 %)		(Catamarca, Salta,
	(3,13 %)	<u>57</u>	<i>pin</i> (100 %)		y Santiago del
		(3 / 4)	<i>sid</i> (0 %)		Estero)
		72	<i>car</i> (0 %)		
		73	<i>hol</i> (0 %)		
		74	<i>int</i> (0 %)		Argentina
	<b>H7</b>	75	<i>pin</i> (100 %)		(Córdoba)
	(7,29 %)	76	<i>sid</i> (0 %)		
		77			
		<u>78</u>			
		(7 / 13)			
			<i>car</i> (0 %)		
			<i>hol</i> (0 %)		
			<i>int</i> (0 %)		
	<b>H8</b>	<u>47</u>	<i>pin</i> (100 %)		Argentina (Salta)
	(1,42 %)	(1 / 2)	<i>sid</i> (0 %)		

Tabla 9 (continuación).

Ha	H	N° (N <sub>p</sub> / N <sub>i</sub> )	Porcentaje haplotipo / subespecie	Porcentaje haplogrupo / subespecies	Ubicación geográfica
D	H9 (1,42 %)	<u>63</u> (1 / 3)	<i>car</i> (0 %)	Argentina (Corrientes)	
			<i>hol</i> (0 %)		
			<i>int</i> (0 %)		
			<i>pin</i> (100 %)		
			<i>sid</i> (0 %)		
	H10 (2,08 %)	<u>74</u> <u>75</u> (2 / 2)	<i>car</i> (0 %)	Argentina (Córdoba)	
			<i>hol</i> (0 %)		
			<i>int</i> (0 %)		
			<i>pin</i> (100 %)		
	H11 (4,17 %)	<u>69</u> <u>71</u> <u>86</u> <u>87</u> (4 / 7)	<i>car</i> (0 %)	Argentina (Buenos Aires) y Uruguay (Lavalleya y Punta Gorda)	
			<i>hol</i> (0 %)		
			<i>int</i> (0 %)		
			<i>pin</i> (100 %)		
			<i>sid</i> (0 %)		
	H12 (1,42 %)	<u>61</u> (1 / 1)	<i>car</i> (0 %)	Bolivia (Tarija)	
<i>hol</i> (0 %)					
<i>int</i> (0 %)					
<i>pin</i> (100 %)					
<i>sid</i> (0 %)					
H13 (1,42 %)	<u>55</u> (1 / 1)	<i>car</i> (0 %)	Argentina (Salta)		
		<i>hol</i> (0 %)			
		<i>int</i> (0 %)			
		<i>pin</i> (100 %)			
		<i>sid</i> (0 %)			
H14 (5,21 %)	<u>64</u> <u>65</u> <u>66</u> <u>67</u> <u>88</u> (5 / 7)	<i>car</i> (0 %)	Argentina (Corrientes) y Uruguay (Paisandú y Salto)		
		<i>hol</i> (0 %)			
		<i>int</i> (0 %)			
		<i>pin</i> (100 %)			
		<i>sid</i> (0 %)			
H15 (7,29 %)	3 4 5 <u>62</u> <u>68</u> <u>79</u> <u>80</u> (7 / 9)	<i>car</i> (42,86 %)	Argentina (Córdoba) y Corrientes) y Uruguay (Río Negro)		
		<i>hol</i> (0 %)			
		<i>int</i> (0 %)			
		<i>pin</i> (57,14 %)			
		<i>sid</i> (0 %)			

Tabla 9 (continuación).

Ha	H	Nº (N <sub>p</sub> / N <sub>i</sub> )	Porcentaje haplotipo / subespecie	Porcentaje haplogrupo / subespecies	Ubicación geográfica
<b>D</b>	<b>H16</b> (1,42 %)	<b>83</b> (1 / 2)	<i>car</i> (0 %) <i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (0 %) <i>pin</i> (100 %) <i>sid</i> (0 %)		Argentina (Córdoba)
	<b>H17</b> (1,42 %)	<b>81</b> (1 / 1)	<i>car</i> (0 %) <i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (0 %) <i>pin</i> (100 %) <i>sid</i> (0 %)		Argentina (Córdoba)
	<b>H18</b> (1,42 %)	<b>84</b> (1 / 1)	<i>car</i> (0 %) <i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (0 %) <i>pin</i> (100 %) <i>sid</i> (0 %)		Uruguay (Colonia)
	<b>H19</b> (1,42 %)	<b>85</b> (1 / 2)	<i>car</i> (0 %) <i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (0 %) <i>pin</i> (100 %) <i>sid</i> (0 %)		Uruguay (Colonia)
	<b>H30</b> (1,42 %)	<b>31</b> (1 / 1)	<i>car</i> (0 %) <i>hol</i> (0 %) <i>int</i> (100 %) <i>pin</i> (0 %) <i>sid</i> (0 %)		Argentina (Corrientes)

## RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE HAPLOTIPOS

El análisis de la red de haplotipos (Figs. 9 y 10) mostró la presencia de varios haplotipos más frecuentes (de centro) a partir de los cuales derivan otros haplotipos menos frecuentes (de punta). Estos últimos se encuentran separados, en su mayoría, por una sola mutación del haplotipo central del cual derivan. En las Figuras 9 y 10 se observa que los diferentes haplotipos se agrupan claramente en cuatro grupos de haplotipos más relacionados entre sí que con otros haplotipos (haplogrupos). Estos haplogrupos están conformados por entre 5 a 18 haplotipos separados por varios pasos mutacionales.

El haplogrupo A presentó una forma lineal, con un haplotipo central más frecuente (el haplotipo 26), un haplotipo derivado (haplotipo 25), y tres haplotipos más basales de poca frecuencia (haplotipos 22, 27 y 35).

El haplogrupo B está constituido por 2 subgrupos, ambos con 3 haplotipos. Uno de los subgrupos incluyó al haplotipo 21, el haplotipo más frecuente en todo el haplogrupo y presente en 5 poblaciones. Del haplotipo 21 deriva el haplotipo 28 (presente en tres poblaciones), el cual da origen al haplotipo 29 que se observó exclusivamente en la población 35. El otro subgrupo incluyó al haplotipo 36, presente en dos poblaciones y del cual derivan los haplotipos 24 y 31, cada uno exclusivo de una población particular.

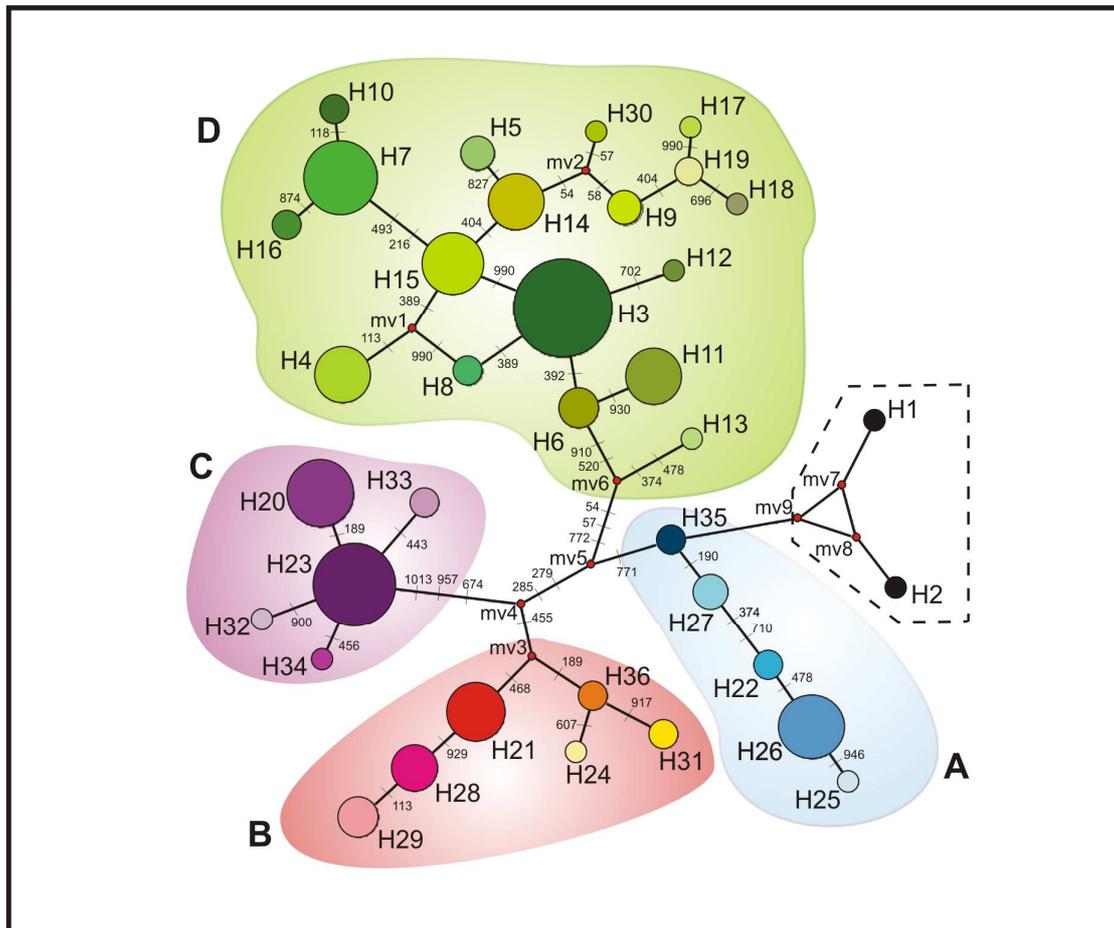
El haplogrupo C presentó una clara configuración en estrella, con un haplotipo central (haplotipo 23) del cual derivan los restantes haplotipos de punta, los cuales se separan del haplotipo central por un sólo paso mutacional. En este haplogrupo se encontraron dos de los haplotipos más frecuentes, el haplotipo 23 presente en 13 poblaciones, y el haplotipo 20 presente en 10 poblaciones. Los tres haplotipos restantes (haplotipos 32, 33 y 34) fueron exclusivos cada uno de una población en particular.

El haplogrupo D fue el más numeroso, conformado por 18 haplotipos, 9 de los cuales son exclusivos y los otros 9 están presentes en 2 a 13 poblaciones. Posee un haplotipo central (haplotipo 3) presente en 13 poblaciones a partir del cual derivan, directa o indirectamente, haplotipos también centrales, pero de menor frecuencia, como ser los haplotipos 7 y 15, presentes en 7 poblaciones, y el haplotipo 14, presente en 5

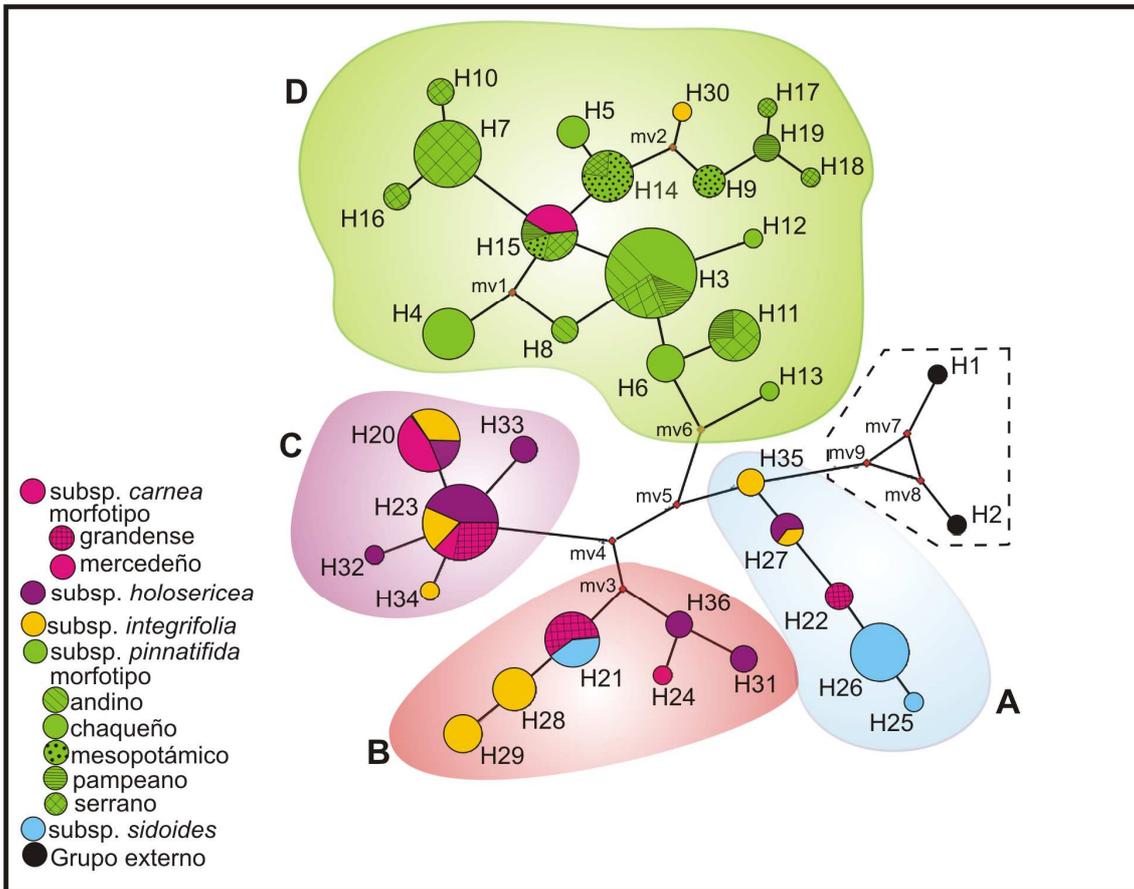
poblaciones. Se observa también, en este haplogrupo, la presencia de varios haplotipos de punta, presentes en 1 a 4 poblaciones, y derivados de los haplotipos centrales antes mencionados.

Algunas de las subespecies de *T. sidoides* presentaron haplotipos pertenecientes a diferentes haplogrupos (Fig. 10, Tabla 9). Sin embargo ninguno de los haplogrupos quedó constituido por haplotipos presentes en las 5 subespecies ni fue exclusivo de una única subespecie. La subespecie *carnea* presentó haplotipos pertenecientes a los 4 haplogrupos, principalmente a los haplogrupos B (33,33 %) y C (33,33 %), con una población en donde se observó un haplotipo exclusivo perteneciente al haplogrupo A, y tres poblaciones en las cuales se observó un haplotipo perteneciente al haplogrupo D. La subespecie *holosericea* presentó en su mayoría haplotipos pertenecientes al haplogrupo C (57,14 %), aunque también se encontraron haplotipos pertenecientes a los haplogrupos A (14,29 %) y B (28,57 %). La subespecie *integrifolia* también presentó haplotipos correspondientes a los 4 haplogrupos, con mayor porcentaje de haplotipos pertenecientes al haplogrupo C (37,5 %), y con tan sólo una población presentando un haplotipo exclusivo de la misma y perteneciente al haplogrupo D. Con respecto a la subespecie *pinnatifida*, la misma presentó exclusivamente haplotipos pertenecientes al haplogrupo D. Por último en la subespecie *sidoides* la mayor parte de los haplotipos pertenecían al haplogrupo A (66,67 %), excepto un haplotipo perteneciente al haplogrupo B.

Al analizar los niveles de ploidía de las distintas poblaciones en relación a la presencia de haplotipos en cada una, se observó que en el haplogrupo A y C todos los haplotipos se encontraron en poblaciones poliploides. En cambio para los haplogrupos B y D muchos de los haplotipos centrales se encontraban en poblaciones diploides, mientras que los haplotipos derivados eran en su mayoría poliploides.



**Figura 9.** Red de haplotipos que muestra las relaciones evolutivas entre los 36 haplotipos hallados en *Turnera sidoides* y las dos especies empleadas como grupo externo (combinación de las secuencias *trnL* – *trnF* y *matK5'*-*matK6*). Cada círculo representa un haplotipo, el tamaño de los mismos es proporcional a su frecuencia. Las líneas que unen a los círculos representan las relaciones entre los haplotipos y los números sobre éstas representan la posición nucleotídica en donde se presenta una mutación. Los círculos rojos pequeños representan los vectores medios y se encuentran denotados con las letras mv. Las líneas de puntos delimitan al grupo externo. Los haplogrupos se representan con colores y letras diferentes.



**Figura 10.** Red de haplotipos que muestra las relaciones evolutivas entre los 36 haplotipos hallados en *Turnera sidoides* y las dos especies empleadas como grupo externo (combinación de las secuencias *trnL - trnF* y *matK5'-matK6*) y su representación en las cinco subespecies. Las líneas de puntos delimitan al grupo externo. Los haplogrupos se representan con colores y letras diferentes.

Los mismos índices de diversidad calculados para el complejo como un todo fueron calculados para cada haplogrupo (Tabla 10). El haplogrupo D mostró los valores más elevados de diversidad, mientras que el haplogrupo C fue el que presentó los valores más bajos. En todos los casos la diversidad nucleotídica presentó valores bajos, mientras que para la diversidad haplotípica se observaron valores altos.

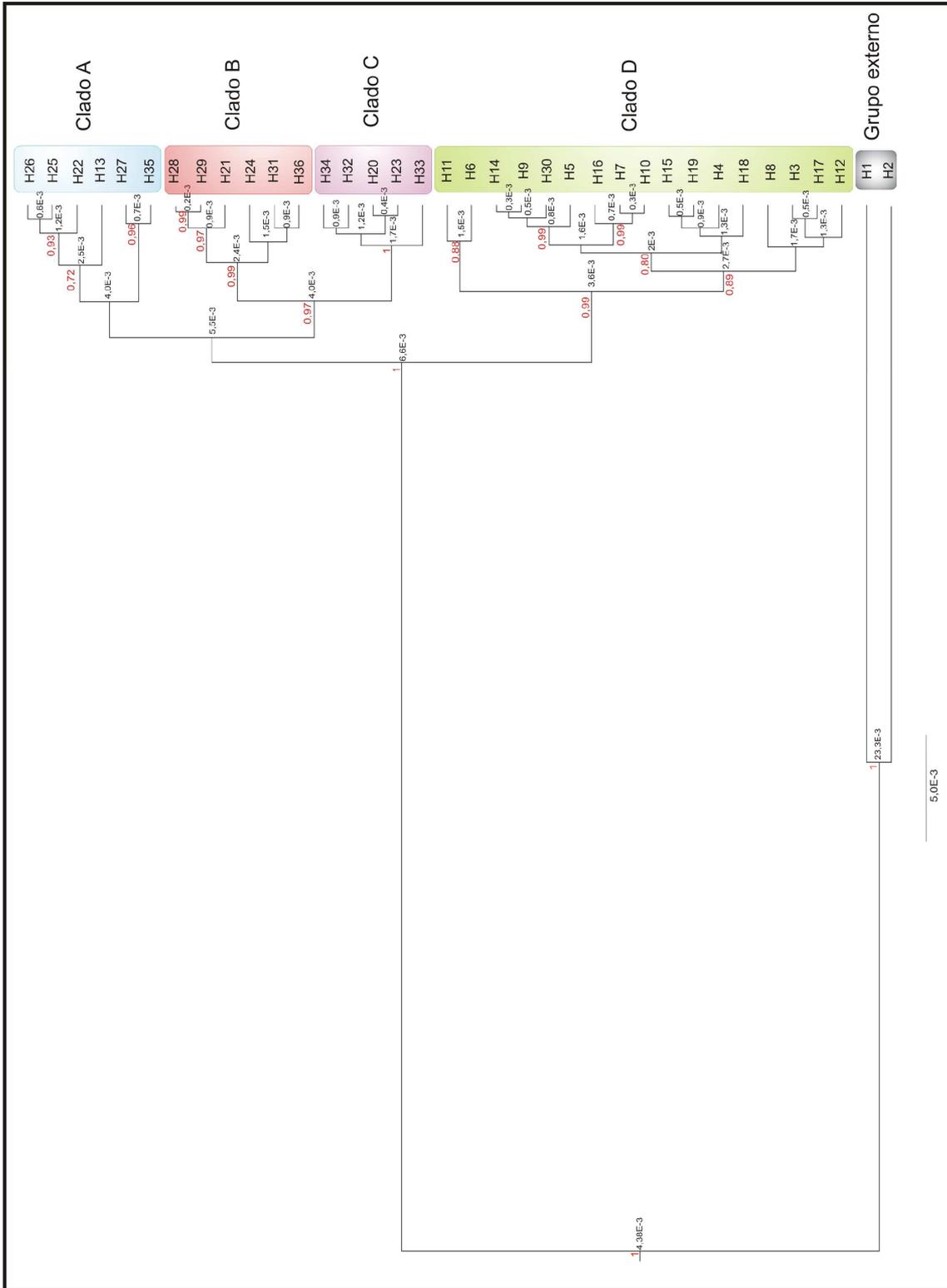
**Tabla 10.** Estadísticos de resumen para cada haplogrupo. **H** = número de haplotipos; **N** = total de poblaciones (total de individuos); **S** = sitios polimórficos;  $\pi$  = diversidad nucleotídica; **h** = diversidad haplotípica; **DE** = desvío estándar.

HAPLOGRUPO	H	N	S	$\pi$ (DE)	h (DE)
A	5	12 (18)	5	0,00146 (0,00025)	0,634 (0,093)
B	6	13 (22)	6	0,00113 (0,00020)	0,714 (0,062)
C	5	24 (31)	4	0,00025 (0,00011)	0,234 (0,099)
D	18	48 (89)	22	0,00189 (0,00015)	0,861 (0,019)

### FILOGENIA INTRAESPECÍFICA

El árbol filogenético bayesiano obtenido a partir de secuencias de ADNcp (Fig. 11) mostró cuatro clados principales, cada uno de los cuales comprendió a uno de los cuatro haplogrupos identificados en la red de haplotipos, motivo por el cual se los ha identificado con las mismas letras. El haplotipo 13, presente en un único individuo de la población 55, se ubicó en el árbol dentro del clado A, cuando en la red de haplotipos fue incluido en el haplogrupo D. Los haplotipos correspondientes al grupo externo quedaron claramente diferenciados del grupo interno. Los valores de soporte para los clados B, C y D fueron elevados. Se puede observar que el clado D, el cual presenta casi en su mayoría poblaciones pertenecientes a la subespecie *pinnatifida*, se separa primero de los demás clados, diferenciándose de los mismos por 0,66E-3 sustituciones por sitio. Los clados A, B y C se agrupan en un clado monofilético, del mismo se separa el clado A de

los clados B y C por  $0,55E-3$  sustituciones por sitio, mientras que los clados B y C se encuentran más relacionados entre sí que con los demás clados.



**Figura 11.** Árbol filogenético bayesiano mostrando las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de *Turnera sidoides* y el grupo externo obtenido a partir de secuencias de ADNcp. Los números en color rojo representan los valores de las probabilidades posteriores ( $\square$  0,7), obtenidas mediante inferencia Bayesiana. El número de sustituciones / sitio / Ma se indica en cada bifurcación. Los colores representan los haplogrupos detectados en la red de haplotipos.

### ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS

La mayoría de los estadísticos de neutralidad calculados fueron no significativos, tanto en el complejo *T. sidoides* como en los haplogrupos, con la excepción de los estadísticos D de Tajima y rg de Harpending los cuales resultaron significativos para el haplogrupo C (Tabla 11).

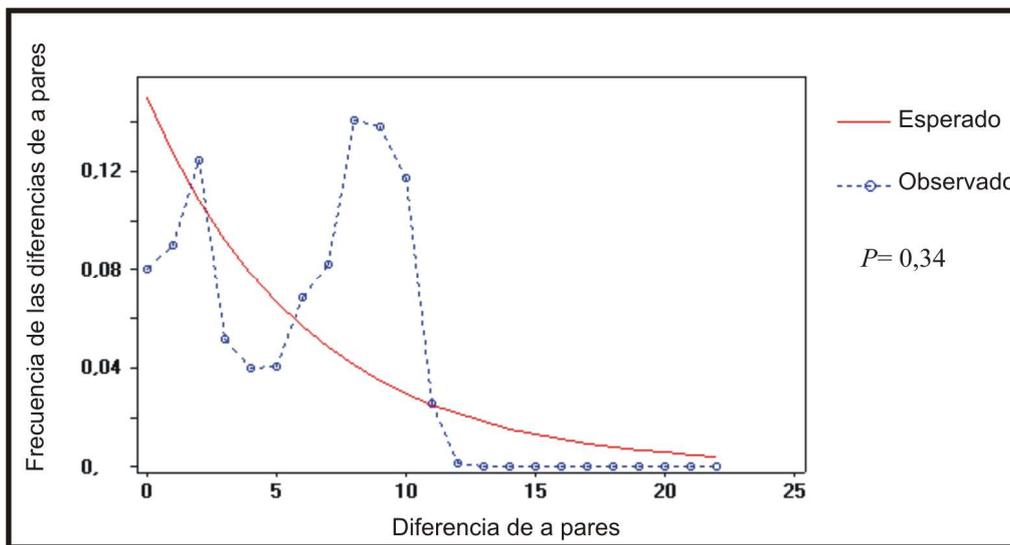
**Tabla 11.** Estadísticos de neutralidad calculados para el complejo *Turnera sidoides* y para cada uno de los haplogrupos encontrados en la red de haplotipos. **D** = D de Tajima; **Fs** = Fs de Fu; **rg** = índice raggedness de Harpending.

	<i>T. sidoides</i>	Haplogrupo A	Haplogrupo B	Haplogrupo C	Haplogrupo D
<b>D</b>	0,203 <i>P</i> = 0,648	0,777 <i>P</i> = 0,785	0,106 <i>P</i> = 0,585	-1,544* <i>P</i> = 0,025	-0,880 <i>P</i> = 0,217
<b>Fs</b>	-3,803 <i>P</i> = 0,215	0,047 <i>P</i> = 0,518	-0,374 <i>P</i> = 0,420	-1,437 <i>P</i> = 0,118	-4,510 <i>P</i> = 0,067
<b>rg</b>	0,011 <i>P</i> = 0,570	0,095 <i>P</i> = 0,641	0,024 <i>P</i> = 0,964	0,199* <i>P</i> = 0,021	0,014 <i>P</i> = 0,913

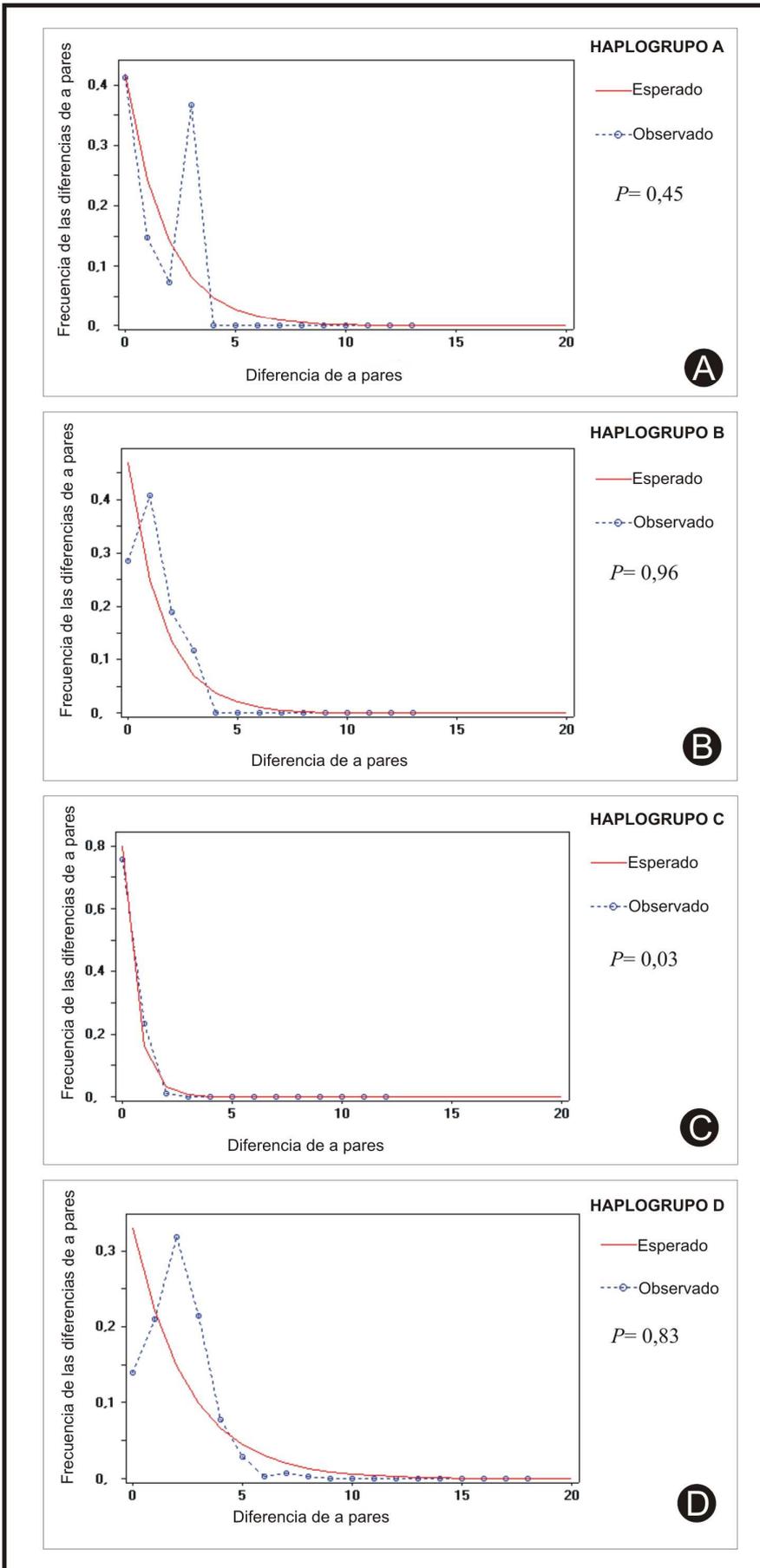
\*significativo  $P < 0,05$ .

La distribución de diferencias pareadas observada a nivel del complejo fue multimodal (Fig. 12). Al analizar la distribución de diferencias pareadas en cada

haplogrupo (Fig. 13), se observó que únicamente el haplogrupo C presentó una distribución unimodal con ajuste significativo al modelo de expansión poblacional (Fig. 13 C).

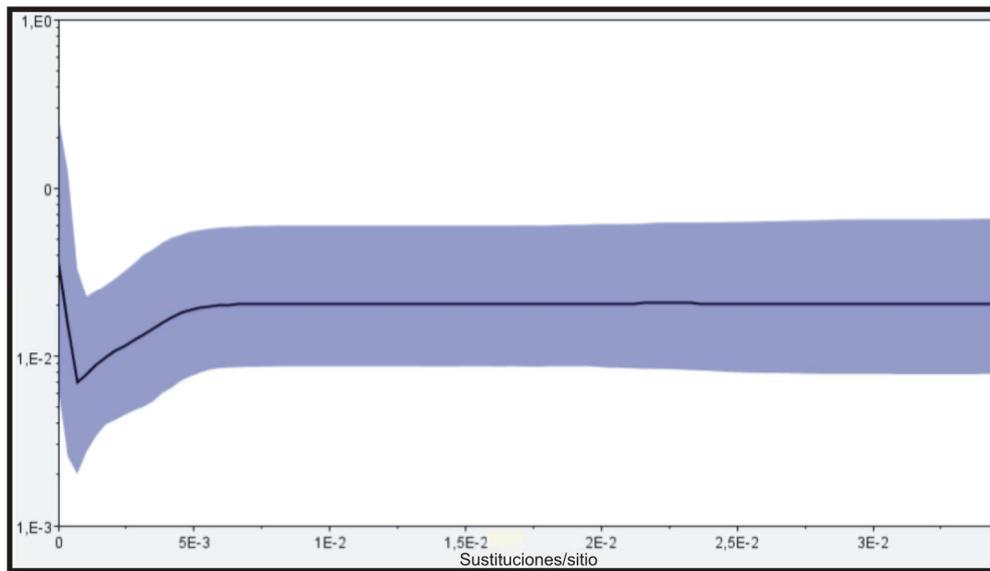


**Figura 12.** Distribución de diferencias de a pares (*mismatch distribution*) observadas en el complejo *Turnera sidoides*. El eje horizontal indica las diferencias de a pares entre las secuencias y el eje vertical su frecuencia. La línea roja señala la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional súbita luego de un cuello de botella. La línea azul señala la distribución observada en el conjunto de los datos.

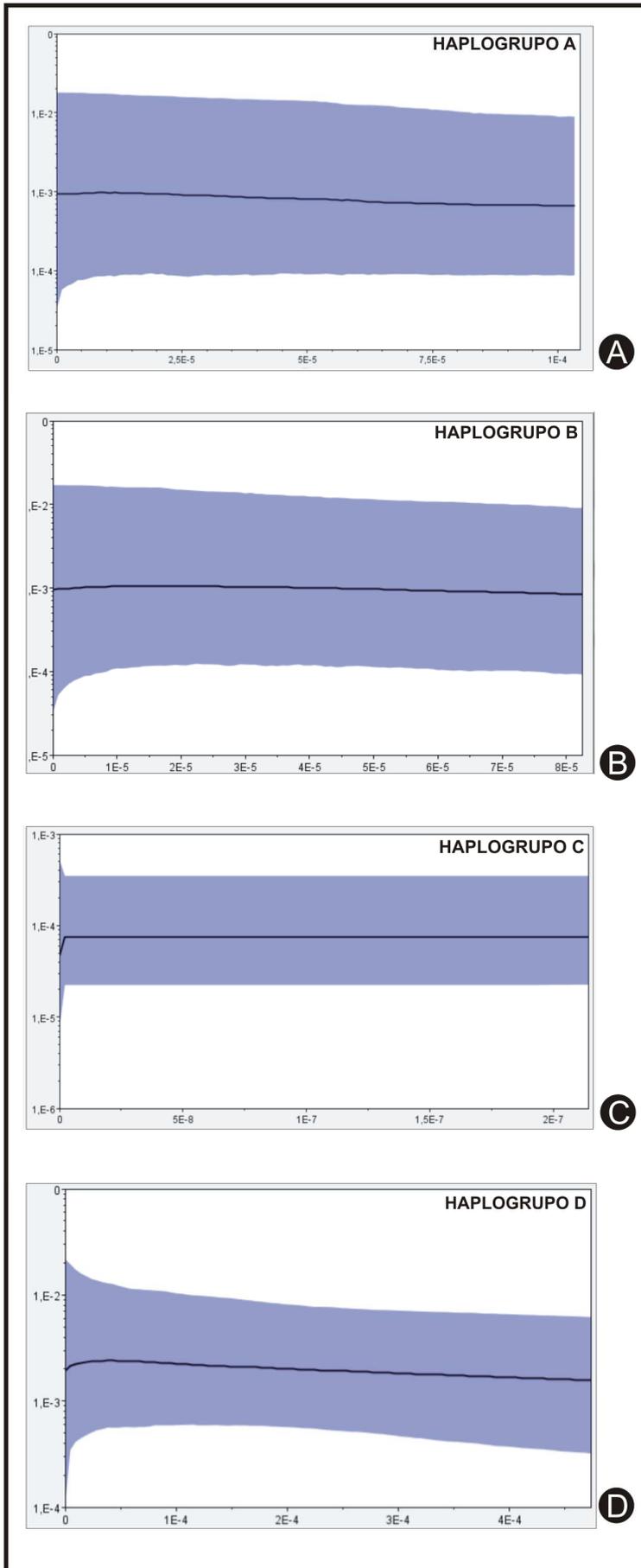


**Figura 13.** Distribución de diferencias de a pares (*mismatch distribution*) en cada haplogrupo. El eje horizontal indica las diferencias de a pares entre las secuencias y el eje vertical su frecuencia. La línea roja representa la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional súbita luego de un cuello de botella. La línea azul señala la distribución observada en el conjunto de datos.

El análisis de los perfiles bayesianos realizados en el complejo como un todo mostró un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral de pequeño tamaño efectivo. En cada haplogrupo este análisis no mostró evidencias de cambios en el tamaño poblacional efectivo, a excepción del haplogrupo C en donde se evidenció una ligera disminución en el tamaño poblacional (Figs. 14 y 15).



**Figura 14.** Perfil demográfico obtenido a partir del análisis bayesiano del ADNcp, donde se muestra la fluctuación en el tamaño efectivo ( $N_e$ ) de *Turnera sidoides*. El eje x representa las sustituciones por sitio. La línea negra representa la media estimada y el área celeste representa el 95 % de intervalo de confianza.



**Figura 15.** Perfil demográfico obtenido a partir del análisis bayesiano del ADNcp, donde se muestra las fluctuaciones del tamaño poblacional efectivo ( $N_e$ ) de cada uno de los haplogrupos de *Turnera sidoides*. El eje x representa las sustituciones por sitio. La línea negra representa la media estimada y el área celeste representa el 95 % de intervalo de confianza.

## ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

### *Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA)*

Los análisis de la varianza molecular (AMOVA) resultaron estadísticamente significativos. Tanto las subespecies taxonómicas como los haplogrupos identificados en la red de haplotipos, fueron genéticamente diferentes entre sí (Tablas 12, 13 y 14). Los resultados indicaron que el porcentaje de variación genética es mayor entre las subespecies (58,53%) y entre los haplogrupos (80,20%) que dentro de los mismos. En la matriz de distancias genéticas entre subespecies se observa que la mayor distancia se da entre la subespecie *pinnatifida* y la subespecie *sidoides*, mientras que las menores distancias se dan entre la subespecie *integrifolia* y la subespecie *carnea*, y entre esta última y la subespecie *holosericea*. Todas las distancias genéticas entre haplogrupos fueron elevadas, las mismas variaron desde 0,75893 entre los haplogrupos A y D, hasta 0,88582 entre los haplogrupos A y C.

**Tabla 12.** Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) basado en datos de secuencias de ADNcp de *Turnera sidoides*. g.l. = grados de libertad.

<b>Agrupamiento</b>	<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componente de la varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
<b>Subespecies</b>	Entre subespecies	4	319,842	2,924	58,53 %
	Dentro de subespecies	155	321,770	2,072	41,47 %
	Total	154	641,019	4,996	100,00 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,585^*$					
<b>Haplogrupos</b>	Entre haplogrupos	3	463,027	4,622	80,20 %
	Dentro de haplogrupos	153	177,992	1,141	19,80 %
	Total	159	641,019	5,763	100 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,802^*$					

\*significativo  $P < 0,05$

**Tabla 13.** Matriz de distancias genéticas entre las subespecies de *Turnera sidoides*.

<i>T. sidoides</i>	subsp. <i>carnea</i>	subsp. <i>holosericea</i>	subsp. <i>integrifolia</i>	subsp. <i>pinnatifida</i>	subsp. <i>sidoides</i>
subsp. <i>carnea</i>	0,0000				
subsp. <i>holosericea</i>	0,05853*	0,0000			
subsp. <i>integrifolia</i>	0,05637*	0,12696*	0,0000		
subsp. <i>pinnatifida</i>	0,55119*	0,71363*	0,66126*	0,0000	
subsp. <i>sidoides</i>	0,40713*	0,58519*	0,46566*	0,71984*	0,0000

\*significativo  $P < 0,05$

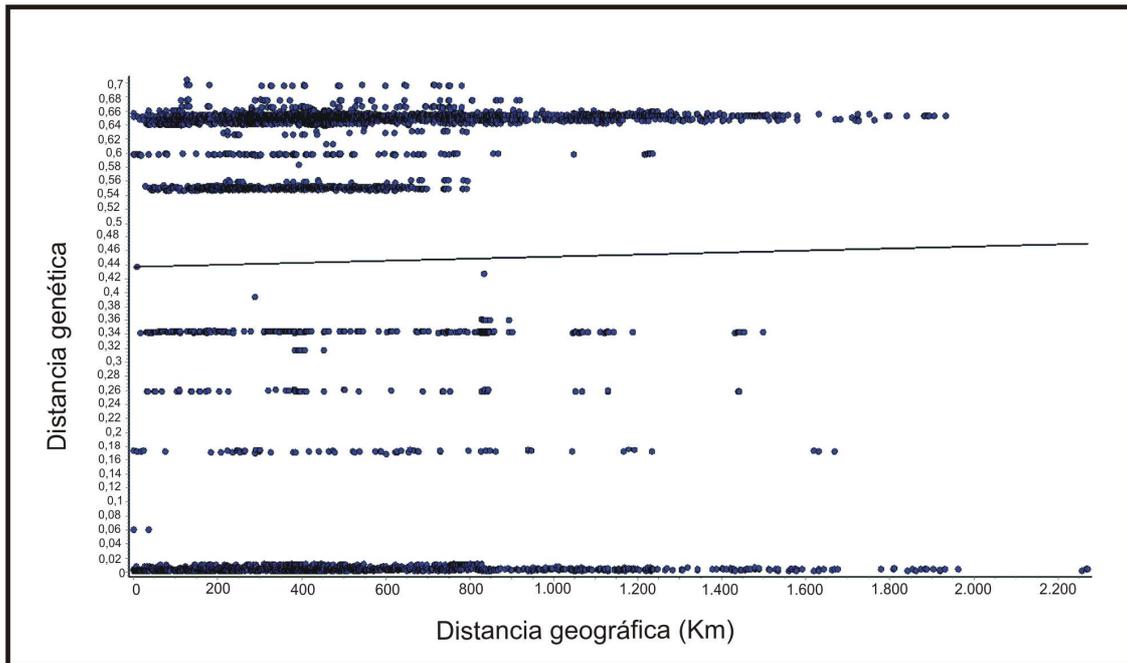
**Tabla 14.** Matriz de distancias genéticas entre los haplogrupos hallados en *Turnera sidoides*.

	Haplogrupo A	Haplogrupo B	Haplogrupo C	Haplogrupo D
Haplogrupo A	0,0000			
Haplogrupo B	0,79926*	0,0000		
Haplogrupo C	0,88582*	0,80267*	0,0000	
Haplogrupo D	0,75893*	0,77280*	0,81590*	0,0000

\*significativo  $P < 0,05$

### *Test de Mantel*

El test de Mantel reveló que la divergencia genética entre las poblaciones no está correlacionada con la distancia geográfica ( $r = 0,019$ ;  $P = 0,806$ ) por lo que la variación genética no está estructurada clinalmente (Fig. 16).



**Figura 16.** Relación entre la distancia genética obtenida a partir de las secuencias de ADNcp y la distancia geográfica (Km) entre las poblaciones analizadas de *Turnera sidoides*.

## **DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA**

La distribución geográfica de los haplotipos y de los haplogrupos se muestra en la Figura 17, en la misma se observa una clara estructuración geográfica de la variabilidad genética, tanto a nivel de haplotipos, como de haplogrupos.

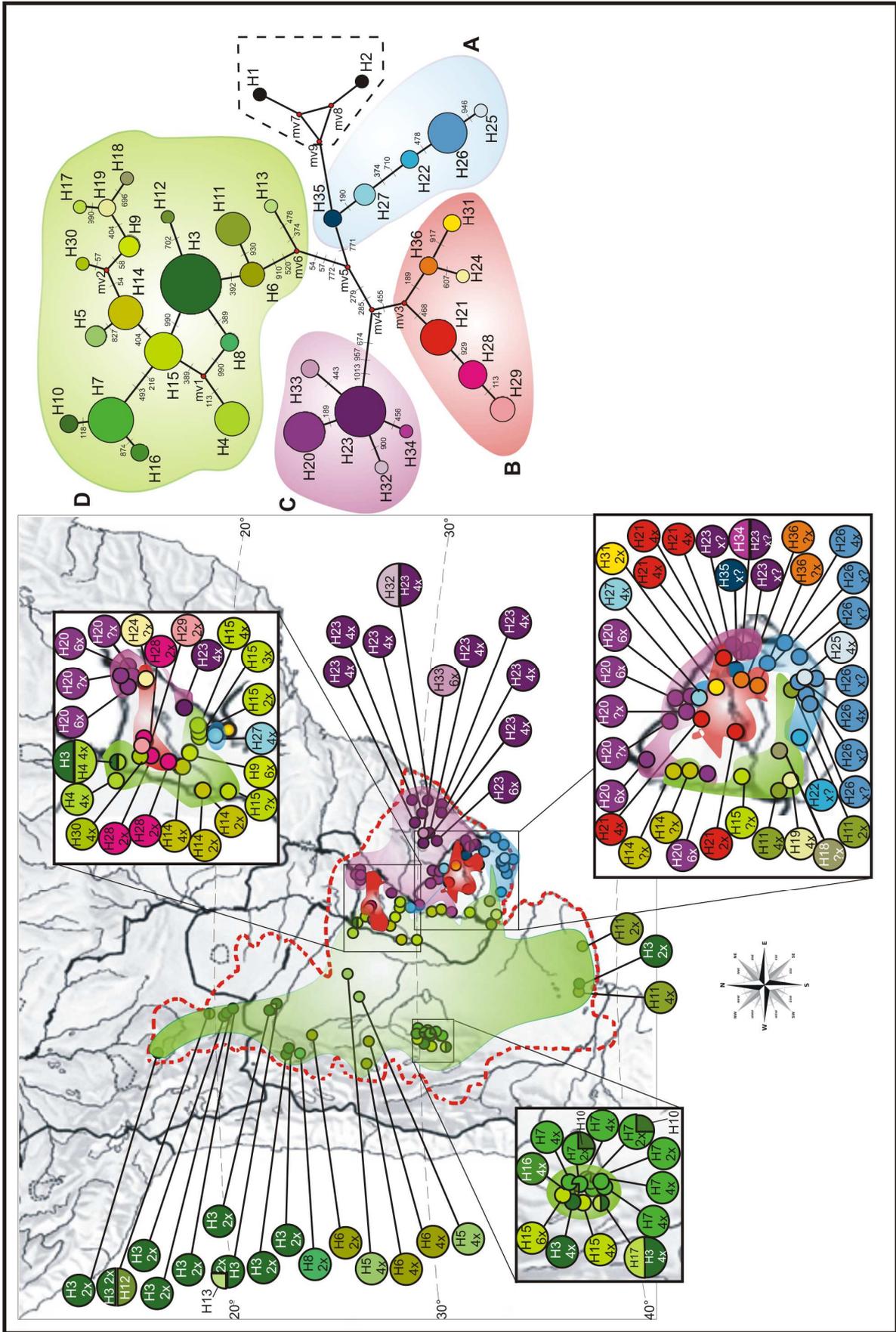
Las regiones geográficas con mayor número de haplotipos fueron Uruguay y el noreste de Argentina. En Uruguay se encontraron 16 haplotipos (haplotipos 11, 14, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 26, 27, 31, 34, 35 y 36), diez de los cuales fueron exclusivos (haplotipos 18, 19, 21, 22, 25, 26, 31, 34, 35 y 36) y, de éstos, cuatro se hallaron de manera exclusiva al este de Uruguay (haplotipos 31, 34, 35 y 36). En el noreste de Argentina (este de la provincia del Chaco, toda la provincia de Corrientes y sur de Misiones) se encontraron 12 haplotipos (haplotipos 3, 4, 9, 14, 15, 20, 23, 24, 27, 28, 29 y 30). Del total de haplotipos encontrados en esta región 7 fueron exclusivos (haplotipos 4, 9, 24, 27, 28, 29 y 30).

En las Sierras de Córdoba (Argentina) se encontraron 6 haplotipos (haplotipos 3, 7, 10, 15, 16 y 17), de los cuales 4 fueron exclusivos de la región (haplotipos 7, 10, 16 y 17). De éstos, el haplotipo 7 fue el más frecuente, estando presente en 7 poblaciones, mientras que los demás haplotipos se observaron en 1 a 2 poblaciones. En el noroeste del área de distribución de la especie (sur de Bolivia, Jujuy, Salta, oeste de Catamarca y Santiago del Estero) fueron hallados 6 haplotipos (haplotipos 3, 5, 6, 8, 12 y 13), todos exclusivos de dicha región excepto el haplotipo 3. En el S de Rio Grande do Sul (Brasil) se halló de manera casi exclusiva el haplotipo 23, aunque también se encontraron otros dos haplotipos (haplotipos 32 y 33), cada uno exclusivo de una única población. Finalmente, el sur del área de distribución de la especie (sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina) fue el área en la que se detectó la menor diversidad de haplotipos, con sólo 2 haplotipos (haplotipos 3 y 11), ninguno exclusivo de la región.

Si bien se aprecia la estructuración geográfica de los haplotipos, algunos de ellos fueron encontrados en distintas regiones, como el haplotipo 11, el cual se encontró en las poblaciones del límite sur del área de distribución de la especie, en Sierra de la Ventana y en San Cayetano (Pcia. de Buenos Aires, Argentina), y en el suroeste de Uruguay, en Punta Gorda. El haplotipo 15 se encontró en varias poblaciones del sur de la provincia de Corrientes, en una población al centro – oeste de Uruguay, en Río Negro

y, en las Sierras de Córdoba. El haplotipo 27 se encontró al sureste de la provincia de Corrientes, en Monte Caseros, y al noreste de Uruguay, en el Cerro Miriñaque en Rivera.

En relación a la distribución geográfica de los haplogrupos, el haplogrupo A se encontró principalmente en el este y sur de Uruguay (Dptos. Canelones, Cerro Largo, Lavalleja, Maldonado, Rocha y San José), aunque también se hallaron dos poblaciones, ambas con el haplotipo 27, una de ellas en el noreste de Uruguay (Dpto. Rivera) y la otra en el sureste de la provincia de Corrientes (Argentina). El haplogrupo B fue hallado en el centro – norte de Uruguay (Dptos. Cerro Largo, Florida y Tacuarembó) y en el centro de la provincia de Corrientes en Argentina. El haplogrupo C fue el único hallado en Brasil y también fue detectado en el norte de Uruguay (Dptos. Artigas, Cerro Largo, Rivera, Paysandú y Treinta y Tres) y el noreste de Argentina (este y noreste de la provincia de Corrientes y sur de la provincia de Misiones). Finalmente, el haplogrupo D fue el de mayor extensión geográfica, coincidiendo su área de distribución con la de la subespecie *pinnatifida*, es decir desde el sur de Bolivia, Argentina (excepto el nordeste de Corrientes y el sur de Misiones) hasta el límite sur de la distribución de la especie y el oeste y parte del sur de Uruguay (desde Salto hasta Lavalleja). En este haplogrupo se encuentra el haplotipo 3, el cual es el más frecuente y el que presenta la distribución más amplia de todos los haplotipos encontrados.



**Figura 17.** Distribución geográfica de los haplotipos hallados en *Turnera sidoides*. Los círculos en el mapa representan las poblaciones analizadas. Los haplotipos están representados con diferentes colores. La línea de puntos roja delimita el área de distribución de *T. sidoides*. Los haplogrupos se encuentran sombreados del mismo color que en la red de haplotipos (derecha): celeste, haplogrupo A; rojo, haplogrupo B; violeta, haplogrupo C y verde, haplogrupo D.

En base a la distribución geográfica de los haplotipos y de los haplogrupos, fue posible dividir al área de estudio en 9 regiones: 1- Región Noroeste (sur de Bolivia, Jujuy, Salta, Catamarca, Santiago del Estero y límite oeste del Chaco, Argentina), 2- Región Sierras de Córdoba, 3- Región Sur (sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina), 4- Región NEA (este de la provincia del Chaco, Corrientes y el sur de Misiones, Argentina), 5- Región Río Grande do Sul (Brasil), 6- Región Uruguay Norte (Dptos. de Artigas y Rivera, y norte de Tacuarembó), 7- Región Uruguay Oeste (límite oeste de los Dptos. Artigas, Salto, Paysandú, Río Negro, Soriano, Punta Gorda y Colonia), 8- Región Uruguay Sur (Dptos. San José, Canelones, Maldonado y sur de Lavalleja), 9- Región Uruguay Centro y Este (Dptos. Tacuarembó, Durazno, Cerro Largo, Treinta y Tres y Rocha). Los índices de diversidad también fueron calculados para cada una de estas regiones (Tabla 15). Las regiones con mayor variabilidad haplotípica fueron la región Uruguay Centro y Este ( $h = 0,871$ ), la región Uruguay Oeste ( $h = 0,857$ ) y la región NEA ( $h = 0,854$ ), mientras que la región Río Grande do Sul fue la que presentó los valores más bajos de diversidad haplotípica ( $h = 0,362$ )

**Tabla 15.** Estadísticos de resumen calculados en base a las secuencias de ADNcp para cada una de las regiones geográficas identificadas. **H** = haplotipos encontrados en la región; **N** = número de población presente en la región; **S** = número de sitios polimórficos;  $\pi$  = índice de diversidad nucleotídica; **h** = índice de diversidad haplotípica; **DS** = desvío estándar.

Regiones	H	N	S	$\pi$ (DS)	h (DS)
Noroeste	3 - 5 - 6 - 8 - 12 - 13	45 - 46 - 47 -48 - 49 - 50 - - 52 - 54 - 55 - 56- 57 - 58 - 59 - 60 - 61	11	0,00125 (0,00039)	0,590 (0,101)
	Sierras de Córdoba	3 - 7 -10 - 15 - 16 -17	72 - 73 - 74- 75 -76 - 77 - 78 -79 - 80 - 81 - 82 - 83	9	0,00079 (0,00020)
Sur	3 - 11	69 - 70 -71	2	0,00100 (0,00053)	0,500 (0,265)
NEA	3 - 4 - 9 - 14 - 15 - 20 - 23 - 24 - 27 - 28 - 29 - 30	1 - 2 - 3 -4 -5 -6 - 7 - 8 - 9 - 31 - 32 - 33 - 34 - 35 - 36 - 51 - 53 - 62 - 63 - 64 - 65 - 66	24	0,00550 (0,00041)	0,854 (0,00042)
Río Grande do Sul	23 - 32 - 33	10 - 11 - 18 - 19 - 20 - 21 - 22 - 23 - 24 - 37	2	0,00038 (0,00016)	0,362 (0,145)
Uruguay Norte	20 - 21 - 27	25 - 27 - 28 - 38 - 40 - 41 - 97	10	0,00365 (0,00056)	0,689 (0,104)
Uruguay Oeste	11 - 14 - 15 - 18 - 19 - 20	39 - 67 - 68 - 84 - 85 - 87 - 88	18	0,00354 (0,00145)	0,857 (0,108)
Uruguay Sur	11 - 22 - 25 - 26	15 - 86 - 89 - 90 - 91 - 93 - 94	12	0,00315 (0,00083)	0,702 (0,105)
Uruguay Centro y Este	21 - 23 - 26 - 31 - 34 - 35 - 36	12 - 13 - 14 - 16 - 17 - 26 - 29 - 30 - 42 - 43 - 44 - 92 - 95 - 96	15	0,00469 (0,00050)	0,871 (0,042)

## ADN NUCLEAR

### CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

En la Tabla 16 se resumen los estadísticos descriptivos calculados para las 41 poblaciones analizadas y las cinco subespecies. Se detectaron un total de 179 bandas RAPD, el porcentaje promedio de *loci* polimórficos fue de 9,47 % (DE = 0,49), el índice de diversidad de Shannon promedio fue de 0,052 (DE = 0,002) y la heterocigosis esperada promedio fue de 0,035 (DE = 0,001). El mayor valor para los tres índices se observó en la población 90 de la subespecie *sidoides* proveniente de Lavalleja, Uruguay (PLP = 16,76 %, He = 0,069 y Sh = 0,101), mientras que en la población 49 de la subespecie *pinnatifida* proveniente de Cochabamba, Bolivia, se observaron los valores más bajos (PLP = 3,41 %, He = 0,016 y Sh = 0,023). Los patrones de bandas variaron tanto entre poblaciones como entre subespecies. La población con mayor número de bandas exclusivas fue la población 90, con 10 bandas exclusivas, mientras que en 17,07% de las poblaciones se observó el valor mínimo de bandas exclusivas (NBE = 1), y 31,71% de poblaciones no presentaron ninguna banda exclusiva.

El análisis de los patrones de bandas por subespecies reveló un elevado número de bandas exclusivas. La subespecie con mayor número de bandas exclusivas y mayor porcentaje de *loci* polimórficos fue la subespecie *pinnatifida* (NBE = 29 y PLP = 53,07 %), mientras que, tanto la heterocigosis esperada como el índice de Shannon fueron mayores en la subespecie *sidoides* (He = 0,083 y Sh = 0,136). La subespecie *carnea* fue la que presentó los menores valores para todos los índices de diversidad calculados (Tabla 16).

**Tabla 16.** Resumen de la diversidad genética basado en 179 *loci* RAPD para 41 poblaciones de *Turnera sidoides*. **NTB** = Número total de bandas; **NBE** = número de bandas exclusivas; **PLP** = porcentaje de *loci* polimórficos; **He** = heterocigosis esperada; **Sh** = índice de diversidad de Shannon; **DE** = desvío estándar.

	<b>NTB</b>	<b>NBE</b>	<b>PLP</b>	<b>He</b> ( <b>DE</b> )	<b>Sh</b> ( <b>DE</b> )	<b>Ubicación geográfica</b>
<i>T. sidoides</i>	179		9,47 %	0,035 (0,001)	0,052 (0,002)	
<b>subsp. <i>carnea</i></b>	64	12	35,20 %	0,062 (0,009)	0,107 (0,013)	
<b>3</b>	25	0	10,06 %	0,033 (0,008)	0,050 (0,012)	Argentina (Corrientes)
<b>4</b>	26	3	11,17 %	0,047 (0,010)	0,068 (0,014)	Argentina (Corrientes)
<b>5</b>	21	1	6,15 %	0,025 (0,007)	0,037 (0,011)	Argentina (Corrientes)
<b>10</b>	19	2	11,17 %	0,026 (0,007)	0,039 (0,011)	Brasil (RS, Cachoeira do Sul)
<b>11</b>	24	4	10,06 %	0,030 (0,008)	0,045 (0,012)	Brasil (RS, Encruzilhada do Sul)
<b>17</b>	28	1	12,85 %	0,045 (0,009)	0,068 (0,014)	Uruguay (Treinta y Tres)
<b>subsp. <i>holosericea</i></b>	88	27	49,16 %	0,077 (0,010)	0,131 (0,015)	
<b>18</b>	33	3	14,53 %	0,053 (0,010)	0,079 (0,015)	Brasil (RS,)
<b>19</b>	26	0	7,26 %	0,028 (0,008)	0,041 (0,011)	Brasil (RS,)
<b>20</b>	26	2	7,82 %	0,029 (0,008)	0,043 (0,011)	Brasil (RS, Bagé)
<b>21</b>	28	2	6,70 %	0,025 (0,007)	0,037 (0,011)	Brasil (RS, Caçapava do Sul)

Tabla 16 (continuación).

<b>subsp. <i>holosericea</i></b>	<b>NTB</b>	<b>NBE</b>	<b>PLP</b>	<b>He (DE)</b>	<b>Sh (DE)</b>	<b>Ubicación geográfica</b>
<b>23</b>	30	1	14,53 %	0,042 (0,009)	0,066 (0,013)	Brasil (RS, Encruzilhada do Sul)
<b>24</b>	23	0	7,82 %	0,032 (0,009)	0,046 (0,012)	Brasil (RS, Pelotas)
<b>25</b>	29	0	10,61 %	0,037 (0,009)	0,056 (0,013)	Uruguay (Artigas)
<b>26</b>	26	3	12,29 %	0,045 (0,009)	0,067 (0,014)	Uruguay (Florida)
<b>27</b>	35	6	14,53 %	0,051 (0,010)	0,076 (0,014)	Uruguay (Rivera)
<b>30</b>	23	3	8,94%	0,030 (0,008)	0,046 (0,011)	Uruguay (Treinta y Tres)
<b><i>subsp. integrifolia</i></b>	68	13	37,43 %	0,073 (0,010)	0,122 (0,015)	
<b>32</b>	29	2	11,73 %	0,047 (0,010)	0,068 (0,014)	Argentina (Corrientes)
<b>35</b>	18	1	5,03 %	0,021 (0,007)	0,031 (0,010)	Argentina (Corrientes)
<b>37</b>	23	2	7,82 %	0,031 (0,008)	0,046 (0,012)	Brasil (RS, Rochas de Bagé)
<b>40</b>	27	5	8,38 %	0,036 (0,009)	0,052 (0,013)	Uruguay (Rivera)
<b>42</b>	28	1	10,06 %	0,030 (0,007)	0,047 (0,011)	Uruguay (Cerro Largo)
<b>43</b>	26	1	12,29 %	0,043 (0,009)	0,065 (0,013)	Uruguay (Cerro Largo)
<b><i>subsp. pinnatifida</i></b>	58	29	53,07 %	0,075 (0,009)	0,132 (0,013)	
<b>46</b>	30	0	11,73 %	0,049 (0,010)	0,071 (0,015)	Argentina (Jujuy)
<b>47</b>	35	2	15,64 %	0,047 (0,009)	0,073 (0,013)	Argentina (Salta)

Tabla 16 (continuación).

<b>subsp. <i>pinnatifida</i></b>	<b>NTB</b>	<b>NBE</b>	<b>PLP</b>	<b>He (DE)</b>	<b>Sh (DE)</b>	<b>Ubicación geográfica</b>
<b>49</b>	17	0	3,91 %	0,016 (0,006)	0,023 (0,009)	Bolivia (Cochabamba)
<b>51</b>	17	0	4,47 %	0,018 (0,006)	0,027 (0,009)	Argentina (Chaco)
<b>52</b>	22	4	8,38 %	0,034 (0,009)	0,050 (0,013)	Argentina (Chaco)
<b>53</b>	27	0	12,29 %	0,046 (0,010)	0,068 (0,014)	Argentina (Corrientes)
<b>54</b>	28	2	10,61 %	0,038 (0,009)	0,057 (0,013)	Argentina (Salta)
<b>55</b>	26	0	6,70 %	0,020 (0,006)	0,031 (0,009)	Argentina (Salta)
<b>56</b>	23	1	9,50 %	0,038 (0,009)	0,056 (0,013)	Bolivia (Tarija)
<b>60</b>	24	0	6,70 %	0,025 (0,007)	0,037 (0,011)	Bolivia (Tarija)
<b>63</b>	25	0	10,06 %	0,035 (0,008)	0,053 (0,012)	Argentina (Corrientes)
<b>69</b>	29	3	8,38 %	0,030 (0,008)	0,045 (0,012)	Argentina (Buenos Aires)
<b>74</b>	30	2	12,29 %	0,040 (0,009)	0,062 (0,013)	Argentina (Córdoba)
<b>75</b>	20	0	7,82 %	0,032 (0,008)	0,047 (0,012)	Argentina (Córdoba)
<b>81</b>	24	2	8,94 %	0,030 (0,007)	0,046 (0,011)	Argentina (Córdoba)
<b>86</b>	24	0	5,59 %	0,024 (0,007)	0,035 (0,011)	Uruguay (Lavalleja)

Tabla 16 (continuación).

	NTB	NBE	PLP	He (DE)	Sh (DE)	Ubicación geográfica
<b>subsp. sidoides</b>	62	20	34,08 %	0,083 (0,010)	0,136 (0,016)	
<b>90</b>	34	10	16,76 %	0,069 (0,012)	0,101 (0,017)	Uruguay (Lavalleja)
<b>94</b>	21	3	5,03 %	0,021 (0,007)	0,030 (0,010)	Uruguay (Maldonado)
<b>97</b>	27	6	9,50 %	0,037 (0,009)	0,054 (0,013)	Uruguay (Tacuarembó)

El análisis de la variabilidad genética en las regiones geográficas mostró que, en general, todos los índices de diversidad resultaron elevados en la mayoría de las regiones, a excepción de la región Sur, la cual incluye a una única población (población 69), lo cual podría ser el motivo por el cual todos los valores de diversidad para dicha región resultaron bajos. En todas las regiones se observaron bandas exclusivas, las regiones con mayor NBE fueron Rio Grande do Sul y Uruguay Norte, con 19 bandas exclusivas. El porcentaje de *loci* polimórficos varió de 8,38 % (región Sur) a 42,46 % (región Rio Grande do Sul). Tanto la heterocigosis esperada como el índice de diversidad de Shannon resultaron mayores en la región Uruguay Sur. La región Uruguay Oeste no fue incluida en los análisis de ADNn por no contar con suficientes individuos de la región (Tabla 17).

**Tabla 17.** Resumen de la diversidad genética basado en 179 *loci* RAPD para las regiones geográficas de *Turnera sidoides* definidas en base a la variabilidad del ADNcp. **NTB** = Número total de bandas, **NBE** = número de bandas exclusivas, **PLP** = porcentaje de *loci* polimórficos, **He** = heterocigosis esperada, **Sh** = índice de diversidad de Shannon, **DE** = desvío estándar.

Región	Poblaciones	NTB	NBE	PLP	He (DE)	Sh (DE)
Noroeste	46 - 47 - 49 - 52 - 54 - 55 - 58 - 60	76	14	41,90 %	0,071 (0,009)	0,122 (0,014)
Sierras de Córdoba	74 - 75 - 81	51	4	27,37 %	0,062 (0,009)	0,102 (0,014)
Sur	69	29	3	8,38 %	0,030 (0,008)	0,045 (0,012)
NEA	3 - 4 - 5 -32 - 35 - 51 - 63	66	8	36,31 %	0,070 (0,009)	0,117 (0,014)
Río Grande do Sul	10 - 11 - 18 - 19- 20 - 21 - 23 - 24- 37	77	19	42,46 %	0,071 (0,009))	0,120 (0,014)
Uruguay Norte	25 - 27 - 40 - 97	72	19	39,11 %	0,085 (0,010)	0,141 (0,015)
Uruguay Sur	86 - 90 - 94	60	13	33,52 %	0,089 (0,011)	0,143 (0,016)
Uruguay Centro y Este	17 - 26 - 30 - 42 - 43	60	12	33,52 %	0,065 (0,009)	0,108 (0,014)

## ESTRUCTURACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

### *Análisis de la varianza molecular (AMOVA)*

Los análisis de la varianza molecular (AMOVA) resultaron estadísticamente significativos (Tabla 18). Tanto las poblaciones como las subespecies y las regiones geográficas resultaron genéticamente diferentes entre sí. El análisis de estructuración genética mostró que el mayor grado de división se da entre poblaciones ( $\Phi_{st} = 0,606$ ), siendo menor entre subespecies ( $\Phi_{st} = 0,182$ ). El mayor porcentaje de variación se observó dentro de las subespecies (82 %). En la matriz de distancias genéticas entre subespecies (Tabla 19) se observa que las subespecies *holosericea* e *integrifolia* (0,122) son las menos distantes, mientras que las más distantes fueron las subespecies *sidoides* e *integrifolia* (0,238). La subespecie *pinnatifida* presentó valores relativamente altos de distancia con todas las subespecies, no obstante la subespecie *sidoides* fue la más distante. Cuando se analizaron las distancias genéticas entre regiones geográficas los valores resultaron más altos en comparación con las distancias obtenidas entre subespecies (Tabla 20), desde 0,128 entre las regiones Sur y Uruguay Sur, hasta 0,524 entre las regiones Noroeste y Sierras de Córdoba. En este análisis también se observa que la región Noroeste es la que se presenta más distante con todas las demás regiones.

**Tabla 18.** Resultados del análisis de la varianza molecular (AMOVA) basado en datos de ADNn de *Turnera sidoides*. g.l. = grados de libertad.

<b>Agrupamiento</b>	<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componente de la varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
<b>Poblaciones</b>	Entre poblaciones	40	1558,293	6,896	61 %
	Dentro de poblaciones	164	734,400	4,478	39 %
	Total	204	2292,693	11,374	100 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,606^*$					
<b>Subespecies</b>	Entre subespecies	4	363,560	2,142	18 %
	Dentro de subespecies	200	1929,133	9,646	82 %
	Total	204	2292,693	11,788	100 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,182^*$					
<b>Grupos geográficos</b>	Entre grupos	7	496,615	2,513	22 %
	Dentro de grupos	197	1796,077	9,117	78 %
	Total	204	2292,693	11,631	100 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,216^*$					

\*significativo  $P < 0,05$

**Tabla 19.** Matriz de distancias genéticas entre las subespecies de *Turnera sidoides* obtenida a partir de RAPD. \*significativo  $P < 0,05$

<i>T. sidoides</i>	subsp. <i>carnea</i>	subsp. <i>holosericea</i>	subsp. <i>integrifolia</i>	subsp. <i>pinnatifida</i>	subsp. <i>sidoides</i>
subsp. <i>carnea</i>	0,000				
subsp. <i>holosericea</i>	0,144*	0,000			
subsp. <i>integrifolia</i>	0,165*	0,122*	0,000		
subsp. <i>pinnatifida</i>	0,158*	0,210*	0,166*	0,000	
subsp. <i>sidoides</i>	0,233*	0,211*	0,238*	0,212*	0,000

**Tabla 20.** Matriz de distancias genéticas entre regiones geográficas obtenida a partir de RAPD. \*significativo  $P < 0,05$

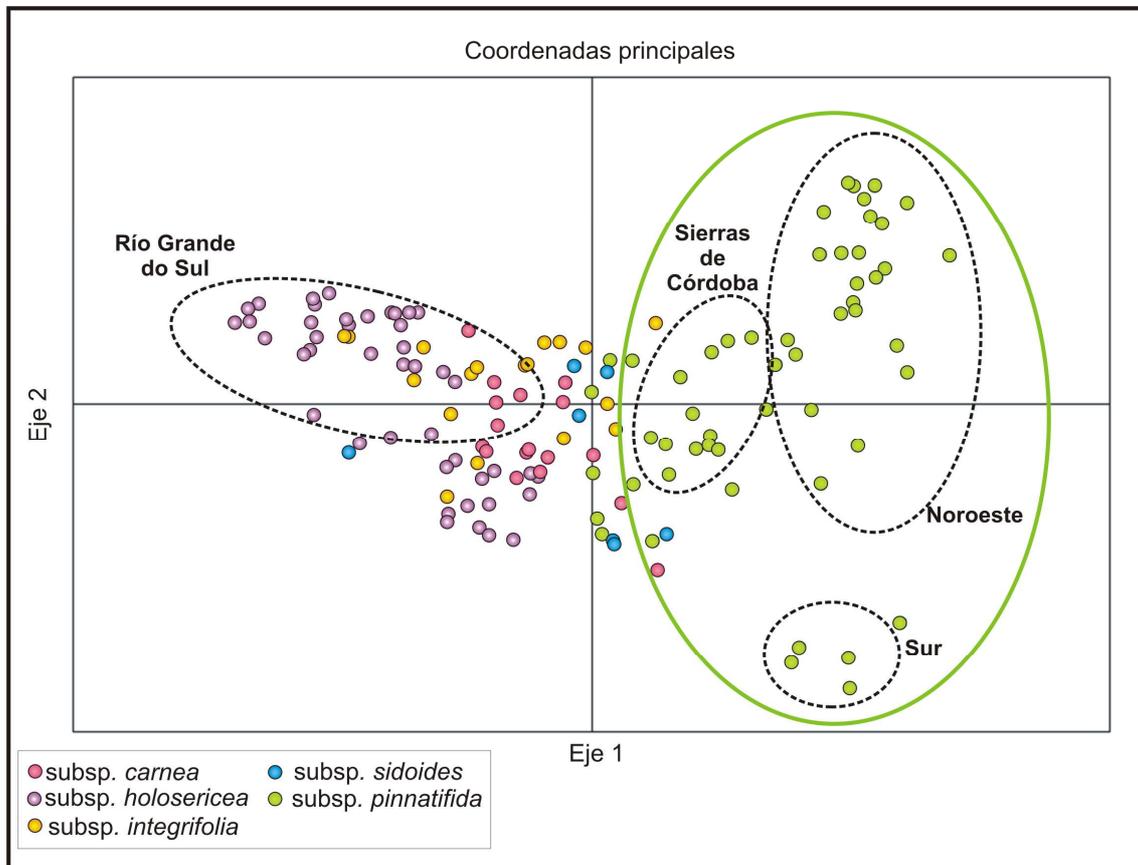
Regiones	Noroeste	Sierras de Córdoba	Sur	NEA	Río Grande do Sul	Uruguay Norte	Uruguay Sur	Uruguay Centro y Este
Noroeste	0,0000							
Sierras de Córdoba	0,524*	0,000						
Sur	0,495*	0,247*	0,000					
NEA	0,320*	0,254*	0,212*	0,000				
Río Grande do Sul	0,419*	0,170*	0,253*	0,156*	0,000			
Uruguay Norte	0,443*	0,274*	0,181*	0,222*	0,247*	0,000		
Uruguay Sur	0,428*	0,163*	0,128*	0,189*	0,151*	0,153*	0,000	
Uruguay Centro y Este	0,496*	0,127*	0,213*	0,201*	0,181*	0,230*	0,161*	0,000

*Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)*

El análisis de Coordenadas Principales (PCoA), basado en las distancias genéticas entre los individuos de las poblaciones estudiadas, reveló que las dos primeras coordenadas explican un 49,43 % de la variación total (Tabla 21). El gráfico resultante del análisis se muestra en la Figura 18, en el mismo se observa que la coordenada 1 separa principalmente a los individuos pertenecientes a la subespecie *pinnatifida* del resto de las subespecies. Asimismo, es posible identificar algunas poblaciones agrupadas de acuerdo a las regiones geográficas definidas anteriormente como ser Rio Grande do Sul, Sierras de Córdoba, Sur y Noroeste.

**Tabla 21.** Resultados del análisis de coordenadas principales basado en los patrones de bandas RAPD de 205 individuos de 41 poblaciones de *Turnera sidoides*.

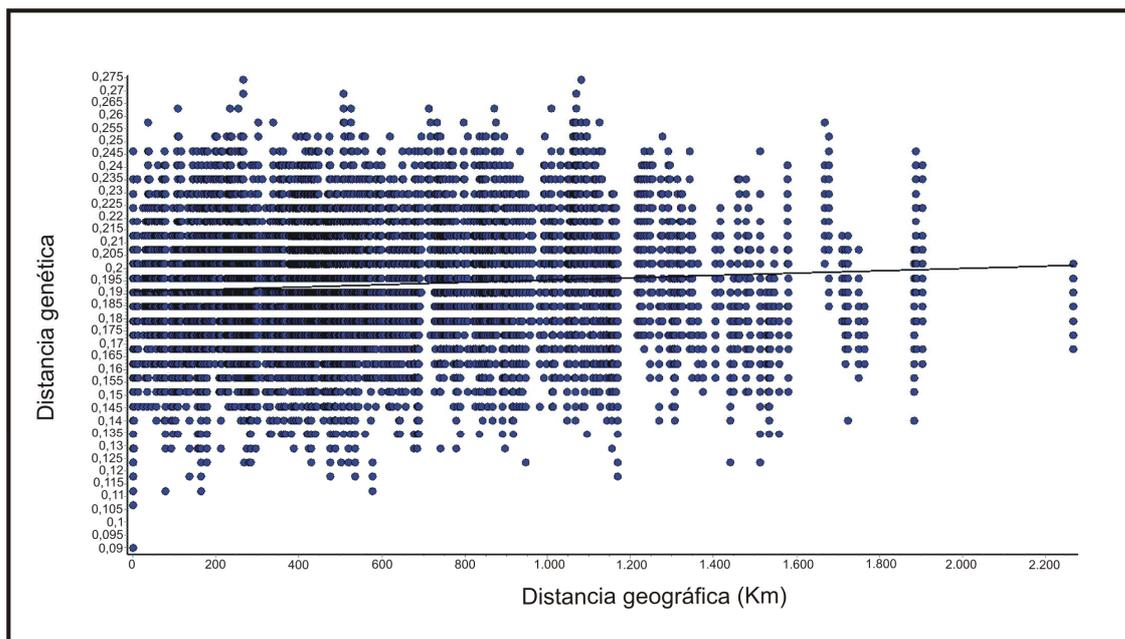
	Coordenadas principales	
	1	2
Valor Eigen	16,071	11,976
Porcentaje	28,32 %	21,10 %
Porcentaje acumulado	28,32 %	49,43 %



**Figura 18.** Gráfico resultante del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores RAPD de los individuos de *Turnera sidoides*. La línea verde encierra a los individuos pertenecientes a la subespecie *pinnatifida*. Las líneas de puntos delimitan las regiones geográficas.

### Test de Mantel

El test de Mantel reveló que la divergencia genética entre las poblaciones de *Turnera sidoides* mediante marcadores RAPD no está correlacionada con la distancia geográfica ( $r = 0,0763$ ;  $P = 0,964$ ) por lo que la variación genética no se encuentra estructurada clinalmente (Fig. 19).



**Figura 19.** Relación entre la distancia genética obtenida a partir de los marcadores RAPD y la distancia geográfica (Km) entre las poblaciones de *Turnera sidoides*.

Con respecto a los análisis llevados a cabo en las poblaciones pertenecientes a la subespecie *carnea*, el AMOVA reveló que el mayor porcentaje de la variación se da dentro de los morfotipos (70%), mientras que el mayor grado de división se da entre poblaciones (0,471) (Tabla 22). Asimismo, los resultados del análisis de coordenadas principales (Fig. 20; Tabla 23) mostraron una clara separación entre las poblaciones pertenecientes al morfotipo grandense y aquellas pertenecientes al morfotipo mercedense.

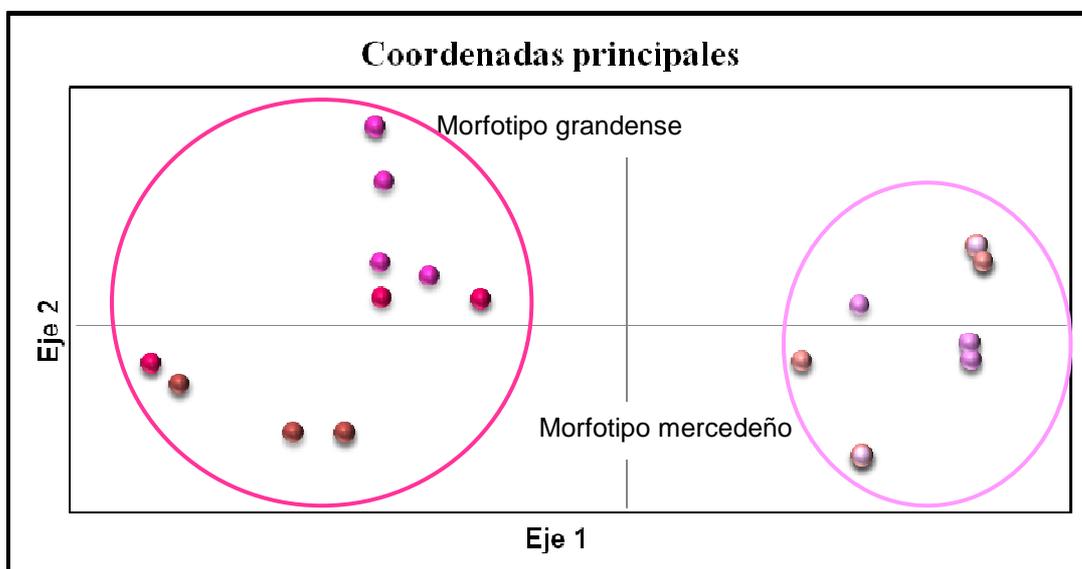
**Tabla 22.** Análisis de la varianza molecular (AMOVA) para los individuos de *Turnera sidoides* subsp. *carnea*. g.l. = grados de libertad.

<b>Agrupamiento</b>	<b>Fuente de variación</b>	<b>g.l.</b>	<b>Suma de cuadrados</b>	<b>Componente de la varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
<b>Poblaciones</b>	Entre poblaciones	5	123,900	4,046	47 %
	Dentro de poblaciones	24	109,200	4,550	53 %
	Total	29	223,100	8,596	100 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,471^*$					
<b>Morfotipos</b>	Entre morfotipos	1	48,967	2,826	30 %
	Dentro de morfotipos	28	184,133	6,576	70 %
	Total	29	233,100	9,402	100 %
Índice de fijación $\Phi_{st} = 0,301^*$					

\*significativo  $P < 0,05$

**Tabla 23.** Análisis de coordenadas principales basado en los patrones RAPD de 30 individuos de 6 poblaciones de *Turnera sidoides* subsp. *carnea*.

	Coordenadas principales	
	1	2
Valor Eigen	9,569	6,951
Porcentaje	22,11	16,06
Porcentaje acumulado	21,11	38,16



**Figura 20.** Gráfico resultante del Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) obtenido a partir de los patrones de marcadores RAPD de los individuos pertenecientes a *Turnera sidoides* subsp. *carnea*.

# DISCUSIÓN

*“Aprende de ayer, vive para hoy, espera para mañana. Lo importante es no parar de hacerse preguntas.”*

*A. Einstein*

# DISCUSIÓN

## ADN CLOROPLÁSTICO

### CARACTERIZACIÓN DE LAS SECUENCIAS DE ADN CLOROPLÁSTICO Y DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA INTRAESPECÍFICA

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica detectados tanto en el complejo *Turnera sidoides* en su conjunto como en cada una de las subespecies sugieren que, durante la historia evolutiva de esta especie, habría ocurrido un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral con pequeño tamaño poblacional efectivo, donde el tiempo fue suficiente para recuperar la variación haplotípica pero muy corto como para una gran acumulación de diferencias en las secuencias (Avice 2000).

#### Variabilidad intrapoblacional

La escasa o nula diversidad haplotípica intrapoblacional detectada en esta tesis concuerda con los estudios previos en *T. sidoides* donde se comprobó que la mayoría de las poblaciones del complejo presentaba un único haplotipo (Speranza *et al.* 2007). Se ha sugerido que la baja variabilidad intrapoblacional sería el resultado de una colonización reciente a partir de un único haplotipo fundador (Ferris *et al.* 1999; Avice 2000). En *T. sidoides* la propagación ocurre de manera vegetativa por rizomas o sexualmente por semillas, a su vez, las semillas no muestran ninguna adaptación para la dispersión a larga distancia (Solís Neffa 2000), por lo cual es probable que la mayoría de las poblaciones se originen a partir de unos pocos individuos fundadores, lo cual es consistente con la falta de variabilidad intrapoblacional aquí encontrada.

Las únicas excepciones fueron ocho poblaciones de las subespecies *holosericea*, *integriolia* y *pinnatifida* en cada una de las cuales se detectaron dos haplotipos diferentes. En todos los casos, uno era un haplotipo central del haplogrupo correspondiente, mientras que el otro era un haplotipo derivado de dicho haplotipo

central y, en la mayoría de los casos, exclusivo de esa población. Se ha sugerido que, dado que es poco probable que todas las copias del haplotipo ancestral muten o se extingan rápidamente, se espera que los haplotipos ancestrales persistan en la población junto con los haplotipos derivados (Posada & Crandall 2001). Por lo tanto, el polimorfismo ancestral podría explicar la variación intrapoblacional detectada en las poblaciones polimórficas de *T. sidoides*.

### **Variación del ADNcp entre las subespecies**

La comparación de los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica dentro del complejo *T. sidoides* mostró diferencias entre las subespecies. Las subespecies *pinnatifida* y *sidoides*, que poseen características contrastantes en relación a las otras subespecies del complejo, fueron las que presentaron los valores más extremos de ambos índices. En numerosas especies se ha demostrado una correlación positiva entre la amplitud del área de distribución geográfica y la diversidad genética de la especie (Hamrick & Godt 1989; Hamrick *et al.* 1992; Templeton 1998; Byrne *et al.* 2002). En *T. sidoides*, los valores de diversidad haplotípica observados en las subespecies *pinnatifida* y *sidoides* están relacionados con el grado de variación morfológica y el tamaño del área geográfica de las mismas. En la subespecie *pinnatifida*, de acuerdo a lo esperado por ser la subespecie más diversa morfológicamente y la de mayor área geográfica (Arbo 1985; Solís Neffa 2000, 2010; Solís Neffa *et al.* 2004), se detectaron los mayores niveles de diversidad haplotípica, aunque los valores de diversidad nucleotídica fueron los más bajos en el complejo. Por otra parte, en la subespecie *sidoides*, que es la única subespecie que posee el indumento con pelos estrellados y la distribución más restringida, se observó el valor más bajo de diversidad haplotípica. Las otras tres subespecies (*carnea*, *holosericea* e *integrifolia*), que son morfológicamente y geográficamente similares (Solís Neffa 2000) presentaron valores intermedios en ambos índices.

Además, a partir de los resultados aquí obtenidos se evidencia que, aunque la mayoría de las subespecies presenta haplotipos exclusivos, algunos haplotipos son compartidos por diferentes subespecies, siendo las subespecies *carnea*, *holosericea* e

*integrifolia* las que comparten más haplotipos. Este hecho concuerda con la mayor similitud morfológica y geográfica de estas subespecies. En este sentido, a nivel infraespecífico, Arbo (1985) consideró a la subespecie *carnea* como el núcleo del complejo *T. sidoides* teniendo en cuenta que ocupa la banda central del área de la especie y que ciertos especímenes presentan concordancias con las otras subespecies. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la subespecie *carnea* es la única que presenta haplotipos compartidos con las otras cuatro subespecies de *T. sidoides*, sustentando lo propuesto por dicha autora. Asimismo, dentro de las subespecies *carnea* y *pinnatifida*, los diferentes morfotipos también presentaron al menos un haplotipo exclusivo.

La discordancia parcial entre los haplotipos de ADNcp y los límites subespecíficos observada en *Turnera sidoides*, ha sido observada previamente en este (Speranza *et al.* 2007) y en otros complejos de especies (Turchetto *et al.* 2014). Este hecho podría ser el resultado de uno o más procesos diferentes como el polimorfismo ancestral, la introgresión y la captura de cloroplastos (Patterson *et al.* 1993; Kadereit 1994; Dumolin-Lape`gue *et al.* 1999; Lorenz-Lemke *et al.* 2010). Dado que *T. sidoides* es, desde un punto de vista evolutivo, una especie politípica que se halla en proceso de diversificación (Solís Neffa 2000) y que la variación morfológica que exhibe podría ser el resultado de pocas mutaciones en genes, cuyas tasas evolutivas pueden diferir de las del genoma cloroplástico, es posible que la diferenciación morfológica de las subespecies haya sido posterior a la fijación de los haplotipos. Por lo tanto, el polimorfismo ancestral debido a una divergencia reciente del complejo *T. sidoides* podría explicar, por ejemplo, que poblaciones distantes geográficamente de las subespecies *carnea* (morfotipo mercedeño) y *pinnatifida* (morfotipo serrano) presenten el haplotipo H15 o de las subespecies *holosericea* e *integrifolia* presenten el haplotipo H27.

Por otra parte, como resultado de una falta de diferenciación genética y un subsecuente potencial para la hibridación interespecífica, el intercambio genético puede ocurrir entre linajes independientes (ej. Rieseberg & Wendell 1993). Dado que los taxones que componen el complejo *T. sidoides* son entidades en proceso de adquisición de aislamiento reproductivo, habiéndose demostrado mediante la obtención y el análisis citogenético de algunos híbridos artificiales, que las barreras reproductivas entre las

subespecies/morfotipos son incompletas (Solís Neffa 2000), se ha sugerido que la introgresión de haplotipos de ADNcp podría ocurrir en las zonas de contacto entre subespecies (Speranza *et al.* 2007). El análisis morfológico y genético realizado en una zona de contacto entre las subespecies *pinnatifida* (2x) y *sidoides* (4x) en Uruguay reveló que el haplotipo de ADNcp diagnóstico de cada una de las subespecies no fue encontrado en la otra, el flujo asimétrico desde el parental paterno diploide al parental materno tetraploide aportó evidencias que sugieren que la hibridación intersubspecífica puede favorecer la introgresión de haplotipos citoplasmáticos entre las subespecies (Moreno *et al.* inéd.) En consecuencia, éste proceso podría explicar el hallazgo de los haplotipos H20 y H23 en algunas poblaciones próximas geográficamente, de las subespecies *carnea*, *holosericea* e *integrifolia* que coexisten en el norte de Uruguay o en el estado de Rio Grande do Sul en Brasil.

### **Variación del ADNcp dentro de las subespecies**

Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que, en general, tanto en las poblaciones diploides como en las poliploides dentro de cada subespecie / morfotipo, se detectaron haplotipos exclusivos y compartidos.

El hallazgo de haplotipos exclusivos en poblaciones diploides de las diferentes subespecies y morfotipos sustenta la hipótesis evolutiva del complejo *T. sidoides*, la cual propone que la divergencia de los mismos habría ocurrido a nivel diploide (Solís Neffa 2007). Además, sobre la base de los resultados del análisis morfológico, el comportamiento meiótico de los cromosomas, las características de los cariotipos así como de la caracterización genética preliminar de poblaciones diploides y poliploides de *T. sidoides* se ha sugerido que los diferentes citotipos hallados en las subespecies y morfotipos habrían surgido por autoploidización (Solís Neffa 2000; Solís Neffa & Fernández 2002; Panseri 2011). En consecuencia, se espera que los poliploides de cada subespecie / morfotipo de *T. sidoides* se hayan originado a partir de poblaciones diploides que presenten los mismos haplotipos de ADNcp, como lo observado en poblaciones tetraploides de los morfotipos mercedense y grandense de la subespecie *carnea* y de los morfotipos andino / chaqueño, mesopotámico y serrano de la subespecie

*pinnatifida* que presentan los haplotipos H15, H21, H3, H14 y H7, respectivamente, los que también fueron hallados en las poblaciones diploides de cada uno de dichos morfotipos.

Sin embargo, teniendo en cuenta que 1) la distribución actual de los citotipos sugiere que los diploides serían poblaciones relictuales, mientras que la distribución de los tetraploides sería el resultado de la expansión del área de los mismos a partir de diferentes eventos de poliploidización seguidos de contacto secundario (Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa & Seijo 2003; Solís Neffa *et al.* 2004); 2) en algunas zonas de contacto se ha detectado hibridación natural entre subespecies (Moreno *et al.* inéd.) y 3) el estudio de los híbridos artificiales demostró que el aislamiento reproductivo entre las subespecies es incompleto, especialmente a nivel poliploide (Arbo 1985; Solís Neffa 2000), el origen múltiple de los poliploides seguido de hibridación pudo haber estado involucrado en el proceso evolutivo del complejo. Como resultado de estos procesos, se esperaría que los poliploides presenten haplotipos de ADNcp diferentes que los diploides de la misma subespecie o morfotipo.

Se ha demostrado que en muchos casos los eventos de poliploidización pueden ocurrir múltiples veces dentro de un linaje (Soltis *et al.* 1992; Soltis & Soltis 1993). Asimismo, se ha sugerido que las estimaciones sobre la frecuencia de la ocurrencia del origen múltiple de los poliploides son bajas siendo el origen múltiple la regla tanto en auto como en alopoliploides (Soltis & Soltis 1993). La formación recurrente de poliploides dentro de una especie puede crear un mosaico de poblaciones diploides pre-existente y poblaciones poliploides nuevas establecidas a lo largo del área de la especie. Los resultados obtenidos en esta tesis mostraron que algunos poliploides de *T. sidoides* poseen haplotipos diferentes a los hallados en los diploides, sustentando la hipótesis que la poliploidización habría ocurrido de manera independiente en *T. sidoides*. Tal es el caso de las poblaciones tetraploides del morfotipo serrano de la subespecie *pinnatifida* que ocurren al oeste de las Sierras Chicas (poblaciones 79, 80, 81, 82 y 83) que presentan haplotipos (H3, H15, H16 y H17) diferentes de los haplotipos (H7 y H10) detectados en las poblaciones diploides y tetraploides del Valle de Punilla (poblaciones 72, 73, 74, 75, 76, 77 y 78). Estos resultados sugieren que los poliploides del oeste pudieron originarse de poblaciones diploides que se extinguieron y/o no fueron detectadas en este estudio.

La incongruencia entre los haplotipos de ADNcp y los niveles de ploidía también podría resultar de la hibridación y la captura de cloroplastos entre citotipos de diferentes subespecies. Dicha introgresión pudo involucrar el pasaje del genoma cloroplástico desde los diploides a los tetraploides o entre diferentes poblaciones con el mismo nivel de ploidía. En el primer caso, el flujo génico entre citotipos pudo haber ocurrido través de la hibridación por medio de un intermediario triploide. Además, teniendo en cuenta que se detectaron plantas productoras de gametos no reducidos, tanto masculinos como femeninos, en las poblaciones diploides (Panseri *et al.* 2008; Kovalsky 2012; Kovalsky & Solís Neffa 2012), dichos gametos habrían ofrecido la posibilidad de transferir el genoma cloroplástico desde poblaciones diploides a las tetraploides. Este proceso podría explicar la ocurrencia de una población tetraploide de la subespecie *sidoides* que comparte el haplotipo H21 con una población diploide de la subespecie *carnea* que co-ocurren en la misma región. Sin embargo, las barreras reproductivas incompletas entre subespecies, especialmente a nivel tetraploide, la ocurrencia de híbridos naturales, así como el hallazgo de haplotipos compartidos en zonas de contacto entre poblaciones poliploides de las subespecies *carnea*, *holosericea* e *integrifolia* del norte de Uruguay, sugiere que puede ocurrir un cierto grado de introgresión local de ADNcp desde poblaciones con el mismo nivel de ploidía. Considerando que se ha sugerido que los diploides de *T. sidoides* serían poblaciones relictuales, los poliploides pudieron haber surgido mediante episodios de introgresión y poliploidización ancestrales entre dos poblaciones diploides con genomas cloroplásticos divergentes.

#### **RELACIONES EVOLUTIVAS ENTRE HAPLOTIPOS Y FILOGENIA INTRAESPECÍFICA**

El análisis de la red de haplotipos reveló una clara división de los mismos en cuatro haplogrupos, los cuales representan cuatro unidades evolutivas que permanecieron estables a lo largo del tiempo. Estos resultados sugieren la ocurrencia de extensos períodos de aislamiento entre dichos haplogrupos en *T. sidoides*.

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica observados en los haplogrupos A, B y D, sugieren que las poblaciones habrían permanecido estables con

un tamaño efectivo grande por un largo tiempo (Avice 2000). Por otra parte, el patrón en estrella observado en el haplogrupo C, sugiere un escenario de expansión poblacional, aparentemente reciente, luego de haber sufrido un cuello de botella. Esta hipótesis es sustentada por los altos niveles de diversidad haplotípica y bajos de diversidad nucleotídica encontrados en este haplogrupo, los cuales sugieren un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral con pequeño tamaño efectivo, donde el tiempo fue suficiente para recuperar la variación haplotípica por medio de mutación pero muy corto para generar una acumulación de grandes diferencias entre las secuencias.

El haplogrupo D, cuyos haplotipos están presentes casi en su totalidad en poblaciones de la subespecie *pinnatifida*, es el que presenta mayor cantidad de haplotipos y mayores valores de diversidad, tanto haplotípica como nucleotídica. Este hecho sumado al patrón observado en la red para este haplogrupo, sugieren una historia demográfica de poblaciones menos afectadas por la reducción del tamaño poblacional. Sin embargo, las características de los subgrupos dentro del haplogrupo, son consistentes con un modelo de expansión repentina de las poblaciones luego de una reducción en el tamaño poblacional o bien, de estabilidad de poblaciones que han permanecido pequeñas y aisladas por muchas generaciones (Barrett & Khon 1991; Young *et al.* 1996; Avice 2000). El primero de los casos explicaría los patrones de variabilidad y estructura genética de las poblaciones de las Sierras de Córdoba, mientras que el segundo explicaría los patrones observados en las poblaciones del noroeste del área de la especie.

Asimismo, de acuerdo a la teoría de la coalescencia, el haplotipo interno en la red, con elevada frecuencia y una amplia distribución geográfica debería ser el haplotipo más ancestral (Neigel & Avice 1993; Schaal *et al.* 1998; Posada & Crandall 2001). De acuerdo con lo antes expuesto, en *T. sidoides*, el haplotipo H3 del haplogrupo D sería el haplotipo ancestral. La presencia en este haplogrupo de otros haplotipos centrales derivados del haplotipo H3, sugiere la ocurrencia de poblaciones relativamente más antiguas dentro del haplogrupo D (Avice 2000). Teniendo en cuenta el mismo criterio, los haplotipos H26, H21 y H23 serían los haplotipos ancestrales de los haplogrupos A, B y C, respectivamente. El hecho de que en estos haplogrupos se observe un sólo haplotipo ancestral podría indicar un menor tiempo de diferenciación de

los haplotipos que los constituyen o que sufrieron mayores alteraciones en el tamaño poblacional, lo cual redundó en la pérdida de diversidad genética.

Estos resultados están sustentados por los obtenidos del análisis del árbol filogenético bayesiano a partir de secuencias de ADNcp, el cual mostró cuatro clados principales, cada uno de los cuales comprendió a uno de los cuatro haplogrupos identificados en la red de haplotipos como grupos monofiléticos. El análisis de la topología del árbol y de las tasas de sustitución por sitio sugiere que el clado D se habría diferenciado en primer término; mientras que los clados B y C serían los más relacionados.

#### **ANÁLISIS DEMOGRÁFICOS**

Los resultados del análisis de la historia demográfica tanto en la especie como un todo, como en los haplogrupos A, B y D, sugieren que el tamaño efectivo de las poblaciones / grupos de poblaciones se habría mantenido estable a lo largo del tiempo. Además, los análisis demográficos realizados a partir de las distribuciones de diferencias pareadas, revelaron curvas multimodales, típicas de poblaciones estables. No obstante, las escasas diferencias nucleotídicas entre los haplotipos dentro de cada haplogrupo, sugiere una la diversificación reciente de los mismos.

En el haplogrupo C, en cambio, los valores negativos de los índices de neutralidad, sugieren que las poblaciones habrían estado sujetas a procesos de cuellos de botella y/o expansiones poblacionales repentinas. Los valores del estadístico  $r_g$  de Harpending y la distribución unimodal resultante del análisis de diferencias de a pares, sumados al patrón en estrella observado en la red de haplotipos, sustentan la hipótesis de expansión poblacional de este haplogrupo.

Por otra parte, los resultados obtenidos a partir del método de Skyline Plot, sugieren un repentino aumento del tamaño efectivo poblacional para el complejo como un todo, mientras que para los haplogrupos sugiere que los tamaños poblacionales efectivos se habrían mantenido estables, a excepción del haplogrupo C en el cual se evidencia una ligera disminución poblacional.

### ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA GENÉTICA POBLACIONAL

Los resultados del AMOVA demostraron que tanto las subespecies como los haplogrupos están diferenciados genéticamente entre sí. En concordancia con los resultados de los otros análisis realizados en esta tesis y de los obtenidos por otros autores (Solís Neffa 2000; Solís Neffa & Fernández 2002; Solís Neffa *et al.* 2003), el AMOVA entre subespecies reveló que las subespecies *pinnatifida* y *sidoides*, que son las subespecies más diferenciadas tanto morfológica y geográficamente así como en las características cariotípicas y en la capacidad de liberar ácido cianhídrico, son también las más diferenciadas genéticamente dentro del complejo *T. sidoides*, siendo la primera la que mayor distancia genética presentó respecto de las otras subespecies. Contrariamente, las subespecies *carnea*, *integrifolia* y *holosericea*, que son las más afines entre sí en los aspectos antes citados, también presentaron los menores valores de distancia genética entre sí.

Los valores de distancia genética entre los haplogrupos, sustentan la hipótesis que propone que los mismos serían linajes independientes que habrían permanecido aislados durante extensos períodos de tiempo.

La falta de correlación entre la divergencia genética y la distancia geográfica de las poblaciones *T. sidoides* revelada por el test de Mantel, sugiere que la variación genética en este complejo no está distribuida clinalmente, por lo que la diferenciación genética actual entre las poblaciones de *T. sidoides* no puede ser explicada bajo un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia, siendo el resultado de otros procesos como la deriva génica. En este sentido, se ha sugerido que las frecuencias alélicas pueden ser afectadas severamente por la deriva génica, particularmente en especies que estuvieron sujetas a cambios drásticos en el tamaño poblacional (Rauscher *et al.* 2008). Además, la falta de correlación entre las distancias geográficas y genéticas podría ser el resultado de una reciente expansión del área de una especie, debido a que las poblaciones provenientes de la misma fuente son genéticamente más similares, reflejando una historia evolutiva reciente (Hutchinson & Templeton 1999).

### DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

En concordancia con los resultados encontrados previamente en el complejo (Speranza *et al.* 2007), el análisis de la distribución geográfica de los haplotipos cloroplásticos de *Turnera sidoides* demostró que existe una asociación no al azar de los haplotipos en el espacio. La estructuración geográfica detectada no es sorprendente teniendo en cuenta la biología de la especie y el marcador molecular empleado (Comes & Kadereit 1998), ya que los cloroplastos son heredados por vía materna en *T. sidoides* (Speranza *et al.* 2007) y, además, esta especie no presenta mecanismos de dispersión de las semillas a la larga distancia (Solís Neffa 2000), con lo cual se reduce el flujo génico entre poblaciones. En consecuencia, diferentes regiones dentro del área geográfica del complejo *T. sidoides* también difieren en la variabilidad de haplotipos de ADNcp.

A partir del análisis de la distribución geográfica de las subespecies / morfotipos, citotipos y haplotipos, Solís Neffa (2007) propuso que existirían dos grandes centros de variación en *Turnera sidoides*. En uno de ellos, ubicado en el este del área del complejo (Mesopotamia, Uruguay y sur de Brasil), la distribución de las subespecies y morfotipos se superpone parcialmente, se hallaron citotipos desde diploide hasta octoploide y se detectó la mayor diversidad de haplotipos. En el otro centro, localizado en el límite noroeste del área del complejo, aunque todas las poblaciones estudiadas presentaron un solo haplotipo, se encontró la mayor variación de morfotipos y citotipos de la subespecie *pinnatifida* y es también el mayor relicto de diploides hasta ahora detectado. En cada centro, los diploides de las subespecies y morfotipos ocupan áreas disyuntas y habitan sitios con diferentes condiciones ecológicas, aunque generalmente asociados a los sistemas serranos. Los tetraploides están ampliamente distribuidos y habrían expandido las áreas de las subespecies y morfotipos hasta establecer eventuales contactos secundarios. Los hexaploides y octoploides poseen áreas restringidas en zonas marginales del complejo (Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa *et al.* 2004; Solís Neffa 2007; Speranza *et al.* 2007).

Los resultados obtenidos en esta tesis revelaron que Uruguay y la Mesopotamia Argentina también son las regiones dentro del área geográfica de *Turnera sidoides* con

mayor variabilidad de haplotipos de ADNcp, aunque se pueden distinguir subregiones de acuerdo con los haplotipos y haplogrupos allí presentes. En el centro y este de Uruguay se encontraron haplotipos pertenecientes a tres (A, B y C) de los cuatro haplogrupos identificados en la red de haplotipos y en el árbol bayesiano. El oeste de Uruguay también presenta una elevada diversidad haplotípica, aunque la mayoría de los haplotipos hallados pertenecen al haplogrupo D. El sur de Uruguay se caracteriza por la presencia exclusivamente de haplotipos del haplogrupo A (a excepción de la población 86 que posee el H11 del haplogrupo D), siendo el haplotipo H26 el más frecuente y abundante dentro de esta subregión. Finalmente, en la Mesopotamia Argentina, también se identificaron haplotipos pertenecientes a los cuatro haplogrupos, con predominio del haplogrupo D y menor representación del haplogrupo A.

En el centro noroeste de variación propuesto por Solís Neffa (2007), si bien se encontró una menor variabilidad haplotípica, se identificaron haplotipos exclusivos y una elevada frecuencia del haplotipo H3 considerado como el haplotipo ancestral.

Los resultados aquí obtenidos también evidenciaron que, aunque en las Sierras de Córdoba ocurre exclusivamente el morfotipo serrano de la subespecie *pinnatifida* (Solís Neffa 2010), el hallazgo de varios haplotipos exclusivos (siendo el H7 el más frecuente), junto con haplotipos ancestrales (H3 y H15) en menor frecuencia, sugiere que esta región constituirían un importante centro de variación del complejo.

Contrariamente, el sur del área de *T. sidoides* y el sur de Brasil, son las regiones con menor variabilidad haplotípica. En el sur del área de distribución de la especie (sur de la provincia de Buenos Aires, Argentina) se detectaron sólo 2 haplotipos pertenecientes al haplogrupo D, ninguno exclusivo de la región; mientras que en el sur de Brasil se encontraron tres haplotipos pertenecientes al haplogrupo C, de los cuales, dos son exclusivos cada uno de una única población, mientras que el tercer haplotipo, H23, se encuentra ampliamente distribuido en dicha región. Se ha sugerido que este patrón de distribución geográfica de los haplotipos, en donde algunas regiones presentan escasa o ninguna variación genética (con un único haplotipo ampliamente distribuido) en comparación al resto del área de una especie, es consistente con un modelo de expansión rápida (Schaal *et al.* 1998; Graziotin *et al.* 2006; Bennet & Provan 2008). El patrón de distribución de haplotipos en el sur de Brasil concuerda con este modelo de

expansión rápida luego de un cuello de botella, hipótesis sustentada por los resultados de los análisis de variabilidad genética, filogeográficos y demográficos realizados en esta tesis.

## ADN NUCLEAR

El análisis de la variabilidad genética de *Turnera sidoides* empleando marcadores nucleares mostró que tanto las subespecies / morfotipos como las regiones geográficas difieren en los niveles de variabilidad genética.

De acuerdo a lo esperado por tratarse de una especie politípica en proceso de diferenciación (Solís Neffa 2000), los resultados aquí obtenidos revelaron que el mayor porcentaje de variabilidad genética en *Turnera sidoides* se da dentro de las subespecies. Sin embargo, el elevado número de bandas exclusivas detectado en las subespecies permite caracterizarlas genéticamente. De acuerdo con lo esperado por ser la subespecie con la mayor variabilidad morfológica, geográfica y haplotípica del complejo, la subespecie *pinnatifida* fue la que presentó el mayor número de bandas exclusivas. Contrariamente, aunque la subespecie *carnea* también varía morfológicamente y presenta niveles intermedios de variabilidad haplotípica, fue la subespecie que presentó los menores valores para todos los índices de diversidad calculados. En esta subespecie, los análisis llevados a cabo demostraron que, además de las diferencias morfológicas y geográficas, los morfotipos mercedense y grandense difieren genéticamente entre sí, habiéndose detectado haplotipos exclusivos para cada uno de dichos morfotipos. Los resultados aquí obtenidos están de acuerdo con los obtenidos del análisis de ADNcp así como con los del análisis biosistemático realizado en el complejo (Solís Neffa 2000; Solís Neffa & Fernández 2002; Solís Neffa *et al.* 2003) y sugieren que las subespecies *holosericea* e *integrifolia* son las más afines genéticamente; mientras que la más distante es la subespecie *sidoides*.

La variación genética en las poblaciones de *Turnera sidoides* exhibe un patrón geográfico que se corresponde con los patrones de diferenciación genética revelados en el análisis de estructuración geográfica del ADNcp realizados en esta tesis, siendo la región Noroeste la más distante genéticamente. Asimismo, el análisis de coordenadas principales mostró que las poblaciones de las regiones Noroeste, Córdoba, Sur y Rio

Grande do Sul, definidas previamente, se agrupaban entre sí distinguiéndose claramente de las restantes regiones. Contrariamente a lo observado en el análisis de ADNcp, la región de Rio Grande do Sul fue la que presentó la mayor variabilidad genética respecto de las otras regiones. En este sentido, se ha sugerido que las poblaciones que presentan un único o unos pocos haplotipos organelares fijados, no necesariamente muestran bajos niveles de variabilidad a nivel de marcadores nucleares (Heuertz *et al.* 2004; Magri *et al.* 2006). Los altos niveles de diversidad nuclear pueden explicarse por repetidos eventos de dispersión (Nei *et al.* 1975).

Los resultados del test de Mantel evidenciaron que las distancias genéticas obtenidas a partir de marcadores RAPD no están correlacionada con las distancias geográficas, sustentando que la diversidad genética de las poblaciones en *T. sidoides* no está estructurada clinalmente.

En general, la estructuración genética detectada mediante el empleo de marcadores nucleares fue mucho menor que la encontrada para marcadores cloroplásticos. Esta incongruencia puede resultar de diferencias en los mecanismos de dispersión de las semillas y el polen (Caetano *et al.* 2008; Collevatti *et al.* 2009; Palma-Silva *et al.* 2009; Tremetsberger *et al.* 2009; Pinheiro *et al.* 2011); de diferencias en los tiempos de coalescencia de marcadores citoplasmáticos y nucleares (Cabanne *et al.* 2008; Tellier *et al.* 2009) así como de la introgresión por hibridación (Dick & Heuertz 2008; Acosta & Premoli 2010; Palma-Silva *et al.* 2011). Asimismo, se ha estimado que la divergencia entre las poblaciones como resultado de la deriva génica es cuatro veces más lenta en los *loci* nucleares, por lo tanto es de esperar que la estructura genética sea menor que la detectada con marcadores organelares (Moore 1995).

## **IMPLICANCIAS BIOGEOGRÁFICAS Y EVOLUTIVAS**

Diversos autores han propuesto que los patrones de distribución geográfica de la variabilidad genética observados en diferentes especies del Hemisferio Norte serían el resultado de procesos históricos (Whittemore & Shaal 1991; Ferris *et al.* 1993; Petit *et al.* 1993, 2002; Avise 1994; Soltis *et al.* 1997; Taberlet *et al.* 1998). Los patrones actuales de distribución de los haplotipos resultarían de la supervivencia en refugios periféricos y la subsecuente reinmigración a las áreas disponibles luego de la retirada de

los glaciares (hipótesis de la tabula rasa) o, alternativamente, de la supervivencia *in situ* por largos períodos de tiempo en regiones aisladas (hipótesis de los nunataks) libres de hielo (Brochmann *et al.* 2003; Stehlik 2003). La ocurrencia de sitios con elevada diversidad genética, la presencia de varios haplotipos exclusivos en una misma región y los altos niveles de diversidad haplotípica y nucleotídica constituyen evidencias de un refugio (Eidesen *et al.* 2007; Provan *et al.* 2005; Bennet & Provan 2008). Como consecuencia de un aislamiento prolongado, las poblaciones actuales situadas cerca de los refugios deberían ser altamente divergentes, especialmente si no fueron la fuente de expansión. Se espera que la diversidad intraespecífica decline al alejarse del refugio, como consecuencia de sucesivos efectos fundadores durante la colonización post-glacial (Hewitt 1996, 2000). La disminución de la variabilidad genética a medida que las poblaciones se alejan de un refugio constituye una evidencia de la existencia de rutas migratorias (Hewitt 1996; Soltis *et al.* 1997; Cruzan & Templeton 2000).

En relación a *Turnera sidoides*, se propuso que los patrones biogeográficos actuales del complejo serían el resultado de procesos morfogenéticos y climáticos (Solís Neffa 2000, 2010; Solís Neffa & Fernández 2001; Solís Neffa *et al.* 2004; Speranza *et al.* 2007; Elías *et al.* 2011). Si bien no se cuenta con registros fósiles, las evidencias que nos permiten inferir la edad de *T. sidoides*, son indirectas. En este sentido, Stebbins (1971) ha sugerido que los complejos poliploides maduros, como el aquí estudiado, se habrían originado durante el Plioceno – Pleistoceno. Asimismo, a partir del análisis de las secuencias de tres *loci* (dos cloroplásticos, *rbcL* y *atpB*, y uno nuclear, 18S rADN) se ha estimado que la edad del género *Turnera* es de aproximadamente  $28-33 \pm 2$  m.a. (Wikström *et al.* 2001), es decir que su origen se remontaría hacia finales del Oligoceno y su diversificación pudo haber ocurrido a partir del Mioceno. Además, como la distribución de *T. sidoides* coincide en gran parte con el Dominio Fitogeográfico Chaqueño, cuya identidad biogeográfica se habría establecido en el Plioceno (Iriondo 1992), la diversificación de *T. sidoides* también habría estado influenciada por los cambios históricos acontecidos en esta región de Sudamérica a partir del Plioceno.

Los eventos históricos más importantes que dieron lugar al escenario geomorfológico actual del área de *T. sidoides* están relacionados con el emplazamiento de los cratones o escudos Brasileño y Andino, la orogenia andina, el relleno de la cuenca intracratónica, el redireccionamiento de los grandes ríos de la región (Grande,

Parapetí, Pilcomayo, Teuco-Bermejo, Paraguay y Paraná) y la formación de una gran llanura aluvial xérica a partir de los antiguos abanicos aluviales de los ríos. Además, en este período una secuencia de climas secos y húmedos ocurrió entre los 22°S y 39°S, en correspondencia con los ciclos de glaciación en los Andes (Groeber 1936; Ab'Sáber 1990; Iriondo 1992, 1995; Iriondo & García 1993; Prieto 1996). Un período seco ocurrió al final del Pleistoceno, junto con el UMG, y otro más breve y menos severo en el Holoceno Superior (Iriondo & García 1993). Durante los períodos secos, una pronunciada actividad eólica deflacionó y reposicionó grandes masas de arcilla y arena fina en gran parte del área (Popolizio 1982, 2003; Iriondo 1992; Iriondo & García 1993). Asimismo, el deshielo en las áreas adyacentes a los Andes dio lugar a la formación de enormes lagos de agua dulce en depresiones a lo largo de los ríos Paraguay y Paraná, alcanzando el sur de Paraguay y el norte de la provincia de Corrientes (Tapia 1935). En el norte de la provincia de Buenos Aires otro gran lago se extendió hacia el oeste.

La diferenciación de la vegetación que pudo haber dado lugar a la flora actual del área geográfica de *Turnera sidoides* habría comenzado durante el Oligoceno (Spichiger *et al.* 1995). Las evidencias, paleontológicas, paleoclimatológicas y geológicas sugieren que durante el Terciario prevaleció un clima templado, permitiendo que los bosques húmedos se extendieran de manera continua mucho más al sur que en la actualidad. El enfriamiento y la aridificación habrían comenzado en el Oligoceno, y simultáneamente con los cambios climáticos inducidos por el levantamiento de la cordillera de los Andes durante el Mioceno, el bosque se fragmentó (Morrone 2001, 2006). En el Cuaternario, las oscilaciones climáticas causaron el avance y el retroceso de los glaciares a mayores latitudes, los cambios altitudinales así como la coalescencia y la separación cíclica de los pisos de vegetación en las montañas y una serie de períodos húmedos y secos en las tierras bajas (Iriondo & García 1993).

La cobertura vegetal de la región no fue estable desde el UMG debido a las oscilaciones de la vegetación xerofítica y tropical y los tipos de vegetación subtropical. La primera avanzó repetidamente hacia el NE durante los períodos secos y fríos y se retrajo hacia el SW durante los períodos húmedos y cálidos (Popolizio 1970, 2003; Iriondo 1992). Durante las fases frías y secas, los valles de los ríos y las laderas en las áreas montañosas de Argentina, Uruguay y Rio Grande do Sul (“arco peripampásico”,

i.e. Sierras Pampeanas, Sierras de Tandil y Ventana, elevaciones del núcleo uruguayo-surriograndense del Escudo Brasileiro), así como algunas zonas bajas, pudieron haber servido de refugio para la flora adaptada a climas más húmedos (Vuilleumier 1971; Ab'Sáber 1977). Tales eventos geomorfológicos y climáticos pudieron tener un impacto significativo en la distribución y abundancia de las poblaciones de *T. sidoides*, interrumpiendo el área de las subespecies y morfotipos confinando algunas poblaciones a determinadas regiones aisladas con presiones de selección particulares. En este escenario, las subespecies y morfotipos de *T. sidoides* pudieron haberse originado por evolución divergente a nivel diploide a partir de una forma ancestral en aquellos refugios y, luego del mejoramiento del clima, poblaciones poliploides de cada subespecie / morfotipo pudieron haber recolonizado el área desde los refugios hasta alcanzar sus límites actuales (Solís Neffa 2010). La estructura geográfica de los haplotipos de ADNcp de *T. sidoides* observada en esta tesis y el hecho que los diploides de las subespecies y morfotipos presentan diferentes haplotipos sustentan la hipótesis de la diversificación del complejo en alopatría a nivel diploide.

Para organismos sin registro fósil, el análisis de linajes genealógicos de taxones actuales provee el único método para la reconstrucción de la historia biogeográfica de la especie (Provan *et al.* 2005). En este sentido, se ha sugerido que la ocurrencia de grupos genéticamente distintos probablemente representen linajes descendientes de diferentes poblaciones ancestrales sugiriendo la supervivencia en diferentes regiones (Avice 2000; Ehrich *et al.* 2008). Además, una alta diversidad haplotípica y una distribución restringida de los haplotipos son signos de una supervivencia prolongada en un sitio (Eidesen *et al.* 2007; Bennet & Provan 2008).

Estudios previos en el complejo *Turnera sidoides* también evidenciaron una clara estructuración geográfica de los haplotipos de ADNcp, sugiriendo la existencia de al menos tres posibles centros de fijación de haplotipos en el pasado asociados a los principales sistemas orográficos en la región: los sistemas montañosos al oeste del área de *T. sidoides* (y en particular el noroeste del área del complejo), la Cuchilla de Haedo en el Norte de Uruguay y las Serranías del Este en el sudeste de Uruguay, los que representarían áreas de refugio o corredores de expansión y retracción de la flora (Speranza *et al.* 2007). Los resultados del análisis de la distribución de las variantes genéticas de ADNcp y ADNn obtenidos en esta tesis sustentan lo propuesto por estos

autores y sugieren la ocurrencia de otros centros secundarios (posibles refugios) de fijación de haplotipos, así como de numerosas zonas de contacto secundario en la provincia de Corrientes (Argentina) y en Uruguay.

En los sistemas serranos del oeste del área de *Turnera sidoides* y en la meseta mercedaña habrían existido al menos cuatro centros de fijación de los haplotipos del haplogrupo D, cuya distribución coincide completamente con el área geográfica de la subespecie *pinnatifida* y fue encontrado casi exclusivamente en poblaciones de esta subespecie. Dos de los centros antes mencionados habrían estado ubicados en el noroeste del área de distribución de la especie donde predomina el haplotipo ancestral H3; mientras que los otros dos centros habrían estado, uno en las Sierras de Córdoba y, el otro, en la meseta mercedaña.

En relación a los centros del noroeste, uno de ellos habría estado en los valles interandinos donde se habrían fijado el haplotipo H8 hallado en una población diploide del morfotipo andino. El otro centro habría estado en el Chaco de Bolivia y el oeste de la provincia de Salta (Argentina), donde además del haplotipo H3 presente en poblaciones diploides del morfotipo chaqueño, también se encontraron los haplotipos exclusivos H12 y H13 en poblaciones tetraploides del mismo morfotipo. El hallazgo de estos dos centros donde se habrían fijado, además del haplotipo ancestral, los haplotipos exclusivos de los morfotipos andino y chaqueño sustenta la hipótesis de Solís Neffa *et al.* (2004) y de Solís Neffa (2010) que propone que los cambios altitudinales de los pisos de vegetación como consecuencia del levantamiento de los Andes (Simpson 1975) pudieron haber restringido a algunas poblaciones a los valles interandinos limitados por la Cordillera Oriental y las Sierras Subandinas, donde se habría diferenciado el morfotipo andino. Dicho morfotipo pudo, posteriormente, haber expandido su área de distribución desde estos valles hacia los valles subtropicales y los pastizales de altura. Dos barreras físicas habrían limitado la expansión de este morfotipo hacia el este en la llanura Chaqueña: el establecimiento de condiciones más xéricas y la deposición de suelo arcilloso. Por otra parte, se ha sugerido que la historia evolutiva del morfotipo chaqueño habría estado asociada directamente a la dinámica de los bosques de quebracho donde crece (Solís Neffa 2010) la que está, a su vez, relacionada con la dinámica aluvional del Pleisto-Holoceno de las planicies y de la migración de los principales ríos de la región (Iriando 1995; Morello & Mateucci 1999). El hallazgo de

poblaciones diploides y de haplotipos exclusivos del morfotipo chaqueño en el límite oeste de la llanura Chaqueña aporta evidencias que algunas regiones bajas también habrían ofrecido refugios para la flora. Las llanuras aluviales a lo largo de los paleocauces de los principales ríos de la llanura Chaco-Pampeana habrían servido de rutas de dispersión para las poblaciones, como fuera sugerido por Popolizio (1970) y Spichiger *et al.* (2004) para otros elementos de la flora chaqueña.

En el tercer centro, ubicado en las Sierras de Córdoba, se habrían fijado los haplotipos exclusivos H7, H10, H16 y H17, hallados en poblaciones diploides y tetraploides del morfotipo serrano de la subespecie *pinnatifida*. Las citadas sierras corresponden a la entidad orográfica más oriental de las Sierras Pampeanas. Son bloques de una antigua penillanura fracturados y separados por la tectónica del Terciario en varios cordones con orientación Norte-Sur (Cabido *et al.* 2003). La ubicación geográfica, los movimientos orogénicos y los procesos geomorfológicos que modelaron su relieve, junto a las variaciones climáticas ocurridas, han determinado la presencia de una vegetación integrada por elementos provenientes de diferentes corrientes florísticas. La historia geológica permite imaginar una vasta planicie antigua, ligeramente ondulada y con elevaciones de poca magnitud, ocupada por un tipo de vegetación probablemente bastante uniforme, extendido en todas direcciones, alcanzando hasta regiones alejadas por el sur y a Paraguay y Brasil por el norte. La migración de especies en tales condiciones, se verificaba libremente. Pero el levantamiento de la cordillera de los Andes, con la consiguiente repercusión en las sierras de Córdoba, se tradujo en modificaciones climáticas que determinaron gradualmente la formación de ambientes muy variados y bien definidos. El pasado paleontológico y geológico permite suponer en Córdoba, como en la mayor parte de Argentina, la existencia de una vegetación de tipo tropical o subtropical en aquellas épocas. Sin embargo, los cambios producidos llevaron a una desecación ambiental general, que provocó la evolución paulatina de la vegetación hacia tipos más xerófilos y una adaptación a biótopos de altitudes mayores en las sierras (Luti *et al.* 1979). Se ha sugerido que estos cambios habrían sido suficientes para actuar como barreras significativas, determinando la adaptación local y la subsecuente diferenciación del morfotipo serrano de la subespecie *pinnatifida* que presenta citotipos desde diploide hasta hexaploide (Elías *et al.* 2011). Este morfotipo pudo haberse originado en la parte central de las Sierras Pampeanas, seguido por la

dispersión a través de esas sierras hacia los sistemas de Ventania y Tandilia a través del corredor de las Mahuidas (Solís Neffa 2010). El hallazgo de los haplotipos H3 (compartido con las regiones noroeste, nordeste y sur) y H15 (compartido con las regiones nordeste y Uruguay) sustenta la hipótesis que sugiere que, como resultado de tales procesos evolutivos, el complejo de especies que hoy puebla las Sierras de Córdoba, tiene vinculaciones filogenéticas con formaciones vegetales geográficamente apartadas (Kurtz 1904; Hicken 1918-1919; Frengüelli 1950; Morello 1958; de la Sota 1967). A mayor altitud se destaca la riqueza de especies andinas y de elementos distribuidos en regiones montañosas del noroeste de Argentina. Por debajo de 1800 m.s.n.m. la proporción de esas especies disminuye, siendo reemplazadas por otras netamente chaqueñas de amplia distribución en los territorios más bajos de Argentina e incluso de Brasil, Paraguay y Uruguay (Luti *et al.* 1979). Las comunidades que se presentan por debajo de 1800 m.s.n.m., comparten numerosas especies con las descritas por Frangi (1975) para las sierras de Tandil y Ventana en la provincia de Buenos Aires. La presencia en las Sierras de Córdoba de haplotipos compartidos con otras regiones geográficas del área de *T. sidoides* podría explicarse, por lo tanto, por las conexiones orográficas representadas por el “*arco serrano peripampásico*” (de la Sota 1967).

El hallazgo del haplotipo ancestral H3 en poblaciones diploides y poliploides de *T. sidoides* distribuidas en las regiones más elevadas del área del complejo, sustenta la hipótesis que sugiere que los diploides habrían ocupado un área más continua que la actual a lo largo del arco formado por la Cordillera Oriental y las sierras Subandinas, Pampeanas y de la Ventana, así como y la meseta de Mercedes en la Mesopotamia (Argentina), las que habrían sido vías de migración de las poblaciones. Asimismo, el hallazgo de este haplotipo en poblaciones tetraploides de los morfotipos chaqueño (tanto del Chaco Oriental como del Occidental) y pampeano sustenta la hipótesis que propone que los tetraploides, que están distribuido a lo largo de la llanura Chaco-Pampeana, habrían expandido su distribución a partir de las áreas de refugio hasta alcanzar los límites actuales (Solís Neffa & Fernández 2001; Speranza *et al.* 2007).

El último centro de fijación de haplotipos del haplogrupo D habría estado en el noreste del área de distribución de *Turnera sidoides*, más específicamente en la provincia de Corrientes, donde también se habrían fijado haplotipos de otros

haplogrupos. La historia geomorfológica de esta región es compleja (Popolizio 1970). Está cubierta con sedimentos de origen tanto terrestre como marino del Cretácico y del Terciario y, posteriormente, rellenada por la formación pampeana del Cuaternario. La mayor parte está constituida por llanuras de agradación, caracterizadas por su hundimiento relativo con respecto a las áreas vecinas y en las que se produce una sedimentación generalizada. El otro segmento corresponde a una planicie estructurada que tiene tendencia a levantamientos epirogénicos y donde han prevalecido la meteorización y los fenómenos erosivos. La génesis del modelado actual se remonta a fines del Terciario. Con el plegamiento de los Andes, al comienzo del Plioceno, el macizo de Brasilia recibió el impacto de las fuerzas correspondientes desde el oeste, y no pudiendo plegarse a su vez debido a su estructura cristalina, fue quebrado a lo largo de grandes fallas como las que han constituido los actuales cauces de los ríos Paraná y Uruguay, y levantando o hundiendo zonas más profundas como sucede en la región Chaqueña. Los sedimentos depositados posteriormente rellenaron y nivelaron este relieve durante el Cuaternario. Predomina entre estos depósitos el loess, sedimento con abundante carbonato de calcio y escasa cantidad de arcilla, acumulado por el viento en períodos secos, alternando con limos, sedimentos aluviales depositados durante las épocas lluviosas luego de ser arrastrado por las aguas en los extensos llanos (Popolizio 1970; Erize *et al.* 1993). En la Mesopotamia, las formaciones geológicas más antiguas consisten de rocas volcánicas del Triásico y areniscas silicificadas. Estas rocas forman un basamento complejo en la mayor parte de la región y se encuentran a gran profundidad. Las areniscas forman el material base a partir del cual se formaron los suelos lateríticos del nordeste de la región. Estas areniscas y el basalto afloran en la meseta de Mercedes. Los movimientos tectónicos y los activos procesos de fallas, que continuaron durante el Cuaternario, han delineado el paisaje actual. Durante el Plioceno, las ingresiones marinas cubrieron gran parte del sur de la Mesopotamia y, posteriormente al movimiento tectónico de levantamiento de la meseta de Mercedes, los ríos Uruguay y Paraná adquirieron sus cursos actuales (Popolizio 2003). El noroeste de la Mesopotamia, que representa el antiguo delta del Paraná, está cubierto principalmente por sedimentos arenosos y arcillosos de edad Holocena. El área incluye innumerables lagunas y cuerpos de agua que son en su mayoría permanentes, entre ellos el sistema de Iberá. Hacia el noreste, se encuentran sedimentos Holocenos a lo largo del valle del río Aguapey, a través del cual el Paraná fluía hacia el río Uruguay. Hacia el este, hay

depósitos arcillosos-arenosos de origen fluvio-lacustre del Plioceno. Depósitos Pleistocénicos cubren la mayor parte del sur de la Mesopotamia (Popolizio 1970). En el NEA confluyen las Provincias Fitogeográficas Chaqueña, Espinal (Dominio Chaqueño) y Paranaense (Dominio Amazónico, Cabrera 1971; Cabrera & Willink 1973), con caracteres propios que dan lugar a amplios ecotonos o zonas de transición en sus áreas de contacto, resultando en patrones muy diversos de variabilidad florística (Carnevali 1994).

En este escenario, grupos de poblaciones de *Turnera sidoides* pudieron haber quedado confinadas en los diferentes ambientes resultantes de los procesos antes mencionados, donde se habrían fijado los haplotipos exclusivos allí encontrados. En este sentido, considerando la distribución de las subespecies /morfotipos y de los citotipos se ha sugerido que los morfotipos mercedeno y mesopotámico de las subespecies *carnea* y *pinnatifida*, respectivamente, así como la subespecie *integrifolia* se habrían originado probablemente en esta región (Solís Neffa 2007, 2010; Solís Neffa & Seijo com. pers.). Debido a que al suroeste del río Corriente se hallaron poblaciones diploides del morfotipo mesopotámico, es probable que la diferenciación de dicho morfotipo así como la fijación del haplotipo H9 (exclusivo de este morfotipo) hubiera ocurrido en dicha región. Asimismo, la distribución restringida de los diploides del morfotipo mercedeno de la subespecie *carnea* en la meseta de Mercedes sugiere que dicho morfotipo pudo haberse originado en dicha región, donde también se habría fijado el haplotipo H15. El levantamiento de la meseta mercedena y el establecimiento de los cursos de los ríos Paraná y Uruguay habrían restringido algunas poblaciones diploides a los suelos arenosos del antiguo delta del río Paraná dando lugar a la diferenciación de la subespecie *integrifolia* y a la fijación de los haplotipos H28 y H29 (haplotipos derivados del haplogrupo B), al norte de los esteros del Iberá. Finalmente, en el noroeste de la provincia de Corrientes y este de la provincia del Chaco (Chaco Oriental) se habría fijado el haplotipo H4 del haplogrupo D, exclusivo de poblaciones tetraploides del morfotipo chaqueño de la subespecie *pinnatifida*. El análisis de la distribución de los haplogrupos también reveló la existencia de una zona de contacto entre los haplogrupos D y B al noroeste del Iberá, mientras que hacia el sureste del Iberá se encuentra una zona de contacto entre los haplogrupos A, C y D.

En concordancia con lo propuesto por Speranza *et al.* (2007), en Uruguay habrían existido dos importantes centros de fijación de haplotipos: la Cuchilla de Haedo y las Serranías del Este. En la Cuchilla de Haedo se habría fijado el haplotipo ancestral del haplogrupo B (H21). Sobre la base de la distribución de las subespecies / morfotipos y de los citotipos, se sugirió que en dicha región también se habrían diferenciado la subespecie *holosericea* y el morfotipo *grandense* de la subespecie *carnea* (Solís Neffa & Seijo *com pers.*). Por otra parte, en el refugio de las Serranías del Este se habrían fijado los haplotipos del haplogrupo A hallado principalmente en poblaciones de la subespecie *sidoides*. La distribución restringida de esta subespecie en dicha región sumado al hecho que dichas formaciones metamórficas más elevadas habrían estado aisladas temporariamente en el pasado por las ingresiones marinas (Rambo 1954) sugieren la diferenciación en alopatría tanto de la subespecie (Solís Neffa & Seijo *com pers.*) como del haplogrupo A en esa área. En Uruguay también se detectaron zonas de contacto entre haplogrupos: al sur una zona de contacto entre los haplogrupos A y D (Moreno *et al.* *inéd.*) y al norte una zona de contacto entre los haplogrupos A, B y C.

En el denominado bioma Pampa al norte de Uruguay y sur de Brasil (Rio Grande do Sul), habría existido otro centro donde se habrían fijado los haplotipos del haplogrupo C. El bioma Pampa es complejo y está constituido por áreas extensas de campos, con inclusiones de bosques en las márgenes de los ríos. Los campos cubren grandes extensiones, en un relieve suavemente ondulado en la porción central de Rio Grande do Sul y fuertemente ondulado en la Serra do Sudeste. Según Rambo (1954) esta área habría quedado aislada temporalmente con las ingresiones marinas. Especies de origen andino, procedentes de la pampa uruguaya y argentina, penetran en Rio Grande do Sul y alcanzan su límite más septentrional en esta región. La menor variabilidad haplotípica detectada en esta región respecto del resto del área de distribución de *T. sidoides* es consistente con una rápida expansión del área de la especie en dicha región a partir de un refugio. Dado que no se han encontrado poblaciones diploides en el haplogrupo C y que todas las poblaciones de *T. sidoides* que ocurren en esta región son poliploides (Solís Neffa & Fernández 2001; Roggero Luque 2010) la expansión del área geográfica de los haplotipos H20 y H23 hacia el norte de Uruguay y el sur de Brasil, respectivamente, habría estado asociada a la mayor

capacidad competitiva y/o la mayor tolerancia ecológica de los poliploides respecto de los progenitores diploides.

## **IMPLICANCIAS EN LA CONSERVACIÓN DE LA BIODIVERSIDAD**

La región comprendida en el Dominio Fitogeográfico Chaqueño es considerada uno de los espacios silvestres más importantes de Sudamérica. Asimismo, la gran biodiversidad que presenta hace de ésta una de las regiones de mayor importancia socio - ambiental de Sudamérica. En la actualidad, la región es el escenario de un proceso de fragmentación de los hábitats, de sobreexplotación y reemplazo de ecosistemas naturales por el avance de la frontera agrícola, de desarrollo de redes viales, así como del cambio en el uso de las tierras destinadas a las tareas agropecuarias (desmontes y conversión de tierras de pastizales a forestales, o ganaderas a agrícolas). Todos estos cambios y la velocidad con que ocurren, producen una pérdida importante de la biodiversidad de la región y ponen en riesgo la continuidad de los procesos que la generan y mantienen (Brown *et al.* 2006).

El conocimiento de la biología evolutiva de los organismos pasó, recientemente, a ser valorizado para la identificación de áreas prioritarias para la conservación que contemplen el mantenimiento de la variabilidad genética y los procesos evolutivos (Mace & Purvis 2008). Asimismo, a través de la interpretación de las respuestas bióticas a los cambios paleoclimáticos y paleoecológicos (Comes & Kadereit 1998; Hewitt 1996, 1999), los estudios evolutivos y filogeográficos han realizado importantes contribuciones para identificar poblaciones con mayor variabilidad genética y constatar la existencia de unidades intraespecíficas (ESUs) con suficiente divergencia evolutiva como para requerir una conservación independiente (Vázquez & Gittleman 1998). En este sentido, se ha sugerido que los refugios Cuaternarios representarían reservorios de largo plazo de la variabilidad genética de una especie donde la evolución ha desarrollado genotipos únicos y elevados niveles de variabilidad (Willis & Whittaker 2000).

Por otra parte, la comprensión de la importancia relativa de los procesos que estructuran la diversidad genética dentro y entre poblaciones (específicamente endogamia, flujo génico, deriva genética y selección) así como el análisis de la distribución de las variantes genéticas en relación con el uso de la tierra y el grado en el que dichas variantes ocurren en áreas protegidas, pueden contribuir a la detección de riesgos de erosión de la diversidad genética de las especies así como al diseño de estrategias de conservación efectivas (Ji & Leberg 2002).

En este marco, las áreas de mayor diversidad específica y genética detectadas en esta tesis podrían representar reservorios de la variabilidad genética de *Turnera sidoides* como de otras especies; mientras que el arco serrano constituiría un importante corredor que mantendría la conectividad biológica entre dichos reservorios. El análisis de la congruencia de los patrones filogeográficos y de la distribución de las variantes genéticas de *Turnera sidoides* y de otros taxones codistribuidos en relación a patrones de variación ambiental y uso de la tierra a escala regional podría, por lo tanto, contribuir a la identificación de áreas prioritarias para la conservación de la diversidad vegetal de la región y realizar predicciones para el estudio de otras especies.

## **CONCLUSIONES GENERALES**

Este trabajo constituye el primer estudio filogeográfico del complejo *Turnera sidoides* y es también el primer estudio realizado en una especie ampliamente distribuida en el Dominio Fitogeográfico Chaqueño.

Los valores de diversidad haplotípica y nucleotídica detectados en el complejo *Turnera sidoides* sugieren que, durante su historia evolutiva, habría ocurrido un rápido crecimiento poblacional a partir de una población ancestral con pequeño tamaño poblacional efectivo, donde el tiempo fue suficiente para recuperar la variación haplotípica pero muy corto como para una gran acumulación de diferencias en las secuencias.

La discordancia parcial entre los haplotipos de ADNcp y los límites subespecíficos observada en *Turnera sidoides* sería el resultado de uno o más procesos diferentes como el polimorfismo ancestral, la introgresión y la captura de cloroplastos.

El hallazgo de haplotipos exclusivos en poblaciones diploides de las diferentes subespecies y morfotipos sustenta la hipótesis que propone que la diferenciación de las subespecies / morfotipos del complejo *T. sidoides* habría ocurrido a nivel diploide.

Los análisis de la red de haplotipos y el árbol de inferencias bayesianas revelaron una clara división de los haplotipos en cuatro haplogrupos o clados, los cuales representan cuatro unidades evolutivas que habrían permanecido estables a lo largo del tiempo, sugiriendo la ocurrencia de extensos períodos de aislamiento entre dichos haplogrupos en *T. sidoides*. Estos resultados fueron sustentados por los obtenidos de los análisis demográficos.

Los resultados del AMOVA revelaron que tanto las subespecies como las regiones geográficas difieren en los niveles de variabilidad genética detectada tanto a partir del análisis de las secuencias de ADNcp como por RAPDs.

Los valores de distancia genética entre los haplogrupos sustentan la hipótesis que propone que los mismos serían linajes independientes que habrían permanecido aislados durante extensos períodos de tiempo.

La falta de correlación entre la divergencia genética y la distancia geográfica de las poblaciones *T. sidoides* revelada por el test de Mantel, sugiere que la variación genética en este complejo no está distribuida clinalmente, por lo que la diferenciación genética actual entre las poblaciones de *T. sidoides* no puede ser explicada bajo un modelo de flujo génico de aislamiento por distancia.

El análisis llevado a cabo en los morfotipos de la subespecie *carnea* confirmó que los mismos difieren no sólo morfológicamente sino genéticamente entre sí. El hecho de haber encontrado haplotipos pertenecientes a distintos haplogrupos en ambos morfotipos, indicaría que se trata de morfotipos polifiléticos.

En base a la distribución geográfica de los haplotipos, haplogrupos y de la variabilidad genética detectada por RAPDs se distinguieron nueve regiones dentro del área de *T. sidoides*: Noroeste, Sierras de Córdoba, Sur, NEA, Región Río Grande do Sul, Uruguay Norte, Uruguay Oeste, Uruguay Sur y Uruguay Centro y Este.

El análisis de la distribución de las variantes genéticas del complejo en relación a la información paleoambiental y biogeográfica de la región ha contribuido a la comprensión de los patrones y procesos relacionados con la diversificación del complejo *Turnera sidoides* en respuesta a los cambios climáticos del pasado en la región.

Se proponen posibles centros de diversificación y fijación de los haplotipos para el complejo *Turnera sidoides* asociados los mismos con los mayores sistemas orográficos en la región: Valles interandinos, Chaco Boliviano y salteño, Sierras de Córdoba, Mesopotamia, Cuchilla de Haedo, Serranías del Este y Río Grande do Sul.

El hallazgo del haplotipo ancestral en poblaciones diploides y poliploides de *T. sidoides* distribuidas en las regiones más elevadas del área del complejo, sustenta la hipótesis que sugiere que los diploides habrían ocupado un área más continua que la actual a lo largo del arco formado por la Cordillera Oriental y las sierras Subandinas, Pampeanas y de la Ventana, así como y la meseta de Mercedes en la Mesopotamia (Argentina), las que habrían sido vías de migración de las poblaciones. Asimismo, el hallazgo de este haplotipo en poblaciones tetraploides de los morfotipos chaqueño (tanto del Chaco Oriental como del Occidental) y pampeano sustenta la hipótesis que propone que los tetraploides, que están distribuidos a lo largo de la llanura Chaco-Pampeana, habrían expandido su distribución a partir de las áreas de refugio hasta alcanzar los límites actuales.

Las áreas de mayor diversidad específica y genética detectadas en *Turnera sidoides* representarían reservorios de la variabilidad genética de ésta como de otras especies; mientras que el arco serrano constituiría un importante corredor que mantendría la conectividad biológica entre dichos reservorios. El análisis de la congruencia de los patrones filogeográficos y de la distribución de las variantes genéticas de *Turnera sidoides* y de otros taxones codistribuidos en relación a patrones

de variación ambiental y uso de la tierra a escala regional podría, por lo tanto, contribuir a la identificación de áreas prioritarias para la conservación de la diversidad vegetal de la región y realizar predicciones para el estudio de otras especies.

# BIBLIOGRAFÍA

---

# BIBLIOGRAFÍA

- AB'SÁBER, A.N. 1977. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na America do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários *Paleoclimas*, Universidad de Sao Pablo, Instituto de Geografía 3: 1.19.
- AB'SÁBER, A.N. 1982. The paleoclimate and paleoecology of Brazilian Amazonia. Biological diversification in the Tropics (ed. by G.T. Prance), pp. 41–59. Plenum Press, New York, NY.
- AB'SÁBER, A. N. 1990. FLORAM: Nordeste Seco. *Revista Estudos Avançados*. vol. 4, p. 149-174.
- ACOSTA, M.C., PREMOLI, A.C. 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 235–242.
- ALEIXO, A., ROSSETTI, D.F. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology*, 148, S443–S453.
- ANTONELLI, A., VEROLA, C.F., PARISOD, C., GUSTAFSSON, A.L.S. 2010. Climate cooling promoted the expansion and radiation of a threatened group of South American orchids (Epidendroideae: Laeliinae). *Biological Journal of Linnean Society* 100: 597–607.
- APG. 2009. An update of the angiosperm phylogeny group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of Linnean Society* 161: 105–121.
- ARANA, M.V., GALLO, L.A., VENDRAMIN, G.G., PASTORINO, M.J., SEBASTIANI, F., MARCHELLI, P. 2010. High genetic variation in marginal fragmented populations at extreme climatic conditions of the Patagonian Cypress *Austrocedrus chilensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54: 941–949.
- ARBO, M.M. 1985. Notas taxonómicas sobre turneráceas Sudamericanas. *Candollea* 40: 175–191.

- ARBO, M.M. 2005. Estudios sistemáticos en turnera (Turneraceae). III. Series *Anomalae* y *Turnera*. *Bonplandia* 14(3-4): 115-318.
- ARBO, M.M. 2007. Turneraceae. Pp. 458–466 in: Kubitzki, K. (ed.), *The Families and Genera of Vascular Plants*, vol. 9. Springer, Berlin.
- ARBO, M.M. 2008. Estudios sistemáticos en *Turnera* (Turneraceae). IV. Series *Leiocarpae*, *Conciliatae* y *Sessilifoliae*. *Bonplandia* 17(2): 107-334.
- ARBO, M.M., ESPERT, S.M. 2009. Morphology, phylogeny and biogeography of *Turnera* (Turneraceae). *Taxon* 58(2): 457-467.
- AVISE, J.C. 1994. Molecular markers, natural history and evolution. Chapman and Hall, New York, 511p.
- AVISE, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7, 371-379.
- AVISE, J.C. 2000. *Phylogeography: the History and Formation of Species*. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts.
- BALLARD, J.W.O., WHITLOCK, M.C., 2004. The incomplete natural history of mitochondria. *Molecular ecology* 13, 729–744.
- BANDELT, H.J., FORSTER, P., RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- BARRETT, S.C.H., KOHN, J. 1991. The genetic and evolutionary consequences of small population size in plant: implications for conservation. In: *Genetics and Conservation of Rare Plants* (Eds. D. Falk & K.E. Holsinger), pp. 3–30. Oxford University Press.
- BEHEREGARAY, L.B. 2008. Twenty years of phylogeography: The state of the field and the challenges for the Southern Hemisphere. *Molecular Ecology* 17: 3754–3774.
- BEHLING, H. 1995. A high resolution Holocene pollen record from Lago do Pires, SE Brazil, vegetation, climate and fire history. *Journal of Paleolimnology* 14: 253-268.

- BEHLING, H. 1997. Late Quaternary vegetation, climate and fire history in the Araucaria forest and campos region from Serra Campos Gerais (Paraná), S Brazil. *Review of Palaeobotany and Palynology* 97: 109-121.
- BEHLING, H. 2002. South and southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: A synthesis. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 177: 19 – 27.
- BENNET, K.D., PROVAN, J. 2008. What do we mean by ‘refugia’? *Quaternary Science Reviews* 27 (2008) 2449–2455.
- BIRMINGHAM, E., MCCAFFERTY, S.S., MARTIN, A.P. 1977. First biogeography and molecular clocks: perspective from the Panamanian isthmus. Pp 113-128. En: Kocher TD, Stepien AC (eds.). *Molecular Systematic of fishes*. California America Press, San Diego.
- BROCHMANN, C., GABRIELSEN, T.M., NORDAL, I., LANDVIK, J.Y., ELVEN, R. 2003. Glacial survival or *tabula rasa*? The history of North Atlantic biota revisited *Taxon* 52: 417–450.
- BROWN, A., MARTÍNEZ ORTIZ, U., ACERBI, M., CORCUERA, J. (eds.). 2006. La situación ambiental argentina 2005. Fundación Vida Silvestre Argentina. Buenos Aires. 586 pp.
- BRUNSFELD, S.J., SULLIVAN, J., SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. 2001. Comparative phylogeography of northwestern North America: A synthesis. In: *Integrating Ecological and Evolutionary Processes in a Spatial Context* (eds. Silvertown J, Antonovics J), pp. 319–339. Blackwell Science, Oxford.
- BULL-HEREÑU, K., MARTÍNEZ, E.A., FRANCISCO, A. 2005. Structure and genetic diversity in *Colliguaja odorifera* Mol. (Euphorbiaceae), a shrub subjected to Pleisto-Holocenic natural perturbations in a mediterranean South American region. *Journal of Biogeography* 32: 1129–1138.
- BURNHAM, R.J., GRAHAM, A. 1999. The history of Neotropical vegetation: new developments and status. *Annals of the Missouri Botanical Garden*: 86: 546-589.

- BYRNE, M., MACDONALD, B., COATES, D. 2002. Phylogeographic patterns in chloroplast DNA variation within the *Acacia acuminata* (Leguminosae: Mimosoideae) complex in Western Australia. *Journal of Evolution and Biology* 15: 576–587.
- CABANNE, G.S., D'HORTA, F.M., SARI, E.H.R., SANTOS, F.R., MIYAKI, C.Y. 2008. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): biogeography and systematics implications. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49, 760–773.
- CABIDO, D., CABIDO, M., GARRÉ, S.M., GORGAS, J.A., MIATELLO, R., RAVELO, A., RAMBALDI, S., TASSILE, J. 2003 Regiones naturales de la Provincia de Córdoba. *Publicaciones Técnicas*, Saerie C, Dirección de Ambiente, Agencia Córdoba D.A.C. y T
- CABRERA, A.L. 1971. Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14: 1-55.
- CABRERA, A.L., WILLINK, A. 1973. Biogeografía de América Latina. Monografía N° 13. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D.C. pp. 120.
- CAETANO, S., PRADO, D., PENNINGTON, R.T., BECK, S., OLIVEIRA.FILHO, A., SPICHIGER, R., NACIRI, Y. 2008. The history of Seasonally Dry Tropical Forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Molecular Ecology*, 17, 3147–3159.
- CARNEVALLI, R. 1994. Fitogeografía de la Provincia de Corrientes. Gobierno de la Provincia de Corrientes-INTA. pp.324.
- CARON, H., DUMAS, S., MARQUE, G., MESSIER, C., BANDOU, E., PETIT, R.J., KREMER, A. 2000. Spatial and temporal distribution of chloroplast DNA polymorphism in a tropical tree species. *Molecular Ecology* 9: 1089–1098.
- CHASE, M.W., ZMARZTY, S., LLEDO, M.D., WURDACK, K.J., SWENSEN, S.M., FAY, M.F. 2002. When in doubt, put it in Flacourtiaceae: a molecular phylogenetic analysis based on plastid *rbcL* DNA sequences. *Kew Bulletin* 57: 141–181.

- CLAPPERTON, C.M. 1993. Nature of environmental changes in South America at the Last Glacial Maximum. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, and Palaeoecology* 101: 189–208.
- COLINVAUX, P.A., DE OLIVEIRA, P.E., MORENO J.E., MILLER, M.C., BUSH, M.B. 1996a. A long pollen record from lowland Amazonia: forest and cooling in glacial times. *Science* 274: 85-88.
- COLINVAUX, P.A., LIU, K-B., DE OLIVEIRA, P.E., BUSH, M.B., MILLER, M.C., STEINITZ KANNAN, M. 1996b. Temperature depression in the lowland tropics in glacial times. *Climatic Change* 32: 19–33.
- COLLEVATTI, R.G., RABELO, S.G., VIEIRA, R.F. 2009. Phylogeography and disjunct distribution in *Lychnophora ericoides* (Asteraceae), an endangered cerrado shrub species. *Annals of Botany*, 104, 655–664.
- COMES, H.P., KADEREIT, J.W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends in Plant Science* 3: 432-438.
- COSACOV, A., SÉRSIC, A.N., SOSA, V., JOHSON, L.A, COCUCCI, A.A. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography* vol. 37 p. 1463 - 1477.
- COSACOV, A., JOHNSON, L.A., PAIARO, V., COCUCCI, A.A., CÓRDOBA, F.E., SÉRSIC, A.N. 2012. Precipitation rather than temperature influenced the phylogeography of the endemic shrub *Anarthrophyllum desideratum* in the Patagonian steppe. *Journal of Biogeography* p. 1 - 15.
- CRISCI, J.V., FREIRE, S.E., SANCHO, G., KATINAS, L. 2001. Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania mountain ranges (Buenos Aires, Argentina). *Caldasia* 23: 21-41.
- CRUZAN, M.B., TEMPLETON, A.R. 2000. Paleoeecology and coalescence: phylogeographic analysis of hypotheses from the fossil record. *TREE* vol. 15, no. 12.
- CULLINGS, K.W. 1992. Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Molecular Ecology* 1: 233–240.

- CUNNINGHAM, C.W. & COLLINS, M.T. 1998. Beyond area relationships: Extinction and recoloniation in molecular marine biogeography. pp 297-232. En: De Salle R, Schierwater B (eds.) *Molecular approaches to ecology and evolution*. Birkhäuser, Basilea.
- DAMUTH, E., FAIRBRIDGE, R.W. 1970. Equatorial Atlantic deep-sea arkosic sands and Ice-Age aridity in tropical South America. *Bulletin of the Geological Society of America* 81:189–206.
- DARRIBA, D., TABOADA, G.L., DOALLO, R., POSADA, D. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9:772.
- DAVIS, C.C., CHASE, M.W. 2004. Elatinaceae are sister to Malpighiaceae; Peridiscaceae belong to Saxifragales *American Journal of Botany* 91 (2): 262-273.
- DE LA SOTA, E.R. 1967. Composición, origen y vinculaciones de la flora pteridológica de las sierras de Buenos Aires (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 2-3: 105-128.
- DEMASURE, B., SODZI, N., PETIT, R.J. 1995. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding region of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology* 4:129-131.
- DERGAM, J.A., PAIVA, S.R., SCHAEFFER, C.E., GODINHO, A.L, VIEIRA, F. 2002. Phylogeography and RAPD-PCR variation in *Hoplías malabaricus* (Bloch, 1794) (Pisces, Teleostei) in southeastern Brazil. *Genetics and Molecular Biology*, 25, 4, 379-387.
- DICK, C.W., HEUERTZ, M. 2008. The complex biogeographic history of a widespread tropical tree species. *Evolution*, 62, 2760–2774.
- DOYLE, J.J., DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemistry Bulletin* 19: 11–15.
- DRUMMOND, A.J., RAMBAUT, A., SHAPIRO, B., PYBUS, O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 22, 1185–1192.

- DRUMMOND, A.J., SUCHARD, M.A., XIE, D., RAMBAUT, A. 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969–1973.
- DUMOLIN-LAPE`GUE, A., KREMER, A., PETIT, R.J. 1999. Are chloroplast and mitochondrial DNA variation species independent in oaks? *Evolution*, 53, 1406–1413.
- EHRICH, D., ALSOS, I.G., BROCHMANN, C. 2008. Where did the northern peatland species survive the dry glacials? Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) as an example. *Journal of Biogeography* 35: 801 – 814.
- EIDENSEN, P.B., ALSOS, I.G., POPP, M., STRENSRUD, Ø., SUDA, J., BROCHMANN, C. 2007. Nuclear versus plastid data: complex Pleistocene history of a circumpolar key species. *Moleculr Ecology* 16: 3902-3925.
- ELÍAS, G., SARTOR, M., SOLÍS NEFFA, V.G. 2011. Patterns of cytotype variation of *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Turneraceae) in mountain ranges of central Argentina. *Journal of Plant Research* 124:25–34.
- EMERSON, B.C., PARADIS, E., THÉBAUD, C. 2001. Revealing the demographic histories of species using DNA sequences. *TRENDS in Ecology and Evolution* vol.16, 12: 707-716.
- ERIZE, F., CANEVARI, M., CANEVARI, P., COSTA, G., RUMBOLL, M. 1993. Los parques nacionales de la Argentina y otras de sus áreas naturales. Ed. El Ateneo.
- EXCOFFIER, L., SMOUSE, P.E., QUATTRO, J.M. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479–494.
- EXCOFFIER, L., LISCHER, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10, 564–567.
- FERNÁNDEZ, A. 1987. Estudios cromosómicos en *Turnera* y *Piriqueta* (Turneraceae). *Bonplandia* 6: 1-21.
- FERRIS, C., OLIVER, R.P., DAVY, A.J., HEWITT, G.M. 1993. Native oak chloroplasts reveal an ancient divide across Europe. *Molecular Ecology*, 2, 337–344.

- FERRIS, C., KING, R.A., HEWITT, G.M. 1999. Isolation within species and the history of glacial refugia. In: *Molecular Systematics and Plant Evolution* (eds. Hollingsworth PM, Bateman RM, Gornall RJ), pp. 20–34. Taylor & Francis, London.
- FONTANELLA, F.M., FELTRIN, N., AVILA, L.J., SITES, J.W. JR., MORANDO, M. 2011. Early stages of divergence: phylogeography, climate modeling, and morphological differentiation in the South American lizard *Liolaemus petrophilus* (Squamata: Liolaemidae). *Ecology and Evolution* 792 - 808.
- FRANGI, J.L. 1975. Sinopsis de las comunidades vegetales y el medio de las Sierras de Tandil (Provincia de Buenos Aires). *Boletín Sociedad Argentina de Botánica* 15 (4): 293 - 319.
- FREGONEZI, J.N., TURCHETTO, C., BONATTO, S.L., FREITAS, L.B. 2012. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2013, 171, 140–153.
- FRENGÜELLI, F. 1950. Rasgos generales de la morfología y la geología de la provincia de Buenos Aires. *Anales LEMIT, serie II*, 33, 72 pp. La Plata.
- FU, Y.X. 1997. New statistical tests of neutrality for DNA samples from a population. *Genetics* 147: 915–925.
- GONZÁLEZ, A.M. 2000. Estudios anatómicos en los géneros *Turnera* y *Piriqueta* (Turneraceae). Tesis doctoral. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- GRAZZIOTIN, F.G., MONZEL, M., ECHEVERRIGARAY, S., BONATTO, S.L. 2006. Phylogeography of the *Bothrops jararaca* complex (Serpentes: Viperidae): past fragmentation and island colonization in the Brazilian Atlantic Forest. *Molecular Ecology* 15, 3969–3982.
- GRELA, I.A. 2004. Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Master's Thesis. Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas, Ministerio de Educación y Cultura, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

- GROEBER, P. 1936. Oscilaciones del clima en la Argentina desde el Plioceno. Holmbergia, *Revista Centro Estudiantes Ciencias Naturales* 1: 71-84, Buenos Aires.
- GUINDON, S., GASCUEL, O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5):696-704.
- HAMRICK, J.L., GODT, M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. In: Brown ADH, Clegg MT, Kahler AL, Weir BS, eds. *Plant population genetics and genetic resources*. Sinauer, Sunderland, pp. 43-63.
- HAMRICK, J.L., GODT, M.J.W., SHERMAN-BROYLES, S.L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6: 95-124.
- HARPENDING, H.C. 1994. Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human Biology* v. 66, n. 4: 591-600.
- HARPENDING, H.C., SHERRY, S.T., ROGERS, A.R. 1993. The genetic structure of ancient human populations. *Current Anthropology* 34:483-496.
- HEUERTZ, M., HAUSMAN, J., HARDY, O.J., VENDRAMIN, G.G., FRASCARIA-LACOSTE, N., VEKEMANS, X. 2004. Nuclear microsatellites reveal contrasting patterns of genetic structure between western and southeastern European populations of the common ash (*Fraxinus excelsior* L.). *Evolution*, 58(5), pp. 976-988.
- HEWITT, G.M. 1996. Some genetic consequence of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58: 247-276.
- HEWITT, G.M. 1999. Post-glacial re-colonization of European biota. *Biological Journal of the Linnean Society* 68: 1-2.
- HEWITT, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature*, vol 405: 907 - 913.
- HEWITT, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology* 10: 537-549.
- HICKEN, C.M. 1918-1919. La migración de los helechos en la flora de Tucumán. Pp. 187- 209. Primera Reunión Nacional de la Sociedad Científica Argentina de Ciencias Naturales, Tucumán, Argentina.

- 
- HIGGINS, D., THOMPSON, J., GIBSON, T. THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G., GIBSON, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22:4673-4680.
- HIJMANS, R.J., GUARINO, L., ROJAS, E. 2011. DIVA-GIS version 7.5. A geographical information system for the analysis of biodiversity data.
- HUDSON, R.R. 1990. Gene genealogies and the coalescent process. *Oxford Survive Evolution Biology* 7:1–44.
- HUTCHINSON, D.W., TEMPLETON, A.R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distances measures: inferring the relative inferences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution*, 53:1898-1914.
- IRIARTE, J. 2006. Vegetation and climate change since 14,810<sup>14</sup> C yr B.P. in southeastern Uruguay and implications for the rise of early formative societies. *Quaternary Research* 65: 20–32.
- IRIONDO, M.H. 1981. Antigüedad del último cambio climático en el Litoral. *Ecología* 6: 5–8.
- IRIONDO, M.H. 1991. El Holoceno en el Litoral. *Comunicaciones del Museo Provincial de Ciencias Naturales “Florentino Ameghino” (Nueva Serie)* 3: 1-39.
- IRIONDO, M.H. 1992. El Chaco. *Holoceno* 1: 50-63.
- IRIONDO, M.H. 1995. El Cuaternario del Chaco, en Argollo J., Mourguiat Ph (eds.), *Climas Cuaternarios en América del Sur*: Marsella, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement et Coopération, 344 pp.
- IRIONDO, M.H. 1999. Climatic changes in the South American plains: records of a continent-scale oscillation. *Quaternary International* 57-58: 93-112.
- IRIONDO, M.H. & GARCÍA, N.O. 1993. Climatic variations in the Argentine plains during the last 18.000 years. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, and Palaeoecology* 101: 209-220.
- JI, W., LEBERG, P. 2002. A GIS-based approach for assessing the regional conservation status of genetic diversity: an example from the Southern Appalachians. *Environmental Management* 29: 531–544.
-

- JOHNSON, W.E., SLATTERY, J.P., EIZIRIK, E., KIM, J., RAYMOND, M.M., BONACIC, C., CAMBRE, R., CRAWSHAW, P., NUNES, A., SEUÁNEZ, H.N., MOREIRA, M.A.M., SEYMUR, K.L., SIMON, F., SWANSON, W., O'BRIEN, S.J. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* 8, S79–S94.
- KADEREIT, J.W. 1994. Molecules and morphology, phylogenetics and genetics. *Botanica Acta* 107: 369-373.
- KELCHNER, S.A. 2000. The evolution of non-coding chloroplast DNA and its application in plant systematics. *Annual Missouri Botanical Garden* 87: 482-298.
- KELCHNER, S.A., THOMAS, M.A. 2007. Model use in phylogenetics: nine key questions. *Trends in Ecology and Evolution*, 22, 87–94.
- KINGMAN, J.F.C. 1982. The coalescent. *Stochastic Processes Applications* 13: 235-248.
- KNOWLES, L.L., MADDISON, W.P. 2002. Statistical phylogeography. *Molecular Ecology* 11: 2623–2635.
- KOVALSKY, I.E. 2012. Origen y establecimiento de neopoliploides en poblaciones naturales de *Turnera sidoides* subsp. *carnea*. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- KOVALSKY, I.E., SOLÍS NEFFA, V.G. 2012. Evidence of  $2n$  microspore production in a natural diploid population of *Turnera sidoides* subsp. *carnea* and its relevance in the evolution of the *T. sidoides* (Turneraceae) autopolyploid complex. *Journal of Plant Research* 125: 725–734.
- KURTZ, F. 1904. Flora de Córdoba. In: Ríó, M. E. & L. Achával (eds.), Geografía de la Provincia de Córdoba. Vol. 1, pp. 270-343. Compañía Sudamericana de Billetes de Banco, Buenos Aires.
- LEDRU, M.P. 1993. Late Quaternary environmental and climatic changes in Central Brazil. *Quaternary Research* 39: 90-98.
- LEGENDRE, P., LEGENDRE, L. 1998. *Numerical Ecology*. Second English Edition ELSEVIER. Amsterdam. pp. 853.

- LIBRADO, P., ROZAS, J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
- LORENZ-LEMKE, A.P., MUSCHNER, V.C., BONATTO, S.I., CERVI, A.C., SALZANO, F.M., FREITAS, L.B. 2005. Phylogeographic Inferences Concerning Evolution of Brazilian *Passiflora actinia* and *P. elegans* (Passifloraceae) Based on ITS (nrDNA) Variation. *Annals of Botany* 95: 799–806.
- LORENZ-LEMKE, A.P., TOGNI, P.D., MADER, G., KRIEDT, R.A., STEHMANN, J.R., SALZANO, F.M., BONATTO, S.L., FREITAS, L.B. 2010. Plant species diversification in eastern South American highland subtropical region: a phylogeographic perspective with native *Petunia* (Solanaceae). *Molecular Ecology*, 19, 5240-5251.
- LOWE, A., MUNRO, R., SAMUEL, S., COTTRELL, J. 2004. The utility and limitations of chloroplast DNA analysis for identifying native British oak stands and for guiding replanting strategy. *Forestry*, vol. 77, no. 4, 335-347.
- LUTI, R., SOLÍS, M., GALERA, F., FERREIRA, N., NORES, M., HERRERA, M., BARRERA, J.C. 1979. Vegetación. En: Vázquez JB, Matiello R, Roque M (eds.) *Geografía Física de la Provincia de Córdoba*. Córdoba: Bold.
- LYNCH, M., MILLIGAN, B.G. 1994. Analysis of population structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.
- MACE, G.M., PURVIS, A. 2008. Evolutionary biology and practical conservation: bridging a widening gap. *Molecular Ecology* 17: 9–19.
- MÄDER, G., FREGONEZI, J.N., LORENZ-LEMKE, A.P., BONATTO, S.L., FREITAS, L.B. 2013. Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evolutionary Biology*, 13:178.
- MAGRI, D., VENDRAMIN, G.G., COMPS, B., DUPANLOUP, I., GEBUREK, T., GÖMÖRY, D., LATALOWA, M., LITT, T., PAULE, L., ROURE, J.M., TANTAU, I., VAN DER KNAAP, W.O., PETIT, R.J., BEAULIEU, J. 2006. A new scenario for the Quaternary history of European beech populations: palaeobotanical evidence and genetic consequences. *New Phytologist* 171: 199–221.

- MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27: 209-220.
- MARCHELLI, P., GALLO, L., SCHOLZ, F., ZIEGENHAGEN, B. 1998. Chloroplast DNA markers reveal a geographical divide across Argentinean southern beech *Nothofagus nervosa* (Phil.) Dim. et Mil. distribution area. *Theoretical and Applied Genetics*. 97: 642 - 646.
- MARKGRAF, V. 1991. Younger Dryas in southern South America?. *Boreas* 20: 63-69.
- MARKGRAF, V., BRADBURY, J.P. 1982. Holocene climatic history of South America. *Striae* 16: 40-45.
- MÁRQUEZ, A.J., MALDONADO, E., GONZÁLEZ, S., BECCACECI, M.D., GARCIA, J.E., DUARTE, J.M.B. 2006. Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics* 7:563-575.
- MAYNARD SMITH, J., HAIGH, J. 1974. The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetic Resources* 23: 23-35.
- MILLER, M.P. 2005. Alleles In Space: Computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *Journal of Heredity* 96: 722-724.
- MOLA MORINGA, N.S., MORENO, E.M.S, KOVALSKI E.I., ROGGERO J.M., SOLÍS NEFFA V.G. 2011. Patrones de variación morfológica y genética de *Turnera sidoides* subsp. *carnea* (Turneraceae). XXXIII Jornadas Argentinas de Botánica. Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica.
- MOORE, W. 1995. Inferring phylogenies from mtDNA variation: mitochondrial-gene trees versus nuclear-gene trees. *Evolution* 49:718-726.
- MORELLO, J. 1958. La provincia fitogeográfica del Monte. Universidad Nacional del Tucumán, Instituto Miguel Lillo, 155 pags.
- MORELLO, J., MATTEUCCI, S.D. 1999. Biodiversidad y fragmentación de los bosques en la Argentina. En: S.D. Matteucci; O.T. Solbrig; J.Morello y G. Halffter. 1999. Biodiversidad y uso de la tierra. Conceptos y ejemplos de latinoamérica. EUDEBA-UNESCO, Buenos Aires. Pp. 463-498.

- MORENO, E.M.S., MOLA MORINGA, N.S., ROBLEDO, G., PANSERI, A.F., SOLÍS NEFFA, V.G. 2011. *Análisis de la variabilidad genética de los citotipos de poblaciones mixtas del complejo autoploiploide Turnera sidoides L. (Turneraceae)*. XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA. C. *Journal of Basic and Applied Genetics* p.237-238.
- MORENO, E.M.S., MOLA MORINGA, N.S., PANSERI, A.F. SOLÍS NEFFA, V.G. 2013. *Diversidad y estructura genética de poblaciones diploides y autoploiploides de Turnera sidoides subsp. pinnatifida*. XLII Congreso Argentino de Genética, III Reunión Regional SAG-NOA. *Journal of Basic and Applied Genetics* vol. XXIV (1), p. 222.
- MORENO, E.M.S., SPERANZA, P.R., ROGGERO LUQUE, J.M., SOLÍS NEFFA, V.G. “Analysis of a contact zone between subspecies of the complex *Turnera sidoides* L. (Passifloraceae). *Plant Systematic and Evolution* **inéd.**
- MORRONE, J.J. 2001. Biogeografía de América Latina y el Caribe. Vol. 3. Zaragoza, Spain: Manuales&Tesis SEA.
- MORRONE, J. J. 2006. Biogeographic areas and transition zones of Latin America and the Caribbean Islands, based on panbiogeographic and cladistic analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51: 467-494.
- MUELLNER, N.A., TREMETSBERGER, K., STUESSY, T., BAEZA, C.M. 2005. Pleistocene refugia and recolonization routes in the southern Andes: insights from *Hypochaeris palustris* (Asteraceae, Lactuceae). *Molecular Ecology* 14: 203-212.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 70: 3321-3323.
- NEI, M. 1986. Stochastic errors in DNA evolution and molecular phylogeny. In Gershowitz, H., Rcknagel, D.L., Tashian, R.E. (eds.). *Evolutionary Perspectives and the New Genetics*. pp. 133-147. Alan R. Liss, New York.
- NEI, M. 1987. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York.
- NEI, M., MARUYAMA, T., CHAKRABORTY, R. 1975. Bottleneck effect and genetic variability in populations. *Evolution* 29:1–10.

- NEIGEL, J.E., AVISE, J.C. 1993. Application of a random walk model to geographic distributions of animal mitochondrial DNA variation. *Genetics* 135:1209-1220.
- NOVAES, R.M.L., PIRES DE LEMOS, J.F., RIBEIRO, R.A., LOVATO, M.B. 2010. Phylogeography of *Plathyenia reticulata* (Leguminosae) reveals patterns of recent range expansion towards northeastern Brazil and southern Cerrados in Eastern Tropical South America. *Molecular Ecology* 19, 985–998.
- NYBOM, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13: 1143-1155.
- NYBOM, H., BARTISH, I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematic* 3/2: 93-114.
- OJEDA, A.A. 2010. Phylogeography and genetic variation in the South American rodent *Tympanoctomys barrerae* (Rodentia: Octodontidae). *Journal of Mammalogy*, 91(2).
- PALMA, R.E., RIVERA-MILLA, E., SALAZAR-BRAVO, J., TORRES-PÉREZ, F., PARDIÑAS, U.F.J., MARQUET, P.A., SPOTORNO, A.E., MEYNARD, A.S.P., YATES, T.L. 2005. Phylogeography of *Oligoryzomys longicaudatus* (Rodentia: Sigmodontinae) in temperate South America. *Journal of Mammalogy*, 86(1):191–200.
- PALMA-SILVA, C., LEXER, C., PAGGI, G.M., BARBARA, T., BERED, F., BODANESE-ZANETTINI, M.H. 2009. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (Bromeliaceae), a neotropical forest species *Heredity* 103: 503–512.
- PALMA-SILVA, C., WENDT, T., PINHEIRO, F., BARBARÁ, T., FAY, M.F., COZZOLINO, S., LEXER, C. 2011. Sympatric bromeliad species (*Pitcairnia* spp.) facilitate tests of mechanisms involved in species cohesion and reproductive isolation in Neotropical inselbergs. *Molecular Ecology*, 20:3185-3201.
- PANSERI, A.F. 2011. Estructura genética y variación de los caracteres reproductivos en *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Turneaceae). Tesis Doctoral, Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

- PANSERI, A.F., SEJO, J.G., SOLÍS NEFFA, V.G. 2008. Análisis de la producción y frecuencia de microsporas no reducidas en diploides de *Turnera sidoides* (Turneraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 43 (1-2): 95 - 101.
- PARKER, P.G., SNOW, A.A., SCHUG, M.D, BOOTOM, G.C., FUERST, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, volume 79, Issue 2, 361-382.
- PASTORINO, M.J., GALLO, L.A. 2002. Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *Journal of Biogeography* 29: 1167-1178.
- PASTORINO, M.J., GALLO, L.A., HATTEMER, H.H. 2004. Genetic variation in natural populations of *Austrocedrus chilensis*, a cypress of the Andean-Patagonian forest. *Biochemical Systematics and Ecology* 32: 993–1008.
- PATTERSON C, WILLIAMS DM, HUMPHRIES CJ. 1993. Congruence between molecular and morphological phylogenies. *Annual review of ecology and Systematics* 24: 153-188.
- PEAKALL, R., SMOUSE, P.E. 2006. GENALEX 6: Genetic Analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology. Notes* 6: 288-295.
- PENNINGTON, R.T., PRADO, D.E., PENDRY, C.A. 2000. Neotropical seasonally dry forests and Quaternary vegetation changes. *Journal of Biogeography* 27: 261–273.
- PETIT, R.J., KREMER, A., WAGNE, D.B. 1993. Finite island model for organelle nuclear genes in plants. *Heredity* 71: 630-641.
- PETIT, R.J., GRIVET, G. 2002. Optimal Randomization Strategies When Testing the Existence of a Phylogeographic Structure. *Genetics* 161: 469–471.
- PETIT, R.J., CSAIKL, U.M., BORDÁCS, S., BURG, K., COART, E., COTTRELL, J., VAN DAM, B., DEANS, J.D., DUMOLIN-LAPÈGUE, S., FINESCHI, S., FINKELDEY, R., GILLIES, A., GLAZ, I., GOICOECHEA, P.G., JENSEN, J.S., KÖNIG, A.O., LOWE, A.J., MADSEN, S.F., MÁTYÁS, G., MUNRO, R.C., OLALDE, M., PEMONGE, M.H., POPESCU, F., SLADE, D., TABBENER, H., TAURCHINI, D., DE VRIES, S.G.M., ZIEGENHAGEN, B., KREMER, A. 2002. Chloroplast DNA variation in European

- white oaks: phylogeography and patterns of diversity based on data from over 2600 populations. *Forest Ecology and Management* 156, 5–26.
- PIELOU, E.C. 2008. Plankton, from the last ice age to the year 3007. *ICES Journal of Marine Science*, 65: 296–301.
- PINHEIRO, F., DE BARROS M.F., PALMA-SILVA C., FAY, M.F., LEXER, C., COZZOLINO, S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*, 38, 1923–1935.
- POLJACK, S., CONFALONIERI, V.A., FASSANELLA, M., GABRIELLI, M., LIZARRALDE M.S. 2010. Phylogeography of the armadillo *Chaetophractus villosus* (Dasypodidae – Xenarthra): post-glacial range expansion from Pampas to Patagonia (Argentina). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 55: 38 - 46.
- PONS, O., PETIT, R.J. 1995. Estimation, variance and optimal sampling of gene diversity. I. Haploid locus. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 462–470.
- POPOLIZIO, E. 1970. Algunos rasgos de la geomorfología del Nordeste Argentino. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 11 (Supplement): 17-35.
- POPOLIZIO, E. 1982. Geomorphology of the Argentine Northeast. *Water International* 7: 162-177.
- POPOLIZIO, E. 2003. El Paraná, un río y su historia geomorfológica. Ph.D. Thesis, Universidad del Salvador, Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina.
- POSADA, D., CRANDALL, K.A. 2001. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. *TRENDS in Ecology & Evolution* Vol.16 No.1.
- PRADO, D.E., GIBBS, P.E. 1993. Patterns of species distributions in the dry seasonal forest of South America. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 80: 902–927.
- PRANCE, G.T. 1996. Islands in Amazonia. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London (B)* 351: 823-833.
- PREMOLI, A.C., KITZBERGER, T., VEBLEN, T.T. 2000. Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *Journal of Biogeography* 27: 251-260.

- 
- PREMOLI, A.C., MATHIASSEN, P., ACOSTA, M.C., RAMOS, V.A. 2012. Phylogeographically concordant intraspecific cpDNA divergence in sympatric *Nothofagus*. How deep can it be? *New Phytologist* 193: 261 - 261
- PRIETO, A.R. 1996. Late Quaternary vegetational and climatic changes in the Pampa grassland of Argentina. *Quaternary Research* 45: 73-88.
- PROVAN, J. WATTIER, R.A., MAGGS, C.A. 2005. Phylogeographic analysis of the red seaweed *Palmaria palmata* reveals a Pleistocene marine glacial refugium in the English Channel. *Molecular Ecology* 14: 793-803.
- QUIROGA, P., PREMOLI, A.C. 2007. Genetic patterns in *Podocarpus parlatorei* reveal a long term persistence of cold tolerant elements in southern Yungas. *Journal of Biogeography* 34: 447–455.
- QUIROGA, P., PREMOLI, A.C. 2010. Genetic structure of *Podocarpus nubigena* (Podocarpaceae) provides evidence of Quaternary and ancient historical events. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 285: 186–193.
- RAMBAUT, A., DRUMMOND, A.J. 2009. Tracer version 1.5 (<http://beast.bio.ed.ac.uk>).
- RAMBO, B. 1954. Análise histórica da flora de Pôrto Alegre. *Sellowia* 6: 9-112.
- RAMOS-ONSINS, S.E., ROZAS, J. 2002. Statistical Properties of New Neutrality Tests Against Population Growth *Molecular Biology and Evolution* 19(12):2092–2100.
- RANNALA, B., YANG, Z. 1996. Probability distribution of molecular evolutionary trees: a new method of phylogenetic inference. *Journal of Molecular Evolution*. 43:304-311.
- RAUSHER, M.D., LU, Y. MEYER, K. 2008. Variation in Constraint Versus Positive Selection as an Explanation for Evolutionary Rate Variation Among Anthocyanin Genes. *Journal of Molecular Evolution* 67: 137-144.
- RIBEIRO, R.A., LEMOS-FILHO, J.P., RAMOS, A.C.S., LOVATO, M.B. 2011. Phylogeography of the endangered rosewood *Dalbergia nigra* (Fabaceae): insights into the evolutionary history and conservation of the Brazilian Atlantic Forest. *Heredity* 106, 46–57.
-

- RIESEBERG, L.H., WENDELL, J.F. 1993. Introgression and its consequences in plants, in *Hybrid Zones and the Evolutionary Process*, Harrisn, R., Ed., Oxford University Press. New York, 70.
- ROGERS, A. R., HARPENDING, H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular Biology and Evolution* 9: 552-569.
- ROGGERO LUQUE JM. 2010. Estudios cromosómicos en poblaciones de *Turnera sidoides* L. (Turneraceae) del sur de Brasil. Tesina de graduación FACENA-UNNE.
- RUZZANTE, D.E., WALDE, S.J., MACCHI, P.J., ALONSO, M., BARRIGA, J.P. 2011. Phylogeography and phenotypic diversification in the Patagonian fish *Percichthys trucha*: the roles of Quaternary glacial cycles and natural selection. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 514–529
- SANG, T., DONOGHUE, M.J., ZHANG, D. 1997. Evolution of alcohol dehydrogenase genes in peonies (*Paeonia*): phylogenetic relationships of putative nonhybrid species. *Molecular Biology and Evolution* 14: 994–1007.
- SCHAAL, B.A., HAYWORTH, D.A., OLSEN, K.M., RAUSCHER, J.T., SMITH, W.A. 1998. Phylogeographic studies in plants: problems and prospects. *Molecular Ecology* 7: 465-474.
- SCHAAL, B.A., OLSEN, K.M. 2000. Gene genealogies and population variation in plants. *PNAS* vol. 97, no. 13, 7024-7029.
- SCHWEIGER, O., STETTELE, J., KUDRNA, O., KLOTZ, S., KÜHN, I. 2009. Climate change can cause spatial mismatch of trophically interacting species. *Ecology* 89:3472–3479.
- SÉRSIC, A.N., COSACOV, A., COCUCCI, A.A., JOHNSON, L.A., POZNER, R., AVILA, L.J., SITES, J.W., MORANDO, M. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society*, 103, 475–494.
- SHANNON, C., WEAVER, W. 1949. The mathematical theory of communication. University of Illinois Press, Urbana.

- SHAW, J., LICKEY, E.B., BECK, J.T., FRAMER, S.B., LIU, W., MILLER, J., SIRIPUN, K.C., WINDER, C.T., SCHILLING, E.E., SMALL, R.L. 2005. The tortoise and the hare II: relative utility of 21 noncoding chloroplast DNA sequences for phylogenetic analysis. *American Journal of Botany* 92(1): 142–166.
- SHAW, J., LICKEY, E.B., SCHILLING, E.E., SMALL, L.R. 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(3): 275–288.
- SILVA, S.M., MORAES-BARROS, N., RIBAS, C.C., FERRAND, N., MORGANTE, J.S. 2012. Divide to conquer: a complex pattern of biodiversity depicted by vertebrate components in the Brazilian Atlantic Forest. *Biological Journal of the Linnean Society*, 107, 39–55.
- SIMONS, M.P., OCHOTERENA, H. 2000. Gaps as Characters in Sequence-Based Phylogenetic Analyses. *Systematics Biology* 49(2):369–381.
- SIMPSON, B.B. 1975. Pleistocene changes in the flora of the high tropical Andes. *Paleobiology* 1: 273-294.
- SIMPSON, B.B., TODZIA, C.A. 1990. Patterns and process in the development of the High Andean flora. *American Journal of Botany* 77: 1419-1432.
- SLATKIN, M., HUDSON, R.R. 1991. Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing populations. *Genetics*, 129:555-562.
- SOLIANI, C., GALLO, L.A., MARCHELLI, P. 2012. Phylogeography of two hybridizing southern beeches (*Nothofagus* spp.) with different adaptive abilities. *Tree Geentics & GENomes* 8: 659 – 673.
- SOLÍS NEFFA, V.G. 2000. Estudios biosistemáticos en el complejo *Turnera sidoides* L. (Turneraceae, Leiocarpace). Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina.
- SOLÍS NEFFA VG. 2007. Estudios evolutivos en el complejo poliploide *Turnera sidoides* (Turneraceae). II Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución. Palmira (Colombia).

- SOLÍS NEFFA V.G. 2010. Geographic patterns of morphological variation in *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* (Turneraceae). *Plant Systematic and Evolution* 284: 231-253.
- SOLÍS NEFFA, V.G., FERNÁNDEZ, A. 2001. Cyto geography of the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae, Leiocarpace). *Botanical Journal of the Linnean Society* 137: 189-196.
- SOLÍS NEFFA, V.G., FERNÁNDEZ, A. 2002. Karyotypic studies in *Turnera sidoides* complex (Turneraceae, Leiocarpace). *American Journal of Botany* 89: 551-558.
- SOLÍS NEFFA, V.G., SEIJO, J.G. 2003. Citogeografía del complejo autoploide *Turnera sidoides* L. (Turneraceae). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 38 (Suppl.): 247-248.
- SOLÍS NEFFA, V.G., FALOCCHI, M.B., SEIJO, J.G. 2003. Cyanogenesis variation in the *Turnera sidoides* L. polyploid complex (Turneraceae). *Botanical Journal Linnean Society* 141: 85-94.
- SOLÍS NEFFA, V.G., PANSERI, A.F., REYNOSO, W.L., SEIJO, J. G. 2004. Variación del color de flores y números cromosómicos en el noroeste del área de distribución de *Turnera sidoides* (Turneraceae). *Bonplandia* 13: 117-128.
- SOLÍS NEFFA, V.G., SPERANZA, P.R. 2006. Patrones de hibridación entre subespecies del complejo *Turnera sidoides*. 57° Congreso Nacional de Botánica. Gramado, RS (Brasil).
- SOLÍS NEFFA, V.G., MORENO, E.M.S., ROGGERO, J.M., MACHADO, H., SPERANZA, P.R. 2008. Análisis de una zona de contacto entre subespecies del complejo *Turnera sidoides*. Tandil (Buenos Aires). XXXVII Congreso Argentino de Genética.
- SOLTIS, P.S., DOYLE, J.J., SOLTIS, D.E. 1992. Molecular data and polyploidy evolution in plants. En: *Molecular Systematics of Plants*. Soltis PS, Soltis DE, Doyle JJ (eds.), Chapman and Hall, New York. pp. 177-201.
- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. 1993. Molecular data and the dynamic nature of polyploidy. *Critical Reviews in Plants Sciences* 12: 243-273.

- SOLTIS, D.E., GITZENDANNER, M.A., STRENGE, D.D., SOLTIS, P.S. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematic and Evolution* 206: 353-373.
- SOLTIS, D.E., SOLTIS, P.S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In *Molecular Systematics of Plants II*, D.E. Soltis, and J. Doyle (eds.) pp. 1-42, Kluwer, Boston.
- SOUBIES, F., SUGUION, K., MARTIN, L., LEPRUN, J., SERVANT, M., TURCQ, B., FOURNIER, M., DELAUNE, M., SFEDDINE, A. 1991. The Quaternary deposits of the Serra dos Carajas (State of Pará, Brazil) – ages and other preliminary results. Proceedings Global Changes in South America during the Quaternary. *Boletim Instituto de Geociencias-Universidade de São Paulo, Publicação Especial*, 8: 223–243.
- SPERANZA, P.R., SEJO, J.G., GRELA, I.A., SOLÍS NEFFA, V.G. 2007. cpDNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography* 34: 427–436.
- SPICHIGER, R., PALESE, R., CHAUTEEMS, A. RAMELLA, L. 1995. Origin, affinities and diversity hot spots of the Paraguayan dendrofloras. *Candollea* 50:515–537.
- SPICHIGER, R., CALENGE, C. BISE, B. 2004. Geographical zonation in the Neotropics of tree species characteristic of the Paraguay-Paraná Basin. *Journal of Biogeography* 31:1489-1501.
- STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal evolution in higher plants. Ed. Edward Arnold Ltd. London.
- STEHLIK, I. 2003. Resistance or emigration? Response of alpine plants to the Ice Age. *Taxon*, 52, 499–510.
- TABERLET, P., GIELLY, L., PAUTOU, G., BOUVET, J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105–1109.
- TABERLET, P., FUMAGALLI, L., WUST-SAUCY, A.G., COSSON, J.F. 1998. Comparative phylogeography and postglacial colonization routes in Europe. *Molecular Ecology*, 7, 453–464.

- TAJIMA, F. 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics* 105: 437-460.
- TAJIMA, F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585–595.
- TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, KUMAR S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution* 28: 2731-2739.
- TAPIA, A. 1935. Pilcomayo. Contribución al conocimiento de las llanuras argentinas. Dirección de Minas y Geología, Boletín No. 40, Buenos Aires, Argentina.
- TELLIER, F., MEYNARD, A.P., CORREA, J.A., FAUGERON, S., VALERO, M. 2009. Phylogeographic analyses of the 30 degrees S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: vicariance or parapatry? *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53, 679–693.
- TEMPLETON, A.R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Molecular Ecology*, 7: 381-397.
- TONNI, E.P., FIDALGO, F. 1978. Consideraciones sobre los cambios climáticos durante el Pleistoceno tardío-reciente en la Provincia de Buenos Aires. Aspectos ecológicos y zoogeográficos relacionados. *Ameghiniana* 15: 235–253.
- TREMETSBERGER, K., URTUBEY, E., TERRAB, A., BAEZA, C.M., ORTIZ, M.A., TALAVERA, M., KÖNIG, C., TEMSCH, E.M., KOHL, G., TALAVERA, S., STUESSY, T.F. 2009. Pleistocene refugia and polytopic replacement of diploids by tetraploids in the Patagonian and Subantarctic plant *Hypochaeris incana* (Asteraceae, Cichorieae). *Molecular Ecology* 18, 3668–3682
- TURCHETTO, C., FAGUNDES, N.J.R., SEGATTO, A.L., KUHLEMEIER, C., SOLÍS NEFFA, V.G., SPERANZA, P.R., BONATTO, S.L., FREITAS, L.B. 2014. Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology* 23: 374–389.

- TURCHETTO-ZOLET AC, PINHEIRO F, SALGUEIRO F, PALMA-SILVA C. 2012. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology*, 22, 1193–1213.
- URBAN I. 1883. Monographie der familie der Turneraceen. *Jahrbuch des Königlichen Botanischen Gartens und des Botanischen Museums zu Berlin* 2: 1-152.
- VAN DER HAMMEN, T., ABSY, M.L. 1994. Amazonia during the last glacial. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 109: 247-261.
- VARGAS P. 2003. Molecular evidence for multiple diversification patterns of alpine plants in Mediterranean Europe. *Taxon* 52: 463–476.
- VÁZQUEZ, D.P., GITTLEMAN, J.L. 1998. Biodiversity conservation: Does phylogeny matter? *Current Biology* 8: R379-R381.
- VUILLEUMIER, B.S. 1971. Pleistocene changes in the fauna and flora of South America. *Science* 173: 529-554.
- WAYNE, M.L., SIMONSEN, K.L. 1998. Statistical test of neutrality in the age of weak selection. *Tree* vol. 13, no. 6, 236-240.
- WENINK, P.W., BARKER, A.J., ROSNER, H.U., TILANUS, M.G.J. 1996. Global mitochondrial DNA phylogeography of holarctic breeding dunlins (*Calidris alpina*). *Evolution* 50, 318–330.
- WERNECK, F.P., GAMBLE, T., COLLI, G.R., RODRIGUES, M.T., SITES, J.W. 2012. Deep diversification and long term persistence in the south american “Dry Diagonal”: integrating continent-wide phylogeography and distribution modelling of geckos. *Evolution* 1 - 21.
- WHITTEMORE, A.T., SHAAL, B.A. 1991. Interspecific gene flow in oaks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 88, 2540–2544.
- WIKSTRÖM, N., SAVOLAINEN, V., CHASE, M.W. 2001. Evolution of the Angiosperms: calibrating the family tree. *Proceedings of the Royal Society of London B* 268: 2211-2220.
- WILLIS, K.J. & WHITTAKER, R.J. 2000. The refugial debate. *Science* 287: 1406–1407.
- WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28: 114-138.

- WURDACK, K.J., DAVIS, C.C. 2009. Malpighiales phylogenetics: Gaining ground on one of the most recalcitrant clades in the angiosperm tree of life. *American Journal of Botany* 96: 1551–1570.
- YOUNG, A., BOYLE, T., BROWN, T. 1996. The population genetic consequences of habitat fragmentation for plants. *Trends in Ecology and evolution* 11, 413-418.
- ZÁRATE, M., BLASI, A. 1993. Late Pleistocene–Holocene eolian deposits of Southern Buenos Aires Province, Argentina: a preliminary model. *Quaternary International* 17: 15–20.
- ZUCOL, A.F., BREA, M., SCOPEL, A. 2005. First record of fossil wood and phytolith assemblages of the Late Pleistocene in El Palmar National Park (Argentina). *Journal of South American Earth Sciences* 20: 33–43.

# ANEXO

**Anexo 1.** Secuencias nucleotídicas de los 36 haplotipos encontrados. Los haplotipos H1 y H2 se corresponden únicamente a las especies empleadas como grupo externo, *Turnera fernandezii* y *T. melochioides* respectivamente. Para información sobre los demás haplotipos referirse a la tabla 9. Únicamente se indican los sitios nucleotídicos polimórficos. El – indica un *indel*, el punto indica una base igual a la del H1, las distintas letras indican sustituciones. Hap. = haplotipo

Hap..	Sitios nucleotídicos																									
	13	23	31	38	45	53	54	57	58	84	89	95	101	102	110	112	113	118	137	142	167	170	171	176	189	190
H1	C	T	A	G	-	T	C	T	A	A	C	G	C	T	C	T	C	-	C	T	A	C	G	-	G	-
H2	T	.	C	T	-	.	.	.	.	C	G	.	G	.	C	.	-	.	C	.	G	.	T	-	-	-
H3	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H4	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	t	t	-	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H5	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H6	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H7	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H8	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H9	.	G	.	T	T	-	.	-	-	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H10	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	C	A	A	G	.	A	-	-	-
H11	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H12	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H13	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H14	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H15	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H16	.	G	.	T	T	-	-	-	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H17	.	G	.	T	T	-	.	-	-	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H18	.	G	.	T	T	-	.	-	-	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H19	.	G	.	T	T	-	.	-	-	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H20	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	.	-
H21	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H22	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	A
H23	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H24	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	.	-
H25	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	A
H26	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	A
H27	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	A
H28	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H29	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	t	t	-	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H30	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H31	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	.	-
H32	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H33	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H34	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H35	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	-	-
H36	.	G	.	T	T	-	.	.	.	.	G	T	T	-	T	.	.	-	A	A	G	.	A	-	.	-

**Anexo 1** Continuación.

Hap..	Sitios nucleotídicos					
	216	217	222	235	240	241
H1	C	T	C	A	C	A
H2	.	.	G	.	G	.
H3	.	C	G	G	.	G
H4	.	C	G	G	.	G
H5	.	C	G	G	.	G
H6	.	C	G	G	.	G
H7	A	C	G	G	.	G
H8	.	C	G	G	.	G
H9	.	C	G	g	.	G
H10	A	C	G	G	.	G
H11	.	C	G	G	.	G
H12	.	C	G	G	.	G
H13	.	C	G	g	.	G
H14	.	C	G	g	.	G
H15	.	C	G	G	.	G
H16	A	C	G	G	.	G
H17	.	C	G	G	.	G
H18	.	C	G	G	.	G
H19	.	C	G	G	.	G
H20	.	C	G	G	.	G
H21	.	C	g	g	c	G
H22	.	C	G	g	.	G
H23	c	c	g	g	c	g
H24	.	C	G	G	.	G
H25	.	C	G	G	.	G
H26	.	C	G	g	.	G
H27	.	C	G	g	.	G
H28	.	C	G	G	.	G
H29	.	C	G	g	c	G
H30	.	C	G	G	.	G
H31	.	C	G	G	.	G
H32	.	C	G	G	.	G
H33	.	C	G	G	.	G
H34	.	C	G	G	.	G
H35	.	C	G	G	.	G
H36	.	C	G	G	.	G

Anexo 1 Continuación.

Hap.	Sitios nucleotídicos																								
	263	264	265	266	267	268	276	279	285	289	299	301	303	318	320	344	349	374	389	392	400	404	405	411	418
H1	C	C	-	-	T	G	A	T	G	T	C	T	T	C	C	G	C	G	C	T	C	A	C	C	G
H2	.	A	G	C	-	.	-	.	.	A	A	.	.	.	G	.	G	.	G	.	A	G	.	.	.
H3	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H4	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	A	A	A	G	A	T	A
H5	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	T	A	T	A
H6	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H7	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H8	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	A	A	A	G	A	T	A
H9	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	T	A	T	A
H10	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H11	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H12	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H13	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	A	.	G	A	G	A	T	A
H14	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	T	A	T	A
H15	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H16	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H17	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H18	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H19	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	G	A	T	A
H20	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H21	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H22	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	A	.	G	A	G	A	T	A
H23	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H24	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H25	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	A	.	G	A	G	A	T	A
H26	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	A	.	G	A	G	A	T	A
H27	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H28	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H29	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H30	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	A	A	T	A	T	A
H31	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H32	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H33	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H34	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H35	G	-	-	-	-	-	-	G	.	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A
H36	G	-	-	-	-	-	-	A	A	.	A	C	C	T	G	A	.	.	.	G	A	G	A	T	A

**Anexo 1** Continuación.

Hap.	Sitios nucleotídicos						
	420	421	426	427	432	443	450
H1	G	G	G	-	G	A	G
H2	.	.	.	T	-	.	.
H3	C	-	C	T	.	.	T
H4	C	-	C	T	.	.	T
H5	C	-	C	T	.	.	T
H6	C	-	C	T	.	.	T
H7	C	-	C	T	.	.	T
H8	C	-	C	T	.	.	T
H9	C	-	C	T	.	.	T
H10	C	-	C	T	.	.	T
H11	C	-	C	T	.	.	T
H12	C	-	C	T	.	.	T
H13	C	-	C	T	.	.	T
H14	C	-	C	T	.	.	T
H15	C	-	C	T	.	.	T
H16	C	-	C	T	.	.	T
H17	C	-	C	T	.	.	T
H18	C	-	C	T	.	.	T
H19	C	-	C	T	.	.	T
H20	C	-	C	T	.	.	T
H21	C	-	C	T	.	.	T
H22	C	-	C	T	.	.	T
H23	C	-	C	T	.	.	T
H24	C	-	C	T	.	.	T
H25	C	-	C	T	.	.	T
H26	C	-	C	T	.	.	T
H27	C	-	C	T	.	.	T
H28	C	-	C	T	.	.	T
H29	C	-	C	T	.	.	T
H30	C	-	C	T	.	.	T
H31	C	-	C	T	.	.	T
H32	C	-	C	T	.	.	T
H33	C	-	C	T	.	<b>G</b>	T
H34	C	-	C	T	.	.	T
H35	C	-	C	T	.	.	T
H36	C	-	C	T	.	.	T

Anexo 1 Continuación.

Haplotype	Sitios nucleotídicos																									
	455	456	468	470	471	473	476	478	479	482	492	493	494	499	501	503	504	510	515	520	529	536	551	560	580	595
H1	T	C	C	C	T	G	T	T	C	T	C	G	A	A	G	C	T	-	A	C	C	G	C	C	C	C
H2	.	.	.	.	.	T	.	.	.	G	A	.	G	.	.	.	.	-	.	.	T	A	T	T	.	A
H3	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H4	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H5	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H6	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H7	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	-	t	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H8	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H9	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H10	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	-	t	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H11	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H12	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H13	.	.	.	A	G	T	G	.	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	t
H14	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H15	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H16	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	-	t	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H17	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H18	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H19	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H20	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H21	C	.	T	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H22	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H23	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H24	C	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H25	.	.	.	A	G	T	G	.	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H26	.	.	.	A	G	T	G	.	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H27	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H28	C	.	T	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H29	C	.	T	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H30	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	T	T	A	T	T	T	T
H31	C	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H32	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H33	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H34	.	T	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H35	.	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T
H36	C	.	.	A	G	T	G	C	G	.	A	.	T	G	C	A	-	A	G	.	T	A	T	T	T	T

**Anexo 1** Continuación.

Haplotipo	Sitios nucleotídicos					
	598	607	625	642	651	658
H1	C	G	G	C	-	-
H2	.	.	A	G	-	T
H3	T	.	.	.	G	T
H4	T	.	.	.	G	T
H5	T	.	.	.	G	T
H6	T	.	.	.	G	T
H7	T	.	.	.	G	T
H8	T	.	.	.	G	T
H9	T	.	.	.	G	T
H10	T	.	.	.	G	T
H11	T	.	.	.	G	T
H12	T	.	.	.	G	T
H13	T	.	.	.	G	T
H14	T	.	.	.	G	T
H15	T	.	.	.	G	T
H16	T	.	.	.	G	T
H17	T	.	.	.	G	T
H18	T	.	.	.	G	T
H19	T	.	.	.	G	T
H20	T	.	.	.	G	T
H21	T	.	.	.	G	T
H22	T	.	.	.	G	T
H23	T	.	.	.	G	T
H24	T	A	.	.	G	T
H25	T	.	.	.	G	T
H26	T	.	.	.	G	T
H27	T	.	.	.	G	T
H28	T	.	.	.	G	T
H29	T	.	.	.	G	T
H30	T	.	.	.	G	T
H31	T	.	.	.	G	T
H32	T	.	.	.	G	T
H33	T	.	.	.	G	T
H34	T	.	.	.	G	T
H35	T	.	.	.	G	T
H36	T	.	.	.	G	T

Anexo1 Continuación.

Haplotype	Sitios nucleotídicos																									
	674	678	696	702	710	735	763	771	772	783	795	805	806	827	863	869	874	889	892	896	900	910	911	912	917	919
H1	G	C	T	C	G	-	C	T	-	C	G	T	C	A	C	A	T	A	G	G	T	C	A	G	C	A
H2	.	.	.	.	.	A	G	.	-	T	.	C	A	.	.	C	.	.	C	.	.	T	.	.	.	T
H3	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H4	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H5	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	T	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H6	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H7	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H8	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H9	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H10	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H11	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H12	.	T	.	A	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H13	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H14	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H15	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H16	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	C	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H17	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H18	.	T	G	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H19	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H20	A	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H21	.	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H22	.	T	.	.	A	-	A	.	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H23	A	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H24	.	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H25	.	T	.	.	A	-	A	.	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H26	.	T	.	.	A	-	A	.	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H27	.	T	.	.	.	-	A	.	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H28	.	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H29	.	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H30	.	T	.	.	.	-	A	C	-	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	.	G	C	.	G
H31	.	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	T	G
H32	A	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	G	T	G	C	.	G
H33	A	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H34	A	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H35	.	T	.	.	.	-	A	.	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G
H36	.	T	.	.	.	-	A	C	A	A	T	.	G	.	-	.	.	C	.	A	.	T	G	C	.	G

Haplotipo	Sitios nucleotídicos					
	926	927	929	930	931	937
H1	G	G	T	C	C	C
H2	T	T	.	.	A	T
H3	T	T	.	.	.	.
H4	T	T	.	.	.	.
H5	T	T	.	.	.	.
H6	T	T	.	.	.	.
H7	T	T	.	.	.	.
H8	T	T	.	.	.	.
H9	T	T	.	.	.	.
H10	T	T	.	.	.	.
H11	T	T	.	T	.	.
H12	T	T	.	.	.	.
H13	T	T	.	.	.	.
H14	T	T	.	.	.	.
H15	T	T	.	.	.	.
H16	T	T	.	.	.	.
H17	T	T	.	.	.	.
H18	T	T	.	.	.	.
H19	T	T	.	.	.	.
H20	T	T	.	.	.	.
H21	T	T	.	.	.	.
H22	T	T	.	.	.	.
H23	T	T	.	.	.	.
H24	T	T	.	.	.	.
H25	T	T	.	.	.	.
H26	T	T	.	.	.	.
H27	T	T	.	.	.	.
H28	T	T	G	.	.	.
H29	T	T	G	.	.	.
H30	T	T	.	.	.	.
H31	T	T	.	.	.	.
H32	T	T	.	.	.	.
H33	T	T	.	.	.	.
H34	T	T	.	.	.	.
H35	T	T	.	.	.	.
H36	T	T	.	.	.	.

**Anexo 1** Continuación.

Haplotipo	Sitios nucleotídicos							
	939	940	946	957	968	990	999	1013
H1	G	A	T	C	T	T	A	G
H2	.	.	.	.	.	.	C	.
H3	T	C	C	G	C	.	.	.
H4	T	C	C	G	C	A	.	.
H5	T	C	C	G	C	A	.	.
H6	T	C	C	G	C	.	.	.
H7	T	C	C	G	C	A	.	.
H8	T	C	C	G	C	.	.	.
H9	T	C	C	G	C	A	.	.
H10	T	C	C	G	C	A	.	.
H11	T	C	C	G	C	.	.	.
H12	T	C	C	G	C	.	.	.
H13	T	C	C	G	C	.	.	.
H14	T	C	C	G	C	A	.	.
H15	T	C	C	G	C	A	.	.
H16	T	C	C	G	C	A	.	.
H17	T	C	C	G	C	.	.	.
H18	T	C	C	G	C	A	.	.
H19	T	C	C	G	C	A	.	.
H20	T	C	C	.	C	.	.	A
H21	T	C	C	G	C	.	.	.
H22	T	C	C	G	C	.	.	.
H23	T	C	C	.	C	.	.	A
H24	T	C	C	G	C	.	.	.
H25	T	C	.	G	C	.	.	.
H26	T	C	C	G	C	.	.	.
H27	T	C	C	G	C	.	.	.
H28	T	C	C	G	C	.	.	.
H29	T	C	C	G	C	.	.	.
H30	T	C	C	G	C	A	.	.
H31	T	C	C	G	C	.	.	.
H32	T	C	C	.	C	.	.	A
H33	T	C	C	.	C	.	.	A
H34	T	C	C	.	C	.	.	A
H35	T	C	C	G	C	.	.	.
H36	T	C	C	G	C	.	.	.