



**Universidad Nacional del
Comahue Centro Regional
Universitario Bariloche**

**Variación genética y ecofisiológica de
Festuca pallescens (St. Yves) en relación a
un gradiente pluviométrico en Patagonia
Norte**



**Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en
Biología**

**Lic. Aldana Soledad López
Director: Dra. Paula Marchelli
Codirector: Dr. Ing. Dardo R. López**

2018

**Universidad Nacional del
Comahue Centro Regional
Universitario Bariloche**

**Variación genética y ecofisiológica de
Festuca pallescens (St. Yves) en relación a
un gradiente pluviométrico en Patagonia**

Norte

**Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor en
Biología**

Tesista: Lic. Aldana S. López

Director: Dra. Paula Marchelli

Codirector: Dr. Ing. Dardo R. López

2018

INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	7-8
INDICE DE TABLAS.....	9
INDICE DE FIGURAS.....	10-12
RESUMEN.....	13-14
ABSTRACT.....	15-16

CAPÍTULO 1: Introducción general

1. PLANTEO DEL PROBLEMA.....	17-19
2. MARCO CONCEPTUAL	
2.1 Ambientes heterogéneos y su impacto sobre la vegetación.....	20-21
2.2 Respuesta de las especies vegetales a los cambios en el ambiente.....	21-23
2.3 Efecto de la heterogeneidad ambiental sobre la vegetación de la Patagonia.....	23-25
3. LA REGIÓN DE ESTUDIO Y SUS CARACTERÍSTICAS.....	25-27
4. LA ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO	
4.1 Distribución de la especie de estudio en Patagonia Norte.....	28-29
4.2 Características morfológicas	30
4.3 Características genéticas, fisiológicas y ecológicas.....	30-31
4.4 Ventajas y desventajas de ser un poliploide en los estudios genéticos.....	31-32
5. CONTEXTO DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO.....	32-33
5.1 Hipótesis y predicciones	
5.1.1 Hipótesis.....	33
5.1.2 Predicción.....	34
6. OBJETIVO GENERAL.....	34
7. ESTRUCTURA DE LA TESIS.....	34-35
8. ÁREA DE ESTUDIO Y SITIOS DE MUESTREO.....	35-41
8.1 Características geográficas y climáticas.....	35-41

CAPÍTULO 2:

A) Diversidad genética y estructura genético-poblacional de *Festuca pallescens* en poblaciones distribuidas a lo largo del gradiente pluviométrico en Patagonia Norte

1. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....	43-46
2. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	47
3. METODOLOGIA	
3.1 Complejidad del abordaje genético en especies poliploides.....	47-49
3.2 Muestreo y colección del material vegetal.....	49
3.3 Extracción de ADN.....	49-50
3.4 Transferencia de marcadores moleculares microsatélites.....	50-52
3.5 Análisis estadísticos de los datos genéticos de microsatélites.....	52
3.5.1 Diversidad genética.....	52-53
3.5.2 Diferenciación entre poblaciones.....	53
3.5.3 Estructuración genética.....	53-55
4. RESULTADOS	
3.6 Transferencia de marcadores microsatélites.....	56-59
3.7 Diversidad y diferenciación genética.....	59-60
3.8 Estructuración genética.....	61-65

5. DISCUSIÓN

- 5.1 ¿Cuál es la causa de las evidentes diferencias genéticas de las poblaciones PHB, SA-1 y SB con respecto al resto de las poblaciones de *Festuca pallescens*?.....69-70

B) Relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Festuca pallescens*. Diferenciación genética en poblaciones periféricas de la Meseta de Somuncura

1. INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y PREDICCIONES.....71-74
2. OBJETIVO GENERAL Y ESPECÍFICOS.....74
3. METODOLOGIA
- 3.1 Material vegetal.....74-75
- 3.2 Extracción de ADN (ver sección A) y amplificación por PCR.....75-76
- 3.3 Análisis morfo-anatómico.....76
- 3.4 Análisis filogenéticos.....76-79
4. RESULTADOS
- 4.1 Análisis morfo-anatómico.....80-83
- 4.2 Región ITS.....83-86
- 4.3 Región de ADN de cloroplasto (*trnL-F*).....86-88
- 4.4 Loci de microsatélites.....88-90
5. DISCUSIÓN
- 5.1 Diversidad genética dentro de las poblaciones periféricas.....91-96
- 5.2 *Festuca pallescens* y poblaciones de Somuncura dentro de la filogenia de *Festuca*96-97
6. CONCLUSIÓN.....98

CAPÍTULO 3: Requerimientos térmicos e hídricos para la germinación de semillas de poblaciones de *Festuca pallescens*

- 1 INTRODUCCION, HIPOTESIS Y PREDICCIONES.....99-103
- 2 OBJETIVO GENERAL Y PARTICULARES.....103
- 3 METODOLOGÍA
- 3.1 Material vegetal.....103
- 3.2 Evaluación de la germinación.....103-104
- 3.3 Modelo de tiempo térmico:
- 3.3.1. Estimación de la temperatura base (T_b) de germinación y evaluación de su variabilidad en diferentes fracciones de la población mediante regresiones lineales.....105-106
- 3.3.2 Estimación de los parámetros térmicos de la población.....106-107
- 3.3.3 Experimentos de validación bajo condiciones naturales107-108
- 3.3.4 Correlaciones entre los parámetros del modelo de Tiempo Térmico y las variables ambientales108-109
- 3.4 Modelo de Tiempo Hídrico
- 3.4.1 Estimación del potencial hídrico base (Ψ_b) de germinación y evaluación de su variabilidad en diferentes fracciones de la población mediante regresiones lineales....109-110
- 3.4.2 Estimación de los parámetros hídricos.....111-112
- 3.4.3 Correlaciones entre los parámetros del modelo de Tiempo Hídrico y las variables ambientales.....112-113
4. RESULTADOS
- 4.1 Viabilidad y peso de mil semillas.....112-113
- 4.2 Modelos de tiempo térmico

4.2.1 Rangos térmicos y evaluación de la temperatura base (T_b) en diferentes fracciones de la población de semillas mediante curvas de germinación acumulativa y regresiones lineales.....	114-115
4.2.2 Modelo de Tiempo Térmico: Análisis de los parámetros térmicos poblacionales.....	116-118
4.2.3 Validación a campo de los modelos de tiempo térmico.....	117-119
4.2.4 Relación entre los parámetros de tiempo térmico y los factores ambientales en los sitios muestreados del rango de distribución natural de las poblaciones.....	119-120
4.3 Modelos de Tiempo Hídrico	
4.3.1 Curvas de germinación acumulada en función del tiempo, regresiones lineales para la determinación del potencial hídrico base (Ψ_b) y estimación de los parámetros hídricos.....	121-124
4.3.2 Relación entre los parámetros del modelo Tiempo Hídrico y los factores ambientales en los sitios muestreados del rango de distribución natural de las poblaciones.....	124-125
5. DISCUSIÓN	
5.1 Peso de semillas y su relación con la germinación.....	125-128
5.2 Requerimientos térmicos para la germinación: Temperatura base (T_b) y Tiempo térmico (θ_T)	128-129
5.3 Requerimientos hídricos para la germinación: potencial hídrico base (Ψ_b) y tiempo hídrico (θ_H).....	131-133
6. CONCLUSION.....	133-134

CAPITULO 4: Variación de las respuestas morfo-fisiológicas al déficit hídrico de diferentes poblaciones de *Festuca pallescens* en ensayo de ambiente común

1 INTRODUCCIÓN, HIPÓTESIS Y PREDICCIÓN.....	135-139
2 OBJETIVOS.....	139
3 MATERIALES Y MÉTODOS	
3.1 Sitio de muestreo y material vegetal.....	140-141
3.2 Diseño experimental.....	141-143
3.3 Variables respuesta.....	144
3.4 Medición de variables respuesta.....	145-148
3.5 Análisis de datos.....	148-149
4 RESULTADOS	
4.1 Diferencias en caracteres morfológicos de las poblaciones de <i>F. pallescens</i>	149-151
4.2 Respuesta de las poblaciones de <i>F. pallescens</i> frente a déficit hídrico.....	152
4.2.1 Diferencias entre tratamientos (T, P, SR)... ..	152-153
4.2.2 Diferencias entre poblaciones.....	153 -154
4.3 Respuesta fisiológica a los pulsos de agua.....	154-160
5 DISCUSION	
5.1 Adaptaciones locales en las poblaciones de <i>F. pallescens</i> en ensayo de ambiente común.....	160-162
5.2 Respuestas de las poblaciones de <i>F. pallescens</i> al déficit hídrico.....	162-163
5.3¿Qué pasa con las poblaciones de <i>Festuca</i> en Somuncura?.....	164
6 CONCLUSIÓN.....	164-165

CAPÍTULO 5: Discusión general.....166-169

5.1 Patrones de variación a escala de paisaje a lo largo del gradiente de precipitaciones	
i. Poblaciones de Cordillera y Pre- Cordillera: Península Huemul y San Ramón.....	170-172
ii. Poblaciones de Sierras y Mesetas Occidentales: Pilcaniyeu, Jacobacci y Somuncura.....	173-175
5.2 Ecotipo de <i>Festuca</i> de la Meseta de Somuncura.....	175-177
5.3 Perspectivas a futuro: Implicancias en el manejo y la domesticación.....	177-180
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	181-200
ANEXOS.....	201-228

CAPÍTULO 2:

Protocolo de Extracción de ADN total en microtubo (Adaptado de Doyle & Doyle (1990) por Dumolin et al. 1995)

Figura S2.1: a) Relación entre la verosimilitud del modelo Ln (p) y el número de agrupamientos genéticos (K) obtenidos con el programa STRUCTURE a partir de la base de datos codominantes. b) Estimación del número de agrupamientos mediante el método de Evanno et al. (2005) a partir del cálculo de estadístico ΔK (ver explicación en Materiales y Métodos) basados en la base de datos codominantes.

Figura S2.2: Determinación del K óptimo calculado con el método de Evanno et al (2004) a partir del método no jerárquico de k- medias implementado por Arrigo et al (2010).

Figura S2.3: Asignación de grupos genéticos a las poblaciones de *Festuca pallescens* a partir de la matriz de datos co-dominantes.

Figura S2.4: Árboles filogenéticos de Maxima parsimonia (a) y máxima verosimilitud (b) basados en marcador nuclear (ITS).

Figura S2.5: Árboles filogenéticos de Maxima parsimonia (a) y máxima verosimilitud (b) basados en marcador del cloroplasto (*trnL-F*).

Figura S2.6: Relaciones filogenéticas basadas en el árbol consenso del 50% de los árboles bayesianos con mejor probabilidad posterior a partir de la combiación de datos de ITS/*trnL-F*.

Tabla S2.1: Condiciones de amplificación para los SSRs transferidos exitosamente a *Festuca pallescens*.

Tabla S2.2: Condiciones de amplificación en el termociclador para los microsatélites transferidos exitosamente a *Festuca pallescens*.

Tabla S2.3: Combinación de genotipos de las tres especies utilizados en la construcción del PCoA.

CAPÍTULO 3

Figura S3.1: Relación entre el peso de mil semillas y el θ_T y T_b en las poblaciones de *Festuca pallescens*.

Figura S3.2: Relación entre el peso de mil semillas, el porcentaje y la tasa de germinación

CAPÍTULO 4

Figura S4.1: Diferencias en la distribución de la biomasa entre los tres niveles de disponibilidad de agua.

Figura S4.2: Análisis de la varianza para la distribución de la biomasa en cada población al inicio y al final de cada nivel de disponibilidad de agua.

TRABAJO DE RESPALDO.....	229-245
--------------------------	---------

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar quiero agradecerles a mis Directores con quienes junto a mis compañeros de trabajo aprendí a transitar este viaje académico....

A mi Directora, un verdadero motor. Con ella aprendí a crecer profesionalmente desde la humildad, calidez humana, compromiso y perseverancia frente a todas las pequeñas cosas que nos tiran para atrás. Gracias Pau por enseñarme a crecer desde las pequeñas decisiones de la profesión hasta tomar las más decisivas. Por ser una verdadera mamá académica! La que está en todos los detalles, ajusta cuando hay que ajustar y afloja cuando hay que aflojar.

A mi Co-director, quien iba aprender a co-dirigir, y lo hizo con un sobresaliente. Gracias D por el positivismo y empuje incondicional, por la mirada crítica y el cariño a esta tierra. Y por sobretodo la comprensión frente a las situaciones institucionales que nos ponen a prueba todos los días, a aprender que nuestras debilidades a veces son nuestras fortalezas y nos ayudan a enfrentar los desafíos profesionales y personales.

A INTA y CONICET y los proyectos INTA PN1126072, INTA PN1126074, PICT 2013 1932 que permitieron el financiamiento de mi Tesis Doctoral y me proporcionaron un ámbito laboral interdisciplinario donde pude desarrollar todo mi doctorado.

A mis compañeros y amigos de trabajo.... Vivimos miles de experiencias juntos y cada mate, música, sahumero en la oficina o facturas por llegar tarde hicieron que la interdisciplinariedad y nuestros puntos de vista contrapuestos nos hicieran crecer juntos. Salidas de campo, fiestas, cervezas, comidas, anécdotas y recuerdos que hoy después de cinco años nos encuentran viendo todo desde otra mirada y “aconsejando” a los que entran en la etapa que nosotros cerramos. GRACIAS!!!

Al personal del Campo Experimental de Pilcaniyeu, las Estancias (San Ramón, P. Huemul), las Agencias de extensión, por abrirnos las puertas para realizar los muestreos, siempre con excelente predisposición.

A mis amigos bariloenses que hicieron que este lugar se transformara poco a poco en un hogar, cuando se está tan lejos de casa. Por su oído, cariño y entendimiento en esta etapa, que nos generan altos y bajos que se comparten con cenas y muchas lindas charlas.

Y agradecer por capítulo a los profesionales y compañeros de trabajo que hicieron posible cumplir con todo lo propuesto...

El capítulo 1 se realizó con la ayuda del Ingeniero Guillermo Siffredi y Humberto Moraga. Gracias Guille por el oído, discusiones y conocimiento que me compartiste en todos estos años, por colaborar muchísimo en mi crecimiento personal y profesional en INTA. A Humbert, por su dedicadísimo trabajo en el campo, sin el todo hubiese sido más difícil y menos divertido, gracias!!!!!!

El capítulo 2A se realizó con la ayuda del grupo de trabajo de la Dra. Birgit Ziegenhagen, de Marburg, Alemania, especialmente al Dr. Sascha Liepelt cuyas

recomendaciones fueron de gran ayuda en la interpretación de los datos. Además, se agradece a la Dra. Pilar Catalán, a la Lic. Lera Forester y al Ing. Jorge Bossi por las recomendaciones de los programas y metodologías para trabajar con organismos poliploides. A Humberto Moraga y Ing. G. Siffredi por su importantísima ayuda en el campo.

El capítulo 2B se realizó con la importantísima participación de la Dra. María Marta Azpilicueta con quien aprendimos mucho sobre el mundo poliploide a lo largo del desarrollo del mismo y compartimos muchísimas charlas en las largas esperas de PCRs. Gracias Mari!!! A Donaldo Bran, por levantar la mano y desatar el motor del trabajo de respaldo y colaborar en su esclarecimiento. Además, se agradecen las invaluable recomendaciones de la Dra. Cecilia Ezcurra quien se tomó el tiempo para ayudarme en la caracterización morfológica de las especies estudiadas. El diseño de la Figura 1 se realizó gracias a la colaboración del Ms. Fernando Umaña mediante el uso del programa QGIS así como también las valiosas sugerencias de las Ing. Valeria Aramayo y Lic. Clara Fariña. Además, se agradece profundamente a la Dra. Romina Vidal Russell por su ayuda en el análisis e interpretación de los datos y a Humberto Moraga, Dr. Dardo López, Ing. Guillermo Siffredi y Clara Fariña por su inmensa ayuda en el campo.

El capítulo 3 se realizó con la invaluable y dedicadísima participación de la Dra. Verónica Arana en realización y análisis de los modelos. Gracias Vero por todas las charlas y los mates con Pau, que hicieron muy especial el mundo de los modelos umbrales. Conjuntamente, se agradecen los aportes y recomendación del Dr. Diego Batlla en el análisis e interpretación de los resultados. Finalmente, la realización de los ensayos contó con la gran ayuda de Gabriel Rascovan, Dra. Andrea Enriquez en la instalación de los dataloggers y mis queridos compañeros de laboratorio.

La realización del capítulo 4 contó con el invaluable aporte del Dr. Ing. Gonzalo Caballé en diseño del ensayo en el invernáculo y análisis e interpretación de los resultados; al Dr. Mario Pastorino por sus recomendaciones del trabajo en el invernáculo y a la Dra. Priscila Willems por su gran ayuda en el diseño y análisis estadístico de los datos. A su vez, se agradece la importantísima colaboración del Lic. Msc. Santiago Varela en las mediciones y análisis de los parámetros fisiológicos. La instalación y desarrollo de las plántulas fue posible gracias al diseño del “mini-invernáculo” del Ing. Ms. Ariel Mazzoni, su ayuda y compromiso en la preparación de todo el ensayo. Finalmente, al compromiso de Aldo Zúñiga y Humberto Moraga para trabajar en el invernáculo durante el trasplante y destrucción de plantas cuando eran demandados en muchas otras actividades.

Finalmente al incondicional acompañamiento de mi familia, que desde la distancia siempre está presente, siendo mi motor de arranque para enfrentar todas las situaciones nuevas y cambios que me presenta la vida. Y en particular, a mi familia barilocheño, a Flor, Max, Luni, Cleo y Luciano. A ellos que han sido mi pequeño pilar en este nuevo hogar, por su contención amor y fuerza, simplemente gracias!

INDICE DE TABLAS

Tabla 1.1: Características de las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> . El tipo fisonómico florístico se caracterizó siguiendo a Bran et al. (2002).....	42
Tabla 2.1: Microsatélites transferidos desde otras especies del género <i>Festuca</i> , <i>Poa arachnifera</i> Torr y <i>Lolium perenne</i> a <i>Festuca pallescens</i>	57-58
Tabla 2.2: Variación genética de las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i>	60
Tabla 2.3: Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones analizadas de <i>F. pallescens</i>	62
Tabla 2.4: Índices de diferenciación (Φ_{PT}) de a pares para las 14 poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> (diagonal inferior) y significancia del Φ_{PT} (diagonal superior).....	62
Tabla 2.5: Comparación de los rasgos morfo-anatómicos de <i>Festuca argentina</i> , <i>F. pallescens</i> y las poblaciones de Somuncura (SA1; Somuncura alto1; SB Somuncura bajo).....	81
Tabla 2.6: Posiciones variables en la región ITS entre las especies.....	86
Tabla 3.1: Parámetros del modelo de Tiempo Térmico.....	116
Tabla 3.2: Parámetros del modelo de Tiempo Hídrico.....	122
Tabla 4.1: Variables respuesta medidas en las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> . Se especifica qué variable se evalúa en cada población.....	143
Tabla 4.2: Resumen de las variables morfológicas del nivel testigo para las poblaciones de <i>F. pallescens</i>	150
Tabla 4.3: Diferencias en las variables respuesta entre tratamientos de disponibilidad de agua: Testigo (alta disponibilidad), Pulsos (disponibilidad media) y Sin Riego (baja disponibilidad)...	151
Tabla 4.4: Diferencias en las variables respuesta entre tratamientos por población. N: Niveles de disponibilidad de agua: alto (T: Testigo); intermedio (P: Pulsos) y bajo (SR: Sin Riego).....	157
Tabla 4.5: Efecto de los pulsos de agua.....	158
Tabla 4.6: Respuesta de las poblaciones SRA3, SRB, JA y JB al pulso de agua.....	159

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1:a) Foto de una pradera en uno de los sitios de muestreo. Las matas de <i>Festuca pallescens</i> presentan una gran proporción de cañas florales (foto tomada en diciembre de 2014). b) Mata encañada de <i>F. pallescens</i> . c) “ <i>Semilla</i> ” (lema, palea y cariopsis) de <i>F. pallescens</i> ; el fruto esta disociado de la lema y la palea.	28
Figura 1.2: Foto de un pastizal de <i>Festuca pallescens</i> (coirón blanco o coirón dulce) en Pilcaniyeu, Patagonia Norte. En la parte superior de la foto se muestra un mapa de la distribución de la especie en Argentina.	29
Figura 1.3: Mapa de los sitios de muestreo que se corresponden a la Tabla 1.1	37
Figura 1.4: Fotos de las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> en cada sitio de muestreo.	38-41
Figura 2.1: a) Transferencia de microsatélites a <i>F. pallescens</i> . Amplificación de cuatro microsatélites en gel de agarosa 2,5%. b) Corrida electroforética de los microsatélites transferidos a <i>F. pallescens</i> amplificados en multiplex.	56
Figura 2.2: Ejemplo de los genotipos obtenidos y analizados con GeneMarker V2.6.3 para dos microsatélites: HVM4, marcado con el fluoróforo HEX (verde) y B1B6 marcado con el fluoróforo FAM (azul).	59
Figura 2.3: Análisis de Coordenadas principales (PCoA) a partir de las distancias genéticas de Bruvo para las 14 poblaciones de <i>Festuca pallescens</i>	61
Figura 2.4: Determinación del número óptimo de grupos genéticos. a) Relación entre la verosimilitud del modelo Ln (p) y el número de agrupamientos genéticos (K) obtenidos a partir del análisis con el programa STRUCTURE. b) Estimación del número de agrupamientos mediante el método de Evanno et al. (2005) a partir del cálculo del estadístico ΔK (ver materiales y métodos).	63
Figura 2.5: Asignación de grupos genéticos a las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> . Resultados obtenidos con el STRUCTURE editados con CLUMPAK para a) k = 2 y b) k = 3. Cada barra vertical corresponde a un individuo.	64
Figura 2.6: Distribución de las variantes genéticas de la región ITS y cpDNA (<i>trnL-F</i>) en las poblaciones analizadas.	80
Figura 2.7: Foto de <i>semillas</i> de <i>Festuca pallescens</i> (F.p) y de poblaciones de Somuncura (S) tomada con un zoom de 10x con una lupa Leica SGE.	82
Figura 2.8: Esquema de cortes transversales de a) <i>Festuca argentina</i> , b) <i>Festuca pallescens</i> , c) Somuncura alto y d) Somuncura bajo.	83
Figura 2.9: Árbol bayesiano construido a partir del conjunto de datos nucleares (ITS).	85
Figura 2.10: Árbol bayesiano basado en el marcador cloroplástico (<i>trnL-F</i>). El recuadro superior de la izquierda muestra la red de haplotipos.	87
Figura 2.11: Análisis con loci de microsatélites. a) Asignación de los individuos a cada uno de los diferentes grupos (k = 2 a k = 4) obtenidos con STRUCTURE; b) Árbol radial de Neighbour joining basado en la distancia de Bruvo calculado con el paquete de polysat en R; c) Análisis de coordenadas principales baso en la distancia de Bruvo para los loci de microsatélites.	89

Figura 2.12: Asignación de grupos genéticos en 12 poblaciones de *Festuca pallescens*. Resultados obtenidos con STRUCTURE editados con CLUMPAK para $k = 2$90

Figura 3.1: **a)** Prueba de tetrazolio para determinar la viabilidad en semillas de *F. pallescens*. Se observan las semillas vivas (rojas) con el embrión teñido con un rojo intenso a la izquierda y las semillas muertas (sin teñir) a la derecha. **b)** Semillas de ensayo de Tiempo térmico sobre un algodón embebido con Vitavax-FLO (color rosa) en una placa de Petri. En el centro se puede ver la pequeña radícula de una semilla germinada. **c)** Semillas embebidas en la solución de PEG sobre el papel de filtro para uno de los potenciales hídricos de ensayo del modelo de Tiempo Hídrico **d)** Ensayo de validación del modelo de tiempo térmico a campo. Cada semilla emergida está marcada con un alambre de color azul o amarillo.....112

Figura 3.2: Relación entre el peso de mil semillas y la altitud de cada población. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los pesos de las semillas (Test *a posteriori* de Tuckey, $p < 0.05$).....112

Figura 3.3: Relación entre la tasa de germinación (TG) de las nueve poblaciones de semillas de *Festuca pallescens* y la temperatura de incubación. Las curvas de germinación acumuladas (a-i) a 5, 7, 10, 12 y 15,5 ° C se calcularon con ajuste no lineal a la ecuación de Gompertz. Las regresiones lineales corresponden a la tasa de germinación en función a la temperatura de incubación para las fracciones 30, 50, 70 y 90% de la población de semillas (j-r) e interceptan el eje de las temperaturas (GR=0) en el valor común de la temperatura base media (T_b) para cada población.....115

Figura 3.4: Validación de modelos de tiempo térmico en experimentos de campo. Las curvas acumulativas predichas y observadas se indican en líneas continuas y círculos negros cerrados, respectivamente.....117

Figura 3.5: Relación entre el tiempo térmico de las poblaciones de *Festuca pallescens* y las variables ambientales analizadas: **a)** Tiempo térmico (θ_{50} (°C.d); cuadrado rosa) vs Longitud; **b)** (θ_{50} (°C.d)) vs la estacionalidad por año (EA; círculos azules); **c)** (θ_{50} (°C.d)) vs la estacionalidad por día (ED; triángulos verdes); **d)** (θ_{50} (°C.d)) vs Temperatura de otoño (TO; rombos naranjas) y **d)** (θ_{50} (°C.d)) vs altitud (triángulos invertidos grises) a la que se encontraba cada población.....119

Figura 3.6: Relación entre la tasa de germinación (TG) de las nueve poblaciones de semillas de *Festuca pallescens* y el potencial hídrico. Las curvas de germinación acumuladas (**a-i**) a 0, -0.8, -1 y -1.6 MPa se calcularon con ajuste no lineal a la ecuación de Gompertz. Las regresiones lineales corresponden a la tasa de germinación en función a la temperatura de incubación para las fracciones 5 a 90% de la población de semillas (**j-s**) e interceptan el eje de los potenciales hídricos (TG=0) en el potencial hídrico base medio (Ψ_b) para cada población. La población SA2 no germinó en -1.6 MPa (**i, r**).....121

Figura3.7: Relación entre el tiempo hídrico para cada población y a) (CV pp est), b) las precipitaciones de los meses más húmedos (PpMH), c) altitud y d) longitud. O: Oeste; E: Este.....124

Figura 4.1: a) Semillas germinadas en placas de Petri con agar. b) Dos semillas repicadas en la bandeja multiceldada c) “Mini-invernáculo” donde se instalaron las bandejas con plantas repicadas hasta alcanzar tres hojas.....140

Figura 4.2: Monitoreo del porcentaje del potencial hídrico a lo largo del ensayo (a), contenido volumétrico de agua en maceta (%vol) (b) y conductancia estomática (gs) (c). Los colores indican los tres niveles de disponibilidad de agua: rojo (T; testigo), azul (P; pulsos de riego), verde (SR; sin riego).142

Figura 4.3: Planta con cuatro macollos marcados con aros de metal.....	146
Figura 4.4: Niveles de disponibilidad hídrica en el ensayo de estrés hídrico en el día 24/02/14. a) Testigo, b) Pulsos y c) Sin riego.....	147
Figura 4.5: Porcentaje de sobrevivencia de las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> evaluadas luego de 45 días del inicio del ensayo. Las barras de colores indican los tratamiento con diferentes niveles de disponibilidad hídrica: alta (T : Testigo), intermedia (P : Pulsos) y baja (SR : Sin riego).....	152
Figura 4.6: a) Relación entre el potencial hídrico y la conductancia estomática en JA, JB, SA, SB, SRA-3 y SRB. Las curvas presentaron los siguientes ajustes: $r^2_{JA} = 0,35$; $r^2_{JB} = 0,22$; $r^2_{SA} = 0,5$; $r^2_{SB} = 0,2$; $r^2_{SRA} = 0,3$; $r^2_{SRB} = 0,5$	154
Figura 4.7: a) Relación entre el DPV (Deficit de Presión de Vapor) y la conductancia estomática en JA, JB, SRA-3 y SRB.	155
Figura 5.1. Relación entre variables genéticas (número de alelos: Na) y morfológicas (producción de macollos: ProM –n° de macollo por madre-, número de hojas: ProH, y elongación de las hojas –EloH-) con la longitud geográfica.....	170
Figura 5.2. Peso de semillas del ecotipo de somuncura y su relación con las poblaciones de <i>Festuca pallescens</i> analizadas. Se muestran también semillas y la mata de ejemplares del ecotipo de Somuncura.....	176

RESUMEN

Los ambientes heterogéneos presentan características climáticas, topográficas y edáficas que varían en tiempo y espacio favoreciendo la formación de gradientes clinales. Estos generan presiones de selección diferenciales sobre las poblaciones de las especies que los habitan. De esta forma se promueven adaptaciones locales y variación genética clinal. Una de las regiones que presenta una gran heterogeneidad ambiental, con variaciones latitudinales, altitudinales y un marcado gradiente de precipitación es la Patagonia Argentina. Específicamente en Patagonia Norte se conjugan una gran heterogeneidad ambiental, signada por eventos paleogeográficos y paleoclimáticos del pasado, con una alta presión de pastoreo histórica que imponen fuertes presiones de selección sobre las especies de los pastizales. La mayor superficie de esta región está ocupada por pastizales naturales, que son el principal recurso forrajero para el ganado doméstico y están en gran parte dominados por poáceas. Una especie forrajera clave es *Festuca pallescens* (St. Yves) Parodi, que se destaca por su amplia distribución e importancia forrajera. La desertificación es un proceso de deterioro de estos pastizales, que ha afectado su capacidad productiva, situación agravada por la vulnerabilidad frente a los nuevos escenarios de cambio climático. La domesticación para el cultivo de especies forrajeras nativas permitiría la mejora de la productividad y la recuperación de pastizales con ciertos niveles de degradación, para lo cual se requiere conocimiento de su variación genética y eco-fisiológica. En esta Tesis Doctoral, mediante un abordaje interdisciplinario se evaluó la variación genética y eco-fisiológica de poblaciones de *F. pallescens* distribuidas a lo largo de un gradiente de precipitación y a dos altitudes, con el fin de conocer su potencial adaptativo y generar conocimientos básicos para su domesticación.

Por un lado, (i) se evaluó la variación genética neutral y su estructuración espacial entre poblaciones de *F. pallescens* distribuidas a lo largo del gradiente pluviométrico, y contemplando diferentes ambientes, mediante la utilización de marcadores moleculares microsatélites. Se encontraron niveles altos de diversidad genética y flujo génico entre la mayoría de las poblaciones. Tres de las poblaciones fueron genéticamente muy distintas al resto, por lo que se profundizó su estudio mediante análisis filogenéticos moleculares, identificándose un ecotipo de *Festuca* sp similar a *F. argentina* en la Meseta de Somuncura producto de una posible hibridación ancestral. Por otro lado, (ii) se analizó la variación intra-específica en los requerimientos para la germinación de las poblaciones de la especie bajo estudio a través de modelos umbrales de tiempo térmico y de tiempo hídrico. Se estimaron los parámetros fisiológicos que determinan la germinación de semillas de diferentes poblaciones de *F. pallescens* encontrándose que los requerimientos de tiempos térmicos e hídricos para la germinación varían a lo largo del gradiente pluviométrico. Esta variación sugiere que las poblaciones presentan adaptaciones locales a los lugares en donde se desarrollan, necesitando acumular más temperatura (°/días) y más humedad (MPa/día) las poblaciones ubicadas en el sector este. El último enfoque (iii) fue la detección de diferencias genéticas entre poblaciones de la especie en caracteres morfo-fisiológicos de importancia adaptativa en ensayos de ambiente común. Conjuntamente, se evaluó la respuesta de poblaciones de *F. pallescens* provenientes de ambientes con precipitaciones medias anuales contrastantes frente a diferentes niveles de disponibilidad de agua. Se encontró que las poblaciones provenientes de distintos ambientes (del gradiente a diferentes altitudes), presentaron diferencias significativas en algunos de los caracteres morfológicos analizados (producción de macollos, producción de hojas y elongación foliar), por lo que se asume que esas diferencias son genéticas y existirían adaptaciones locales. Algunas de estas diferencias genéticas se asociarían a la capacidad de respuesta de las poblaciones frente al déficit hídrico. La distribución de la

biomasa (biomasa aérea/biomasa radicular) no presentó diferencias significativas entre las poblaciones, pudiendo ser un carácter plástico. Se diferenciaron dos estrategias entre las poblaciones analizadas: las poblaciones de ambientes húmedos tendrían menor producción de macollos y hojas y mayor elongación foliar; mientras que lo opuesto se observa entre las poblaciones de los ambientes más secos de este estudio. Además, el ecotipo de Somuncura resultó más conservador y mostró mejor eficiencia en el uso del agua.

Los conocimientos generados en esta Tesis Doctoral, permitieron identificar adaptaciones locales asociadas a variaciones ambientales tanto a gran escala (i.e. Áreas ecológicas) como a escalas espaciales menores (micro-ambiente). Se generó conocimiento de base para delinear programas de domesticación y mejoramiento de esta especie, así como disparadores de nuevas inquietudes sobre la existencia de ecotipos en Patagonia Norte. Algunas de estas poblaciones fueron seleccionadas para continuar estudios relacionados con la domesticación a futuro de la especie.

ABSTRACT

Environmental heterogeneity due to temporal and spatial variation in climatic, topographic and edaphic features, favours the settlement of gradients. Along these gradients, natural selection exerts strong and differential pressures on populations leading to local adaptations and clinal genetic variation. The highly heterogeneous environment that characterizes North Patagonia in addition to paleogeographic and paleoclimatic events, and more than a century of overgrazing, impose strong selection pressures on grass species of natural rangelands. North Patagonian region is characterized by natural rangelands, which constitute the main forage resource for domestic livestock and are largely dominated by poaceae. A key species of these ecosystems is *Festuca pallescens* (St. Yves) Parodi, which has a wide distribution and forage importance. Desertification is a process of deterioration of these rangelands, which has affected their productive capacity, increasing its vulnerability to new scenarios of climate change. The domestication of this native forage species would allow the improvement of productivity and the recovery of degraded rangelands. For this, genetic and eco-physiological knowledge is needed. In this Doctoral Thesis, through an interdisciplinary approach, the genetic and eco-physiological variation of populations of *F. pallescens* was evaluated. Populations were distributed along the precipitation gradient and at two altitudes, in order to study their adaptive potential.

First, (i) the neutral genetic variation and its spatial structure were evaluated in *F. pallescens* populations distributed along different environments of the rainfall gradient using microsatellite molecular markers. High levels of genetic diversity and gene flow were found among populations. Outstanding differences were detected in three populations, so their study was deepened by molecular phylogenetic analyses. In two of these populations located at the Somuncura plateau, an ecotype of *Festuca* sp similar to *F. argentina* was identified probably originated by an ancestral hybridization. Secondly, (ii) the intra-specific variation in germination using thermal time and hydro-time models was evaluated. The physiological parameters for seed germination in the different populations of *F. pallescens* were estimated. Thermal time and hydro-time varied between populations along the rainfall gradient. This variation suggests the existence of local adaptations, with populations at eastern and driest conditions requiring the accumulation of more temperature ($^{\circ}$ / days) and more water (MPa / day) to germinate. Finally, (iii) genetic differences among populations in morpho-physiological characters of adaptive importance were tested in a common garden. The response of *F. pallescens* populations from contrasting annual mean rainfall environments was evaluated under different levels of water availability. Significant differences in some of the morphological characters (such as bunch and leaf production, leaf elongation) were observed. These differences can be assumed as having a genetic base suggesting the existence of local adaptations. Some of these traits would be associated with responses to water deficit. The distribution of biomass (aerial biomass / root biomass) did not show significant differences between populations and could be plastic. Two strategies were observed among the analysed populations: populations from the west (Cordillera and Pre-cordillera) would have lower bunch and leaf production than those from the east (Sierras and Mesetas Occidentales). Besides, the ecotype was more conservative and showed a higher water use efficiency.

The knowledge generated in this Doctoral Thesis allowed the identification of local adaptations associated with environmental variation both on large (i.e. Ecological Areas) and smaller (micro-environments) spatial scales. Basic knowledge was generated

for the delineation of domestication and breeding programs of this species, as well as new questions about the existence of ecotypes in North Patagonia. Selected populations are currently under study to pursue the domestication program.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. PLANTEO DEL PROBLEMA

Los ambientes heterogéneos presentan características climáticas, topográficas y edáficas que varían en tiempo y espacio generando distintos efectos en las poblaciones naturales que los habitan. La variabilidad temporal, interaccionando con las diversas escalas espaciales, ha modulado la dinámica de la vegetación, determinando las características ecofisiológicas de las poblaciones vegetales de diferentes ecosistemas (Whitford 2002; Schwinning & Sala 2004). A escala regional, esta heterogeneidad ambiental favorece la formación de gradientes clinales (Woods et al. 2012) asociados principalmente a factores como la precipitación y la temperatura (Chapin et al. 1993; Jump et al. 2009). De esta forma, se generan presiones de selección diferenciales sobre las poblaciones de las especies que se distribuyen a lo largo de dichos gradientes geográficos (Woods et al. 2012), promoviendo adaptaciones locales y variación genética clinal (Whitford 2002; Tyukmaeva et al. 2011). Sin embargo, la plasticidad fenotípica también puede generar una variación clinal en ambientes heterogéneos que cambian gradualmente, enmascarando la variación con base genética (Wood et al. 2012).

En la región patagónica, los ambientes heterogéneos se asocian principalmente a variables geomorfológicas, edafológicas y climáticas (Jobbágy et al. 1996; Collantes et al. 1999; Godagnone & Bran 2009). Específicamente, en Patagonia Norte se distinguen dos gradientes ambientales principales: el pluviométrico generado por la sombra de lluvias que impone la Cordillera de los Andes, y el altitudinal asociado a las formas del relieve (Oesterheld et al. 1998). En el primero, la disminución de precipitaciones es extremadamente marcada, variando en sólo 200 km desde más de 3000 mm en el oeste en el límite con Chile a menos de 250 mm en la estepa patagónica, con la consecuente influencia sobre la vegetación acompañante (León et al. 1998; Godagnone & Bran 2009). A lo largo de estos gradientes, la dinámica poblacional de las especies es modelada por cambios ambientales y antropogénicos, tanto actuales como históricos, por su historia demográfica y por procesos microevolutivos (Reid et al. 2005; Jump et al. 2005, 2009;

Holderegger et al. 2012; Iglesias et al. 2013, 2014; Reynolds et al. 2016). Las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y los eventos orogénicos del Plioceno/Mioceno han dado forma a la diversidad y distribución actual de las especies en América del Sur (Turcheto-Zolet et al. 2013), modelando gran parte del rango de distribución y composición de las especies vegetales en Patagonia (Iglesias et al. 2013, 2014). La gran heterogeneidad ambiental biótica y abiótica que caracteriza a esta región, sumado a una alta presión de pastoreo histórica (Oesterheld et al. 1998) imponen fuertes presiones de selección sobre las especies que habitan en estos ecosistemas. En un contexto en el cual el cambio climático profundizaría las presiones de selección, las poblaciones podrán adaptarse a los cambios ambientales (e.g. temperatura y precipitaciones) y antropogénicos (e.g. sobrepastoreo del ganado) si poseen suficiente diversidad genética y tamaño efectivo (Reed & Frankham 2002; Jump et al. 2008).

Los pastizales naturales de Patagonia Norte son el principal recurso forrajero para el ganado doméstico, principal actividad agropecuaria de la región (León & Aguilar 1985; AEFP 2004) y sustento de una gran parte de la población rural (Easdale 2015). La ganadería extensiva (bovina, ovina, caprina y de camélidos) es una de las actividades más importantes en esta región. Para su desarrollo, se requiere cada vez con más frecuencia la suplementación con forraje a los animales al finalizar el invierno. Esto se debe a la falta de forraje en el período invernal y coincide a su vez, con el aumento de los requerimientos en el último tercio de gestación de los animales. La desertificación afecta a más de un tercio del territorio patagónico, lo cual sumado a suelos con poca estructura y susceptibles a erosión, ha ido deteriorando los pastizales naturales y su capacidad productiva (del Valle et al. 1998). Esta situación se ve aún más agravada por la vulnerabilidad de estos sistemas frente a cambios en precipitación y temperatura (Barros & Camilloni 2016). El potencial adaptativo de los organismos a estos nuevos ambientes o contextos futuros dependerá tanto de factores ecológicos como de atributos genéticos intrínsecos (Woods et al. 2012). Detectar la variación genética adaptativa en respuesta a gradientes ambientales permite comprender la potencialidad evolutiva de los organismos ante perturbaciones climáticas puntuales y/o cambios acelerados en el paisaje (Hoffman & Willi 2008).

El manejo sustentable de los pastizales naturales áridos, semiáridos y sub-húmedos tiene como principal objetivo prevenir el avance de la desertificación (informe COP de desertificación 2009). Para esto es necesario generar conocimiento y tecnologías que permitan recuperar los ecosistemas degradados, como así también aumentar su

productividad forrajera. En este contexto es fundamental realizar estudios que integren aspectos genéticos, ecológicos y fisiológicos permitiendo caracterizar el potencial adaptativo de las especies nativas capaces de sobrevivir y prosperar en diversas condiciones ambientales. La domesticación para el cultivo de especies forrajeras nativas permitiría la mejora de la productividad y la recuperación de pastizales con ciertos niveles de degradación. Llegar a domesticar una especie forrajera nativa requiere conocimiento de su variación genética y ecofisiológica.

Festuca pallescens (St. Yves) Parodi es una especie forrajera de importancia para la producción ganadera en regiones áridas y semi-áridas de Patagonia, que se distribuye en una gran diversidad de ambientes a lo largo de los principales gradientes ambientales de la Patagonia. Sus pastizales se ubican en áreas topográficas que por su exposición o altura poseen balances hídricos favorables para su desarrollo (Bertiller 1990; Bertiller et al. 1990; León et al. 1998). En Patagonia Norte, la abundancia de estos pastizales disminuye considerablemente desde la Cordillera de los Andes hacia el este de la provincia de Río Negro, haciéndose nuevamente abundantes en las zonas más elevadas de la Meseta de Somuncura, donde las condiciones ambientales vuelven a ser favorables para la especie (León et al. 1998; Godagnone & Bran 2009). La especie posee un alto grado de plasticidad que le permite colonizar diversos ambientes (Oliva et al. 2011), aunque se desconoce si es sólo plasticidad fenotípica o existe también adaptación local.

En esta Tesis Doctoral se evaluará la variación genética y ecofisiológica de poblaciones de *F. pallescens* distribuidas a lo largo de un gradiente de precipitación y a dos altitudes, con el fin de conocer su potencial adaptativo y generar conocimientos básicos para su domesticación. Se aportan los primeros estudios de (i) diversidad genética de la especie abordados con marcadores moleculares neutros, (ii) variaciones en las respuestas a cambios en la temperatura y disponibilidad hídrica en la germinación mediante modelos umbrales y (iii) desempeño frente al déficit hídrico de poblaciones de diferentes procedencias en ensayos de ambiente común.

2. MARCO CONCEPTUAL

2.1. Ambientes heterogéneos y su impacto sobre la vegetación:

La heterogeneidad ambiental resulta de la variación espacial y temporal de factores abióticos teniendo una fuerte incidencia en el patrón de distribución y abundancia

de las especies (Stewart et al. 2000). La variabilidad espacio-temporal de la temperatura, precipitación, disponibilidad de agua en suelo y/o evapotranspiración, favorecen la formación de gradientes clinales (Chapin et al. 1993; Garreaud et al. 2009; Jump et al. 2009). La interacción entre la heterogeneidad y los gradientes ambientales modula los patrones de distribución y abundancia de las especies vegetales (Pumilo 1988; Leon et al. 1998; Oosterheld et al. 1998) e influye en su establecimiento, desarrollo, reproducción y sobrevivencia (Santibañez-Andrade et al. 2009). Las poblaciones de especies que se distribuyen a lo largo de estos gradientes pueden experimentar presiones de selección diferenciales (Woods et al. 2012), promoviéndose adaptaciones locales y variación genética clinal (Whitford 2002; Tyukmaeva et al. 2011; Maluleke et al. 2017).

En especies con amplios rangos de distribución, la diferenciación genética entre poblaciones en general aumenta desde el centro del área de distribución geográfica de la especie hacia la periferia (Eckert et al. 2008). En los límites de su distribución geográfica, las poblaciones suelen ser más pequeñas y más fragmentadas (Brown et al. 1995; Thomas & Kunin 1999; Bridle & Vines 2007), acentuándose los efectos de la deriva genética y la endogamia. En general, estos límites se establecen por la incapacidad de las poblaciones periféricas para adaptarse a ambientes más allá del su rango actual (Pfennig et al. 2016), donde las condiciones ya no son adecuadas para su desarrollo (Hold 2000). Estas poblaciones pueden (i) quedar aisladas de las poblaciones centrales o seguir conectadas mediante flujo génico (Bridle & Vines 2007), (ii) experimentar procesos de hibridación y especiación (Thompson et al. 2010) los cuales generen mayor variabilidad genética mediante la creación de nuevas combinaciones génicas mejor adaptadas al ambiente (Johansen-Morris & Latta 2008); o (iii) promover la expresión de variabilidad fenotípica debido a la constante exposición a condiciones estresantes (Hoffmann & Hercus 2000).

La existencia de variación genética es un factor determinante en el rango de distribución geográfico y ecológico de las especies vegetales (Huennenke 1991). El mantenimiento de niveles altos de variación genética le proporciona a las poblaciones la potencialidad de adaptación ante modificaciones en su ambiente (Jump et al. 2008). Por el contrario, la pérdida de diversidad genética, ya sea neutral o adaptativa, está relacionada con el aumento del riesgo de extinción en las poblaciones naturales (Kahilainen et al. 2015). Las especies vegetales con amplios rangos de distribución se enfrentan a cambios geográficos y ecológicos que influyen en la distribución de la diversidad genética de sus poblaciones. Asociado a esto las poblaciones de estas especies

presentan gran variación fenotípica que puede atribuirse a (i) plasticidad fenotípica; (ii) cambios genéticos a lo largo del rango de distribución y/o a diferentes altitudes; o (iii) ambas (Jain 1979).

2.2. Respuesta de las especies vegetales a los cambios en el ambiente

Los organismos sésiles, como las plantas, pueden responder a cambios climáticos o variaciones ambientales *in situ*, principalmente mediante dos mecanismos: la plasticidad fenotípica y las adaptaciones genéticas locales, aunque también puede darse una combinación de ambos (Jump et al. 2005; Charmantier et al. 2008; Woods et al. 2009, 2012). La *plasticidad fenotípica* es la expresión diferencial de un mismo genotipo en respuesta al ambiente (Scheiner et al. 1993; Zhivotovsky et al. 1996), mientras que la *adaptación* es un proceso lento que involucra la acumulación de cambios genéticos en una población producto de la presión que el ambiente ejerce sobre la misma (Price et al. 2003). La plasticidad fenotípica puede involucrar cambios a nivel morfológico, fisiológico, e incluso comportamental (Piuglici 2001; Aubin-Horth & Renn 2009). Sin embargo, estos cambios son reversibles y no se asocian a modificaciones a nivel genético (Scheiner et al. 1993; Zhivotovsky et al. 1996).

Cada mecanismo actúa a diferentes escalas, la plasticidad fenotípica permite responder a cambios ambientales a corto plazo, mientras que los cambios genéticos están asociados a la adaptación de las especies frente a modificaciones en el ambiente a través de varias generaciones (Gienapp et al. 2008; Hendry et al. 2008; Hansen et al. 2012). Tradicionalmente, la plasticidad fenotípica se relacionó con la capacidad de sobrevivencia de una población (Via & Lande 1985; Via & Conner 1995), dado que puede presentarse como un mecanismo rápido de respuesta inicial frente a un cambio ambiental en una generación (Falluor-Rubio et al. 2009), facilitando una subsecuente adaptación genética local (Hansen et al. 2012). Sin embargo, algunos trabajos han planteado la existencia de variación genética asociada a la plasticidad fenotípica, la cual es heredable y puede estar sujeta a selección (Nussey et al. 2005). Incluso un atributo de carácter plástico puede convertirse en un atributo adaptativo (Pigliucci 2001; Price et al. 2003; Aubin-Horth & Renn 2009), por lo que, la plasticidad fenotípica puede en ciertas circunstancias, ser adaptativa (Falluor-Rubio et al. 2009). Una de las formas de discernir entre una adaptación local y una respuesta plástica, es la utilización de ensayos de

ambiente común en laboratorio (o invernáculos). De esta forma, si la divergencia fenotípica se mantiene en las poblaciones experimentales (poblaciones de individuos tomadas de diferentes ambientes) en condiciones ambientales comunes, se puede corroborar que la plasticidad tiene bases genéticas (White et al. 2007; Ballentine & Greenberg 2010).

La adaptación de las plantas a cambios drásticos depende de varios factores. Si bien la regeneración vegetativa es el principal mecanismo de reproducción en poáceas, la reproducción sexual juega un rol fundamental en la restauración luego de disturbios ambientales (Romo et al. 1991), siendo esencial como fuente de variabilidad genética. Específicamente, la germinación es una de las etapas crítica en el ciclo de vida que afecta al establecimiento de nuevos individuos (Pendleton & Meyer 2004; Donahue et al. 2005). La germinación es modulada tanto por factores genéticos como ambientales siendo temperatura y disponibilidad hídrica dos factores ambientales clave (Lacey 1996; Murray et al. 2004). La variación en la germinación de numerosas especies está asociada al hábitat, reflejando la existencia de adaptaciones locales (Basking & Baskin, 1998). La germinación bajo situaciones de estrés hídrico y térmico puede evaluarse mediante modelos de tiempo térmico (García-Huidobro et al. 1982) y de hidrotiempo (Bradford 1995), los cuales permiten obtener coeficientes asociados a las respuestas germinativas de las plantas en condiciones de campo potenciales (Herdegg et al. 2003).

Por otro lado, cambios drásticos en el ambiente pueden promover diferencias fenológicas y, en última instancia, aislamiento genético por limitaciones al flujo génico. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional dado que determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente (Slatkin 1994). Asimismo, mantiene la variabilidad genética de poblaciones pequeñas a largo plazo (Hanski 1994; Etienne & Heesterbeek 2000; Mora et al. 2010) y disminuye el grado de aislamiento genético entre poblaciones semi-aisladas (Peacock et al. 1997). El flujo génico puede favorecer la adaptación local mediante la incorporación de alelos beneficiosos (“migración adaptativa”) (Holderegget et al. 2012) o desfavorecerla debido a su efecto homogeneizador (Kawecki & Ebert 2004). Sin embargo, el aislamiento genético puede persistir incluso en presencia de flujo génico, conduciendo hacia un proceso de especiación ecológica, además de promover la diferenciación genética tanto en caracteres adaptativos (ej. morfológicos y fisiológicos), como en marcadores moleculares selectivamente neutros (Andrew et al. 2012). En este

caso, los marcadores microsatélites permiten evaluar la variabilidad genética neutral y abordar los procesos evolutivos que ocurren dentro del paisaje (Holderegger et al. 2006), mientras que la capacidad adaptativa de las poblaciones puede evaluarse a partir de la diferenciación genética en caracteres adaptativos.

2.3.Efecto de la heterogeneidad ambiental sobre la vegetación de la Patagonia

La interacción de los procesos microevolutivos con las características del paisaje definen en gran medida la distribución de la diversidad genética de las poblaciones de especies vegetales a diferentes escalas espaciales y temporales (Sork & Smouse 2005; Odduo-Muratorio et al. 2010). En consecuencia, los ambientes con gran heterogeneidad ambiental, promueven cambios genéticos a diferentes escalas espacio-temporales (Anderson et al. 2010). Una de las regiones geográficas que presenta una gran heterogeneidad ambiental es la Patagonia Argentina (Schlesinger et al. 1990; Godagnone & Bran 2009). Específicamente, en Patagonia Norte existe un marcado gradiente de precipitaciones generado por lluvias orográficas desde la Cordillera de los Andes (desde el oeste hacia el este), como así también, presenta una geomorfología y relieve muy heterogéneo, con una organización jerárquica desde grandes paisajes (ej. Sierras y Mesetas) hasta unidades de paisaje (ej. mallines) (Godagnone & Bran 2009). Todo esto genera una distribución espacial muy heterogénea de los recursos del suelo (agua y nutrientes) y por ende del recurso forrajero (León et al. 1998; Godagnone & Bran 2009). Asimismo, la región se caracteriza por la ocurrencia de eventos climáticos estocásticos cada vez más frecuentes (Barros & Camillioni 2016) que se expresan como períodos húmedos y secos (López 2011). Este tipo de variabilidad temporal, interaccionando con las diversas escalas espaciales, modulan la dinámica de la vegetación, determinando las características ecofisiológicas de las poblaciones vegetales de los diferentes ecosistemas (Whitford 2002; Schwinning & Sala 2004).

En un contexto de cambio climático, las regiones áridas y semiáridas afectadas por el avance de la desertificación, son los sistemas más susceptibles al efecto de un aumento de fluctuaciones climáticas (Zárate & Tripaldi 2012). El 70% de las tierras áridas y semiáridas en Argentina se localizan en Patagonia (LUDEPA-SME 1995), cuya aridez se ve profundizada por un gran avance de la desertificación (35% de la superficie con un grado medio a grave y 32% con grado grave a muy grave) (del Valle et al. 1998). La

mayoría de los modelos de cambio climático predicen que para los próximos años, habrá un incremento en la temperatura media, alteraciones en las precipitaciones y un aumento en la frecuencia de eventos extremos, tales como sequías y años húmedos (Schwinning & Sala 2004; IPCC 2014). Estos cambios podrían alterar el gradiente pluviométrico que caracteriza a la Patagonia profundizando aún más el déficit hídrico, afectando significativamente a la biota de sus ecosistemas.

En regiones con gran heterogeneidad espacio-temporal, como Patagonia Norte, en interacción con el cambio climático y la desertificación, las especies nativas de los pastizales podrán presentar respuestas plásticas, migrar a sitios más favorables, adaptarse *in situ* en las sucesivas generaciones o extinguirse localmente (Fallour-Rubio et al. 2008). Las especies perennes y longevas, como muchas poáceas, presentan mayor dificultad para ajustarse a los cambios ambientales rápidos (Chapin 1993). Morelo (2012) planteó que en poáceas perennes provenientes de ambientes secos, como por ejemplo *Poa ligularis* y *F. pallescens* en Patagonia, la plasticidad fenotípica se asocia a atributos relacionados con el crecimiento vegetativo; mientras que otros atributos funcionales relacionados con estrés hídrico y defensa contra herbívoros estarían asociados a caracteres adaptativos. Gonzalo-Turpin & Hazard (2009) reportaron para *Festuca eskia* que la mayoría de los atributos funcionales y reproductivos encontrados en poblaciones ubicadas a lo largo de un gradiente altitudinal eran caracteres adaptativos. Por lo tanto, demostraron la existencia de adaptación local, a pesar de existir flujo génico entre las poblaciones de la especie.

Los pastizales de Patagonia Norte están en gran parte dominados por poáceas, que constituyen una familia muy importante por el valor forrajero en la producción pecuaria (Correa 1978). Por ello resulta de suma importancia para la producción regional iniciar estudios que aporten conocimientos genético-ecofisiológicos necesarios para el uso y conservación de dichas especies. Este conocimiento permitirá diseñar programas de domesticación y mejoramiento que promuevan la adaptación de especies forrajeras nativas, capaces de sobrevivir y prosperar en diversas condiciones climáticas. De esta forma se proveerán herramientas científico-tecnológicas para la conservación de pastizales naturales y/o para restaurar ecosistemas degradados, mejorando la capacidad de los mismos para responder y adaptarse frente a futuros cambios, y para mantener la capacidad de proveer bienes y servicios (AEFP, 2011; Convention on Biological Diversity, 2008; Drylandscience for Development Consortium, 2009).

3. LA REGIÓN DE ESTUDIO Y SUS CARACTERÍSTICAS

La Patagonia es una extensa región ubicada al sur de la República Argentina, con una superficie estimada en 700.000 km², se extiende aproximadamente desde los 36° a los 55° S, incluyendo la Cordillera de los Andes, las mesetas, planicies y serranías comprendidas entre los Andes y el Océano Pacífico (Leon et al. 1998). El clima de la región está determinado por las masas de aire provenientes del Océano Pacífico, que producen los fuertes vientos de dirección O-E y modulan el régimen de precipitaciones durante el período estival, condicionado a su vez, por la sombra de lluvias orográficas impuesta por la Cordillera de los Andes (Paruelo et al. 1998). Los suelos de la estepa patagónica presentan características asociadas a las condiciones de aridez donde se desarrollaron, presentando notables diferencias en los niveles de salinidad y humedad en los horizontes más superficiales (del Valle et al. 1998). En síntesis, la gran variabilidad climática espacio-temporal que caracteriza a la Patagonia se materializa en dos gradientes principales: uno oeste-este de precipitaciones decrecientes, particularmente muy húmedo en el sector de la cordillera; y otro noreste-sudoeste de temperatura decreciente, fundamentalmente ligado a la latitud y altitud.

Los patrones climáticos generales mencionados condicionan fuertemente el desarrollo de la vegetación, generando una variedad muy grande de biomas y ecosistemas asociados (Oesterheld et al. 1998). En este sentido, tres provincias fitogeográficas definen a la región: la Subantártica, la Patagónica y el Monte, cada una de ellas asociada a una gran diversidad fisonómica (Oesterheld et al. 1998, León et al. 1998). El área de estudio de esta tesis se encuentra dentro de las dos primeras provincias fitogeográficas. La Región Subantártica ocupa una franja relativamente angosta y comprende selvas, bosques caducifolios, y matorrales con estepas en mosaico (León et al. 1998). La Provincia Patagónica abarca la parte occidental de Neuquén y Río Negro, gran parte de Chubut, casi toda Santa Cruz y el N. de Tierra del Fuego. Se caracteriza por su vegetación desértica y semidesértica y la principal actividad es la ganadería ovina. La fisonomía predominante es la estepa arbustiva-graminosa, con un gran número de endemismos y especies con adaptaciones a ambientes áridos (Soriano et al. 1983; Correa 1998; León et al. 1998).

Asociada geográficamente tanto a la región Patagónica como al Monte, se encuentra la Meseta de Somuncura de 1200 m s.n.m. en la altiplanicie (León et al. 1998),

que ha sido ampliamente reconocida como una isla biogeográfica con presencia de endemismos, e.g. *Somuncuria Lynch* y *Atelognathus reberverii* Cei (Telmatobiinae, Amphibia), *Gymnocharacinus Steindachner* (Characidae, Pisces) (Ceí 1969; Lynch 1978; Menni & Gómez 1995; Muzón 1997; Muzón & Ellenrieder 1999; Spinelli & Muzón 2000), *Conyza magnimontana* Cabrera, *Grindelia pygmaea* Cabrera, *Grindelia coronensis*, *Senecio megaoreinus* Zardini, *Senecio mustersii* Speg. var. *dentatus* Cabrera (Asteraceae), *Adesmia serrana* M. N. Correa (Fabaceae) y *Lecanophora ruiz-leali* Krapov. (Malvaceae) (Bartoli & Torrosa 2003). A pesar de situarse en un área árida o semi-árida de escasas precipitaciones, presenta algunas características similares al distrito subandino de la Provincia Patagónica, como la presencia de estepas graminosas de *F. pallescens* (León et al. 1998). Además, conforma una unidad geomorfológica de naturaleza volcánica con geoformas como las mesetas y las sierras volcánicas que se desarrollan en las provincias de Río Negro y Chubut (Muzón et al. 2005).

La geomorfología de la región fue modelada fuertemente por actividad volcánica, glaciaciones, levantamiento de cordones montañosos y modificaciones en los sistemas de drenaje en Sudamérica (revisión Turchetto-Zoler et al. 2013) y en la región Patagónica (Ruzzante et al. 2006; Marchelli & Gallo 2006, Morando et al. 2007; Azpilicueta et al. 2009; Jakob et al. 2009; Mathiasen & Premoli 2010; Cosacov et al. 2010; Breitman et al. 2011; Sersic et al. 2011). Se destacan eventos como los movimientos tectónicos que generaron el levantamiento de la Cordillera de los Andes durante el Mioceno (15-10 Ma) (Uliana & Biddle 1988; Corbella & Lara 2008; Ramos & Ghiglione 2008) y la formación de la Meseta Patagónica durante el Paleozoico inferior en el ciclo Famatiniano (Ramos et al. 1999), los paisajes glaciarios producto de la “Gran Glaciación Patagónica” que comenzó en el Mioceno Tardío, el Plioceno hasta el Pleistoceno donde los glaciares cubrieron gran parte de la Patagonia (Flint & Fidalgo 1969; Rabassa et al. 2005), y los materiales parentales más importantes de los suelos patagónicos, detritos glaciarios y materiales volcánicos (Paruelo et al. 1998). Además, los cambios en los regímenes de las precipitaciones del Pleistoceno modularon la dinámica poblacional y la diversidad genética de especies vegetales en la estepa patagónica (Cosacov et al. 2010, 2012). Entre los 39° y 43° S (Flint & Fidalgo 1964; 1969) los glaciares pleistocénicos de tipo “valle” avanzaron en forma irregular desplazando la vegetación a zonas libres de hielo (Refugios glaciarios) (Markgraf et al. 1995; Villagrán et al. 1991). Por otra parte, durante el Oligoceno y el Mioceno, las zonas meridionales (38°- 43° S) fueron invadidas por

transgresiones marinas del Océano Atlántico (Ramos 1982; Premoli et al. 2011) y del Pacífico, estas últimas continuaron desde el Oligoceno hasta el Mioceno (Bechis et al. 2011).

4. LA ESPECIE OBJETO DE ESTUDIO

La familia Poaceae comprende 206 géneros y 1523 especies distribuidas en 10 subfamilias diferentes en América del Sur austral (Biganzoli & Zuloaga 2015) con una amplia distribución geográfica en Patagonia. Muchas de estas poáceas son cespitosas y forman matas, que se conocen también con el nombre local de coirones (Correa, 1978). En general, en los suelos arenosos poco profundos, predominan estepas de coirón duro (*Pappostipa speciosa* var. *speciosa*), mientras que en suelos más profundos, prevalecen estepas de coirón blanco o coirón dulce (*F. pallescens*), acompañada por la cebadilla patagónica (*Bromus setifolius*) y la cebada patagónica (*Hordeum comosum*), entre otras. Por otro lado, es habitual encontrar en lugares húmedos y salitrosos, un dominio de mallines con pastos salados (*Distichlis scoparia*, *D. spicata* y *D. australis*) (Correa, 1978).

Festuca pallescens es una especie nativa de gran valor forrajero que presenta crecimiento primavero-estival, de fecundación cruzada, con gran producción de cañas florales, así como de *semillas* con elevado valor cultural y sin dormición (Soriano 1960; Coronato & Bertiller 1997; Defossé et al. 1997). Cabe destacar que en gramíneas el fruto es una cariopsis, es decir, la semilla se suelda íntimamente al pericarpo (Nicora 1978). La cariopsis se encuentra protegida por dos glumelas, la lema y la palea, constituyendo el antecio. Por lo tanto, se utilizará el termino “*semilla*” haciendo referencia al antecio. Asimismo, *F. pallescens* es una especie con participación destacada (superior al 20%) en la dieta de ovinos, bovinos y caprinos dado que es altamente palatable y con relativamente elevada productividad (Pelliza Sbriller et al. 1984, Bonvissuto et al. 2008). Si bien posee valores proteicos de sus hojas son bajos (entre 4 y 6%), la digestibilidad de la materia seca supera el 60% en la época primavero-estival y permanece el resto del año por encima del 50% (Somlo et al. 1985). Se distribuye en una gran diversidad de ambientes y crece en diferentes tipos de suelos y en diferentes áreas ecológicas de Patagonia (Bertiller et al. 1990).

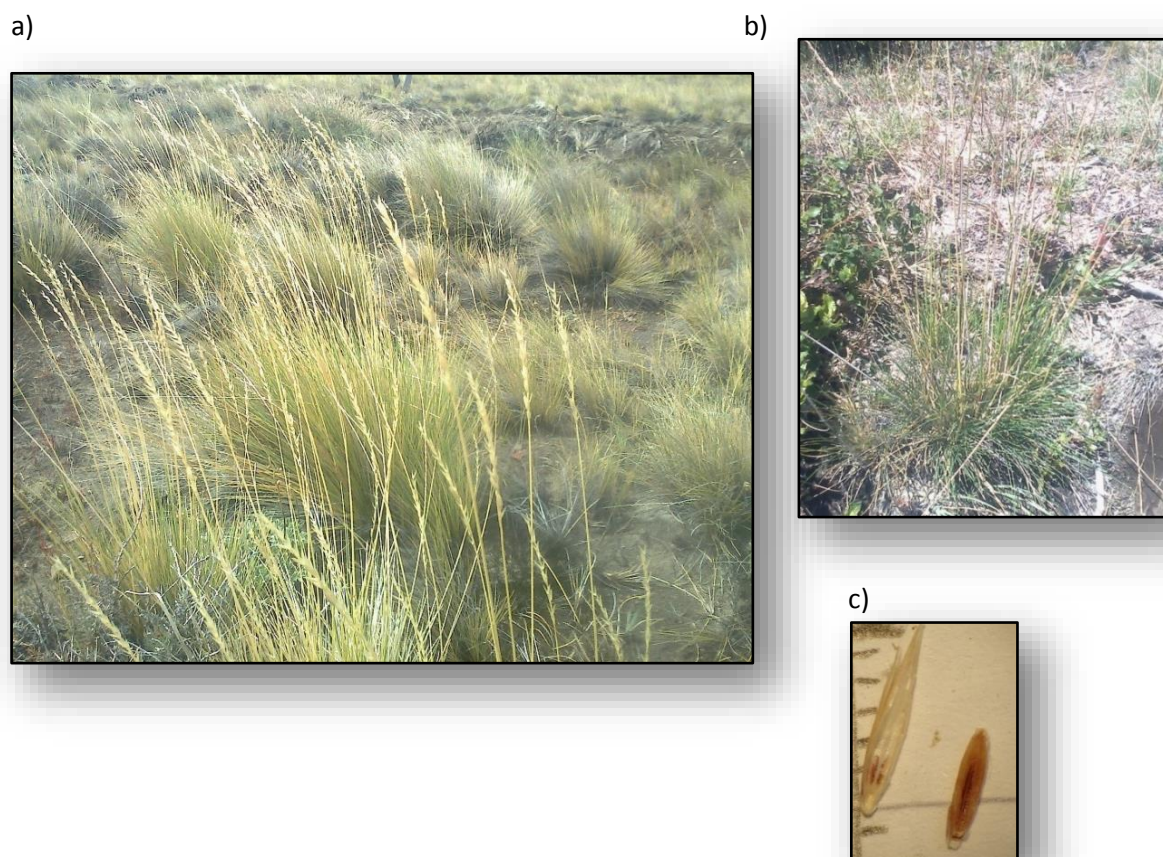


Figura 1.1: a) Foto de una pradera en uno de los sitios de muestreo. Las matas de *Festuca pallescens* presentan una gran proporción de cañas florales (foto tomada en diciembre de 2014). b) Mata encañada de *F. pallescens*. c) “*Semilla*” (lema, palea y cariopsis) de *F. pallescens*; el fruto está disociado de la lema y la palea.

4.1. Distribución de la especie de estudio en Patagonia Norte

Los pastizales de *F. pallescens* se ubican en áreas topográficas que por su exposición, profundidad de suelo y/o altura poseen balances hídricos favorables para su desarrollo (Figura 1.1a) (Bertiller 1990; Bertiller et al. 1995; León et al. 1998). Este patrón de distribución se observa desde el Norte de Neuquén hasta las nacientes del Coyle en Santa Cruz (Figura 1.2) (León et al. 1998). Específicamente, según la descripción de Áreas Ecológicas de Godagnone & Bran (2009), en el área ecológica de Precordillera de Patagonia Norte, las poblaciones de *F. pallescens* se presentan como ingresiones en el bosque en forma de isletas, en los bordes de numerosos mallines (5% a 10% de la superficie) y en mesetas altas (más de 900 m.s.n.m., asociadas a una disminución en la temperatura, con un balance hídrico más favorable), formando la llamada “meseta del coirón blanco” (Figura 1.2) (Bertiller & Defossé 1990; Bonvissuto et al. 2008). Luego,

hacia el área ecológica de las Sierras y Mesetas Occidentales, con menores precipitaciones y mayor evapotranspiración, se encuentran estepas gramíneas de *F. pallescens* en sectores por encima de los 1200 m s.n.m. como la Meseta de Somuncura y en bordes de mallines, aunque en menor proporción ya que hay una gran disminución de mallines (humedales) (López et al. 2005; Bran et al. 1998). Por lo tanto, la distribución de *F. pallescens* abarca un amplio gradiente pluviométrico, desarrollándose en ambientes desde 2000 mm de precipitación media anual hasta 200 mm, tanto en mallines subhúmedos y peri-mallines (ubicados a diferentes alturas), como en estepas gramíneas ubicadas a más de 900 m s.n.m.



Figura 1.2: Foto de un pastizal de *Festuca pallescens* (coirón blanco o coirón dulce) en Pilcaniyeu, Patagonia Norte. En la parte superior de la foto se muestra un mapa de la distribución de la especie en Argentina.

4.2. Características morfológicas

Las plantas de *F. pallescens* (coirón dulce) forman matas de hasta 60 cm de altura (Figur 1.1b), aunque suelen observarse a campo con menor porte como consecuencia del pastoreo intensivo. Las matas presentan una tonalidad blanco azulada y sus hojas son

finas (Bran 1995). En la zona de contacto entre la base de las hojas y la vaina, la lámina presenta un pequeño hombro, el cual resulta un carácter morfológico relevante para su identificación a campo (Bonvissuto et al. 2008). Las semillas son pequeñas (6-8 mm de largo por 1-1,5 mm de ancho) y en el ápice de la lema del antecio poseen una arista de aproximadamente 3mm (Figura 1.1c).

En algunas estepas, co-existe con *Festuca argentina* (Bran et al. 2000), por ejemplo suelen encontrarse juntas en estepas arbutivo-graminosas en zonas altas del distrito occidental de la Provincia Fitogeográfica Patagónica (e.g. Meseta de Somuncura) (Leon et al. 1998). Ambas especies se diferencian por el color de la hoja, la morfología del cariopsis, el tamaño de las matas, entre otras características (Correa 1978; Nicora 1978; Catalan & Muler 2012).

4.3. Características genéticas, fisiológicas y ecológicas

Festuca pallescens es una especie alohexaploide ($2n=6x=42$) con un cariotipo uniforme y con escasa o nula formación de multivalentes durante la meiosis (Ducovsky & Martinez 1987, 1991). Se desconoce cuáles serían los posibles genomas que dieron origen a la especie dado que se tiene escaso conocimiento sobre la relaciones filogenéticas entre esta especie y otras festucas patagónicas (Ducovsky & Martinez 1991, 1992; Oliva et al. 2011). La uniformidad del genoma y la segregación de los cromosomas durante la división meiótica indicarían que la especie utilizaría un mecanismo de diploidización durante la meiosis, comportándose como un diploide normal y formando $nx/2$ bivalentes (es decir, 14 bivalentes). Por lo tanto, a pesar de no tener certeza sobre el tipo de segregación cromosómica de la especie (disómica o polisómica), según los trabajos de Ducovsky & Martinez (1987; 1988) podría presentar herencia disómica.

La germinación se produce inmediatamente luego de la dispersión en primavera y otoño (Bertiller & Coronato 1994), sin embargo la mayor parte ocurre en otoño (Defosse et al. 1995). Luego, el crecimiento es mínimo durante el invierno y su pico de producción ocurre en noviembre y diciembre, cuando comienza el período de floración (Bonvissuto et al. 2008). Durante el otoño crecen a menor ritmo y, al comenzar las heladas, numerosas plantas se descalzan y mueren mientras que aquellas que sobreviven afrontan la primavera con escasas lluvias y fuertes vientos (Bran 1995).

Por otro lado, el amplio rango de distribución de la especie está asociado en parte a la tolerancia a la salinidad y a la sequía, alcanzando ambientes con niveles medios de salinidad en mallines dominados por *Distichlis* sp (Bertiller 1992; Bran 1995). Asimismo, constituye sistemas silvopastoriles junto a *Pinus ponderosa* Doug. ex Laws ya que se adaptaría al crecimiento bajo cobertura arbórea (Fernández et al., 2004, 2006a, 2007; Caballe et al. 2011). El crecimiento en sistemas silvopastoriles le proporcionaría un microhabitat con menor déficit hídrico, indicando así que *F. pallescens* presentaría cierto grado de tolerancia a la sombra (Fernández et al. 2007). La especie presenta diferencias fenológicas asociadas a la variación de la temperatura del aire en distintas posiciones topográficas (Bertiller et al. 1990) y aprovecha en forma oportunista los pulsos de agua y nutrientes (Coronato & Bertiller 1997; Morelo 2012), los cuáles son más erráticos en ecosistemas áridos y semiáridos (Noy Meir 1973) como la estepa patagónica.

4.4. Ventajas y desventajas de ser un poliploide en los estudios genéticos

La poliploidía es una característica muy común en especies vegetales (Tate et al. 2005) y juega un rol muy importante en su evolución. Se define como el producto de la fusión de gametos no reducidos de una misma especie (e.g. por la duplicación del mismo genoma) lo cual origina un organismo autopoliploide, o diferentes especies (e.g. una hibridación interespecífica), produciendo alopoliploides (Trapnell et al. 2011). La poliploidía es el único mecanismo que permite la especiación instantánea (Futuyma 2005; Ramsey & Ramsey, 2014), por lo tanto, tiene un papel importante en la especiación simpátrica (que ocurre dentro de la misma región geográfica) (Beest et al. 2012). Estas nuevas especies presentarán niveles de diversidad genética asociados al número de los genomas involucrados en su formación y al nivel del flujo génico que haya habido entre ellos (Meimberg et al. 2009). Un ejemplo de esto es la especie alopoliploide *Salsola ryanii*, un nueva especie producto de al menos tres eventos de alopoliploidización seguidos por flujo génico entre descendientes de los parentales originales (Welles & Ellstrand 2016).

Los alopoliploides son generalmente considerados mucho más comunes que los autopoliploides (Ramsey & Schemske, 1998), ya que en la mayoría de los casos los descendientes de un evento de hibridación interespecífica exhiben apareamiento bivalente de cromosomas y patrones de herencia disómica (Thorpe et al. 2007). Estos organismos presentan suficiente variación genética en sus poblaciones (Soltis & Soltis, 2000;

Vrijenhoek 2007) aportada por los genes duplicados, lo cual resulta de gran utilidad para reducir los efectos de la deriva genética cuando colonizan nuevos ambientes. Otro de los beneficios, es el incremento de los eventos de recombinación genética durante la meiosis, lo cual incrementa la diversidad genética en el genoma, permitiendo la plasticidad adaptativa y reduciendo los costos de endogamia (Lopez-Vinyallonga et al. 2015). Por lo tanto, es esperable que los niveles de polimorfismo de organismos poliploides sea mayor al de sus parientes diploides (Pfeiffer et al. 2011).

A pesar del avance en los estudios en organismos poliploides, su complejidad impone varias limitaciones en los análisis genéticos de estos organismos. Las limitaciones se asocia a la dificultad de la determinación del dosaje alélico, frecuencias alélicas, presencia de alelos nulos y patrones de herencia mixtos (Dufresne et al. 2014). En particular, cuando se trabaja con marcadores moleculares del tipo microsatélites, la determinación del dosaje alélico es dificultosa (Esselink et al. 2004; Catalan et al. 2004; Trapnell et al. 2011). Sin embargo, a pesar de las limitaciones en los análisis genéticos, los microsatélites se utilizan con más frecuencias que otros marcadores (e.g AFLP, Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados) en el análisis de poliploides (Lopez-Vinyallonga et al. 2015; Kaur et al. 2016; Balao et al. 2016; Welles & Ellstrand 2016).

5. CONTEXTO DE LA HIPÓTESIS DE TRABAJO

La dinámica lenta de los ecosistemas áridos y semiáridos de Patagonia (Cingolani et al. 2005; López 2011) implica que los trabajos de ecología de comunidades insuman mucho tiempo. Un abordaje desde la genética-ecológica y la ecofisiología permite generar conocimientos en forma integral y a corto plazo, complementando los estudios ecológicos de comunidades vegetales. El empleo de marcadores moleculares selectivamente neutros provee información sobre la distribución de la variación genética y la existencia de flujo génico entre poblaciones. Por otra parte, los ensayos de ambiente común permiten identificar qué proporción de la variación total corresponde a la variación genética. La combinación de esta información con la respuesta fisiológica de las plantas en ensayos controlados de estrés hídrico permite profundizar sobre las bases genéticas de dicha respuesta.

Festuca pallescens, forrajera nativa de gran interés ecológico y productivo, cuya distribución cubre un amplio y variable gradiente pluviométrico, se desarrolla en una gran diversidad de ambientes. Asimismo, las poblaciones de esta especie aumentan de nivel de fragmentación (i.e. mayor aislamiento geográfico por menor densidad de poblaciones, más alejadas entre sí) hacia el este de su distribución en Patagonia Norte, asociado con la disminución en el relieve topográfico y de mallines. (Bran et al. 2000; López et al. 2005; Godagnone & Bran 2009). Se desconoce si esta capacidad de la especie de tolerar condiciones tan diversas se debe a una respuesta exclusivamente plástica o a un proceso adaptativo. Por otra parte, si bien existe evidencia de que algunas áreas de esta región sufrieron cierto grado de aislamiento genético (e.g. endemismos en diferentes órdenes en la Meseta de Somuncura), se desconoce si existe conexión genética entre las poblaciones de *F. pallescens*. Estudiar la variación genética y las respuestas fisiológicas de las distintas poblaciones en un ambiente común y controlado permitirá responder estos interrogantes. En este contexto, se plantea la siguiente hipótesis general de esta tesis:

5.1. Hipótesis y predicciones:

Hipótesis:

La heterogeneidad ambiental, producto de la variación espacio-temporal de los factores ambientales, que caracterizan Patagonia Norte han moldeado la diversidad genética, neutral y adaptativa, de las poblaciones de *Festuca pallescens* que se distribuyen en esta región. Asimismo, las poblaciones de la especie ubicadas en los límites del gradiente de precipitación, ocurren en ambientes donde los factores ambientales (e.g. precipitación y temperatura) son más diferenciados promoviendo la existencia de adaptaciones locales.

Predicción:

Las poblaciones de *F. pallescens*, provenientes de diferentes ambientes del gradiente de precipitación bajo estudio, exhibirán diferencias genéticas tanto en caracteres moleculares neutros como en caracteres adaptativos (ecofisiológicos) medidos en ensayos de ambiente común.

6. OBJETIVO GENERAL:

Generar conocimientos sobre aspectos genéticos y eco-fisiológicos relacionados con el potencial adaptativo de la especie forrajera nativa *Festuca pallescens* de manera de contribuir al inicio de delineamientos para el desarrollo de programas de domesticación y mejoramiento genético con fines productivos y de restauración de ecosistemas.

7. ESTRUCTURA DE LA TESIS:

Para abordar el objetivo general, en la tesis se plantean cuatro capítulos, de los cuales tres poseen estudios observacionales y experimentales y un capítulo final de integración de la información y conclusiones generales de la tesis. En este sentido, el Capítulo 2 tiene por objetivo particular analizar la variación genética y el grado de estructuración genética de *F. pallescens* con marcadores moleculares selectivamente neutros en poblaciones de la especie ubicadas a diferente altitud y en diferentes ambientes del gradiente pluviométrico. Por su parte, el Capítulo 3 tiene como objetivo específico evaluar si las poblaciones de *F. pallescens* provenientes de diferentes ambientes tienen distinta capacidad de germinación de semillas, empleando modelos umbrales que evalúen el comportamiento de la germinación bajo diferentes regímenes de temperatura y potencial hídrico. Complementariamente, los objetivos específicos del Capítulo 4 apuntan a examinar la respuesta fisiológica-vegetativa de las poblaciones de *F. pallescens* al estrés hídrico en ensayos de ambiente común. Finalmente, el Capítulo 5 aborda la relación entre la variación genética y ecofisiológica con el fin de identificar adaptaciones locales o respuestas plásticas que sirvan de información de base para futuros delineamientos de programas de mejoramiento genético de la especie. De esta forma, se pretende sistematizar la información obtenida de manera de establecer y brindar recomendaciones introductorias para el manejo y domesticación de la especie.

8. ÁREA DE ESTUDIO Y SITIOS DE MUESTREOS

El muestreo se realizó sobre una transecta en sentido oeste–este en la provincia de Río Negro, en cinco sitios que se corresponden a distintas áreas ecológicas: Península

Huemul (Cordillera), Estancia San Ramón (Pre-cordillera), Pilcaniyeu, Ing. Jacobacci y Meseta de Somuncura (Sierras y Mesetas Occidentales) (Figura 1.3 y 1.4). En cada sitio se muestrearon dos poblaciones con una diferencia de altitud de al menos 200 m entre ellas. La caracterización térmica, hidrológica y topográfica de los sitios de muestreo se realizó en base al inventario integrado de la Provincia de Río Negro (Godagnone & Bran 2009). Las características generales de cada sitio y la descripción de cada ambiente se resumen en la Tabla 1.1.

8.1 Características geográficas y climáticas

Península Huemul se sitúa en la región Patagónica Andina, donde el clima es húmedo, el relieve característico corresponde a Montañas y Valles, los suelos son criandes, udandes, vitriandes, umbreptes, crieptes y ustoles (Godagnone & Bran 2009). El tipo fisonómico característico es de bosque, acompañado de pastizales de pradera (mallines) y de matorrales en cumbres y laderas expuestas. Los vientos del Oeste se caracterizan por su persistencia durante todo el año con una velocidad de 20-30 Km /h a 10 mts de altura. La temperatura media anual del sitio es 8,4°C (3,7°C y 13,5°C, la mínima y máxima respectivamente) y la amplitud térmica de 9,8 °. La evapotranspiración real es 617 mm y el promedio de precipitaciones anual es de 1096 mm. La vegetación se caracteriza por la presencia de bosques del género *Nothofagus* con intrusiones de la estepa patagónica, principalmente de estepas gramíneas o subarborescente gramíneas de *F. pallescens*.

Los sitios restantes están ubicados en la Región Patagónica Extra Andina Occidental; caracterizada por un gradiente Oeste-Este de variación climática, donde el clima es semiárido en el Oeste a árido hacia el Este. Las geoformas más destacadas son de baja altitud, sierras, mesetas lávicas y bajos endorreicos. Los suelos son mayoritariamente Arigides y Ortentes, y en menor cantidad, Xeroles y Ustoles (Godagnone & Bran 2009). La fisonomía predominante en esta región son las estepas arbustivo gramíneas. El régimen de precipitación disminuye gradualmente con dirección Oeste-Este desde 1000 mm anuales en Bariloche hasta 250 mm en Pilcaniyeu, luego pasando los 68° O, el registro es de 150 mm. La temperatura media anual se incrementa de 8° a 12 °C del Sudeste al Noroeste con un promedio de la velocidad de los vientos entre 10-15 km/h con dirección O-E (Godagnone & Bran 2009). Por otra parte, dentro del Macizo Nord-Patagónico, la Ea. San Ramón y la Ea. Pilcaniyeu forman parte de la Región Geomorfológica de Sierras Rocosas mientras que Ing. Jacobacci y la Meseta de

Somuncura pertenecen a la Región geomorfológica de las Mesetas Basálticas. En la Región Patagónica Extra Andina Occidental, la fisonomía dominante es de estepa, cuya cobertura vegetal y composición florística están determinadas por (i) el gradiente de precipitación; (ii) la altitud (relación entre la temperatura y el balance hídrico); (iii) los suelos (textura y profundidad); y (iv) la exposición (irradiación y vientos). Los principales tipos de estepa que se presentan en estos ambientes son a) graminosas, b) arbustivo graminosas, c) sub-arbustivo graminosas. Asimismo, en toda la región se desarrollan “mallines”, un tipo de vegetación azonal, que se encuentran en relieves bajos con abundante disponibilidad hídrica (Godagnone & Bran 2009).

Las poblaciones de *F. pallescens* pueden formar praderas o estepas. En el primer caso, la cobertura de la especie es de 60 hasta más de un 80%, y en estepas, los porcentajes de cobertura son del 40 al 60% (Siffredi et al. 2005). En los valles, donde la condición de humedad es mayor que la de la estepa, se desarrollan praderas húmedas de herbáceas y subhúmedas de *F. pallescens* (Lopez et al. 2005). Asimismo, se encuentran poblaciones de la especie en planicies suavemente onduladas con altitudes superiores a los 1100 m s.n.m. Este tipo de estepas se extienden a lo largo de las sierras y mesetas, aunque hacia el oriente sólo se desarrollan en niveles altitudinales elevados, siendo su ubicación más oriental en la Alta Sierra de Somuncura, en las proximidades del Cerro Corona. Cabe destacar que desde Pilcaniyeu hasta Ingeniero Jacobacci, y borde de la Meseta de Sumuncurá, las poblaciones de *F. pallescens* son menos frecuentes y se encuentran más distanciadas entre sí (Godagnone & Bran 2009).

En esta Tesis se abordarán los análisis genéticos para todas las poblaciones, aunque para los objetivos específicos 2 y 3 se utilizarán sólo dos poblaciones de San Ramon (SRA-3 y SRB) e Ing. Jacobacci (JA y JB). Esta selección de poblaciones respondió principalmente a la disponibilidad de semillas y plántulas, pero se tuvo en cuenta la representación de poblaciones provenientes de ambientes de *F. pallescens* de todo el gradiente de precipitaciones.

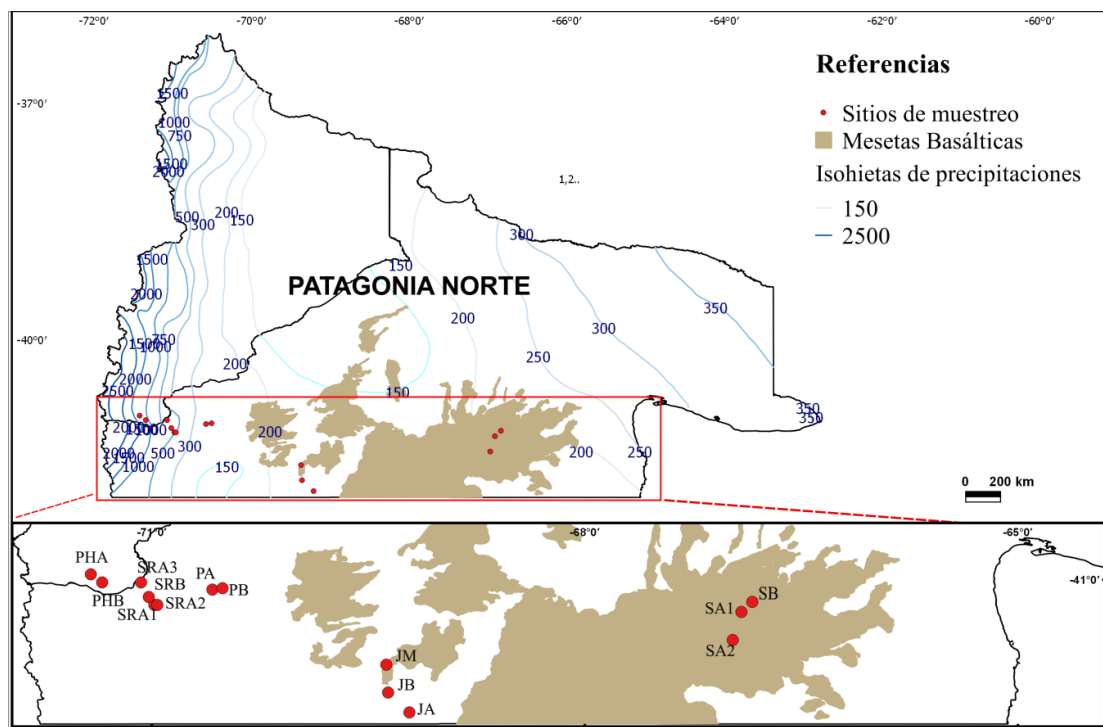


Figura 1.3: Mapa de los sitios de muestreo que se corresponden a la Tabla 1.1.



Figura 1.4: Fotos de la población de *Festuca pallescens* en cada sitio de muestreo. a) PHA; estepa arbustivo-graminosa de altura. b) PHB, estepa arbustivo-graminosa. c) SRA (1), estepa expuesta arbustivo-graminosa, d) SRA (2), mallín de altura



Figura1.4 (cont): Fotos de la población de *Festuca pallescens* en cada sitio de muestreo. e) SRB, mallín f) SRA (3), estepa gramínea, g) PA, Estepa arbustivo-gramínea, h) PB, Mallín



Figura 1.4 (cont): Fotos de la población de *Festuca pallescens* en cada sitio de muestreo.

i) JA, Estepa gramínea j) JM, Mallín salino k) JB, Mallín salino

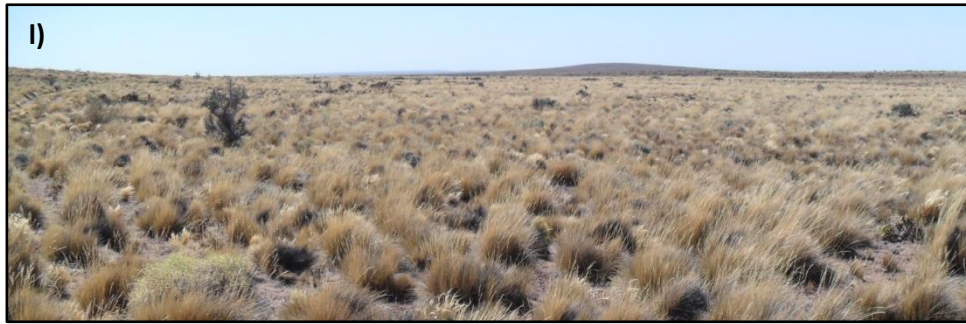


Figura1.4 (cont): Fotos de la población de *Festuca pallescens* en cada sitio de muestreo. l) SA_1, estepa arbustivo-graminosa m) SB, Estepa arbustivo-graminosa y o) SA_2, Mallín

Tabla 1.1: Características de las poblaciones de *Festuca pallescens*. El tipo fisonómico florístico se caracterizó siguiendo a Bran et al. (2002). **Pob:** población; **Pp.:** precipitación(mm); **Lat:** latitud; **Long:** longitud; **Alt:** altitud(m s.n.m.). Las letras en negrita debajo de cada población corresponden a las fotos de las páginas anteriores.

Pob	Sitio de muestreo	Pp	Long	Alt	Tipo fisonómico-florístico	Cobertura vegetal	Especies dominantes	Paisaje	Elemento del Paisaje	Suelo	Ambiente
PHA a	Península Huemul, Neuquén	831	71°25'	1220	Estepa arbustivo-graminosa alta	20-30% gramíneas 40-50% arbustos	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Pappostipa sp.</i> ; <i>Poa ligularis</i> ; <i>Adesmia boroniodes</i> ; <i>Berberis sp.</i> ; <i>Mulinum spinosum</i>	Loma alta	Ladera	Moderadamente profundo, derivado de cenizas volcánicas	Frío, con nieve en invierno. Exposición Norte, déficit hídrico en verano. Abras en bosque de <i>Nothofagus pumilio</i> .
PHB b			71°20'	845	Estepa arbustivo-graminosa media	30-40% gramíneas 20-30% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>P. speciosa</i> vr. <i>major</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Berberis sp.</i>	Valle bajo	Plano	Arenoso profundo	Déficit hídrico en el verano.
SRA1 c	Ea. San Ramón Río Negro	584	70°59'	1140	Estepa expuesta arbustivo-graminosa ¹	5-10% gramíneas 10-20% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>Pappostipa sp.</i> ; <i>Acaena splendens</i> ; <i>Mulinum spinosum</i>	Loma alta	Ladera media	Poco profundo, textura contrastante, franco arenoso en superficie y franco arcilloso en profundidad.	Frío, con nieve en invierno, deficit hídrico en verano, expuesto al viento del Oeste.
SRA2 d			70°57'	1100	Mallín	> 60% gramíneas	<i>F. pallescens</i> ; <i>Juncus sp.</i> ; <i>Carex subantarctica</i>	Plano alto	Plano suvemente ondulado	Profundo, textura franca arenoso y sustrato de arcilloso de origen glacial, bien provisto de MO.	Frío, con nieve en invierno, deficit hídrico al final del verano.
SRB e			71°1'	902	Mallín	60% gramíneas < 20% herbáceas	<i>F. pallescens</i> ; <i>Poa pratensis</i> ; <i>Taraxacum officinale</i> ; <i>Juncus sp.</i> ; <i>Carex subantarctica</i>	Valle	Plano bajo	Profundo, de textura franca a franco limoso y con abundante contenido de MO	Bien provisto de humedad, sin déficit hídrico al final del verano.
SRA3 f			71°4'	1139	Estepa graminosa	50-60% gramíneas 5-10% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>F. argentina</i> ; <i>Pappostipa speciosa</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio sp.</i>	Colinado	Ladera media	Moderadamente profundo, franco arenoso.	Frío, exposición Norte, moderado deficit hídrico en verano.
PA g	Pilcaniyeu, Río Negro	264	70°34'	1260	Estepa arbustivo graminosa	30-40% gramíneas 30-40% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>F. argentina</i> ; <i>Pappostipa sp.</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio sp.</i>	Lomas altas redondeadas	Ladera media	Moderadamente profundo, textura franca y arcilloso en profundidad	Frío, con nieve en el invierno, expuesto al viento del Oeste, déficit hídrico en verano.
PB h			70°30'	970	Mallín	80% gramíneas	<i>F. pallescens</i> ; <i>Juncus sp.</i> ; <i>Hordeum sp.</i>	Valle	Plano	Profundo, arenoso franco, alcalino, bien provisto de MO.	Frío en invierno, déficit hídrico a fines del verano
JA i	Ingeniero Jacobacci, Río Negro	170	69°12'	1400	Estepa graminosa	>60% gramíneas <5% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>Poa pratensis</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio sp.</i>	Loma	Ladera media	Moderadamente profundos, franco arenoso.	Frío, déficit hídrico en verano.
JB j			69°21'	970	Mallín salino	50-60% gramíneas 5-10% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>Juncus sp.</i> ; <i>Distichlis sp.</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio sp.</i>	Valle	Plano	Profundo, franco limoso, alcalinos- salinos. Bien provisto de MO.	Déficit hídrico a fin del verano.
JM k			69°22'	1135	Mallín salino	>60% gramíneas <5% arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>Juncus sp.</i> ; <i>Distichlis sp.</i> ; <i>Azorella trifurcata</i>	Valle	Plano	Profundo, franco limoso, alcalino-salino. Bien provisto de MO.	Déficit hídrico a fin del verano.
SA1 l	Meseta de Somuncura, Río Negro	150	66°54'	1100	Estepa arbustivo-graminosa	30-40% gramíneas 5-10%arbustos	<i>Festuca sp.</i> ; <i>Pappostipa sp.</i> ; <i>Jarava humilis</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Adesmia campestris</i>	Valle	Plano	Moderadamente profundo, franco arenoso, con piedras en superficie.	Frío en invierno, expuesto al viento del Oeste, déficit hídrico en el verano.
SB m			66°50'	925	Estepa arbustivo-graminosa	20-30% gramíneas 5-10 arbustos	<i>Festuca sp.</i> ; <i>Pappostipa sp.</i> ; <i>Mulinum spinosum</i>	Planicie suavemente ondulada	Plano	Moderadamente profundo, franco arenoso, con grandes piedras en superficie.	Valle angosto, déficit hídrico en el verano.
SA2 o			66°58'	1430	Mallín	60-80% gramíneas 5-10%arbustos	<i>F. pallescens</i> ; <i>Poa ligularis</i> ; <i>Senecio sp.</i>	Planicie suavemente ondulada	Plano	Moderadamente profundo, franco arenoso.	Muy frío con nieve en invierno, expuesto al viento del Oeste, moderado déicit hídrico hacia fin del verano.

CAPÍTULO 2 A

Diversidad genética y estructura genético-poblacional de *Festuca pallescens* en poblaciones distribuidas a lo largo del gradiente pluviométrico en Patagonia Norte

1. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética es la base sobre la que actúa la selección natural, por lo tanto constituye una de los mecanismos más importantes que posee una población para responder a cambios bióticos y abióticos (Jump et al. 2008). Esta variación se genera continuamente a través de mutaciones y, al mismo tiempo, se elimina por selección y deriva genética. La variación genética le proporciona a las poblaciones la potencialidad de adaptación ante modificaciones en su ambiente, ya sean estas modificaciones lentas o rápidas (e.g. ciclos climáticos inter-anales, cambio climático antropogénico). Estas variables climáticas, junto con la heterogeneidad ambiental, favorecen la formación de gradientes clinales (Chapin et al. 1993; Jump et al. 2009). Las poblaciones de especies que se distribuyen a lo largo de estos gradientes pueden experimentar presiones de selección diferenciales (Woods et al. 2012), promoviéndose adaptaciones locales y variación genética clinal (Whitford 2002; Tyukmaeva et al. 2011).

La heterogeneidad ambiental modela la variación genética de las poblaciones de forma directa e indirecta (Pumilo 1988). Por un lado, los genotipos pueden responder diferencialmente en ambientes heterogéneos por lo que procesos selectivos diferenciales impactarían directamente en la variación genética (Holderegger et al. 2012; Wood et al. 2012). Por otro lado, existe un impacto indirecto del ambiente en la variación genética que se produce por la interacción entre los patrones ambientales y los procesos demográficos poblacionales sin consecuencias a nivel selectivo (Pumilo 1988; Jump et al. 2008). El mantenimiento de la variación genética es fundamental en un ambiente heterogéneo y la respuesta de las poblaciones a estos patrones ambientales depende no sólo de su capacidad adaptativa sino también del tamaño poblacional, ya que los procesos estocásticos tienen una gran influencia en el modelado de la estructura genética

poblacional (Bijlsma et al. 1991; Hampe et al. 2005; Cota et al. 2011; Villellas et al 2013). Diversas fuerzas evolutivas pueden dificultar o enmascarar procesos de adaptación local. Por ejemplo un flujo génico extensivo puede dificultar el establecimiento de adaptaciones locales, la existencia de deriva génica confundir su detección, y, en última instancia, la falta de diversidad genética restringir las posibilidades de adaptación (Kawecki & Ebert, 2004).

Los patrones de distribución de la variación genética están fuertemente influenciados por procesos demográficos históricos (Matocq et al. 2000; Mora et al. 2007) determinados por eventos paleogeográficos y paleoclimáticos (Sersic et al. 2011). Un ejemplo son las oscilaciones climáticas del Pleistoceno y los eventos orogénicos que ocurrieron durante el Mioceno y el Plioceno. La actividad volcánica, el levantamiento de cordones montañosos y las modificaciones en los sistemas de drenaje marcaron la historia demográfica y la distribución de las especies en Sudamérica (revisión Turchetto-Zoler et al. 2013) y en Patagonia (Ruzzante et al. 2006; Marchelli & Gallo 2006, Morando et al. 2007; Azpilicueta et al. 2009; Jakob et al. 2009; Mathiasen & Premoli 2010; Cosacov et al. 2010; Breitman et al. 2011; Sersic et al. 2011). Estos eventos paleogeográficos y paleoclimáticos han promovido quiebres filogeográficos compartidos por numerosas especies en Patagonia (Sersic et al. 2011). En particular, los cambios en los regímenes de las precipitaciones del Pleistoceno han modulado la dinámica poblacional y la diversidad genética de especies vegetales en la estepa patagónica (Cosavov et al. 2010, 2012).

Por otra parte, los procesos micro-evolutivos (como la deriva genética y el flujo génico) tienen una fuerte incidencia en la diversidad genética (Eckert et al. 2008). La deriva genética influye notoriamente en poblaciones pequeñas, determinando la velocidad a la cual la variación genética se pierde a lo largo de las generaciones (Eckert et al. 2008), mientras que el flujo génico tiende a mantener y homogeneizar la variabilidad genética permitiendo la persistencia en poblaciones a largo plazo (Hanski 1994; Etienne & Heesterbeek, 2000; Hanski & Gaggiotti, 2004; Worthington Wilmer et al. 2008; Mora et al. 2006, 2010). En ese sentido, el flujo génico tiende a reducir las diferencias genéticas entre poblaciones locales y, por lo tanto, disminuir el grado de aislamiento genético entre poblaciones semi-aisladas (Peacock et al. 1997). Sin embargo, en algunos casos el aislamiento genético puede persistir incluso en presencia de flujo génico, promoviendo la diferenciación genética tanto en caracteres adaptativos (ej. morfológicos y fisiológicos) como en marcadores moleculares selectivamente neutros (Andrew et al. 2012). El empleo

de este tipo de marcadores moleculares provee información sobre la distribución de la variación genética y la existencia de flujo génico entre poblaciones.

En especies vegetales que poseen un amplio rango de distribución, la diversidad genética tiende a disminuir hacia los extremos mientras que la diferenciación genética entre poblaciones aumenta desde el centro de distribución hacia la periferia (Eckert et al. 2008). A medida que las especies se acercan a los límites de su distribución, las poblaciones suelen ser más pequeñas y más fragmentadas (Brown et al. 1995; Thomas & Kunin 1999; Bridle & Vines 2007). Estas poblaciones periféricas pueden quedar aisladas de las poblaciones centrales o seguir conectadas mediante flujo génico (Bridle & Vines 2007), por lo tanto el grado de diferenciación genética dependerá del nivel de flujo génico que exista entre ellas. Entonces, la diferenciación genética entre poblaciones puede deberse tanto a procesos evolutivos contemporáneos como a las fluctuaciones históricas en el tamaño efectivo de la población asociado con los cambios en el rango geográfico durante los eventos paleogeográficos y paleoclimáticos (Eckert et al. 2010; Sersic et al. 2011).

En la región patagónica, uno de los ambientes heterogéneos más destacados de Argentina, dos gradientes ambientales principales determinan la distribución de especies vegetales como *Festuca pallescens*: el pluviométrico generado por la sombra de lluvias que impone la Cordillera de los Andes y el altitudinal, asociado a las formas del relieve (más pronunciado en la zona Andina). *Festuca pallescens* se desarrolla en una gran diversidad de ambientes cubriendo un amplio gradiente pluviométrico (ver Capítulo 1 para una descripción detallada). Las poblaciones de esta especie son continuas y grandes en el oeste (desde la zona de 800 – 1000 mm de precipitación anual), fragmentándose hacia el límite este de su distribución en Patagonia Norte. Esta fragmentación está asociada a la disminución de la altitud y de las precipitaciones (menores a 160 mm) que conlleva una reducción de ambientes favorables para la especie (e.g. peri-mallines) (Bran et al. 2000, López et al. 2005; Godagnone & Bran 2009). Existen evidencias sobre el aislamiento de algunas áreas de esta región relacionado con los procesos evolutivos históricos mencionados antes que llevaron, por ejemplo, a la ocurrencia de endemismos en la Meseta de Somuncurá. Más aún, en los bordes de esta meseta, las poblaciones de la especie escasean debido a la reducción del número y tamaño de mallines, mientras que en las zonas elevadas de la meseta los ambientes son más favorables (e.g. estepas de altura; Bertiller et al. 1990; Gaitán et al. 2010) con poblaciones más grandes y continuas

(Andrade & Monjeau 2014). Esto sugiere que la conexión genética entre las poblaciones de *F. pallescens* podría disminuir hacia el este de su distribución en Patagonia Norte.

Bajo este escenario, se plantean las siguientes hipótesis con sus respectivas predicciones:

HIPÓTESIS 1:

La distribución de la variación genética entre las poblaciones de *Festuca pallescens* fue modelada por procesos demo-estocásticos pasados, y, más recientemente, por las condiciones ambientales que caracterizan el gradiente pluviométrico. Por ende, las poblaciones ubicadas en la periferia de la distribución de la especie en Patagonia Norte, aisladas y de menor tamaño, tendrán menor diversidad y mayor estructuración genética que el resto de las poblaciones.

PREDICCIÓN 1:

Las poblaciones de *Festuca pallescens* ubicadas en el extremo este del gradiente pluviométrico tendrán valores más bajos en los parámetros genético-poblacionales estimados a partir de la genotipificación con marcadores microsatélites y mayor diferenciación genética respecto a las poblaciones más grandes y continuas ubicadas hacia el oeste.

HIPÓTESIS 2:

La distancia geográfica entre poblaciones de *Festuca pallescens* junto con las barreras topográficas que caracterizan la región, mantienen un alto grado de diferenciación genética entre poblaciones a pesar del efecto homogeneizador del flujo génico extensivo que se espera de una especie anemófila.

PREDICCIÓN 2:

Se encontrará diferenciación genética significativa y aislamiento por distancia entre las poblaciones a lo largo del área de estudio.

2. OBJETIVO GENERAL:

Evaluar la variación genética neutral y su estructuración espacial entre poblaciones de *Festuca pallescens* distribuidas a lo largo del gradiente pluviométrico y cubriendo diferentes ambientes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Generar un set de marcadores nucleares microsatélites útiles para analizar la diversidad genética en *F. pallescens* a partir de la transferencia de marcadores desarrollados para otras especies del género.
- 2- Evaluar la diversidad genética entre y dentro de las poblaciones de *Festuca pallescens* a lo largo del gradiente pluviométrico de Patagonia Norte
- 3- Analizar la distribución espacial de la variación genética

3. METODOLOGIA

3.1. Complejidad del abordaje genético en especies poliploides

El empleo de marcadores moleculares selectivamente neutros provee información sobre la distribución de la variación genética y la existencia de flujo génico entre poblaciones, siendo los marcadores moleculares microsatélites (o SSRs *Simple Sequence Repeats*) los más utilizados en este tipo de estudios (e.g; Saha et al. 2004; Lauvergeat et al. 2005; Saha et al. 2006; Yong-Bi et al. 2006; Jensen et al. 2007; Gonzalo-Turpin & Hazard 2009; Elazreg et al. 2011; Kindiger et al. 2013). Estos marcadores son secuencias de ADN en tándem formadas por repeticiones de 1 a 6 pares de bases, por ejemplo mononucleótidos (T)_n, dinucleótidos (AT)_n, o trinucleótidos (AAG)_n (Litt & Luty 1989). Presentan dos tipos de mecanismos mutacionales: por deslizamiento (slippage) y por recombinación (Hancock 1999; Anmarkrud et al. 2008). Además, segregan de manera mendeliana, son co-dominantes, presentan un sólo locus genético facilitando la lectura de las bandas y las tasas de mutación se encuentran en un rango de 1×10^{-3} a 1×10^{-6} (Wiessenbach et al. 1992). En general, se señala que los microsatélites se encuentran en regiones no codificantes del genoma, por lo que pueden ser considerados como marcadores selectivamente neutros, excepto cuando se desarrollan sobre secuencias expresadas como es el caso de los EST-SSRs, que pueden o no estar bajo selección. En

síntesis, se han convertido en los marcadores de elección para estudios de genética de poblaciones (Cornuet et al. 1999).

Como se mencionó en el Capítulo 1, la poliploidía es una característica muy común en especies vegetales (Tate et al. 2005) y cumple un rol muy importante en su evolución. El abordaje de la genética de poblaciones con marcadores moleculares microsatélites en organismos poliploides suele presentar inconvenientes debido a la complejidad del análisis de los datos genéticos (Dufresne et al. 2014). Cabe destacar que otro de los marcadores moleculares con alto nivel de polimorfismo y cada vez más utilizados en los análisis genéticos de poliploides son los AFLPs (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados). Aunque poseen muchas ventajas, al tratarse de amplificaciones inespecíficas, suelen mostrar contaminación con ADN de otros organismos (e.g. hongos fitoparásitos), mientras que los SSRs presentan primers específicos y son fácilmente transferibles (Pfeiffer et al. 2011). Varios trabajos han comprobado que los SSRs permiten distinguir individuos distintos, siendo mas confiables y precisos que los AFLPs (Pfeiffer et al. 2011; Moscoe & Emshwiller 2015). Por lo tanto, los microsatélites son marcadores informativos, confiables y precisos cada vez más utilizados en el estudio de organismos poliploides (Catalán et al. 2004; Schuster et al. 2009; Siena et al. 2013, López-Vinyallonga et al. 2015; Balao et al. 2016; Welles & Ellstrand 2016).

La principal dificultad que presentan los microsatélites en organismos poliploides radica en la imposibilidad de estimar frecuencias alélicas con lo cual no pueden estimarse parámetros clásicos como heterocigosis, alelos nulos, etc (Dufresne et al. 2014; Pfeiffer et al. 2011). A modo de ejemplo, un genotipo tetraploide en el que se distinguen tres alelos en un locus microsatélite, puede tener tres genotipos posibles: AABC, ABBC o ABCC. Más aún, si hay un alelo nulo, esto es un alelo que no amplifica, el genotipo podría ser ABCX. El tamaño efectivo de la población en organismos poliploides es mayor que en los organismos diploides con lo cual se esperarían altos niveles de polimorfismo (Pfeiffer et al. 2011). Sin embargo, los organismos con niveles de ploidía altos presentan menos alelos en relación al máximo de alelos que pueden poseer (e.g. un dodecaploide podría presentar como máximo 12 alelos; Espinoza and Noor 2002; Huang et al. 2009). Esto puede deberse a la dificultad en el establecimiento del dosaje alélico.

Se han desarrollado métodos para estimar la configuración alélica y utilizar a los microsatélites como marcadores co-dominantes, como por ejemplo el método de la

relación de altura de los picos de microsatélites (MAC-PC; Esselink et al. 2004). Sin embargo, en la práctica este método sólo es certero cuando se usa en conjunto con análisis de segregación dentro de familias (Dufresne et al. 2014). Es por este motivo que, aunque se pierda información, se toman los perfiles de los SSRs como “alelos fenotípicos”, es decir como presencia/ausencia de alelos como en el caso de marcadores dominantes (Pfeiffer et al. 2011). En esta tesis se emplearon microsatélites desarrollados para otras especies de *Festuca* y se analizaron como marcadores dominantes, excepto en el caso del análisis de estructura (ver sección 3.5.3).

3.2. Muestreo y colección del material vegetal:

A lo largo del gradiente pluviométrico, se recolectó material en cinco sitios (mencionados y descritos en el Capítulo 1), a distintas altitudes dentro de cada sitio con una diferencia aproximada de 200 m s.n.m. entre sí. El muestreo se realizó durante los meses de diciembre de 2013, enero de 2014 y enero de 2015. Se trabajó con un total de 14 poblaciones (ver Tabla 1.1, Capítulo 1), tomando muestras de hojas de 30-34 individuos en cada población. Se considera que un individuo de *Festuca pallescens* es una mata y se colectaron hojas de estos individuos con una distancia de, al menos, 25 metros entre ellos con el fin de evitar recolectar individuos estrechamente emparentados. Las plantas fueron identificadas en el campo utilizando caracteres exomorfológicos descritos para esta especie (incluidas hojas de color glauco, vainas con callo pulvinus y lemas con arista, e.g. Nicora 1978). Las hojas fueron guardadas en bolsas de papel en el campo y luego almacenadas en freezer a -20°C hasta su procesamiento para los análisis genéticos.

3.3. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó a partir de hojas de al menos 30 individuos por población siguiendo el protocolo descrito por Doyle & Doyle (1990), con modificaciones sugeridas por Dumolin et al. 1995 (ver protocolo en el Anexo). La calidad y cantidad de ADN se chequeó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. Los geles fueron visualizados por tinción con Syber Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y exposición en trans-iluminador de luz azul.

3.4. Transferencia de marcadores moleculares microsatélites

Dado que no se han reportado microsatélites específicos para *Festuca pallescens* hasta el momento, se evaluó la transferencia de marcadores desarrollados en otras especies de la familia. Existen en la bibliografía marcadores microsatélites para el género tanto del tipo SSR (de la sigla en inglés Simple Sequence Repeats) como EST-SSR (del inglés Expressed Sequence Tags-Simple Sequence Repeats). Mientras los SSRs provienen de ADN genómico, generalmente de regiones no-codificantes, los EST-SSRs se desarrollan a partir de secuencias expresadas (transcriptomas), es decir que se encuentran insertos en genes y se los denomina SSRs génicos. Ambos tipos de marcadores son útiles para estudios de genética poblacional (Varshney et al. 2005). Al momento de iniciar este trabajo se contaba con microsatélites desarrollados para *Lolium perenne* (Jones et al. 2001; Elazreg et al. 2011), *Poa arachnifera* Torr (Kindiger et al. 2011), el complejo *Lolium multiflorum* cv. Lipo x *F. glaucescens*, (Lauvergeat et al. 2005) y *Festuca* spp (ej. en *F. ovina*, *F. arundinacea*, *F. pratensis*, *F. rubra* ssps., *Festuca altaica*, *Festuca hallii*, *Festuca campestris* (Jensen et al. 2007; Young-Bi et al. 2006; Saha et al. 2004).

Se evaluaron 20 microsatélites del tipo SSRs e EST-SSRs. La amplificación por PCR (del inglés Polymerase Chain Reaction) se optimizó para cada marcador utilizando un gradiente de temperaturas y distintas condiciones de reacción combinando las descritas por Lauvergeat et al. (2005) y Bach-Jensen et al. (2007). En la tabla S2.1 del Anexo se detallan las condiciones de reacción para cada uno de los loci. La amplificación se realizó en termociclador (MJ Research o BioRad) y se verificó a través de geles de agarosa al 2,5%. Los geles fueron visualizados por tinción con Syber Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y exposición en trans-iluminador de luz azul. Se logró amplificación positiva y con banda única en 9 loci microsatélites (ver sección resultados, Figura 2.1 a, Tabla 2.1).

Las reacciones de amplificación de los nueve SSRs seleccionados (ver sección resultados) fueron llevadas a cabo mediante el armado de una Multiplex (reacción de amplificación por PCR de más de un SSR en simultáneo). En primera instancia, se realizó Multiplex amplificando en conjunto tres (HVM4, B1B6 y M4-213; Multiplex 1) y cuatro (B1-C9, CML127, KSUM157, FA44D09RT074; Multiplex 2) loci de microsatélites (los cuales no presentaron inconvenientes al amplificarse simultáneamente) en un volumen total de 15 µl conteniendo 5 ng de ADN molde, 0,05 unidades de Go-Taq DNA

polimerasa (Promega, Madison, WI, USA) y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de buffer GoTaq® reaction buffer (Promega), 0,3 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ y *primers* o iniciadores marcados con fluorescencia: 0,1 µM (HVM4, B1B6, M4-213 y B1C9), 0,08 µM (CML127, KSUM157) y 0,06 µM (FA44D09RT074). El resto de los microsatélites presentaron inconvenientes en la amplificación en conjunto, por lo que FA60A06LF037 y Poa402 se amplificaron por separado. Las condiciones de amplificación para estos SSRs fueron: 4 ng de ADN molde, 0,45 unidades de Go-Taq DNA polimerasa (Promega, Madison, WI, USA) y las siguientes concentraciones finales de reactivos: 1X de buffer GoTaq® reaction buffer (Promega), 0,2 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂ y 0,12 µM (Poa402) o 0,1 µM (FA60A06LF037) de *primers* marcados con fluorescencia en un volumen total de 10 µl.

Las condiciones para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para los Multiplex 1 y 2 fueron las siguientes: un período de desnaturalización inicial de 3 minutos a 94° C, seguido de 10 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 30 segundos de anclaje a 65° C disminuyendo 1° C por ciclo y 30 segundos de extensión a 72° C. Luego, se realizaron 30 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94° C, 30 segundos de anclaje a 55° C y 30 segundos de extensión a 72° C. Finalmente un período de 15 minutos de extensión final a 72° C. Para FA60A06LF037 y Poa402, las condiciones fueron las siguientes: un período de desnaturalización inicial de 5 minutos a 94° C, seguido de 20 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94° C, 60 segundos de anclaje a 62° C y 30 segundos de extensión a 72° C. Luego, se realizaron 10 ciclos de 45 segundos de desnaturalización a 94° C, 45 segundos de anclaje a 55° C y 30 segundos de extensión a 72° C. Finalmente un período de 7 minutos de extensión final a 72° C. El éxito de la amplificación se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 2,5% (Figura 2.1b). Los geles fueron visualizados por tinción con Syber Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y exposición en trans-iluminador de luz azul.

La genotipificación se realizó en secuenciador capilar (ABI 3700, Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA, Hurlingham, Argentina). Los *primers* de microsatélites habían sido marcados con fluoróforos diferentes (HEX-FAM-NED) de modo de formar tres grupos para análisis en el secuenciador. La lectura de los electroferogramas se realizó con el programa GeneMarker V2.6.3 (versión Demo), y los alelos se determinaron mediante la identificación de picos siguiendo la metodología de Pfeiffer et al. (2011). La determinación de alelos en organismos poliploides es difícil

debido a que no se puede establecer el dosaje alélico asociado a un pico observado en el electroferograma (Pfeiffer et al. 2011). *Festuca pallescens* es un organismo hexaploide por lo tanto la asignación de los alelos se basó en la identificación confiable de picos en el electroferograma. Los picos se asociaban a un alelo de un microsatélite determinado sólo si la intensidad de la fluorescencia del pico era superior a 400 UFR (Unidades de Fluorescencia Relativa) nm, con ausencia de “stuttering” o “tartamudeo de la polimerasa” (varios picos escalonados previos al pico principal).

3.5. Análisis estadísticos de los datos genéticos de microsatélites:

Como se mencionó antes, la complejidad de la naturaleza de los datos genéticos en organismos poliploides limita los cálculos de parámetros clásicos utilizados en genética de poblaciones (e.g. determinación de alelos nulos, estimación de frecuencias alélicas, desequilibrio de ligamiento, estructura Hardy-Weinberg, etc) (Dufresne et al. 2014). Una de las alternativas a este problema es tratar a los SSRs como marcadores dominantes y trabajarlos como una base de datos binaria (presencia/ausencia de alelos). De este modo, cada individuo está representado por un vector binario cuyo largo es el número total de alelos detectado en todos los individuos. Aunque parte de la información genética se pierde, este método es robusto y muy utilizado en el análisis de especies poliploides (e.g. Rouger & Jump, 2014; Sampson & Byrne, 2012). Se utilizó el programa GenAlEx v. 6.5 (Peakall & Smouse, 2012) para el cálculo de los siguientes parámetros:

3.5.1. *Diversidad genética:*

La diversidad genética en cada población se estimó con el porcentaje de loci polimórficos (P), el número de alelos por locus (A), el número de alelos con frecuencia mayor al 5% ($A_{5\%}$), el número de alelos exclusivos (A_E) y la diversidad genética no sesgada de Nei (Nei 1987) (uh) que es equivalente al índice de Simpson (Simpson, 1949) y se calcula como

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

donde p = frecuencia de la banda presente

3.5.2. Diferenciación entre poblaciones:

La distancia genética entre poblaciones se evaluó con la distancia de Nei en GenAlex 6.5 y también con el método de Bruvo en el paquete Polysat en R (R Development Core Team 2013). La distancia de Bruvo (Bruvo et al. 2004) es una de las recomendadas para organismos poliploides (Dufresne et al. 2014) y es similar a los índices de distribución de bandas utilizados con los datos dominantes, pero teniendo en cuenta la distancia mutacional entre alelos (Clark y Jasieniuk 2011). La ventaja de esta medida es que es independiente del nivel de ploidía y el dosaje alélico. Utilizando la distancia estimada de Bruvo, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con el paquete polysat (Clark y Jasieniuk, 2011) en R (R Core Team, 2013).

3.5.3. Estructuración genética:

La partición de la variación genética entre y dentro de poblaciones se calculó mediante un AMOVA (Análisis Molecular de la Variancia) utilizando el índice de fijación Φ_{PT} recomendado para organismos poliploides, en el programa GenAlex 6.5. La elección del parámetro Φ_{PT} se basa, en primer lugar, en la dificultad de determinar el dosaje alélico que impide establecer con certeza la heterocigocidad; tanto el F_{ST} como el G_{ST} son índices que dependen en gran parte de esta medida (Meirnmans & Hedrick 2011; Whitlock 2011). Además, en organismos poliploides generalmente se desconoce el modo de herencia de los genes (e.g. herencia disómica vs herencia polisómica), con lo cual el uso de índices como el D de Jost's resulta en una difícil interpretación (Meirnmans & Van Tienderen 2013; Dufresne et al. 2014). Un índice recomendado para el uso de SSRs en poliploides es el Rho por ser poco sensible al nivel de ploidía y adecuado al tipo de mutación de gran parte de los microsatelites (modelo de mutación por pasos). Sin embargo, si alguno de los SSRs presenta un modelo mutacional distinto, el índice se ve notoriamente afectado (Meirnmans & Hedrick 2011). Peakall & Smouse (2012) en el programa GenAlex recomiendan la utilización del parámetro Φ_{PT} para el caso de marcadores haploides o binarios, basados en Maguire et al. (2002). El nivel de significancia se evaluó a partir de 999 permutaciones.

Por otro lado, se realizó un análisis de agrupamientos genéticos empleando estadística bayesiana en el programa STRUCTURE v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000) con el fin de asignar individuos a distintos grupos o *clusters*. El programa utiliza cadenas aleatorias de Markov con un procedimiento de Monte Carlo (MCMC) para estimar la

probabilidad de que los datos concuerden con la hipótesis de K agrupamientos permitiendo realizar inferencias sobre la escala geográfica de la subdivisión poblacional y la identificación de las poblaciones que presentan mayor grado de aislamiento vs. mayor grado de conectividad. El análisis en STRUCTURE se realizó utilizando a los SSRs de dos formas distintas: como marcadores co-dominantes siguiendo las recomendaciones de los autores para organismos poliploides y como una matriz de datos binarios. Para el caso de marcadores co-dominantes el análisis se hizo usando el modelo de ALELOS RECESIVOS (ver Pritchard et al. 2000). Los loci ambiguos (es decir, cuando hay incertidumbre sobre el número de copias de cada alelo) se codificaron repitiendo un alelo como se describe por Pritchard et al. (2000). Las iteraciones se realizaron utilizando el modelo de admixia con frecuencias de alelos correlacionadas, ya que es más conservado y proporciona mayor poder para detectar poblaciones que están estrechamente relacionadas (Porrás-Hurtado et al. 2013). Se realizaron 10 repeticiones para cada K, variando el rango de K desde 1 a 14, utilizando una longitud de período *burn-in* de 100.000 iteraciones y luego 300.000 iteraciones adicionales de cadenas aleatorias de Markov con un procedimiento de Monte Carlo (MCMC). El número óptimo de grupos se determinó a través del método de Evano et al. (2005) mediante la estimación del estadístico ΔK en la plataforma en línea STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt 2012). Este estadístico está basado en la tasa de cambio de segundo orden del logaritmo de las probabilidades entre valores sucesivos de K. Luego, utilizamos Clumpak (Kopelman et al. 2015) para combinar los archivos de las 10 repeticiones del K óptimo y preparar la representación gráfica.

Dado que STRUCTURE (Pritchard et al. 2000) asume que las poblaciones están en equilibrio Hardy-Weinberg y que existe desequilibrio de ligamiento entre los loci de una población (Pritchard et al. 2000), supuestos que no siempre se cumplen con datos poliploides, se analizó también otra aproximación para confirmar los resultados. Esta aproximación es un agrupamiento no jerárquico de k-medias (en inglés *non-hierarchical K-means clustering*; KMNS), implementado por Arrigo et al. (2010). Este método asigna individuos a un grupo genético (k) definido *a priori* para maximizar la varianza intergrupo (medida como la inercia, Legendre & Legendre 1998). El análisis se realizó utilizando el paquete stats de R (Development Core Team 2013), basado en el *script* de Arrigo et al. (2010). Se realizaron 100.000 corridas independientes para cada valor de K (K varió de 1 a 7). Se computó $I(K)$ y $sd(K)$, la media y la desviación estándar de la inercia inter-grupo para cada valor de K, $I_1(K)$ e $I_2(K)$ (la derivada primera y segunda de $I(K)$). Luego se

computó el ΔK como $L2(K)$ dividido por $sd(K)$ y se usó como criterio de selección el número más probable de grupos para los análisis de agrupamiento.

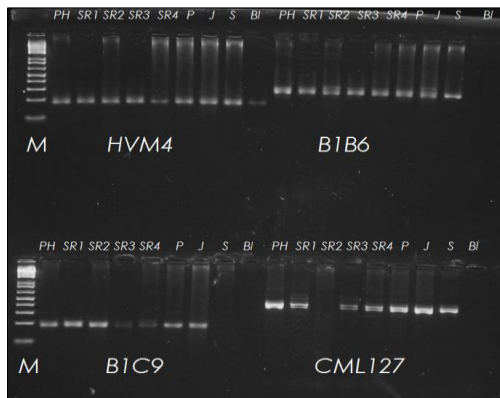
Por último, los niveles de flujo génico se estimaron en forma indirecta a través de la estimación de la diferenciación (Φ_{PT}) entre pares de poblaciones utilizando el programa GenAlex 6.5 y su significancia realizando 999 permutaciones. Se estimó el aislamiento por distancia a través de un test de Mantel correlacionando la matriz del logaritmo natural de las distancias geográficas con la matriz de distancias genéticas (tanto la matriz de los coeficientes de diferenciación como la matriz de las distancias de Bruvo). La significancia del test se evaluó con 999 permutaciones en GenALEx v 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). Asimismo, se realizó una correlación entre la diversidad genética, expresada como el número total de alelos (A) y la diversidad genética insesgada de Nei (u_h), y la longitud geográfica utilizando el programa GraphPad Prism version 5.00 for Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

4. RESULTADOS

4.1. Transferencia de marcadores microsatélites

De los 20 marcadores evaluados nueve amplificaron en forma positiva y con un tamaño de banda dentro del tamaño esperado según la bibliografía (cinco SSRs y 4 EST-SSRs). Siete marcadores no dieron ningún producto de amplificación mientras que cuatro resultaron en un patrón de bandas múltiples (Figura 2.1; Tabla 2.1). Uno de los nueve SSRs seleccionados resultó monomórfico (Poa402), mientras que el resto presentó niveles de polimorfismo entre 22,6 y 48,4% dependiendo de la población con un número de alelos que varió entre 5 y 42 (López et al. 2014).

a)



b)

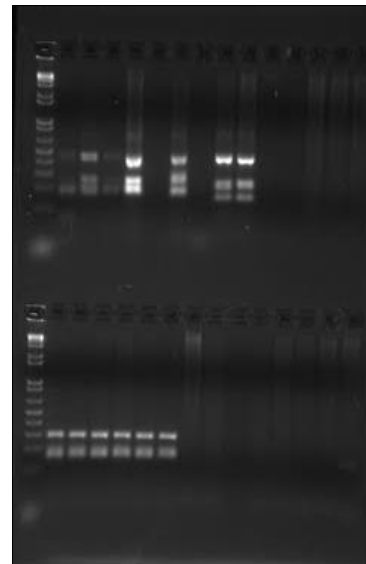


Figura 2.1: a) Transferencia de microsatélites a *F. pallescens*. Amplificación de cuatro microsatélites en gel de agarosa 2,5%. M: marcador de peso molecular (1 Kb plus ladder, Invitrogen). Las calles representan individuos de distintas poblaciones. b) Corrida electroforética de los microsatélites transferidos a *F. pallescens* amplificados en multiplex. Las calles superiores del gel corresponden al multiplex 1 y las calles inferiores al multiplex 2. Cada banda corresponde a un locus microsatélite. Los marcadores del peso molecular se sembraron en las primeras calles.

Tabla 2.1: Microsatélites transferidos desde otras especies del género *Festuca*, *Poa arachnifera* Torr y *Lolium perenne* a *Festuca pallescens*. Para cada marcador se muestra la secuencia de los primers (F y R), el motivo de repetición, el resultado de la amplificación (+: positivo, -: negativo, M: patrón de bandas múltiples), el número de alelos encontrados (A), el tamaño del fragmento, la temperatura de anclaje de los primers (Ta) y la referencia bibliográfica.

Primer	Secuencia	Motivo	Amp	A	Tamaño	Ta	Ref
SSRs							
HVM4	F:AGAGCAACTACCAGTCCAATGGCA R:GTCGAAGGAGAAGCGGCCCTGGTA	(AT) ₉	+	5	170-185	55	7
B1-B6	F: GGAGCTGCATCTTTCTTGCT R:GCAAACCCAGACACCCATTA	TG ₃ CG ₃ TGC GTG ₃	+	42	270-376	55-65	4
B1C9	F:GAGCCGATGCACAGGTTACT R: AAAGGAAGCCGGCTAATCAC	CT ₈	+	30	180-242	58	
M4-213	F:CACCTCCCGCTGCATGGCATGT R:TACAACGACATGTCAAGG	(GT) ₈ AGGT	+	8	146-160	51-55	2
Poa402	F:CTCACCCAAAGAAGCACAAG R:TGCTGGTGCTGACATTACTA	GCC ₅	+	1	160	51	3
LPSSRH01A02	F:AAAGACCGCAGACGAAGT R:AACCAAAGCCGCAAGACA	(CA) ₂₇	M	-	-	-	2
H01A07	F: TGGAGGGCTCGTGGAGAAGT R:CGGTTCCCACGCCTTGC	GT ₉ imp	M	-	-	-	1
B1-B3	F: AGGTGTCCTGTTGCTTTGGA R: TTTACCCCCAGGGATCAAAT	(TG) ₆	-	-	-	-	4
LM26	F:AAGAAAATGCAATGTCTAAACAGATTAGTT R:CGCCTCATGAACACTTTATATATTCTAGAA	GT ₅ GCGT ₅	-	-	-	-	2
H02C11	F:TGGAATAACGATGAAAAG R:CATCACGAATTAACAAGAG	CA ₄ IMP	-	-	-	-	1
K01A03	F:GGACGAACTGCCGAGACA R:CGGGCATGGTGAGAAGAA	CCT ₇	-	-	-	-	
Poa418	F:CAAGGTTGGTGAGACCCATT R:CCTGGACCCTGGCTGTTTAT	CCA ₅	-	-	-	-	3
TFGA_SSR12_H08	F:GGATGTTCTCACTCGGAATGTA R:ATGTTTGGACGAGTTCATGTTG		-	-	-	-	5
TFGA_SSR07_B09	F:CAATACTGTTGCTCTCCCCATT R:TTGCCTCGTAGGTAACATTCAA		-	-	-	-	

EST-SSRs						
CNL127	F:CACAAGTTCGAGTACTCCATC R:AAGTGGCGAGCTTTCTGAC	(CCT) ₆	+	13	395-482	55
KSUM157	F:CGAGGCGATCATGAGAAGGAG R:AAACGACCAAATCAACCAGC	(ACC) ₅	+	11	130-180	55
FA60A06LF037	F:GTTTTGCTCCCTCCTGTCC R:AGGGTCCTTCTGCAAGTCCT	CGC ₇	+	11	215-540	62
FA44D09RT074	F:CTCTGCCCTTCCTTCCTCTT R:GGTCTCCCTCTGCTCGTAGTC	CCA ₆	+	8	213-256	62
CWM311	F:CCGTCTCGCTCGCTCCCGCCTCTC R:GCCACCCGCCCGATCTCCACGAAC	(CCG) ₈	M	-	-	-
CWM361	F:CATAATCTGGGTGGAGGTGG R:GATGTAGAGCACGGAGGAGG	(GGC) ₆	M	-	-	-

Referencias: [1]. Elazreg H., Ghariani S. Chtourou-Ghorbel N.Chakroun M. & Trifi-Farah N. 2011.Biochem. Syst. Ecol. 39: 79-87.[2]. Jensen LB, Holm PB, Lübberstedt T (2007) Mol. Ecol. Not. 7: 1155-1161[3]. Kindiger, B., Conley, T. and Cai, H. (2013), Grass Sci. 59: 160–165.[4]. Lauvergeat P, Barre P, Bonnet M & Ghesquière M. 2005. Mol. Ecol. 5:401-405.[5]. Saha M.C., Rouf Mian M.A., Eujayli, Zwonitzer J.C., Wang L. & May G.D. 2004. Theor Appl Genet 109: 783–791.[6]. Saha M.C., Cooper J.D., Rouf Mian M.A., Chekhovskiy K. & May G.D. 2006. Theor Appl Genet 113:1449–1458[7]. Yong-Bi F., Quiu J., Peterson G.W., Willms W.D. & Wilmshurst J.F. 2006. Mol. Ecol. Not. 6, 894–896

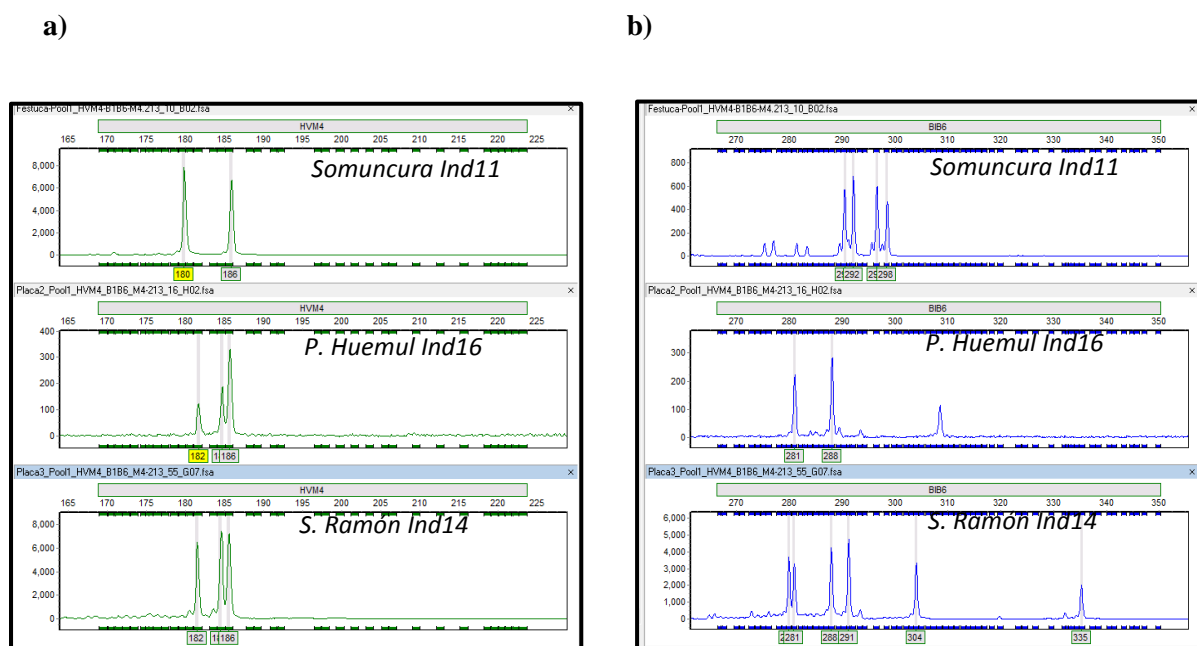


Figura 2.2: Ejemplo de los genotipos obtenidos y analizados con GenMarker V2.6.3 para dos microsatélites: HVM4, marcado con el fluoróforo HEX (verde) y B1B6 marcado con el fluoróforo FAM (azul). En algunos casos se pueden ver 6 picos (posibles alelos) ya que la especie es alohexaploide.

4.2. Diversidad y diferenciación genética:

Al nivel de especie se encontró un total de 128 alelos, con un promedio de alelos por población de $51,7 \pm 7,02$. La diversidad genética insesgada de Nei varió entre 0,063 y 0,085. En general, la diversidad genética fue menor en las poblaciones de los extremos del gradiente (Península Huemul (PHA y PHB) y la Meseta de Somuncura, (sólo poblaciones SA-1 y SB) ya que presentan menor porcentaje de loci polimórficos, menor número de alelos (tanto totales como con frecuencias superiores al 5%) y valores bajos de diversidad genética de Nei (excepto SB) (Tabla 2.2). Por ejemplo, la mayoría de las poblaciones presenta más de 50 alelos, mientras que SA-1, una de las poblaciones más extremas, registró el número más bajo (35 alelos). Por otra parte, un dato interesante es la ausencia de alelos exclusivos en las poblaciones de los dos extremos (PHA y SB), mientras que las poblaciones con mayor número de alelos exclusivos son dos de las poblaciones de San Ramón (SRA_1 y SRB). Otro resultado relevante es la diferencia en la frecuencia de algunos alelos en las poblaciones SA-1 y SB. Si bien SB no posee alelos exclusivos como SA-1, ambas se diferencian notoriamente del resto en la frecuencia de

algunos alelos de los loci B1C9 (SSR), KSUM157, CML127, Fo37 y Fo74 (EST-SSRs) (Tabla S2.3). La población con mayor polimorfismo fue Pilcaniyeu Bajo (PB), en el centro de la distribución (Tabla 2.2).

En concordancia con estos resultados, el análisis de coordenadas principales (PCoA) muestra que las poblaciones de la Meseta de Somuncura (SA-1 y SB) quedan muy separadas del resto de las poblaciones de la especie, y también separadas entre sí. Por otro lado, queda aislada la población de Península Huemul (PHB). El resto de las poblaciones conforma un grupo muy cercano (Figura 2.3).

Tabla 2.2: Variación genética de las poblaciones de *Festuca pallescens*. *P*: porcentaje de loci polimórficos, *A*: Número de alelos por locus; *A*_{5%}: número de alelos con frecuencia mayor al 5%; *A*_E: número de alelos exclusivos; *uh*: diversidad genética insesgada de Nei y su desvío estándar (ds). Las poblaciones están ordenadas de oeste a este.

Población	<i>P</i> (%)	<i>A</i>	<i>A</i> _{5%}	<i>A</i> _E	<i>Uh</i>	ds
PHA	35,2	47	32	0	0,071	0,011
PHB	32,8	43	29	3	0,067	0,011
SRA-1	42,2	57	38	4	0,072	0,010
SRA-2	39,1	52	34	1	0,079	0,012
SRA-3	42,2	57	40	2	0,085	0,012
SRB	43,0	55	35	4	0,080	0,012
PA	36,7	51	33	0	0,063	0,010
PB	48,4	63	35	2	0,078	0,011
JA	42,2	55	38	1	0,081	0,012
JB	38,3	54	37	1	0,065	0,011
JM	39,1	53	39	0	0,071	0,011
SA-1	22,7	35	33	1	0,068	0,013
SA-2	42,2	56	34	3	0,075	0,011
SB	35,2	46	35	0	0,080	0,013

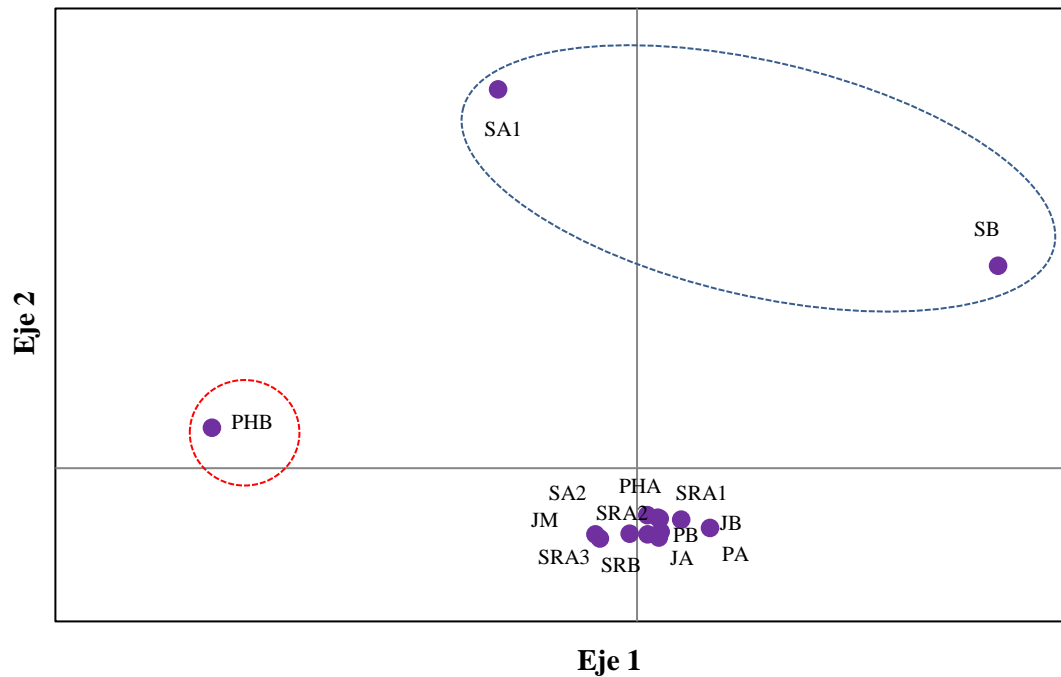


Figura 2.3: Análisis de Coordenadas principales (PCoA) a partir de las distancias genéticas de Bruvo para las 14 poblaciones de *Festuca pallescens*. Las poblaciones de la Meseta de Somuncura y Península Huemul, están circuladas con línea de puntos azules y rojos, respectivamente.

4.3. Estructuración genética:

El análisis de la variancia molecular (AMOVA) muestra que la mayor parte de la variación (Φ_{PT} , porcentaje de diferenciación entre las poblaciones) se encuentra dentro de las poblaciones 69%, pero que el porcentaje de diferenciación entre poblaciones es alto y significativo (31%; $p < 0.001$, Tabla 2.3). Analizando los Φ_{PT} entre pares de poblaciones se observa que los valores son muy altos (0,367-0,655) y significativos ($p < 0.05$) entre PHB, SA-1, SB y el resto de las poblaciones y la población con los valores de Φ_{PT} más altos con respecto al resto es SA-1. Sin embargo, para el resto de las poblaciones los Φ_{PT} de a pares son más bajos, variando entre 0,006 y 0,12, lo cual indicaría que el flujo génico entre estas poblaciones podría ser alto (Tabla 2.4). Análisis de la varianza (AMOVA) de cada locus de manera individual evidenciaron que algunos de los marcadores diferencian marcadamente a las poblaciones SA-1 y SB del resto (5 loci: B1C9 (SSR), KSUM157, CML127, Fo74 y Fo37 (EST-SSRs)). Por otro lado, otros marcadores muestran que existe similitud entre PHB y SA-1 (M4-213, HVM4 y B1B6 (SSRs)).

Tabla 2.3: Análisis de varianza molecular (AMOVA) para las poblaciones analizadas de *F. pallescens*.

Fuente de variación	gl	Suma de cuadrados (SSD)	Estimación de componentes de la varianza (CV)	Porcentaje de variación (PV)	Significancia de la probabilidad (PS)
Entre poblaciones	13	841,03	2,1	31	<0.001
Dentro de poblaciones	383	1807,6	4,7	69	
Total	396	2648,6	6,8		

Tabla 2.4: Índices de diferenciación (Φ_{PT}) de a pares para las 14 poblaciones de *Festuca pallescens* (diagonal inferior) y significancia del Φ_{PT} (diagonal superior). Los valores no significativos se resaltan en negrita.

	JA	JB	JM	PA	PB	PHA	PHB	SA-2	SA-1	SB	SRA-1	SRA-2	SRB	SRA-3
JA		0,011	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,002	0,001	0,001	0,001
JB	0,026		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
JM	0,057	0,065		0,030	0,008	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,064	0,212	0,001
PA	0,042	0,048	0,018		0,079	0,002	0,001	0,001	0,001	0,001	0,142	0,232	0,058	0,001
PB	0,064	0,066	0,025	0,012		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,020	0,074	0,003	0,001
PHA	0,070	0,120	0,054	0,037	0,048		0,001	0,001	0,001	0,001	0,056	0,168	0,024	0,001
PHB	0,420	0,482	0,408	0,450	0,418	0,419		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
SA-2	0,036	0,035	0,063	0,040	0,045	0,050	0,436		0,001	0,001	0,001	0,038	0,003	0,001
SA-1	0,603	0,655	0,628	0,645	0,621	0,614	0,518	0,626		0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
SB	0,441	0,491	0,473	0,485	0,461	0,457	0,614	0,469	0,430		0,001	0,001	0,001	0,001
SRA-1	0,043	0,066	0,031	0,008	0,020	0,014	0,424	0,045	0,622	0,463		0,384	0,123	0,001
SRA-2	0,038	0,049	0,016	0,006	0,013	0,010	0,372	0,018	0,592	0,447	0,001		0,453	0,004
SRB	0,056	0,063	0,006	0,015	0,029	0,024	0,395	0,038	0,611	0,454	0,010	0,000		0,025
SRA-3	0,060	0,095	0,046	0,063	0,072	0,061	0,367	0,064	0,593	0,452	0,042	0,031	0,021	

Los análisis realizados con el programa STRUCTURE utilizando los datos como binarios o como co-dominantes mostraron los mismos agrupamientos. La única diferencia encontrada entre tratamientos es la proporción de individuos que se asignan a cada *cluster*. Por lo tanto, se muestran aquí los resultados de la base binaria y en el anexo aquellos obtenidos con la base de datos co-dominantes (Figura S2.4). El mayor valor de verosimilitud se obtuvo para $K=2$ (Figura 2.4a). La utilización del método de Evanno et al. (2005) permitió confirmar el valor óptimo de K en 2 (Figura 2.4b), indicando la existencia de dos agrupamientos genéticos en la zona de muestreo (ambas figuras están basadas en el set de datos binarios, los mismos gráficos para el set con los SSRs tratados como co-dominantes se detallan en la Figura S2.1 en el Anexo).

Si bien el método de Evanno et al. (2005) es muy contundente en la designación del K óptimo ($k=2$), tanto los resultados del PCoA como los valores de Φ_{PT} pareados sugieren que en realidad podrían ser tres los agrupamientos genéticos ya que las diferencias entre PHB, SA-1 y SB y el resto de las poblaciones son muy fuertes. Por esta razón, se presentan las asignaciones individuales (Q) en cada población para $k = 2$ y $k = 3$ (Figura 2.5a y 2.5b, respectivamente).

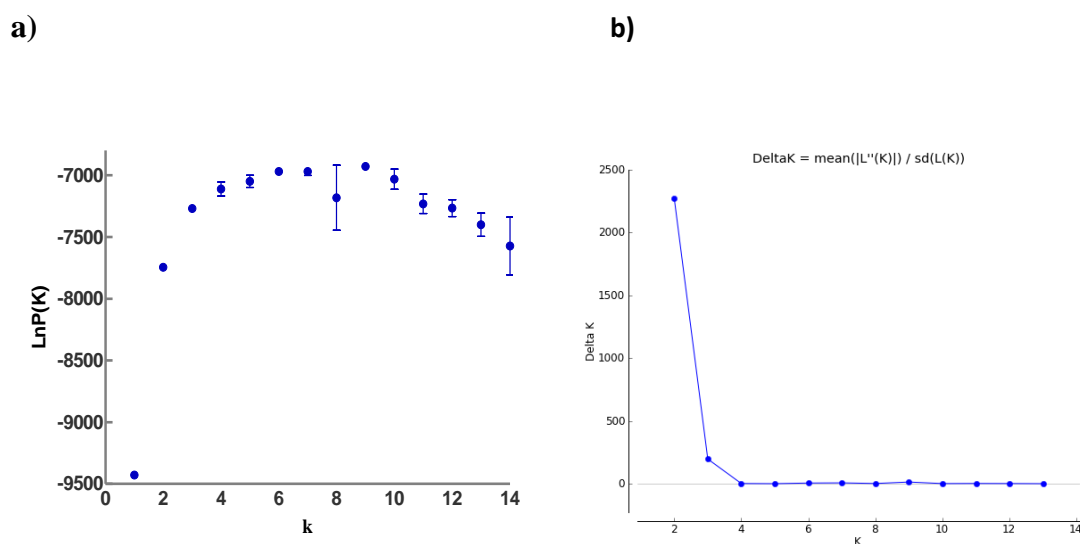
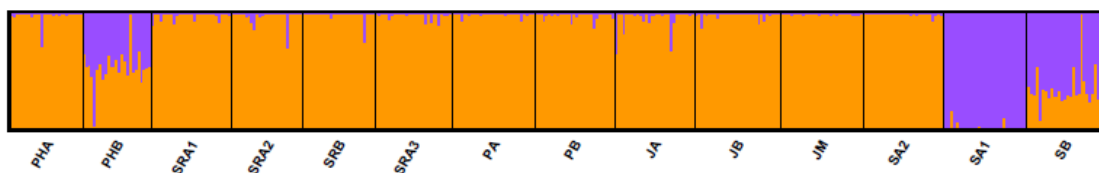


Figura 2.4: Determinación del número óptimo de grupos genéticos. a) Relación entre la verosimilitud del modelo $\ln(p)$ y el número de agrupamientos genéticos (K) obtenidos a partir del análisis con el programa STRUCTURE. En la figura se reúnen 10 corridas diferentes para cada valor de K . Los círculos azules muestran los valores medios de verosimilitud para cada valor de K y las barras indican los desvíos estándar. b) Estimación del número de agrupamientos mediante el método de Evanno et al. (2005) a partir del cálculo del estadístico ΔK (ver materiales y métodos).

El agrupamiento obtenido cuando el valor de k óptimo es 2, muestra que uno de los grupos o *clusters* genéticos es común en la mayor parte de las poblaciones y el otro se encuentra representado mayoritariamente en dos de las poblaciones de la Meseta de Somuncura (SA-1 y SB), en tanto que ambos *clusters* se encuentran representados en una población de Península Huemul (PHB), coincidiendo con la separación que se produjo en el análisis de Coordenadas Principales (PCoA) y en los coeficientes de diferenciación (ϕ_{PT}) pareados. La asignación del cluster 1 (naranja) en la mayoría de las poblaciones de la especie fue $Q=0.9$, con excepción de PHB con valor de $Q=0.6$ y para SA-1 y SB con valor de $Q=0.1$ (Figura 2.5a). Por otro lado, si se considera el valor de k 3, la población PHB presenta una asignación media de $Q=0.9$ para el tercer grupo genético, las poblaciones de la Meseta de Somuncura presentan una asignación media de $Q=0.9$ para el grupo genético 2 y el resto de las poblaciones presentan una asignación media al primer grupo genético que varía de 0,7 a 0,9 (Figura 2.5b).

a)



b)

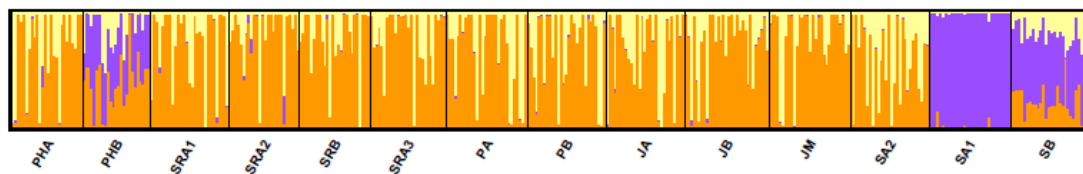


Figura 2.5: Asignación de grupos genéticos a las poblaciones de *Festuca pallescens*. Resultados obtenidos con el STRUCTURE editados con CLUMPAK para **a)** $k = 2$ y **b)** $k = 3$. Cada barra vertical corresponde a un individuo.

Para evaluar la existencia de agrupamientos genéticos con otra metodología que ha sido también recomendada para individuos poliploides, y de este modo comparar con los resultados del STRUCTURE, se utilizó el agrupamiento no jerárquico de k - medias

implementado por Arrigo et al. (2010). Coincidentemente con el STRUCTURE, el cálculo del K óptimo indicó que el número de grupos genéticos es 2 (Figura S2.3). Si bien este método no permite la asignación de individuos o poblaciones a los grupos genéticos, refuerza los resultados obtenidos con el STRUCTURE al haber encontrado el mismo número óptimo de *clusters*.

Por último, el test de Mantel indicó que existe aislamiento por distancia entre las poblaciones, con un valor bajo, pero significativo ($R^2 = 0,202$ $p = 0.009$). Sin embargo, no se observó una relación entre la diversidad genética y la longitud ya que el número de alelos (A) ($r^2 = 0,11$; $p = 0,2$), los alelos exclusivos (A_E) ($r^2 = 0,06$, $p = 0,4$) y la diversidad genética (uh) ($r^2 = 0,00003$; $p = 0,9$) no presentaron valores de correlación significativos con la longitud, con lo cual no habría un patrón definido de disminución de la variación genética a lo largo del gradiente; es decir que no se observa variación genética clinal.

5. DISCUSIÓN

Los análisis de diversidad genética con marcadores microsatélites presentados en este capítulo constituyen los primeros estudios de este tipo en poblaciones de la especie *Festuca pallescens*. Se logró la transferencia de nueve marcadores SSRs y la aplicación de un set de ocho de esos marcadores que permitieron establecer niveles de diversidad genética en las poblaciones bajo estudio, así como reconocer grupos de poblaciones genéticamente similares.

La diversidad genética en los organismos aloploidoides se debe tanto al incremento de eventos recombinantes durante la meiosis (Lopez-Viyallonga et al. 2016) como al grado de flujo génico existente entre los genomas que les dieron origen (Welles & Ellstrand 2016). Las tendencias encontradas en la distribución de la diversidad genética de las poblaciones de *Festuca pallescens* sugieren que la hipótesis 1 planteada en este capítulo se verificaría ya que se encontró una disminución de la diversidad hacia las poblaciones del este en la Meseta de Somuncura. La predicción asociada a esta hipótesis, se cumple parcialmente ya que dos de las tres poblaciones de la Meseta de Somuncura presentaron valores de A , A_E y Uh más bajos que el resto de las poblaciones, mientras que la tercer población (SA-2) y JA, JB y JM

presentaron valores similares a las poblaciones del centro de la distribución. En general, las poblaciones presentan menor tamaño y se encuentran más fragmentadas hacia los límites de su distribución (Bridle & Vines 2007), debido a variaciones locales en la topografía, el suelo, el microclima y la hidrología (Jump et al. 2009). Este patrón no se estaría cumpliendo en SA-2, JA, JB y JM, aunque sí se observa esta tendencia en PHA y PHB donde los valores de diversidad genética fueron bajos. Por lo tanto, estos resultados estarían indicando que algunas poblaciones de la periferia (PHA, PHB, SA-1 y SB) son menos diversas y posiblemente más pequeñas y menos conectadas entre sí que las del centro, con lo cual la deriva genética tendría un fuerte efecto. Contrariamente, las poblaciones SA-2, JA, JB y JM podrían estar más conectadas entre sí, con lo cual el flujo génico contrarrestaría el efecto de la deriva genética.

Los análisis de estructuración y diferenciación genética separan sólo a las poblaciones PHB, SA-1 y SB del resto de las poblaciones de *Festuca pallescens*. El análisis de la varianza molecular indica que el grado de estructuración genética es alto (31%), y los índices de diferenciación (Φ_{PT}) de a pares revelaron que la mayoría de las poblaciones presentan diferencias entre sí. Los métodos de agrupamiento (STRUCTURE, k-means) indican que hay sólo dos grupos genéticos, que se distribuyen diferencialmente entre PHB, SA-1 y SB y el resto de las poblaciones. Asimismo, las distancias genéticas (PCoA) muestran que PHB se diferencia de SA-1 y SB y del resto de las poblaciones. Cabe destacar que la diferenciación de las poblaciones SA-1 y SB está dada principalmente por cuatro de los marcadores que son EST-SSRs y que, por ende, podrían ser selectivamente no neutros. Contrariamente, la diferenciación de PHB es principalmente debida a tres loci que corresponden a SSRs neutros. Por lo tanto, el principal resultado encontrado es la gran diferenciación genética de estas tres poblaciones y la mayor homogeneidad entre las poblaciones centrales. Resultados similares se obtuvieron para *Festuca ovina* L. en el Noroeste de China, donde dos de las diez poblaciones muestreadas constituyeron un agrupamiento genético diferente al resto en un acotado rango de distribución de la especie y la mayor parte de la diversidad genética dentro de las poblaciones se atribuye al nivel de ploidía (4x) y a la fecundación cruzada (Zang et al. 2017).

Por otra parte, no sólo la configuración genética es un factor determinante en el grado de diversidad genética de las poblaciones de *Festuca pallescens*. La historia demográfica

desempeña un papel primordial en el nivel y estructuración de la diversidad genética actual de las poblaciones vegetales (Bijlsma et al. 1991). Por lo tanto, resulta fundamental comprender los procesos evolutivos y actuales que modelan la variación genética de las poblaciones. Los eventos del Pleistoceno y Mioceno/Plioceno pueden haber modelado la historia demográfica de estas tres poblaciones. Los avances y retrocesos de los glaciares del Cuaternario (Flint & Fidalgo 1969; Rabassa et al. 2005) y las transgresiones marinas del Mioceno (Malumián & Nández, 2011) alcanzaron la zona de Península Huemul donde hoy se encuentran las poblaciones PHA y PHB (ver Figura 2.6 en Capítulo 2B). Durante la recolonización post-glacial, los sucesivos cuellos de botella y el efecto fundador dan lugar a una reducción en la diversidad genética (e.g. Hewitt, 2000). La presencia de *Festuca pallescens* en los estudios paleontológicos se registró hace 16.500 años AP a los 41°40'S (Markgraf et al. 2013), sin embargo es posible que su distribución haya cambiado junto con las variaciones en el clima regional entre las latitudes 38° - 42°S que alteraron el rango y la densidad de muchas especies patagónicas produciendo cambios en la estructura y composición de la vegetación entre los 15000 y 5000 años AP (Iglesias et al 2013). Un claro ejemplo es la colonización de la estepa por árboles y arbustos en relación al aumento de la temperatura y humedad durante el período glacial tardío (Markgraf et al 2007).

Por otra parte, la variación estacional e interanual de las precipitaciones regula muchos procesos biológicos de los ecosistemas de ambientes áridos y semiáridos (Pruel et al. 1998, Schwinning & Sala, 2004), por lo tanto es probable que durante las glaciaciones del Pleistoceno las fluctuaciones en el régimen de precipitación hayan tenido influencia sobre la distribución de las especies vegetales en Patagonia (Cosacov et al. 2012). Entre los 10000 y 5000 AP, se produjo un cambio en el gradiente de vegetación de la cordillera hacia la estepa en Patagonia Norte, los bosques fueron cambiando de cerrados a abiertos hacia el este donde las condiciones eran más áridas y predominaban arbustos, gramíneas y herbáceas (Iglesias et al 2014). La apertura de los bosques podría haber generado un nuevo nicho para la especie. Las poblaciones periféricas del oeste podrían ser potencialmente el producto de efectos fundadores en serie, que conllevan una reducción de la variación genética (Slakin and Excoffier 2012), quedando sólo los alelos adaptados al límite de una distribución ancestral, pero no actual (Hoffmann and Blows 1994; Gaston 2009). Es decir que estas poblaciones pueden ser producto de la recolonización a partir de poblaciones vecinas. Sin embargo, los

vientos fuertes del oeste durante el Holoceno temprano (Iglesias et al. 2014) podrían haber sido una barrera para la dispersión del polen por lo que las poblaciones PHA y PHB podrían haber quedado aisladas en relictos de vegetación (Markgraf et al. 1995).

Otro proceso evolutivo que estaría actuando diferencialmente en las poblaciones de *Festuca pallescens* es el flujo génico, siendo extensivo entre las poblaciones centrales y limitándose notoriamente con PHB, SA-1 y SB. Dado que la especie es anemófila, los fuertes vientos con dirección O-E de la Patagonia indicarían que probablemente la dirección del flujo génico sea desde el oeste de la distribución hacia el este, con lo cual las poblaciones del este se asemejarían en su estructura genética a las del oeste. Sin embargo, la existencia de barreras topográficas, como la Meseta de Somuncura, limitan el flujo génico entre las poblaciones (hipótesis 2). Contrariamente, se encontró una excepción en una de las poblaciones (SA-2) que mantiene un alto grado de flujo génico con las poblaciones centrales. La limitación del flujo génico entre poblaciones ubicadas en un extremo del rango de distribución se reportó en *Festuca ovina* L, donde dos de cuatro poblaciones en el extremo este de su distribución quedan aisladas de sus poblaciones vecinas (Zhang et al. 2017). Por otra parte, PHB se diferencia notoriamente de PHA, con una distancia de 200 m en altura. Este patrón también se observó en *Festuca eskia* donde el flujo génico es restringido a lo largo de un gradiente altitudinal en las Montañas del Pirineo (Gonzalo-Turpin & Hazard 2009).

Los resultados del STRUCTURE (tanto con la matriz de datos binario como co-dominantes) y el análisis del agrupamiento no jerárquico de k- medias (Arrigo et al. (2010) demostraron que la estructura genética de la especie es baja a lo largo del gradiente pluviométrico ya que sólo dos grupos genéticos fueron detectados. Sin embargo, la mayor parte de las poblaciones de *F. pallescens* pertenecieron a un grupo genético. Estos resultados constituyen una evidencia a favor de la segunda hipótesis, mostrando que el flujo génico entre las poblaciones es entre moderado y alto, pero existe una diferenciación genética marcada entre las poblaciones explicada por la presencia de dos grupos genéticos y la significancia del análisis de la varianza molecular. Por otra parte, el aislamiento por distancia planteado en la predicción 2 se cumple, con lo cual las poblaciones del este son distintas a las del oeste aunque no se encontró la relación entre la diversidad genética (A , AE y uh) y la longitud.

Los resultados encontrados sugieren que la distribución de la variación genética en las poblaciones de *Festuca pallescens* está determinada por procesos demográficos históricos (eventos geológicos) y actuales (fragmentación y disminución del tamaño poblacional hacia los extremos). El mantenimiento de la variabilidad genética resulta fundamental en especies perennes para maximizar su potencial frente a cambios bióticos y abióticos en el ambiente (Jump et al. 2008). La detección de poblaciones aisladas hace pensar que a pesar de la existencia de flujo génico extensivo (bajos niveles de diferenciación genética entre las poblaciones centrales), existen procesos que promoverían la diferenciación de tres poblaciones y posiblemente la pérdida de variabilidad genética a largo plazo (PHB, SA-1 y SB), por ejemplo por efecto de deriva genética. La fuerza evolutiva que genera variabilidad genética es la mutación, pero es un proceso lento, especialmente en poblaciones pequeñas y en declive, como las de los límites del rango de distribución de una especie (Orr & Unckless 2008; Barrett & Schluter 2008; Bijlsma & Loeschcke 2012). Otro proceso que puede generar nueva variación genética es la hibridación. Este proceso puede favorecer la persistencia de poblaciones en los límites de su rango de distribución, proporcionándole la posibilidad de nuevas combinaciones genéticas a través de cruzamientos interespecíficos (Bridle & Vines 2007). Por lo tanto, la hibridación puede aumentar las posibilidades de adaptación local tanto directamente facilitando la innovación evolutiva e indirectamente mediante el flujo génico entre distintas especies (Pfennig et al. 2016).

¿Cuál es la causa de las evidentes diferencias genéticas de las poblaciones PHB, SA-1 y SB con respecto al resto de las poblaciones de *Festuca pallescens*?

Se decidió ahondar en estas diferencias a través de un estudio que permitiera comprender las relaciones filogenéticas entre las poblaciones. Dada la escasa información para esta especie, resulta de interés establecer cuáles son las relaciones filogenéticas entre las poblaciones del primer grupo genético y el segundo. Esta información nos ayudaría a comprender por qué la mayor parte de las poblaciones constituyen un grupo genético tan fuerte. ¿Puede ser posible que el flujo génico en esta especie sea muy alto entre las poblaciones que constituyen el primer grupo genético y que sólo existan barreras al flujo génico en la Meseta de Somuncura y en Península Huemul? Sin embargo, la tercera población

muestreada en la Meseta de Somuncura (SA-2) y otra población muestreada en Península Huemul (PHA) forman parte del primer grupo genético. Se presenta a continuación el estudio filogenético para las poblaciones de *Festuca pallescens* analizadas y se retomará al final del capítulo la discusión de todos los resultados en conjunto.

CAPÍTULO 2 B

Relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Festuca pallescens*.

Diferenciación genética en poblaciones periféricas y evidencias de hibridación en la Meseta de Somuncura

Nota: los resultados de este capítulo se publicaron en el artículo: López, A. S., Azpilicueta, M. M., López, D. R., Siffredi, G. L., & Marchelli, P. (2017). Phylogenetic relationships and intraspecific diversity of a North Patagonian Fescue: evidence of differentiation and interspecific introgression at peripheral populations. *Folia Geobotanica*, 1-17.

1. INTRODUCCIÓN

La variación espacial de las condiciones ambientales así como también disturbios naturales (ej. ciclos climáticos, incendios) actuales y pasados dan lugar a un gradiente de distribución de las poblaciones de una especie, con áreas de alta densidad poblacional, y otras, periféricas de baja densidad poblacional (Jump et al. 2009; Iglesias et al. 2014). Los sitios periféricos suelen ofrecer condiciones sub-óptimas para especies con distribuciones amplias y ambientalmente diversas, lo que lleva a las poblaciones a ser progresivamente más pequeñas propensas al aislamiento y la extinción (Eckert et al. 2008). Muchas especies en ambientes áridos mostraron altos niveles de diferenciación genética entre poblaciones extremas (Martínez-Palacios et al. 1999). Además, la constante exposición a condiciones estresantes de las poblaciones periféricas podría promover la expresión de variabilidad fenotípica (Hoffmann & Hercus 2000) y/o adaptaciones locales (Hoffmann & Blows 1994). Estos ambientes también son proclives a la aparición de hibridación natural e introgresión (Thompson et al. 2010) que pueden aumentar la variación genética generando nuevas combinaciones de genes y por tanto mayor potencial de adaptación a nuevos ambientes (Johansen-Morris & Latta 2008). En cualquier caso, estas respuestas contribuyen a una mayor flexibilidad y supervivencia de una población en un contexto de condiciones ambientales cambiantes.

La geomorfología de la región Patagónica fue modelada fuertemente tanto por la actividad volcánica como por las glaciaciones. Los movimientos tectónicos que dieron origen a la Cordillera de los Andes tuvieron lugar en el Cretácico tardío y la formación de la Meseta Patagónica ocurrió durante el Período Primario. Por otro lado, los paisajes glaciarios fueron producto de la “Gran Glaciación Patagónica” que comenzó en el Mioceno Tardío y continuó durante el Plioceno y hasta el Pleistoceno donde los glaciares cubrieron gran parte de la Patagonia (Flint & Fidalgo 1969; Rabassa et al. 2005). Estos eventos originaron los materiales parentales más importantes de los suelos patagónicos, detritos glaciarios y materiales volcánicos (Paruelo et al. 2000). Entre los 39° y 43° S (Flint & Fidalgo 1964; Flint & Fidalgo 1969) los glaciares pleistocénicos de tipo “valle” avanzaron en forma irregular desplazando la vegetación a zonas libres de hielo (refugios glaciarios) (Markgraf et al. 1995; Villagrán et al. 1991). Es posible que el avance de los hielos hacia el este haya generado un paisaje “mosaico” de vegetación y campos de hielo, así como ocurrió entre los 41°- 43° S donde cordones montañosos con orientación N-S paralelos a los Andes, frenaron el avance de los hielos hacia el este formando “islas” separadas de los glaciares principales (Soliani 2012). Por otra parte, durante el Oligoceno y el Mioceno, las zonas meridionales (38°- 43° S) fueron invadidas por transgresiones marinas del Océano Atlántico (Ramos 1982; Premoli et al. 2011) y del Pacífico, estas últimas continuaron desde el Oligoceno hasta el Mioceno (Bechis et al. 2011).

Por otro lado, las sierras y mesetas -un rasgo geomorfológico característico de la Patagonia- disminuyen hacia el este (Paruelo et al. 2000), donde se destaca la Meseta de Somuncura, un macizo basáltico elevado y biogeográficamente aislado formado durante el Terciario. Esta meseta es una formación peculiar que se destaca hacia el este del gradiente pluviométrico. Las transgresiones marinas del Mioceno afectaron las tierras bajas que rodearon el macizo, pero no llegaron a la meseta (Malumián & Náñez, 2011). Este macizo, sin embargo permaneció volcánicamente activo hasta el Plioceno temprano (Rabassa 2008). Por lo tanto, esta antigua meseta constituyó una estructura insular rodeada de agua (Burkart et al. 1999), generando micro-hábitats que favorecieron la presencia de numerosos endemismos, como cinco especies de plantas, al menos catorce invertebrados y diez vertebrados (Andrade & Monjeau 2014; Cei 1969; Cei & Scolaro 1981; Breitman et al. 2015; Chebez 2005, 2007; León et al. 1998). Además, posee características geomorfológicas únicas

y su ubicación coincide con el extremo de la distribución de muchas especies de la estepa patagónica (Andrade & Monjeau 2014; León et al. 1998). En comparación con las localidades occidentales y más centrales, Somuncura presenta precipitaciones mucho más bajas (150 mm/año vs 800 mm/año), mayor rango diurno medio de temperatura (14,4 vs 11,5 °C) y mayor temperatura anual (29 vs 22,7°C).

La capacidad de *Festuca pallescens* para instalarse y reproducirse en una gran variedad de ambientes se asociaría a cierta plasticidad a nivel de la especie (Correa 1978; Bertiller et al. 1990). Como ya fuera mencionado, es capaz de desarrollarse en diferentes tipos de suelos y áreas ecológicas de Patagonia y presenta diferencias fenológicas asociadas a la variación de la temperatura del aire en distintas posiciones topográficas (Bertiller et al. 1990). Sin embargo, se desconoce si estas respuestas son sólo de tipo plásticas, o si existen adaptaciones locales que generen ecotipos adaptados a los diferentes sitios del gradiente.

Festuca es el género más grande entre los Loliinae, con alrededor de 500 especies (Inda et al. 2008). La poliploidización, las hibridaciones pasadas y recientes y los cruzamientos intergénicos con otras Loliinae son frecuentes (Inda et al. 2008 y referencias dentro). A pesar de las bien documentadas filogenias del género *Festuca* (Torrecilla & Catalán 2002; Torrecilla et al. 2003; Catalán et al. 2004; Inda et al. 2008) se sabe poco sobre las festucas patagónicas ya que sólo tres especies fueron incluidas en estos estudios (*Festuca argentina* (Speg.) Parodi, *Festuca subantarctica* Parodi y *Festuca purpurascens* Banks & Sol. Ex Hook). Por lo tanto, la posición de *F. pallescens* dentro de la filogenia infragenérica, así como la relación con especies simpátricas es desconocida.

Como se describió en la sección A de este capítulo, la densidad de las poblaciones de *Festuca pallescens* disminuye hacia el este, donde las poblaciones de la especie se encuentran espaciadas entre sí asociado a la disminución de ambientes favorables para su desarrollo (e.g. mallines y peri-mallines) (León et al. 1998). Tanto la Meseta de Somuncura en el este, como Península Huemul en el oeste, son áreas de la Patagonia que han pasado por períodos de aislamiento a lo largo de su historia lo cual tiene un impacto profundo en su vegetación y ha dejado huella en su diversidad genética. De acuerdo a los resultados obtenidos en la Sección A de este capítulo, se plantea la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS:

Los eventos geomorfológicos del pasado produjeron distintos grados de aislamiento en algunas poblaciones de *Festuca pallescens* promoviendo diferencias genéticas. En lugares periféricos, como la meseta de Somuncura, biogeográficamente aislados desde comienzos del Mioceno, se favorecieron procesos de hibridación y especiación. Por otro lado, en la zona cordillerana, los avances y retrocesos glaciarios durante épocas más recientes (Pleistoceno), pueden haber promovido aislamiento en algunas poblaciones de la especie, profundizando su diferenciación genética.

PREDICCIÓN

Las relaciones filogenéticas intra-específicas mostrarán diferencias entre las poblaciones de la especie que han quedado aisladas debido a los diferentes procesos geomorfológicos ocurridos en Patagonia Norte.

2. OBJETIVO GENERAL

Estudiar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Festuca pallescens* de Patagonia Norte para profundizar en las causas de la alta diferenciación encontrada entre algunas de las poblaciones. Asimismo, se pretende contribuir con la escasa información que existe sobre las relaciones filogenéticas de las especies de festucas patagónicas.

3. METODOLOGÍA

3.1. Material vegetal (ver sección A)

Se utilizó material de las mismas poblaciones mencionadas en el capítulo 2 A (hojas de individuos de las 14 poblaciones de *Festuca pallescens*), tomando un individuo por población identificado con el mismo rótulo que en Tabla 1.1 seguido de un número. Adicionalmente, se recolectaron cuatro individuos de la especie simpátrica *Festuca argentina* en uno de los sitios (Pilcaniyeu, coincidiendo con las poblaciones PA y PB) y dos

especies de gramíneas patagónicas (*Poa ligularis* Nees ex Steud, var. *ligularis*, y *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* Trin. Et Rupr). Estas dos últimas se utilizaron como especies distantes a *Festuca pallescens* (*outgroups*) en la reconstrucción filogenética.

3.2. Extracción de ADN (ver sección A) y amplificación por PCR

Para estudiar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Festuca pallescens* y con otras especies patagónicas de *Festuca*, se utilizaron tres marcadores de ADN: el espaciador transcrita interno ribosomal (ITS), una región de ADN cloroplástico (*trnL-F*) y los ocho microsatélites nucleares (SSR) polimórficos transferidos exitosamente a la especie (ver sección A). La región ITS completa (ITS1-5.8S-ITS2) se amplificó con los *primers* *cy1-cy3* (Wright et al. 2006). Debido a que las secuencias de ADN de la región nuclear ITS son altamente conservadas dentro de las especies, se secuenció un individuo de cada población. Sin embargo, dada la mayor variación fenotípica observada en la Meseta de Somuncura (observaciones personales) y la alta diferenciación detectada en el capítulo 2A, se incrementó el número de individuos a un total de 12 entre las tres poblaciones muestreadas (5 de SA1, 5 de SB y 2 de SA2). Para la amplificación de la región ITS, se usaron 40 ng de ADN como molde con una mix que contenía las siguientes concentraciones finales: 0,6 unidades de ADN polimerasa Go-Taq (Promega, Madison, WI, USA) con buffer de reacción 1X Green GoTaq® (Promega), 1,5 mM de MgCl₂, 250 µM de dNTP, y 0,3 µM de cada *primer* en un volumen total de 30 µl. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo con el siguiente programa: 5 min a 94°C, 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 56°C y 2 min a 72°C y un ciclo final de 10 min a 72°C. La región *trnL-F* del cloroplasto se amplificó usando los *primers* universales *c* y *f* (Taberlet et al. 1991) con 90 ng de ADN, 1 unidad de ADN polimerasa Go-Taq® (Promega, Madison, WI, USA) con 1X Green GoTaq® (Promega), 2 mM de MgCl₂, 200 µM of dNTPs, y 0.2 µM de cada *primer* en un volumen total de 50 µl. El programa de amplificación fue: 1 min a 94°C, 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C y 1 min a 72°C y un ciclo final de 7 min a 72°C. Por último, se analizaron los ocho loci microsatélites (SSR) utilizados en la sección 2 A de este capítulo para todas las especies (ver sección A). Las amplificaciones por PCR y el genotipado se llevaron a cabo de acuerdo con lo detallado en la sección 2A.

Se comprobó la amplificación positiva de los productos de PCR para los tres marcadores en geles de agarosa al 1% que se tiñeron con Syber Safe (Invitrogen, Eugene, OR, EEUU) y se visualizaron con un transiluminador de luz azul. Las regiones ITS y *trnL-F* amplificadas produjeron una banda de aproximadamente 700 pb y 1000 pb respectivamente. El producto de PCR se purificó usando el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard (Pomera) y luego se secuenció, en ambas direcciones, en un secuenciador capilar ABI 3700 (Unidad de Biotecnología, INTA, Hurlingham, Argentina).

3.3. Análisis morfo-anatómico

Debido a la variación fenotípica observada a campo en la meseta de Somuncura, se realizó un análisis de los principales caracteres morfológicos que distinguen a *Festuca pallescens* (Catalán & Müller 2012). Se analizaron exomorfológicamente muestras de un ejemplar típico de *F. pallescens* y uno de la especie simpátrica *F. argentina* ambos recolectados en Pilcaniyeu (poblaciones centrales de ambas especies), así como un ejemplar de cada una de las dos poblaciones altamente diferenciadas de *F. pallescens* de Somuncura. Además, se realizaron cortes transversales de hojas para análisis morfo-anatómico, para determinar la posición y extensión del tejido esclerenquimático dentro de la hoja. Se obtuvieron cortes transversales de hojas maduras que se cortaron aproximadamente a 12 cm de distancia a la altura de la lámina foliar (es decir, del extremo distal de la vaina foliar). Las secciones se observaron a 10x con una lupa Leica SGE. Las características morfológicas medidas han sido reportadas como importantes descriptoras de especies de *Festuca* (Dubkovski & Martínez 1988; Catalán & Müller 2012).

3.4. Análisis filogenéticos

Los cromatogramas de las secuencias directa y reversa se analizaron con seqtrace 0.9.0 (Stucky 2012) y se crearon secuencias consenso usando BioEdit v7.2.5 (Hall 1999). Se utilizó el software OLFinder (Dixon 2010) para reconstituir las secuencias en aquellos casos con presencia de polimorfismos heterocigota indel. Las secuencias de todas las especies de *Festuca* de América del Sur disponibles en Genbank (Catalán et al. 2004; Inda et al. 2008) se utilizaron para el análisis filogenético (15 especies, una secuencia por especie; Tabla S2.5).

Además se incluyeron especies de *Festuca* de otros continentes disponibles en Genbank que podrían estar emparentadas con las festucas patagónicas: 18 especies para ITS y 19 especies para *trnL-F* (1 secuencia por especie; Tabla S2.1). *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* y *Poa ligularis* son dos especies de Poaceae generalmente encontradas en los pastizales de *F. pallescens*. Estas especies son filogenéticamente muy distantes de *F. pallescens* y fueron utilizadas como grupos externos. Las secuencias de ITS y *trnL-F* de *F. pallescens*, *F. argentina*, *Poa ligularis* y *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* se depositaron en el GenBank (los números de acceso se proporcionan en la Tabla S2.5, del anexo). Las secuencias se alinearon usando Muscle con ajustes manuales en AliView 1.18 (Larsson 2014) en los casos necesarios. Los límites de cada secuencia se establecieron mediante el alineamiento con las especies de *Festuca* obtenidas de Genbank (Torrecilla & Catalán 2002, Torrecilla et al. 2003; Catalán et al. 2004). Para el análisis filogenético, la presencia del heterocigota indel fue codificada como un dato binario e incorporado en la base de datos. Los gaps (falta de bases) fueron tratados como datos faltantes.

Para evaluar las relaciones filogenéticas entre las poblaciones se realizaron análisis con Inferencias Bayesianas (BI), máxima parsimonia (MP) y máxima verosimilitud (ML) a partir de matrices de datos de *trnL-F* e ITS tanto por separado como combinados. Los análisis de BI, MP y ML se llevaron a cabo con el programa Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012), Paup * 4.0 beta10 (Swofford 2003) y el software en línea PhyML (Guindon et al. 2010), respectivamente. Para ejecutar BI y ML, se estimó el modelo de sustitución de nucleótidos óptimo para la matriz de datos ITS (GTR + G con 4 categorías de tasas gamma), la matriz de datos *trnL-F* (TPM1uf + G) y el conjunto de datos concatenados (GTR + G con 4 categorías gamma), después de probar 56 modelos de sustitución de nucleótidos y secuencias en base a el Criterio de Información de Akaike (AIC) implementado en jmodeltest 2.0 (Guindon & Gascuel 2003; Posada 2008; Darriba et al. 2012). Se realizaron los mismos análisis bayesianos para ambos conjuntos de datos independientes (1 millón de generaciones iniciadas a partir de diferentes árboles aleatorios, muestreando cada 100 generaciones los parámetros del modelo tales como las tasas de sustitución de nucleótidos, la forma gamma, la proporción de sitios invariables, la frecuencia de nucleótidos) estimados en Mr. Bayes. Después de descartar 0,25 del muestreo total ("burn-in"), los parámetros se tomaron al alcanzar el estado estacionario. Los árboles consenso (según la regla del 50% de la mayoría)

para la matriz de datos de ITS y *trnL-F*, obtenidos a partir de 15000 árboles, fueron respaldados por un valor de probabilidad posterior (PP); por defecto, para la construcción del árbol consenso, MrBayes condensa los clados con menos de 50% de PP. Los clados con valores de PP superiores al 95% se consideraron con buen soporte. Luego, se realizaron los análisis de máxima parsimonia en cada matriz de datos independiente. En base a estudios realizados en este género (Torrecilla & Catalán 2002; Torrecilla et al. 2003; Inda et al. 2008), se realizó un análisis heurístico en las matrices de datos para encontrar todos los árboles igualmente parsimoniosos. En primer lugar, se estableció una restricción a partir del árbol concenso obtenido a partir de 10000 árboles de orden aleatorio, MULPARS ON, con intercambio de ramas TBR y guardando no más de 10 árboles de longitud igual o menor a 10 pasos por repetición. Luego, la segunda búsqueda heurística consistió en 5000 árboles de orden aleatorio, MULPARS ON, con intercambio de ramas TBR y guardando de no más de 5 árboles de longitud igual o menor a 5 por repetición. Todos los árboles parsimoniosos se utilizaron para calcular el árbol de consenso estricto y el árbol consenso del 50% de la mayoría de los árboles coincidentes. Los valores de *bootstrap* para las ramas de los árboles parsimoniosos se calcularon a través de búsquedas heurísticas de 1000 repeticiones. La mayor parte de los clados presentaron valores de *bootstrap* entre 90-100%, por lo que se consideraron bien respaldados.

Se calcularon las distancias genéticas tanto para ITS como para cpDNA (*trnL-F*) en R (R Core Team 2013) usando el paquete *dist.dna* (Paradis et al. 2004). Esta función calcula una matriz de pares de distancias de secuencias de ADN utilizando 11 modelos de sustitución de ADN y la distancia genética de Bruvo (Bruvo et al. 2014). Finalmente, se utilizó un algoritmo “median-joining network” (Bandelt et al. 1999) para reconstruir las relaciones entre los haplotipos usando la Red 5.0.0.0 (www.fluxus-engineering.com). Luego, se utilizó la opción de post-procesamiento (MP) para eliminar vectores medianos y enlaces innecesarios (Polzin & Daneschmand 2003).

Los loci de microsatélites se analizaron en el mismo conjunto de individuos seleccionados para la reconstrucción filogenética, incluyendo a *F. argentina*. Se utilizó la distancia de Bruvo (Bruvo et al. 2004), que es la distancia recomendada para poliploides (ver Sección 2A, pág.8) para realizar un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) con el paquete de *polysat* (Clark & Jasieniuk 2011) y una estimación de Neighbor-joining con el

paquete ape (Paradis et al. 2004), ambos en R (R Core Team 2013). Con estos análisis se pretende profundizar en los análisis filogenéticos, particularmente en la relación entre la especie simpátrica y las poblaciones de *F. pallescens*. Asimismo, para determinar el número de grupos genéticos y evaluar las señales de admixia se utilizó STRUCTURE ver. 2.3.4. (Pritchard et al. 2000). Se determinó el número óptimo de grupos genéticos mediante el método de Evanno (Evanno et al. 2005) en la plataforma en línea Harvester (Earl & vonHoldt 2012) y las figuras se procesaron con Clumpak (Kopelman et al. 2015) (ver Sección 2A).

4. RESULTADOS

Las poblaciones de *Festuca pallescens* de la meseta de Somuncura (poblaciones SA-1 y SB) mostraron grandes diferencias genéticas con respecto al resto de las poblaciones muestreadas a lo largo de la transecta oeste-este (Figura 2.6). Hubo un alto nivel de diversidad tanto en el marcador nuclear como en el de plástido, con la presencia de seis diferentes secuencias ITS y cuatro haplotipos de cloroplasto. Por el contrario, todas las demás poblaciones no mostraron ningún polimorfismo para la región ITS y sólo tres variantes para el cloroplasto (Figura 2.6). La población SA-2 es la única población de la Meseta de Somuncura con la misma constitución genética (secuencias de ITS y haplotipos) que el resto de las poblaciones de *F. pallescens*. Por lo tanto, a partir de ahora se hará referencia a las poblaciones de Somuncura haciendo mención sólo a las poblaciones SA-1 y SB, que presentaron una constitución genética diferente. Por otro lado, la población PHB de Península Huemul, que se encuentra en el otro extremo del gradiente y que presentó diferencias con los marcadores microsatélites (Sección 2A) resultó genéticamente idéntica (ITS y haplotipo) al resto de las poblaciones de *Festuca pallescens*.

4.1. Análisis morfo-anatómicos

Varios de los caracteres morfológicos analizados mostraron diferencias entre las poblaciones centrales típicas de *F. pallescens* (PA y PB) y los individuos marginales recolectados en Somuncura (Tabla 2.5). También comparamos las poblaciones de Somuncura con la especie simpátrica *F. argentina* y se encontraron algunos rasgos similares y otros intermedios con *F. pallescens*. Por ejemplo, el color de las hojas en las poblaciones

de Somuncura era glauco como en *F. pallescens*. Por el contrario, la lígula en el ápice de la vaina foliar y la presencia de cordones adaxiales/abaxiales de esclerénquima de las poblaciones de Somuncura se asemejaban a las de *F. argentina*. Por último, algunos rasgos eran claramente intermedios entre *F. pallescens* y *F. argentina*: tamaño del pulvínulo calloso en la base de la lámina, longitud de la arista en el ápice del lema (Figura 2.7) y presencia de una banda continua de esclerénquima debajo de la epidermis abaxial en el corte transversal de la hoja. Además, se detectaron diferencias entre las dos poblaciones de Somuncura: la población SB tenía una mayor proporción de esclerénquima que la población SA (Tabla 2.5; Figura 2.8).

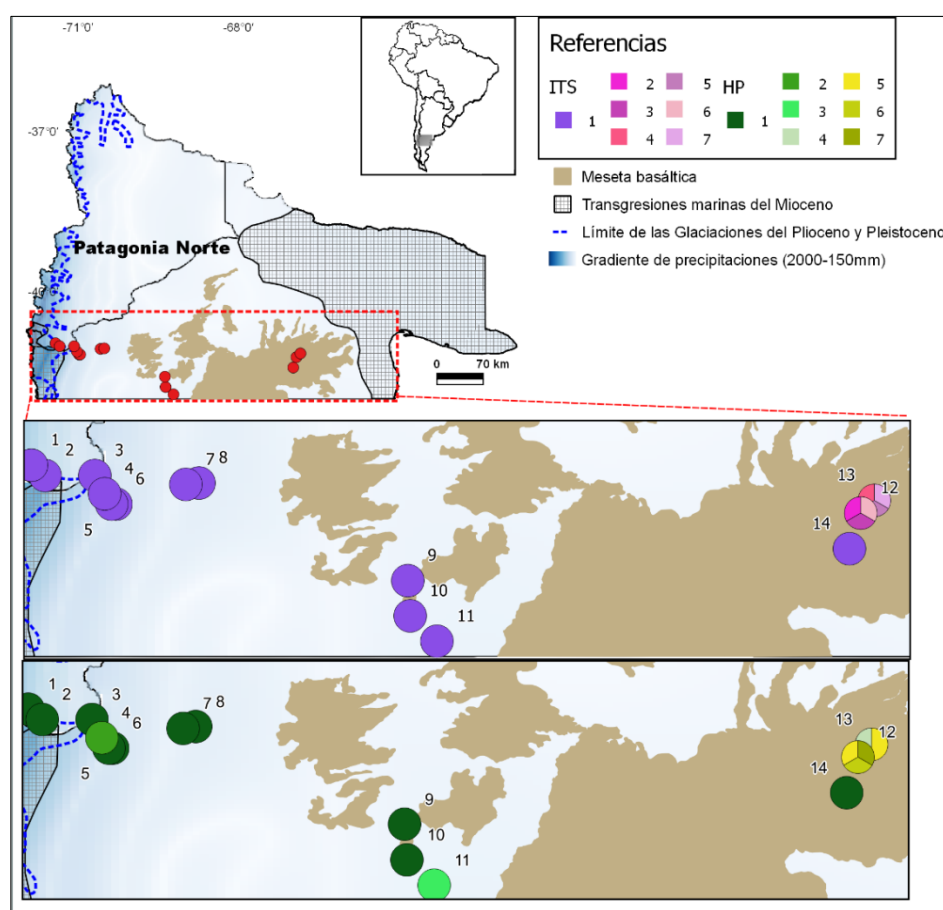


Figura 2.6: Distribución de las variantes genéticas de la región ITS y cpDNA (*trnL-F*) en las poblaciones analizadas. Los números de la *Referencia* siguen la descripción de la Tabla 2.1. La gama de colores violeta (ITS) y verde (haplotipos (HP) de cpDNA) muestran las diferentes variantes para los dos marcadores. Además, en la parte superior de la derecha se indican los eventos geomorfológicos que caracterizan las región: las transgresiones marinas del Oligoceno-Mioceno y los límites de glaciaciones Pleistoceno-Plioceno modificados a partir Premoli et al. 2011 (basado en Ramos 1982) y Pastorino y Gallo 2006 (según Hollin & Schilling 1981), respectivamente. También se presenta el gradiente de precipitación decreciente oeste-este.

Tabla 2.5: Comparación de los rasgos morfo-anatómicos de *Festuca argentina*, *F. pallescens* y las poblaciones de Somuncura (SA1: Somuncura alto1; SB: Somuncura bajo).

<u>Rasgos Morfoanatómicos</u>	<u><i>Festuca argentina</i></u>	<u><i>Festuca pallescens</i></u>	<u>SA1</u>	<u>SB</u>
<i>Color de hoja</i>	verde claro	glauc	glauc	glauc
<i>Lígula</i>	claramente visible	poco visible	visible (similar a <i>F. argentina</i>)	visible (similar a <i>F. argentina</i>)
<i>Pulvínulo calloso en la base de la lámina</i>	ausente	presente, claramente visible	presente, pequeña y menos distinguible que en <i>F. pallescens</i>	presente, pequeña y menos distinguible que en <i>F. pallescens</i>
<i>Longitud de la arista en el ápice del lemma</i>	ausente	Presente >1 mm	Presente, aprox. 0,2 mm	Presente, < 0,2 mm
<i>Presencia de cordones adaxiales/abaxiales de esclerénquima</i>	presente	ausente	presente	presente
<i>Presencia de una banda continúa de esclerénquima debajo de la epidermis abaxial en el corte transversal dela hoja</i>	ausente	presente (a veces interrumpido por partes)	ausente (pero con una mayor proporción que en <i>F. argentina</i>)	ausente (pero con una mayor proporción de esclerénquima que en SA)

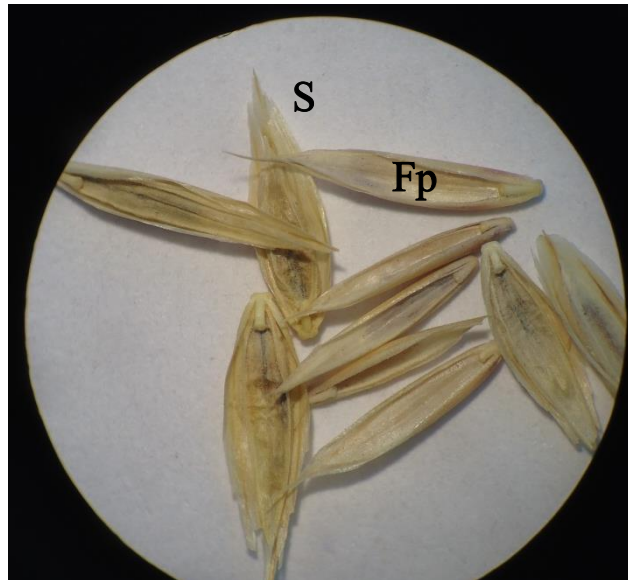


Figura 2.7: Foto de semillas de *Festuca pallescens* (F.p) y de poblaciones de Somuncura (S) tomada con un zoom de 10x con una lupa Leica SGE. Se observa la diferencia en el tamaño de la arista.

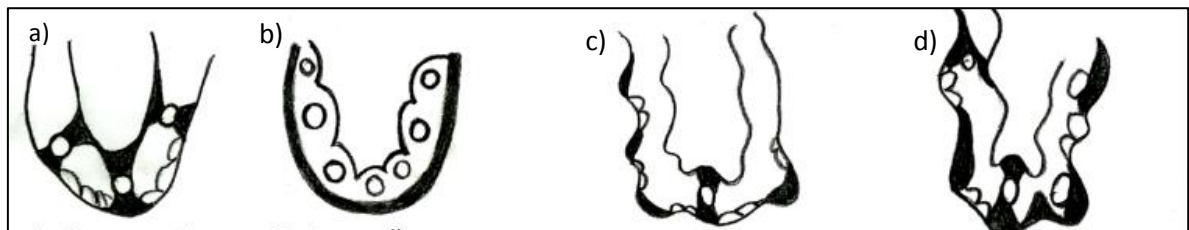


Figura 2.8: Esquema de cortes transversales de a) *Festuca argentina*, b) *Festuca pallescens*, c) Somuncura alto y d) Somuncura bajo. En negro se representa el esclerénquima.

4.2.Región ITS

Todos los individuos analizados de *F. pallescens* presentaron la misma secuencia para la región ITS, excepto las poblaciones de Somuncura donde se encontraron seis secuencias ITS diferentes entre un total de 10 secuencias analizadas (Figura 2.6). Los individuos de la población SA-2, en la meseta de Somuncura, fueron idénticos al resto de las muestras de *F. pallescens*. *Festuca argentina* también mostró un alto polimorfismo ya que cada individuo de los cuatro analizados presentó una secuencia del ITS diferente. Todas las secuencias de las poblaciones SA-1 y SB presentaron un heterocigota indel en la misma posición, mientras que en una sola muestra de *F. argentina* se detectó un

heterocigota indel pero en una posición diferente. No se encontró la presencia de un heterocigota indel en las secuencias de *F. pallescens*. El conjunto de datos ITS incluía 47 secuencias pertenecientes a 38 taxones y 621 nucleótidos alineados, siendo 107 (17,23%) informativos.

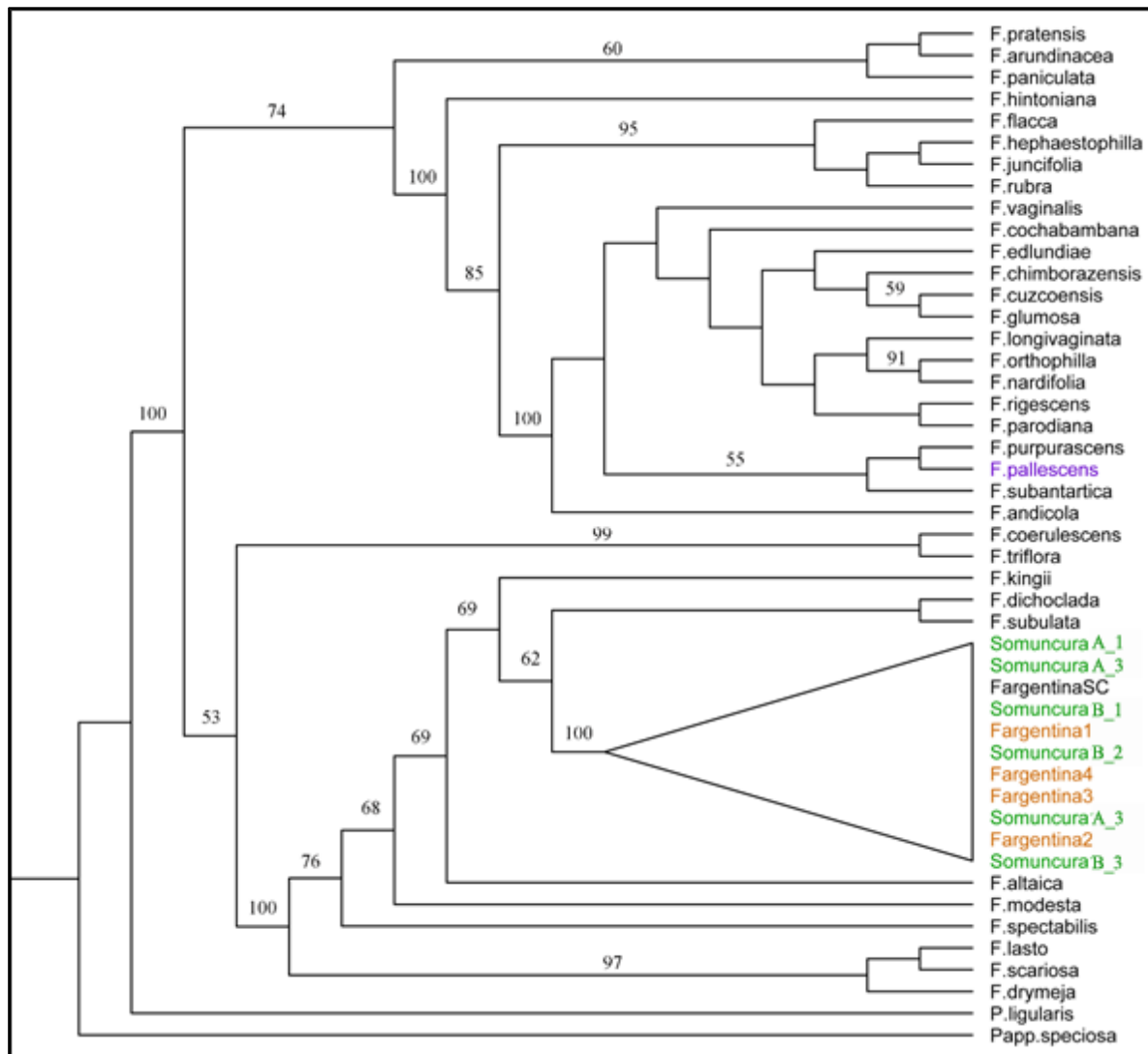


Figura 2.9: Árbol bayesiano construido a partir del conjunto de datos nucleares (ITS).

Los taxones coloreados corresponden a *F. pallescens* (violeta), *F. argentina* (naranja) y poblaciones de Somuncura (verde). Los números por encima de las ramas indican los valores de probabilidad posterior (BI). *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* y *Poa ligularis* fueron utilizados como grupos externos.

Los tres métodos filogenéticos empleados mostraron topologías similares, por lo que se presentan sólo los resultados del Mr Bayes (Figura 2.9) (los análisis de máxima parsimonia y máxima verosimilitud se muestran en el anexo, Figura S2.4). *Festuca pallescens* y los individuos de Somuncura pertenecen a diferentes clados. De hecho, Somuncura formó un clado con *F. argentina* con un soporte fuerte (Figura 2.9). Las tres especies patagónicas constituyeron clados hermanos con bajo soporte: *Festuca pallescens* con *F. purpurascens* y luego ambas con *F. subantartica*. Este clado está estrechamente relacionado con las especies sudamericanas (*F. chimborazensis*, *F. rigenscens*, *F. vaginalis*, *F. parodiana*, *F. glumosa*, *F. andicola*, *F. cochabambana*, *F. nardifolia*, *F. longivaginata*, *F. Orthophilla* y *F. cuzcoensis*) y con una especie norteamericana (*F. edlundiae*) (Figura 2.9 y Fig. S2.4). Los individuos de Somuncura y *F. argentina* se agruparon como una politomía estrechamente relacionada con *F. dichoclada*, *F. subulata*, *F. kingii* y *F. altaica* en todas las topologías (Figura 2.9 y Figura S2.4).

Las distancias genéticas fueron pequeñas entre *F. argentina* y Somuncura (entre 0 y 0,7%) y considerablemente mayores entre los individuos de Somuncura y *F. pallescens* (entre 7,3 y 8,1%) (Tabla 2.4). Por otra parte, la mayoría de los sitios polimórficos en las secuencias de ITS de los individuos de Somuncura fueron compartidos con *F. argentina*, mientras que sólo unos pocos coincidieron con *F. pallescens* y algunos fueron exclusivos. La mayoría de los polimorfismos eran posiciones heterocigóticas entre las dos especies (Tabla 2.6).

Tabla 2.6: Posiciones variables en la región ITS entre las especies. Columnas marcadas en violeta indican sitios compartidos entre *F. pallescens* y Somuncura, en amarillo, sitios polimórficos entre Somuncura y *F. argentina*, y en verde sitios observados únicamente en individuos de Somuncura. El heterocigota indel está en la posición 398, marcada en rojo.

		Posiciones variables (ITS)																																				
Individuo		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	3						
/Especie		1	1	2	2	3	3	4	4	4	5	6	6	7	7	8	0	0	0	0	1	3	6	7	8	9	9	9	9	0	0	1	5					
		4	9	6	7	2	9	4	6	7	9	3	4	0	9	8	0	1	6	7	9	4	9	7	6	8	4	7	8	1	2	4	1					
<i>F.pallescens</i>	C	C	C	G	T	C	T	C	C	C	T	T	C	G	A	T	C	C	G	C	C	A	C	G	G	A	G	T	G	T	A	C						
SomuncuraA1_1	C	T	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
SomuncuraA1_2	C	Y	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
SomuncuraA1_3	C	Y	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
SomuncuraB_1	C	Y	C	R	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
SomuncuraB_2	C	Y	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
SomuncuraB_3	C	T	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
<i>F.argentina1</i>	M	T	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	C	T	T	G	T	T	T	A	T	C	C	T	G	T	T							
<i>F.argentina2</i>	C	T	C	G	C	Y	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	Y	T	T	G	T	W	Y	T	A	T	C	C	T	G	T	T						
<i>F.argentina3</i>	A	T	Y	G	C	T	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	C	T	T	G	T	T	T	A	T	C	C	T	G	T	T							
<i>F.argentina4</i>	A	T	-	G	C	-	C	T	T	T	C	C	T	T	T	C	C	T	T	G	T	T	T	A	T	C	C	T	G	T	T							
continuación																																						
Individuo		3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	6	6				
/Especie		8	9	0	0	1	1	2	3	4	6	7	8	8	9	1	1	3	4	4	4	5	5	5	7	7	8	8	8	8	8	0	0	1				
		4	8	7	8	0	1	0	5	4	0	4	2	6	0	0	7	9	1	2	9	0	3	7	2	4	5	6	8	9	8	9	5					
<i>F.pallescens</i>	C	C	A	C	T	G	T	T	C	G	C	C	C	G	T	A	C	T	G	G	C	A	C	A	T	A	C	-	G	A	G	-						
SomuncuraA1_1	A	-	-	-	C	T	C	C	G	R	C	C	Y	A	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
SomuncuraA1_2	A	-	-	-	C	T	C	C	G	R	C	Y	Y	A	C	T	T	C	R	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
SomuncuraA1_3	A	-	-	-	C	T	C	C	G	R	C	C	Y	A	C	T	T	C	R	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	C	A	G						
SomuncuraB_1	A	-	-	-	C	T	C	C	G	R	C	C	Y	A	C	T	T	C	R	A	Y	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
SomuncuraB_2	A	-	-	-	C	T	C	C	G	G	C	A	Y	A	C	T	T	C	R	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
SomuncuraB_3	A	-	-	-	C	T	C	C	G	R	C	C	Y	A	C	T	T	C	R	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
<i>F.argentina1</i>	A	C	-	-	C	T	C	C	G	G	Y	Y	Y	A	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
<i>F.argentina2</i>	A	-	-	-	C	T	C	C	G	G	C	C	Y	A	C	T	T	C	R	A	C	G	G	T	G	T	T	A	A	A	G	-						
<i>F.argentina3</i>	A	C	-	-	C	T	C	C	G	G	C	C	T	A	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						
<i>F.argentina4</i>	A	C	-	-	C	T	C	C	G	G	C	C	T	A	C	T	T	C	A	A	C	G	G	T	G	T	T	-	A	A	G	-						

4.3.Región de ADN de cloroplasto (trnL-F)

Se identificaron tres haplotipos entre las poblaciones de *F. pallescens* (HP1, HP2 y HP3), siendo HP1 el más frecuente. Entre los 12 individuos de Somuncura, se detectaron cuatro variantes (HP4, HP5, HP6 y HP7, Figura 2.6), siendo HP5 compartida

con *F. argentina*. El conjunto de datos de cpDNA (*trnL-F*) incluye 43 secuencias (39 taxones) con 907 posiciones alineadas; 63 (6,94%) sitios variables fueron informativos.

Los árboles construidos a partir de la base de datos del marcador cloroplástico (*trnL-F*) en todos los análisis mostraron, en general, la misma topología que los árboles ITS. Asimismo, los distintos métodos filogenéticos empleados para analizar la región de cloroplasto arrojaron resultados similares por lo que se muestra sólo el Mr. Bayes (en el anexo se pueden ver los otros análisis). Los haplotipos 2 y 3 de *F. pallescens* constituyeron clados hermanos y el haplotipo 1 (el haplotipo más común encontrado en *F. pallescens*) un clado hermano de *F. purpurascens* (Patagonia). Asimismo, *F. subantarctica* presentó el haplotipo 1. Estos taxones estaban estrechamente relacionados con *F. chimborazensis* (Ecuador), *F. edlundiae* (Canadá) y *F. glumosa* (Colombia). Además, el haplotipo exclusivo de la población SB de Somuncura y los otros dos haplotipos encontrados en la población SA1 de Somuncura constituyeron un clado hermano de *F. amplissima* y resultó filogenéticamente muy cercano a *F. argentina*. Asimismo, estos clados se unen luego a un clado compuesto por *F. breviglumis* (México) y *F. dichoclada* (Perú) (Figura 2.10). Sin embargo, los valores de soporte de PP fueron muy bajos (menos del 50%). Las distancias genéticas fueron bajas entre *F. argentina* y Somuncura (entre 0 y 0.24%) y considerablemente mayores entre Somuncura y *F. pallescens* (entre 1.9 y 2.03%) (Tabla 4.3).

La red de haplotipos muestra que 19 mutaciones separan a *F. pallescens*5 (HP2) de Somuncura SA1_2 (HP4), mientras que los haplotipos de Somuncura difieren del haplotipo de *F. argentina* (HP5) sólo por una o dos mutaciones entre sí (inbox en la figura 2.10). El conjunto de datos combinados (ITS-*trnL-F* datos concatenados) mostró una topología similar al árbol del gen del cloroplasto (Figura S2.5 del anexo).

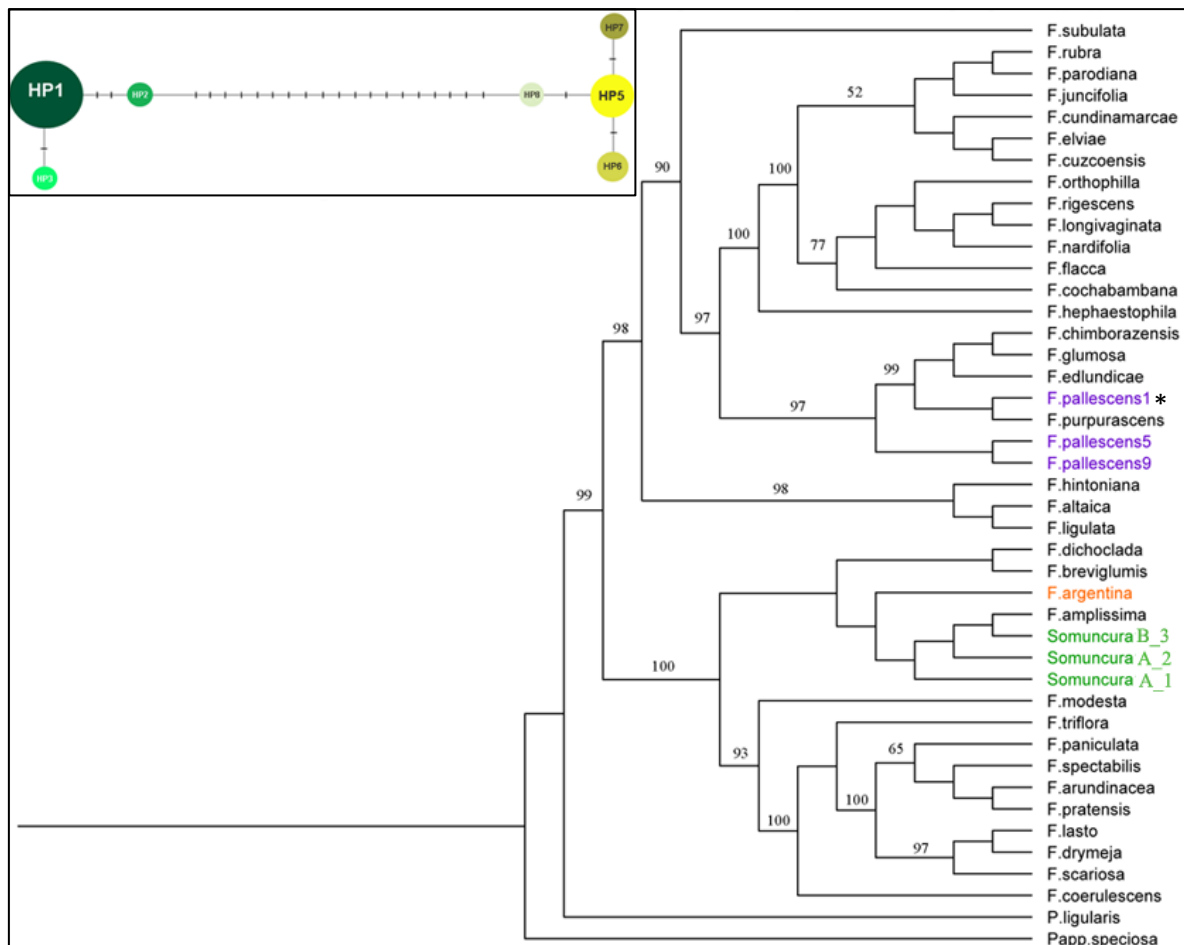


Figura 2.10: Árbol bayesiano basado en el marcador cloroplástico (*trnL-F*). Los taxa estudiados se colorean con violeta (*F. pallescens*), verde (*Somuncura*) y naranja (*F. argentina*). Los valores de soporte (probabilidad posterior) se indican por encima de las ramas. Los valores de soporte de probabilidad posterior inferiores al 50% no se muestran. * *Festuca subantartica* tiene el mismo haplotipo que *F. pallescens* 1. El recuadro superior de la izquierda muestra la red de haplotipos.

4.4. Loci de microsatélites

Todos los análisis realizados con el conjunto de datos de microsatélites fueron consistentes mostrando cuatro grupos bien definidos. Los individuos de *F. argentina* (4 individuos) y *F. pallescens* (12 individuos) fueron muy diferentes entre sí en coincidencia con los análisis filogenéticos. Los marcadores microsatélites permitieron, además, la separación de las dos poblaciones de *Somuncura*. Los individuos de la población SA1 (5 individuos) se ubicaron más cerca de *F. argentina* mientras que los individuos de la población SB (5 individuos) se sitúan en una posición intermedia entre *F. argentina* y *F. pallescens* tanto en el PCoA como en el árbol de Neighbour-joining (Figura 2.11).

El agrupamiento realizado con STRUCTURE indicó que el número de grupos genéticos es 2 ($K = 2$) según el método de Evanno et al. (2005) (Figura S2.6 del anexo). Sin embargo, meanLnK alcanza la meseta en $K = 3$ y $K = 4$. Por lo tanto, se muestran los tres resultados (Figura 2.11). La mejor partición ($K = 2$) identifica a las dos especies, aunque también muestra admixia en la población SB de Somuncura, mientras que la población SA1 resultó genéticamente idéntica a *F. argentina*. Cuando $K = 3$, la población SB de Somuncura formó un grupo puro, mientras que la población SA1 se agrupó con *F. argentina*. Finalmente, cuando $K = 4$ se conforman los mismos cuatro grupos genéticos que en el PCoA.

La proximidad de la población SB a *F. pallescens* se debe a una mayor proporción de alelos compartidos (Figura S2.6 del anexo). En general, los individuos de Somuncura en algunos loci de microsatélites tienen al menos un alelo predominante en *F. pallescens* y otro que es característico de *F. argentina*, lo que indica posibles eventos de hibridación pasada entre estas dos especies. Además, se encontraron alelos exclusivos en ambas poblaciones de Somuncura.

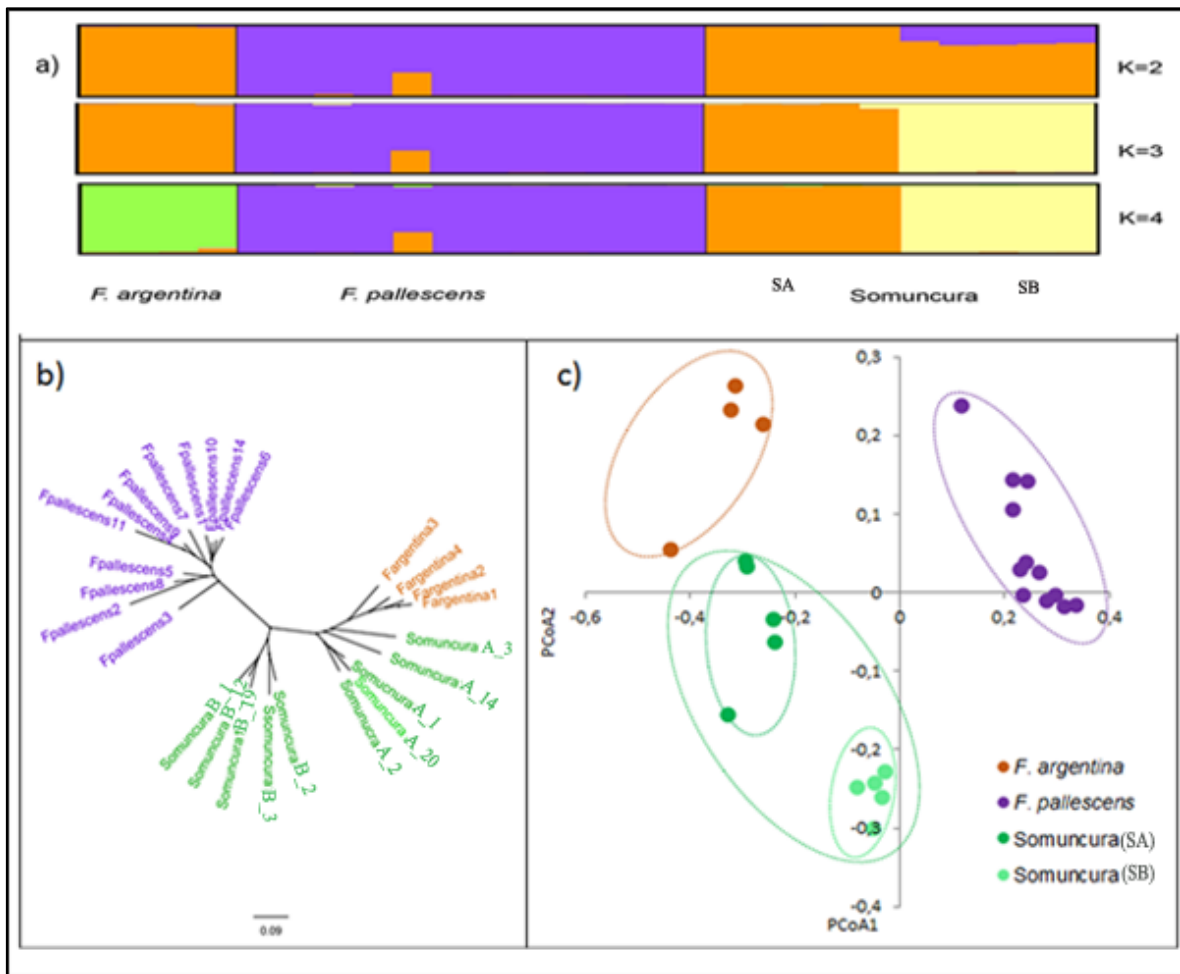


Figura 2.11: Análisis con loci de microsatélites. a) Asignación de los individuos a cada uno de los diferentes grupos ($k = 2$ a $k = 4$) obtenidos con STRUCTURE; b) Árbol radial de Neighbour joining basado en la distancia de Bruvo calculado con el paquete de polysat en R; c) Análisis de coordenadas principales basado en la distancia de Bruvo para los loci de microsatélites. Pueden distinguirse cuatro grupos: los individuos de *F. pallescens* están coloreados en violeta, *F. argentina* en naranja y Somuncura en verde oscuro (población SA) y verde claro (población SB).

En virtud de los resultados obtenidos en este capítulo que señalan que las poblaciones de Somuncura no se agrupan con *F. pallescens*, se analizaron nuevamente todos los datos de microsatélites de todas las poblaciones (capítulo 2A) excluyendo las dos poblaciones de Somuncura (Figura 2.12). El número óptimo de grupos genéticos en este nuevo análisis fue $K = 2$. La mayoría de las poblaciones presenta uno de los grupos genéticos con niveles de asignación altos ($Q \geq 0.85$) mientras el segundo grupo genético estuvo representado sólo por la población PHB con un nivel de asignación muy alto ($Q = 0.9$).

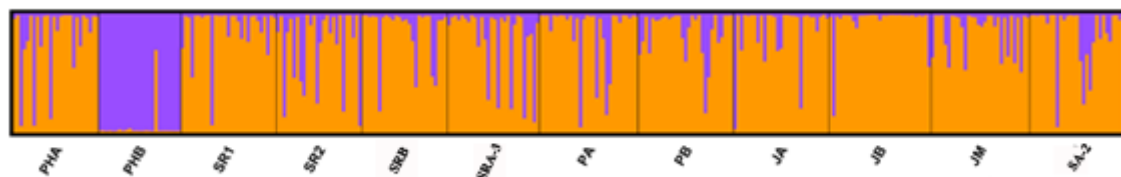


Figura 2.12: Asignación de grupos genéticos en 12 poblaciones de *Festuca pallescens*.
Resultados obtenidos con STRUCTURE editados con CLUMPAK para $k = 2$.

5. DISCUSIÓN

Las relaciones filogenéticas y el análisis de la variación genética (Capítulo 2 Sección A) entre las poblaciones de *Festuca pallescens* de Patagonia Norte indicaron que las diferencias encontradas en tres poblaciones se deben a distintas causas. Los eventos geomorfológicos del pasado han producido distintos grados de aislamiento en algunas poblaciones de *F. pallescens*, sin embargo las consecuencias de estos aislamientos serían distintas, lo cual nos permite, en parte, confirmar nuestra hipótesis de trabajo. En lugares periféricos, como la meseta de Somuncura, biogeográficamente aislados desde comienzos del Mioceno, las poblaciones SA y SB se diferencian filogenéticamente del resto de las poblaciones y serían un ecotipo de *Festuca argentina* producto de una hibridación ancestral con *F. pallescens*. Por otro lado, en la zona cordillerana, los avances y retrocesos glaciares durante el Pleistoceno (Iglesias et al. 2013, 2014), pueden haber dado origen a PHB mediante una posterior recolonización de la especie.

5.1. Diversidad genética dentro de las poblaciones periféricas

Las poblaciones periféricas suelen tener niveles más bajos de diversidad genética porque su aislamiento conduce a una mayor probabilidad de endogamia y deriva genética (Eckert 2008). Sin embargo, la diferenciación genética que se detectó con los tres marcadores analizados fue muy fuerte entre las poblaciones SA y SB de la meseta de Somuncura y el resto de las poblaciones, pero no en la población PHB de Península Huemul que sólo presentó diferencias genéticas con los marcadores moleculares del tipo microsatélite con el resto de las poblaciones de *F. pallescens*. Los altos niveles de variación en estas poblaciones de la meseta junto con la detección de alelos exclusivos

con los SSRs indican que las poblaciones estarían atravesando diferentes procesos evolutivos.

Durante los eventos que ocurrieron desde el Mioceno/Plioceno hasta el Pleistoceno donde los glaciares y las transgresiones marinas cubrieron gran parte de la Patagonia, la zona donde hoy se encuentra la población PHB quedó cubierta por los hielos, según la línea que delimita la última gran glaciación (Hollin & Schilling, 1981). Es decir que la población actual sería producto de la recolonización post-glacial, con la consecuente reducción en la diversidad genética que conlleva el efecto fundador (Hewitt 2000). Los marcadores que permiten establecer diferencias filogenéticas (ITS y cpDNA) indicaron que las poblaciones SA y SB de Somuncura son muy diferentes al resto de las poblaciones de *F. pallescens*. Sin embargo, la población PHB es idéntica al resto de las poblaciones de la especie. Algunos trabajos sugieren que las filogenias realizadas con la región ITS deben ser analizadas con precaución dada la complejidad y la falta de predictibilidad de su comportamiento evolutivo (Alvarez & Wendel 2003). No obstante, se cree que la evolución concertada reduce la variación intragenómica entre las copias dentro de las repeticiones en tándem del gen ITS (Liao 1999), incluso existiendo variación en las mismas. Por lo tanto, el nivel de polimorfismo detectado en las poblaciones SA y SB de Somuncura es muy interesante.

Festuca pallescens y *F. argentina* presentan características morfológicas distintivas (Catalán & Müller 2012), pero poseen una gran variación fenotípica (Parodi 1953; Nicora 1978; Bertiller et al. 1990; Oliva et al. 1993) que muchas veces hace que sean difíciles de distinguir. Además, estas especies presentan diferentes características ecológicas. *Festuca pallescens* forma grandes pastizales en la Patagonia (por ejemplo, estepas altas o pastizales en peri-mallines), alcanzando grandes altitudes (1800 msnm, Catalán & Müller 2012). Por su lado, *F. argentina* se encuentra generalmente en parches dentro de distintos tipos de estepas (Bran et al. 2000), generalmente a altitudes comprendidas entre 270 y 700 m snm (Catalán & Müller 2012), en estepas arbustivo-graminosas de *Mulinum spinosum* y *Poa ligularis* o estepas graminosas de *F. pallescens*. Por lo tanto, los tamaños de población más pequeños en *F. argentina* podrían contribuir a un efecto de deriva genética más fuerte. Además, hacia el este del gradiente de estudio, las poblaciones de *F. pallescens* ocurren con menor frecuencia debido a la disminución de mallines (y aumento del déficit hídrico), encontrándose en los pocos peri-mallines o estepas de altura, donde predominan las condiciones húmedas (Bertiller et al. 1990;

Gaitán et al. 2010). En consecuencia, las poblaciones de Somuncura consisten en pastizales de altura en ambientes áridos, muy aislados geográficamente de otros pastizales de *F. pallescens* en el resto de Patagonia Norte.

Las relaciones filogenéticas y las distancias genéticas indican que las poblaciones de Somuncura están más próximas a la especie simpátrica *F. argentina* que a *F. pallescens*. Sin embargo, los microsatélites permitieron una distinción clara de cada una de las dos especies, así como entre las dos poblaciones. Además, se detectó un grado considerable de admixia en una de las poblaciones, lo que podría indicar que haya existido una hibridación entre estas especies. Por otra parte, los resultados morfo-anatómicos indicaron que las poblaciones de Somuncura tenían caracteres intermedios de ambas especies y caracteres que se asemejan tanto a una como a otra especie. Además, las poblaciones de *F. pallescens* de Patagonia Norte son genéticamente uniformes, ya que se observó una única secuencia ITS idéntica en todos los individuos. Por el contrario, las poblaciones de Somuncura son variables, mostrando seis secuencias ITS entre 10 individuos. También se detectó un alto nivel de polimorfismo en *F. argentina*: cada uno de los cuatro individuos muestreados tenían una secuencia diferente. Por otra parte, no se encontraron haplotipos de cloroplasto compartidos entre *F. pallescens* y Somuncura.

En vista del nivel de diferenciación detectado en las poblaciones de Somuncura, se podrían proponer tres posibles escenarios a) las poblaciones de Somuncura son en realidad *F. argentina*, b) son un ecotipo de *F. argentina*, y/o c) son híbridos entre *F. pallescens* y *F. argentina* y podrían estar en proceso de especiación.

Los resultados que apoyan la primera hipótesis se asocian a la estrecha relación genética con *F. argentina*, (i) ya que todos los análisis filogenéticos agrupan las poblaciones de Somuncura junto con *F. argentina* o constituyen una politomía con esta especie; (ii) el PCoA basado en datos de microsatélites agrupó la población SA muy cerca de *F. argentina*, y (iii) los individuos de Somuncura compartieron varios rasgos morfo-anatómicos con *F. argentina*. No obstante, en este trabajo se encontraron evidencias que dan sustento a la segunda hipótesis. En base a otros rasgos morfo-anatómicos, de características intermedias con *F. pallescens*, es posible que los individuos de Somuncura constituyan un ecotipo de *F. argentina*, genéticamente distinto y morfológicamente similar a *F. pallescens*. La diferencia más importante es la morfología de la lema: *F. argentina* difiere de otras especies del género debido a que su lema es mútica (Dubcovsky & Martínez 1988; Catalán & Müller 2012) y las lemas de Somuncura tenían una arista

minúscula en el ápice. Se encontraron además cuatro haplotipos y una gran variación genética en el marcador nuclear entre los individuos de Somuncura. Por último los resultados de agrupamiento obtenidos con STRUCTURE, PCoA y Neighbour Joining usando los loci de microsatélites apoyan esta segunda hipótesis (Figura 2.11) ya que claramente separaron a las poblaciones de Somuncura de las de *F. argentina*.

En áreas geográficamente aisladas y en ausencia de competidores, se promueve la existencia de radiaciones adaptativas (Simpson 1953, Stroud & Losos 2016). De hecho, el aislamiento biogeográfico de la meseta de Somuncura promovió la evolución de diferentes taxa endémicos (Leon et al. 1998, Chebez 2005, Andrade & Monjeau 2014). Por lo tanto, las poblaciones de Somuncura podrían ser un nuevo ecotipo de *F. argentina* desarrollado en este ambiente aislado. La radiación adaptativa ocurre gracias a la adquisición de "innovaciones clave" (Stroud & Losos 2016) que le proporciona a un clado la capacidad de adaptación mediante el aprovechamiento de los recursos disponibles. Por ejemplo, las poblaciones de Somuncura presentaron algunos rasgos morfo-anatómicos, como un pulvínulo calloso en la base de la lámina y una mayor proporción de esclerénquima bajo la epidermis abaxial que *F. argentina*. El esclerénquima es un tejido especializado que proporciona fuerza y apoyo a las hojas, especialmente en condiciones áridas con períodos de fuerte déficit hídrico que producen pérdida de turgencia celular, como los ambientes secos y ventosos de Somuncura. Además, puede mantener las hojas más erguidas promoviendo una estructura cespitosa constituyendo un tipo de bio-forma que le otorgaría a la planta una protección de la radiación directa y disminuiría la evapotranspiración (Oliva 1996). Todas estas características morfológicas están asociadas a la adaptación a la aridez (Moreno 2012).

Finalmente, la presencia de sitios polimórficos y un haplotipo de cloroplasto compartidos entre Somuncura y *F. pallescens*, las posiciones heterocigóticas entre *F. pallescens* y *F. argentina*, los alelos compartidos en loci de microsatélites y los rasgos morfo-anatómicos intermedios sugieren un posible proceso de hibridación. La cercanía a *F. argentina* podría deberse a un retrocruzamiento duradero hacia esta especie. Las poblaciones de Somuncura ocurren en estepas a 900-1100 m s.n.m. donde *F. pallescens* es abundante (Andrade & Monjeau 2014). Por el contrario, *F. argentina* es una especie dominante en estepas de suelo poco profundo en zonas más bajas (por ejemplo, laderas de la meseta) (Leon et al. 1998; Bran D. comunicación personal). Por lo tanto, las diferencias en altitud de los nichos ecológicos establecidos de cada especie podrían

actualmente crear una barrera a la reproducción. En el pasado, en cambio, sus distribuciones podrían haber coincidido promoviendo la hibridación y retrocruzamiento entre el híbrido y *F. argentina*. A pesar de ser especies alógamas con fecundación cruzada, las diferencias en los niveles de ploidía (*F. pallescens* 6x, *F. argentina* 4x) (Dubcovsky & Martínez 1991, 1992) podrían limitar su reproducción. La hibridación interespecífica entre especies con diferentes niveles de ploidía es infrecuente, pero posible ya que se informó en este género. Por ejemplo, *F. arundinacea* (alohexaploide) es el resultado del cruzamiento artificial entre *F. pratensis* (diploide) y *F. fenas* (alotetraploide) (Inda et al. 2014). Además, el complejo *Lolium-Festuca* obtenido a partir del cruzamiento de especies distantes de ryegrass y festuca, presentó una combinación de rasgos útiles de ambos progenitores y resultó en variedades comerciales estables y exitosas (Thomas & Humpreys 1991). Otro ejemplo es el pentaploide *Paspalum durifolium* Mez que comparte caracteres morfológicos y reproductivos intermedios con sus progenitores tetraploides y hexaploides, pero produce una pequeña cantidad de semillas, principalmente debido a la inestabilidad genética después de un comportamiento meiótico irregular (Quarín & Caponio, 1995).

Los análisis filogenéticos no apoyan plenamente que *F. pallescens* y *F. argentina* sean las especies parentales del potencial híbrido, y no podemos descartar la existencia de otras especies parentales en Somuncura. Además, aunque *F. pallescens* y *F. argentina* coexisten en algunos lugares a lo largo de su distribución natural, hasta donde sabemos, la hibridación interespecífica nunca ha sido reportada. Para confirmar esta hipótesis, son necesarios estudios citogenéticos que permitan evaluar aún más la posible hibridación e introgresión entre las dos festucas. La hibridación explicaría las diferencias encontradas entre SA1 y SB con respecto a SA2 (ver sección capítulo 2A). Sin embargo, si las poblaciones SA1 y SB son un ecotipo producto de una hibridación ancestral, las diferencias genéticas entre los individuos de estas poblaciones con los de SA2 deberían ser lo suficientemente importantes como para evitar un cruzamiento. Podría ocurrir que el ecotipo (poblaciones SA y SB) sólo se reproduzca con individuos de su propia población quedando aislados reproductivamente de otras poblaciones (Pfennig et al. 2016). Por lo tanto, con los datos obtenidos hasta el momento, sugerimos que las poblaciones de Somuncura serían un ecotipo de *F. argentina* originado a partir de una hibridación ancestral y una subsecuente introgresión, que difiere exomorfológicamente

en sus hojas glaucas, lemas con aristas cortas y presencia de un pulvínulo calloso en base foliar.

5.2. *Festuca pallescens* y poblaciones de *Somuncura* dentro de la filogenia de *Festuca*

El género *Festuca* ha sido muy estudiado (Torrecilla & Catalán 2002; Torrecilla et al. 2003; Catalán et al. 2004; Inda et al. 2008), pero el conocimiento de las relaciones filogenéticas de las festucas patagónicas es escaso (Oliva et al. 1993), y particularmente *F. pallescens* nunca fue incluida en las filogenias publicadas hasta el momento. La mayoría de los estudios en festucas patagónicas se centraron en análisis citogenéticos (Dubcovsky & Martínez 1988, 1991, 1992) y fisiológicos (e.g. Bertiller et al. 1990; Bertiller & Defossé 1990; Fernandez et al. 2006, 2007). Por lo tanto, nuestros resultados proporcionan información novedosa sobre las relaciones genéticas de *F. pallescens* con el resto de las festucas sudamericanas.

El estado de arte en la filogenia de *Festuca* reconoce 23 clados con 500 especies (Inda et al. 2014). Las especies patagónicas *Festuca subantarctica* y *Festuca purpurascens* pertenecen al clado de América I (Inda et al. 2008) como parte del clado de hojas finas (Catalan et al. 2004). Nuestros resultados mostraron que *F. pallescens* está fuertemente relacionada con estas dos especies, ya que formaron un clado hermano en los árboles de los análisis bayesianos de ambos marcadores moleculares y constituyeron una politomía (es decir, alta similitud genética) en la topología de los análisis de Máxima Parsimonia. No obstante, no se descarta la posibilidad que la existencia de politomias se deba a que los marcadores utilizados posean baja resolución. Por otro lado, los resultados obtenidos no son concordantes con estudios fenéticos y citológicos realizados en esta especie (Dubcovsky & Martínez 1988, 1991) donde *F. pallescens* y *F. purpurascens* no se agrupan. Por otra parte, las tres especies tienen áreas de distribución diferentes, pero solapadas en cierta medida: *F. subantarctica* se describió en el Lago Argentino, Santa Cruz (Inda et al. 2008), *Festuca purpurascens* se encuentra en los Andes, de Neuquén a Santa Cruz y *F. pallescens* ocurre desde Mendoza hasta el río Coyle en Santa Cruz (Nicora 1978). El análisis de otras especies de festucas patagónicas y/o la utilización de marcadores más variables podrían ayudar a resolver la politomía.

Por otro lado, el clado *Somuncura* - *F. argentina* está estrechamente relacionado con el clado asiático - americano, especialmente con las festucas norteamericanas, y muy

distante de las festucas patagónicas y andinas estudiadas hasta el momento (Inda et al. 2008). Además, Somuncura y *F. argentina* formaron una politomía, lo que podría deberse a las similitudes genéticas entre las secuencias, a la existencia de hibridación que produce radiación adaptativa (Seehausen 2004) o a la falta de evolución concertada (Bailey et al. 2003). Somuncura y *F. argentina* están más estrechamente relacionadas con algunas festucas norteamericanas (*F. subulata*, *F. dichoclada*, *F. kingii* y *F. altaica*, Fig. 2.9), con *F. breviglumis* y *F. amplissima* (ambas de México), y con *F. modesta* (Asia, Figura 2.9). *F. argentina* ha sido clasificada como festuca de hoja ancha (ver Inda et al. 2008 y sus referencias). Sin embargo, Somuncura y *F. argentina* también se relacionaron con *F. subulata* y *F. altaica*, que fueron descriptas como festucas de hojas anchas a finas, representando una transición entre los dos grupos principales. El rasgo de hoja ancha parece ser un carácter plesiomórfico (Catalán et al. 2007) que puede indicar tanto un origen antiguo de *Festuca argentina* como una especie reciente con un carácter ancestral. Las especies de hoja ancha han experimentado múltiples radiaciones desde el centro de origen y los cambios climáticos que ocurrieron hace 12 millones de años promovieron la diferenciación de sus ancestros (Inda et al. 2008). Las regiones áridas y semiáridas de Argentina son susceptibles a las fluctuaciones climáticas (Zarate & Tripaldi 2012) y las limitaciones ambientales en la meseta de Somuncura podrían haber promovido la variación genética detectada en las regiones de ITS y cpADN en esas poblaciones y haber desencadenado un proceso de especiación en el clado Somuncura. Por otra parte, los eventos de hibridación y poliploidización permitieron la colonización de zonas áridas durante los periodos glaciales e interglaciales del Pleistoceno en el Hemisferio Sur (Dubcovsky & Martínez 1992; Hewitt 1996). Aunque el muestreo de este trabajo está restringido a la Patagonia Norte, una hipótesis plausible podría ser que *F. pallescens* se haya originado durante ese periodo geológico en la Patagonia, tal como se ha propuesto para los clados poliploides americanos I y II (Inda et al. 2008).

6. CONCLUSIÓN

La variabilidad genética observada en las dos poblaciones dentro del área protegida en la meseta de Somuncura indicaría la existencia de procesos evolutivos que podrían desencadenar eventos de especiación en las festucas patagónicas. A pesar de tener algunas características exomorfológicas similares y alelos compartidos con *F. pallescens*,

la mayoría de las evidencias indican que las poblaciones de Somuncura no corresponden a *F. pallescens*. Si bien se necesitan más estudios para dilucidar las relaciones filogenéticas entre las festucas patagónicas, las poblaciones de Somuncura podrían ser un ecotipo de *F. argentina* originado a partir de una introgresión antigua con *F. pallescens* y que actualmente se diferencia morfológica y genéticamente de *F. argentina* (es decir, un endemismo estrecho) (Kruckeberg & Rabinowitz 1985).

Por otro lado, el marcador de la región ITS indicó que la población PHB de Península Huemul es *Festuca pallescens*, pero los microsatélites muestran que es genéticamente muy diferente al resto de las poblaciones de la especie. En la figura 2.6 se observa el límite de las glaciaciones del Plioceno y Pleistoceno así como también las transgresiones marinas del Mioceno. Las únicas poblaciones que quedaron bajo estos límites fueron las poblaciones de Península Huemul, el resto de las poblaciones se encuentra por fuera de los límites de estos dos eventos. La población PHA de este sitio, se encuentra a mayor altitud que PHB, con lo cual es posible que haya quedado como refugio de altura y conectada con el resto de las poblaciones de la especie, pero PHB habría quedado cubierta por los glaciares. Estas apreciaciones surgen de los análisis genéticos, los cuales indican que el flujo génico entre PHA y el resto de las poblaciones de *F. pallescens* sería alto. Por lo tanto, a partir de los resultados obtenidos en ambas secciones de este capítulo, se sugiere que las diferencias genéticas de la población PHB son consecuencia de los eventos ocurridos durante las últimas glaciaciones. Esta población puede haber quedado cubierta por los hielos y ser producto de una recolonización post-glacial.

El estudio de las relaciones filogenéticas entre las poblaciones de *Festuca pallescens* de Patagonia Norte permitió comprender las causas de la alta diferenciación encontrada en las poblaciones de la Meseta de Somuncura. En este capítulo se generó información novedosa sobre los procesos que podrían haber ocurrido en la isla biogeográfica contribuyendo así con la escasa información que existe sobre las relaciones filogenéticas de las especies de festucas patagónicas.

CAPÍTULO 3

Requerimientos térmicos e hídricos para la germinación de semillas de poblaciones de *Festuca pallescens*

1. INTRODUCCIÓN

La desertificación afecta a las regiones áridas, semiáridas y subhúmedas de todo el mundo por la influencia tanto del cambio climático como de las actividades humanas (Reynolds et al. 2016). Estos ecosistemas están dominados por gramíneas perennes con baja capacidad para superar rápidos cambios ambientales (Chapin 1993). El potencial adaptativo de estas especies dependerá, en gran medida, del éxito de la regeneración que surge a través de la reproducción sexual, la cual aportará nuevas combinaciones alélicas, y por lo tanto diversidad genética potencialmente adaptativa a las nuevas condiciones ambientales. Por lo tanto, la capacidad de producir semillas viables que logren germinar, establecerse y afrontar las presiones ambientales es de vital relevancia para la persistencia de las especies en escenarios climáticos variables. El establecimiento de la planta luego de la germinación constituye una de las etapas más vulnerables del ciclo de vida de las plantas (Alvarado & Bradford 2002), y el éxito del establecimiento cobra particular importancia en especies de pastizales de ambientes áridos, donde la germinación es errática o episódica (O'Connor 1991; Rotundo et al. 2015). Aunque muchas especies de gramíneas tienen propagación vegetativa, la adaptabilidad depende de la diversidad genética y, por lo tanto, de la reproducción sexual. Entonces, comprender la germinación en relación con las condiciones ambientales puede ayudar a predecir adaptación, en particular si se ensayan diferentes orígenes de semillas en un ambiente común (Donohue et al. 2010).

La germinación es un proceso crítico en el ciclo de vida de las plantas que implica cambios drásticos como el pasaje de un estado quiescente y protegido a un estado de activo crecimiento expuesto a las condiciones ambientales (Donohue et al. 2010). Se encuentra altamente regulada e influenciada por el ambiente, por lo tanto constituye una etapa que se encuentra bajo fuerte presión de selección (Pendleton & Meyer 2004; Donohue et al. 2005). La variación en la germinación de numerosas especies está asociada

al hábitat sugiriendo la existencia de adaptaciones locales (Basking & Baskin 1998). Más aún, respuestas en la germinación ante alteraciones ambientales de origen antrópico indican que la germinación puede evolucionar rápidamente acompañando dichos cambios (e.g. Itoh et al. 1997; Ferasol et al. 1995; Rout et al. 2000). Estos eventos están modulados tanto por factores genéticos como ambientales (Pendletoe & Meyer 2004), entre los que la temperatura y la humedad del suelo son críticos (Lacey 1996; Murray et al. 2004).

La temperatura puede ser considerada como uno de los principales factores que regula la germinación de las semillas sin dormición (Alvarado & Bradford 2002) debido a que desempeña un papel importante en la velocidad de la tasa de germinación (Moot et al. 2000; Batlla & Benech-Arnold 2015). Los modelos de cambio climático predicen que para los próximos años habrá un incremento en la temperatura media, alteraciones en las precipitaciones y un aumento en la frecuencia de eventos extremos, tales como sequías y años húmedos (Schwinning & Sala 2004; IPCC 2014). Teniendo en cuenta que los parámetros fisiológicos de las semillas que determinan la germinación están bajo control genético (Bradford 1995), el aumento de las temperaturas globales podría tener un fuerte impacto en poblaciones adaptadas localmente. En consecuencia, puede esperarse que especies con distribución amplia y cubriendo ambientes heterogéneos, muestren gran variabilidad en la respuesta de la germinación de sus poblaciones a factores ambientales específicos.

Para conocer los factores que modulan la germinación existen modelos que permiten evaluar la respuesta de las semillas a la temperatura y a la disponibilidad de agua en el suelo a nivel de población: los modelos umbrales de Tiempo Térmico (García-Huidobro et al. 1982) y de Tiempo Hídrico (Bradford 1995). Estos modelos permiten predecir el momento en que ocurrirá la germinación de distintas fracciones de semillas de la población cuando éstas están sometidas a regímenes de temperatura (modelo de Tiempo Térmico) o humedad (modelo de Tiempo Hídrico) (Bradford 2002). Los modelos constituyen herramientas útiles que han sido ampliamente utilizadas en el control de malezas (Ustarroz et al. 2015; Sharifiamina et al. 2016) y / o cultivos hortícolas (Alvarado & Bradford 2002; Bakhshandeh et al. 2015), así como en especies forrajeras nativas (por ejemplo en pastizales sudamericanos, Rotundo et al. 2015). Los parámetros poblacionales obtenidos a partir de estos modelos caracterizan cuantitativamente los requerimientos hídricos y térmicos de la germinación. Estos coeficientes están asociados a las respuestas

germinativas de las plantas en diferentes condiciones ambientales o con diferentes orígenes genéticos (Alvarado & Bradford 2002; Herdegrete et al. 2003).

El modelo de tiempo térmico describe dos parámetros térmicos: *el tiempo térmico* (θ_T), definido como la acumulación de grados-días ($^{\circ}\text{Cd}$) requeridos para la germinación sobre una *temperatura base* (T_b), la cual constituye la temperatura mínima requerida para la germinación. Por debajo de T_b , la germinación no ocurre. Paralelamente, el modelo de Tiempo hídrico presenta dos parámetros hídricos: el *tiempo hídrico* (θ_H) determinado por las unidades de potencial agua acumuladas (MPa) sobre un valor umbral de *potencial agua base* (ψ_b), el cual constituye el requerimiento hídrico mínimo para que ocurra la germinación (la explicación detallada de la obtención de cada parámetro se describe en las secciones 3.3 y 3.4). Estos métodos se han utilizado en especies de pastizales para predecir diferencias en la germinación acumulada en varios escenarios de temperatura (Hardegrete et al. 1999; Moot et al. 2000; Rotundo et al. 2015), así como bajo distintas condiciones hídricas (Rotundo et al. 2015; Sharifiyamin 2016).

La estepa patagónica constituye la extensión de ecosistemas áridos más grande y más meridional de América del Sur (Palazzesi et al. 2014) y se caracteriza por fuertes gradientes climáticos ya descritos en el Capítulo 1. En particular, los gradientes latitudinal y altitudinal determinan el patrón espacial de temperatura (Villalba et al. 2003) y el pluviométrico, en sentido oeste – este, determina la disponibilidad de agua (León et al. 1998; Bran et al. 2000). Además, en la meseta central de la Patagonia, se alcanzan las amplitudes térmicas anuales y diarias más grandes por su ubicación distante tanto del océano Pacífico como del océano Atlántico (Bianchi et al. 2016). Por lo tanto, estas dos características determinan la orientación de las isotermas en una dirección dominante noroeste-sureste. La temperatura media anual varía de 14°C en el noreste a 10°C en el suroeste, con mínimas de alrededor de 6°C en las elevaciones de los Andes. La amplitud térmica anual oscila entre 16°C en el centro de la meseta central de Patagonia y 10°C en el suroeste, cerca de la costa del Pacífico (Garreoud et al. 2009). Por otra parte, en la cordillera y pre-cordillera, las precipitaciones alcanzan entre 2000-3000 mm por año por lo que la disponibilidad de agua sería un recurso menos limitante que en la estepa patagónica, en donde las precipitaciones son estocásticas y mucho más bajas (150-200 mm). En la estepa patagónica, el agua es el principal factor limitante (Oosterheld et al. 1998).

La especie objeto de estudio de esta tesis, *Festuca pallescens*, produce una abundante cantidad de *semillas* que germinan bajo una amplia gama de temperaturas inmediatamente después de la dispersión, lo que sugiere la ausencia de dormición (Soriano 1960; Defossé et al. 1994). La mayoría de los estudios en esta especie se centraron en el banco de semillas y el establecimiento de plántulas en condiciones de campo (Bertiller 1992; Bertiller & Coronato 1994, Defossé et al. 1994; Bertiller 1996; Bertiller & Aloia 1996) y evaluando la sobrevivencia y desarrollo de plántulas en condiciones de déficit hídrico en laboratorio (Bertiller et al. 1994). Dadas las grandes amplitudes térmicas y el marcado gradiente de precipitación que caracterizan el área de distribución de la especie, así como la incidencia que estos tienen en la germinación de las semillas, resulta de interés generar conocimientos sobre cómo las poblaciones de *Festuca pallescens* de distintos ambientes responden a los cambios de temperatura y humedad. En este capítulo se presenta una evaluación de la germinación de *Festuca pallescens* con un nuevo enfoque basado en las interpretaciones ecológicas de modelos matemáticos. Se plantea la siguiente hipótesis de trabajo:

HIPÓTESIS

Las grandes amplitudes térmicas y el marcado gradiente de precipitación en Patagonia Norte condicionan los requerimientos térmicos e hídricos de la germinación de las *semillas* de las poblaciones de *Festuca pallescens*. En este sentido, existirán diferencias entre las poblaciones que provengan de ambientes más húmedos (e.g. la cordillera y pre-cordillera), respecto a las de origen más árido (e.g. estepa patagónica) debido a la existencia de adaptaciones que condicionen la germinación en cada sitio al momento temporal más adecuado.

PREDICCIÓN

Los parámetros poblacionales determinados a través de los modelos de umbrales de Tiempo térmico y de Tiempo hídrico (Temperatura base, tiempo térmico, potencial agua base y tiempo hídrico) mostrarán diferencias significativas entre las poblaciones de *Festuca pallescens* asociados al tipo de ambiente del que provengan.

2. OBJETIVO:

El objetivo específico de este capítulo es cuantificar la variación intraespecífica en los requerimientos para la germinación de poblaciones de *Festuca pallescens* de Patagonia Norte a través de modelos umbrales de tiempo térmico (Bradford 2002) y de tiempo hídrico. Luego, se correlacionarán los parámetros poblacionales térmicos e hídricos obtenidos a partir de cada modelo con los factores ambientales del rango de distribución natural de las poblaciones.

3. METODOLOGÍA

3.1. Material vegetal

Para los modelos desarrollados en este capítulo se utilizaron *semillas* colectadas de 9 poblaciones (PHA, PHB, SRA3; SRB, PA, PB, JA, JB y SA2, ver Tabla 1.1 Capítulo 1) de *Festuca pallescens* durante enero de 2014 y enero de 2015. La recolección de semillas fue a nivel poblacional (*bulk*) y al volver del campo se almacenaron en oscuridad a 4° C hasta su uso.

En primer instancia se determinó el peso de mil semillas tomando cuatro repeticiones de 100 semillas cada una para cada población y se analizó la variación entre poblaciones con un análisis de la varianza con heterogeneidad de varianzas en el programa estadístico InfoStat (Di Rienzo et al. 2016). Antes de iniciar los ensayos de germinación se evaluó la viabilidad promedio del lote de *semillas* de cada población mediante la prueba de tetrazolio (Moore 1966) (Figura 3.1).

3.2. Evaluación de la germinación

Las *semillas* que estaban almacenadas en oscuridad a 4 °C, se esterilizaron superficialmente con hipoclorito de sodio (1%) durante 1,5 min y se enjuagaron con el fungicida VITAVAX-FLO (Luján Agrícola, Argentina) antes de ser colocadas en placas de Petri de 9 cm de diámetro, sobre algodón (modelo de tiempo térmico) o papeles de filtro (modelo de tiempo hídrico) humedecido con 5 ml de una solución acuosa que contenía VITAVAX-FLO al 1% (ver resultados Figura 3.1). Para los modelos de tiempo térmico las cajas de Petri se colocaron en cámaras de cultivo a cinco temperaturas

diferentes (5, 7, 10, 12,5 y 15,5° C), mientras que para los modelos de tiempo hídrico se evaluaron 4 potenciales hídricos (0, -0,8, -1, 1,6 MPa). Los distintos Ψ se generaron mediante la imbibición de papeles de filtro dentro de cajas de Petri con distintas soluciones de Polietilenglicol (PEG 6000)/agua, de acuerdo a las ecuaciones de Mitchel (1983). Las soluciones de PEG se midieron con un osmómetro para confirmar los potenciales hídricos de trabajo. El cambio de los papeles de filtro y las soluciones PEG se realizó cada 96 h con el fin de evitar la modificación en los potenciales hídricos de trabajo por la absorción de moléculas de agua en los papeles de filtro. Los ensayos de Tiempo Térmico (realizados previamente a los de Tiempo Hídrico) indicaron que la temperatura a la que se observó el mayor porcentaje de germinación fue 15,5°C, por lo tanto los ensayos de tiempo hídrico se realizaron a esta temperatura. En ambos modelos se utilizaron 4 réplicas de cada condición (temperatura o potencial hídrico) para cada población. A partir de la prueba del tetrazolio (Moore 1966), se utilizó la viabilidad promedio de cada lote de semillas para calcular la cantidad de semillas que debían incluirse en cada réplica con el fin de lograr al menos 40 semillas viables por placa para cada ensayo. Una *semilla* se consideró germinada después de la protrusión de la radícula. Para la generación de las curvas de germinación en función del tiempo, se monitoreó la germinación de las semillas a las diferentes temperaturas y potenciales hídricos cada dos días durante 80 días. Al final del experimento, se evaluó la viabilidad de las semillas no germinadas con una prueba de tetrazolio y sólo las semillas con embriones teñidos de rojo se consideraron para la estimación del porcentaje de germinación.

3.3. Modelo de tiempo térmico:

El tiempo térmico (θ_T) se define como la acumulación de grados-días (° Cd) requeridos para la germinación sobre una temperatura base, y la temperatura base (T_b) es la temperatura mínima por encima de la cual ocurre la acumulación de grados-días para la germinación, por lo tanto, debajo de la cual no ocurre germinación. La temperatura base y el tiempo térmico permiten calcular y comparar las tasas de desarrollo de los procesos a cualquier temperatura dada entre diferentes especies o poblaciones (Trudgill et al. 2005). La temperatura base es una de las tres temperaturas cardinales que caracterizan el rango térmico de germinación de las semillas (Batlla & Benech-Arnold 2015; Arana et al. 2015). Las otras dos temperaturas son la temperatura óptima (T_o) y la temperatura crítica (T_c), siendo T_c la temperatura por encima de la cual no se produce la

germinación y T_o la temperatura a la cual la tasa de germinación es máxima (Bewley & Black 1994; Bewley et al. 2013). Una temperatura base constante para la población implica que las semillas sin dormición (o, por lo menos, la fracción de la población que no presenta dormición) deberían alcanzar una germinación casi completa una vez que la temperatura excede a dicha T_b , mientras que en temperaturas entre la T_o y T_c la tasa de germinación disminuye con el aumento de la temperatura, hasta que en temperaturas iguales o superiores a la T_c , no ocurre germinación (García-Huidobro 1982). Entre T_b y T_c , la temperatura sólo modula la tasa de germinación de las semillas (Batlla & Benech-Arnold 2015). En general, en semillas sin dormición hay poca variación en la T_b entre semillas de una misma población, con lo cual se considera a este parámetro como constante, aunque hay casos en que se ha reportado como variable (Labouriau & Osborn 1984; Kebreab & Murdoch 2000; Chantre et al. 2009). Si la T_b es constante, se utiliza el modelo de Covell & Ellis (1986) para calcular el resto de los parámetros de tiempo térmico; si la T_b varía entre las distintas fracciones de la población, se utilizan modelos del tipo descrito en Chantre et al. (2009).

3.3.1. Estimación de la temperatura base (T_b) de germinación y evaluación de su variabilidad en diferentes fracciones de la población mediante regresiones lineales

Las curvas de germinación acumulativa obtenidas a diferentes temperaturas se utilizaron en primer lugar para estimar el tiempo necesario para completar la germinación de los percentiles de cada subpoblación de semillas 30, 50, 70 y 90%. Para ello, se ajustaron los datos de germinación acumulada en la ecuación de Gompertz:

$$Y = C * \exp (-\exp (-B * (X-M)))$$

donde C , B y M son parámetros de la ecuación. La tasa de germinación ($1 / dg$) se consideró como la inversa del tiempo de germinación para una fracción dada, donde dg es la germinación de la fracción g de la población medida en días ($dg = M - (\log_e - \log_e Y / C)$) (Arana et al. 2015). La tasa de germinación (TG) está linealmente relacionada con la temperatura de incubación, por lo que se realizó una regresión lineal de TG en función de la temperatura para definir T_b . La T_b se obtiene de la intercepción de la regresión en el

eje de las temperaturas cuando $TG_{(g)} = 0$; por debajo de esta temperatura no se produce la germinación en semillas sin dormición. En el caso de *Festuca pallescens*, la mayor parte de las poblaciones mostraron poca variación en la T_b entre las distintas fracciones de semillas de cada población (variación menor a 1°C , excepto para SR4, JA y SA2: PHA 1.5 ± 0.05 ; PHB 0.57 ± 0.3 ; SR3 0.22 ± 0.7 ; SR4 -1.48 ± 0.56 ; PA -0.47 ± 0.23 ; PB -1.63 ± 0.05 ; JA 2.46 ± 0.4 ; JB -0.34 ± 0.24 ; SA2 1.78 ± 0.34), por lo que la T_b se consideró un valor constante dentro de las poblaciones. Luego, una vez que los rangos de T_b fueron identificados, se re-calcularon las regresiones lineales para cada población, con la restricción de pasar por una T_b común para todas las subpoblaciones. Para cada cálculo independiente, se incrementaron los valores de T_b en $0,5^\circ\text{C}$ y se seleccionó el valor de T_b con el mejor ajuste (el menor valor para la suma del error estándar de la media) para cada población (ver resultados Figura 3.3). Las curvas de germinación acumulada y las regresiones lineales se realizaron empleando Premiun Solver 7.0 (Frontline Systems, Inc).

3.3.2. Estimación de los parámetros térmicos de la población

La T_b mostró poca variación entre las diferentes fracciones de las subpoblaciones y *F. pallescens* no presenta dormición (Soriano 1960; Defossé et al. 1995). Por este motivo, se utilizaron las curvas de germinación en función del tiempo obtenidas experimentalmente para evaluar el ajuste de diferentes modelos de tiempo térmico de germinación en la predicción de la respuesta de germinación a temperaturas de incubación constantes. Se evaluó el ajuste de un modelo de tiempo térmico que asumió que T_b es constante para toda la población de semillas y que el θ_T (el tiempo térmico que se requiere acumular para completar la germinación de la población en el rango térmico sub-óptimo) se distribuye normalmente con una media ($\theta_{(50)}$) y su desviación estándar (σ_θ) (Covell et al. 1986; Ellis et al. 1986; Banech-Arnold et al. 1990). En este modelo, el tiempo térmico requerido para la germinación de una fracción dada de la población se calcula como:

$$\theta_g = (T - T_b) t_g \text{ [Ecuación 1]}$$

donde θ_g es el tiempo térmico necesario para completar la germinación de la fracción g de la población, T es la temperatura ambiente, T_b es la temperatura base y t_g es el tiempo requerido para completar la germinación de la fracción g de la población.

La proporción de semillas germinadas en una fracción determinada se calcula de la siguiente forma:

$$p(\theta_{Tg}) = \Theta[(\theta_{(g)} - \theta_{T50}) / \theta_{Tg}] \quad [\text{Ecuación 2}]$$

donde p es la proporción de semillas germinadas en un tiempo térmico determinado θ_g que es característico de la fracción g de la población, Θ es la integral de probabilidad normal, y θ_{T50} y θ_g son la media y la desviación estándar de la distribución normal, respectivamente. Se estimó un único valor de T_b , $\theta_{T(50)}$ y $\sigma_{\theta T}$ (desviación estándar del tiempo térmico) para cada réplica biológica empleando un método de ajuste de curvas por mínimos cuadrados no lineales (Premium Solver Platform 7.0, sistemas Frontline, Incline Village, NV, EE.UU.). Para evaluar si los parámetros T_b y $\theta_{(50)}$ eran diferentes entre las poblaciones, se realizó un ANOVA con heterogeneidad de varianzas en InfoStat (Di Rienzo et al. 2016).

3.3.3. Experimentos de validación bajo condiciones naturales

En condiciones de campo, la germinación de *F. pallescens* ocurre luego de la dispersión de las *semillas* (Bertiller 1992), cuando se produce la disminución de las temperaturas del suelo y el aumento de las precipitaciones (Defossé et al. 1995), tanto durante el otoño como en la primavera (Bertiller & Coronato 1994). Por lo tanto, para validar los resultados obtenidos bajo condiciones controladas, se sembraron en abril de 2016 tres repeticiones biológicas de cada población en una parcela de 0,9 m x 5,5 m en la Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria de Bariloche (INTA, EEA Bariloche). La parcela se dividió en cinco subparcelas (0,9 m x 0,6 m) que contenían seis repeticiones biológicas en cuadrados de 0,09 m² y dentro de las sub-parcelas se sembraron setenta y cinco semillas de cada población (excepto la población de Somuncura (SA2), en la que la producción de *semillas* era escasa, y se usaron 30 *semillas* por repetición) en líneas, a 1 cm de profundidad. Debido a que en experimentos de campo no es posible utilizar la protrusión de radículas para evaluar la germinación, se consideró una *semilla* germinada cuando el coleóptilo era visible en la superficie del suelo (Moot et al. 2010). Se contó el número de plántulas emergidas cada dos días durante un período de 40 días con el fin de cuantificar la

germinación en condiciones naturales. Se utilizó la germinación media acumulada de las tres repeticiones y se generaron las curvas de germinación en función del tiempo como se indicó anteriormente. Luego, se comparó la germinación en condiciones naturales con la germinación teórica estimada por el modelo de tiempo térmico. Las condiciones ambientales (temperatura del suelo y humedad) fueron monitoreadas con un datalogger de cuatro canales cada sesenta minutos (Cadavidaces mililogger4), además de contar con los datos de la estación meteorológica de Bariloche (<http://sipan.inta.gob.ar>). En todos los casos, la evaluación del ajuste entre los datos observados y predichos se realizó mediante la estimación del coeficiente de determinación (R^2), descrito por la siguiente ecuación:

$$R^2 = 1 - [\sum (y_{obs} - y_{pred})^2 / \sum (y_{obs} - \bar{y}_{obs})^2] \text{ [Ecuación 3]}$$

3.3.4. Correlaciones entre los parámetros del modelo de Tiempo Térmico y las variables ambientales

Para estudiar posibles asociaciones entre la respuesta de las *semillas* de las diferentes poblaciones de *Festuca pallescens* a la temperatura con factores ambientales que caracterizan sus ambientes naturales, se analizaron correlaciones entre los parámetros térmicos de cada población y las variables ambientales de sus zonas de origen. Las variables ambientales fueron obtenidas de Worldclim (www.worldclim.com). Se evaluaron asociaciones entre T_b , θ_{50} y σ_{θ} con las siguientes variables climáticas: temperatura media anual, temperatura estacional media (especialmente durante el período de germinación de la especie, primavera y otoño), estacionalidad por día (la diferencia entre el máximo y el mínimo de la temperatura de la media mensual), estacionalidad por año (la diferencia entre la temperatura máxima del mes más cálido y el más frío). Además, se analizaron asociaciones entre T_b , θ_{50} y σ_{θ} con las variables geográficas (altitud, longitud, latitud) y con el peso de mil *semillas* de cada población. Conjuntamente se realizaron correlaciones entre el peso de mil *semillas* y el porcentaje y tasa de germinación para 5, 10 y 15,5°C. Las correlaciones se efectuaron mediante regresiones lineales con el programa GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com y luego se evaluó la significancia con el ajuste de R^2 según la ecuación 3.

3.4. Modelo de Tiempo Hídrico:

Este modelo describe los parámetros hídricos que caracterizan los requerimientos de una población de semillas para germinar. Gummerson (1986) y Bradford (1990) propusieron un modelo de Tiempo Hídrico para describir la tasa de germinación de las semillas en respuesta al potencial hídrico. El tiempo hídrico (θ_H , medido en Mega Pascales por día (MPa-días)) puede definirse como las unidades de potencial agua acumuladas (MPa) sobre un valor umbral de potencial agua base (ψ_b) multiplicados por el tiempo de exposición de las semillas a cierto potencial hídrico, y se encuentra relacionado con el tiempo necesario para que una semilla germine en función de la diferencia entre el potencial hídrico del ambiente (ψ) y el potencial hídrico base (ψ_b) de la forma descrita en la ecuación 4. El ψ_b es el contenido hídrico mínimo o umbral para que ocurra la germinación, y sobre el cual las semillas acumulan θ_H para completar la germinación (Gummerson 1986; Bradford et al. 2002). En general, los valores de ψ_b , a diferencia de la T_b , varían en la población de semillas, por lo tanto, las tasas de germinación también varían y la uniformidad de la germinación se mide con el desvío estándar del ψ_b (σ_{ψ_b}). Es decir, los desvíos estándar describen la distribución del Ψ_b dentro de una población de semillas, con lo cual a menores valores de σ_{ψ_b} , mayor uniformidad en la distribución del Ψ_b . Este modelo es una herramienta útil para predecir el potencial de germinación de un lote de semillas cuando la disponibilidad hídrica es el factor limitante para la germinación (Bradford & Ellis 2004).

3.4.1. Estimación del potencial hídrico base (ψ_b) de germinación y evaluación de su variabilidad en diferentes fracciones de la población mediante regresiones lineales

Las curvas de germinación acumulada obtenidas con los cuatro potenciales hídricos se utilizaron en primer lugar para estimar el tiempo necesario para completar la germinación de los percentiles de subpoblación 30, 50, 70 y 90%. Para ello, se ajustaron los datos de germinación acumulada utilizando la ecuación de Gompertz y se calculó la tasa de germinación de la misma forma que para el modelo de tiempo térmico (ver sección 3.3.1). La tasa de germinación (TG) está linealmente relacionada con el potencial hídrico, por lo que se realizó una regresión lineal de TG en función de los potenciales hídricos para definir ψ_b . El ψ_b se obtiene de la intercepción de la regresión en el eje de los

potenciales hídricos cuando $TG_{(g)} = 0$; por debajo de este potencial hídrico no se produce la germinación en semillas sin dormición. Las curvas de la germinación acumulada y las regresiones lineales se realizaron empleando GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com.

Para determinar si los potenciales hídricos base varían dentro de las poblaciones de *semillas*, se realizaron regresiones lineales de los percentiles de cada subpoblación (5 al 90%) para los potenciales hídricos utilizados en el ensayo en función de la tasa de germinación (TG) (ver resultados Figura 3.5). Debido a que JA, JB y SA2 no alcanzaron la germinación completa a -1,6MPa, se interpolaron los valores de los percentiles faltantes para calcular las regresiones para luego evaluar si las regresiones eran paralelas entre sí. Para ello, se realizó la comparación de las pendientes mediante una prueba de hipótesis a dos colas con una hipótesis nula de pendientes iguales con un valor de significancia del 5% mediante el programa GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software, San Diego California USA, www.graphpad.com. Luego, se evaluó la intercepción de las regresiones en el eje X para cada población utilizando un segundo valor de probabilidad calculado a partir de la prueba de hipótesis para las pendientes con el mismo software. Todas las regresiones lineales de la tasa de germinación para cada población en función al potencial hídrico resultaron paralelas entre sí interceptando el eje de los potenciales en $TG=0$ en diferentes valores de ψ , (ver resultados Figura 3.5) con la excepción de (SRA3 y JA). Entonces, debido a que 7 de las 9 poblaciones analizadas presentaron regresiones lineales paralelas entre sí para los percentiles 5-90%, se consideró al θ_H como un valor constante definido como la pendiente de las regresiones ($1/\theta_H$) y al ψ_b , variable en las fracciones de la población de *semillas*. Por lo tanto, se calcularon los parámetros del modelo de Tiempo Hídrico a partir del modelo de Gummerson (1986).

3.4.2. Estimación de los parámetros hídricos:

El modelo de Tiempo Hídrico asume que los potenciales base se distribuyen normalmente en las fracciones de la población con una media (ψ_{b50}) y un desvío estándar ($\sigma_{\psi b}$), el tiempo hídrico se define entonces de la siguiente manera:

$$\theta_H = [\psi - \psi_{b(g)}]/tg \quad \text{[Ecuación 4]}$$

donde θ_H es la constante del tiempo hídrico (MPa día), ψ es el potencial de agua de trabajo, $\psi_{b(g)}$ es el potencial de agua de base (MPa) definido para una fracción de germinación específica g , y t_g es el tiempo (d) en el cual emerge la radícula de la fracción g de la población de *semillas*. La ecuación 3 se reformula para ilustrar la relación entre el ψ y la tasa de germinación ($TG_g = 1/t_g$, la inversa del tiempo de emergencia de la radícula) de la fracción g de la población de *semillas*, quedando la siguiente ecuación:

$$TG_g = 1/t_g = [\psi - \psi_{b(g)}] / \theta_H \quad [\text{Ecuación 5}]$$

Se estimaron los valores de $\psi_{b(g)}$, θ_H y $\sigma_{\psi b}$. Se calculó un único valor de $\psi_{b(g)}$, θ_H y $\sigma_{\psi b}$ para cada réplica biológica empleando un método de ajuste de curvas por mínimos cuadrados no lineales (Premium Solver Platform 7.0, sistemas Frontline, Incline Village, NV, EE.UU.). Para evaluar si los parámetros $\psi_{b(g)}$, θ_H y $\sigma_{\psi b}$ eran diferentes entre las poblaciones, se realizó un ANOVA con heterogeneidad de varianzas en InfoStat (Di Rienzo et al 2016).

3.4.3. Correlaciones entre los parámetros del modelo de Tiempo Hídrico y las variables ambientales

Se generaron correlaciones entre los parámetros hídricos de cada población y las variables ambientales de los sitios donde se muestrearon. Las variables ambientales fueron obtenidas de Worldclim. Se buscaron asociaciones entre ψ_b , θ_H y $\sigma_{\psi b}$ con las siguientes variables climáticas: precipitación en los meses más húmedos, precipitación en los meses más secos, precipitación del trimestre más lluvioso, coeficiente de variación de la precipitación estacional (CV del rango de variación de la precipitación anual), precipitación del trimestre más frío y más cálido, precipitación del trimestre más húmedo y del más seco. Además, se buscaron asociaciones entre ψ_b , θ_H y $\sigma_{\psi b}$ con las siguientes variables geográficas: altitud, longitud y latitud de cada población. Para evaluar las correlaciones se realizaron regresiones lineales con el software Premium Solver Platform 7.0 (sistemas Frontline, Incline Village, NV, EE.UU) y luego se evaluó la significancia con el ajuste de R^2 de la ecuación 3.

4. RESULTADOS

Los modelos umbrales de Tiempo Térmico y de Tiempo Hídrico mostraron que existen diferencias significativas en los parámetros poblacionales θ_T y θ_H , entre las *semillas* de las poblaciones de *Festuca pallescens*. Estos parámetros se correlacionaron significativamente con algunas de las variables ambientales analizadas. El peso y la viabilidad de las *semillas* de *Festuca pallescens* difirieron entre las poblaciones, sin embargo todas las *semillas* presentaron altos porcentajes de germinación final en la mayoría de los tratamientos.

4.1. Viabilidad y peso de mil semillas

Las *semillas* de las poblaciones de *Festuca pallescens* mostraron, en general, altos porcentajes de viabilidad con la prueba de tetrazolio (PHA=57%, PHB=72%; SRA3=62,5%; SRB=93%, PA=71%, PB=93%, JA=77%, JB=77%) (Figura 3.1a). El peso de 1000 *semillas* osciló entre 0,8 y 2 g, siendo más pesadas las *semillas* de las poblaciones de sitios altos, con excepción de JA que fue la población con menor peso ($F=27,7$; $p < 0,001$). Las diferencias entre poblaciones se detectaron con un test a posteriori de Tuckey ($p < 0,05$).

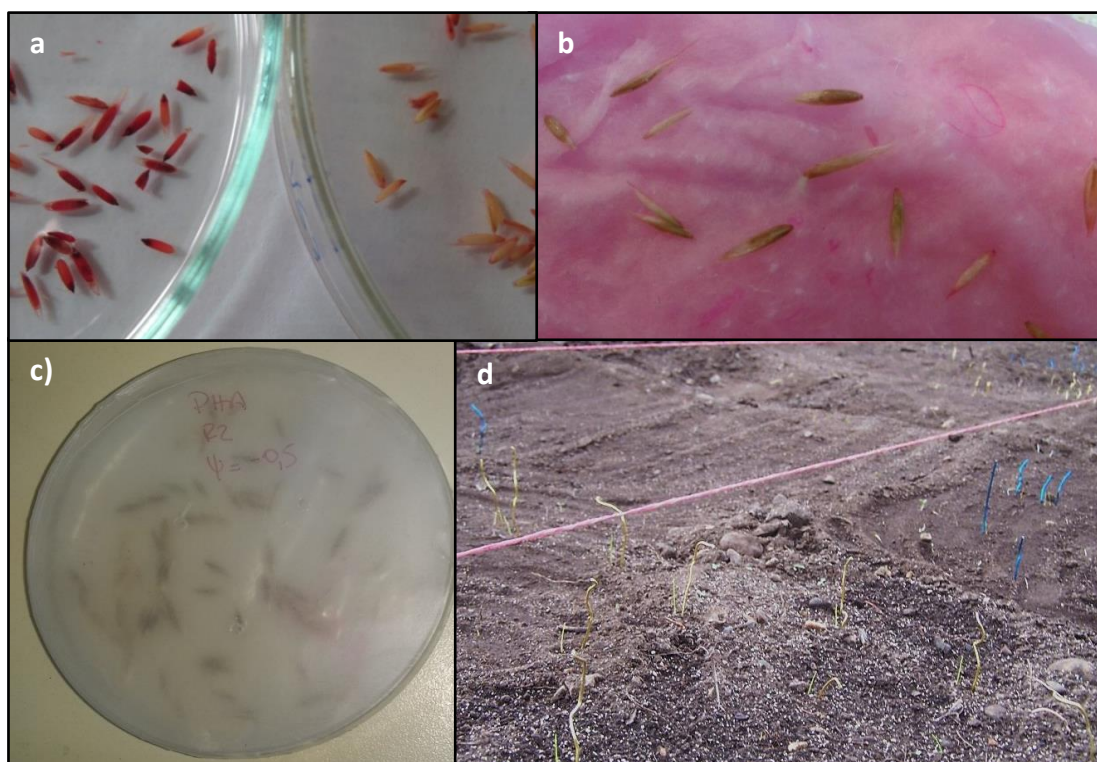


Figura 3.1: **a)** Prueba de tetrazolio para determinar la viabilidad en *semillas* de *F. pallescens*. Se observan las *semillas* vivas (rojas) con el embrión teñido con un rojo intenso a la izquierda y las *semillas* muertas (sin teñir) a la derecha. **b)** *Semillas* de ensayo de Tiempo Térmico sobre un algodón embebido con Vitavax-FLO (color rosa) en una placa de Petri. En el centro se puede ver la pequeña radícula de una *semilla* germinada. **c)** *Semillas* embebidas en la solución de PEG sobre el papel de filtro para uno de los potenciales hídricos de ensayo del modelo de Tiempo Hídrico **d)** Ensayo de validación del modelo de Tiempo Térmico a campo. Cada *semilla* emergida está marcada con un alambre de color azul o amarillo.

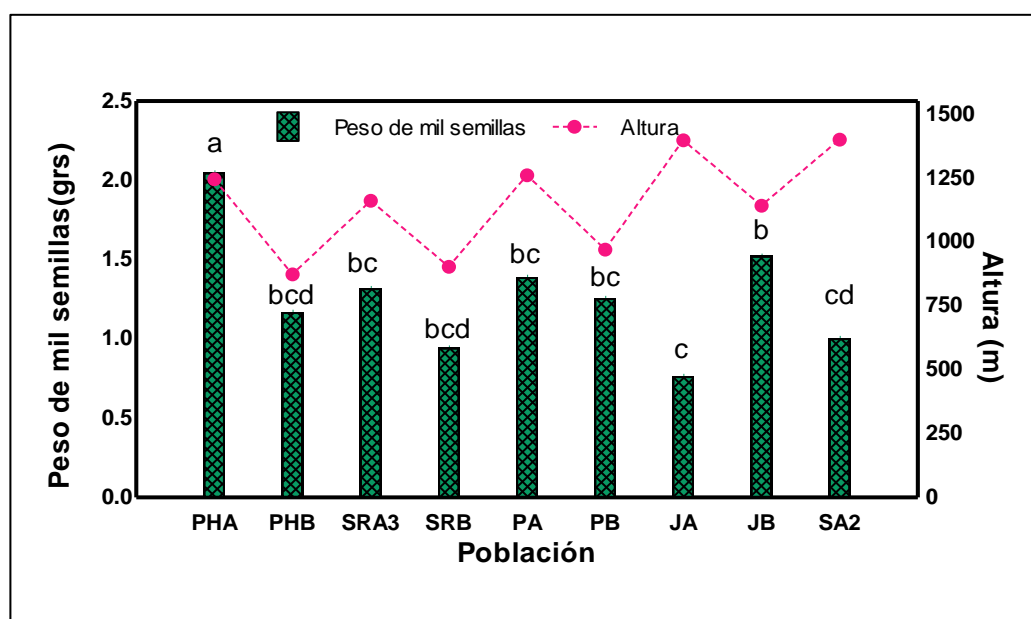


Figura 3.2: Relación entre el peso de mil *semillas* y la altitud de cada población. Las letras distintas indican diferencias significativas entre los pesos de las *semillas* (Test *a posteriori* de Tuckey, $p < 0.05$).

4.2. Modelos de tiempo térmico

4.2.1. Rangos térmicos y evaluación de la temperatura base (T_b) en diferentes fracciones de la población de semillas mediante curvas de germinación acumulativa y regresiones lineales

La temperatura base promedio para las poblaciones analizadas de la especie fue de $-0,47 \pm 0,19$ °C (Tabla 3.1). Para establecer los rangos térmicos, se analizó la relación entre las regresiones lineales para cada temperatura de trabajo y la tasa de germinación para las diferentes fracciones de semillas de la población. Se probaron seis temperaturas 5, 7, 10, 12, 15,5 y 22,5°C (anexo Figura S3.1) aunque 22,5 no se utilizó para el modelo de tiempo térmico, ya que a partir de 22,5°C se observó una caída en la velocidad de germinación de las semillas.

Las curvas de tiempo de germinación mostraron que la velocidad de germinación fue relativamente lenta a 5 °C y aumenta a medida que la temperatura se incrementa, alcanzando la velocidad máxima de germinación a 15,5 °C. De esta forma, se define el rango térmico sub- óptimo para las poblaciones de *Festuca pallescens* con una temperatura base promedio de -0,47°C y una temperatura óptima que se encontraría alrededor de los 15,5°C y por debajo de los 22,5°C. Para determinar con exactitud tanto la temperatura óptima como la crítica, se necesitarían probar más de una temperatura intermedias entre 15,5 y 22,5°C. Sin embargo, dado que la tasa de germinación disminuye por encima de 15,5°C (anexo Figura S3.1); las temperaturas superiores a 22,5 °C constituirían el rango supra óptimo para las poblaciones de *F. pallescens* evaluadas en esta especie.

La mayoría de las poblaciones alcanzaron alrededor del 100% de germinación en todas las temperaturas exceptuando JA (Figura 3.3). Esta población sólo alcanzó más del 95% de germinación a 12 °C mientras que en el resto de las temperaturas fue menor: 5°C (48,6%±5,4), 10°C (74,8%±3,4) y 15,5°C (83,8%±5,03). Las curvas de germinación experimental y teórica para todas las poblaciones y las temperaturas analizadas presentaron un buen ajuste al modelo ($r^2 > 0,85$) (Tabla 3.1).

4.2.2 Modelo de Tiempo Térmico: Análisis de los parámetros térmicos poblacionales

El modelo de Tiempo Térmico se basó en una T_b constante en las distintas fracciones de la población y θ_T variable, los cuales fueron ajustados con la metodología de Covell & Ellis (1986) utilizando las ecuaciones 1 y 2 descritas en la sección 3.3.2. A partir de este modelo se obtuvieron los valores de T_b , $\theta_{T(50)}$ y σ_θ calculados para las cuatro repeticiones biológicas de las poblaciones de la especie analizadas. Los valores de las T_b variaron a lo largo del gradiente de muestreo, oscilando entre 0,2°C (PHA, población más occidental) y -1,58°C (SA2, población más oriental) (promedio -0.47 °C; Tabla 3.1). Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas y no se detectó un patrón creciente o decreciente en las T_b respecto al gradiente pluviométrico. Por otro lado, el $\theta_{T(50)}$ así como su desvío estándar variaron significativamente entre las poblaciones, siendo $126,2 \pm 1,9$ °Cd en la población más occidental (PHA) y $229,36 \pm 1,1$ °Cd en una de las poblaciones más orientales (JA) ($p < 0,05$). El resto de las poblaciones presentaron $\theta_{T(50)}$ que variaron dentro

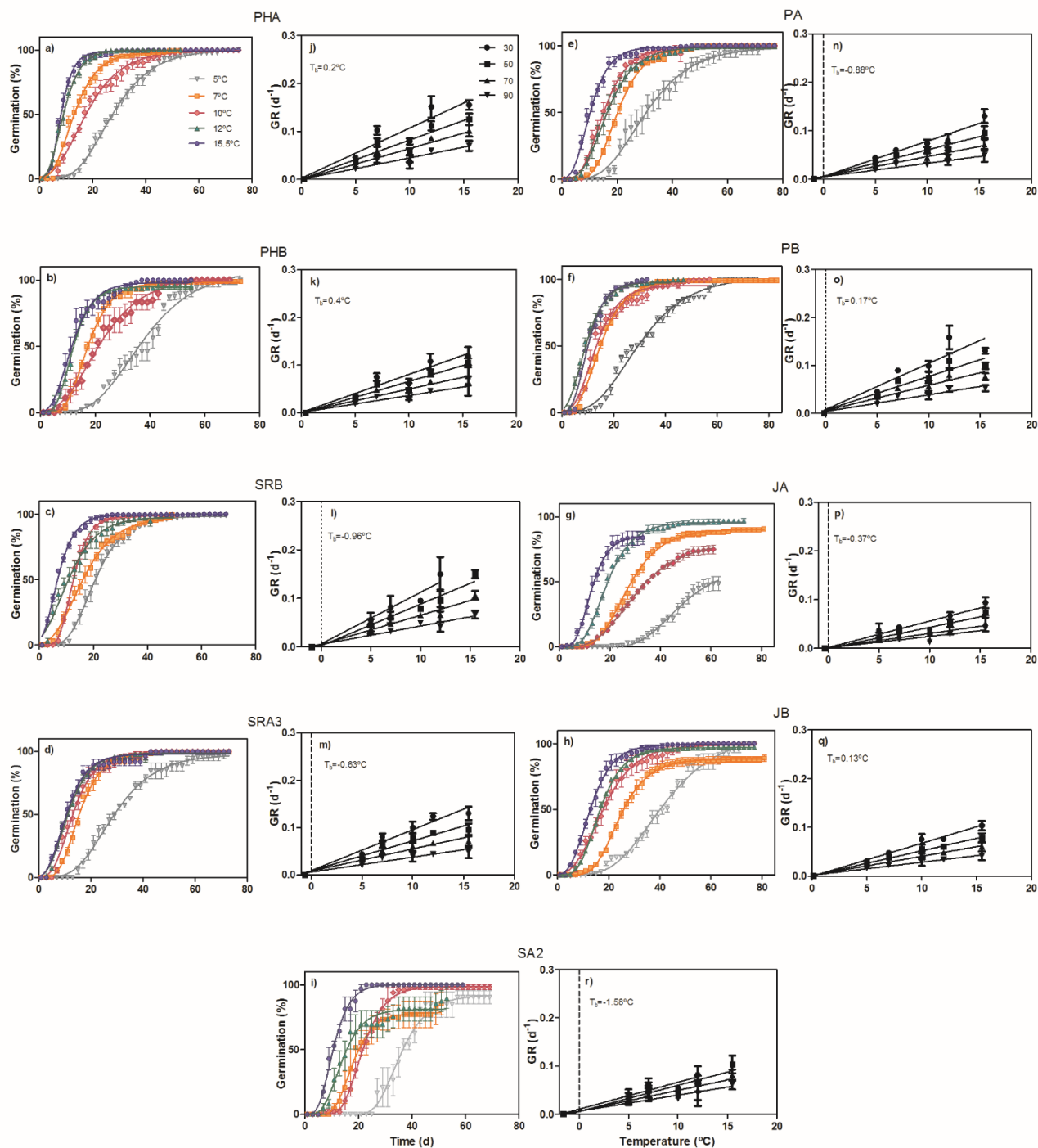


Figura 3.3: Relación entre la tasa de germinación (TG) de las nueve poblaciones de semillas de *Festuca pallescens* y la temperatura de incubación. Las curvas de germinación acumuladas (a-i) a 5, 7, 10, 12 y 15,5 °C se calcularon con ajuste no lineal a la ecuación de Gompertz. Las regresiones lineales corresponden a la tasa de germinación en función a la temperatura de incubación para las fracciones 30, 50, 70 y 90% de la población de semillas (j-r) e interceptan el eje de las temperaturas (GR=0) en el valor común de la temperatura base media (T_b) para cada población. Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM).

de este rango. Contrariamente a los valores observados en Tb, los valores de tiempo térmico aumentaron hacia el este del gradiente de muestreo, de hecho, JA, mostró el valor más alto. Las poblaciones JB y SA2 también presentaron valores altos de tiempo térmico, sin embargo éstos no difirieron significativamente de PHB y PA (Tabla 3.1).

Tabla 3.1: Parámetros de Tiempo Térmico. **Tb**: Temperatura base, **$\theta_{T(50)}$** : Tiempo térmico; **σ_{θ}** : desvío del tiempo térmico; **r^2** : ajuste para el modelo. Las letras distintas indican diferencias significativas (Tuckey, $p < 0,05$), números en cursiva indican los errores estándar del promedio del valor de cada parámetro para las 4 repeticiones biológicas.

Población	Tb	$\theta_{T(50)}$	σ_{θ}	r^2
PHA	$0,2 \pm 0,2$ A	$126 \pm 5,8$ b	$42,1 \pm 1,9$ b	0,86
PHB	$0,04 \pm 1$ A	$161 \pm 25,5$ ab	$53,7 \pm 8,5$ ab	0,86
SRA33	$-0,63 \pm 0,4$ A	$154 \pm 7,3$ b	$51,3 \pm 2,4$ b	0,88
SRB	$-0,96 \pm 1,3$ A	$136 \pm 17,2$ b	$45,2 \pm 5,7$ b	0,89
PA	$-0,88 \pm 0,8$ A	$178 \pm 15,2$ ab	$59,4 \pm 5,1$ ab	0,92
PB	$-0,17 \pm 0,4$ A	$144 \pm 11,7$ b	$47,9 \pm 3,9$ b	0,89
JA	$-0,37 \pm 0,1$ A	$229 \pm 3,4$ a	$76,5 \pm 1,1$ a	0,92
JB	$0,13 \pm 0,2$ A	$193 \pm 7,2$ ab	$64,2 \pm 2,4$ ab	0,94
SA2	$-1,58 \pm 0,9$ a	$219 \pm 29,9$ ab	$74,8 \pm 10,8$ ab	0,85

4.2.3 Validación a campo de los modelos de tiempo térmico

Durante el período de ensayo a campo la lluvia se produjo en intervalos regulares, pero fue notoriamente menos abundante que el otoño del año anterior (2016: 12 mm vs 2015:117,6 mm; <http://sipan.inta.gob.ar>) y la temperatura media fue de $5,6 \pm 2,5$ °C, con temperaturas máximas y mínimas diarias de 9,7 y -1,6 °C, respectivamente. El porcentaje medio de humedad del suelo fue de $21,5 \pm 1,5$ (Recuadro superior de la Figura 3.4).

En todas las poblaciones, la emergencia tomó al menos 20 días y, durante el período del ensayo, la germinación máxima alcanzó menos del 90%, variando de 86,3% en la población más occidental (PHA) hasta 42,3% en la población oriental (SA2). Las poblaciones con mayor porcentaje final de germinación a campo fueron SRB (73,3%), PA (72,8%), PB (72,6%) y JA (70,3%). El menor porcentaje de germinación se registró en PHB (45,6%), SRA3 (50,6%) y JB (54%). Las curvas de germinación acumuladas obtenidas en condiciones de campo se ajustaron a la germinación teórica calculada con el modelo de tiempo térmico. En general, a pesar de la falta de riego suplementario, el

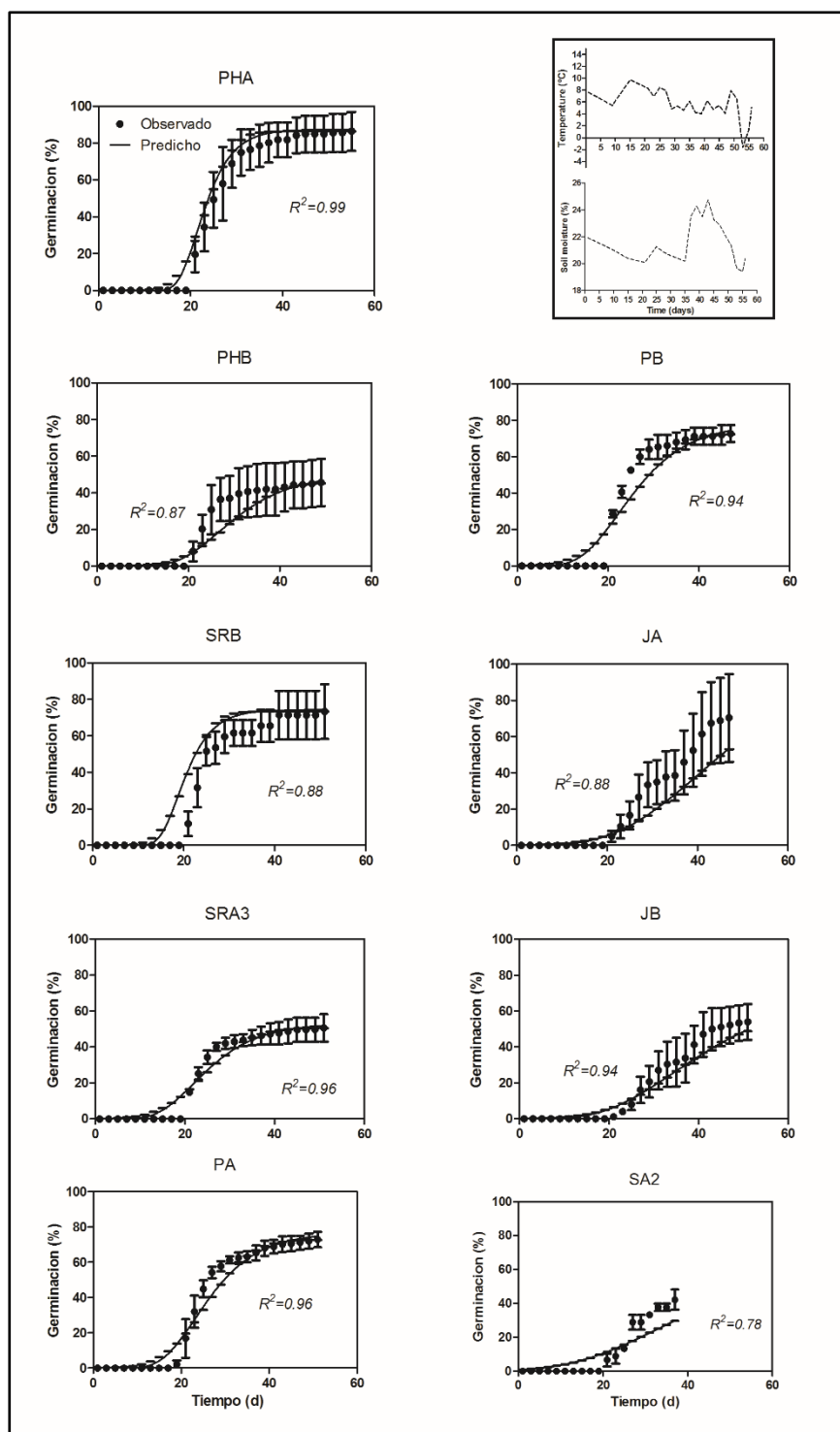


Figura 3.4: Validación de modelos de tiempo térmico en experimentos de campo. Las curvas acumulativas predichas y observadas se indican en líneas continuas y círculos negros cerrados, respectivamente. El error estándar de la media (SEM) se representa mediante barras verticales. Las estimaciones de r^2 para los valores observados y predichos de ajuste se muestran dentro de cada panel. Las condiciones ambientales (humedad y temperatura) monitoreadas a lo largo del experimento a campo se muestran en un recuadro.

modelo proporcionó un buen ajuste y predicción del comportamiento de la semilla (las curvas ajustadas explicaron más del 85% de la dinámica de germinación, excepto SA2). Además, el porcentaje final de germinación en condiciones de campo para cada población fue mayor que la germinación teórica estimada, salvo en SRB, donde hubo una sobrestimación de este parámetro por el modelo (Figura 3.3).

4.2.4 Relación entre los parámetros de tiempo térmico y los factores ambientales en los sitios muestreados del rango de distribución natural de las poblaciones

El valor medio de tiempo térmico ($\theta_{(50)}$) de cada población se correlacionó fuertemente con la longitud ($r^2=0,68$) y con tres variables térmicas: temperatura media anual ($r^2 = 0,76$), estacionalidad diaria ($r^2 = 0,75$) y temperatura de otoño ($r^2 = -0,71$) ($p < 0,0$; Figura 3.5). Hubo una correlación negativa entre las temperaturas del otoño y el tiempo térmico, la población más occidental presentó valores relativamente más bajos de tiempo térmico y estas poblaciones se ubican en lugares en los que la temperatura media en otoño fue relativamente alta (5,6 °C). Por el contrario, se observó el patrón opuesto hacia el este (valores de tiempo térmico relativamente altos asociados a temperaturas relativamente más bajas). Tanto la estacionalidad diaria de temperatura como la temperatura media anual mostraron una relación positiva con el tiempo térmico. A pesar de no mostrar una correlación significativa, se registró una relación entre la altitud y el tiempo térmico ($r^2 = 0,4$) y se observó que en general los sitios altos presentaron tiempos térmicos mayores que los sitios bajos exceptuando PHA ($\theta_{(50)PHA} < \theta_{(50)PHB}$) (Figura 3.5). La temperatura base no mostró correlación significativa con ninguna de las variables analizadas.

Además, se evaluó la relación entre el peso de mil semillas y el tiempo térmico, el porcentaje de germinación final y la tasa de germinación. Aunque las correlaciones no fueron significativas entre el peso de las semillas y el tiempo térmico, se observó que las semillas con menor peso (JA y SA2) correspondían a los mayores valores de tiempo térmico, mientras que las de mayor peso requirieron menor tiempo térmico (Figura S3.1). Finalmente, la relación entre el peso de mil *semillas* con el porcentaje y la tasa de germinación para las tres temperaturas no fue significativa (ver anexo figura 3.2), aunque se observó la misma tendencia: la población con el peso de *semillas* más bajo (JA) presentó el menor porcentaje y la tasa de germinación, mientras que la población con mayor peso de *semillas* (PHA) mostró el patrón inverso (Figura S3.2).

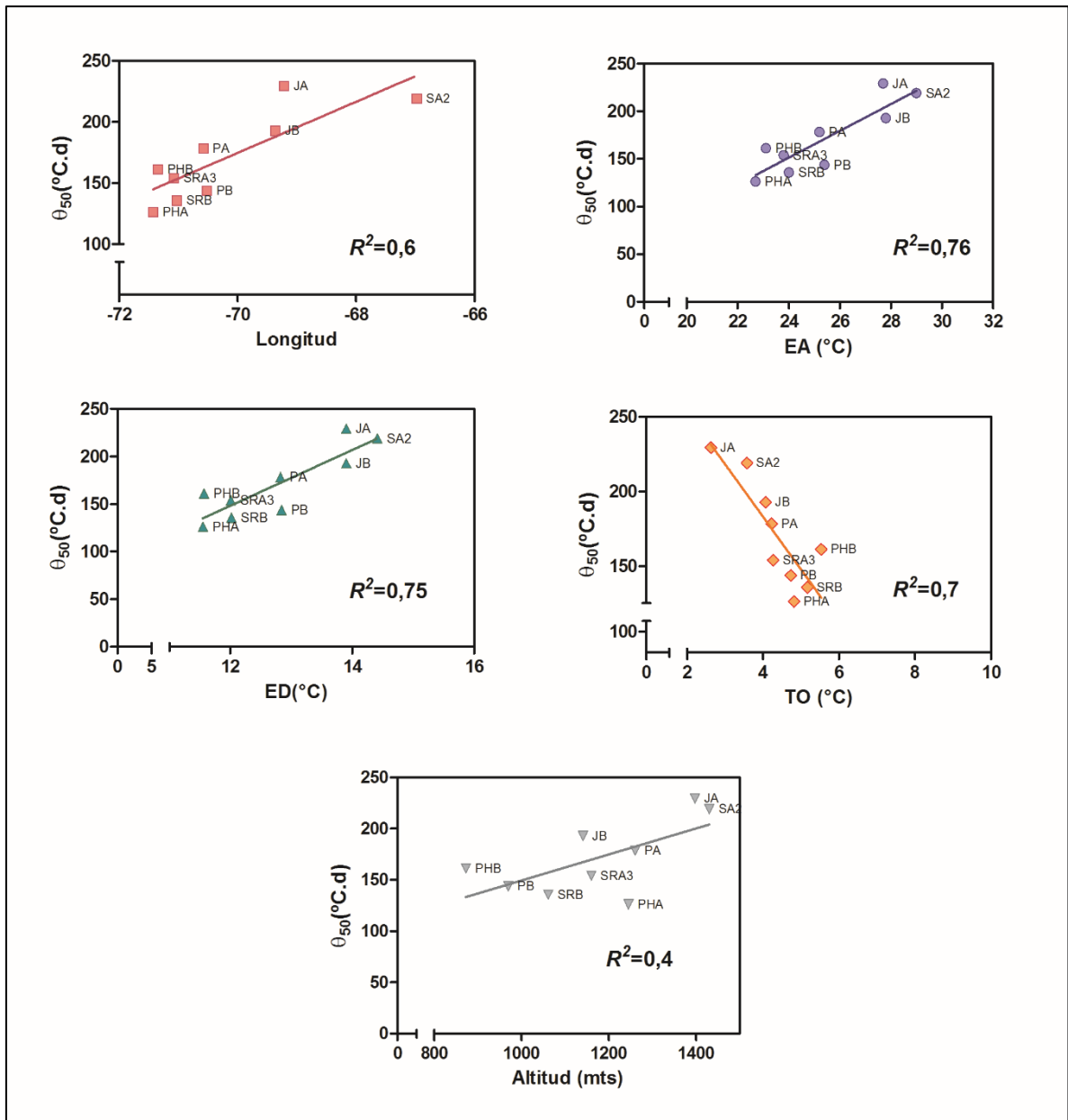


Figura 3.5: Relación entre el tiempo térmico de las poblaciones de *Festuca pallescens* y las variables ambientales analizadas: **a)** Tiempo térmico (θ_{50} ($^{\circ}\text{C.d}$); cuadrado rosa) vs Longitud; **b)** (θ_{50} ($^{\circ}\text{C.d}$)) vs la estacionalidad por año (EA; círculos azules); **c)** (θ_{50} ($^{\circ}\text{C.d}$)) vs la estacionalidad por día (ED; triángulos verdes); **d)** (θ_{50} ($^{\circ}\text{C.d}$)) vs Temperatura de otoño (TO; rombos naranjas) y **e)** (θ_{50} ($^{\circ}\text{C.d}$)) vs altitud (triángulos invertidos grises) a la que se encontraba cada población.

4.3. Modelos de Tiempo Hídrico

4.3.1. Curvas de germinación acumulada en función del tiempo, regresiones lineales para la determinación del potencial hídrico base (Ψ_b) y estimación de los parámetros hídricos

Las curvas de la tasa de germinación en función del tiempo para los distintos potenciales hídricos indicaron que todas las poblaciones alcanzan la germinación completa en $\Psi_H = 0$ y $\Psi_H = -0,8$ MPa, exceptuando JA que germinó entre un 80-90 %. A medida que los potenciales hídricos son más negativos, el % de germinación fue menor y no alcanzó a completarse (Figura 3.6). Cuando las semillas se expusieron a $\Psi_H = -1$ y $\Psi_H = -1,6$ MPa, sólo SRB y PB completaron la germinación (100%), en el resto se registró entre el 70 y 80% de germinación salvo las tres poblaciones más orientales. Estas tres poblaciones (JA, JB y SA2) germinaron menos del 50% en $\Psi_H = -1,6$ MPa, incluso SA2 no germinó. Las curvas de germinación experimental y teórica para todas las poblaciones y los potenciales hídricos presentaron un muy buen ajuste al modelo ($r^2 > 0,9$) (Tabla 3.2).

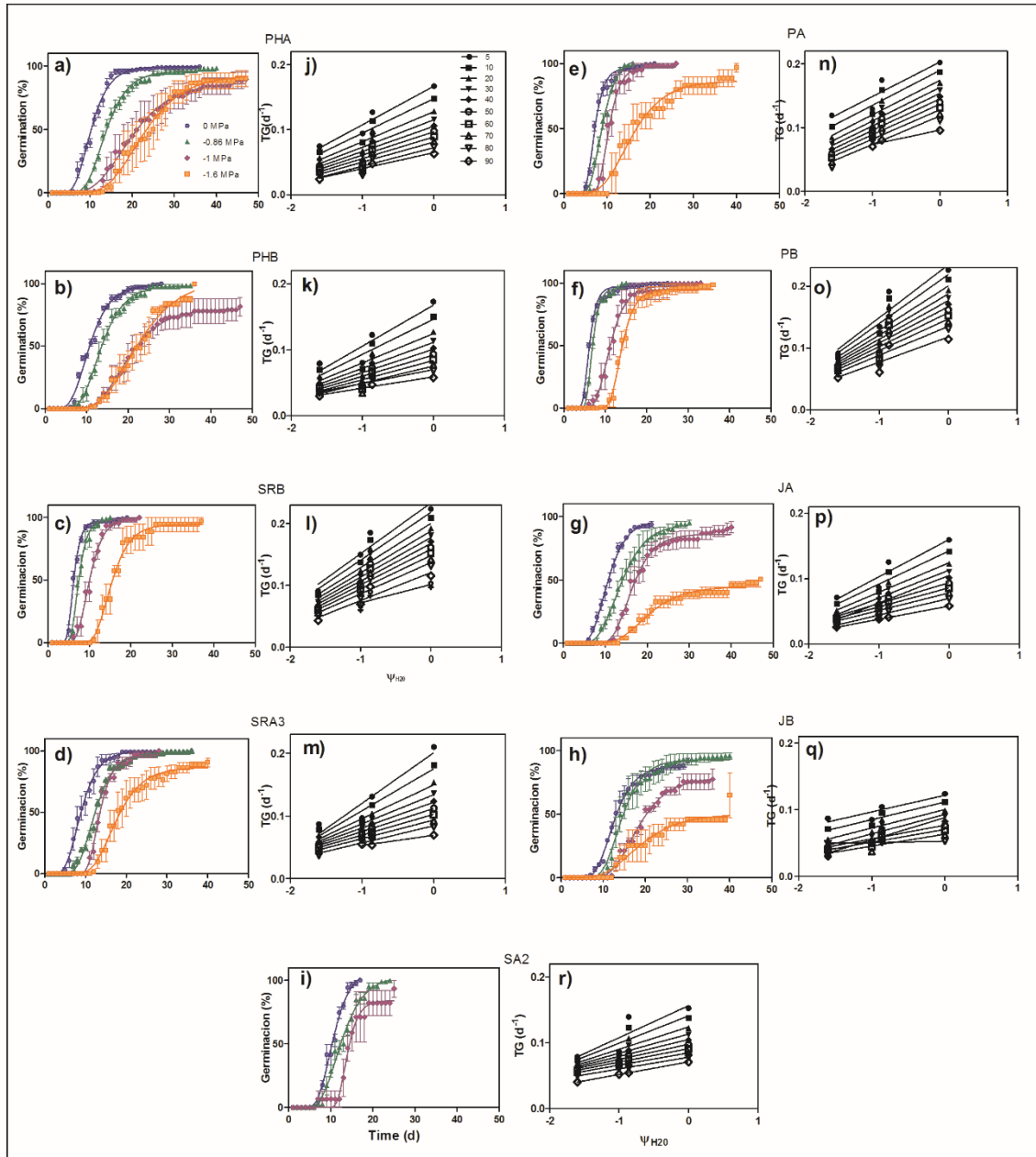


Figura 3.6: Relación entre la tasa de germinación (TG) de las nueve poblaciones de *semillas* de *Festuca pallescens* y el potencial hídrico. Las curvas de germinación acumuladas (a-i) a 0, -0.8, -1 y -1.6 MPa se calcularon con ajuste no lineal a la ecuación de Gompertz. Las regresiones lineales corresponden a la tasa de germinación en función a la temperatura de incubación para las fracciones 5 a 90% de la población de *semillas* (j-s) e interceptan el eje de los potenciales hídricos (TG=0) en el potencial hídrico base medio (Ψ_b) para cada población. La población SA2 no germinó en -1.6 MPa (i, r). Las barras verticales representan el error estándar de la media (SEM). Los símbolos coloreados corresponden a los potenciales hídricos de trabajo: Circulo violeta (0MPa), triangulo verde (-0.86MPa), rombo rosa (-1MPa) y cuadrado naranja (-1.6MPa).

El modelo de Tiempo Hídrico se basó en un Ψ_b variable en las distintas fracciones de la población y θ_H constante, los cuales fueron ajustados utilizando las ecuaciones 1 y 2 descriptas en la sección 3.4.2. A partir del mismo, se calcularon los valores de Ψ_b , θ_H y

σ_{Ψ_b} de las poblaciones que se reportan en la Tabla 3.2. Los valores de Ψ_b variaron entre las poblaciones provenientes del gradiente de muestreo, oscilando entre -2,69 (PB) y -3,74MPa (JB). Sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (Tabla 3.2) y no se detectó un patrón creciente o decreciente en los Ψ_b respecto al gradiente pluviométrico. Por otro lado, el θ_H varió significativamente entre las poblaciones ($F = 3,29$; $p = 0,0095$) (Tabla 3.2). Aunque no se observó un patrón asociado al gradiente como en el caso del θ_T , los valores más bajos de θ_H se encontraron en las poblaciones del oeste SRB, PA y PB, y los más altos en algunas del este JB y SA2 (Figura 3.7d). Estos resultados indicarían que estas dos poblaciones orientales necesitan acumular mayores unidades de MPa.días para germinar que el resto de las poblaciones. Por otro lado, SRB, PA y PB requieren la menor cantidad de Mpa.días para germinar, siendo SRB de un ambiente Pre-cordillerano y PA y PB de un ambiente estepario.

Los valores de σ_{Ψ_b} también presentaron diferencias significativas entre poblaciones, la población con el mayor desvío estándar fue SRA3, y la de menor desvío estándar, SRB y PB, mientras que el resto de las poblaciones presenta valores intermedios dentro de este rango. Debido a que los desvíos estándar no variaron significativamente entre las poblaciones analizadas de la especie, exceptuando SRA3, SRB y PB, la distribución del potencial agua entre estas poblaciones fue similar. Por otro lado, la distribución del Ψ_b en SRB y PB resultó la más uniforme (menor valor de σ_{Ψ_b}) de todas las poblaciones, mientras que SRA3 constituyó la menos uniforme (mayor valor de σ_{Ψ_b}).

Tabla 3.2: Parámetros del modelo de Tiempo Hídrico. Ψ_b Potencial hídrico base (MPa); θ_H tiempo hídrico (MPa día); σ_{Ψ_b} desvío del tiempo hídrico; r^2 ajuste para el modelo. Las letras distintas indican diferencias significativas (Tuckey, $p < 0,05$). Los valores más altos y más bajos de cada parámetro se resaltan en negrita.

Población	Ψ_b	θ_H	σ_{Ψ_b}	r^2
PHA	-2,96 ± 0,23 a	27,3 ± 2,49 bcd	0,64 ± 0,08 ab	0,95
PHB	-3,14 ± 0,23 a	30,9 ± 2,71 de	0,91 ± 0,05 ab	0,95
SRA3	-3,48 ± 0,15 a	26,8 ± 3,19 bcd	1,03 ± 0,05 a	0,95
SRB	-3,08 ± 0,41 a	15,02 ± 1,68 ab	0,6 ± 0,15 b	0,96
PA	-2,91 ± 0,31 a	17,5 ± 1,85 abc	0,64 ± 0,09 ab	0,93
PB	-2,69 ± 0,02 a	13,6 ± 0,17 a	0,58 ± 0,07 b	0,93
JA	-3,06 ± 0,18 a	29,3 ± 2,98 cde	0,73 ± 0,03 ab	0,98
JB	-3,57 ± 0,42 a	40,9 ± 4,73 e	0,95 ± 0,08 ab	0,97
SA2	-3,74 ± 0,32 a	33,8 ± 3,59 de	0,93 ± 0,09 ab	0,97

4.3.2. Relación entre los parámetros del modelo Tiempo Hídrico y los factores ambientales en los sitios muestreados del rango de distribución natural de las poblaciones

El tiempo hídrico (θ_H) de cada población se correlacionó significativamente sólo con una de las variables analizadas, el coeficiente de variación de la precipitación estacional ($r^2 = 0,5$; $p = 0,03$) (Figura 3.7a), pero el potencial hídrico base no se correlacionó con ninguna de las variables analizadas. Los valores más altos del coeficiente de variación de la precipitación estacional (CV pp est) coincidieron con las poblaciones que tenían valores de Ψ_b y tiempos térmicos más bajos (PA, PB y SRB), mientras que en las poblaciones más orientales (JB y SA2) y en PHB se observó una correlación con los CV pp est más bajos. Por otro lado, el θ_H no se correlacionó con las precipitaciones de los meses más húmedos, la longitud o la altura. Se observa que las poblaciones del este con menores precipitaciones en los meses más húmedos, presentan valores de tiempo hídrico elevados (JA, JB, y SA2), siendo JA y SA2 las poblaciones con mayor altitud (Figura 3.7 b, c y d).

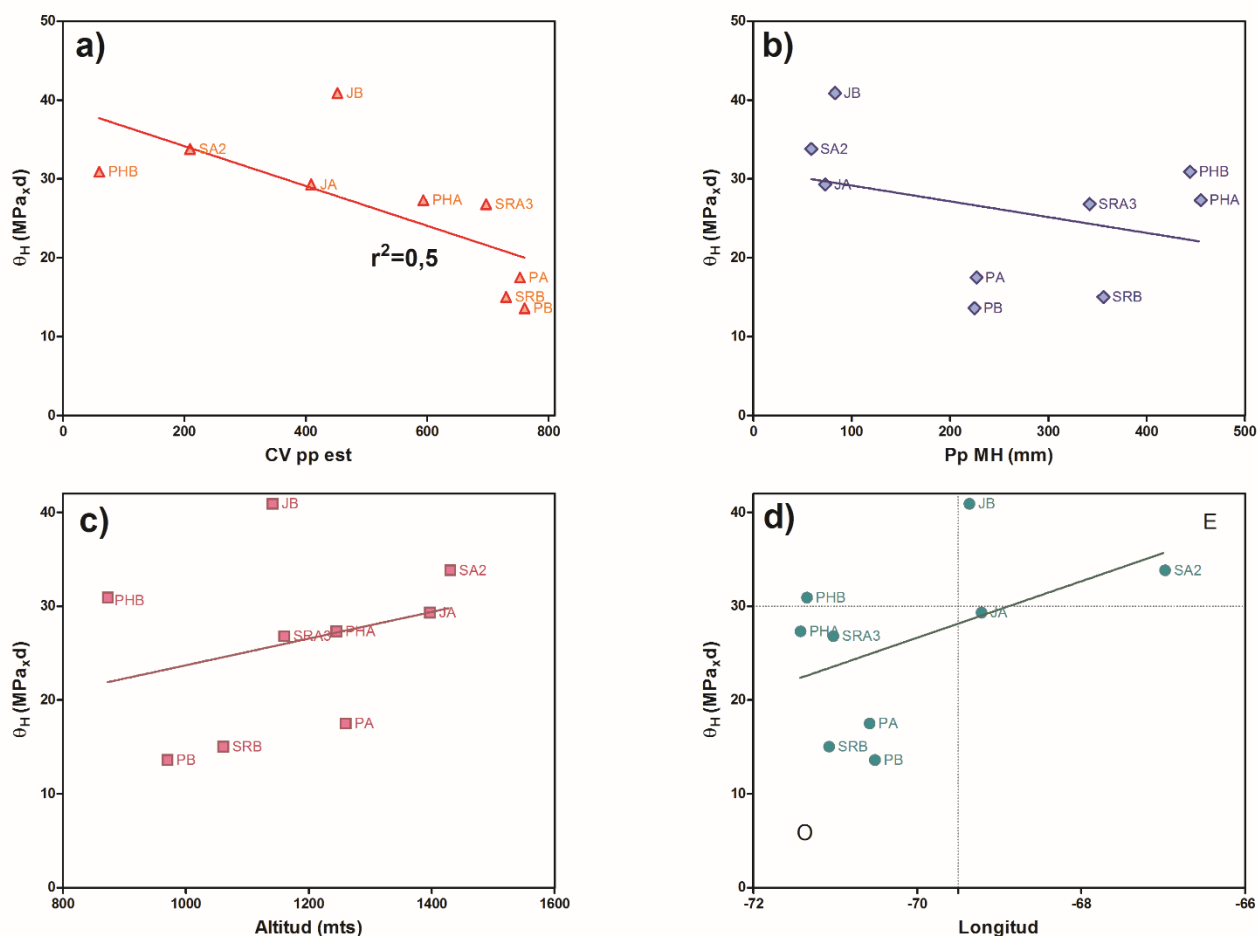


Figura3.7: Relación entre el tiempo hídrico para cada población y a) (CV pp est), b) las precipitaciones de los meses más húmedos (PpMH), c) altitud y d) longitud. O: Oeste; E: Se muestra sólo el ajuste de la correlación significativa.

5. DISCUSIÓN

Los parámetros fisiológicos que regulan la germinación permiten comprender y predecir cómo se comportarían las poblaciones de una especie frente a cambios en su nicho ecológico (Qiu et al. 2010). Los modelos umbrales desarrollados en este capítulo permitieron estimar los parámetros térmicos e hídricos que caracterizan los requerimientos de distintas poblaciones de *semillas* de *F. palleescens* para su germinación. De este modo, se puede conocer la forma en que la temperatura y la disponibilidad de agua, factores que controlan fuertemente la germinación de las especies, afectan la germinación de *F. palleescens*. Más aún, se puede predecir la germinación ante determinadas condiciones hídricas y térmicas, constituyendo una buena herramienta en la evaluación del comportamiento de las semillas frente a diferentes regímenes de temperatura y humedad. En general, los resultados indicaron que tanto la amplitud

térmica y la temperatura de otoño como el coeficiente de variación de la precipitación a lo largo del gradiente se encuentran asociadas a diferentes respuestas de la germinación de las poblaciones a condiciones hídricas y térmicas.

5.1 *Peso de semillas y su relación con la germinación*

La producción, viabilidad y peso de las semillas constituyen caracteres adaptativos vitales que permiten la sobrevivencia de una especie en ecosistemas áridos (Defossé et al. 1995; Hardegree et al. 2008). Las poblaciones de *F. pallescens* de Patagonia Norte presentaron diferencias significativas en el peso de sus *semillas*. Como se explicó en el Capítulo 1, se evaluaron los antecios (ver pág. 28), con lo cual estas diferencias no están necesariamente asociadas sólo al peso de la semilla. Es posible que el menor peso registrado en las poblaciones del Este respecto a las del Oeste (a excepción de JB, ver Figura 3.2), se deba a una variación en el peso de la lema o palea. Estos caracteres reproductivos tienen gran relevancia en la descripción de especies de *Festuca* (Ospina et al. 2016).

El tamaño y peso de las semillas es un carácter adaptativo, y en ambientes áridos existe una tendencia a que sobrevivan y dejen más descendencia los genotipos que producen semillas de mayor tamaño (i.e. selección natural a favor de ese rasgo) (Venable & Brown 1988). Esto sólo se observa en JB la cual se encuentra en el ambiente con el balance hídrico más negativo (i.e. por bajas precipitaciones y alta demanda atmosférica dado que es el sitio más árido y bajo). En el resto de las poblaciones de *F. pallescens* de ambientes áridos, el peso de las *semillas* fue el más bajo. Este patrón también se reportó en otras especies xerófitas como *Plantago insularis*, donde a pesar de presentar gran variación, las poblaciones de ambientes más áridos presentaron semillas de menor peso y tamaño (Claus & Venable 2000).

Estos caracteres seminales están relacionados con varios aspectos ecológicos de las plantas (Moles et al. 2005). Por un lado, semillas pequeñas favorecerían el incremento en la producción de semillas, y las semillas alcanzarían mayor número de micrositios. Por el otro, individuos que producen semillas grandes (probablemente con más reservas), pero en menor cantidad podrían garantizar el establecimiento exitoso de las plántulas. Entonces, se vislumbran dos estrategias: (i) capacidad de “colonizar” mayor cantidad de micrositios, que podría ser un rasgo muy importante en ambientes con mucha

heterogeneidad micro-ambiental como la estepa patagónica (López 2011); mientras que en ambientes con menor heterogeneidad ambiental, o temporalmente más estables (e.g. como mallines de Pre-cordillera y Cordillera) se daría la estrategia (ii) y podrían mejorar la capacidad de competencia asegurando un exitoso establecimiento. Sin embargo, a largo plazo, ambas estrategias resultarían beneficiosas ya que en la mayoría de las especies se encuentra una gran variación en el tamaño de las semillas, existiendo en última instancia un balance costo/beneficio de cada estrategia (Moles et al. 2003).

El peso de las semillas, asociado a su calidad, afecta la tasa de germinación (Ouborg & Van Treuren 1995; Wang et al. 2004). El porcentaje final y la tasa de germinación en respuesta a tres de las temperaturas de trabajo evaluadas no tuvieron una correlación significativa con el peso de las *semillas*. Esto podría deberse a que la expresión de la dormición en esta especie es baja con lo cual los porcentajes de germinación generalmente alcanzan el máximo. Sin embargo, tanto el porcentaje final como la tasa de germinación fueron menores en la población con semillas más livianas, las cuales además necesitaron mayor cantidad de grados días para germinar que la población con el mayor peso de semillas, al igual que en *Festuca hallii* (Qiu et al. 2010). Las *semillas* de la población con mayor altitud ubicada en la zona cordillerana (PHA) germinaron más rápido y fueron más pesadas que las *semillas* de las poblaciones con mayor altitud del extremo este (JA y SA2), sugiriendo que las poblaciones estarían adaptadas localmente. La población JA presentó menor peso, porcentaje más bajo de germinación y tasa más lenta de germinación, lo cual indicaría cierto grado de letargo en la germinación de esta población.

Se ha reportado que las semillas de *F. pallescens* no presentan dormición (Soriano 1960; Bertiller et al. 1990; Coronato & Bertiller 1997; Defossé et al. 1997). No obstante, las semillas de especies nativas suelen presentar “dormición relativa”, es decir, que la dormición se expresa cuando se incuban las semillas a temperaturas dentro de rangos sub-óptimos y/o supraóptimos (Batlla & Benech-Arnold 2015). La dormición es una característica fisiológica que le provee a la semilla un importante valor ecológico y adaptativo (Donohue et al. 2010), ya que impide la germinación cuando las condiciones no son óptimas (Benech-Arnold et al. 2000). Una forma de detectar la dormición en una población de semillas es analizando si la germinación es incompleta o nula a determinadas temperaturas. Entre las poblaciones analizadas de *F. pallescens* la germinación a 5°C fue menor al 50% en una de las poblaciones más orientales (JA). De manera similar, se

observó que la germinación estuvo por debajo del 50% en los potenciales hídricos -1 y -1,6 MPa para todas las poblaciones más orientales JA, JB y en el caso de SA2 no germinó a -1,6MPa. Por lo tanto, es posible que exista muy bajo grado de dormición en la especie, y se exprese sólo en algunas poblaciones y en determinadas condiciones ambientales (por ejemplo, bajas temperaturas o potenciales hídricos muy negativos) (Batlla & Benech-Arnold 2015). La germinación de muchas gramíneas en la estepa patagónica es errática y estaría asociada a la variabilidad climática y eventos estocásticos de lluvias (López 2011; Rotundo et al 2015). Es posible que la expresión diferencial de la dormición en poblaciones donde las fluctuaciones climáticas sean muy pronunciadas, constituya un ajuste fisiológico que brinde una estrategia ecológica para su sobrevivencia.

5.2 Requerimientos térmicos para la germinación: Temperatura base (T_b) y Tiempo térmico (θ_T)

Los parámetros poblacionales de los modelos umbrales proveen información valiosa sobre las respuestas germinativas de las plantas en condiciones de campo potenciales (Herdegreve et al. 2003). Existe un compromiso entre la T_b y el θ_T a nivel fisiológico y ecológico, donde la mayor variación del θ_T con respecto a la T_b , constituiría una estrategia ecológica de adaptación al rango térmico de la distribución de una especie (Trudgill et al. 2005). En *F. pallescens* la temperatura base no difirió significativamente entre las poblaciones analizadas, pero sí lo hizo el tiempo térmico y su desvío estándar, incrementándose ambos hacia el este del gradiente Oeste-Este. Dado que las semillas de las distintas poblaciones fueron recolectadas en la misma temporada y se mantuvieron en las mismas condiciones antes y durante los ensayos, así como en cosechas de años independientes, se puede asumir que las diferencias en los parámetros de germinación serían de origen genético. Estos resultados sugieren que, al igual que en otras gramíneas (Meyer and Alen 1997; Rotundo et al. 2015), las poblaciones de la especie presentan cierto grado de adaptación a los sitios de donde provienen,

Los valores bajos de T_b encontrados (T_b promedio = -0.47) indican que la mayor parte de las semillas de *F. pallescens* comenzarían a acumular tiempo térmico en otoño, luego de la dispersión cuando comienza el período de lluvias pero las temperaturas ya son bajas. Un período germinativo durante el otoño constituiría una ventaja adaptativa ya que las plántulas pueden germinar a bajas temperaturas, teniendo una ventana de tiempo más

amplia para crecer lo suficiente durante la primavera. De esta forma, llegarían al verano con un tamaño y desarrollo radicular mayor (Bertiller & Coronato 1994; Defossé et al. 1994) que les proporcionaría más oportunidades ante el verano muy seco de la estepa patagónica (López 2011). Hacia el este hay un requerimiento de una acumulación mayor de tiempo térmico para la germinación, lo que, asociado a las escasas precipitaciones y a la mayor amplitud térmica (con mayor temperatura diaria media del verano), estaría definiendo una ventana temporal mayor y previniendo una germinación temprana (Arana et al., 2015), luego de su dispersión durante el verano.

Estudios previos de germinación en *F. pallescens* mostraron diferencias en la tasa y porcentaje final de germinación a distintas temperaturas y condiciones de humedad en suelo en poblaciones a lo largo de un gradiente de altitud en el oeste de Chubut (43° 35'5'' S, 71° 25'10'' O) (Defossé et al. 1994). Estos autores reportaron que el porcentaje y la tasa de germinación más elevada (99% en ocho días) ocurrió a 10°C y con un 16 % de humedad en suelo. A pesar de no haber determinado los requerimientos mínimos de germinación, es plausible que las Tb en estas poblaciones más australes (i.e. de Patagonia Sur) sean menores que en las poblaciones de la especie evaluadas en esta tesis (i.e. Patagonia Norte), o que necesiten acumular menos tiempo térmico para germinar y las Tb sean similares. Asimismo, Oliva (1996) determinó similares condiciones de germinación para *Festuca gracillima* en la estepa Magallánica, donde los ambientes son más fríos y con mejor balance hídrico (disponibilidad/demanda) que en estepas de Sierras y Mesetas Occidentales de Patagonia Norte. Esta especie, junto con *F. pallescens*, constituyen dos de las especies de festucas patagónicas de mayor valor forrajero en la estepa Patagónica (sur y norte) que, al igual que otras especies del coironal (*Pappostipa* spp., *Bromus* spp, y *Hordeum* spp.), germinan en un amplio rango de temperaturas (Soriano 1960). Sin embargo, no presentan dormición y su banco de semillas es temporario, es decir, germinan en una ventana de tiempo donde las condiciones de temperatura y humedad son óptimas, o mueren, ya sea por contaminación fúngica o predación (Bertiller 1992; Defossé et al. 1994; Oliva 1996).

Estimaciones de temperatura base y tiempo térmico en otras especies de *Festuca* (Qiu et al. 2010; Zhang et al. 2012), en *Poa ligularis* (Leva 210; Rotundo et al. 2015) y en *Bromus pictus* (Leva 210) mostraron que tanto la Tb como el θ_T variaron en función a la distribución geográfica, asociado particularmente a la latitud. Es probable que la falta de variación en la Tb entre las poblaciones analizadas en esta tesis se deba a que todas las

poblaciones se encuentran a una latitud similar. Las temperaturas base reportadas en las otras especies, son en general más altas que las encontradas en esta tesis para *F. pallescens*. Por ejemplo, la población de *Poa ligularis* de General Conesa, provincia de Río Negro (39°S 58'W, 64° 4'O) presentó una Tb de 2,8 ° (Rotundo et al. 2015) y para *F. hailli* en Canadá, las Tb varían de -0,3 a 1,9 (Qiu et al. 2010). No obstante, los valores de Tb para poblaciones de *Poa ligularis* y *Bromus pictus* (Leva 2010) en poblaciones de Alicura y Pilcaniyeu fueron similares a los reportados en esta tesis.

El tiempo térmico (θ_T) se correlacionó con la longitud, indicando que las poblaciones del este necesitan acumular más grados días para germinar que las poblaciones ubicadas al oeste. Las correlaciones entre el θ_T y la estacionalidad por año y por día sugieren que la variación de la temperatura es importante para la germinación. Las amplitudes térmicas anuales y diarias, así como la tasa de evapotranspiración potencial, son más elevadas en la estepa patagónica (ambientes áridos) que en la Cordillera y la Pre-cordillera (ambientes húmedos y más fríos) (Heinrich 1979; Bianchi et al. 2016). En este sentido, las poblaciones JA, JB y SA2 ubicadas hacia el este necesitan más grados días que las poblaciones de la Pre-cordillera (PHA, PHB, SRA3 y SRB) para germinar. De todas formas, las poblaciones que se ubican en las zonas intermedias del gradiente (PA y PB), donde las características climáticas generales se corresponden a las de la estepa patagónica, presentan valores de θ_T similares a las poblaciones ubicadas más al oeste. Probablemente esta similitud se deba a que la amplitud térmica sumado a la temperatura anual media, la influencia de los vientos fríos provenientes de la cordillera y el tipo de suelo de estas poblaciones, generen micrositos con temperaturas medias más similares a las de las poblaciones de San Ramón que a las de Ing. Jacobacci (Godagnonde & Bran 2009). Por otra parte, la validación a campo del modelo de tiempo térmico presentó un buen ajuste, mostrando que las poblaciones con los porcentajes germinativos más altos fueron PHA, PB, SRB y PA. La coincidencia entre las observaciones a campo y los ensayos de laboratorio, indican que el modelo explica de manera adecuada el comportamiento de las semillas a campo.

5.3 Requerimientos hídricos para la germinación: potencial hídrico base (Ψ_b) y tiempo hídrico (θ_H)

El Ψ_b , al igual que la T_b , no varió significativamente entre las poblaciones y tampoco se observó una correlación entre este parámetro y la variación en las precipitaciones. Estos resultados indican que en general todas las poblaciones de *F. pallescens* tienen un umbral de potencial agua similar para germinar. En otras especies de la Patagonia, *Poa ligularis* y *Bromus pictus*, Leva (2010) registró diferencias significativas en los Ψ_b a lo largo de un gradiente latitudinal, aunque esta variación no estuvo asociada a la variación en las precipitaciones. En general las semillas de *F. pallescens* germinan a potenciales hídricos bajos (entre -2.69 y -3.74 MPa) con respecto a otras especies de *Festuca* y a *Poa ligularis* (Rotundo et al. 2015). Sharifiyamin et al. (2016) reportaron que *F. arundinacea* germina en un rango de -0,37 y -0,95MPa, considerándose este último un nivel de estrés alto, mientras que los potenciales hídricos base para *P. ligularis* se encuentran en un rango de -1,14 y -1,95MPa (Rotundo et al. 2015). Más aún, especies de gramíneas perennes en ecosistemas áridos de Norteamérica presentaron valores más altos (Allen et al. 2000). Todo esto indicaría que *F. pallescens* es una especie capaz de germinar en ambientes xéricos y con baja disponibilidad de agua, ya que los potenciales hídricos base son de alrededor de -3MPa, incluso más altos que *P. ligularis*, que es una de las especies mejor adaptadas, o más abundantes, en muchos ambientes áridos sin pastoreo (Couso 2011; Leva et al. 2013; Lopez 2011).

El θ_H difiere entre poblaciones y es mayor en las poblaciones de los dos extremos del gradiente de precipitaciones, contrariamente a lo encontrado para el tiempo térmico. Sin embargo, los θ_H de las poblaciones del este son mayores a los de las poblaciones de la pre-cordillera. En Ing. Jacobacci y en la Meseta de Somuncura, los registros de las precipitaciones medias anuales (150-200 mm) son notoriamente más bajos que los de cordillera (1034 mm en Península Huemul) y pre-cordillera (609 mm en San Ramón). En concordancia, las poblaciones del este (JA, JB y SA2) necesitarían acumular más MPa días para poder germinar que las poblaciones del oeste (PHA y PHB). En la zona central (PA y PB) los registros de precipitación (307 mm) son menores que en cordillera y pre-cordillera y, sin embargo, estas poblaciones presentan un θ_H más bajo que en PHA y PHB y similares a SRB. Estos resultados sugieren que en las zonas más áridas, con precipitaciones esporádicas, se han seleccionado individuos que producen semillas que germinan en períodos húmedos relativamente prolongados, evitando la germinación ante

el primer pulso de lluvia (e.g. durante la dispersión estival). En el caso de las poblaciones más occidentales, PHA, PHB y SRA3, donde el agua no sería en principio un recurso limitante para la germinación (por las altas precipitaciones), pueden darse condiciones particulares de cada sitio. Por ejemplo la población PHB se desarrolla en un ambiente “estepario”, en un fondo de valle glaciario muy expuesto a los vientos. Esta comunidad es una estepa arbustivo-graminosa con dominio de *Mulinum spinosum* y *Pappostipa speciosa* spp, y baja proporción de *F. pallescens*, que se desarrolla en suelos arenoso-pedregosos con baja retención de agua (Godagnonde & Bran 2009) (y observaciones personales). En el caso de las poblaciones PHA y SRA3 por su posición topográfica en pendientes con orientación Norte, quedan expuestas a vientos del oeste que erosionan el suelo y aumentan la demanda atmosférica de agua limitando su disponibilidad (Coronato & Bertiller 1996, 1997).

El tiempo hídrico se correlacionó sólo con el coeficiente de variación de las precipitaciones estacionales, aunque se observó una tendencia con las precipitaciones de los meses más húmedos (PpMH) a lo largo del gradiente pluviométrico. Los menores valores de PpMH en JA, JB y SA2 podrían explicar los mayores valores de θ_H , es decir, las semillas en estos ambientes con lluvias erráticas germinarían sólo cuando se produce un período húmedo prolongado, siendo el pulso de emergencia otoñal el más propicio para la germinación y sobrevivencia de plántulas de varias especies de gramíneas (López 2011). Por otra parte, los valores intermedios de PpMH en las poblaciones PA, PB y SRB se asociaron a los menores valores de θ_H , lo cual indicaría que la disponibilidad de agua en estos ambientes podría ser mayor a pesar de los eventos estocásticos de lluvia, y estaría asociado a ambientes con suelos profundos, que permiten una mayor retención y disponibilidad de agua (Bertiller et al. 1996, 1997, Bran et al. 2006).

Tanto *F. pallescens* como otras especies perennes de los pastizales patagónicos dependen del banco de semillas para su sobrevivencia, incluso en ausencia de pastoreo (Bertiller 1992). Los bancos de semillas fluctúan año a año y están modulados fuertemente por los regímenes de lluvia y por la incidencia del pastoreo (Ares et al. 1990, Bertiller 1992; Bertiller & Coronato 1994; Bertiller 1995; Bertiller & Ares, 2011). Además, la morfología de las semillas de *F. pallescens* facilita su dispersión, con lo cual si no germinan rápidamente, los fuertes vientos remueven con mayor facilidad el banco de semillas (Bertiller & Coronato 1994; Defossé et al. 1994). Los estudios de Bertiller (1992, 1995), Bertiller & Coronato (1994), Bertiller et al. (1994) y Defossé et al. (1994),

sumado a los resultados obtenidos en esta tesis indicarían que *F. pallescens* es una especie con una buena producción de semillas, con alta viabilidad y porcentajes finales de germinación (en laboratorio y a campo), capaz de germinar en ambientes con amplios rangos hídricos (0 y -1,6MPa) y térmicos (5-22,5°C). La fuerte correlación entre el tiempo térmico y la temperatura de otoño para cada sitio, sumado a la relación entre las precipitaciones de los meses húmedos y el tiempo hídrico indicarían que en otoño sería el período más favorable para la germinación de estas poblaciones de *F. pallescens*. No obstante, se ha reportado que las *semillas* de esta especie germinan generalmente inmediatamente luego de la dispersión (Bertiller 1992; Bertiller & Coronato 1994; Defossé et al. 1994; Oliva 1996) presentando dos períodos de germinación en otoño y en la primavera temprana (Bertiller & Coronato 1994).

CONCLUSION

Los modelos de umbrales resultaron una herramienta útil en la evaluación del comportamiento de la germinación de las *semillas* de *Festuca pallescens* y permitieron aceptar la predicción planteadas para la hipótesis del capítulo. Los tiempos térmicos e hídricos para la germinación de las *semillas* de las poblaciones de la especie analizadas variaron a lo largo del gradiente pluviométrico indicando que las poblaciones presentarían adaptaciones locales a los lugares donde se desarrollan. No obstante, la temperatura base y el potencial hídrico base no difirieron significativamente a lo largo del gradiente de precipitaciones, con lo cual, la disminución de las lluvias desde la Cordillera hacia las Sierras y Mesetas Occidentales no determinarían los requerimientos mínimos de contenidos hídricos de germinación.

En la Cordillera y Pre-cordillera, donde las precipitaciones son más abundantes y la amplitud térmica más reducida, se requieren menos grados días para germinar que en la estepa, aunque deben acumular mayores unidades MPa.días para germinar que algunas poblaciones de la estepa (i.e. PA y PB). Esto sugiere que en el Oeste las temperaturas durante el período germinativo serían más constantes y por encima de la T_b de cada población. De esta manera, las semillas germinan con menor cantidad de grados días acumulados. Por el contrario, en la estepa patagónica las amplitudes térmicas son mayores, con una variación en la temperatura anual o diaria por debajo de la T_b , lo cual se refleja en el aumento de los tiempos térmicos hacia el este. Por otro lado, hacia el oeste del gradiente de estudio, a pesar de ser ambientes húmedos, no todas las poblaciones

presentaron bajos valores de tiempo hídrico. Esto sugiere que las características edáficas de los ambientes inciden más en la germinación de las semillas de cada población que las características macro-ambientales (e.g. precipitaciones) del área ecológica a la que pertenecen. Lo mismo ocurría en la estepa patagónica, los requerimientos hídricos y térmicos difirieron en relación con las características edáficas de los ambientes a los que pertenecen.

Además, se observó que en los extremos del gradiente de muestreo las semillas presentaron pesos muy distintos en un mismo sitio (i.e. PHA, PHB, JA y JB), lo cual indicaría que poseen diferentes estrategias en la producción de semillas. A su vez, se detectó cierto grado de dormición en JA. Finalmente, la correlación entre los tiempos térmicos y la temperatura media anual de otoño, junto con una tendencia entre las precipitaciones de los meses más húmedos y los tiempos hídricos indicarían que las condiciones más favorables para la germinación de las poblaciones de *F. pallescens* analizadas tendrían lugar en los meses de otoño.

CAPÍTULO 4

Variación de las respuestas morfo-fisiológicas al déficit hídrico de diferentes poblaciones de *Festuca pallescens* en ensayo de ambiente común

1. INTRODUCCIÓN

La heterogeneidad ambiental de los ecosistemas se genera por la interacción entre la distribución de los forzantes ambientales y la respuesta diferencial de los organismos a esos factores (Quero 2006). Además, la variación espacial y temporal de factores tanto bióticos como abióticos influye en el establecimiento, desarrollo, reproducción y sobrevivencia de especies vegetales (Santibañez-Andrade et al. 2009). Las zonas áridas y semiáridas como la que se aborda en esta tesis, se caracterizan por una gran heterogeneidad ambiental (Tongway et al. 2004) que promueve una amplia diversidad de tipos de vegetación (fisonomías), diversidad de comunidades vegetales y tipos de suelos (Oosterheld et al. 1998). Sumado a esta complejidad espacio-temporal, los modelos climáticos predicen para los próximos años un incremento en la temperatura media, alteraciones en las precipitaciones y un aumento en la frecuencia de eventos extremos, tales como sequías y años húmedos (Schwinning & Sala 2004; IPCC 2014; Rusticucci & Barrucand 2004). Estos cambios alterarían el régimen del gradiente pluviométrico, y/o la variabilidad climática que caracteriza a la Patagonia, profundizando aún más el déficit hídrico de la región. En este escenario, es fundamental estudiar si existen organismos (e.g. especies o poblaciones de especies) que poseen mayor capacidad de adaptarse a estos cambios futuros. Esto aportará conocimiento esencial para plantear estrategias de gestión de los recursos naturales que refuercen la resiliencia de los ecosistemas al cambio climático.

La economía del agua conforma el principal factor limitante para los organismos que habitan en ecosistemas áridos y semiáridos (Noy Meir 1973), estando la sobrevivencia de las especies vegetales estrechamente relacionada con la disponibilidad de agua en el suelo (Beatley 1974; Fowler 1986; Bertiller et al. 1996). Consecuentemente, el estrés hídrico es una de las principales causas de muerte en plantas (Luna Flores et al. 2012). A diferencia de otros tipos de estrés, el estrés hídrico no ocurre abruptamente sino

que se produce de manera gradual por efecto de la desecación del suelo y una alta tasa de evapotranspiración. El primer efecto se verifica en el cierre estomático y la consecuente reducción del intercambio de dióxido de carbono (CO_2) que repercute negativamente sobre la capacidad de crecimiento de las plantas (Engelbrecht 2001; Larcher 2003; Garau et al. 2009). Frente a valores extremos de sequía, se suma a la reducción en el intercambio de CO_2 una marcada pérdida en la eficiencia del uso del agua (Flexas et al. 2004). Por otro lado, el déficit hídrico produce cambios a nivel morfológico sobre las plantas, como la disminución en el crecimiento de hojas y tallos, producción de menor área foliar y reducción del área foliar específica ($\text{cm}^2\text{gr}^{-1}$) (Farooqi et al. 1994; Engelbrecht 2001). Estos cambios se encuentran asociados a la disminución en la transpiración y conservación del potencial hídrico (Ψ) y el contenido relativo de agua. En general, se verifica también, una reducción de la biomasa aérea de la planta (Khurana & Singh 2004; Singh & Singh 2006; Luna Flores et al. 2012).

Los cambios ambientales provocan respuestas que reflejan las estrategias ecológicas que las especies vegetales desarrollan para sobrellevar estas alteraciones (Kattge et al. 2011; Pérez-Harguindeguy et al. 2013). En ambientes áridos, las precipitaciones son estocásticas y poco abundantes y la evapotranspiración mucho más elevada (Heinrich 1979). Por lo tanto, la vegetación puede desarrollar tanto mecanismos de resistencia o tolerancia a la sequía, como también capturar y almacenar el agua aportada por los infrecuentes eventos torrenciales (Tongway et al. 2004). En condiciones de baja disponibilidad de agua las especies economizan el recurso para minimizar las pérdidas, desarrollando diferentes estrategias como poseer bajas tasas de crecimiento, y en consecuencia, bajas tasas de absorción de recursos (Grime 1977,1979; Chapin 1980, 1991; Lambers et al. 1998; Couso 2011). Esto genera un compromiso entre la capacidad de usar rápidamente los recursos cuando están disponibles (traducir la rápida absorción de recursos en crecimiento) y tolerar la escasez (crecer poco) (Couso 2011).

La gran proporción de tierras áridas, la alta heterogeneidad ambiental y el marcado gradiente pluviométrico hacen de la Estepa Patagónica una región donde coexisten ambientes con déficit hídrico muy contrastantes, desde ambientes muy húmedos hasta ambientes áridos. Las especies presentan características y/o mecanismos que responden a esta disponibilidad de agua (Heinrich 1979; Couso 2011). En la Cordillera y Pre-cordillera, donde las precipitaciones son más abundantes, la disponibilidad de agua sería un recurso menos limitante (Oosterheld et al. 1998; Bianchi 2015). Por lo tanto, las

poblaciones de una misma especie que se desarrollan a lo largo del gradiente pluviométrico entre la Cordillera y la Estepa patagónica, podrían presentar distintas estrategias para ocupar estos ambientes contrastantes.

Las gramíneas constituyen uno de los grupos funcionales más destacados en la estepa de la región Patagonia Norte (Fernández et al. 1991). Muchas de estas especies presentan características en común que les permiten tolerar ambientes con baja disponibilidad de agua como, por ejemplo, gran desarrollo radical y fenología acoplada al régimen de precipitaciones y disponibilidad de agua (Golluscio et al. 2005). Asimismo, muchos aspectos morfológicos y fisiológicos de algunas gramíneas se encuentran estrechamente relacionados con la gran heterogeneidad de los ambientes patagónicos, como la anatomía radical (Leva et al. 2009), la capacidad de recuperación luego de un evento de sequía (Yahdjian & Sala 2006) y ajustes en la relación biomasa aérea: biomasa subterránea (Austin & Sala 2002). En particular, *Festuca pallescens* aprovecha en forma oportunista los pulsos de agua y nutrientes (ver Capítulo 1; Coronato & Bertiller 1997; Moreno 2012) y presenta diferencias fenológicas asociadas a la variación de la temperatura del aire (Bertiller et al. 1990).

Los pastizales de *F. pallescens* se ubican en áreas topográficas que por su exposición o altura poseen balance hídrico favorable para su desarrollo (i.e. al balance entre demanda atmosférica versus oferta de agua) (León et al. 1998). Por lo tanto, se la puede encontrar dominando comunidades tanto en ambientes húmedos de peri-mallines, como en ambientes más secos de estepas de altura (Bran et al. 2000). Este patrón de distribución se observa desde el Norte de Neuquén hasta las nacientes del río Coyle en Santa Cruz (León et al. 1998). Específicamente, en el área ecológica de Pre-cordillera de Patagonia Norte, las poblaciones de *F. pallescens* se presentan como: ingresiones en el bosque en forma de isletas; en mallines sub-húmedos; en los bordes de numerosos mallines húmedos (peri-mallines) (Siffredi et al. 2004; Godagnonde & Bran 2009); y en mesetas altas (más de 900 m s.n.m.) asociado a la disminución de la temperatura con un balance hídrico más favorable (Bertiller & Defossé 1990; Bonvissuto et al. 2008). Hacia el este, en el área ecológica de Sierras y Mesetas Occidentales, con dominio de suelos poco desarrollados, se encuentran estepas gramíneas de *F. pallescens* en sectores: (i) por encima de los 1200 m s.n.m. como la Meseta de Somuncurá; y (ii) en mallines sub-húmedos y bordes de mallines húmedos (peri-mallines), aunque en menor proporción que en el Área Ecológica de Pre-cordillera. Esto se debe a que hay una gran disminución de

mallines (humedales) (i.e. n° y/o dimensiones por km²), asociado a la existencia del gradiente pluviométrico Oeste-Este, y a una temperatura media anual mayor (López et al. 2005; Bran et al. 1998). Por lo tanto, la distribución de *F. pallescens* abarca un amplio gradiente pluviométrico, desarrollándose en áreas con 2000 mm de precipitación media anual hasta menos de 200 mm, tanto en ambientes de peri-mallines (ubicados a diferentes alturas) como en estepas gramíneas ubicadas a más de 900 m s.n.m. Esta capacidad de *F. pallescens* de instalarse y desarrollarse en una gran variedad de ambientes podría deberse a un alto grado de plasticidad o la existencia de adaptación local.

Es importante interpretar las diferencias entre la plasticidad y la adaptación. La *plasticidad fenotípica* es la expresión fenotípica diferencial de un mismo genotipo en respuesta al ambiente (Scheiner et al. 1993; Zhivotovsky et al. 1996), mientras que la *adaptación* es un proceso lento que involucra la acumulación de cambios genéticos en una población producto de la presión que el ambiente ejerce sobre la misma (Price et al. 2003). La plasticidad fenotípica puede involucrar cambios a nivel morfológico, fisiológico, e incluso comportamental (Pigliucci 2001; Aubin-Horth & Renn 2009). Sin embargo, estos cambios son reversibles y no se asocian a modificaciones a nivel genético, es posible que un atributo de carácter plástico pueda convertirse en un atributo adaptativo (Pigliucci 2001; Price et al. 2003; Aubin-Horth & Renn 2009), por lo que la plasticidad fenotípica puede en ciertas circunstancias ser adaptativa (i.e. plasticidad fenotípica adaptativa) (Falluor-Rubio et al. 2009). Un ejemplo puede ser cuando el ambiente modula cambios a nivel genético, favoreciendo la sobrevivencia de especies y/o poblaciones con genotipos que poseen mayor plasticidad fenotípica (ej. en ambiente con gran variabilidad espacio-temporal). Una de las formas de discernir entre una adaptación local y una respuesta plástica, es la utilización de ensayos de ambiente común. En estos ensayos se evalúan poblaciones de una especie provenientes de sitios diversos minimizando la variación ambiental. De esta forma, si la divergencia fenotípica se mantiene en las poblaciones experimentales (poblaciones de individuos tomadas de diferentes ambientes) en condiciones ambientales comunes, se puede asumir que las variaciones morfológicas y/o fisiológicas entre poblaciones tienen bases genéticas (White et al. 2007; Ballentine & Greenberg 2010).

Por lo expuesto, bajo el régimen de precipitaciones establecido en Patagonia Norte y con una disponibilidad de agua determinada por las condiciones de demanda atmosférica, las poblaciones de *F. pallescens* podrían presentar diferencias morfo-

fisiológicas relacionadas a los ambientes que habitan y a los mecanismos que utilizan para aprovechar el agua disponible. Frente a este escenario se plantea la siguiente hipótesis de trabajo con su predicción asociada:

HIPÓTESIS:

La diversidad de ambientes en los que se distribuye *Festuca pallescens* en el norte de Patagonia, asociados principalmente al fuerte gradiente de precipitaciones, ha promovido procesos de adaptación local que se evidencian en caracteres morfo-fisiológicos de importancia adaptativa relacionados con la respuesta a estrés hídrico.

PREDICCIÓN:

En un ensayo en ambiente común las poblaciones provenientes de sitios con distintos regímenes de precipitación, presentarán diferencias en caracteres morfo-fisiológicos asociados al crecimiento vegetativo y a la capacidad de respuesta frente al estrés hídrico.

2. OBJETIVOS DEL CAPÍTULO:

Objetivo 1: Determinar si las poblaciones de *Festuca pallescens* distribuidas a lo largo de un gradiente de precipitaciones presentan diferencias genéticas en caracteres morfo-fisiológicos al ser evaluadas en ensayos de ambiente común (en el tratamiento testigo, cuando el agua no es un factor limitante).

Objetivo 2: Evaluar la respuesta de poblaciones de *Festuca pallescens* provenientes de ambientes con precipitaciones medias anuales contrastantes frente a diferentes niveles de disponibilidad de agua en caracteres morfo-fisiológicos en un ensayo de ambiente común.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Sitio de muestreo y material vegetal

Se seleccionaron 10 poblaciones para el ensayo de ambiente común de las 14 inicialmente incluidas en esta tesis (Capítulo 1). En sentido O-E del gradiente pluviométrico: Península Huemul alto y bajo (PHA y PHB), San Ramón alto y bajo (SRA-3 y SRB), Campo Experimental de Pilcaniyeu (PA y PB), Ing. Jacobacci (JA y JB) y se incluyeron las poblaciones de Somuncura (SA y SB) (Tabla 1.1 del Capítulo 1). La selección de poblaciones respondió principalmente a la disponibilidad de semillas y plántulas, pero se tuvo en cuenta la representación de poblaciones provenientes de ambientes de *F. pallescens* de todo el gradiente de precipitaciones. Por otra parte, al momento de establecer el ensayo se desconocía que las poblaciones SA y SB no eran poblaciones puras sino que se trataba de un ecotipo híbrido. No obstante, se realizaron gran parte de las mediciones en estas especies con lo cual se decidió incluirlas para comparar la respuesta al estrés de este ecotipo con el de las poblaciones de *F. pallescens*.

Las plantas utilizadas en este ensayo se obtuvieron a partir de los ensayos de germinación del capítulo 3. Las semillas germinadas se colocaron en placas de Petri con agar en cámaras de germinación hasta que desarrollaran la primer hoja (Figura 4.1a), luego se instalaron en “Plugs” (bandejas multiceldadas) de 200 cavidades con sustrato inerte (Figura 4.1b), que fueron colocadas en un “mini-invernáculo” para mantener la humedad y temperatura (Figura 4.1c). Cuando las plántulas desarrollaron tres hojas en el macollo, se trasplantaron a macetas plásticas de 3 litros con un sustrato que contenía una relación 1:1 de ceniza volcánica y de tierra negra y 1/2 de turba, con una conductancia eléctrica (CE) de 0,15 mS y pH=6,97. Para favorecer el desarrollo inicial y la aclimatación de las plantas, se fertilizó por única vez la semana posterior al repique. Antes de dar inicio a los tratamientos las plantas crecieron durante tres meses en ambiente común (bajo las mismas condiciones de luz, temperatura y humedad) en un invernáculo vidriado. El total de plantas para el ensayo fue de 600.

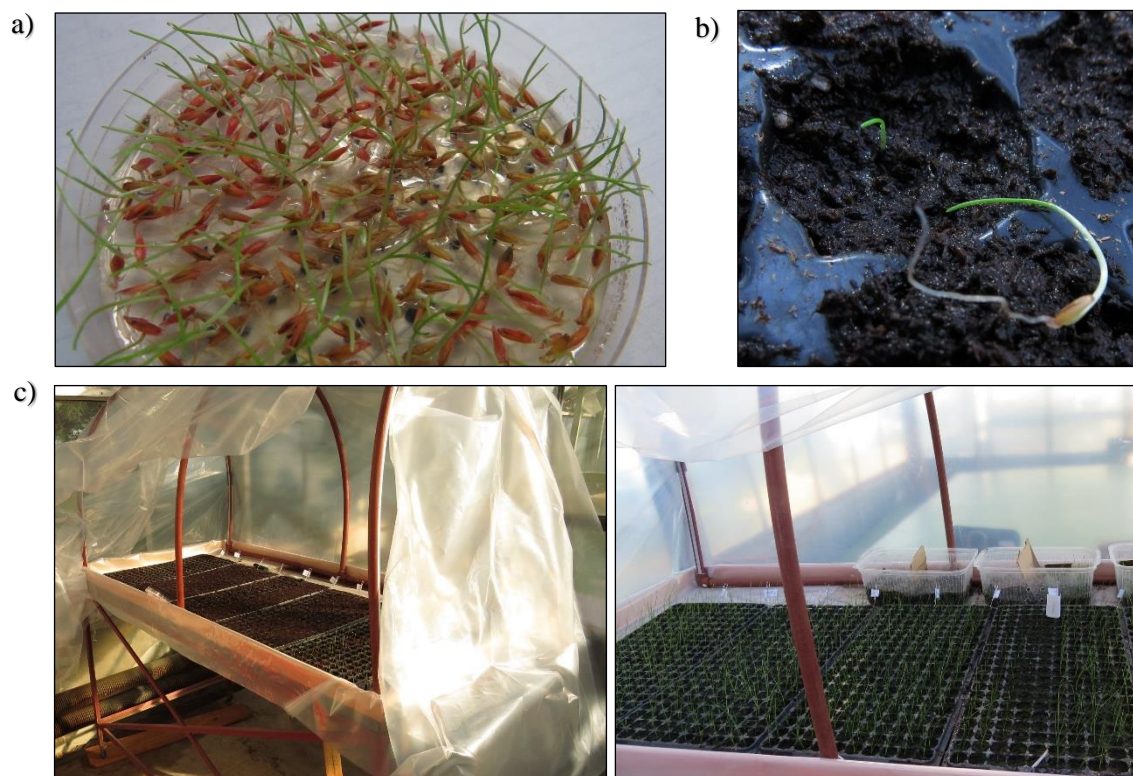


Figura 4.1: a) Semillas germinadas en placas de Petri con agar. b) Dos semillas repicadas en la bandeja multiceldada c) “Mini-invernáculo” donde se instalaron las bandejas con plantas repicadas hasta alcanzar tres hojas.

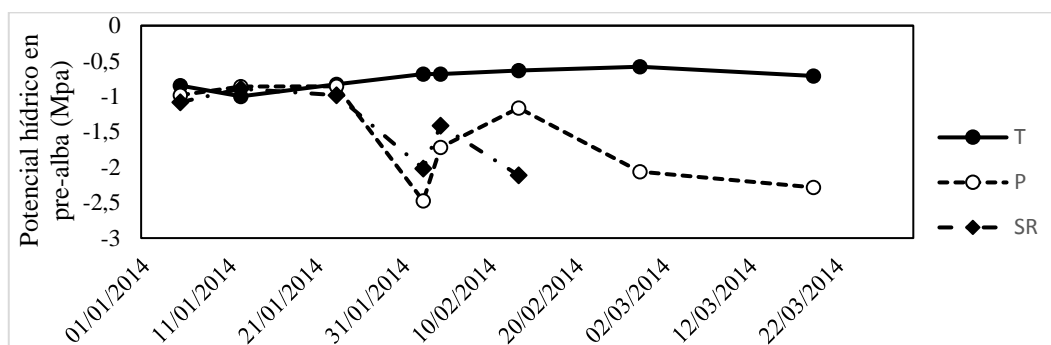
3.2 Diseño experimental

El ensayo se realizó con un diseño de parcelas divididas donde se evaluó el efecto de la disponibilidad de agua (factor asignado a parcela principal), las poblaciones (factor asignado a las sub-parcelas) y la interacción disponibilidad de agua*población (tratamiento). Se establecieron tres niveles para el factor “disponibilidad de agua”: i) manteniendo el contenido volumétrico de agua en la maceta próximo al 15% (T, “testigo”), ii) riego al inicio hasta capacidad de maceta y luego pulsos periódicos de riego de 5mm simulando lluvias esporádicas (P, “pulsos”) y iii) sólo un único riego al inicio hasta capacidad de maceta (SR, “sin riego”) (Figura 4.2). El pulso de riego de 5 mm se determinó en base al promedio diario inter-anual de las precipitaciones en las estepas del sureste y noreste de Patagonia (Coronato & Bertiller 1996; 1997; López 2011). En el nivel “testigo” se evaluaron las diferencias genéticas en los caracteres morfo-fisiológicos entre las poblaciones ya que el agua no fue un factor limitante. La sub-parcela estuvo conformada por las 10 poblaciones (PHA, PHB, SRA-3, SRB, PA, PB, JA, JB, SA y SB) con cuatro repeticiones por tratamiento distribuidas al azar y con 5 plantas por población

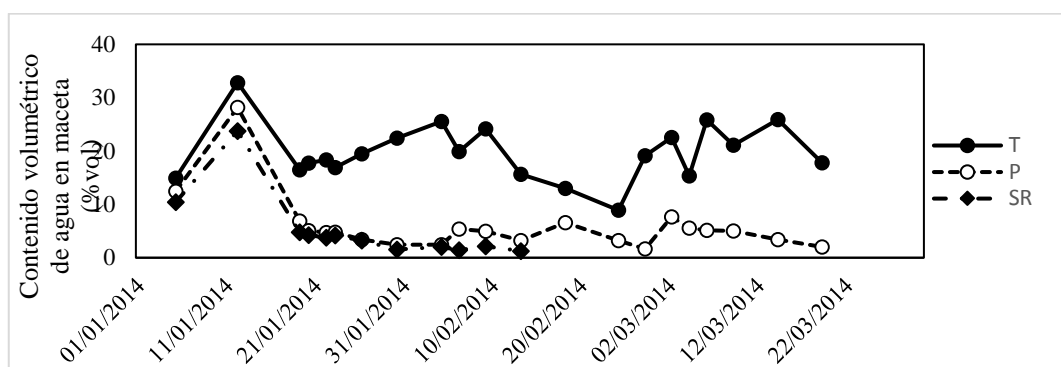
(200 por tratamiento, totalizando 600 plantas para todo el ensayo (4 repeticiones x 5 plantas x 10 poblaciones x 3 niveles de disponibilidad de agua). Los “pulsos” de riego se aplicaron cuando el 50 % del total de las plantas del tratamiento se encontraban por debajo del 3 % de humedad en maceta (Figura 4.2; fechas 4, 13 y 27 de febrero de 2014). En cada pulso de riego se suministraron 5 mm de agua simulando un evento errático de precipitación de la estepa (Golluscio et al. 1998; López 2011). La duración total del ensayo fue de tres meses (05/01/14 al 17/03/14) y durante ese período se monitoreó el contenido volumétrico de agua en maceta (%Vol), la conductancia estomática (gs) y el estado hídrico de las plantas utilizando como variable el potencial hídrico en pre-alba (Ψ_p , (Figura 4.2).

El contenido volumétrico de agua en maceta se midió cada cuatro días empleando un tridente TDR (reflectometría de dominio temporal) el cual se enterró a 10 cm de profundidad en cada maceta. La conductancia estomática ($\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2}\text{s}^{-1}$) se monitoreó tres veces por semana, como proxy del estado hídrico. Se empleó un porómetro SC-1 (Decagon Devices inc.) midiendo en cuatro hojas totalmente expandidas en todas las plantas del ensayo. El potencial hídrico en pre-alba (MPa) se midió periódicamente (10-15 días) para evitar el daño sobre las plantas. Las determinaciones se realizaron en tres hojas de todos los niveles de tratamiento, empleando una bomba de presión (PMS Instruments Co., Corvallis, USA). Los individuos muestreados fueron distintos en cada fecha de medición, siendo elegidos al azar dentro de cada tratamiento. Las hojas se obtuvieron cortando al nivel del suelo un macollo que luego se colocó en un sobre de papel y en un lapso no mayor a 5 min se realizó la medición.

a)



b)



c)

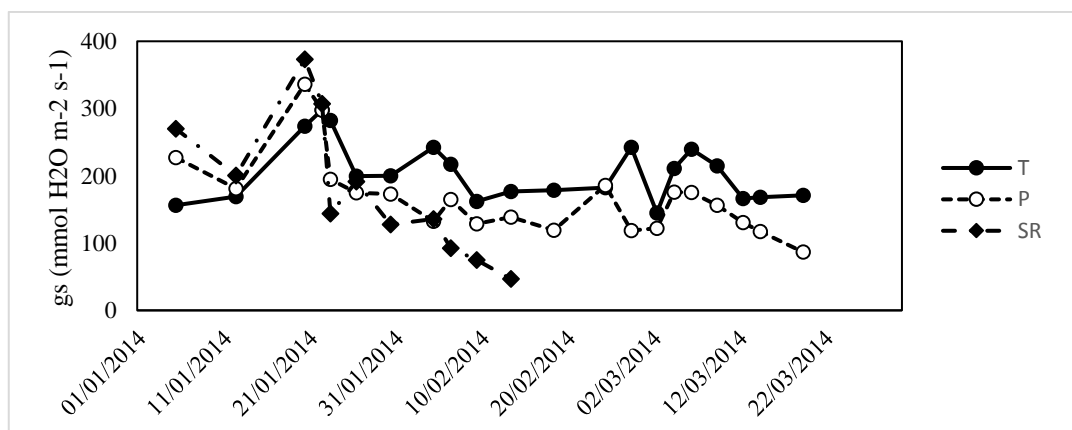


Figura 4.2: Monitoreo del porcentaje del potencial hídrico a lo largo del ensayo (a), contenido volumétrico de agua en maceta (%vol) (b) y conductancia estomática (gs) (c). Los símbolos indican los tres niveles de disponibilidad de agua: círculo negro (T; testigo), círculo blanco (P; pulsos de riego), rombo (SR; sin riego).

3.3 Variables respuesta

Las variables respuesta medidas en las poblaciones de *F. pallescens* se presentan a continuación en la Tabla 4.1:

Tabla 4.1: Variables respuestas medidas en las poblaciones de *Festuca pallescens*. Se especifica qué variable se evalúa en cada población

Variable	Población									
	PHA	PHB	SRA-3	SRB	PA	PB	JA	JB	SA	SB
1. Producción de macollos	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
2. Producción de hojas verdes	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
3. Elongación foliar (mm)	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
4. Producción de biomasa (gr)	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
5. Distribución de la biomasa radical y aérea (R/S).	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
6. Supervivencia	si	si	si	si	si	si	si	si	si	si
7. Tasa de fotosíntesis neta (A)	-	-	si	si	-	-	si	si	-	-
8. Conductancia estomática (gs)	-	-	si	si	-	-	si	si	-	-
8. Potencial hídrico a pre-alba	-	-	si	si	-	-	si	si	-	-

3.4 Medición de variables respuesta:

Para evaluar si existían diferencias genéticas entre las poblaciones de *Festuca pallescens* que se manifiesten en caracteres morfo-fisiológicos (**Objetivo 1**) se evaluaron en el “testigo” sin restricción hídrica: *componentes del crecimiento y distribución de biomasa y peso de macollos*. Para la evaluación de los componentes del crecimiento se marcaron 4 macollos con aros de metal en 10 plantas de cada población (Figura 4.3a) al inicio de ensayo y luego, se midieron las siguientes variables al final del mismo:

- i. *Componentes del crecimiento:*
 - a. Producción de macollos: promedio por planta de la diferencia en número de macollos producido por macollo marcado (i.e. macollo madre) al final y al inicio: PM [(n° de macollos finales) – (n° de macollos iniciales)].

- b. Producción de hojas verdes: promedio por planta de la diferencia del número de hojas producido por macollo madre al final y al inicio: PH [(n° de hojas finales) – (n° de hojas iniciales)].
- c. Elongación foliar: promedio de la diferencia de la sumatoria de la longitud total de las hojas verdes producidas por macollo madre por planta. Para ello, al largo total final se restó el largo inicial (medido al momento de marcar cada macollo); y luego se relativizó al número de hojas producidas por macollo madre. Es decir, para cada planta se obtuvo: $\sum EF [(mm \text{ de hojas finales por macollo madre}) - (mm \text{ de hojas iniciales por macollo madre})] / n^\circ \text{ de hojas producidas por macollo madre}$.
- e. Producción de biomasa: se determinó por la diferencia entre la biomasa radical y aérea al inicio y al final del ensayo. Previo al inicio del ensayo, se seleccionaron 3 plantas al azar por población para determinar el peso seco en gramos de la biomasa aérea y radical. Las plantas fueron removidas de las macetas, se lavaron para descartar en particular restos de turba en raíces y se secaron en estufa a 70°C hasta peso constante (72 hs) y se pesaron con balanza de precisión. Al final del ensayo, para cada nivel de disponibilidad de agua y población se realizó el mismo procedimiento y se determinó la biomasa final a partir de las plantas marcadas para la determinación de los componentes de crecimiento. La producción de biomasa se evaluó como la diferencia entre la biomasa final y la inicial.
- ii. *Distribución de la biomasa aérea y radical*: A partir de los datos de biomasa aérea y radical obtenidos para cada población, se estableció la relación peso seco de la biomasa radical: peso seco de la biomasa aérea (R/S; del inglés Root/Shoot) al inicio y al final del ensayo.
- iii. *Peso por macollo*: se calculó a partir de la relación entre la biomasa final de las plantas marcadas para evaluar el crecimiento y el número total de macollos que presentaban al momento de la determinación de la biomasa final, PeM: (Producción de biomasa final de la planta) / (número de macollos que produjo al final del ensayo).

Para analizar los caracteres morfo-fisiológicos y estrategias de poblaciones de *F. pallescens* provenientes de los extremos del gradiente de precipitación frente a diferente

disponibilidad de agua (**Objetivo 2**), se midieron en los tres niveles de disponibilidad de agua (T, P y SR) las siguientes variables respuesta:

- i. *Sobrevivencia*: La sobrevivencia se evaluó a los 45 días de iniciado el ensayo, cuando más del 50% de las plantas del tratamiento “sin riego” presentaban potencial hídrico en pre-alba menor a -2 MPa indicando un estrés hídrico de moderado a severo (Caballé et al. 2011).
- ii. *Producción de macollos* (explicado en el párrafo anterior)
- iii. *La distribución de la biomasa radical y aérea (R/S)* (explicado en el párrafo anterior).
- iv. *Peso por macollo*: (explicado en párrafo anterior).

Por otro lado, en poblaciones provenientes de sitios con precipitación contrastante (SRB, SRA-3, JA y JB) se midieron variables ecofisiológicas para evaluar los mecanismos de ajuste de las plantas a los cambios en la disponibilidad hídrica y que también se relacionaron con las mediciones de estado hídrico y contenido volumétrico de agua en maceta realizados en el seguimiento del ensayo (Ver 4.2). Los parámetros que se evaluaron fueron los siguientes:

- v. *Tasa de fotosíntesis neta (A , $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), y conductancia estomática al vapor de agua (g_s , $\text{mol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$)*: La tasa de fotosíntesis neta y la conductancia estomática fueron evaluadas de manera conjunta utilizando un analizador de gases infrarrojo de sistema abierto Li-Cor 6400 (Lincoln, NE, USA). Las mediciones fueron realizadas al inicio del ensayo y en el día previo y en dos días consecutivos posteriores a la aplicación de los pulsos de agua, entre las 10 hs y las 16 hs, en días coincidentes con las mediciones de potencial hídrico en pre-alba y contenido volumétrico de agua en maceta. Se utilizó una lámpara de LED (6400-02 LED Light Source, Lincoln, NE, USA) para controlar la intensidad lumínica dentro de la cámara de medición. La curva completa de respuesta de la tasa de fotosíntesis neta a la radiación fotosintéticamente activa (RFA) fue evaluada en 3 plantas por población empleando 6 intensidades lumínicas (0, 50, 250, 750, 1000 y 2000 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$), esta medición se realizó solo al inicio del ensayo y en condiciones óptimas no estresantes. Las mediciones previas y posteriores a la aplicación de los pulsos de agua se realizaron sólo a radiación saturante (A_{sat} , 1800 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$). Cada medición fue realizada considerando un mínimo de 180 s en cada nivel

de intensidad lumínica y 3% de coeficiente de variación. La temperatura de la cámara fue similar a la temperatura ambiente en el momento de medición y la presión parcial de CO₂ se fijó en 400 $\mu\text{mol mol}^{-1}$. El flujo de aire varió entre 50 y 500 $\mu\text{mol s}^{-1}$ para mantener el ΔCO_2 por sobre 5 $\mu\text{mol mol}^{-1}$, valor mínimo de sensibilidad del Li-Cor 6400.

- vi. *Eficiencia intrínseca o instantánea en el uso del agua (EUA, $\mu\text{mol CO}_2 \text{ mol H}_2\text{O}^{-1}$)*: se calcula como la relación entre la asimilación de CO₂ y la conductancia estomática (*Asat/gs*). Este parámetro mide diferencias relacionadas con la capacidad de la hoja para regular la fotosíntesis y la conductancia estomática, y que son independientes de las condiciones atmosféricas en el momento de la medida.
- vii. *Déficit de presión de vapor (DPV, KPa)*: Este parámetro se utilizó como medida del nivel de demanda atmosférica. El dato se obtuvo con el Li-Cor 6400 en el momento de medición de la tasa de fotosíntesis neta utilizando el dato de humedad y temperatura ambiente.

Adicionalmente, se evaluó la pérdida y recuperación de la actividad fotosintética mediante la comparación entre el nivel “testigo” y el nivel “pulsos” para cada pulso de agua en el día previo y en dos días consecutivos posteriores a la aplicación de cada pulso.



Figura 4.3: Planta con cuatro macollos marcados con aros de metal.

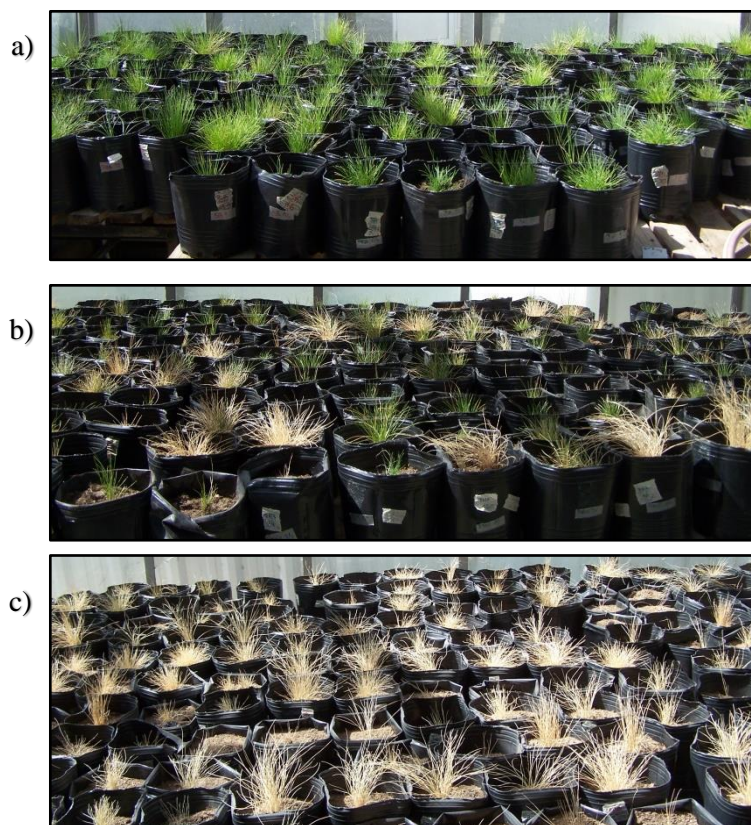


Figura 4.4: Niveles de disponibilidad hídrica en el ensayo de estrés hídrico en el día 24/02/14.
a) Testigo, b) Pulsos y c) Sin riego.

3.5 Análisis de datos:

Los análisis estadísticos se realizaron con el paquete estadístico InfoStat (Departamento de Estadística Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba) utilizando un análisis de la varianza (ANOVA). En los casos en que se encontraron diferencias significativas se abrió la interacción con una comparación de medias con el test a posteriori LSD Fisher con la corrección de Bonferroni, con un nivel de significancia del 5%. El efecto de parcelas divididas se evaluó con el siguiente modelo (modelo 1)

$$Y_{ijk} = \mu + D_i + P_k + (SP)_{ik} + e^1_{ij} + e^2_{ijk}$$

donde D (parcela principal) es el efecto fijo de la disponibilidad de agua ($i=1..3$); P (sub-parcela) es el efecto de la población ($k=1..8$); (DP) es la interacción entre D y P; e^1_{ij} es el error asociado a la parcela principal; e^2_{ijk} es el error asociado a la sub-parcela.

Se evaluaron las diferencias genéticas en las variables mencionadas en la Tabla 4.1 entre poblaciones en el nivel testigo. Dado que las plantas pertenecen al diseño anterior, se cuenta con una restricción a la aleatorización, con lo cual las repeticiones por

población constituyeron bloques. De esta forma, el modelo 2 se estimó de la siguiente manera:

$$Y_{ij} = \mu + P_i + b_j + e_{ij}$$

donde P es el efecto fijo de la población ($i=1 \dots 10$), b es el bloque ($j=1..4$) y e_{ij} es el error experimental. Se cumplen los supuestos de normalidad en ambos modelos y se trabajó con heterocedasticidad de varianzas para el factor población en el análisis de las siguientes variables: producción de biomasa, producción de macollos, producción de macollo neto y peso del macollo.

Las diferencias en las variables fisiológicas se evaluaron mediante análisis de la varianza utilizando el programa InfoStat (Departamento de Estadística Aplicada, Universidad Nacional de Córdoba) y en caso de ser necesario, se realizaon análisis a posteriori con test de comparaciones de Tuckey. Asimismo, la comparación de los parámetros de modelo lineales y no lineales se realizó utilizando en software programa GraphPad Prism version 5.00 para Windows, GraphPad Software.

4. RESULTADOS

Las poblaciones de *F. pallescens* provenientes de distintos ambientes y altitudes del gradiente pluviométrico, presentaron diferencias en caracteres morfo-fisiológicos de importancia adaptativa, relacionados con la respuesta a estrés hídrico. Estas diferencias en el comportamiento de las poblaciones se evidenciaron tanto dentro del nivel “testigo” como entre los diferentes niveles de disponibilidad de agua en un ambiente común, indicando que existirían adaptaciones locales y que algunas de estas diferencias genéticas se asociarían a la capacidad de respuesta de las poblaciones frente al déficit hídrico.

4.1 Diferencias en caracteres morfológicos de las poblaciones de *F. pallescens*

Las poblaciones de *F. pallescens* presentaron diferencias significativas en condiciones no limitantes de disponibilidad de agua (testigo) en los componentes del crecimiento pero no en la distribución de biomasa o relación R/S (Tabla 4.2). Se observó que las poblaciones con mayor *producción de macollos* fueron PA y PB, y la de menor producción fue PHA, mientras que el resto de las poblaciones presentaron valores similares entre sí ($F=3,61$; $p=0,0038$). La *producción de hojas* fue similar en la mayoría

de las poblaciones, siendo PA la población con valor más alto y SRA la de menor producción ($F=2,94$; $p=0,012$) (Tabla 4.2). Luego, se destaca PHA con el valor más alto de *elongación foliar*, diferenciándose de SRB, PA, JA y SB (de valores muy bajos) ($F=3,59$; $p=0,0047$). Asimismo, las poblaciones de *F. pallescens* presentaron diferencias en la *producción de biomasa* (total; $F=7.44$, $p=0.0001$; aérea; $F=6.86$, $p=0.0002$; radical; $F=7.14$, $p=0.0002$), las poblaciones con mayor producción de biomasa total fueron PHA y SRB, mientras que las que produjeron menos cantidad de biomasa fueron SRA-3, SA y SB. Este patrón también se observó tanto en la biomasa aérea como en la radical. Como se mencionó anteriormente no se encontraron diferencias en la distribución de la biomasa ($F=0.61$, $p=0.77$) (Tabla 4.2). No obstante, todas las poblaciones incrementaron la relación R/S con respecto al inicio del tratamiento. Por último, el *peso por macollo* no difirió entre poblaciones aunque se observa que PB y JB valores bajos del peso *por* macollo, pero alta producción de macollos.

Tabla 4.2: Resumen de las variables morfológicas del nivel testigo para las poblaciones de *F. pallescens*. En la tabla se presentan la media y el *error estándar*. Las letras indican los grupos obtenidos con la comparación de medias a partir del test a posteriori LSD Fisher con la corrección de Bonferroni. Las siglas de las poblaciones se corresponden a la Tabla 1.1 del capítulo 1.

Variable\Población	PHA	PHB	SRA-3	SRB	PA	PB	JA	JB	SA1	SB
Producción de macollos neta	2,2 ± 1 b	3,7 ± 0,7 ab	3,04 ± 0,7 ab	5 ± 1,4 ab	8,8 ± 2 a	8,6 ± 0,6 a	6,75 ± 1 ab	7,04 ± 1,5 ab	5,75 ± 0,9 ab	4,8 ± 0,9 ab
Producción de hojas verdes	11,5 ± 2,4 ab	14,3 ± 4,1 ab	10,2 ± 2,9 b	17,8 ± 5 ab	30,4 ± 5,6 a	22,9 ± 2,6 ab	23,25 ± 2 ab	23,75 ± 4 ab	18,8 ± 3,9 ab	14 ± 4,6 ab
Elongación foliar (mm)	12,4 ± 2,3 a	7,04 ± 1,2 ab	6,4 ± 1,2 ab	4,35 ± 0,8 b	5,65 ± 0,3 b	7,9 ± 1,6 ab	4,5 ± 0,8 b	6,7 ± 1 ab	6,46 ± 1,1 ab	5,04 ± 0,7 b
Producción de biomasa (gr)	2,12 ± 0,4 ab	2,05 ± 0,8 ab	1,17 ± 0,2 ab	2,6 ± 0,3 a	1,1 ± 0,3 b	1,9 ± 0,8 ab	1,2 ± 0,04 ab	1,7 ± 0,3 ab	0,8 ± 0,1 b	0,53 ± 0,1 b
Distribución de la biomasa (R/S)	0,7 ± 0,05	0,9 ± 0,1	0,8 0,12	0,88 ± 0,1	0,7 ± 0,16	0,8 ± 0,05	0,68 ± 0,03	0,7 ± 0,08	0,8 ± 0,06	0,9 ± 0,19
Peso de un macollo (gr)	0,05 ± 0,02	0,05 ± 3.10 ⁻³	0,02 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,02	0,03 ± 4.10 ⁻³	0,05 ± 0,02	0,03 ± 4.10 ⁻³	0,05 ± 0,02	0,05 ± 0,02

4.2 Respuesta de las poblaciones de *F. pallescens* frente a déficit hídrico

4.2.1 Diferencias entre tratamientos (T, P, SR)

Las poblaciones de *F. pallescens* respondieron diferencialmente a los tres niveles de disponibilidad de agua, observándose diferencias en la mayor parte de las variables evaluadas con excepción de la distribución de la biomasa (Tabla 4.3). A pesar de no haberse encontrado diferencias significativas en la relación R/S, se observaron valores muy similares entre los niveles T y P y más elevado en el nivel sin riego (SR). Los valores más altos en la *producción de macollos* ($F=37,36$; $p<0,001$), *producción de biomasa* ($F=57,61$; $p<0,001$) y en el *peso por macollo* ($F=44,60$; $p<0,001$) se observaron en T (Tabla 4.6). Asimismo, no se encontraron diferencias entre los niveles P y SR, exceptuando la *producción de macollos*, donde las poblaciones produjeron menos macollos cuando el déficit hídrico fue más intenso (Tabla 4.6).

Tabla 4.3: Diferencias en las variables respuesta entre tratamientos de disponibilidad de agua: Testigo (alta disponibilidad), Pulsos (disponibilidad media) y Sin Riego (baja disponibilidad). En la tabla se presentan la media y el *error estándar*. Los niveles de distinta disponibilidad de agua son: alta (T: Testigo), intermedia (P: Pulsos) y baja (SR: Sin riego). Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los niveles.

Variable\Tratamiento	T	P	SR
Distribución de biomasa (R/S)	$0,82 \pm 0,03$	$0,83 \pm 0,07$	$0,95 \pm 0,08$
Producción de biomasa (gr)	$1,54 \pm 0,18$ a	$0,16 \pm 0,14$ b	$0,14 \pm 0,11$ b
Producción de macollos	$5,57 \pm 0,47$ a	$3,58 \pm 0,4$ b	$1,81 \pm 0,17$ c
Peso de un macollo (gr)	$0,04 \pm 2,5 \times 10^{-3}$ a	$0,01 \pm 2,4 \times 10^{-3}$ b	$0,01 \pm 2,8 \times 10^{-3}$ b

Como se mencionó en 4.1 la relación R/S al final del ensayo fue menor que al inicio en el nivel T, con lo cual todas las poblaciones presentaron un aumento de la biomasa aérea en ausencia de déficit hídrico ($F=5,21$; $p=0,02$). Sin embargo, en bajos niveles de disponibilidad hídrica (P y SR), la R/S no difirió entre el inicio y el final del ensayo en las poblaciones estudiadas (anexo Figura 4.1 y 2).

La sobrevivencia en T fue del 100% y entre los tratamientos P y SR se observaron diferencias en la sobrevivencia con un efecto positivo de los pulsos de agua sobre la

misma. En poblaciones como PB, JA o PHA la aplicación de los pulsos de agua mejora entre un 45-60% la sobrevivencia. Las poblaciones con mejor desempeño frente la baja disponibilidad de agua (tratamiento SR) fueron SRB y las dos de Somuncura (SA y SB). En general, con excepción de PB, las poblaciones de zonas bajas mostraron mayor porcentaje de sobrevivencia que aquellas de zonas altas (Figura 4.5).

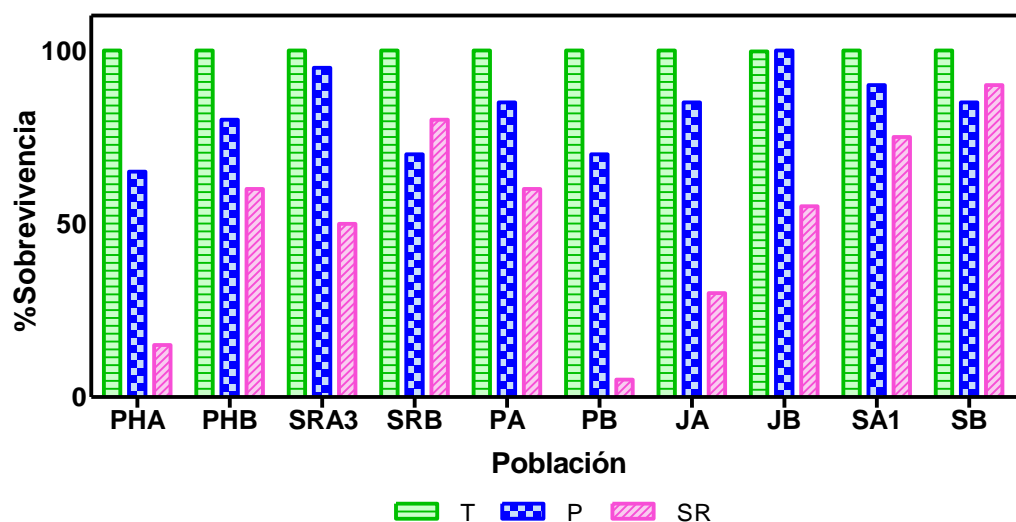


Figura 4.5: Porcentaje de sobrevivencia de las poblaciones de *Festuca pallescens* evaluadas luego de 45 días del inicio del ensayo. Las barras de colores indican los tratamiento con diferentes niveles de disponibilidad hídrica: alta (T: Testigo), intermedia (P: Pulsos) y baja (SR: Sin riego).

4.2.2 Diferencias entre poblaciones

El comportamiento ante los niveles de disponibilidad de agua aplicados fue diferente para cada **población** (Tabla 4.4). En general, los valores de las variables respuesta en los dos niveles de déficit hídrico (P y SR) fueron menores que en el “testigo”, encontrándose diferencias significativas sólo en las variables *producción de macollos* (T: $F=3,61$; $p<0,001$, P: $F=2,30$; $p=0,04$; SR: $F=2,93$; $p=0,01$) y *producción de biomasa* (T: $F=6,57$; $p<0,001$, P: $F=12,87$; $p<0,001$; SR: $F=35,73$; $p<0,001$) entre todas las poblaciones y sólo en el *peso por macollo* en el nivel SR ($F=3,27$; $p=0,03$).

En el tratamiento con pulsos de agua (P) las poblaciones con mayor *producción de macollos* fueron PA y SRA-3 mientras que PHB, SA y SB produjeron la menor cantidad de macollos totales. Siendo la producción de macollos una medida de

crecimiento, en este nivel de disponibilidad de agua, las poblaciones que más crecieron fueron PA y SRA-3. Sin embargo, estas no fueron las que produjeron más biomasa. La población que presentó el valor más alto de *producción de biomasa* fue SRB mientras que la de menor (e incluso pérdida debido a la forma de medición) fue PHA (Tabla 4.4).

En el tratamiento con mayor déficit hídrico (SR) se registra la mayor *producción de macollos* en PB y la menor en SRA y SA. Asimismo, las poblaciones con los valores de mayor y menor *producción de biomasa* se encuentran en el mismo sitio: Península Huemul bajo (PHB) y alto (PHA), respectivamente (Tabla 4.4). En cuanto al peso de un macollos, se observó que de la misma forma que en el nivel T, PHA es la población con el mayor valor del *peso por macollo* y el resto de las poblaciones presentaron el mismo peso para un macollo con excepción de JA (Tabla 4.4).

4.3. Respuesta fisiológica a los pulsos de agua:

La relación entre el potencial hídrico y la conductancia estomática no difirió entre las poblaciones en el tratamiento “pulsos”. Todas las poblaciones analizadas ajustaron a un mismo modelo ($Y=A+B/X$) pero no se registraron diferencias significativas entre los parámetros de ajuste al modelo. No obstante, las poblaciones JA, JB, SRA-3 y SRB presentaron valores de potencial hídrico más negativos que SA y SB (Figura 4.6a). De la misma manera, se evaluó la relación entre el DPV (Deficit de Presión de vapor) y la conductancia estomática (gs) para JA, JB, SRA-3 y SRB. No se registraron diferencias entre los parámetros de ajuste entre las poblaciones. El ajuste de las curvas fue bajo para todas las poblaciones ($r^2 < 0.5$)

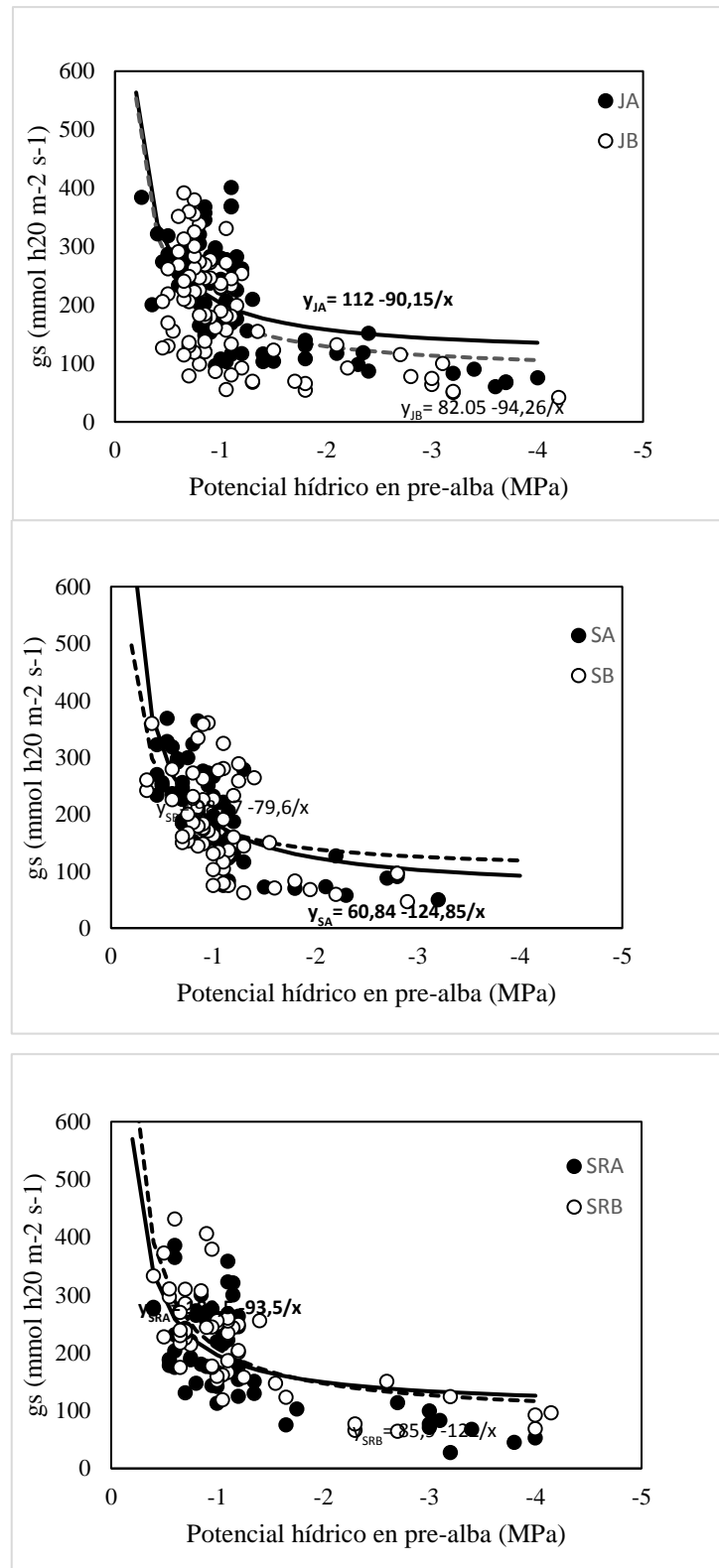
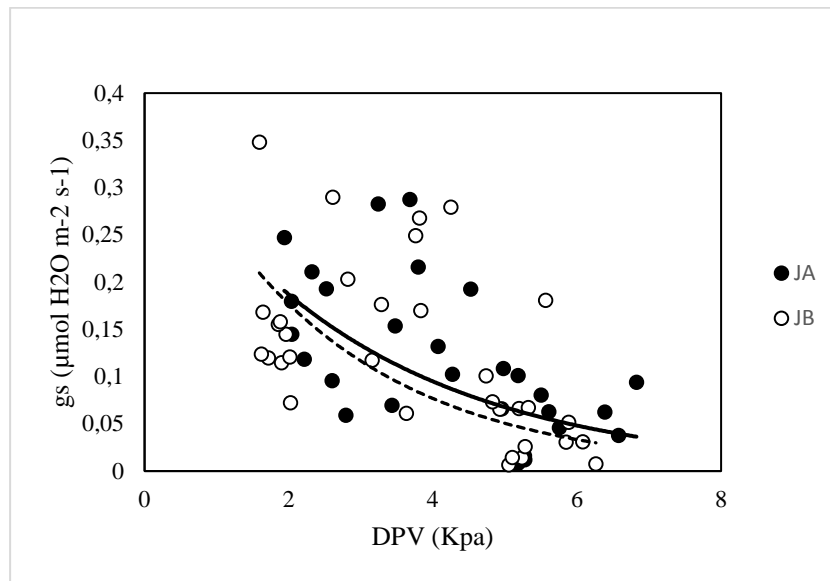


Figura 4.6: Relación entre el potencial hídrico y la conductancia estomática en JA, JB, SA, SB, SRA-3 y SRB. Las curvas presentaron los siguientes ajustes: $r^2_{JA} = 0,35$; $r^2_{JB} = 0,22$; $r^2_{SA} = 0,5$; $r^2_{SB} = 0,2$; $r^2_{SRA} = 0,3$; $r^2_{SRB} = 0,5$.

a)



b)

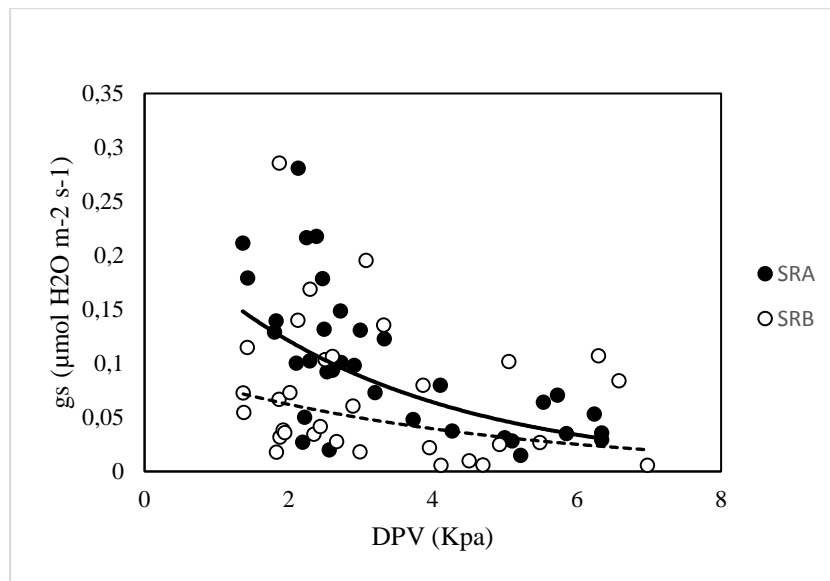


Figura 4.7: Relación entre el DPV (Deficit de Presión de Vapor) y la conductancia estomática en JA, JB (a) , SRA-3 y SRB (b).

La comparación entre los tratamientos “testigo” y “pulsos” indicó que la aplicación del primer pulso de agua el día 04-02-14 produjo una respuesta positiva de la tasa de fotosíntesis neta a saturación ($Asat$) de las plantas que recibieron el pulso de agua. Luego de dos días post-pulso, $Asat$ no presentó diferencias entre las plantas “testigo” y “pulsos”. La respuesta en $Asat$ fue acompañada por un aumento en la eficiencia instantánea en el uso del agua (EUA). Ambas respuestas de las plantas del tratamiento

“pulsos” se produjeron bajo situaciones de mayor déficit de presión de vapor (DPV) respecto a las plantas “testigo”, lo cual indica que si se hubiese medido bajo situaciones de igual demanda, la respuesta pudiera haber sido aún mayor. Las diferencias en DPV se produjeron por cuestiones logísticas y tiempos de medición. Las mediciones se iniciaban a las 10 de la mañana y finalizaban a las 15 h. La demanda atmosférica dentro del invernáculo seguía las condiciones naturales con variaciones de temperatura en esta época del año del orden de los 10 a 15°C (Tabla 4.5).

La *Asat* de plantas del tratamiento “pulsos”, luego del segundo pulso de agua aplicado el 27-02-14, no presentó diferencias respecto a las plantas “testigo” antes de la aplicación del pulso, ni en los días posteriores a la aplicación del mismo. En este caso, el DPV también fue superior en las plantas del tratamiento “pulsos”, sin embargo, las plantas respondieron positivamente. Asimismo, no se manifestaron diferencias en la EUA (Tabla 4.5).

Dentro de cada tratamiento para cada población, no se registraron diferencias significativas entre poblaciones en *Asat* y EUA. No obstante, en el “testigo” especialmente en *Asat*, los promedios fueron superiores en las poblaciones JA y JB respecto a SRA-3 y SRB. Por otra parte, las plantas del tratamiento “pulsos”, exceptuando la medición de *Asat* del segundo día post-pulso 2, no se verificaron diferencias entre las poblaciones. Sin embargo, en respuesta al pulso de agua, los promedios de *Asat* en las poblaciones JA y JB fueron superiores y en uno de los casos se prueba también un marcado aumento de la EUA (2 días post pulso 1) (Tabla 4.6).

Tabla 4.4: Diferencias en las variables respuesta entre tratamientos por población. N: Niveles de disponibilidad de agua: alto (T: Testigo); intermedio (P: Pulsos) y bajo (SR: Sin Riego). Se presentan la media y el *error estándar*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de una población (mayúsculas) y entre poblaciones por tratamientos (minúsculas en cursiva) para cada variable.

Población Variable	N	PHA	PHB	SRA-3	SRB	PA	PB	JA	JB	SA1	SB
Producción de macollos	T	2,6 ± 1 b	3,7 ± 0,7ab	3,04 ± 0,7 ab B	5,2 ± 1,4 ab	8,8 ± 2 a	8,6 ± 0,6 a A	6,75 ± 1ab A	7,04 ± 1,5 ab	5,75± 0,9 ab A	4,8± 0,9 ab
	P	2,63±0,62	2,63±1,25	6,63±0,76 A	2,79±0,61	6,21±2,56	2,59±0,46 B	3,04±0,24 B	4,13±0,72	2,58±1,19 B	2,54±1,17
	SR	1,42±0,4 ab	1,33±0,4 ab	1,08±0,5 b B	1,75±0,2 ab	2,08±0,2 ab	2,71±0,2 ab B	2,04±0,5 ab B	1,67±0,3 ab	0,75±0,2 b B	3,25±0,8 a
Distribución de la biomasa	T	0,76± 0,05	0,94 ± 0, 1	0,88 0,12	0,88 ± 0,1	0,77 ±0,16	0,8 ± 0,05	0,68 ±0,03	0,74 ±0,08	0,82 ±0,06	0,94 ±0,19
	P	1,18±0,4	0,71±0,06	0,84±0,6	1,1±0,09	0,76±0,08	0,85±0,02	0,66±0,35	0,78±0,06	0,72±0,2	0,74±0,1
	SR	0,75±0,2	1,18±0,6	1,54±0,09	0,85±0,4	0,93±0,1	0,88±0,22	0,88±0,08	1,09±0,05	0,77±0,2	0,63±0,09
Producción de biomasa	T	2,12 ± 0,4 ab A	2,05 ± 0,8 ab	1,17 ± 0,2 ab	2,6 ± 0,3 a A	1,1 ± 0,3 b A	1,9 ± 0,8 ab A	1,2 ± 0,04 ab A	1,7 ± 0,3 ab	0,8 ± 0,1 b	0,53 ± 0,1 b
	P	-1,31±0,2 c B	0,64±0,4 ab	0,54±0,08 a	1,06±0,03 ab B	-0,17±0,2 abc B	-0,51±0,11 bc B	0,53±0,2 ab AB	0,31±0,3 ab	0,23±0,06 ab	0,28±0,2 ab
	SR	-0,78±0,06 c B	0,95±0,2 a	0,37±0,04 ab	0,18±0,15 ab B	-0,24±0,03 bc B	-0,37±0,2 bc B	-0,14±0,2 bc B	0,65±0,3 ab	0,38±0,3 ab	0,37±0,1 ab
Peso de un macollo	T	0,05±0,02	0,05±3, .10 ⁻³	0,02±0,01	0,03±0,01	0,04±0,02	0,03±4.10 ⁻³	0,05±0,02	0,03±4.10 ⁻³	0,05±0,02	0,05±0,02
	P	0,02±3.10 ⁻³	0,01±4.10 ⁻³	0,01±7.10 ⁻³	0,01±0,01	0,01±2x10 ⁻³	0,01±1.10 ⁻²	0,02±4.10 ⁻³	0,02±2.10 ⁻²	0,02±2.10 ⁻³	0,01±2.x10 ⁻²
	SR	0,03±5.10 ⁻³ a	-	0,01±6.10 ⁻³ ab	0,01±2.10 ⁻³ b	0,01±1.10 ⁻³ ab	0,01±3.10 ⁻³ ab	0,02±3.10 ⁻² ab	0,01±2.10 ⁻³ ab	0,01±0,01 ab	0,01±0,01 ab

Tabla 4.5: Efecto de los pulsos de agua. El pulso 1 se realizó el 04-02-14 y el pulso 2 el 27-02-14. En la tabla se muestran los valores de A (tasa de fotosíntesis máxima; EUA (Eficiencia en el uso de agua) y DPV (Deficit de Presión de Vapor) en el día previo y en dos días consecutivos posteriores a la aplicación de cada pulso. Se muestran las medias con sus errores estándar en *italica*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre los tratamientos (Tuckey <0,05).

Variables/ Tratamientos	PREPULSO 1			1 DÍA POST-PULSO			2 DÍAS POST-PULSO		
	A	EUA	DPV	A	EUA	DPV	A	EUA	DPV
<i>Testigo</i>	10,32 ±1,30 b	62,84 ±7,89 a	2,58 ±0,08 a	7,60 ±1,32 b	35,37 ±5,95 a	3,73 ±0,11 a	5,10 ±1,24 a	35,07 ±11,04 a	1,64 ±0,09 a
<i>Pulsos</i>	0,33 ±1,25 a	74,03 ±10,19 a	5,01 ±0,08 b	2,79 ±1,32 a	44,35 ±5,70 a	5,58 ±0,11 b	2,74 ±1,09 a	79,46 ±10,07 b	2,23 ±0,07 b

Variables/ Tratamientos	PREPULSO 2			1 DÍA POST-PULSO			2 DÍAS POST-PULSO		
	A	EUA	DPV	A	EUA	DPV	A	EUA	DPV
<i>Testigo</i>	2,80 ±0,79 a	54,89 ±14,69 a	5,65 ±0,43 a	7,12 ±1,44 a	40,15 ±6,38 a	1,80 ±0,05 a	3,33 ±1,46 a	32,99 ±6,28 a	4,54 ±0,13 b
<i>Pulsos</i>	1,42 ±0,82 a	51,77 ±18,96 a	8,69 ±0,45 b	5,72 ±1,50 a	37,82 ±7,06 a	2,17 ±0,05 b	5,58 ±1,54 a	39,06 ±6,71 a	3,35 ±0,13 a

Tabla 4.6: Respuesta de las poblaciones SRA3, SRB, JA y JB al pulso de agua. El pulso 1 se realizó el 04-02-14 y el pulso 2 el 27-02-14. Se presentan la media y el *error estándar*. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos dentro de una población (mayúsculas) y entre poblaciones por tratamientos (minúsculas en cursiva) para cada variable. En la tabla se muestran los valores de A (tasa de fotosíntesis máxima); EUA (eficiencia en el uso de agua) y DPV (déficit de presión de vapor) en el día previo y en dos días consecutivos posteriores a la aplicación de cada pulso. Las letras diferentes indican diferencias significativas entre las poblaciones (Tuckey <0,05).

TESTIGO	PREPULSO 1		1 DIA POSTPULSO 1		2 DIAS POSTPULSO 1		PREPULSO 2		1 DIA POSTPULSO2		2 DIAS POSTPULSO2	
Variable /Población	A	EUA	A	EUA	A	EUA	A	EUA	A	EUA	A	EUA
SRA3	9,7±1,4	a	55,3±5,6	a	7,7±1,2	a	25,1±11,1	a	2,6±1,3	a	13,9±6,5	a
SRB	5,8±3,7	a	121,3±9,7	b	4,9±1,7	a	33,9±9,1	a	2,9±0,7	a	36,2±5,3	ab
JA	10,1±4,9	a	60,5±5,6	a	5,1±4,3	a	34,9±9,1	a	7,3±3,3	a	46,2±6,5	b
JB	15,5±2,8	a	53,7±5,6	a	13,4±1,5	a	44,7±9,1	a	7,5±2,4	a	40,5±5,3	ab

PULSOS	PREPULSO 1		1 DIA POSTPULSO 1		2 DIAS POSTPULSO 1		PREPULSO 2		1 DIA POSTPULSO 2		2 DIAS POSTPULSO 2	
Variable /Población	A	EUA	A	EUA	A	EUA	A	EUA	A	EUA	A	EUA
SRA3	1,5±1,01	a	81,1±26,1	a	2,7±0,9	a	48±12,7	a	0,14±1,2	a	35,6±20,3	a
SRB	-1,1±0,5	a	s/d		2,3±2,1	a	45,8±12,7	a	1,23±0,3	a	39,8±16,6	a
JA	0,03±0,5	a	68,9±26,1	a	4,4±1,2	a	63,3±12,7	a	5,14±3,3	a	120,9±14,4	b
JB	0,9±0,8	a	72,1±26,2	a	1,6±0,6	a	41,8±12,7	a	3,63±1,6	a	93±16,6	ab

5. DISCUSION

Las poblaciones de *Festuca pallescens* provenientes de diferentes ambientes del gradiente pluviométrico presentaron diferencias en caracteres morfológicos relacionados con la respuesta al déficit hídrico, coincidiendo con respuestas similares reportadas en otras especies de gramíneas de Patagonia (Leva 2005; Couso 2011; López 2011; Moreno & Bertiller 2012). Algunos de ellos indicarían que las poblaciones están adaptadas localmente a los sitios de donde fueron muestreadas, mientras que otras respuestas de las poblaciones sugieren que la especie presenta plasticidad fenotípica. Las poblaciones de *Festuca* de Somuncura mostraron algunas respuestas similares y otras muy diferentes a *F. pallescens*. En general, se observó que las poblaciones de Somuncura tienen una estrategia más conservadora que *F. pallescens* frente a la baja disponibilidad de agua.

5.1 Adaptaciones locales en las poblaciones de *F. pallescens* en ensayo de ambiente común

Las poblaciones de *F. pallescens* muestran dos tendencias de crecimiento. Las poblaciones provenientes de ambientes húmedos (Cordillera y Pre-cordillera) registraron, en general, menor producción de macollos con valores relativamente más altos de elongación foliar que las poblaciones provenientes de Sierras y Mesetas. Estas diferencias estarían relacionadas a una posible adaptación a sus ambientes de origen. Sin embargo, todas las poblaciones tienen una estrategia común en relación a la distribución de la biomasa: disminuyen la relación R/S cuando la disponibilidad hídrica no es un factor limitante.

La notoria diferencia en la elongación foliar (el mayor valor de todas las poblaciones) y la baja producción de macollos registrados en PHA respecto a otros ambientes más áridos o con mayor evapotranspiración, podrían indicar cierto grado de adaptación a la sombra o a menor heliofanía típica de ambientes más nublados y/o con sombreado por otras especies leñosas más altas (e.g. de *Berberis* sp; *Nothofagus pumilio*). Es decir, los genotipos que con igual biomasa asignen más recursos a tener hojas más largas (pero produciendo menos cantidad de hojas) tendrán la ventaja competitiva de tener mayor superficie de exposición a la radiación. Por otro lado, en las otras poblaciones de Cordillera y Pre-Cordillera (PHB, SRA-1 y SRB), los componentes de crecimiento mostraron valores más bajos que PHA, pero mayores que en las poblaciones de Sierras y

Mesetas. Estos resultados coinciden con los reportados por Moreno (2012) donde las poblaciones de *F. pallescens* provenientes de ambientes húmedos presentaron mayores valores medios de los atributos asociados al crecimiento (i.e. largo de hoja).

Las poblaciones de ambientes secos presentaron, en general, mayor producción de macollos y hojas, aunque con un tamaño relativamente menor que las poblaciones de ambientes más húmedos (Tabla 4.2). Es posible que el régimen de pastoreo diferencial (por presión de pastoreo y período) moldee la estructura de las plantas de estas poblaciones. Los herbívoros tienen preferencia por plantas con estructuras más laxas y hojas más tiernas (e.g. grandes y delgadas) (Bertiller et al. 1994, 1996; Oliva 1996). Por lo cual los genotipos con arquitectura más compacta (hojas y macollos más pequeños) serían menos afectados por el pastoreo. Si el pastoreo es prolongado podría alterarse la estructura genética de las poblaciones de gramíneas, ya que sobrevivirían más genotipos con arquitectura más compacta. Por ejemplo, el pastoreo con alta carga animal alteró la estructura de los individuos de las poblaciones de *Festuca gracillima* en Santa Cruz, los cuales presentaron macollos pequeños y compactos (Oliva 1996). Por lo tanto, es posible que la arquitectura más compacta de las poblaciones de ambientes secos de *F. pallescens* se asocie a largos períodos de pastoreo con una misma carga animal tanto en zonas altas como en zonas bajas. En pastizales áridos como los de Patagonia, expuestos a sequías recurrentes y pastoreo continuo, puede haber una convergencia hacia la selección de rasgos que proveen mayor adaptación a sequía y/o a herbivoría, como son las plantas compactas (Golluscio et al. 2011).

Por otra parte, la altitud puede jugar un rol importante en el desarrollo de las plantas en ambientes áridos. Por ejemplo, las dos poblaciones de sitios altos (PA y JA) poseen hojas significativamente más cortas que las de los sitios bajos. Los pastizales de altura están expuestos a la desecación por heladas y muchas veces pueden converger hacia selección de rasgos que proveen mayor adaptación a sequía o a herbivoría (Golluscio et al. 2011, Moreno & Bertiller 2012). Las hojas son el órgano clave de una planta que permite el intercambio gaseoso asociado al proceso de fotosíntesis y a la transpiración (Schwinning & Ehleringer 2002), de modo que hojas más cortas y con una arquitectura cespitosa más compacta evitarían la pérdida de agua ya sea por las heladas o por déficit hídrico.

Finalmente, las poblaciones de *F. pallescens* evaluadas en esta Tesis provenientes de distintos ambientes exhiben diferencias significativas en los caracteres evaluados de

crecimiento, con lo cual, al menos estos caracteres, no serían plásticos para estas poblaciones. Se ha descrito a *F. pallescens* como una especie con caracteres plásticos asociados al crecimiento, sobretodo en ambientes secos (Couso, 2011; Moreno, 2012). Sin embargo, los resultados de esta Tesis indican lo contrario. Las diferencias en las características morfológicas asociadas al crecimiento tendrían bases genéticas, mientras que la relación R/S parecería ser un atributo de carácter plástico.

5. 2 Respuestas de las poblaciones de *F. pallescens* al déficit hídrico

En general, las poblaciones fueron tolerantes al déficit hídrico generado por pulsos de agua, ya que sobrevivieron en todos los casos más del 50% de las plantas en cada población. No obstante, cuando se restringió totalmente el agua, se detectó un muy bajo porcentaje de sobrevivencia en PHA y en PB, el resto de las poblaciones presentaron porcentajes similares y menores al tratamiento de “pulsos”. Para estas dos poblaciones, el estrés hídrico sufrido fue severo y las plantas no pudieron ajustarse a la baja disponibilidad de agua, siendo menos eficientes en su uso. Por otra parte, se registró la mayor sobrevivencia entre poblaciones de altitudes bajas (exceptuando PB), indicando mayor tolerancia que las de sitios altos. Es posible que las poblaciones de sitios bajos tengan mayor tasa de evapotranspiración en sus ambientes de procedencia que las de los sitios altos (i.e. por mayores temperaturas ambientales en zonas bajas) y estén más adaptadas a tolerar la baja disponibilidad de agua (Heinrich 1979).

Por otra parte, SRA-3 es la población que más creció cuando recibió el tratamiento “pulsos”, seguida de SRB, JA, JB y PHB aunque este crecimiento fue siempre menor al del nivel “testigo”. El monitoreo fisiológico de cuatro de estas poblaciones (exceptuando a PHB) indicó que el crecimiento estuvo asociado a un incremento del uso eficiente del agua y al aumento de la fotosíntesis al recibir el pulso de agua, lo cual puede relacionarse con una rápida absorción de agua por parte de sus raíces superficiales. Estos resultados apoyarían lo planteado por Defossé et al. (1990), respecto a un comportamiento oportunista de *F. pallescens* frente a un evento estocástico de lluvias en períodos estivales, cuando su crecimiento está limitado por el bajo contenido de agua en el suelo.

Las poblaciones de este estudio no realizaron ningún ajuste en la distribución de la biomasa frente a la reducción en la disponibilidad de agua. La mayoría de las poblaciones de *F. pallescens* mostraron relaciones de R/S menores a 1, al igual que en

Fernández et al. (2004), aunque en otros estudios de *F. pallescens* se encontró mayor asignación de biomasa a raíz (Leva et al. 2009; Caballé et al. 2011). Un buen desarrollo radicular es esencial para aumentar la capacidad de absorción de agua y sobrevivir la primavera tardía y el verano seco de la estepa patagónica (Defoseé et al. 1994). Asimismo, Couso & Fernández (2012) encontraron que la relación de R/S y la biomasa radical es un atributo plástico en ambientes secos, tanto para *F. pallescens* en el festucal así como también para otras especies del coironal. Por lo tanto, las poblaciones de *F. pallescens* analizadas estarían adaptadas a crecer en condiciones xéricas. Esto se evidencia en (i) el incremento de la biomasa aérea cuando las condiciones hídricas son favorables y (ii) no modifican su relación R/S frente al déficit hídrico.

Por otro lado, en los componentes de crecimiento se observó que las poblaciones de Cordillera y Pre-cordillera produjeron menor cantidad de macollos que las poblaciones de Sierras y Mesetas en condiciones hídricas desfavorables. La producción de macollos estaría afectada por el estrés, aunque las poblaciones que macollaron más (PA, PB, JA y JB) en condiciones hídricas favorables, también lo hicieron en situaciones de estrés, sugiriendo que esta característica sería una adaptación local al sitio de donde provienen. A pesar de no haberse medido el largo de las hojas, es plausible que se respetara la arquitectura presentada en el tratamiento testigo. Este comportamiento indica que siendo *F. pallescens* una especie del festucal (un ambiente con condiciones menos restrictivas que estepas de *Poa ligularis* y *Pappostipa* sp) se comporta como una especie del coironal, con características xeromórficas similares a *Poa ligularis* (Couso 2011).

La producción de biomasa fue menor para PA y PB que para JA y JB en ambas situaciones de déficit hídrico. Esto podría explicarse por la recuperación post-pulso de agua que mostraron JA y JB (incremento en la tasa de fotosíntesis y eficiencia en el uso de agua), sugiriendo que aprovecharían con gran eficiencia los pulsos de agua de precipitaciones erráticas en la estepa (i.e. el CV de las precipitaciones aumenta más en las zonas más áridas). No obstante, JB también presentó valores altos de producción de biomasa en condiciones extremas de déficit hídrico. Esto indicaría que no sólo tolera una baja disponibilidad de agua prolongada, sino que en ese período puede seguir produciendo forraje. Cabe destacar que la medición de biomasa es un promedio de la diferencia en el peso seco de sólo tres plantas al inicio y al final del ensayo, por lo tanto los valores negativos pueden deberse a la variabilidad en la biomasa de las plantas de cada población. Finalmente, la población PHA fue una de las poblaciones más sensibles

al estrés hídrico (alto porcentaje de mortalidad a los 45 días del ensayo). Esto puede deberse a que el sitio representa el más húmedo del gradiente de trabajo (por aportes de precipitaciones) y con menor evapotranspiración (por bajas temperaturas). A su vez, este ambiente natural se desarrolla bajo vegetación acompañante que sombrea y disminuye la radiación directa, reduciendo la demanda atmosférica (Fernández et al. 2002, 2004, 2006a).

6. 3 ¿Qué pasa con las poblaciones de *Festuca* en Somuncura?

Las poblaciones de *Festuca* de Somuncura mostraron varias características relacionadas a la adaptación a la aridez: *i. Moderada producción de macollos y hojas* (intermedia entre PA, PB y PHB), *ii. Elongación foliar intermedia*, *iii. Baja producción de biomasa* y *iv. Peso de macollo y asignación de recursos a la biomasa radical sin diferencias con el resto de las poblaciones*. Las primeras tres características (*i, ii, iii*) se asociarían con una tolerancia intermedia de gramíneas perennes de la estepa patagónica a la sequía (Leva et al. 2009; Moreno & Bertiller 2011; Couso & Fernández 2012), mientras que las otras dos (*iv*) serían de carácter plástico (Couso 2011). Asimismo, el desempeño de estas poblaciones frente al déficit hídrico reforzaría la inferencia de adaptación a la aridez, particularmente en la población SB. Esta población no modificó su crecimiento en presencia de déficit hídrico y fue la población que produjo más macollos en ausencia de riego. Las dos poblaciones de Somuncura presentan respuestas conservadoras frente a la baja disponibilidad de agua, esto se refleja en la relación g_s/Ψ_H , indicando que cuando el estrés es muy alto, cierran los estomas y no crecen (Caballé et al. 2011). Esta respuesta se registra en el crecimiento constante, tanto en condiciones favorables como en déficit hídrico severo (ver tabla 4.4). Por lo tanto, las poblaciones de Somuncura presentarían estrategias morfo-funcionales asociadas a la adaptación a ambientes áridos y una estrategia fisiológica de resistencia a sequía.

CONCLUSIÓN

Los resultados de este capítulo indican que existen adaptaciones locales en las poblaciones evaluadas. No obstante, hacen falta más estudios morfológicos y eco-fisiológicos, en estas poblaciones y/u otras del mismo gradiente, para comprender los mecanismos de adaptación a diferentes condiciones de disponibilidad hídrica y de

temperatura. Los forzantes ambientales estarían modulando cambios en la estructura genética de varias poblaciones a lo largo del gradiente de precipitaciones. A partir de los resultados de este capítulo se sugiere que las poblaciones de *F. pallescens* presentan dos posibles estrategias frente al estrés hídrico: las poblaciones de ambientes húmedos tendrían menor producción de macollos y de hojas, y mayor elongación foliar, mientras que lo opuesto se observa entre las poblaciones de ambientes secos. Sin embargo, todas parecen presentar el mismo comportamiento en la asignación de biomasa, ya que no se encontraron diferencias en la relación entre la biomasa aérea y la radical (R/S) y cuando el agua no es un factor limitante, las poblaciones asignarían mayor biomasa a la parte aérea respecto a la radical. A su vez, algunas poblaciones lograron aprovechar el pulso de agua para crecer (SRA3, SRB, JA y JB) y otras resultaron muy poco tolerantes (i.e. PHA y PB).

Capítulo 5

DISCUSIÓN GENERAL

La región patagónica con su heterogeneidad ambiental (Oesterheld et al. 1998) y sus marcados gradientes climáticos (Paruelo et al. 1998; León et al. 1998), constituye un modelo adecuado para estudios de variación clinal y adaptaciones locales (Jump et al. 2005, 2008). El creciente avance de la desertificación (Del Valle et al. 1998; Mazzonia & Vazquez 2009), agravado por el cambio climático y sus predicciones futuras (Rusticucci & Barrucand 2004; Schwinning & Sala 2004; Alexander et al. 2006; Castañeda & González 2008), han puesto en riesgo a los pastizales naturales, la fuente forrajera más importante para la ganadería doméstica (León & Aguilar 1985; AEF 2004; Easdale 2015). El potencial adaptativo de las poblaciones de especies nativas a estos contextos futuros dependerá tanto de factores ecológicos como de sus atributos genéticos y fisiológicos (Woods et al. 2012). Si bien es recomendable profundizar con nuevos estudios para evaluar si otras poblaciones del gradiente ambiental presentan patrones similares a los encontrados en este trabajo, los resultados y el conocimiento generado en esta tesis permiten realizar inferencias y aportes sobre las implicancias ecológicas y productivas de la variación genética y eco-fisiológica de *Festuca pallescens* en relación a un gradiente ambiental en Patagonia norte. En esta Tesis Doctoral se abordó desde un enfoque genético, fisiológico y eco-fisiológico la potencialidad de adaptación de una de las especies más dominante de la región, *F. pallescens*, con el objeto de generar conocimientos de base para iniciar un programa de domesticación con fines productivos y/o de restauración de pastizales degradados.

La combinación de disciplinas como la genética y la fisiología constituye un enfoque novedoso, no reportado con anterioridad para esta especie y para la región. Mediante la aplicación de marcadores moleculares se estudió, por primera vez en *F. pallescens*, la variación genética a lo largo de un gradiente ambiental. Además, se realizaron estudios experimentales sobre los primeros estadios del ciclo de vida (germinación y plántulas) que son los más vulnerables. La germinación se estudió a través de modelos umbrales que describen el comportamiento germinativo en función de distintas temperaturas y disponibilidades hídricas. La respuesta a condicionantes hídricos se evaluó en el estadio de plántula hasta individuos de un año, en ensayos de ambiente

común de modo de detectar diferencias genéticas entre las poblaciones. Este capítulo tiene la finalidad de integrar las principales conclusiones de esta tesis, profundizando una discusión más global de los siguientes resultados:

- Se encontró una alta diversidad genética en las poblaciones de la especie analizadas que se estructuró principalmente en tres grupos: i) dos poblaciones del este, en la meseta de Somuncura (SA1 y SB), ii) una población en el oeste en Península Huemul (PHB) y iii) el resto de las poblaciones del gradiente estudiado. La diferenciación genética entre poblaciones es alta, aunque principalmente entre las poblaciones señaladas previamente. El flujo génico sería extensivo entre el resto de las poblaciones (Capítulo 2A).
- Análisis filogenéticos con tres marcadores moleculares permitieron distinguir a uno de esos grupos como un ecotipo que posiblemente se originó a partir de una hibridación e introgresión ancestral. Este ecotipo es cercano a la especie simpátrica *Festuca argentina*, pero se diferencia tanto morfológica como genéticamente (es decir, es un endemismo estrecho) (Kruckeberg & Rabinowitz 1985) (Capítulo 2B).
- Mediante la utilización de modelos umbrales de germinación se estimaron los parámetros poblacionales térmicos e hídricos que determinan la regulación de la germinación en las poblaciones del gradiente (Capítulo 3). Tanto el tiempo térmico como el tiempo hídrico variaron de forma significativa entre las poblaciones. Las poblaciones del este, requieren la acumulación de más grados por día ($^{\circ}\text{C}$ día) para germinar que las poblaciones del oeste; mientras que los requerimientos hídricos no respondieron a una variación clinal de O-E siguiendo el gradiente de precipitación. Estos resultados sugieren que existen adaptaciones locales asociadas a la altura y/o al tipo de ambiente en dónde se desarrollan las poblaciones (e.g. suelo, exposición, pendiente). Por último, se encontró que el otoño sería la época del año más propicia para la germinación, confirmando estudios previos (Bertiller et al 1994; Oliva 1996) (Capítulo 3).
- Los ensayos en ambiente común permitieron detectar diferencias en el crecimiento vegetativo, el uso eficiente del agua y la pérdida y recuperación de la fotosíntesis entre las poblaciones cuando fueron sometidas a distintos niveles de disponibilidad de agua (Capítulo 4). Se detectaron dos grandes grupos que presentan estrategias diferentes de crecimiento en ensayo de

ambiente común: por un lado las poblaciones de *Cordillera* y *pre-Cordillera* (menor producción de macollos con menos hojas y mayor elongación foliar en algunas poblaciones; i.e. PHA) y por otro lado las poblaciones de *Sierras* y *Mesetas Occidentales* (mayor producción de macollos con más hojas, con una elongación foliar variable). Las diferencias significativas encontradas en algunas de las variables morfo-fisiológicas evaluadas en ambiente común sugieren que existen adaptaciones locales. Sin embargo, otras variables evaluadas tendrían una respuesta plástica, como, por ejemplo la distribución de la biomasa, indicando que ambas estrategias (adaptación y plasticidad) ocurren en las poblaciones analizadas.

La hipótesis general que se planteó en esta tesis fue la siguiente: “*La heterogeneidad ambiental, producto de la variación espacio-temporal de los factores ambientales, que caracterizan Patagonia Norte han moldeado la diversidad genética, neutral y adaptativa, de las poblaciones de Festuca pallescens que se distribuyen en esta región. Asimismo, las poblaciones de la especie ubicadas en los límites del gradiente de precipitación, ocurren en ambientes donde los factores ambientales (e.g. precipitación y temperatura) son más contrastantes promoviéndose la existencia de adaptaciones locales.*” Siendo la predicción asociada que las poblaciones de *F. pallescens*, provenientes de diferentes ambientes del gradiente de precipitaciones bajo estudio, exhibirán diferencias genéticas tanto en caracteres moleculares neutros como en caracteres adaptativos (eco-fisiológicos) medidos en ensayos de ambiente común. A partir de los resultados mencionados antes se puede concluir que la predicción se cumple en forma parcial. Por un lado, la diversidad genética neutra habría sido modelada por eventos del pasado (glaciaciones, geomorfología, ingresiones marinas), así como también por la heterogeneidad ambiental, que determina una disminución de ambientes favorables para la especie hacia el este. De este modo se diferenciaron las poblaciones de los extremos del gradiente (Península Huemul (PHB) y la Meseta de Somuncura poblaciones SA1 y SB, que resultaron ser un ecotipo), mientras que las restantes poblaciones tuvieron una baja estructuración genética, posiblemente debido a la existencia de flujo génico. Por otro lado, las diferencias encontradas tanto en los parámetros fisiológicos de la germinación como en algunas de las variables morfo-fisiológicas sugieren la existencia de adaptaciones locales en algunas poblaciones del gradiente. No obstante, otras variables analizadas mostraron evidencias de plasticidad fenotípica. Tomando todo el gradiente

bajo estudio se pudo detectar una estructuración principalmente asociada a los dos grupos de áreas ecológicas: (i) al oeste: *Cordillera - Pre-cordillera*, y (ii) al este: *Sierras y Mesetas occidentales*; pero con diferencias dentro de cada área a una escala espacial-jerárquica menor. Además, en algunos sitios se observó que la altitud, y la variación ambiental asociada como por ejemplo menores temperaturas, cumplirían un rol fundamental en la modulación de las características fisiológicas (i.e. tiempo hídrico). En otros sitios se encontraron diferencias que estarían asociadas a características ambientales como por ejemplo exposición, tipo de suelo. Todo esto indica que dentro de los dos grupos, a una escala espacial menor, existen también diferencias que inciden en el desarrollo de las poblaciones de *F. pallescens*.

5.1. Patrones de variación a escala de paisaje a lo largo del gradiente de precipitaciones:

Los gradientes ambientales promueven la variación clinal en caracteres fenotípicos y fenológicos (i.e. Gonzalo-Turpin & Hazard 2009; Alberto et al. 2011), así como en frecuencias alélicas (i.e. Leva et al. 2010; Chen et al. 2012). En el caso de las poblaciones de *F. pallescens* estudiadas, las diferencias fueron marcadas entre los extremos del gradiente, pero no todas las variables siguieron un patrón clinal asociado a la precipitación. El tiempo térmico fue uno de los parámetros que mostró una variación clinal con la longitud (y en consecuencia con la precipitación). Sin embargo, incluso sin considerar a las poblaciones de Somuncura por ser un ecotipo de la especie, tanto las variables genéticas (número de alelos) como las variables morfológicas (producción de macollos, producción de hojas) no muestran una variación clinal significativa con la longitud (Figura 5.1). En cambio, se detectaron dos grandes grupos caracterizados principalmente por tener distintas tendencias de crecimiento y respuesta frente al estrés hídrico, pero también diferencias en los parámetros fisiológicos de la germinación y en la diversidad genética. Por un lado, las poblaciones de la zona oeste (*Cordillera y Pre-Cordillera*) y por el otro, las del este (*Sierras y Mesetas Occidentales*). Cada zona presenta condiciones ambientales particulares (Godagnone & Bran 2009) que podrían estar determinando la variación encontrada. A su vez, dentro de cada zona existen diferencias micro-ambientales que pueden haber promovido otras variaciones detectadas (Choler et al. 2001; Gonzalo-Turpin & Hazard 2009; Grassein et al 2014; Moreno & Bertiller 2015; Hamann et al. 2016). Sustentando lo planteado por Andrew et al. (2012),

en la zona de estudio las diferencias en la variación genética neutra y adaptativa entre las poblaciones serían persistentes aún en presencia de altos niveles de flujo génico

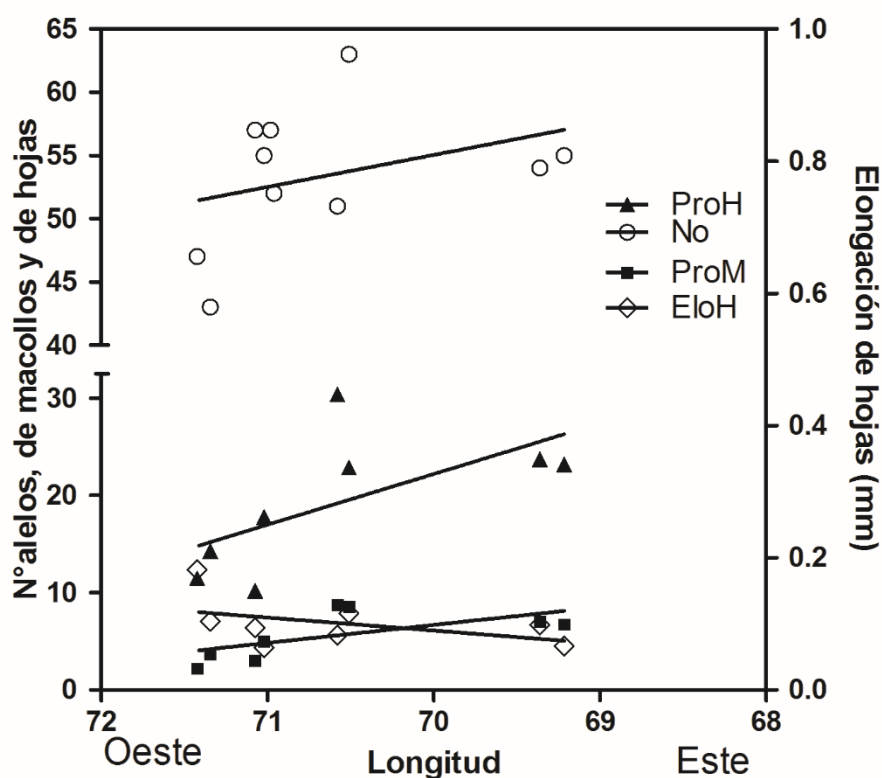


Figura 5.1. Relación entre variables genéticas (número de alelos: No) y morfológicas (producción de macollos: ProM –nº de macollo por madre-, número de hojas: ProH, y elongación de las hojas –EloH-) con la longitud geográfica.

Poblaciones de Cordillera y Pre- Cordillera: Península Huemul y San Ramón

Las diferencias micro-ambientales (i.e. tipo de suelo, vegetación acompañante, elemento del paisaje), constituirían los *forzantes* (*drivers en inglés*) ambientales que estarían actuando como moduladores de las adaptaciones locales observadas en las poblaciones de esta área ecológica (Grassein et al 2014).

Las poblaciones de Cordillera (PHA y PHB) se encuentran en ambientes con elevadas precipitaciones y fuertes vientos del oeste, donde el tipo fisonómico característico es de bosque acompañado de pastizales con *F. pallescens* (Godagnone & Bran 2009). En principio, los ambientes de las poblaciones de Península Huemul resultarían más estables temporalmente en cuanto a disponibilidad hídrica (elevada humedad con menor CV de precipitaciones) que los ambientes de otras zonas dentro del

gradiente estudiado (León et al. 1998). Sin embargo, las dos poblaciones de Cordillera presentaron algunas similitudes en los requerimientos de germinación y diferencias muy marcadas tanto en su estructura genética como en el comportamiento eco-fisiológico en ensayos de ambiente común. La población situada a menor altitud (PHB) se diferencia de todas las poblaciones, lo cual podría estar relacionado con su ubicación dentro del límite de los glaciares (Figura 2.6) y, por ende, haberse constituido por re-colonización postglacial (Ver discusión capítulo 2A y 2B). Sin embargo, es notable la diferenciación genética con respecto a la población PHA, que es muy cercana geográficamente. La historia demográfica, la ausencia de flujo génico y los ambientes contrastantes en donde se desarrollan (i.e. tipo de suelo, elemento de paisaje y la incidencia de la comunidad acompañante; Tabla1 Capítulo 1) promoverían la existencia de adaptaciones locales (Jump & Pañuelas 2005; Byars et al. 2007).

Estas dos poblaciones se desarrollan en ambientes con diferencias marcadas. Por un lado, PHA es una estepa arbustivo-graminosa de altura que limita con un bosque de *Nothofagus pumilio* y presenta características morfológicas asociadas a la adaptación de crecimiento bajo sombra, ya que respecto al resto de las poblaciones, produce pocos macollos y sus hojas son largas. Este patrón de cambios en la morfología de hoja, también fue registrado en poblaciones de *F. pallescens* creciendo con diferente sombreado bajo plantaciones de pino (Fernández et al. 2002, 2006). Por su parte, PHB se corresponde con una estepa graminosa-arbustiva, con suelos pedregoso-arenoso (con poca capacidad de retención de agua) de fondo de valle glaciar (morena del lago Nahuel Huapi). A pesar de ser una población de ambientes húmedos (i.e. altas precipitaciones), PHB presentó un porcentaje mayor de sobrevivencia bajo estrés hídrico que PHA. Por el contrario, PHA fue una de las poblaciones con menor porcentaje de sobrevivencia y con muy baja producción de biomasa en condiciones de estrés. Estos resultados sugieren que PHB es una población de un ambiente cordillerano con abundantes lluvias pero con adaptaciones a condiciones xéricas del micro-ambiente en el que habita. Contrariamente la población de Cordillera PHA tendría ciertas adaptaciones a una zona de condiciones más húmedas con un crecimiento condicionado por la vegetación acompañante (e.g. sombreado por arbustos de entre 1 y 3m de altura de la comunidad y/o árboles circundantes; Capítulo 1). El comportamiento de estas poblaciones cordilleranas fue posiblemente modulado por las condiciones micro-ambientales que ocurren localmente en cada sitio, así como también por los efectos de la vegetación acompañante (Grassein et al 2014).

Las cuatro poblaciones de Pre-cordillera, SRA-1, SRA-2, SRA-3 y SRB, se desarrollan en una región donde el clima es sub-húmedo (precipitaciones alrededor de 600mm), y caracterizado por el dominio de mallines y estepas arbustivo-graminosas (Godagnone & Bran 2009). Estas poblaciones constituyeron un grupo genético homogéneo al ser analizadas con microsatélites (Capítulo 2A). Estos ambientes conforman el Distrito Fitogeográfico Patagónico Sub-andino, en donde las comunidades representativas son mallines y estepa graminosas con escasos arbustos, en donde domina netamente el coirón dulce (*Festuca pallescens*), conformando entre 50 y 90% de la vegetación de dicha zona (en condiciones prístinas o sin sobre-pastoreo). Esto refuerza que *F. pallescens* encuentre en este distrito (área ecológica de Pre-Cordillera, *sensu* Bran et al. 2006) los ambientes más propicios para desarrollarse, en cuanto al balance de temperatura y/o humedad y a su capacidad de competencia con otras especies (i.e. centroide de nicho ecológico *sensu* Maciel-Mata 2015). No obstante, dos de estas poblaciones presentaron diferencias a nivel de su ADN de cloroplasto, así como diferencias en los parámetros germinativos y en caracteres morfo-fisiológicos. La población SRB presentó un haplotipo de cloroplasto diferente al resto de las poblaciones, uno de los tiempos hídricos más bajos y la mayor producción de biomasa en el ensayo de ambiente común.

Por su parte, las semillas de SRA-3 requirieron la acumulación de mayor tiempo hídrico para germinar y fue la única población de Cordillera y Pre-cordillera con baja producción de biomasa. El patrón detectado en San Ramón entre las poblaciones de distintas altitudes es similar al de Península Huemul, con la diferencia que ambas poblaciones cordilleranas se desarrollan en sitios que por la temperatura y/o la disponibilidad de agua representarían ambientes más marginales para la especie, que los ambientes de Pre-Cordillera. Mientras que sólo en SRA-1 el agua constituiría un factor limitante. Existen caracteres morfológicos que varían con la altitud (Gonzalo-Turpin & Hazard 2009; Frei et al. 2013; Hamann et al. 2016), asociados a diferencias en temperatura y disponibilidad de agua. En este sentido, entre las poblaciones evaluadas existe una variación altitudinal en la disponibilidad de agua (asociada a menor demanda atmosférica por menores temperaturas a mayor altitud) que podría estar modulando el tiempo de germinación y la producción de biomasa.

En esta área ecológica, el clima varía de condiciones semiáridas en el oeste a áridas hacia el este y dominan las estepas arbustivo-graminosas con la disminución de mallines hacia el este (capítulo 1). La vegetación de esta región, caracterizada principalmente por especies de gramíneas y arbustos, presenta características comunes que se asocian con la tolerancia a la sequía como por ejemplo mayor asignación de biomasa a raíz, plantas compactas (e.g. gramíneas en matas o coirones y plantas en cojín (Golluscio et al. 2005; López & Cavallero 2017), acoplamiento de la fenología (Golluscio et al. 2005) y/o capacidad de recuperación después de eventos de sequía (Yahdjian & Sala 2006). A lo largo de esta área ecológica, se registraron variaciones en todos los caracteres evaluados en las poblaciones de *F. palleszens*. Específicamente, las poblaciones en estudio ubicadas en esta área ecológica presentaron gran producción de macollos, pero con hojas más pequeñas que las poblaciones de Cordillera y Pre-cordillera, los parámetros fisiológicos de tiempo térmico e hídrico fueron mayores y los porcentajes de sobrevivencia al estrés hídrico fueron variables entre las poblaciones. Si bien no hubo un patrón claro en la designación de biomasa raíz/parte aérea, las diferencias de los patrones de distribución dentro de la parte aérea podrían representar un *trade-off* (costo-beneficio) entre no resignar producción de follaje (área fotosintéticamente activa) en condiciones áridas, pero reducir la exposición a agentes desecantes. Es decir, mayor producción de macollos pero con hojas más cortas podría representar una ventaja adaptativa para los individuos, ya que serían morfotipos de matas (o coirones) más bajas y compactas (i.e. con menor superficie de exposición) (Grime 2006, López 2011).

Las poblaciones de *F. palleszens* ubicadas en esta área ecológica respondieron al estrés hídrico de manera diferente ya que fueron más eficientes en el uso del agua que las poblaciones provenientes de Cordillera y Pre-cordillera. Los valores de diversidad genética entre poblaciones, si no se considera el ecotipo de Somuncura, son similares, aunque la población JA presentó un haplotipo de cloroplasto diferente al resto. Esta última población además se caracterizó por presentar cierto grado de dormición, lo cual le proveería una ventaja adaptativa frente a largos períodos secos (Batlla & Benech Arnold 2003, 2006, 2007). Conjuntamente, las poblaciones de JA, JB y SA-2 presentaron mayores valores de tiempo hídrico y térmico que las poblaciones de Pilcaniyeu (Capítulo 3). Esto representaría una adaptación a ambientes áridos y con lluvias estocásticas, ya que

para que las semillas germinen deben ocurrir dos procesos asociados: (i) acumular varios días con temperaturas mayores a la T_b , (ii) y que ocurran eventos prolongados de lluvia. Es decir, los individuos (genotipos) tendrían mayor probabilidad de germinar durante un período húmedo y frío como el otoño (es el período más favorable registrado para todas las poblaciones), en dónde el déficit hídrico disminuye y la probabilidad de sobrevivencia posterior es mayor (Bertiller et. al 1994; Defosee et al 1994).

Por otro lado, las poblaciones de Pilcaniyeu (PA y PB), es decir las más occidentales de esta área ecológica, provienen de ambientes con características microclimáticas intermedias entre los extremos del gradiente, con precipitaciones alrededor de 250 mm, pero con temperaturas anuales más cercanas a las de pre-cordillera (Godagnone & Bran 2009) (ver discusión en Capítulo 3). Esto podría explicar los bajos valores de tiempo térmico e hídrico indicando que, a pesar de las escasas precipitaciones en los ambientes de estas poblaciones, la disponibilidad de agua en el suelo, no sería un recurso tan limitante como en las poblaciones ubicadas en el extremo este del estudio (e.g. menor temperaturas y baja demanda atmosférica hacia el oeste).

Por otra parte, luego de ocurrida la germinación, las poblaciones bajo estudio respondieron diferencialmente al estrés hídrico. La población JB produjo biomasa incluso bajo estrés y, tanto JB como JA, fueron más eficientes en el uso del agua que las poblaciones SRA-3 y SRB. Si bien, en esta tesis no se evaluó la variación en el número de hojas y la elongación foliar en condiciones de estrés, es posible que frente al estrés en primer lugar las plantas disminuyan la elongación de hojas y luego cesen su producción como se reportó en otras gramíneas de la estepa patagónica (López 2011). Sin embargo, para la producción de hojas y la elongación foliar también hay evidencia de variación fenotípica. Trabajos realizados en la estepa patagónica describen que gran parte de las variaciones encontradas entre especies de gramíneas y de arbustos se asocian a la expresión de la plasticidad fenotípica producida en ambientes heterogéneos, como los ambientes áridos de Patagonia Norte (Leva 2010; Couso 2011; Moreno & Bertiller 2012). Esto podría estar sucediendo en algunos de los caracteres evaluados en las poblaciones de *F. palleszens* (i.e. producción de hojas y elongación foliar), mientras que los tiempos hídricos y térmicos que están asociados a las características germinativas de las especies, bajo control genético (Bradford 1995; Allen et al. 2000), constituirían características adaptativas a los ambientes donde fueron muestreadas.

Se ha sugerido que la plasticidad fenotípica es adaptativa en variables morfológicas medidas a lo largo de gradientes altitudinales para gramíneas (Gonzalo-Tupin & Hazard 2009; Hamann et al. 2016). En este sentido, si bien es necesario profundizar con más estudios, los resultados de esta tesis proveen indicios de que algunas poblaciones de *F. pallescens* presentarían plasticidad adaptativa en ciertos caracteres morfológicos (e.g producción de macollos), y que se asociarían a respuestas frente al clima variable, la heterogeneidad del suelo, u otros factores ambientales no evaluados en esta tesis. En la existencia de plasticidad fenotípica adaptativa asociada a los gradientes altitudinales y al gradiente de precipitación, podría subyacer diferentes respuestas de estas poblaciones al cambio climático (Frei et al. 2013). En este sentido, la diferenciación genética adaptativa y la plasticidad fenotípica jugarían un papel complementario para la adaptación de *F. pallescens* a la heterogeneidad ambiental de Patagonia Norte, y ambas pueden representar estrategias cruciales para responder frente al cambio climático y a la continua presión de pastoreo.

5.2. Ecotipo de *Festuca* de la Meseta de Somuncura

En dos de las poblaciones de Somuncura se detectó un ecotipo probablemente originado a partir de una hibridación ancestral y una subsecuente introgresión con *F. argentina* (Capítulo 2B). Este ecotipo presentó rasgos asociados a adaptaciones a ambientes xeromórficos. Las semillas fueron más anchas que las de otras poblaciones y tuvieron un peso significativamente mayor ($p < 0.05$; Figura 5.2). Además, sus hojas tenían un gran porcentaje de esclerenquima en células del mesofilo y eran más gruesas que las hojas de poblaciones puras de *F. pallescens* (Capítulo 2 B: Tabla 2.5, Figura 2.8 y observaciones personales). En concordancia con estas características, fueron las poblaciones que mejor toleraron el estrés hídrico ya que, respecto a las otras poblaciones, y presentaron los porcentajes más altos de sobrevivencia. Más aún, al finalizar el ensayo, cuando todas las plantas estaban muertas, algunas de las plantas de estas poblaciones todavía estaban vivas aunque con pocos macollos (observación personal). Estas poblaciones presentarían una estrategia conservadora del uso del agua (Engelbrecht 2001; Larcher 2003; Garau et al. 2009), ya que en presencia de un déficit hídrico severo cerrarían los estomas, deteniendo su crecimiento (Figura 4.6, capítulo 4).

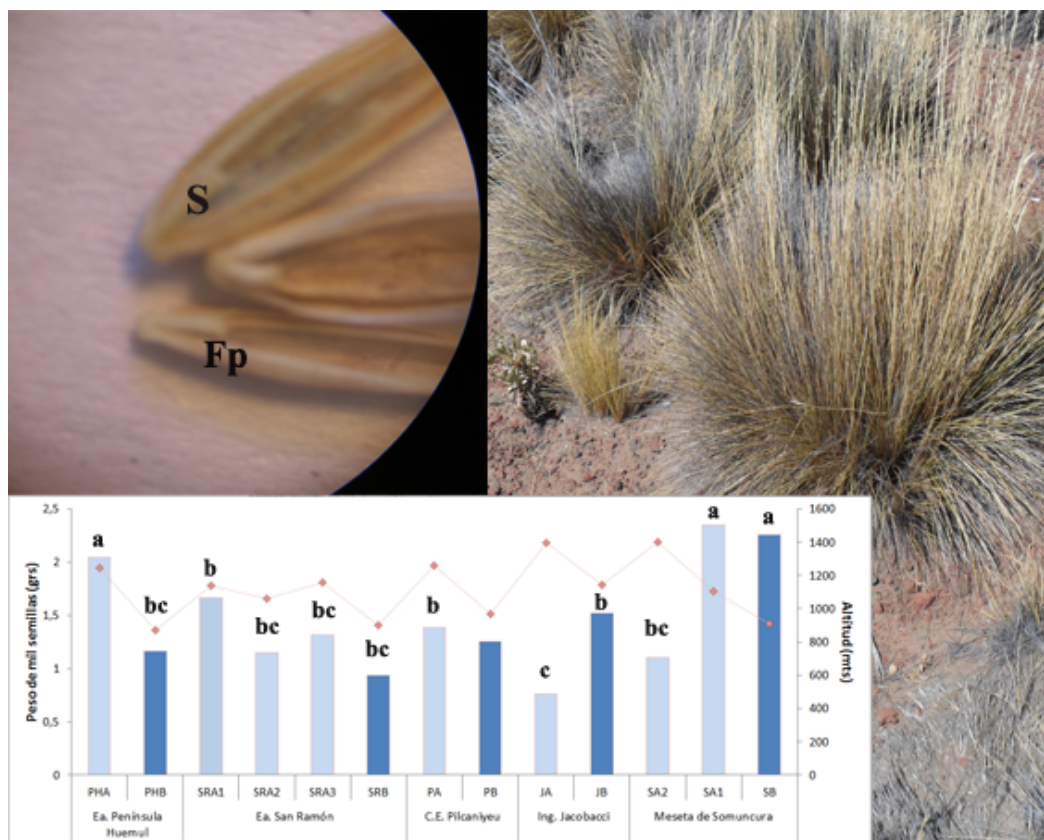


Figura 5.2. Peso de *semillas* del ecotipo de somuncura y su relación con las poblaciones de *Festuca pallescens* analizadas. Se muestran también *semillas* y la mata de ejemplares del ecotipo de Somuncura.

La poliploidía es una característica muy común en especies vegetales (Tate et al. 2005) que favorece la especiación simpátrica (Futuyma 2005; Ramsey & Ramsey 2014) y podría ser un rasgo que facilite la hibridación especies emparentadas filogenéticamente. La hibridación representa un mecanismo de especiación en el cual los híbridos ganan variantes génicas de sus progenitores, y con ello podrían generarse habilidades de colonizar nuevos nichos ecológicos (Seehausen 2013). En la meseta de Somuncura estarían ocurriendo procesos evolutivos que pueden desencadenar eventos de especiación en las “festucas patagónicas”. Es posible que algunas de estas poblaciones tengan una mejor adecuación que sus progenitores y mayor capacidad de sobrellevar cambios en el ambiente como el incremento de la temperatura anual o el aumento de la frecuencia de eventos estocásticos (i.e sequías) asociados al cambio climático.

La hibridación entre especies de la alianza *Festuca pallescens* fue reportada por Dubcovsky & Martinez (1992). En el sud-oeste de Santa Cruz, las poblaciones de *F. pallescens* de pastizales sub-andinos constituyen “islas” dentro de pastizales dominados

por *F. gracillima* (Roig et al. 1985; Oliva 1996). En estas zonas de contacto es donde se han encontrado híbridos naturales (Dubcovsky 1989). Por otro lado, la posible existencia de ecotipos de *F. pallescens* en Patagonia Sur fue sugerida por Bertiller et al. (1996) quienes proponen la selección de sub-poblaciones de *F. pallescens* con características asociadas a la tolerancia del déficit hídrico como fuentes de semillas para la restauración de pastizales degradados.

La alianza *Festuca pallescens* (St.-Yves) Parodi comprende a los taxones *F. gracillima* Hook. *F. var. patagonica* Speg., *F. pallescens* (St.-Yves) Parodi *var. foliosa* Parodi, *F. pallescens* (St.-Yves) Parodi *var. grandiflora* Parodi y *F. gracillima* Hook. *F. fo. scabra* St.-Yves que difieren en caracteres como tamaño de las espiguillas, ancho de las hojas y tamaño de las plantas (Catalán & Müller 2012). Debido a la inconsistencia de los caracteres los taxones han sido subordinados a *Festuca pallescens* (Catalán & Müller 2012). Si bien no existen registro de estos taxones en la Meseta de Somuncura, no se puede descartar su presencia y que el ecotipo sea producto de la hibridación dentro de esta alianza compuesta por todos taxones hexaploides (Dubcovsky & Martinez 1992). De todos modos, la filogenia (capítulo 2B, López et al. 2017) muestra claramente una asociación con *F. argentina*, por lo cual se sugiere que son necesarios más estudios para establecer, por ejemplo, la ploidía del ecotipo y la posible identidad de las especies parentales. Es probable que el ecotipo encontrado en la Meseta de Somuncura tenga una distribución más amplia en Patagonia. Muestras provenientes de Meliquina (Neuquén) que presentaban características morfológicas similares a las de Somuncura tuvieron la misma constitución genética que las poblaciones SA-1 y SB (datos personales no publicados).

5.3 Perspectivas a futuro: Implicancias en el manejo y la domesticación

El objetivo general de esta tesis fue generar conocimientos en aspectos genéticos y eco-fisiológicos sobre poblaciones de *F. pallescens* relacionados con el potencial adaptativo. Este conocimiento aporta las bases para el delineamiento de programas de domesticación y mejoramiento genético con fines productivos y de restauración de ecosistemas. Los resultados obtenidos no sólo aportaron nueva información a la ya generada por otros autores para la especie, sino que también sirvieron de disparadores de nuevas preguntas sobre la existencia de un ecotipo con interesantes características; y la

importancia de moduladores ambientales locales (ej. sitios y altitud) y de gran escala (gradiente de precipitaciones) sobre poblaciones de *F. pallescens*.

El conocimiento generado en base a los modelos de tiempo térmico e hidro-tiempo representan una herramienta clave para el manejo de pastizales y/o para la recuperación de los mismos. Por ejemplo, en años en que los modelos climáticos predigan buenas condiciones para la germinación, según los requerimientos de tiempo hídrico y térmicos (e.g. ciclos climáticos con meses muy húmedos, y con temperaturas por encima de la T_b), luego de la dispersión de semillas debería excluirse el pastoreo de esos sitios, para asegurar una buena germinación y sobrevivencia de nuevos individuos (i.e. evitar el pisoteo de plántulas y/o su ramoneo o herbívora). Del mismo modo, si se plantean estrategias de revegetación, y/o enriquecimiento de los pastizales, pueden emplearse estos modelos para evaluar el año y momento para una mejor implantación. En este sentido, Golluscio et al. (1998) sugieren que en años con buenas condiciones para la germinación (i.e. otoños que provean condiciones por encima de los requerimientos térmicos e hídricos), durante la dispersión de la semilla (ej. verano) puede mantenerse el ganado en los pastizales, lo cual favorecería el “enterramiento” de las semillas en el suelo por efecto del pisoteo del ganado, pero luego (antes del otoño) se debería excluir para asegurar una buena emergencia e implantación.

Por otro lado, suponiendo que *F. argentina* sea una de las posibles especies parentales del potencial híbrido (ecotipo Somuncura), resulta de sumo interés evaluar si las poblaciones SA-1 y SB presentan el endófito que posee *F. argentina* y que produce toxicidad para el ganado (Lischinsky et al. 1990; Cabral et al. 1999). Estas poblaciones se encontraban pastoreadas en la Meseta (Observación personal), y en caso de haber poco forraje disponible, *F. argentina* es consumida por el ganado (Siffredi & Fariña comunicación personal). Si el ecotipo de *F. argentina* no posee el endófito en sus hojas, podría ser de interés productivo en los planes de mejoramiento y domesticación que se pretende abordar a futuro con enfoque a recuperar o rehabilitar pastizales degradados, o mejorar la productividad de pastizales en zonas marginales para *F. pallescens*.

Los resultados generados en esta tesis permiten hacer una primera selección de poblaciones (genotipos) de interés para futuros programas de domesticación en base a la diversidad genética y a las respuestas ante las condiciones limitantes de agua. Teniendo en cuenta además la representatividad de los ambientes, se pre-seleccionaron cuatro poblaciones de *Festuca pallescens* (PA, PB, JA y JB) con las cuales se continuará

trabajando en estudios de campo y ensayos experimentales. Junto con seis poblaciones de *F. pallescens* provenientes de Chubut, se evaluará la variación genética en caracteres morfométricos y fenológicos de interés productivo en jardines de introducción en las experimentales del INTA de Bariloche, Esquel y Trelew (tres ensayos en paralelo). Para estos ensayos ya se sembraron las plantas en invernáculo en cada una de las tres experimentales y se plantarán en condiciones reales de campo (sin pastoreo) durante octubre de 2017. A partir de estos ensayos se plantea seleccionar poblaciones con mejor rendimiento para luego diseñar parcelas demostrativas y evaluar a futuro su rendimiento en campos bajo uso ganadero de la región (i.e. con pastoreo).

Paralelamente, para avanzar con un plan de domesticación y mejoramiento de *F. pallescens*, se ha instalado una clausura (cierre al pastoreo de animales domésticos) de una parcela dentro de una de las poblaciones de interés (PB) ubicada en el Campo Experimental de INTA en Pilcaniyeu. Esta población se eligió por registrar una buena producción de semillas, buen crecimiento y niveles de variación genética intermedios. Se analizarán la productividad de forraje y de semillas, teniendo como finalidad su inscripción como cultivar en el registro del Instituto Nacional de semillas (INASE).

A futuro, se pretende profundizar la información obtenida en esta tesis mediante el estudio de poblaciones capaces de tolerar condiciones ambientales extremas (sequía, salinidad) y/o genotipos que produzcan forraje temprano (i.e. comenzar el crecimiento con bajas temperaturas, hacia el final del invierno lo cual permitiría tener un período de crecimiento vegetativo más largo). De esta forma, se pretende obtener material genético seleccionado con el fin de mejorar y/o restaurar la productividad forrajera de pastizales patagónicos degradados, contribuyendo a la conservación de la biodiversidad y los servicios ambientales que proveen. Asimismo, poblaciones con estas características podrían ser una herramienta para el enriquecimiento genético en pastizales degradados ubicados en zonas prioritarias para la conservación. El enriquecimiento de dichas poblaciones con genotipos seleccionados proporcionaría mayor capacidad a ciertos pastizales para adaptarse a cambios futuros, promoviendo a su vez la capacidad de mantener en el tiempo la provisión de servicios ambientales.

Finalmente, se planifica continuar el estudio del ecotipo identificado en la Meseta de Somuncura, a través del análisis del contenido total de ADN, nivel de ploidía, distribución natural y presencia o no del endófito. Asimismo, se plantea la necesidad de profundizar estudios similares a los realizados en esta tesis, pero que incluyan más

número de poblaciones de la meseta Somuncura. Esto se debe a que Somuncura representa una isla biogeográfica, con registro de procesos de especiación específicos de varias especies (e.g. endemismos), en dónde se desarrollan poblaciones extendidas (festuquetum) de *F. pallescens* a largo de sus paisajes. Estas características hacen de Somuncura un gran-ecosistema focal, tanto desde un punto de vista científico (e.g. genético-ecológico-evolutivo) como desde la conservación de la biodiversidad, de genotipos y endemismos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler, P.B., Milchunas, D.G., Sala, O.E., Burke, I.C., Lauenroth, W.K., 2005. Plant traits and ecosystem grazing effects: comparison of US sagebrush steppe and Patagonian steppe. *Ecol. Appl.* 15, 774–792.
- Aguiar, M.R., León, R.J., 1985. Sheep grazing causes important disturbances in western Patagonian semi-arid grasslands. *Phytocoenologia* 13, 181–196. <https://doi.org/10.1127/phyto/13/1985/181>
- Aguiar, M.R., Soriano, A., Sala, O.E., 1992. Competition and Facilitation in the Recruitment of Seedlings in Patagonian Steppe. *Funct. Ecol.* 6, 66–70. <https://doi.org/10.2307/2389772>
- Alberto, F., Bouffier, L., LOUVET, J.-M., LAMY, J.-B., Delzon, S., Kremer, A., 2011. Adaptive responses for seed and leaf phenology in natural populations of sessile oak along an altitudinal gradient. *J. Evol. Biol.* 24, 1442–1454.
- Alexander, L.V., Zhang, X., Peterson, T.C., Caesar, J., Gleason, B., Klein Tank, A.M.G., Haylock, M., Collins, D., Trewin, B., Rahimzadeh, F., 2006. Global observed changes in daily climate extremes of temperature and precipitation. *J. Geophys. Res. Atmospheres* 111.
- Allen, P.S., Meyer, S.E., Khan, M.A., 2000. Hydrothermal time as a tool in comparative germination studies. *Seed Biol. Adv. Appl.* 401–410.
- Alvarado, V., Bradford, K.J., 2002. A hydrothermal time model explains the cardinal temperatures for seed germination. *Plant Cell Environ.* 25, 1061–1069. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2002.00894.x>
- Anderson, C.D., Epperson, B.K., Fortin, M.-J., Holderegger, R., James, P.M.A., Rosemberg, M.S., Scribner, K.T., Spear, S., 2010. Considering spatial and temporal scale in landscape-genetic studies of gene flow. *Mol. Ecol.* 19, 3565–3575. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04757.x>
- Andrade, A., Monjeau, A., 2014. Patterns in community assemblage and species richness of small mammals across an altitudinal gradient in semi-arid Patagonia, Argentina. *J. Arid Environ.* 106, 18–26. <https://doi.org/10.1016/j.jaridenv.2014.02.004>
- Andrew, R.L., Ostevik, K.L., Ebert, D.P., Rieserberg, L.H., 2012. Adaptation with gene flow across the landscape in a dune sunflower. *Mol. Ecol.* 21, 2078–2091. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05454.x>
- Arana, M.V., Gonzalez-Polo, M., Martinez-Meier, A., Gallo, L.A., Benech-Arnold, R.L., Sánchez, R.A., Batlla, D., 2016. Seed dormancy responses to temperature relate to *Nothofagus* species distribution and determine temporal patterns of germination across altitudes in Patagonia. *New Phytol.* 209, 507–520. <https://doi.org/10.1111/nph.13606>
- Ares, J., Beeskow, A., Bertiller, M., Rostagno, M., Irisarri, M., Anchorena, J., Defossé, G., Merino, C., 1990. Structural and dynamic characteristics of overgrazed lands of northern Patagonia, Argentina. *Ecosyst. World* 17, 149–175.
- Arnold, R.L.B., Ghersa, C.M., Sanchez, R.A., Insausti, P., 1990. Temperature effects on dormancy release and germination rate in *Sorghum halepense* (L.) Pers. seeds: a quantitative analysis. *Weed Res.* 30, 81–89. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.1990.tb01690.x>

- Aronson, J., Floret, C., Floc'h, E., Ovalle, C., Pontanier, R., 1993. Restoration and Rehabilitation of Degraded Ecosystems in Arid and Semi-Arid Lands. I. A View from the South. *Restor. Ecol.* 1, 8–17. <https://doi.org/10.1111/j.1526-100X.1993.tb00004.x>
- Arrigo, N., Felber, F., Parisod, C., Buerki, S., Alvarez, N., David, J., Guadagnuolo, R., 2010. Origin and expansion of the allotetraploid *Aegilops geniculata*, a wild relative of wheat. *New Phytol.* 187, 1170–1180. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03328.x>
- Asner, G.P., Elmore, A.J., Olander, L.P., Martin, R.E., Harris, A.T., 2004. Grazing Systems, Ecosystem Responses, and Global Change. *Annu. Rev. Environ. Resour.* 29, 261–299. <https://doi.org/10.1146/annurev.energy.29.062403.102142>
- AUBIN-HORTH, N., RENN, S.C.P., 2009. Genomic reaction norms: using integrative biology to understand molecular mechanisms of phenotypic plasticity. *Mol. Ecol.* 18, 3763–3780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04313.x>
- Austin, A.T., Sala, O.E., Canadell, J., White, P.S., 2002. Carbon and nitrogen dynamics across a natural precipitation gradient in Patagonia, Argentina. *J. Veg. Sci.* 13, 351–360. [https://doi.org/10.1658/1100-9233\(2002\)013\[0351:CANDAA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1658/1100-9233(2002)013[0351:CANDAA]2.0.CO;2)
- Bailey, C.D., Carr, T.G., Harris, S.A., Hughes, C.E., 2003. Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Mol. Phylogenet. Evol., Plant Molecular Evolution* 29, 435–455. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.08.021>
- Balao, F., Tannhäuser, M., Lorenzo, M.T., Hedrén, M., Paun, O., 2016. Genetic differentiation and admixture between sibling allopolyploids in the *Dactylorhiza majalis* complex. *Heredity* 116, 351. <https://doi.org/10.1038/hdy.2015.98>
- Baldwin, B.G., 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the compositae. *Mol. Phylogenet. Evol.* 1, 3–16.
- Ballentine, B., Greenberg, R., 2010. Common Garden Experiment Reveals Genetic Control of Phenotypic Divergence between Swamp Sparrow Subspecies That Lack Divergence in Neutral Genotypes. *PLOS ONE* 5, e10229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010229>
- Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A., 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16, 37–48.
- Barrett, R.D.H., Schluter, D., 2008. Adaptation from standing genetic variation. *Trends Ecol. Evol.* 23, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- Baskin, C.C., Baskin, J.M., 1998. *Seeds: ecology, biogeography, and, evolution of dormancy and germination.* Elsevier.
- Batlla, D., Benech-Arnold, R.L., 2015. A framework for the interpretation of temperature effects on dormancy and germination in seed populations showing dormancy. *Seed Sci. Res.* 25, 147–158. <https://doi.org/10.1017/S0960258514000452>
- Batlla, D., Benech-Arnold, R.L., 2006. The role of fluctuations in soil water content on the regulation of dormancy changes in buried seeds of *Polygonum aviculare* L. *Seed Sci. Res.* 16, 47–59. <https://doi.org/10.1079/SSR2005234>
- Batlla, D., Benech-Arnold, R.L., 2003. A quantitative analysis of dormancy loss dynamics in *Polygonum aviculare* L. seeds: Development of a thermal time model based on changes in seed population thermal parameters. *Seed Sci. Res.* 13, 55–68. <https://doi.org/10.1079/SSR2002124>

- Batlla, D., Luis Benech-Arnold, R., 2007. Predicting changes in dormancy level in weed seed soil banks: Implications for weed management. *Crop Prot., Weed Science in Time of Transition* 26, 189–197. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2005.07.014>
- Beatley, J.C., 1974. Phenological Events and Their Environmental Triggers in Mojave Desert Ecosystems. *Ecology* 55, 856–863. <https://doi.org/10.2307/1934421>
- Bedolla-Garcia, B.Y., Lindig-Cisneros, R., Cabrera, S.I.L., 2013. Diferenciación genética en poblaciones de *Salvia elegans* (Lamiaceae). *Biológicas Rev. Cienc. Biológico Agropecu. Univ. Michoacana San Nicolás Hidalgo* 13, 59–64.
- Bertiller, M., Beeskow, A., Coronato, F., 1991. Seasonal environmental variation and plant phenology in arid Patagonia (Argentina). *J. Arid Environ.* 21, 1–11.
- Bertiller, M.B., 1998. Spatial patterns of the germinable soil seed bank in northern Patagonia. *Seed Sci. Res.* 8, 39–46. <https://doi.org/10.1017/S0960258500003895>
- Bertiller, M.B., 1996. Grazing effects on sustainable semiarid rangeiands in Patagonia: The state and dynamics of the soil seed bank. *Environ. Manage.* 20, 123–132. <https://doi.org/10.1007/PL00006692>
- Bertiller, M.B., 1992. Seasonal variation in the seed bank of a Patagonian grassland in relation to grazing and topography. *J. Veg. Sci.* 3, 47–54. <https://doi.org/10.2307/3235997>
- Bertiller, M.B., Aloia, D.A., 1997. Seed bank strategies in Patagonian semi-arid grasslands in relation to their management and conservation. *Biodivers. Conserv.* 6, 639–650. <https://doi.org/10.1023/A:1018397615476>
- Bertiller, M.B., Coronato, F., 1994. Seed bank patterns of *Festuca pallescens* in semiarid Patagonia (Argentina): a possible limit to bunch reestablishment. *Biodivers. Conserv.* 3, 57–67. <https://doi.org/10.1007/BF00115333>
- Bertiller, M.B., Defossé, G.E., 1990. Grazing and Plant Growth Interactions in a Semiarid *Festuca pallescens* Grassland (Patagonia). *J. Range Manag.* 43, 300–303. <https://doi.org/10.2307/3898921>
- Bertiller, M.B., Elissalde, N.O., Rostagno, C.M., Defossé, G.E., 1995. Environmental patterns and plant distribution along a precipitation gradient in western Patagonia. *J. Arid Environ.* 29, 85–97. [https://doi.org/10.1016/S0140-1963\(95\)80066-2](https://doi.org/10.1016/S0140-1963(95)80066-2)
- Bertiller, M.B., Irisarri, M.P., Ares, J.O., 1990. Phenology of *Festuca pallescens* in relation to topography in north-western Patagonia. *J. Veg. Sci.* 1, 579–584. <https://doi.org/10.2307/3235562>
- Bertiller, M.B., Zaixso, P., Irisarri, M. del P., Brevedan, E.R., 1996. The establishment of *Festuca pallescens* in arid grasslands in Patagonia (Argentina): the effect of soil water stress. *J. Arid Environ.* 32, 161–171. <https://doi.org/10.1006/jare.1996.0014>
- Bewley, J.D., Black, M., 1994. Seeds, in: *Seeds*. Springer, Boston, MA, pp. 1–33. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-1002-8_1
- Bianchi, E., Villalba, R., Viale, M., Couvreur, F., Marticorena, R., 2016. New precipitation and temperature grids for northern Patagonia: Advances in relation to global climate grids. *J. Meteorol. Res.* 30, 38–52. <https://doi.org/10.1007/s13351-015-5058-y>
- Bijlsma, R., Loeschke, V., 2012. Genetic erosion impedes adaptive responses to stressful environments. *Evol. Appl.* 5, 117–129. <https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2011.00214.x>

- Bijlsma, R., Loeschcke, V., 2005. Environmental stress, adaptation and evolution: an overview. *J. Evol. Biol.* 18, 744–749. <https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2005.00962.x>
- Bisigato, A.J., Bertiller, M.B., 1997. Grazing effects on patchy dryland vegetation in northern Patagonia. *J. Arid Environ.* 36, 639–653. <https://doi.org/10.1006/jare.1996.0247>
- Bonvissuto, G., Somlo, R., Lanciotti, M., Carteau, A., Busso, C., 2008. Guías de Condición para Páyzizales Naturales de la “Pre-Cordillera”, “Sierras y Mesetas” y “Monte Austral” de Patagonia. Centro Regional Patagonia Norte. EEA Bariloche.
- Bradford, K.J., 1995. Water relations in seed germination. *Seed Dev. Germination* 1, 351–396.
- Bran, D., Ayesa, J., López, C., 2000. Regiones Ecológicas de Río Negro. Comunicación Técnica No 59 EEA INTA San Carlos de Bariloche - Río Negro, in: Regiones Ecológicas de Río Negro. Comunicación Técnica No 59 EEA INTA San Carlos de Bariloche - Río Negro.
- Bran, D., López, C., Marcolin, A., Ayesa, J., Barrios, D., 1998. Valles y Mallines de la Comarca de Ingeniero Jacobacci (Río Negro). Distribución y tipificación utilitaria. Laboratorio de Teledetección SIG. INTA, EEA Bariloche. Río Negro, Argentina.
- Bran, D., Siffredi, G., Ayesa, J., López, C., Umaña, F., Gaitan, J., López, D., Franzese, J., 2006. Evaluación del Estado de los Recursos Forrajeros de la Estancia San Ramón., Comunicación Técnica No106. INTA, EEA Bariloche.
- Breitman, M.F., Martinez, R.J.N., Avila, L.J., Sites, J.W., Morando, M., 2015. Phylogeography and morphological variation of the northernmost distributed species of the *Liolaemus lineomaculatus* section (*Liolaemini*) from Patagonia. *Amphib.-Reptil.* 36, 373–387. <https://doi.org/10.1163/15685381-00003017>
- Bridle, J.R., Vines, T.H., 2007. Limits to evolution at range margins: when and why does adaptation fail? *Trends Ecol. Evol.* 22, 140–147. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.002>
- Brown, J.H., Mehlman, D.W., Stevens, G.C., 1995. Spatial Variation in Abundance. *Ecology* 76, 2028–2043. <https://doi.org/10.2307/1941678>
- Bruvo, R., Michiels, N.K., D’Souza, T.G., Schulenburg, H., 2004. A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Mol. Ecol.* 13, 2101–2106. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02209.x>
- Busso, C.A., Bonvissuto, G.L., 2009. Soil seed bank in and between vegetation patches in arid Patagonia, Argentina. *Environ. Exp. Bot.* 67, 188–195. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.01.003>
- Bustos, C., 2012. Estadísticas climáticas del Campo Anexo Pilcaniyeu (Río Negro)., Comunicación Técnica.
- Byars, S.G., Papst, W., Hoffmann, A.A., 2007. Local adaptation and cögradient selection in the alpine plant, *Poa hiemata*, along a narrow altitudinal gradient. *Evolution* 61, 2925–2941. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00248.x>
- Caballé, G., Fernández, M.E., Gyenge, J., Aparicio, A., Schlichter, T., 2011. Modeling leaf maximum net photosynthetic rate of *Festuca pallescens*, the dominant perennial grass of Patagonian pine-based silvopastoral systems. *Agrofor. Syst.* 83, 13–24.
- Castañeda, M., González, M., 2008. Statistical analysis of the precipitation trends in the Patagonia region in southern South America. *Atmósfera* 21, 303–317.

- Catalán P., Müller J., 2012. *Festuca* L. In: Zuloaga, F.O., Rúgolo de Agrasar, Z.E. & Antón, A.M.R. (Eds.) *Flora de Argentina. Monocotyledoneae*.
- Catalán, P., Segarra-Moragues, J.G., Palop-Esteban, M., Moreno, C., González-Candelas, F., 2006. A Bayesian Approach for Discriminating Among Alternative Inheritance Hypotheses in Plant Polyploids: The Allotetraploid Origin of Genus *Borderea* (Dioscoreaceae). *Genetics* 172, 1939–1953. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.042788>
- Catalan, P., Torrecilla, P., Lopez-Rodriguez, J.A., Muller, J., Stace, C.A., 2007. A systematic approach to subtribe Loliinae (Poaceae:Pooideae) based on phylogenetic evidence. *Aliso - Monocots Comp. Biol. Evol. - Poales*.
- Catalán, P., Torrecilla, P., Rodríguez, J.Á.L., Olmstead, R.G., 2004. Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poaceae, Pooideae) inferred from ITS and trnL–F sequences. *Mol. Phylogenet. Evol.* 31, 517–541. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2003.08.025>
- Cavieres, L., Arroyo, M.T., Peñaloza, A., Molina-Montenegro, M., Torres, C., 2002. Nurse effect of *Bolax gummifera* cushion plants in the alpine vegetation of the Chilean Patagonian Andes. *J. Veg. Sci.* 13, 547–554.
- Chantre, G.R., Batlla, D., Sabbatini, M.R., Orioli, G., 2009. Germination parameterization and development of an after-ripening thermal-time model for primary dormancy release of *Lithospermum arvense* seeds. *Ann. Bot.* 103, 1291–1301.
- Chapin, F.S., 1991. Integrated responses of plants to stress. *BioScience* 41, 29–36.
- Chapin III, F., 1993. Functional role of growth forms in ecosystem and global processes. *Scaling Physiol. Process. Leaf Globe* 287–312.
- Chapin III, F.S., 1980. The mineral nutrition of wild plants. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 11, 233–260.
- Chapin III, F.S., Autumn, K., Pugnaire, F., 1993. Evolution of suites of traits in response to environmental stress. *Am. Nat.* 142, S78–S92.
- Charmantier, A., McCleery, R.H., Cole, L.R., Perrins, C., Kruuk, L.E., Sheldon, B.C., 2008. Adaptive phenotypic plasticity in response to climate change in a wild bird population. *Science* 320, 800–803.
- Charmet, G., Ravel, C., Balfourier, F., 1997. Phylogenetic analysis in the *Festuca-Lolium* complex using molecular markers and ITS rDNA. *Theor. Appl. Genet.* 94, 1038–1046. <https://doi.org/10.1007/s001220050512>
- Chebez, J., 2007. Área Natural Protegida Provincial Meseta de Somuncurá. Giacomo MV Francesco EG Coconier Ed. 348–349.
- Chebez, J.C., 2005. Guía de las Reservas Patagonia Norte I in Guía de las Reservas Naturales de la Argentina. Albatroz.
- Chen, J., Källman, T., Ma, X., Gyllenstrand, N., Zaina, G., Morgante, M., Bousquet, J., Eckert, A., Wegrzyn, J., Neale, D., others, 2012. Disentangling the roles of history and local selection in shaping clinal variation of allele frequencies and gene expression in Norway spruce (*Picea abies*). *Genetics* 191, 865–881.
- Cingolani, A.M., Noy-Meir, I., Díaz, S., 2005. Grazing effects on rangeland diversity: a synthesis of contemporary models. *Ecol. Appl.* 15, 757–773.

- Clark, L.V., Jasieniuk, M., 2011. polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 562–566. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2011.02985.x>
- Convention of Biological Diversity, 2008. CONFERENCE OF THE PARTIES TO THE CONVENTION ON BIOLOGICAL DIVERSITY.
- Corander, J., Waldmann, P., Sillanpää, M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics* 163, 367–374.
- Corbella, H., Lara, L.E., 2008. Late Cenozoic Quaternary Volcanism in Patagonia and Tierra del Fuego, in: Rabassa, J. (Ed.), *Developments in Quaternary Sciences, The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra Del Fuego*. Elsevier, pp. 95–119. [https://doi.org/10.1016/S1571-0866\(07\)10006-3](https://doi.org/10.1016/S1571-0866(07)10006-3)
- Coronato, F., Bertiller, M., 1997. Climatic controls of soil moisture dynamics in an arid steppe of northern Patagonia, Argentina. *Arid Land Res. Manag.* 11, 277–288.
- Coronato, F.R., Bertiller, M.B., 1996. Precipitation and landscape related effects on soil moisture in semi-arid rangelands of Patagonia. *J. Arid Environ.* 34, 1–9. <https://doi.org/10.1006/jare.1996.0088>
- Correa MN., 1998. *Flora patagónica.*, Colección Científica del INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ed. Buenos Aires, Argentina.
- Cota, L., Vieira, F., Melo Júnior, A., Brandão, M., Santana, K., Guedes, M., Oliveira, D., 2011. Genetic diversity of *Annona crassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State. *Genet. Mol. Res.* 10, 2172–2180.
- Couso, L., 2004. Mecanismos de tolerancia a sequía y sus efectos sobre la habilidad competitiva de pastos de la estepa patagónica. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Couso, L., Fernández, R., 2012. Phenotypic plasticity as an index of drought tolerance in three Patagonian steppe grasses. *Ann. Bot.* 110, 849–857.
- Covell, S., Ellis, R., Roberts, E., Summerfield, R., 1986. The influence of temperature on seed germination rate in grain legumes: I. A comparison of chickpea, lentil, soyabean and cowpea at constant temperatures. *J. Exp. Bot.* 37, 705–715.
- Cuyeu, R., Rosso, B., Pagano, E., Soto, G., Fox, R., Ayub, N.D., 2013. Genetic diversity in a world germplasm collection of tall fescue. *Genet. Mol. Biol.* 36, 237–242. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572013005000021>
- Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Defosse, G., Bertiller, M., Robberecht, R., 1995. Germination characteristics of *Festuca pallescens*, a Patagonian bunchgrass with reclamation potential. *Seed Sci. Technol. Switz.*
- Defossé, G., Bertiller, M., Robberecht, R., 1997b. Effects of topography, soil moisture, wind and grazing on *Festuca* seedlings in a Patagonian grassland. *J. Veg. Sci.* 8, 677–684.
- Defossé, G., Robberecht, R., Bertiller, M., 1997a. Seedling Dynamics of *Festuca* spp. in a Grassland of Patagonia, Argentina, as Affected by Competition, Microsites, and Grazing. *J. Range Manag.* 50, 73–79. <https://doi.org/10.2307/4002708>
- Del Valle, H., Elissalde, N., Gagliardini, D., Milovich, J., 1998. Status of desertification in the Patagonian region: Assessment and mapping from satellite imagery. *Arid Land Res. Manag.* 12, 95–121.

- Dirihan, S., Helander, M., Väre, H., Gundel, P.E., Garibaldi, L.A., Irisarri, J.G.N., Saloniemi, I., Saikkonen, K., 2016. Geographic Variation in *Festuca rubra* L. Ploidy Levels and Systemic Fungal Endophyte Frequencies. *PloS One* 11, e0166264.
- Dixon, C.J., 2010. OLFinder-a program which disentangles DNA sequences containing heterozygous indels. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 335–340. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02749.x>
- Donohue, K., Dorn, L., Griffith, C., Kim, E., Aguilera, A., Polisetty, C.R., Schmitt, J., 2005. The evolutionary ecology of seed germination of *Arabidopsis thaliana*: variable natural selection on germination timing. *Evolution* 59, 758–770.
- Donohue, K., Rubio de Casas, R., Burghardt, L., Kovach, K., Willis, C.G., 2010. Germination, postgermination adaptation, and species ecological ranges. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 41, 293–319.
- Doyle, J., Doyle, J., 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19, 11–15.
- Dryland Science for Development Consortium., 2009. , Integrated Methods for Monitoring and Assessing Desertification/Land Degradation Processes and Driver.
- Dubcovsky, J., 1989. Estudios genéticos y evolutivos de las especies patagónicas del género *Festuca* (Poaceae). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Dubcovsky, J., Martínez, A., 1988. Phenetic relationships in the *Festuca* spp. from Patagonia. *Can. J. Bot.* 66, 468–478. <https://doi.org/10.1139/b88-072>
- Dubcovsky, J., Martínez, A., 1987. Cariotipos y comportamiento meiótico de *Festuca pallescens* (Poaceae). *Darwiniana* 28, 153–161.
- Dubcovsky, J., Martínez, A.J., 1991. Chromosome complement and nucleoli in the *Festuca pallescens* alliance from South America. *Can. J. Bot.* 69, 2756–2761. <https://doi.org/10.1139/b91-346>
- Dufresne, F., Stift, M., Vergilino, R., Mable, B.K., 2014. Recent progress and challenges in population genetics of polyploid organisms: an overview of current state-of-the-art molecular and statistical tools. *Mol. Ecol.* 23, 40–69.
- Earl, D.A., others, 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.* 4, 359–361.
- Easdale, M., 2015. Una aproximación a la vulnerabilidad y robustez socio-ecológica de los sistemas ganaderos trashumantes. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires.
- Easdale, M.H., López, D.R., Bianchi, E., Bruzone, O., Siffredi, G., Gaitán, J., Umaña, F., Oricchio, P., others, 2012. Una herramienta para monitorear sequías en regiones áridas y semiáridas de Patagonia Norte. *RIA Rev. Investig. Agropecu.* 38, 158–164.
- Eckert, C.G., Samis, K.E., Loughheed, S.C., 2008. Genetic variation across species' geographical ranges: the central–marginal hypothesis and beyond. *Mol. Ecol.* 17, 1170–1188. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03659.x>
- Ehleringer, J.R., Phillips, S.L., Schuster, W.S., Sandquist, D.R., 1991. Differential utilization of summer rains by desert plants. *Oecologia* 88, 430–434.

- Encinas, A., Pérez, F., Nielsen, S.N., Finger, K.L., Valencia, V., Duhart, P., 2014. Geochronologic and paleontologic evidence for a Pacific–Atlantic connection during the late Oligocene–early Miocene in the Patagonian Andes (43–44 S). *J. South Am. Earth Sci.* 55, 1–18.
- Engelbrecht, R., Schulz, J., 2001. Time-resolved measurement of gas parameters inside diffusion-cooled CO₂ lasers with NIR diode laser and UV-VIS emission spectroscopy, in: XIII International Symposium on Gas Flow and Chemical Lasers and High-Power Laser Conference. International Society for Optics and Photonics, pp. 278–282.
- Espinoza, N., Noor, M., 2002. Population genetics of a polyploid: is there hybridization between lineages of *Hyla versicolor*? *J. Hered.* 93, 81–85.
- Esselink, G.D., Nybom, H., Vosman, B., 2004. Assignment of allelic configuration in polyploids using the MAC-PR (microsatellite DNA allele counting?peak ratios) method. *Theor. Appl. Genet.* 109. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1645-5>
- Etienne, R.S., Heesterbeek, J., 2000. On optimal size and number of reserves for metapopulation persistence. *J. Theor. Biol.* 203, 33–50.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J., 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 14, 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G., Schneider, S., 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evol. Bioinforma. Online* 1, 47.
- FALLOUR-RUBIO, D., Guibal, F., Klein, E.K., Bariteau, M., Lefèvre, F., 2009. Rapid changes in plasticity across generations within an expanding cedar forest. *J. Evol. Biol.* 22, 553–563.
- Fant, J.B., Banai, A., Havens, K., Vitt, P., 2010. Hybridization between the threatened plant, *Lespedeza leptostachya* Englem. and its co-occurring congener *Lespedeza capitata* Michx.: morphological and molecular evidence. *Conserv. Genet.* 11, 2195–2205. <https://doi.org/10.1007/s10592-010-0105-9>
- Ferasol, J., Lovett Doust, L., Lovett Doust, J., Biernacki, M., 1995. Seed germination in *Vallisneria americana*: effects of cold stratification, scarification, seed coat morphology and PCB concentration. *Ecoscience* 2, 368–376.
- Fernández, M.E., Gyenge, J., Licata, J., Schlichter, T., Bond, B.J., 2008. Belowground interactions for water between trees and grasses in a temperate semiarid agroforestry system. *Agrofor. Syst.* 74, 185–197.
- Fernández, M.E., Gyenge, J.E., Schlichter, T.M., 2006. Growth of *Festuca pallescens* in silvopastoral systems in Patagonia, Part 2: parameterization of models of stomatal conductance and leaf photosynthesis. *Agrofor. Syst.* 66, 271–280.
- Fernández, M.E., Gyenge, J.E., Schlichter, T.M., 2004. Shade acclimation in the forage grass *Festuca pallescens*: biomass allocation and foliage orientation. *Agrofor. Syst.* 60, 159–166.
- Fernández-A, R.J., Sala, O.E., Golluscio, R.A., 1991. Woody and herbaceous aboveground production of a Patagonian steppe. *J. Range Manag.* 434–437.
- Flexas, J., Bota, J., Loreto, F., Cornic, G., Sharkey, T., 2004. Diffusive and metabolic limitations to photosynthesis under drought and salinity in C3 plants. *Plant Biol.* 6, 269–279.
- Flint, R.F., Fidalgo, F., 1964. Glacial geology of the East flank of the Argentine Andes between Latitude 39° 10' S. and Latitude 41° 20' S. *Geol. Soc. Am. Bull.* 75, 335–352.

- Fowler, N., 1986. The role of competition in plant communities in arid and semiarid regions. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 17, 89–110.
- Frei, E.R., Ghazoul, J., Matter, P., Heggli, M., Pluess, A.R., 2014. Plant population differentiation and climate change: responses of grassland species along an elevational gradient. *Glob. Change Biol.* 20, 441–455.
- Fu, Y.-B., Qiu, J., Peterson, G.W., Willms, W.D., Wilms, J.F., 2006. Characterization of microsatellite markers for rough fescue species (*Festuca* spp.). *Mol. Ecol. Resour.* 6, 894–896. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2006.01390.x>
- Gaitán, J.J., Bran, D., Oliva, G., Ciari, G., Nakamatsu, V., Salomone, J., Ferrante, D., Buono, G., Massara, V., Humano, G., Celdrán, D., Opazo, W., Maestre, F.T., 2013. Evaluating the performance of multiple remote sensing indices to predict the spatial variability of ecosystem structure and functioning in Patagonian steppes. *Ecol. Indic.* 34, 181–191. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.05.007>
- Gaitán, J.J., López, C.R., Bran, D.E., 2010. Vegetation composition and its relationship with the environment in mallines of north Patagonia, Argentina. *Wetl. Ecol. Manag.* 19, 121–130. <https://doi.org/10.1007/s11273-010-9205-z>
- Gaitán, J.J., López, C.R., Bran, D.E., 2009. Efectos del pastoreo sobre el suelo y la vegetación en la estepa patagónica. *Cienc. Suelo* 27, 261–270.
- Garau, A., Ghersa, C., Lemcoff, J., Baraño, J., 2009. Weeds in *Eucalyptus globulus* subsp. *maidenii* (F. Muell) establishment: effects of competition on sapling growth and survivorship. *New For.* 37, 251–264.
- García-Huidobro, J., Monteith, J., Squire, G., 1982. Time, temperature and germination of pearl millet (*Pennisetum typhoides* S. & H.) I. Constant temperature. *J. Exp. Bot.* 33, 288–296.
- Garreaud, R.D., Vuille, M., Compagnucci, R., Marengo, J., 2009. Present-day south american climate. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 281, 180–195.
- Gasparini, Z., Sterli, J., Parras, A., O’Gorman, J.P., Salgado, L., Varela, J., Pol, D., 2015. Late Cretaceous reptilian biota of the La Colonia Formation, central Patagonia, Argentina: Occurrences, preservation and paleoenvironments. *Cretac. Res.* 54, 154–168. <https://doi.org/10.1016/j.cretres.2014.11.010>
- Gaston, K.J., 2009. Geographic range limits: achieving synthesis. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* rspb–2008.
- Gienapp, P., Teplitsky, C., Alho, J., Mills, J., Merilä, J., 2008. Climate change and evolution: disentangling environmental and genetic responses. *Mol. Ecol.* 17, 167–178.
- Godagnone, R., Bran, D., 2009. Inventario integrado de los Recursos de la provincia de Río Negro. INTA.
- Golluscio, R.A., Deregibus, V.A., Paruelo, J.M., 1998. Sustainability and range management in the Patagonian steppes. *Ecol. Austral* 8, 265–284.
- Golluscio, R., Cavagnaro, F., Valenta, M., 2011. Arbustos de la estepa patagónica: ¿adaptados a tolerar la sequía o el pastoreo? *Ecología Austral* 21, 61–70.

- Grassein, F., Lavorel, S., Till-Bottraud, I., 2014. The importance of biotic interactions and local adaptation for plant response to environmental changes: field evidence along an elevational gradient. *Glob. Change Biol.* 20, 1452–1460.
- Grime, J., 1977. Interpretation of small-scale patterns in the distribution of plant species in space and time. *Struct. Funct. Plant Popul.* 101–124.
- Grime, J., 1979: *Plant Strategies and Vegetation Processes*. JO Hn Wdey Sons Tor.
- Grime, J.P., 2006. *Plant strategies, vegetation processes, and ecosystem properties*. John Wiley & Sons.
- Grundy, A., Phelps, K., Reader, R., Burston, S., 2000. Modelling the germination of *Stellaria media* using the concept of hydrothermal time. *New Phytol.* 148, 433–444.
- Gudka, M., Davies, J., Poulsen, L., Schulte-Herbrüggen, B., MacKinnon, K., Crawhall, N., Henwood, W.D., Dudley, N., Smith, J., 2014. Conserving dryland biodiversity: a future vision of sustainable dryland development. *Biodiversity* 15, 143–147. <https://doi.org/10.1080/14888386.2014.930716>
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., Gascuel, O., 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321.
- Guindon, S., Gascuel, O., 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst. Biol.* 52, 696–704.
- Gummerson, R., 1986. The effect of constant temperatures and osmotic potentials on the germination of sugar beet. *J. Exp. Bot.* 37, 729–741.
- Hall, T.A., 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Presented at the Nucleic acids symposium series, pp. 95–98.
- Hamann, E., Kesselring, H., Armbruster, G.F., Scheepens, J.F., Stöcklin, J., 2016. Evidence of local adaptation to fine-and coarse-grained environmental variability in *Poa alpina* in the Swiss Alps. *J. Ecol.* 104, 1627–1637.
- Hampe, A., Petit, R.J., 2005. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol. Lett.* 8, 461–467.
- Hansen, M.M., Olivieri, I., Waller, D.M., Nielsen, E.E., 2012. Monitoring adaptive genetic responses to environmental change. *Mol. Ecol.* 21, 1311–1329.
- Hanski, I., 1994. A practical model of metapopulation dynamics. *J. Anim. Ecol.* 151–162.
- Hardegree, S., Flerchinger, G., Van Vactor, S., 2003. Hydrothermal germination response and the development of probabilistic germination profiles. *Ecol. Model.* 167, 305–322.
- Heady, H., Child, R.D., 1999. *Rangeland ecology and management*. Westview Press.
- Hendry, A.P., Farrugia, T.J., Kinnison, M.T., 2008. Human influences on rates of phenotypic change in wild animal populations. *Mol. Ecol.* 17, 20–29.
- Hewitt, G.M., 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58, 247–276. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1996.tb01434.x>
- Hoffmann, A.A., Blows, M.W., 1994. Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends Ecol. Evol.* 9, 223–227. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(94\)90248-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(94)90248-8)

- Holt, R.D., Gaines, M.S., 1992. Analysis of adaptation in heterogeneous landscapes: Implications for the evolution of fundamental niches. *Evol. Ecol.* 6, 433–447. <https://doi.org/10.1007/BF02270702>
- Huang, Y., Li, Y., Hu, X., Ge, X.-J., Zhang, C.-Q., Long, C.-L., 2009. Development of twelve polymorphic microsatellite loci in polyploid endangered *Omphalogramma vincaeflora* Franch.(Primulaceae). *Conserv. Genet.* 10, 515–517.
- Huenneke, L.F., 1991. Ecological implications of genetic variation in plant populations. *Genet. Conserv. Rare Plants Oxf. Univ. Press N. Y.* 31–44.
- Iglesias, V., Whitlock, C., Bianchi, M.M., Villarosa, G., Outes, V., 2012. Climate and local controls of long-term vegetation dynamics in northern Patagonia (Lat 41 S). *Quat. Res.* 78, 502–512.
- Iglesias, V., Whitlock, C., Markgraf, V., Bianchi, M.M., 2014. Postglacial history of the Patagonian forest/steppe ecotone (41–43 S). *Quat. Sci. Rev.* 94, 120–135.
- Inda, L.A., Sanmartín, I., Buerki, S., Catalán, P., 2014. Mediterranean origin and Miocene-Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca* subgenus *Schedonorus* and *Lolium*). *J. Biogeogr.* 41, 600–614. <https://doi.org/10.1111/jbi.12211>
- Inda, L.A., Segarra-Moragues, J.G., Müller, J., Peterson, P.M., Catalán, P., 2008. Dated historical biogeography of the temperate Lolinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Mol. Phylogenet. Evol.* 46, 932–957. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2007.11.022>
- INTA, 2004. Red de Bancos de Germoplasma. Normas de Procedimiento.
- IPCC, 2007. Cambio climático 2007: Informe de síntesis. Contribución de los Grupos de trabajo I, II y III al Cuarto Informe de evaluación del Grupo Intergubernamental de Expertos sobre el Cambio Climático [Equipo de redacción principal: Pachauri RK & Reisinger A. (directores de la publicación), Ginebra, Suiza,.
- Jump, A.S., Mátyás, C., Peñuelas, J., 2009. The altitude-for-latitude disparity in the range retractions of woody species. *Trends Ecol. Evol.* 24, 694–701. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.06.007>
- Jump, A.S., Peñuelas, J., 2005. Running to stand still: adaptation and the response of plants to rapid climate change. *Ecol. Lett.* 8, 1010–1020. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2005.00796.x>
- Jump, A.S., Peñuelas, J., Rico, L., Ramallo, E., Estiarte, M., Martínez-Izquierdo, J.A., Lloret, F., 2008. Simulated climate change provokes rapid genetic change in the Mediterranean shrub *Fumana thymifolia*. *Glob. Change Biol.* 14, 637–643. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2007.01521.x>
- Jun, T.-H., Michel, A.P., Mian, M.A.R., 2011. Development of soybean aphid genomic SSR markers using next generation sequencing. *Genome Natl. Res. Coun. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* 54, 360–367. <https://doi.org/10.1139/g11-002>
- Kahilainen, A., Puurtinen, M., Kotiaho, J.S., 2014. Conservation implications of species–genetic diversity correlations. *Glob. Ecol. Conserv.* 2, 315–323. <https://doi.org/10.1016/j.gecco.2014.10.013>
- Kattge, J., Díaz, S., Lavorel, S., Prentice, I.C., Leadley, P., Bönsch, G., Garnier, E., Westoby, M., Reich, P.B., Wright, I.J., Cornelissen, J.H.C., Violle, C., Harrison, S.P., Van BODEGOM, P.M., Reichstein, M., Enquist, B.J., Soudzilovskaia, N.A., Ackerly, D.D., Anand, M., Atkin, O., Bahn, M., Baker, T.R., Baldocchi, D., Bekker, R., Blanco, C.C., Blonder, B., Bond, W.J., Bradstock, R., Bunker, D.E., Casanoves, F., Cavender-Bares, J., Chambers, J.Q., Chapin Iii, F.S., Chave, J., Coomes, D., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Dobrin, B.H., Duarte, L., Durka, W., Elser, J., Esser, G., Estiarte, M., Fagan, W.F., Fang, J., Fernández-Méndez, F., Fidelis, A., Finegan, B., Flores, O., Ford, H., Frank, D., Freschet, G.T., Fyllas, N.M., Gallagher, R.V., Green, W.A., Gutierrez, A.G.,

- Hickler, T., Higgins, S.I., Hodgson, J.G., Jalili, A., Jansen, S., Joly, C.A., Kerkhoff, A.J., Kirkup, D., Kitajima, K., Kleyer, M., Klotz, S., Knops, J.M.H., Kramer, K., Kühn, I., Kurokawa, H., Laughlin, D., Lee, T.D., Leishman, M., Lens, F., Lenz, T., Lewis, S.L., Lloyd, J., Llusià, J., Louault, F., Ma, S., Mahecha, M.D., Manning, P., Massad, T., Medlyn, B.E., Messier, J., Moles, A.T., Müller, S.C., Nadrowski, K., Naeem, S., Niinemets, Ü., Nöllert, S., Nüske, A., Ogaya, R., Oleksyn, J., Onipchenko, V.G., Onoda, Y., Ordoñez, J., Overbeck, G., Ozinga, W.A., Patiño, S., Paula, S., Pausas, J.G., Peñuelas, J., Phillips, O.L., Pillar, V., Poorter, H., Poorter, L., Poschlod, P., Prinzing, A., Proulx, R., Rammig, A., Reinsch, S., Reu, B., Sack, L., Salgado-Negret, B., Sardans, J., Shiøder, S., Shipley, B., Siefert, A., Sosinski, E., Soussana, J.-F., Swaine, E., Swenson, N., Thompson, K., Thornton, P., Waldram, M., Weiher, E., White, M., White, S., Wright, S.J., Yguel, B., Zaehle, S., Zanne, A.E., Wirth, C., 2011. TRY – a global database of plant traits. *Glob. Change Biol.* 17, 2905–2935. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02451.x>
- Kawecki, T.J., Ebert, D., 2004. Conceptual issues in local adaptation. *Ecol. Lett.* 7, 1225–1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Kebreab, E., Murdoch, A.J., 2000. The effect of water stress on the temperature range for germination of *Orobanche aegyptiaca* seeds. *Seed Sci. Res.* 10, 127–133. <https://doi.org/10.1017/S0960258500000131>
- Khurana, E., Singh, J.S., 2004. Germination and seedling growth of five tree species from tropical dry forest in relation to water stress: impact of seed size. *J. Trop. Ecol.* 20, 385–396. <https://doi.org/10.1017/S026646740400135X>
- Kopelman, N.M., Mayzel, J., Jakobsson, M., Rosenberg, N.A., Mayrose, I., 2015. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol. Ecol. Resour.* 15, 1179–1191.
- Labouriau, L.G., Osborn, J.H., 1984. Temperature dependence of the germination of tomato seeds. *J. Therm. Biol.* 9, 285–294. [https://doi.org/10.1016/0306-4565\(84\)90010-X](https://doi.org/10.1016/0306-4565(84)90010-X)
- Lacey, E.P., 1996. Parental Effects in *Plantago lanceolata* L. I: A Growth Chamber Experiment to Examine Pre- and Postzygotic Temperature Effects. *Evolution* 50, 865–878. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb03895.x>
- Lambers, H., Chapin, F.S., Pons, T.L., 2008. Photosynthesis, respiration and long-distance transport, in: *Plant Physiological Ecology*. Springer, pp. 10–153.
- Larcher, W., 2003. *Physiological plant ecology: ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer Science & Business Media.
- Larsson, A., 2014. AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30, 3276–3278. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu531>
- Lauvergeat, V., Barre, P., Bonnet, M., Ghesquière, M., 2005. Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses: PRIMER NOTE. *Mol. Ecol. Notes* 5, 401–405. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.00941.x>
- Legendre, P., Legendre, L., 1998. *Numerical ecology: second English edition*. Dev. Environ. Model. 20.
- León, R.J., Bran, D., Collantes, M., Paruelo, J.M., Soriano, A., 1998. Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecol. Austral* 8, 125–144.
- Leva, P., 2010. Variación regional de las características agroecológicas y genéticas de *Bromus pictus* y *Poa ligularis* en estepas patagónicas (Doctoral). Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Buenos Aires.

- Leva, P.E., Aguiar, M.R., Premoli, A.C., 2013. Latitudinal variation of genecological traits in native grasses of Patagonian rangelands. *Aust. J. Bot.* 61, 475–485.
- Liao, D., 1999. Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 24–30.
- López, A., Siffredi, G., Becker, G., López, D., Marchelli, P., 2015. Assessing genetic diversity in *Festuca pallescens* along a rainfall gradient in North Patagonia, in: 5th International Congress of Forage Breeding. Bs As, Argentina.
- López, C., Gaitán, J., Ayesa, J., Siffredi, G., Bran, D., 2003. Evolución y Clasificación de Valles y Mallines (Sudoeste de Río Negro).
- López, D., 2011. Una aproximación Estructural-Funcional 1 del Modelo de Estados y Transiciones para el estudio de la dinámica de la vegetación en estepas de Patagonia Norte. (Doctoral). Universidad Nacional del Comahue, Bariloche.
- López, D.R., Brizuela, M.A., Willems, P., Aguiar, M.R., Siffredi, G., Bran, D., 2013. Linking ecosystem resistance, resilience, and stability in steppes of North Patagonia. *Ecol. Indic.* 24, 1–11. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2012.05.014>
- López, D.R., Cavallero, L., 2017. The role of nurse functional types in seedling recruitment dynamics of alternative states in rangelands. *Acta Oecologica* 79, 70–80. <https://doi.org/10.1016/j.actao.2017.01.003>
- Lopez-Alvarez, D., Manzaneda, A.J., Rey, P.J., Giraldo, P., Benavente, E., Allainguillaume, J., Mur, L., Caicedo, A.L., Hazen, S.P., Breiman, A., Ezrati, S., Catalan, P., 2015. Environmental niche variation and evolutionary diversification of the *Brachypodium distachyon* grass complex species in their native circum-Mediterranean range. *Am. J. Bot.* 102, 1073–1088. <https://doi.org/10.3732/ajb.1500128>
- Lores, R., Ferreira, C., Anchorena, J., Lipinski, V., Marcolin, A., 1983. Las unidades ecológicas del campo experimental de Pilcaniyeu (Pcia de Río Negro). Su importancia regional. (Comunicaciones técnicas). INTA, EEA Bariloche.
- Luna-Flores, W., Estrada-Medina, H., Jiménez-Osornio, J., Pinzón-López, L., 2012. Efecto del estrés hídrico sobre el crecimiento y eficiencia del uso del agua en plántulas de tres especies arbóreas caducifolias. *Terra Latinoam.* 30.
- Maciel-Mata, C.A., Manríquez-Morán, N., Octavio-Aguilar, P., Sánchez-Rojas, G., 2015. El área de distribución de las especies: revisión del concepto. *Acta Univ.* 25, 03–19.
- Maestre, F., Quero, J., Gotelli, N.J., Escudero, A., Ochoa, V., Delgado-Baquerizo, M., García-Gómez, M., Bowker, M.A., Soliveres, S., Escolar, C., García-Palacios, P., Berdugo, M., Valencia, E., Gozalo, B., Gallardo, A., Aguilera, L., Arredondo, T., Blones, J., Boeken, B., Bran, D., Conceição, A.A., Cabrera, O., Chaieb, M., Derak, M., Eldridge, D.J., Espinosa, C.I., Florentino, A., Gaitán, J., Gatica, M.G., Ghiloufi, W., Gómez-González, S., Gutiérrez, J.R., Hernández, R.M., Huang, X., Huber-Sannwald, E., Jankju, M., Miriti, M., Monerri, J., Mau, R.L., Morici, E., Naseri, K., Ospina, A., Polo, V., Prina, A., Pucheta, E., Ramírez-Collantes, D.A., Romão, R., Tighe, M., Torres-Díaz, C., Val, J., Veiga, J.P., Wang, D., Zaady, E., 2012. Plant Species Richness and Ecosystem Multifunctionality in Global Drylands. *Science* 335, 214–218. <https://doi.org/10.1126/science.1215442>
- Maestre, F.T., Salguero-Gómez, R., Quero, J.L., 2012. It is getting hotter in here: determining and projecting the impacts of global environmental change on drylands. The Royal Society.

- Maguire, T. L., Saenger, P., Baverstock, P., & Henry, R. 2000. Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh.(Avicenniaceae). *Molecular Ecology*. 9, 1853-1862.
- Malumian, N., Nanez, C., 2011. The Late Cretaceous–Cenozoic transgressions in Patagonia and the Fuegian Andes: foraminifera, palaeoecology, and palaeogeography. *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 269–288.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., Taberlet, P., 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol. Evol.* 18, 189–197.
- Markgraf, V., Iglesias, V., Whitlock, C., 2013. Late and postglacial vegetation and fire history from Cordón Serrucho Norte, northern Patagonia. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 371, 109–118.
- Martínez-Palacios, A., Eguiarte, L.E., Furnier, G.R., 1999. Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *Am. J. Bot.* 86, 1093–1098.
- Matocq, M.D., Patton, J.L., Da Silva, M.N.F., 2000. Population genetic structure of two ecologically distinct Amazonian spiny rats: separating history and current ecology. *Evolution* 54, 1423–1432.
- Mazzonia, E., Vazquez, M., 2009. Desertification in Patagonia. *Dev. Earth Surf. Process.* 13, 351–377.
- Meimberg, H., Rice, K.J., Milan, N.F., Njoku, C.C., McKay, J.K., 2009. Multiple origins promote the ecological amplitude of allopolyploid *Aegilops* (Poaceae). *Am. J. Bot.* 96, 1262–1273.
- Meirmans, P.G., Hedrick, P.W., 2011. Assessing population structure: F_{ST} and related measures. *Mol. Ecol. Resour.* 11, 5–18. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02927.x>
- Meirmans, P.G., Van Tienderen, P.H., 2013. The effects of inheritance in tetraploids on genetic diversity and population divergence. *Heredity* 110, 131–137. <https://doi.org/10.1038/hdy.2012.80>
- Meyer, S.E., Allen, P.S., Beckstead, J., 1997. Seed germination regulation in *Bromus tectorum* (Poaceae) and its ecological significance. *Oikos* 475–485.
- Millennium Ecosystem Assessment Panel, 2005. *Ecosystems and human well-being*. Wash. DC.
- Moles, A.T., Ackerly, D.D., Webb, C.O., Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Westoby, M., 2005. A brief history of seed size. *Science* 307, 576–580.
- Moot, D., Scott, W., Roy, A., Nicholls, A., 2000. Base temperature and thermal time requirements for germination and emergence of temperate pasture species. *N. Z. J. Agric. Res.* 43, 15–25.
- Mora, M.S., Lessa, E.P., Cutrera, A.P., Kittlein, M.J., Vassallo, A.I., 2007. Phylogeographical structure in the subterranean tuco-tuco *Ctenomys talarum* (Rodentia: Ctenomyidae): contrasting the demographic consequences of regional and habitat-specific histories. *Mol. Ecol.* 16, 3453–3465.
- Mora, M.S., Lessa, E.P., Kittlein, M.J., Vassallo, A.I., 2006. Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *J. Mammal.* 87, 1192–1203.
- Mora, M.S., Mapelli, F.J., Gaggiotti, O.E., Kittlein, M.J., Lessa, E.P., 2010. Dispersal and population structure at different spatial scales in the subterranean rodent *Ctenomys australis*. *BMC Genet.* 11, 9.

- Moreno, L., 2012. Variación de los atributos morfo-funcionales de los pastos perennes a lo largo de gradientes de aridez en la Patagonia (Doctoral). Universidad Nacional del Comahue. Centro Regional Universitario Bariloche, Río Negro.
- Moreno, L., Bertiller, M.B., 2015. Phenotypic plasticity of morpho-chemical traits of perennial grasses from contrasting environments of arid Patagonia. *J. Arid Environ.* 116, 96–102.
- Moscoe, L.J., Emshwiller, E., n.d. Diversity of *Oxalis tuberosa* Molina: a comparison between AFLP and microsatellite markers. *Genet. Resour. Crop Evol.* 62, 335–347.
- Murray, B.R., Brown, A., Dickman, C., Crowther, M., 2004. Geographical gradients in seed mass in relation to climate. *J. Biogeogr.* 31, 379–388.
- Muzón, J., Spinelli, G.R., Pessacq, P., Von Ellenrieder, N., Estevez, A.L., Marino, P.I., Pérez Goodwyn, P.J., Angrisano, E.B., Díaz, F., Fernández, L.A., others, 2005. Insectos acuáticos de la meseta del Somuncurá, Patagonia, Argentina. Inventario preliminar. *Rev. Soc. Entomológica Argent.* 64, 47–67.
- Nicora, E., 1978. Gramineae en Flora Patagónica III (Correa 1985). Colección Científica del INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Noy-Meir, I., 1973. Desert ecosystems: environment and producers. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 4, 25–51.
- Nussey, D.H., Postma, E., Gienapp, P., Visser, M.E., 2005. Selection on heritable phenotypic plasticity in a wild bird population. *Science* 310, 304–306.
- O'Connor, T., 1991. Local extinction in perennial grasslands: a life-history approach. *Am. Nat.* 137, 753–773.
- Oddou-Muratorio, S., Petit, R., Le Guerroue, B., Guesnet, D., Demesure, B., 2001. Pollen-versus seed-mediated gene flow in a scattered forest tree species. *Evolution* 55, 1123–1135.
- Oesterheld, M., Aguiar, M.R., Paruelo, J.M., 1998. Ecosistemas patagónicos. *Ecol. Austral* 8, 75–308.
- Oliva, G., Martínez, A., Collantes, M., Dubcovsky, J., 1993. Phenotypic plasticity and contrasting habitat colonization in *Festuca pallescens*. *ResearchGate* 71, 970–977.
- Oliva, Gabriel. ", 1996. Biología de poblaciones de *Festuca gracillima*.
- Orr, H.A., Unckless, R.L., 2008. Population extinction and the genetics of adaptation. *Am. Nat.* 172, 160–169.
- Ospina, J.C., Sylvester, S.P., Sylvester, M.D.P.V., 2016. Multivariate Analysis and Taxonomic Delimitation within the *Festuca setifolia* Complex (Poaceae) and a New Species from the Central Andes. *Syst. Bot.* 41, 727–746. <https://doi.org/10.1600/036364416X692398>
- Ouborg, N.J., Van Treuren, R., 1995. Variation in fitness-related characters among small and large populations of *Salvia pratensis*. *J. Ecol.* 369–380.
- Palazzesi, L., Barreda, V.D., Cuitiño, J.I., Guler, M.V., Tellería, M.C., Ventura Santos, R., 2014. Fossil pollen records indicate that Patagonian desertification was not solely a consequence of Andean uplift. *Nat. Commun.* 5. <https://doi.org/10.1038/ncomms4558>
- Paradis, E., Claude, J., Strimmer, K., 2004. APE: Analyses of Phylogenetics and Evolution in R language. *Bioinformatics* 20, 289–290. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg412>

- Paruelo, J., Bertiller, M., Schlichter, T., Coronato, F., 1993. Secuencias de deterioro en distintos ambientes patagónicos: Su caracterización mediante el modelo de estados y transiciones. Conv. Argent.-Alemania Coop. Ont Técnica INTA-GTZ Lucha Contra Desertificación En Patagon. Tráves Un Sist. Monit. Ecol Ógico LUDEPA-SME.
- Pastorino, M.J., Gallo, L.A., 2002. Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *J. Biogeogr.* 29, 1167–1178.
- Peacock, M.M., Smith, A.T., 1997. The effect of habitat fragmentation on dispersal patterns, mating behavior, and genetic variation in a pika (*Ochotona princeps*) metapopulation. *Oecologia* 112, 524–533.
- Pelliza-Sbriller, A., Bonino, N., Bonvissuto, G., Amaya, J., 1984. Composición botánica de la dieta de herbívoros silvestres y domésticos en el área de Pilcaniyeu (Río Negro). *IDIA* 429, 63–73.
- Pendleton, B., Meyer, S., 2004. Habitat-correlated variation in blackbrush (*Coleogyne ramosissima*: Rosaceae) seed germination response. *J. Arid Environ.* 59, 229–243.
- Perez-Harguindeguy, N., Diaz, S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M., Cornwell, W.K., Craine, J.M., Gurvich, D.E., others, 2013. New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Aust. J. Bot.* 61, 167–234.
- Pfennig, K.S., Kelly, A.L., Pierce, A.A., 2016. Hybridization as a facilitator of species range expansion, in: *Proc. R. Soc. B. The Royal Society*, p. 20161329.
- Pigliucci, M., 2001. Phenotypic plasticity: beyond nature and nurture. JHU Press.
- Polechová, J., Barton, N.H., 2015. Limits to adaptation along environmental gradients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 6401–6406.
- Polzin, T., Daneshmand, S.V., 2001. Improved algorithms for the Steiner problem in networks. *Discrete Appl. Math.* 112, 263–300. [https://doi.org/10.1016/S0166-218X\(00\)00319-X](https://doi.org/10.1016/S0166-218X(00)00319-X)
- Posada, D., 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1253–1256. <https://doi.org/10.1093/molbev/msn083>
- Premoli, A.C., Mathiasen, P., Cristina Acosta, M., Ramos, V.A., 2012. Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be? *New Phytol.* 193, 261–275. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03861.x>
- Price, T.D., Qvarnström, A., Irwin, D.E., 2003. The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 270, 1433–1440.
- Qiu, J., Bai, Y., Fu, Y.-B., Wilmschurst, J.F., 2010. Spatial variation in temperature thresholds during seed germination of remnant *Festuca hallii* populations across the Canadian prairie. *Environ. Exp. Bot.* 67, 479–486. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.09.002>
- Quarín, C.L., Caponio, I., 1995. Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasyleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. *Int. J. Plant Sci.* 156, 232–235.
- Quero, J., 2006. La heterogeneidad en ecología: herramientas de cuantificación y aplicaciones para la restauración. *Acta Granatense* 4, 107–114.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.

- Rabassa, J., Coronato, A., Martínez, O., 2011. Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biol. J. Linn. Soc.* 103, 316–335. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01681.x>
- Ramos, V.A., Ghiglione, M.C., 2008. Tectonic Evolution of the Patagonian Andes, in: Rabassa, J. (Ed.), *Developments in Quaternary Sciences, The Late Cenozoic of Patagonia and Tierra Del Fuego*. Elsevier, pp. 57–71. [https://doi.org/10.1016/S1571-0866\(07\)10004-X](https://doi.org/10.1016/S1571-0866(07)10004-X)
- Ramos, V.A., Ramos, V.A., Ramos, V.A., Ramos, V.A., Ramos, V.A., Ramos, V., Ramos, V., Ramos, V.A., Ramos, V.A., Ramos, V.A., Ramos, V., Ramos, V.A., Ramos, V.A., 1999. Rasgos estructurales del territorio argentino: 1. Evolución Tectónica de la Argentina.
- Raymond, M., Rousset, F., 1995. An exact test for population differentiation. *Evolution* 49, 1280–1283.
- Reynolds, J., Grainger, A., Stafford Smith, D., Bastin, G., Garcia-Barrios, L., Fernández, R., Janssen, M., Jürgens, N., Scholes, R., Veldkamp, A., others, 2011. Scientific concepts for an integrated analysis of desertification. *Land Degrad. Dev.* 22, 166–183.
- Reynolds, J.F., Smith, D.M.S., Lambin, E.F., Turner, B.L., Mortimore, M., Batterbury, S.P.J., Downing, T.E., Dowlatabadi, H., Fernández, R.J., Herrick, J.E., Huber-Sannwald, E., Jiang, H., Leemans, R., Lynam, T., Maestre, F.T., Ayarza, M., Walker, B., 2007. Global desertification: building a science for dryland development. *Science* 316, 847–851. <https://doi.org/10.1126/science.1131634>
- Reynolds, J.F., Stafford Smith, M., 2002. *Global desertification: do humans cause deserts?* Berlin, Dahlem University Press.
- Rieseberg, L.H., Soltis, D., others, 1991. Phylogenetic consequences of cytoplasmic gene flow in plants. *Evolutionary Trends in Plants*.
- Roig, F., Anchorena, J., Dollenz, O., Faggi, A., Méndez, E., 1985. Las comunidades vegetales de la transecta botánica de la Patagonia Austral. *Transecta Botánica Patagon. Austral* 350, 733.
- Romo, J., Grilz, P., Bubar, C., Young, J., 1991. Influences of temperature and water stress on germination of plains rough fescue. *J. Range Manag.* 75–81.
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D.L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M.A., Huelsenbeck, J.P., 2012. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst. Biol.* 61, 539–542.
- Rotundo, J., 2001. Estudios poblacionales de *Poa ligularis*: una gramínea de zonas áridas amenazada por sobrepastoreo. (Doctoral). Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.
- Rotundo, J.L., Aguiar, M.R., Benech-Arnold, R., 2015. Understanding erratic seedling emergence in perennial grasses using physiological models and field experimentation. *Plant Ecol.* 216, 143–156.
- Rusticucci, M., Barrucand, M., 2004. Observed trends and changes in temperature extremes over Argentina. *J. Clim.* 17, 4099–4107.
- Santibáñez-Andrade, G., Castillo-Argüero, S., Zavala-Hurtado, J.A., Martínez Orea, Y., Hernández Apolinar, M., 2009. La heterogeneidad ambiental en un matorral xerófilo. *Bol. Soc. Botánica México* 71–79.
- Scheiner, S.M., 1993. Genetics and evolution of phenotypic plasticity. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 24, 35–68.

- Schlesinger, W.H., Reynolds, J.F., Cunningham, G.L., Huenneke, L.F., Jarrell, W.M., Virginia, R.A., Whitford, W.G., others, 1990. Biological feedbacks in global desertification. *Science*(Washington) 247, 1043–1048.
- Schuster, I., Vieira, E.S.N., Silva, G.J. da, Franco, F. de A., Marchioro, V.S., 2009. Genetic variability in Brazilian wheat cultivars assessed by microsatellite markers. *Genet. Mol. Biol.* 32, 557–563. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572009005000045>
- Seehausen, O., 2013. Conditions when hybridization might predispose populations for adaptive radiation. *J. Evol. Biol.* 26, 279–281. <https://doi.org/10.1111/jeb.12026>
- Seehausen, O., 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 19, 198–207.
- Sharifiamina, S., Moot, D., Bloomberg, M., n.d. Calculating “Hydrothermal time” to quantify seed germination of tall fescue.
- Siffredi, G., Gaitán, J., López, C., Ayesa, J., 2005. Guía de recomendación de carga animal para mallines. INTA EEA Bariloche Cent. Reg. Patagon. Norte.
- Silvertown, J., 2008. The Evolutionary Maintenance of Sexual Reproduction: Evidence from the Ecological Distribution of Asexual Reproduction in Clonal Plants. *Int. J. Plant Sci.* 169, 157–168. <https://doi.org/10.1086/523357>
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature*.
- Simpson, G.G., 1955. Major features of evolution. Columbia University Press: New York.
- Singh, B., Singh, G., 2006. Effects of controlled irrigation on water potential, nitrogen uptake and biomass production in *Dalbergia sissoo* seedlings. *Environ. Exp. Bot.* 55, 209–219.
- Singh-Sangwan, N., Abad Farooqi, A., Singh Sangwan, R., 1994. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New Phytol.* 128, 173–179.
- Slatkin, M., Excoffier, L., 2012. Serial founder effects during range expansion: a spatial analog of genetic drift. *Genetics* 191, 171–181.
- Somlo, R., Durañona, C., Ortiz, R., 1985. Valor nutritivo de especies forrajeras patagónicas. *Rev. Argent. Prod. Anim.* 5, 589–605.
- Soriano, A., Sala, O.E., Perelman, S.B., 1994. Patch structure and dynamics in a Patagonian arid steppe. *Plant Ecol.* 111, 127–135.
- Stroud, J.T., Losos, J.B., 2016. Ecological opportunity and adaptive radiation. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 47.
- Stucky, B.J., 2012. SeqTrace: A Graphical Tool for Rapidly Processing DNA Sequencing Chromatograms. *J. Biomol. Tech. JBT* 23, 90–93. <https://doi.org/10.7171/jbt.12-2303-004>
- Swofford, D., 2002. PAUP*: phylogenetic analysis using parsimony (* and other methods). Sunderland, MA. Sinauer Associates.
- Taberlet, P., Gielly, L., Pautou, G., Bouvet, J., 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.* 17, 1105–1109. <https://doi.org/10.1007/BF00037152>
- Tate, J.A., Soltis, D.E., Soltis, P.S., 2005. Polyploidy in plants. *Evol. Genome* 371, 414.

- te Beest, M., Le Roux, J.J., Richardson, D.M., Brysting, A.K., Suda, J., Kubešová, M., Pyšek, P., 2011. The more the better? The role of polyploidy in facilitating plant invasions. *Ann. Bot.* 109, 19–45.
- Thomas, C.D., Kunin, W.E., 1999. The spatial structure of populations. *J. Anim. Ecol.* 68, 647–657.
- Thomas, H., Humphreys, M.O., 1991. Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *J. Agric. Sci.* 117, 1–8. <https://doi.org/10.1017/S0021859600078916>
- Thompson, J.D., Gaudeul, M., Debussche, M., 2010. Conservation Value of Sites of Hybridization in Peripheral Populations of Rare Plant Species. *Conserv. Biol.* 24, 236–245. <https://doi.org/10.1111/j.1523-1739.2009.01304.x>
- Thorpe, P.H., Gonzalez-Barrera, S., Rothstein, R., 2007. More is not always better: the genetic constraints of polyploidy. *Trends Genet.* 23, 263–266.
- Tongway, D.J., Cortina, J., Maestre, F.T., 2004. Heterogeneidad espacial y gestión de medios semiáridos. *Rev. Ecosistemas* 13.
- Torrecilla, P., Pez-Rodríguez, J.-A.L., N, P.C., 2003. Phylogenetic relationships of *Vulpia* and related genera (Poeae, Poaceae) based on analysis of ITS and trnL-F sequences. *Ann Mo Bot Gard. ResearchGate* 91.
- Torrecilla, P., Rodríguez, J.A.L., Stancik, D., Catalán, P., 2003. Systematics of *Festuca*. *Plant Syst. Evol.* 239, 113–139. <https://doi.org/10.1007/s00606-002-0265-2>
- Treuren, R. van, Bijlsma, R., Delden, W. van, Ouborg, N.J., 1991. The significance of genetic erosion in the process of extinction. I. Genetic differentiation in *Salvia pratensis* and *Scabiosa columbaria* in relation to population size. *Heredity* 66, 181. <https://doi.org/10.1038/hdy.1991.23>
- Trudgill, D., Honek, A., Li, D., Straalen, N.V., 2005. Thermal time—concepts and utility. *Ann. Appl. Biol.* 146, 1–14.
- Turchetto-Zolet, A., Pinheiro, F., Salgueiro, F., Palma-Silva, C., 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* 22, 1193–1213.
- Tyukmaeva, V.I., Salminen, T.S., Kankare, M., Knott, K.E., Hoikkala, A., 2011. Adaptation to a seasonally varying environment: a strong latitudinal cline in reproductive diapause combined with high gene flow in *Drosophila montana*. *Ecol. Evol.* 1, 160–168.
- Ustarroz, D., Kruk, B., Satorre, E., Ghersa, C., 2016. Dormancy, germination and emergence of *Urochloa panicoides* regulated by temperature. *Weed Res.* 56, 59–68.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Resour.* 4, 535–538.
- Varshney, R.K., Graner, A., Sorrells, M.E., 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *TRENDS Biotechnol.* 23, 48–55.
- Venable, D.L., Brown, J.S., 1988. The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptations for reducing risk in variable environments. *Am. Nat.* 131, 360–384.
- Villagra, P.E., Giordano, C., Alvarez, J.A., Bruno Cavagnaro, J., Guevara, A., Sartor, C., Passera, C.B., Greco, S., 2011. Ser planta en el desierto: estrategias de uso de agua y resistencia al estrés hídrico en el Monte Central de Argentina. *Ecol. Austral* 21, 29–42.

- Villalba, R., Lara, A., Boninsegna, J.A., Masiokas, M., Delgado, S., Aravena, J.C., Roig, F.A., Schmelter, A., Wolodarsky, A., Ripalta, A., 2003. Large-scale temperature changes across the southern Andes: 20th-century variations in the context of the past 400 years. *Clim. Change* 59, 177–232.
- Villellas, J., Ehrlén, J., Olesen, J.M., Braza, R., García, M.B., 2013. Plant performance in central and northern peripheral populations of the widespread *Plantago coronopus*. *Ecography* 36, 136–145.
- Welles, S.R., Ellstrand, N.C., 2016. Genetic structure reveals a history of multiple independent origins followed by admixture in the allopolyploid weed *Salsola ryanii*. *Evol. Appl.* 9, 871–878.
- Whitford, W.G., 2002. *Ecology of desert systems*. Academic Press.
- Whitlock, M.C., 2011. G'ST and D do not replace FST. *Mol. Ecol.* 20, 1083–1091.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04996.x>
- Worthington Wilmer, J., Elkin, C., Wilcox, C., Murray, L., Niejalke, D., Possingham, H., 2008. The influence of multiple dispersal mechanisms and landscape structure on population clustering and connectivity in fragmented artesian spring snail populations. *Mol. Ecol.* 17, 3733–3751.
- Wright, S., Keeling, J., Gillman, L., 2006. The road from Santa Rosalia: a faster tempo of evolution in tropical climates. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103, 7718–7722.
- Yahdjian, L., Sala, O.E., 2006. Vegetation structure constrains primary production response to water availability in the Patagonian steppe. *Ecology* 87, 952–962.
- Zárate, M.A., Tripaldi, A., 2012. The aeolian system of central Argentina. *Aeolian Res.*, The 7th International Conference on Aeolian Research (ICAR VII), Santa Rosa, Argentina 3, 401–417.
<https://doi.org/10.1016/j.aeolia.2011.08.002>
- Zhang, C., Zhang, J., Fan, Y., Sun, M., Wu, W., Zhao, W., Yang, X., Huang, L., Peng, Y., Ma, X., others, 2017. Genetic structure and eco-geographical differentiation of wild sheep *Festuca ovina* L.) in Xinjiang, Northwest China. *Molecules* 22, 1316.
- Zhivotovsky, L.A., Feldman, M.W., Bergman, A., 1996. On the evolution of phenotypic plasticity in a spatially heterogeneous environment. *Evolution* 50, 547–558.

ANEXO

Protocolo de Extracción de ADN total en microtubo (Adaptado de Doyle & Doyle (1990) por Dumolin et al. 1995)

Material vegetal:

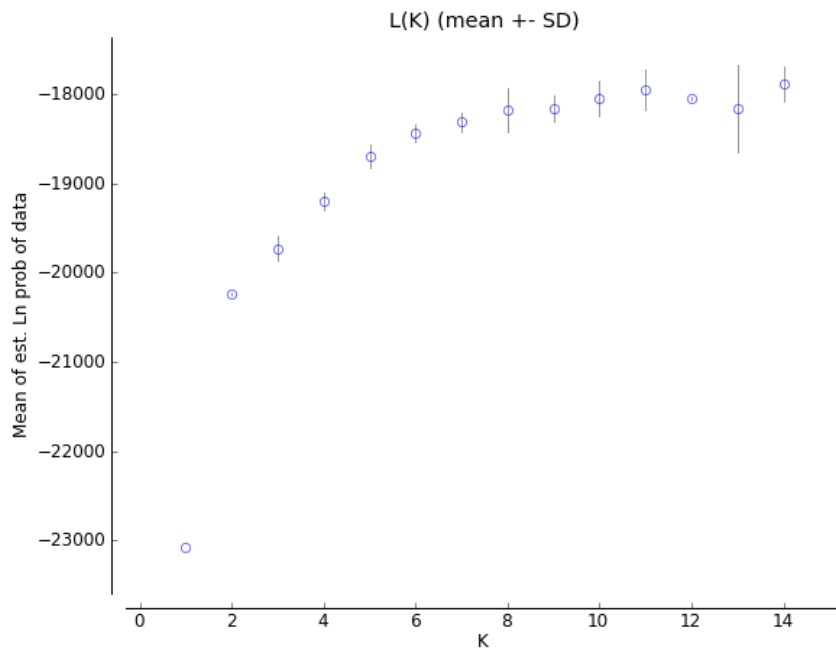
Hojas: 2.3 cm de hojas preferentemente frescas, cortadas e pequeños trozos.

Colocar el material en microtubos de 1,5 o 2 ml y congelar con nitrógeno líquido.

Extracción:

1. Precalentar el baño térmico a 65 °C. Por otro lado, colocar el isopropanol en el freezer hasta el momento de su uso.
2. Preparar la cantidad necesaria de buffer de extracción, se utiliza 1 ml por muestra. El buffer se prepara a partir de 0,1 % de 2-mercaptoetanol y 1% de PVP 40000 soluble.
3. Pre-calentar el buffer de extracción a 65°C.
4. Homogeneizar el tejido obteniendo un polvo con nitrógeno líquido mediante un homogeneizador eléctrico (Mixer Mill, Resch). Luego se agrega 1 ml de buffer de extracción y se agita activamente.
5. Incubar las muestras en el baño térmico con agitación por una hora a 65°C. Retirarlas y dejarlas enfriar durante 10 minutos.
6. Agregar 400ul de diclorometano a cada tubo y mezclar suavemente hasta obtener una emulsión.
7. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm (4°C). Recuperar el sobrenadante en un nuevo tubo, sin pipetear la interfase. Si el sobrenadante no es claro, repetir este paso.
8. Agregar 400ul o (2/3 del volumen) de isopropanol y mezclar suavemente. Si el pellet de ADN no aparece, colocar los tubos a -20°C durante 30 minutos.
9. Centrifugar 10 minutos a 13000 rpm (4°C). Remover el sobrenadante y dejar secar los tubos 15 minutos sobre papel de filtro.
10. Agregar 1ml de etanol 76%, mezclar y centrifugar 10 minutos a 13000 rpm (4°C). Remover el sobrenadante cuidadosamente y secar los tubos durante 30 minutos a 1 hora sobre papel de filtro.
11. Agregar 50 ul de buffer 1x TE con RNAsa (2ul/ml se solución stock: 10mg/ml).
12. Estimar cantidad de ADN.

a)



b)

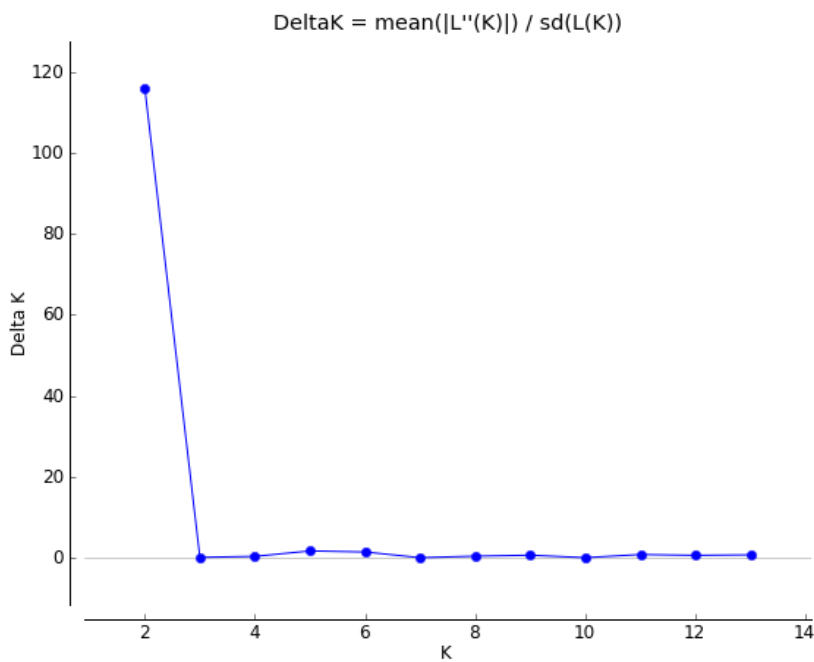


Figura S2.1: a) Relación entre la verosimilitud del modelo Ln (p) y el número de agrupamientos genéticos (K) obtenidos a partir del STRUCTURE a partir de la base de datos codominantes. En la figura se muestran 10 corridas diferentes para cada valor de K. Los círculos azules muestran los valores medios de verosimilitud para cada valor de K y las barras indican los desvíos estándar. **b)** Estimación del número de agrupamientos mediante el método de Evanno et al. (2005) a partir del cálculo de estadístico ΔK (ver explicación en Materiales y Métodos) basados en la base de datos codominantes.

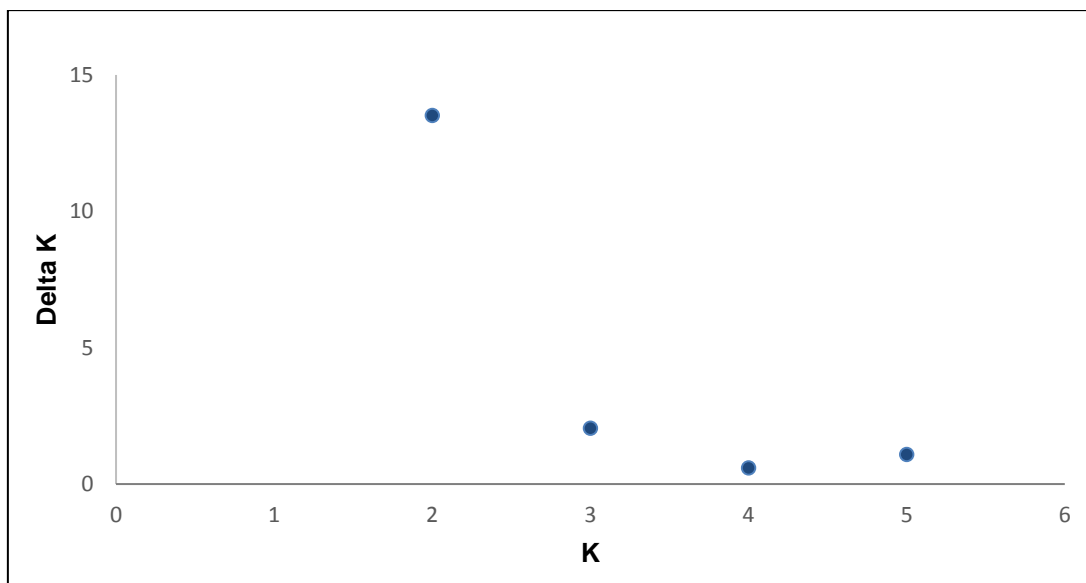
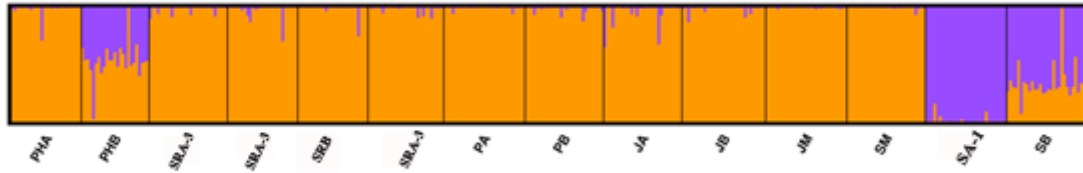
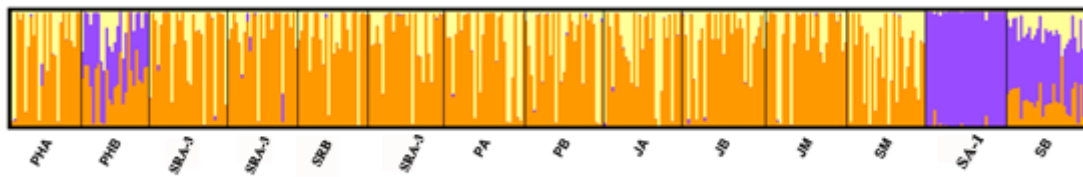


Figura S2.2: Determinación del K óptimo a partir de del delta K calculado con el método de Evanno et al (2004) a partir del método no jerárquico de k- medias implementado por Arrigo et al (2010).

a)



b)



c)

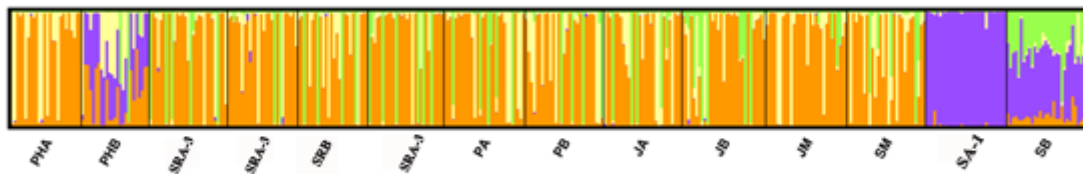
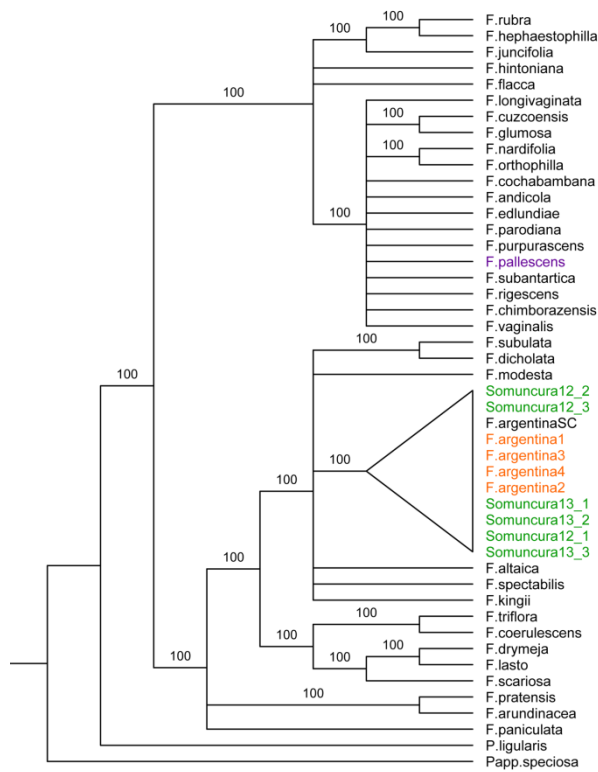


Figura S2.3: Asignación de grupos genéticos a las poblaciones de *Festuca pallescens* a partir de la matrix dedatos co-dominantes. a) Cuando $k = 2$, la poblaciones PHB presentó valores intermedios de asignación media para cada grupo genético ($Q = 0,5$). SB, a diferencia de los resultados anteriores, disminuyó su nivel de asignación media al segundo grupo genético ($Q = 0,6$) pero SA mantuvo el mismo nivel de asignación media al segundo grupo genético. b) Con la presencia de un tercer grupo genético ($K = 3$), los niveles de asignación disminuyen aún más y las poblaciones PHB y SB se asemejan más genéticamente. c) Cuando $K=4$, los niveles de asignación siguen disminuyendo, y las poblaciones PHB y SB se siguen asemejando.

a)



b)

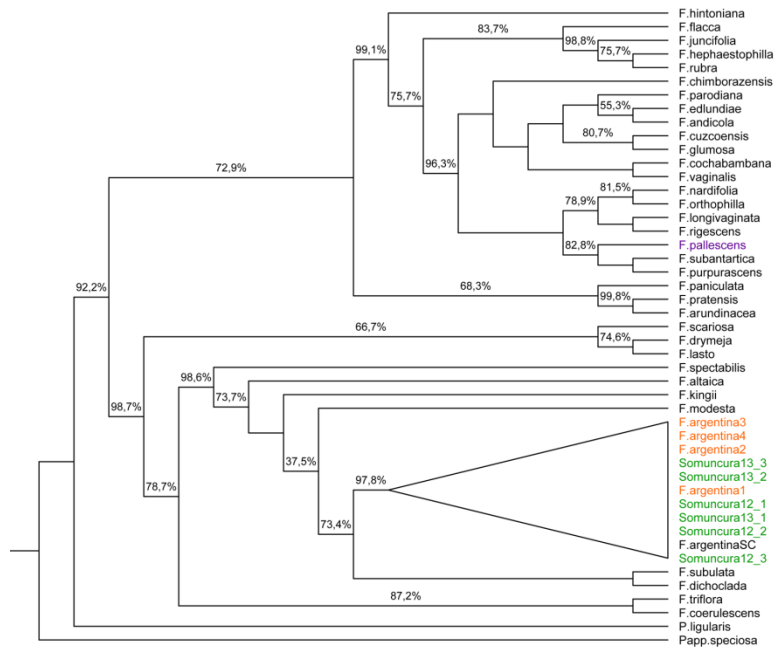
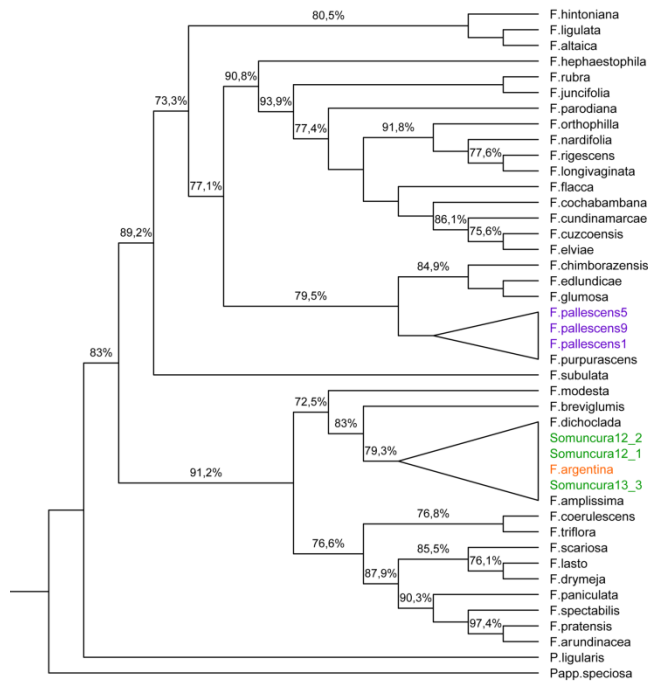


Figura S2.4: Árboles filogenéticos construidos a partir de los análisis de Máxima Parsimonia (a) y Likelihood (b) basados en el marcador nuclear (región ITS). a) Arbol del 50% de la mayoría basado en el análisis de Máxima parsimonia (CI=0.642 RI=0.842). b) Árbol filogenético obtenido por el programa phyML. Los valores de bootstrapping se encuentran en cada rama del árbol. *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* y *Poa ligularis* constituyen los grupos externos. Los taxa evaluados están coloreados en violeta (*F. pallescens*), verde (Somuncura) y naranja (*F. argentina*).

a)



b)

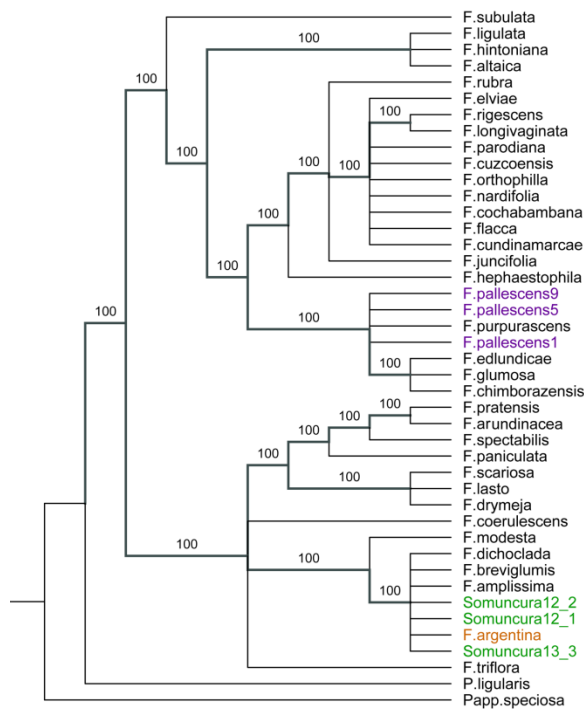


Figura S2.5: Árboles filogenéticos de Máxima parsimonia (a) y máxima verosimilitud (b) basados en marcador del cloroplasto (*trnL-F*). a) Arbol del 50% de la mayoría basado en el análisis de Máxima parsimonia (CI=0.642 RI=0.842). b) Árbol filogenético obtenido por el programa phyML. Los valores de bootstrapping se encuentran en cada rama del árbol. *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* y *Poa ligularis* constituyen los grupos externos. Los taxa evaluados están coloreados en violeta (*F. pallescens*), verde (*Somuncura*) y naranja (*F. argentina*).

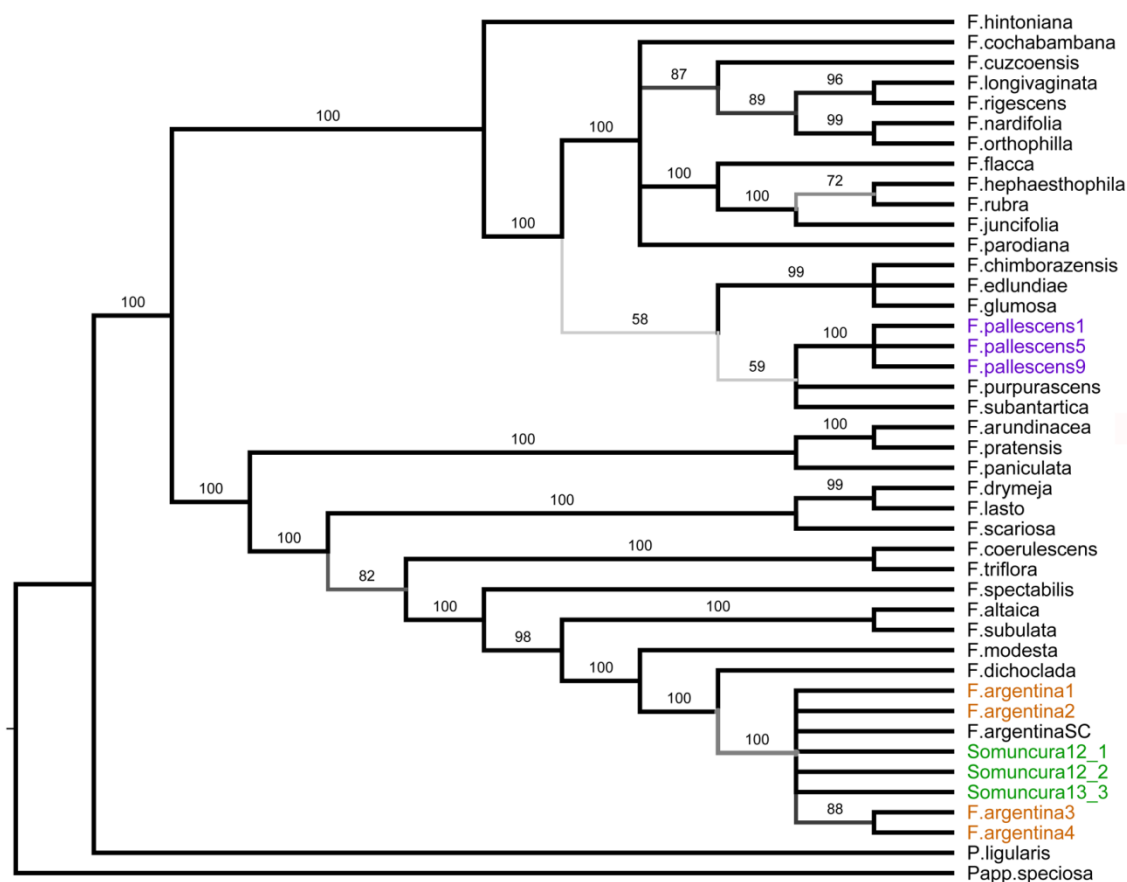


Figura S2.5: Árbol filogenético del 50% de la mayoría basado en análisis bayesianos de la matriz de datos concatenados de ambos marcadores moleculares (ITS/*trnL*-F). Cada rama del árbol contiene los valores de la probabilidad posterior. *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* y *Poa ligularis* constituyen los grupos externos. Los taxa evaluados están coloreados en violeta (*F. pallescens*), verde (Somuncura) y naranja (*F. argentina*).

TablaS2.1: Condiciones de amplificación para los SSRs transferidos a *Festuca pallescens*.

CONDICIONES PCR										
	SSRs				EST-SSRs					
MIX:	HVM4	B1-B6	B1C9	Poa402	CNL127	KSUM157	CWM311	FA60A0 6LF037	FA44D0 9RT074	CWM361
					x1					
	Ci				Vi			Cf (en la PCR)		
H ₂ O	-				7,75 ul			-		
Buffer	5x				3 ul			1x		
MgCl ₂	-				-			-		
dNTPs	5mM				0,75ul			0,1mM		
Primer F	2uM				0,75ul			0,02 uM		
Primer R	2uM				0,75ul			0,02 uM		
BSA	-				-			-		
Taq(1,5 mM Mg ⁺²)	5 U/ul				0,15ul			0,05 U/ul		
ADN					2ul					
VOL FINAL					15 ul					
SSRs										
MIX:	M4-213			LPSSRH01A02			H01A07			
	x1			x1			x1			
	Ci	Vi	Cf (en la PCR)	Ci	Vi	Cf (en la PCR)	Ci	Vi	Cf (en la PCR)	
H ₂ O		7,6ul			7,45ul			6,7ul		
Buffer	5x	3 ul	1x	5x	3 ul	1x	5x	3	1x	
MgCl ₂	50Mm	0,15 ul	0,5mM	50Mm	0,3 ul	1mM	50Mm	0,3	1mM	
dNTPs	5mM	0,75ul	0,1mM	5mM	0,6 ul	0,2mM	5mM	0,6	0,2mM	
Primer F	2uM	0,75ul	0,02 uM	2uM	1,5 ul	0,2 uM	2uM	0,75	0,2 uM	
Primer R	2uM	0,75ul	0,02 uM	2uM	1,5 ul	0,2 uM	2uM	0,75	0,2 uM	
BSA	-		0,15ul			0,15				
Taq(1,5 mM Mg ⁺²)	5 U/ul	0,15ul	0,05 U/ul	5 U/ul	0,25	0,083 U/ul	5 U/ul	0,75	0,25 U/ul	
ADN	2ul			2ul			2ul			
VOL FINAL	15ul			15ul			15ul			

Referencias: Ci: concentración inicial, Cf: concentración final, Vi: volumen inicial, Vf: volumen final.

Tabla S2.2: Condiciones de amplificación en el termociclador para los microsatélites transferidos a *Festuca pallescens*.

Programa	Ciclos	Temperatura	Tiempo	Cantidad de ciclos	Marcador Molecular	Temperatura de anclaje
65-55 °C touch down 2,30 HS	1	94 °c	∞		B1-B6	55°C
	2	94 °C	3 ´		B1-C9	54°C
	3	94 °C	30 ´´	x 10		
		65 -1°C x ciclo	30 ´´		FAGOA06LF037	55-62°C
		72°C	30 ´´			
	4	94°C	30 ´´	x 30	HVM4	55°C
		55°C	30 ´´			
		72°C	30 ´´		CML127	55°C
	5	72°C	15 ´			
	6	12°C	∞		KSUM157	55°C
65-55 °C touch down con hot start 2,30HS	1	94 °c	∞		H01 A07	51°C
	2	94 °C	3 ´			
	3	94 °C	30 ´´	x 10		
		65 -1°C x ciclo	30 ´´			
		72°C	30 ´´			
	4	94°C	30 ´´	x 30		
		55°C	30 ´´			
		72°C	30 ´´			
	5	72°C	15 ´			
	6	12°C	∞			
62-54 °C GTE 2,30HS	1	94 °C	∞		CWM311	61,4°C
	2	94 °C	5 ´			
	3	94 °C	45 ´´	x 30	Poa402	54,5°C
		62 a 54°C	1 ´			
		72°C	30 ´´			
	4	94°C	45 ´´	x 15		
		54°C	45 ´´			
		72°C	45 ´´			
	5	72°C	7 ´			
	6	12°C	∞			

63-51 °C touch down	1	94 °c	∞		M4-213	51°C
	2	94 °C	4 ´			
	3	94 °C	1 ´	x 20		
	2,45HS	63 -0,5°C x ciclo	1 ´			
		72°C	1 ´			
		94°C	1 ´	x 15		
		55°C	1 ´			
		72°C	1 ´			
		72°C	15 ´			
		4°C	∞			
51 °C touch down	1	94 °c	∞		H01A02	51°C
	2	94 °C	3 ´		(LPSSRH01A02)	
	3	94 °C	30 ´´	x 35		
	2HS	65-55°C	30 ´´			
		72°C	30 ´´			
		72°C	15 ´			
	5	12°C	∞			

Table S2.3 SSRs Genotypes. List of genotypes of the three species used to obtain the PCoA.

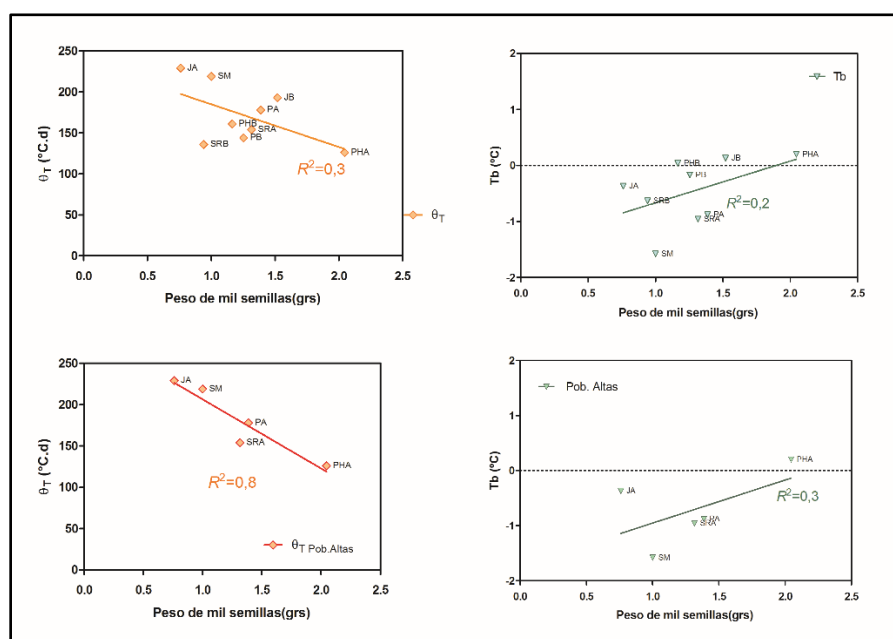
Sample Name	Marker	Allele1	Allele2	Allele3	Allele4	Allele5	Allele6
Farg1	Fo74	232	257	264			
Farg2	Fo74	232	264				
Farg3	Fo74	232					
Farg4	Fo74	232	264				
JA_20	Fo74	235	250				
PHA_25	Fo74	235	247				
SR1_6	Fo74	235	250				
JB_28	Fo74	235	250				
PHB_12	Fo74	235	247	250			
SR4_13	Fo74	235	250				
PA_25	Fo74	235	250				
JM_12	Fo74	235	250				
PB_25	Fo74	235	250				
SM_8	Fo74	235	250				
SR1_2	Fo74	235	250				
SR2_17	Fo74	235	250				
SA_1	Fo74	235					
SA_2	Fo74	235					
SA_3	Fo74	235	250				
SA_20	Fo74	235					
SA_14	Fo74	235					
SB_1	Fo74	235					
SB_2	Fo74	232	235				
SB_3	Fo74	232	235				
SB_19	Fo74	235					
SB_32	Fo74	235	235				
Farg1	CML127	437	452	458	470		
Farg2	CML127	437	452	458	470		
Farg3	CML127	437	470	470	470		
Farg4	CML127	437	452	458	470		
JA_20	CML127	419	461	467			
PHA_25	CML127	419	461	467			
SR1_6	CML127	419	461	467			
JB_28	CML127	419	461	467			
PHB_12	CML127	419	461	467			
SR4_13	CML127	419	461	467			
PA_25	CML127	419	461	467			
JM_12	CML127	419	461	461			
PB_25	CML127	419	461	467			
SM_8	CML127	419	461	467			
SR1_2	CML127	419	461	467			
SR2_17	CML127	419	461	467			
SA_1	CML127	437	470				
SA_2	CML127	437	470				

SA_3	CML127	437	470			
SA_20	CML127	437	470			
SA_14	CML127	437	470			
SB_1	CML127	437	470			
SB_2	CML127	437	470			
SB_3	CML127	437	470			
SB_19	CML127	437	470			
SB_32	CML127	437	470			
Farg1	B1C9	200	214	228	228	
Farg2	B1C9	200	212	216	216	
Farg3	B1C9	-9				
Farg4	B1C9	200	204	210	216	
JA_20	B1C9	192	204	204		
PHA_25	B1C9	192	204	206		
SR1_6	B1C9	192	204	216		
JB_28	B1C9	192	206	206		
PHB_12	B1C9	188	192	198	204	206
SR4_13	B1C9	188	192	204		
PA_25	B1C9	192	204			
JM_12	B1C9	192	206			
PB_25	B1C9	192	204	206		
SM_8	B1C9	192	206	214		
SR1_2	B1C9	188	192	204	206	214
SR2_17	B1C9	192	206			
SA_1	B1C9	200	204	212		
SA_2	B1C9	200	210	214		
SA_3	B1C9	204	212	214		
SA_20	B1C9	200	204	210		
SA_14	B1C9	198	200	204		
SB_1	B1C9	200	202			
SB_2	B1C9	200	204	216		
SB_3	B1C9	198	210	214	216	
SB_19	B1C9	200	216			
SB_32	B1C9	200	204			
Farg1	KSUM157	165	168			
Farg2	KSUM157	165	168			
Farg3	KSUM157	-9				
Farg4	KSUM157	165	168			
JA_20	KSUM157	165				
PHA_25	KSUM157	165	168			
SR1_6	KSUM157	156	168			
JB_28	KSUM157	165	168			
PHB_12	KSUM157	156	165			
SR4_13	KSUM157	165	168			
PA_25	KSUM157	168	171			
JM_12	KSUM157	165	165			

PB_25	KSUM157	156	165			
SM_8	KSUM157	165	168			
SR1_2	KSUM157	156	165			
SR2_17	KSUM157	165	165			
SA_1	KSUM157	136	153	168		
SA_2	KSUM157	136	168			
SA_3	KSUM157	136				
SA_20	KSUM157	136	168			
SA_14	KSUM157	136	153			
SB_1	KSUM157	136	153	165		
SB_2	KSUM157	136	153	165	168	
SB_3	KSUM157	136	153	165		
SB_19	KSUM157	136	165	168		
SB_32	KSUM157	136	165	168		
Farg1	BIB6	292	296			
Farg2	BIB6	292	296			
Farg3	BIB6	292	296			
Farg4	BIB6	282	292	296	298	
JA_20	BIB6	282	288	304		
PHA_25	BIB6	282	288	292	308	
SR1_6	BIB6	288	306			
JB_28	BIB6	282	288	292	306	
PHB_12	BIB6	290	292	298		
SR4_13	BIB6	282	288	292	306	344
PA_25	BIB6	282	288	302		
JM_12	BIB6	282	286	288	306	
PB_25	BIB6	282	288	304	314	
SM_8	BIB6	282	288	294	304	306
SR1_2	BIB6	282	288	306	308	
SR2_17	BIB6	282	288	306	310	
SA_1	BIB6	292	296	298		
SA_2	BIB6	290	296			
SA_3	BIB6	290	292	296	300	
SA_20	BIB6	292	296	298		
SA_14	BIB6	292	296	298		
SB_1	BIB6	282	288	292	306	362
SB_2	BIB6	282	288	306	358	
SB_3	BIB6	282	288	308	310	
SB_19	BIB6	282	288	292	294	306
SB_32	BIB6	282	288	292	308	346
Farg1	HVM4	179	185			
Farg2	HVM4	179	185			
Farg3	HVM4	179	185			
Farg4	HVM4	179	185			
JA_20	HVM4	181	185			
PHA_25	HVM4	181	185			

SR1_6	HVM4	181	185
JB_28	HVM4	181	185
PHB_12	HVM4	181	185
SR4_13	HVM4	181	185
PA_25	HVM4	181	185
JM_12	HVM4	179	181
PB_25	HVM4	181	185
SM_8	HVM4	181	185
SR1_2	HVM4	181	185
SR2_17	HVM4	181	185
SA_1	HVM4	179	185
SA_2	HVM4	179	185
SA_3	HVM4	179	185
SA_20	HVM4	179	185
SA_14	HVM4	179	185
SB_1	HVM4	181	185
SB_2	HVM4	181	185
SB_3	HVM4	181	185
SB_19	HVM4	181	185
SB_32	HVM4	181	185
Farg1	M4-213	160	
Farg2	M4-213	160	
Farg3	M4-213	160	
Farg4	M4-213	160	
JA_20	M4-213	154	
PHA_25	M4-213	154	
SR1_6	M4-213	154	
JB_28	M4-213	154	
PHB_12	M4-213	152	160
SR4_13	M4-213	-9	
PA_25	M4-213	-9	
JM_12	M4-213	154	
PB_25	M4-213	154	160
SM_8	M4-213	154	
SR1_2	M4-213	154	
SR2_17	M4-213	154	
SA_1	M4-213	154	160
SA_2	M4-213	154	160
SA_3	M4-213	160	
SA_20	M4-213	160	
SA_14	M4-213	154	160
SB_1	M4-213	154	
SB_2	M4-213	154	
SB_3	M4-213	154	
SB_19	M4-213	154	
SB_32	M4-213	154	

Farg1	F037	-9	
Farg2	F037	-9	
Farg3	F037	-9	
Farg4	F037	-9	
JA_20	F037	255	
PHA_25	F037	255	
SR1_6	F037	247	255
JB_28	F037	-9	
PHB_12	F037	255	
SR4_13	F037	255	
PA_25	F037	255	
JM_12	F037	-9	
PB_25	F037	255	
SM_8	F037	255	
SR1_2	F037	255	
SR2_17	F037	255	
SA_1	F037	255	
SA_2	F037	255	
SA_3	F037	247	
SA_20	F037	255	
SA_14	F037	247	
SB_1	F037	-9	
SB_2	F037	-9	
SB_3	F037	-9	
SB_19	F037	-9	
SB_32	F037	-9	



FiguraS3.1: Relación entre el peso de mil semillas y el θ_T y T_b en las poblaciones de *Festuca pallescens*.

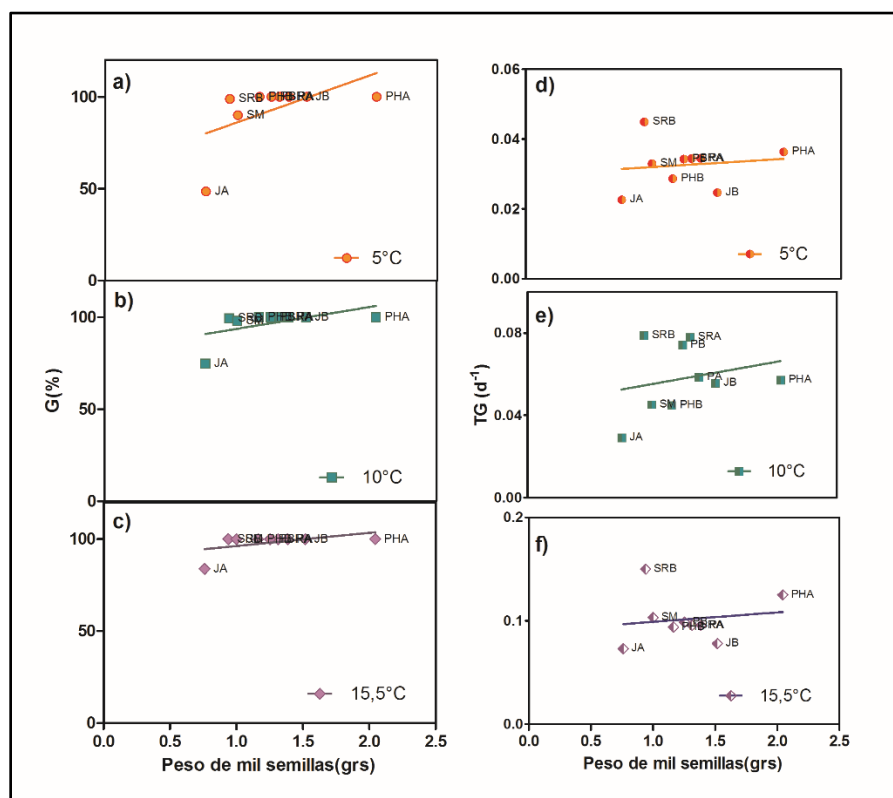


Figura S3.2: Relación entre el peso de mil semillas el porcentaje y tasa de germinación

Figura S4.1: a) Diferencias en la distribución de la biomasa entre los tres niveles de disponibilidad de agua.

TESTIGO

Análisis de la varianza

tratamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	R/S	57	0,25	0,09	36,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		1,79	10	0,18	1,57	0,1463
Momento		0,60	1	0,60	5,21	0,0271
Pob	1,16	9	0,13	1,12	0,3659	
Error	5,25	46	0,11			
Total	7,05	56				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,18025

Error: 0,1142 gl: 46

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,82 29	0,06 A
Inicial	1,03 28	0,06 B

PULSOS

Análisis de la varianza

tratamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	R/S	57	0,09	0,00	48,78

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,85	10	0,08	0,43
Momento		0,34	1	0,34	1,72
Pob	0,48	9	0,05	0,27	0,9794
Error	9,02	46	0,20		
Total	9,87	56			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23615

Error: 0,1961 gl: 46

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,83 29	0,08 A
Inicial	0,99 28	0,08 A

SIN RIEGO

Análisis de la varianza

tratamiento	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
t2	R/S	57	0,14	0,00	47,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		1,67	10	0,17	0,76	0,6678
Momento		0,10	1	0,10	0,48	0,4936
Pob	1,55	9	0,17	0,78	0,6342	
Error	10,12	46	0,22			
Total	11,79	56				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,25019

Error: 0,2201 gl: 46

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,94 29	0,09 A
Inicial	1,03 28	0,09 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Figura S4.2: Análisis de la varianza para la distribución de la biomasa para cada población al inicio y al final de cada nivel de disponibilidad de agua.

TESTIGO:

POBLACIÓN JA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	JA	R/S	5	0,08	0,00	22,00

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		0,01	1	0,01	0,25	0,6535
Momento		0,01	1	0,01	0,25	0,6535
Error	0,07	3	0,02			
Total	0,08	4				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,45623

Error: 0,0247 gl: 3

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,69 3	0,09 A
Inicial	0,76 2	0,11 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN JA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	JB	R/S	6	0,76	0,70	12,80

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		0,17	1	0,17	12,59	0,0238
Momento		0,17	1	0,17	12,59	0,0238
Error	0,05	4	0,01			
Total	0,23	5				

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26526

Error: 0,0137 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,74 3	0,07 A
Inicial	1,08 3	0,07 B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	PA	R/S	6	0,05	0,00	68,24

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		0,08	1	0,08	0,21	0,6723
Momento		0,08	1	0,08	0,21	0,6723
Error	1,46	4	0,37			

Total	1,54	5
-------	------	---

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,37069

Error: 0,3656 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,77	3	0,35 A
Inicial	1,00	3	0,35 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	PB	R/S	4	0,38	0,07	12,61

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,01	1	0,01	1,23 0,3834
Momento		0,01	1	0,01	1,23 0,3834
Error	0,02	2	0,01		
Total	0,04	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,47165

Error: 0,0120 gl: 2

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,81	2	0,08 A
Inicial	0,93	2	0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PHA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
c	PHA	R/S	6	0,22	0,02	21,41

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,04	1	0,04	1,11 0,3516
Momento		0,04	1	0,04	1,11 0,3516
Error	0,13	4	0,03		
Total	0,16	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,40531

Error: 0,0320 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,76	3	0,10 A
Inicial	0,91	3	0,10 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PHB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
c	PHB	R/S	6	0,17	0,00	27,50

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
------	----	----	----	---	---------

Modelo.	0,07	1	0,07	0,79	0,4234
Momento	0,07	1	0,07	0,79	0,4234
Error	0,33	4	0,08		
Total	0,40	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,65311

Error: 0,0830 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,94	3	0,17 A
Inicial	1,15	3	0,17 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	SA	R/S	6	0,02	0,00	26,86

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	1	0,01	0,10	0,7685
Momento	0,01	1	0,01	0,10	0,7685
Error	0,21	4	0,05		
Total	0,22	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,51946

Error: 0,0525 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,82	3	0,13 A
Inicial	0,88	3	0,13 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	SB	R/S	6	0,24	0,05	57,07

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,67	1	0,67	1,27	0,3229
Momento	0,67	1	0,67	1,27	0,3229
Error	2,12	4	0,53		
Total	2,79	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,65097

Error: 0,5304 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,94	3	0,42 A
Inicial	1,61	3	0,42 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SRB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	SRB	R/S	6	0,01	0,00	28,11

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,7E-03	1	2,7E-03	0,05	0,8395
Momento	2,7E-03	1	2,7E-03	0,05	0,8395
Error	0,23	4	0,06		
Total	0,23	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,54454

Error: 0,0577 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Inicial	0,83	3	0,14
Final	0,88	3	0,14

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SRA3

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
T	SRA3	R/S	6	0,32	0,16	16,94

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,05	1	0,05	1,92	0,2380
Momento	0,05	1	0,05	1,92	0,2380
Error	0,11	4	0,03		
Total	0,16	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,37381

Error: 0,0272 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,88	3	0,10
Inicial	1,07	3	0,10

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

PULSOS

POBLACIÓN JA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	JA	R/S	5	0,11	0,00	24,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,01	1	0,01	0,39	0,5769
Momento	0,01	1	0,01	0,39	0,5769
Error	0,09	3	0,03		
Total	0,10	4			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,50064

Error: 0,0297 gl: 3

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,66	3	0,10
Inicial			

Inicial 0,76 2 0,12 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN JB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	JB	R/S	6	0,16	0,00	45,92

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,14	1	0,14	0,78
Momento		0,14	1	0,14	0,78
Error	0,73	4	0,18		
Total	0,87	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,96799

Error: 0,1823 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,78 3	0,25 A
Inicial	1,08 3	0,25 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	PA	R/S	6	0,06	0,00	65,64

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,08	1	0,08	0,25
Momento		0,08	1	0,08	0,25
Error	1,33	4	0,33		
Total	1,42	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,30897

Error: 0,3334 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,76 3	0,33 A
Inicial	1,00 3	0,33 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	PB	R/S	6	2,4E-03	0,00	12,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		1,1E-04	1	1,1E-04	0,9259
Momento		1,1E-04	1	1,1E-04	0,9259
Error	0,04	4	0,01		
Total	0,04	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,23659

Error: 0,0109 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.	
Final	0,85	3	0,06	A
Inicial	0,86	3	0,06	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PHA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	PHA	R/S	6	0,10	0,00	48,19

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,11	1	0,11	0,43	0,5471
Momento	0,11	1	0,11	0,43	0,5471
Error	1,02	4	0,25		
Total	1,13	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,14412

Error: 0,2547 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.	
Inicial	0,91	3	0,29	A
Final	1,18	3	0,29	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PHB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	PHB	R/S	6	0,50	0,37	28,84

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,29	1	0,29	3,98	0,1168
Momento	0,29	1	0,29	3,98	0,1168
Error	0,29	4	0,07		
Total	0,58	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,61008

Error: 0,0724 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.	
Final	0,71	3	0,16	A
Inicial	1,15	3	0,16	A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	SA	R/S	6	0,09	0,00	39,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,04	1	0,04	0,38
Momento		0,04	1	0,04	0,38
Error	0,40	4	0,10		0,5695
Total	0,44	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,71440

Error: 0,0993 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,72	3	0,18
Inicial	0,88	3	0,18

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	SB	R/S	4	0,28	0,00	90,39

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,65	1	0,65	0,77
Momento		0,65	1	0,65	0,77
Error	1,68	2	0,84		0,4729
Total	2,33	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=3,94206

Error: 0,8409 gl: 2

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,61	2	0,65
Inicial	1,42	2	0,65

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SRB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	SRB	R/S	6	0,05	0,00	76,60

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,11	1	0,11	0,19
Momento		0,11	1	0,11	0,19
Error	2,19	4	0,55		0,6817
Total	2,30	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,67873

Error: 0,5484 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Inicial	0,83	3	0,43
Final	1,10	3	0,43

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SRA3

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
P	SRA3	R/S	6	0,52	0,40	14,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,08	1	0,08	4,38	0,1046
Momento	0,08	1	0,08	4,38	0,1046
Error	0,07	4	0,02		
Total	0,15	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,30438

Error: 0,0180 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,84 3	0,08 A
Inicial	1,07 3	0,08 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

SIN RIEGO

POBLACIÓN JA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	JA	R/S	5	0,09	0,00	28,85

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,02	1	0,02	0,30	0,6216
Momento	0,02	1	0,02	0,30	0,6216
Error	0,17	3	0,06		
Total	0,19	4			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,69414

Error: 0,0571 gl: 3

Momento	Medias n	E.E.
Inicial	0,76 2	0,17 A
Final	0,88 3	0,14 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN JB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	JB	R/S	6	3,9E-04	0,00	25,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,2E-04	1	1,2E-04	1,5E-03	0,9705
Momento	1,2E-04	1	1,2E-04	1,5E-03	0,9705
Error	0,30	4	0,08		
Total	0,30	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,62311

Error: 0,0756 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Inicial	1,08 3	0,16 A

Final 1,09 3 0,16 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	PA	R/S	6	0,01	0,00	59,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,01	1	0,01	0,02
Momento		0,01	1	0,01	0,02
Error	1,34	4	0,33		
Total	1,34	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=1,31007

Error: 0,3340 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,93	3	0,33 A
Inicial	1,00	3	0,33 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	PB	R/S	6	0,01	0,00	13,31

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		5,0E-04	1	5,0E-04	0,04
Momento		5,0E-04	1	5,0E-04	0,04
Error	0,05	4	0,01		
Total	0,05	5			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,26189

Error: 0,0133 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Inicial	0,86	3	0,07 A
Final	0,88	3	0,07 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PHA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	PHA	R/S	6	0,08	0,00	40,70

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,04	1	0,04	0,33
Momento		0,04	1	0,04	0,33
Error	0,46	4	0,11		

Total	0,50	5
-------	------	---

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,76787

Error: 0,1147 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,75	3	0,20 A
Inicial	0,91	3	0,20 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN PHB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	PHB	R/S	6	6,1E-04	0,00	67,90

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1,5E-03	1	1,5E-03	2,4E-03	0,9630
Momento	1,5E-03	1	1,5E-03	2,4E-03	0,9630
Error	2,52	4	0,63		
Total	2,52	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,79852

Error: 0,6294 gl: 4

Momento	Medias	n	E.E.
Inicial	1,15	3	0,46 A
Final	1,18	3	0,46 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SA

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	SA	R/S	4	0,42	0,12	37,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,13	1	0,13	1,43	0,3548
Momento	0,13	1	0,13	1,43	0,3548
Error	0,18	2	0,09		
Total	0,31	3			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,29805

Error: 0,0912 gl: 2

Momento	Medias	n	E.E.
Final	0,63	2	0,21 A
Inicial	0,99	2	0,21 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

POBLACIÓN SB

Análisis de la varianza

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	SB	R/S	6	0,43	0,28	62,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		1,46	1	1,46	2,99
Momento		1,46	1	1,46	2,99
Error	1,95	4	0,49		
Total	3,41	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,58469

Error: 0,4886 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Final	0,62 3	0,40 A
Inicial	1,61 3	0,40 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**POBLACIÓN SRB****Análisis de la varianza**

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	SRB	R/S	6	2,2E-03	0,00	27,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		4,7E-04	1	4,7E-04	0,01
Momento		4,7E-04	1	4,7E-04	0,01
Error	0,21	4	0,05		
Total	0,21	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,52094

Error: 0,0528 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Inicial	0,83 3	0,13 A
Final	0,85 3	0,13 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**POBLACIÓN SRA3****Análisis de la varianza**

tratamiento	Pob	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
SR	SRA3	R/S	6	0,24	0,05	39,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.		0,33	1	0,33	1,25
Momento		0,33	1	0,33	1,25
Error	1,06	4	0,26		
Total	1,39	5			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=1,16439

Error: 0,2638 gl: 4

Momento	Medias n	E.E.
Inicial	1,07 3	0,30 A
Final	1,54 3	0,30 A

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Phylogenetic relationships and intraspecific diversity of a North Patagonian Fescue: evidence of differentiation and interspecific introgression at peripheral populations

A. S. López · M. M. Azpilicueta · D. R. López ·
G. L. Siffredi · P. Marchelli 

Received: 25 November 2016 / Accepted: 17 September 2017
© Institute of Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic 2017

Abstract Peripheral sites usually offer suboptimal conditions for species with wide distributions, where expression of phenotypic variability and potential interspecific hybridization might be enhanced. The Patagonian steppe, the largest and southernmost dryland ecosystem in South America, is characterized by natural rangelands dominated by grasses. *Festuca pallescens* is a keystone species with a wide distribution in Patagonia over diverse environments reaching the extreme arid zones in the Somuncura plateau, a biogeographical island. Our aim is to study the phylogenetic relationships among *Festuca pallescens* populations as well as between this species and the sympatric *F. argentina* in North Patagonia. We analysed fourteen populations

along a west-east transect of about 500 km in North Patagonia with three types of molecular markers: ITS, chloroplast *trnL-F* and eight nuclear microsatellites. Bayesian inferences, maximum parsimony and maximum likelihood analyses with *trnL-F* and ITS showed that *F. pallescens* is related to the Patagonian clade within the *Festuca* phylogeny. However, the easternmost populations of *F. pallescens* at Somuncura plateau were highly differentiated from the other populations and clustered with *F. argentina* (a sympatric species of the Asian-American clade). Principal coordinates analyses and Bayesian clustering performed with nuclear microsatellites as well as morphoanatomical traits, showed an intermediate position of one of these easternmost populations with respect to the two species, suggesting admixture. The high genetic variability observed in these peripheral populations highlight their relevance for conservation and might be indicating the existence of evolutionary processes triggering events of speciation in the Patagonian fescues.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s12224-017-9304-1>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

A. S. López · M. M. Azpilicueta · G. L. Siffredi ·
P. Marchelli
INTA, EEA Bariloche, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Bariloche, Modesta Victoria 4450, 8400 Bariloche, Río Negro, Argentina

A. S. López · P. Marchelli (✉)
CONICET, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Buenos Aires, Argentina
e-mail: marchelli.paula@inta.gob.ar
e-mail: pmarchelli@gmail.com

D. R. López
INTA, EF Villa Dolores, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Forestal Villa Dolores, Córdoba, Argentina

Keywords *Festuca pallescens* · *Festuca argentina* · Patagonian fescues · ITS region · *trnL-F* · Microsatellites · Hybridization · Marginal populations

Introduction

Drylands (arid, semi-arid and dry-sub humid ecosystems) are suitable environments to study adaptations to extreme climatic conditions. These ecosystems are of paramount importance because of their multi-

functionality (Maestre et al. 2012) and high biodiversity (Davies et al. 2012) related to the presence of endemisms (Millennium Ecosystem Assessment Panel 2005; Davies et al. 2012). Drylands constitute the largest terrestrial biomes with high sensitivity to climate change and desertification (Sala et al. 2000; Reynolds et al. 2007) and are also known for a noteworthy environmental heterogeneity that might promote the expression of phenotypic variability (Hoffmann and Hercus 2000) and hybridization processes (Thompson et al. 2010). In addition, over 70% of the world's drylands are currently used for grazing of livestock in native vegetation (Asner et al. 2004). Therefore, understanding how environmental drivers influence genetic diversity in these vulnerable ecosystems becomes of high relevance.

In Argentina, the Patagonian steppe constitutes the largest and southernmost dryland ecosystem of South America (Palazzesi et al. 2014). Natural rangelands are strongly affected by desertification and overgrazing (Aguiar and León 1985; Bertiller 1990; Paruelo et al. 1993) becoming highly vulnerable to the fluctuations imposed by climate change. Generally, these ecosystems are dominated by perennial grasses with low capacity to cope with rapid environmental change (Chapin 1993). In addition, a strong precipitation gradient characterizes the region (from above 900 mm in the west to less than 200 mm of annual precipitation in the east) generating a spatial distribution of changing vegetation, soil and forage resources (León et al. 1998). Consequently, the decline of abundance and diversity of native species towards peripheral driest eastern locations resulted in the formation of patches of bare soil with a recolonization by shrubs and unpalatable grasses (Aguiar and León 1985; Bertiller et al. 1993; Golluscio et al. 1998; Busso and Bonvissuto 2009).

Patagonia is characterized by a large environmental heterogeneity and a complex geomorphologic history. Pliocene and Pleistocene glaciations, Miocene marine transgressions and volcanism shaped the current topology and probably left an imprint in the vegetation. In North Patagonia (above 42° S), glaciers had a lesser extent (Flint and Fidalgo 1964), being confined to the foothills of the Andes and neighbouring zones, but with a continuous permafrost throughout the region (Rabassa et al. 2011). Towards the east occurs the Somuncura plateau, a biogeographically isolated and elevated landscape formed during the Tertiary. Layers of basaltic Cenozoic lavas formed this complex, a stable rigid block, during the Andean orogeny (Malumián and

Náñez 2011). The Miocene marine transgressions affected lowlands that surrounded the massif, but did not reach the plateau (Malumián and Náñez 2011). Instead, it remained volcanically active until the early Pliocene (Rabassa 2008). Therefore, this Precambrian plateau formed an insular structure surrounded by water (Burkart et al. 1999), enclosing particular microhabitats. This has favoured the presence of numerous endemisms, such as five plants species, at least fourteen invertebrates and ten vertebrates (Cei 1969; Cei and Scolaro 1981; León et al. 1998; Chebez 2005; Andrade and Monjeau 2014; Breitman et al. 2015). Furthermore, it constitutes a notable geomorphological feature located in the extreme of the distribution for many species of the Patagonian steppe (León et al. 1998; Andrade and Monjeau 2014). Although Somuncura plateau was declared a Protected Area (Río Negro Province, Argentina), only a few works reported on genetic and morphological variation of its biota (Cei and Scolaro 1981; Chebez 2005; Muzón et al. 2005; Andrade and Monjeau 2014; Breitman et al. 2015).

Peripheral sites usually offer suboptimal conditions for species with wide and environmentally diverse distributions, leading to progressively smaller populations prone to isolation and extinction (Eckert et al. 2008). In the case of the Somuncura plateau, apart from the geographic isolation there are also environmental constraints. Compared to western and more central localities, Somuncura has much lower precipitations (150 mm/year vs 800 mm/year), a higher mean diurnal range of temperature (14.4 vs 11.5°C) and a higher temperature annual range (29 vs 22.7°C; Data from WorldClim, Hijmans et al. 2005). Although genetic differences between geographically central and peripheral populations are rarely very large (Eckert et al. 2008), many dryland species showed high levels of genetic differentiation between extreme populations (Martínez-Palacios et al. 1999). In addition, the repeated exposure to stressful conditions of border populations could enhance the expression of phenotypic variability (Hoffmann and Hercus 2000) or local adaptations (Hoffmann and Blows 1994). These environments are also prone to the occurrence of natural interspecific hybridization and introgression (Thompson et al. 2010) that may increase genetic variation producing new gene combinations better adapted to novel environments (Johansen-Morris and Latta 2008). In any case, these responses contribute to a

higher flexibility and survival of a population in a context of changing environmental conditions.

Festuca pallescens (St. Yves) Parodi is a keystone species with a wide distribution over diverse environments, type of soils and ecological areas of Patagonia (Bertiller 1990; Nicora 1978; Catalán and Müller 2012). It is a highly palatable and preferred forage resource, and therefore it was intensively affected by overgrazing (Bertiller et al. 1993). In northern Patagonia, density of *F. pallescens* populations' declines to the east, where the species is increasingly fragmented forming spaced patches related to a reduction of wet meadows and to the lower topographic elevation (León et al. 1998). This allohexaploid species shows a wide morphological and anatomical variation (Oliva et al. 1993) as well as differences in phenology associated to air temperature (Bertiller et al. 1990), but its genetic diversity was never studied. The ability of *F. pallescens* of growing in different environments might be exclusively plastic, adaptive, or a combination of both. We hypothesized that at marginal locations, like the Somuncura plateau, where the species is isolated and growing in suboptimal conditions, environmental pressure promotes phenotypic and genetic variation. Moreover, hybridization and speciation processes could be also favoured.

Festuca is the largest genus among the Loliinae, with around 500 species (Inda et al. 2008). Polyploidization, past and recent hybridizations, and intergeneric crosses with other Loliinae are frequent (Inda et al. 2008 and references within). In spite of the well reported phylogenies of the genus *Festuca* (Torrecilla and Catalán 2002; Torrecilla et al. 2003; Catalán et al. 2004; Inda et al. 2008; Minaya et al. 2017) little is known about the Patagonian fescues, being so far only few species included in these studies (i.e. only *F. argentina* (Speg.) Parodi, *F. subantarctica* Parodi, *F. purpurascens* Banks & Sol. ex Hook. f., *F. gracillima* Hook. f., *F. magellanica* Lam. and *F. pyrogea* Speg.). Therefore, the position of *F. pallescens* within the infrageneric phylogeny, as well as the relation with sympatric species is unknown.

Our aim is to study the phylogenetic relationships among *F. pallescens* populations from North Patagonia. This is the first step towards the study of its genetic diversity and, in particular, to disentangle differentiation between populations and/or hybridization processes associated to its wide distribution. Accordingly, we analysed fourteen populations along a west-east transect that represent the diverse environments where this

dryland species occurs. In particular, due to the considerable number of endemic species at the Somuncura plateau, we will analyse if the isolated populations at this easternmost site are genetically different from western and continuous populations. We intend to contribute to the scarce existing knowledge about the phylogenetic placement of the species, and to provide information of relevance for conservation planning of the Somuncura Protected Area.

Material and methods

Sample sites and plant material

We collected leaf tissue of *Festuca pallescens* at five locations situated along a west-east oriented transect of about 500 km in North Patagonia (Argentina) during January of 2014 (Fig. 1). The material was identified in the field using exomorphological characters described for this species (including leaves with glaucous colour, sheaths with pulvini, and lemmas ending in an awn, e.g. Nicora 1978). At each location, between one to four populations from high steppes and wet-meadows were sampled, gathering 14 populations (Table 1). The average annual rainfall (mm/y) and its coefficient of variation (cv) vary notably between sampling sites being of 831.6 mm/y; cv 0.2 in the west and 170.8 mm/a; c.v. of 0.4 in the east. In addition, we sampled the sympatric species *F. argentina* at one location (Pilcaniyeu, coinciding with populations 7 and 8) and two species of Patagonian grasses (*Poa ligularis* Nees ex Steud. var. *ligularis*, and *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* Trin. et Rupr.) as outgroups.

DNA extraction and PCR amplification

Young leaf tissue from tussocks were collected, frozen in liquid nitrogen and grounded to fine powder using an automatic mixer mill (Resch, Germany). DNA was extracted following a modified protocol of Doyle and Doyle (1987) according to Gonzalo-Turpin and Hazard (2009). We used three different DNA markers to study the phylogenetic relationships: the internal transcribed spacer (ITS), a chloroplast DNA region and eight nuclear microsatellites (SSRs). The complete ITS region (ITS1–5.8S–ITS2) was amplified with primers cy1–cy3 (Wright et al. 2006). Due to the highly conserved DNA sequences of the ITS nuclear region within species, one

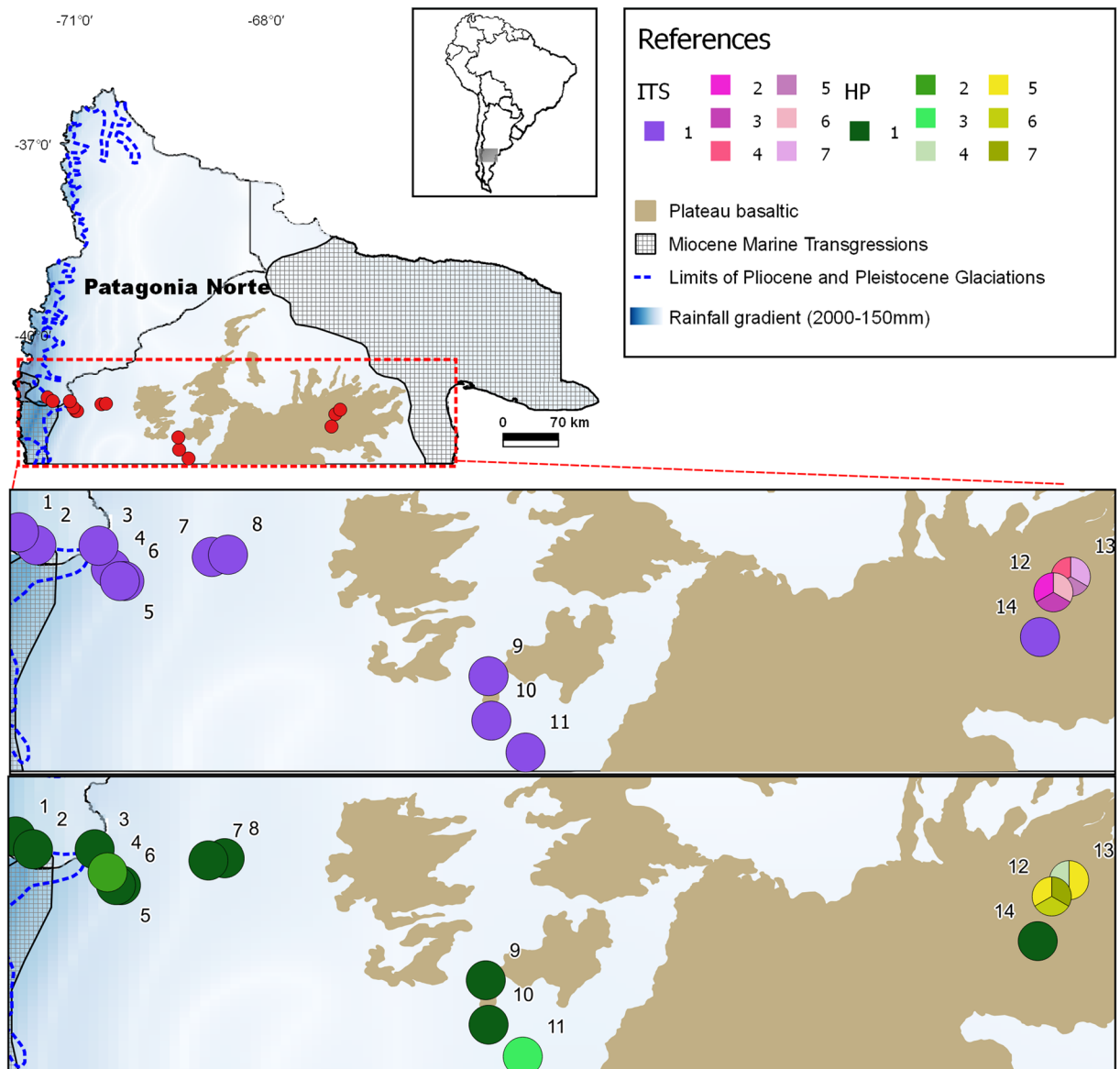


Fig. 1 Distribution of the nuclear (ITS) and plastid (HP) (*trnL-F*) genetic variants among the sampled populations. Numbers follow the description in Table 1. Violet (ITS) and green (cpDNA) colour palettes depict different variants for the two markers. Noteworthy geomorphological features are also shown in the figure:

Oligocene-Miocene marine transgressions and limits of Pleistocene-Pliocene glaciations were modified from (Premoli et al. 2012) and (Pastorino and Gallo 2002), respectively. The west-east decreasing rainfall is also shown.

individual from each population was sequenced. However, given the higher heterogeneity and phenotypic variation observed in the field at the Somuncura plateau, 12 individuals from the three sampled populations were analysed. For the amplification of the ITS region, we used 40 ng of DNA as template, 0.6 units of Go-Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) with

5X Green GoTaq® reaction buffer (Promega), 1.5 mM $MgCl_2$, 250 μM of dNTPs, and 0.3 μM of each primer in a total volume of 30 μl . PCR reactions were carried out with the following programme: 5 min at 94°C, 30 cycles of 30s at 94°C, 1 min at 56°C and 2 min at 72°C and a final cycle of 10 min at 72°C. The chloroplast *trnL-F* region was amplified using the universal primers c and f

Table 1 Characteristics of *Festuca pallescens* populations sampled. Floristic physiognomic types were characterized following.

Population	Sample site	Precipitation [mm]	Latitude	Longitude	Elevation [m a.s.l.]	Floristic physiognomic type	Plant cover	Dominant species
1	Península Huelmul Ranch, Neuquén, Argentina	831	40°57'	71°25'	1,220	Shrub-grass steppe	20–30% grass, 40–50% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Pappostipa</i> sp.; <i>Poa ligularis</i> ; <i>Adesmia boronioides</i> ; <i>Berberis</i> sp.; <i>Mulinum spinosum</i>
2			41°1'	71°20'	845	Shrub-grass steppe	30–40% grass, 20–30% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Pappostipa speciosa</i> vt. major; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Berberis</i> sp.
3	San Ramón Ranch, Río Negro, Argentina	584	41°10'	70°59'	1,140	Exposed Shrub-grass steppe	5–10% grass, 10–20% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Pappostipa</i> sp.; <i>Acena splendens</i> ; <i>Mulinum spinosum</i>
4			41°10'	70°57'	1,100	Meadow	> 60% grass	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Juncus</i> sp.; <i>Carex subantarctica</i>
5			41°7'	71°1'	902	Meadow	60% grass < 20% herbs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Poa pratensis</i> ; <i>Taraxacum officinale</i> ; <i>Juncus</i> sp.; <i>Carex subantarctica</i>
6			41°1'	71°4'	1,139	Grass steppe	50–60% grass, 5–10% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Festuca argentina</i> ; <i>Pappostipa spectiosa</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio</i> sp.
7	Pilcaniyeu Experimental Field, Río Negro, Argentina	264	41°4'	70°34'	1,260	Shrub-grass steppe	30–40% grass, 30–40% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Festuca argentina</i> ; <i>Pappostipa</i> sp.; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio</i> sp.
8			41°3'	70°30'	970	Meadow	80% grass	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Juncus</i> sp.; <i>Hordeum</i> sp.
9	Ingeniero Jacobacci, Río Negro, Argentina	170	41°55'	69°12'	1,400	Grass steppe	> 60% grass, < 5% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Poa pratensis</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio</i> sp.
10			41°46'	69°21'	970	Salty Meadow	50–60% grass, 5–10% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Juncus</i> sp.; <i>Distichlis</i> sp.; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Senecio</i> sp.
11			41°35'	69°22'	1,135	Salty meadow	> 60% grass, < 5% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Juncus</i> sp.; <i>Distichlis</i> sp.; <i>Azorella trifurcata</i>
12	Somuncura plateau, Río Negro, Argentina	150	41°13'	66°54'	1,100	Shrub-grass steppe	30–40% grass, 5–10% shrubs	<i>Festuca</i> sp.; <i>Pappostipa</i> sp.; <i>Jaraba humilis</i> ; <i>Mulinum spinosum</i> ; <i>Adesmia campestris</i>
13			41°9'	66°50'	925	Shrub-grass steppe	20–30% grass, 5–10 shrubs	<i>Festuca</i> sp.; <i>Pappostipa</i> sp.; <i>Mulinum spinosum</i>
14			41°25'	66°58'	1,430	Meadow	50–60% grass, 5–10% shrubs	<i>Festuca pallescens</i> ; <i>Poa ligularis</i> ; <i>Senecio</i> sp.

¹ High proportion of bare soil² Organic matter

(Taberlet et al. 1991) with 90 ng of DNA, 1 unit of GoTaq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) with 5X Green GoTaq® reaction buffer (Promega), 2 mM MgCl₂, 200 µM of dNTPs, and 0.2 µM of each primer in a total volume of 50 µl. The amplification programme was: 1 min at 94°C, 30 cycles of 1 min at 94°C, 1 min at 50°C and 1 min at 72°C and a final cycle of 7 min at 72°C. Finally, a set of eight microsatellite loci (SSR) developed for *Lolium perenne*, *Festuca-Lolium* complex of grasses and *Festuca* spp (Lauvergeat et al. 2005; Fu et al. 2006; Jensen et al. 2007), were successfully transferred being polymorphic in Patagonian fescues (López et al. 2015). PCR amplifications were carried out according to Lauvergeat et al. (2005).

PCR products for the three markers were checked for positive amplification in 1% agarose gels, stained with Syber Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA), and visualized with a blue light trans illuminator. The amplified ITS and *trnL*-F regions rendered a band of approximately 700 bp and 1,000 bp, respectively, that was purified using the Wizard Genomic DNA Purification Kit (Pomega) and then sequenced in a capillary sequencer (ABI 3700, Genomics Unit, Biotechnology Institute of INTA, Hurlingham, Argentina). Microsatellite primers were labelled with different fluorophores and then pooled in three groups for analysis in the ABI 3700 sequencer. Fragments visualization and allele scoring was performed with Genemarker Version 1.97 (SoftGenetics, State College, PA, USA).

Morphoanatomical analyses

Due to the observed phenotypic variation at the Somuncura plateau, an analysis of the main morphological characters characterizing *F. pallescens* (Catalán and Müller 2012) was done. We analysed field samples of typical *F. pallescens* and of the sympatric species *F. argentina* from Pilcaniyeu, Argentina (i.e., from central populations of both these species), and of *F. pallescens* from the sampled Somuncura marginal populations. In addition, cross-sections of leaves were used for morphoanatomical analyses, to determine position and extension of sclerenchymatic tissue within leaf blade. This feature has been described as important for species identification of Patagonian species of *Festuca* (e.g. Dubcovsky and Martínez 1988; Catalán and Müller 2012). Transverse sections were obtained from middle portions of mature leaves that were cut

approximately 12 cm away from the base of the lamina (i.e. from the distal end of the leaf sheath) with a razor blade. Sections were observed at 10x with a Leica SGE microscope.

Phylogenetic analyses

Chromatograms from forward and reverse sequences were corrected with 'seqtrace' 0.9.0 (Stucky 2012) and consensus were created using BioEdit v7.2.5 (Hall 1999). All the ITS sequences from Somuncura populations and one sample of *F. argentina* (F.arg2) presented a heterozygous indel in a single position. Therefore, we used the software OLFinder (Dixon 2010) to resolve the shifts in phase between the forward and reverse strand sequence. All the species of *Festuca* distributed in South America that were available in Genbank (Catalán et al. 2004; Inda et al. 2008) were used for the phylogenetic analysis (15 species; Table S1). In addition, species of *Festuca* from different parts of the world retrieved from Genbank were also included: 18 species for ITS and 19 species for *trnL*-F (Table S1). *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* and *Poa ligularis* are two species of Poaceae generally found in *F. pallescens* rangelands. These species are phylogenetically very distant from *F. pallescens* and were used as outgroups. ITS and *trnL*-F sequences of *F. pallescens*, *F. argentina*, *Poa ligularis* and *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* were deposited in Genbank (Accession numbers are provided in Table S1; supplementary materials). Sequences were aligned using Muscle with manual adjustments when necessary in AliView 1.18 (Larsson 2014). The boundaries of each sequence were established by the alignment with the species of *Festuca* obtained from Genbank (Torrecilla and Catalán 2002; Torrecilla et al. 2003; Catalán et al. 2004). The presence of the heterozygous indel was coded as a binary data and incorporated in the sequence data matrix. Gaps were treated as missing data.

To evaluate the phylogenetic relationships between populations we run Bayesian inferences (BI), maximum parsimony (MP) and maximum likelihood (ML) analyses with ITS and *trnL*-F data matrices both separately and combined. The BI, MP and ML analyses were implemented with Mr. Bayes 3.2 (Ronquist et al. 2012), Paup*4.0 beta10 (Swofford 2003) and on line software PhyML (Guindon et al. 2010), respectively. To run BI and ML, we estimated the optimal nucleotide substitution model for the ITS

dataset (GTR+G with 4 gamma rate categories), the *trnL-F* dataset (TPM1uf + G) and the concatenated dataset (GTR+G with gamma rate categories), after testing 56 nucleotide substitution models based on the Akaike information criterion (AIC) implemented in 'jmodeltest' 2.0 (Guindon and Gascuel 2003; Posada 2008; Darriba et al. 2012). Bayesian analyses were carried out by running twice the same parameters to both independent datasets (1 million generations initiated from different random trees, sampling every 100th generations model parameters such as nucleotide substitution rates, gamma shape, proportion of invariable sites, nucleotide frequency) estimated by MrBayes. After discarding 0.25 of the total sampling ('burn-in'), parameters were sampled when reaching stationary. The ITS and *trnL-F* 50% majority rule consensus trees, obtained from 15,000 trees, were supported by values branches from the posterior probability (PP). Clades with more than 95% PP values were considered well supported. Parsimony analysis was carried out on each independent data matrix. Following Torrecilla and Catalán (2002), Torrecilla et al. (2003) and Inda et al. (2008), data matrices were subjected to heuristic analysis to find all equally parsimonious trees. First, we run 10,000 random-order-entry trees, MULPARS ON, with TBR branch swapping and saving no more than 10 trees of length equal or shorter than 10 per replicate to compute a consensus tree that was used afterwards as a negative constraint for a second search. Then, the second heuristic search consisted on 5,000 random-order-entry trees, MULPARS ON, with TBR branch swapping and saving no more than 5 trees of length equal or shorter than 5 per replicate. All parsimonious trees were used to compute their respective strict and 50% majority rule consensus tree. Bootstrap support for branches of the parsimonious trees was calculated through heuristic searches of 1000 replicates. Most clades presented bootstrap values between 90–100%, so they were considered well supported.

Pairwise genetic distances both for ITS and cpDNA (*trnL-F*) were calculated in R using 'dist.dna' ('ape' package) (Paradis et al. 2004). This function computes a matrix of pairwise distances from DNA sequences using 11 DNA substitution models and the raw distance. Finally, we used a median-joining network algorithm (Bandelt et al. 1999) to reconstruct the relationships between haplotypes using Network 5.0.0.0 (www.fluxus-engineering.com).

A posterior post-processing option (MP calculation) was used to eliminate unnecessary median vectors and links (Polzin and Daneschmand 2003).

Microsatellite loci were analysed in the same set of individuals as for the phylogenies using Bruvo's distance (Bruvo et al. 2004), which is suitable for polyploid organisms. It is based on a measure of genetic distance similar to the band-sharing indices used with dominant data, but taking into account mutational distances between alleles (Clark and Jasieniuk 2011). The advantage of this measure is that it dispenses with knowledge of ploidy and allele dosage, which is difficult to determine in polyploids. Using the estimated Bruvo's distance we calculated a principal coordinate analyses (PCoA) with the 'polysat' package (Clark and Jasieniuk 2011) in R (R Core Team 2013) and a Neighbour-joining tree estimation with 'ape' package (Paradis et al. 2004) in R (R Core Team 2013). On the other hand, to determine the number of clusters and evaluate signals of admixture, we used STRUCTURE ver. 2.3.4. (Pritchard et al. 2000). The different levels of ploidy were coded as recommended by the documentation of Structure for loci with copy number ambiguity, i.e. coding the missing alleles as recessive but not ambiguous and using the RECESSIVE ALLELES model. The ambiguous loci (i.e. when there is uncertainty about the number of copies of each allele) were coded repeating one allele as described by Pritchard et al. (2000). The iterations were run using the admixture model with correlated allele frequencies because it is more conservative and provides greater power to detect populations that are closely related (Porrás-Hurtado et al. 2013). We run Structure 16 times for each K, varying the range of K from 1 to 9, using a length of burn-in period of 200,000 iterations and 10^6 MCMC replications. The optimal number of clusters was determined following (Evanno et al. 2005) in the online platform Harvester (Earl and vonHoldt 2012). We used Clumpak (Kopelman et al. 2015) to combine files from the 16 replicates of the best K and prepare the graphical representation.

Results

The easternmost populations of *F. pallescens* at Somuncura plateau (populations 12 and 13) showed distinctiveness from the rest of the populations sampled along the west-east transect (Fig. 1). There was a high

level of diversity at both nuclear and plastid markers, with the presence of six different ITS sequences and four chloroplast haplotypes. In contrast, all the other populations showed no polymorphism for the ITS region and only minor variations for the chloroplast (Fig. 1). Population 14, also at Somuncura plateau, holds the same genetic constitution than the rest of the *F. pallescens* populations. Therefore, from now on we will refer to *Somuncura* populations as solely referring to populations 12 and 13.

Morphoanatomical analyses

Differences between typical, central populations of *F. pallescens* and the marginal individuals sampled at Somuncura were also evident for several of the morphological characters analysed (Table 2). We also compared the Somuncura populations with the sympatric *F. argentina* and found some traits similar and others intermediate between them. For example, leaf colour at Somuncura populations was glaucous like in *F. pallescens*. On the contrary, the ligule at the apex of the leaf-sheath and the presence of adaxial to abaxial girders of sclerenchyma of the Somuncura populations resembled those of *F. argentina*. Finally, some traits were clearly intermediate between *F. pallescens* and *F. argentina*: size of pulvinus at the base of the lamina, length of the awn at lemma apex, and presence of a continuous band of sclerenchyma under the abaxial epidermis in leaf cross-section. In addition, we detected differences between the two Somuncura populations:

population 13 had a higher proportion of sclerenchyma than population 12 (Table 2).

ITS region

All the analysed individuals of *F. pallescens* showed the same ITS sequence; except for Somuncura populations where six different ITS sequences were found (Fig. 1). The individuals from population 14, also at the Somuncura plateau, were identical in sequence to the rest of the *F. pallescens* samples. *Festuca argentina* also showed high polymorphism since each individual sampled had a different ITS sequence. All sequences from populations 12 and 13 presented shifts in phase between the forward and reverse strand due to the presence of a heterozygous indel at the same position, whereas in only one sample of *F. argentina* a heterozygous indel was detected, but in a different position. Neither the other samples of *F. pallescens* nor the other species showed heterozygous indels. The ITS dataset included 47 sequences belonging to 38 taxa and 621 aligned nucleotide positions, where 107 (17.23%) resulted parsimony informative.

The three methods showed similar tree topologies; therefore, we present the Bayesian results (Maximum Parsimony and Likelihood analyses can be accessed from supplementary materials, Fig S1). *Festuca pallescens* and samples from Somuncura belong to different clades. In fact, Somuncura formed a strongly supported clade with *F. argentina* (Fig. 2). *Festuca pallescens* is sister to the Patagonian species

Table 2 Morphoanatomical traits comparing *Festuca argentina*, *F. pallescens* and Somuncura populations.

Morphoanatomical traits	<i>Festuca argentina</i>	<i>Festuca pallescens</i>	Somuncura 12	Somuncura 13
Leaf colour	bright green	glaucous	glaucous	glaucous
Ligule at apex of leaf-sheath interior	clearly visible	hardly visible	visible (similar to <i>F. argentina</i>)	visible (similar to <i>F. argentina</i>)
Pulvinus at base of lamina	absent	present, relatively large and noticeable	present, small and less distinguishable than in <i>F. pallescens</i>	present, small and less distinguishable than in <i>F. pallescens</i>
Awn at lemma apex	absent	present and >1 mm	Present and approx. 0.2 mm	Present and < 0.2 mm
Adaxial to abaxial girders of sclerenchyma of vascular bundles in leaf cross-section	present	absent	present	present
Continuous band of sclerenchyma under abaxial epidermis in leaf cross-section	absent	present (sometimes interrupted in parts)	absent (but with a higher proportion of sclerenchyma than in <i>F. argentina</i>)	absent (but with a higher proportion of sclerenchyma than in Somuncura 12)

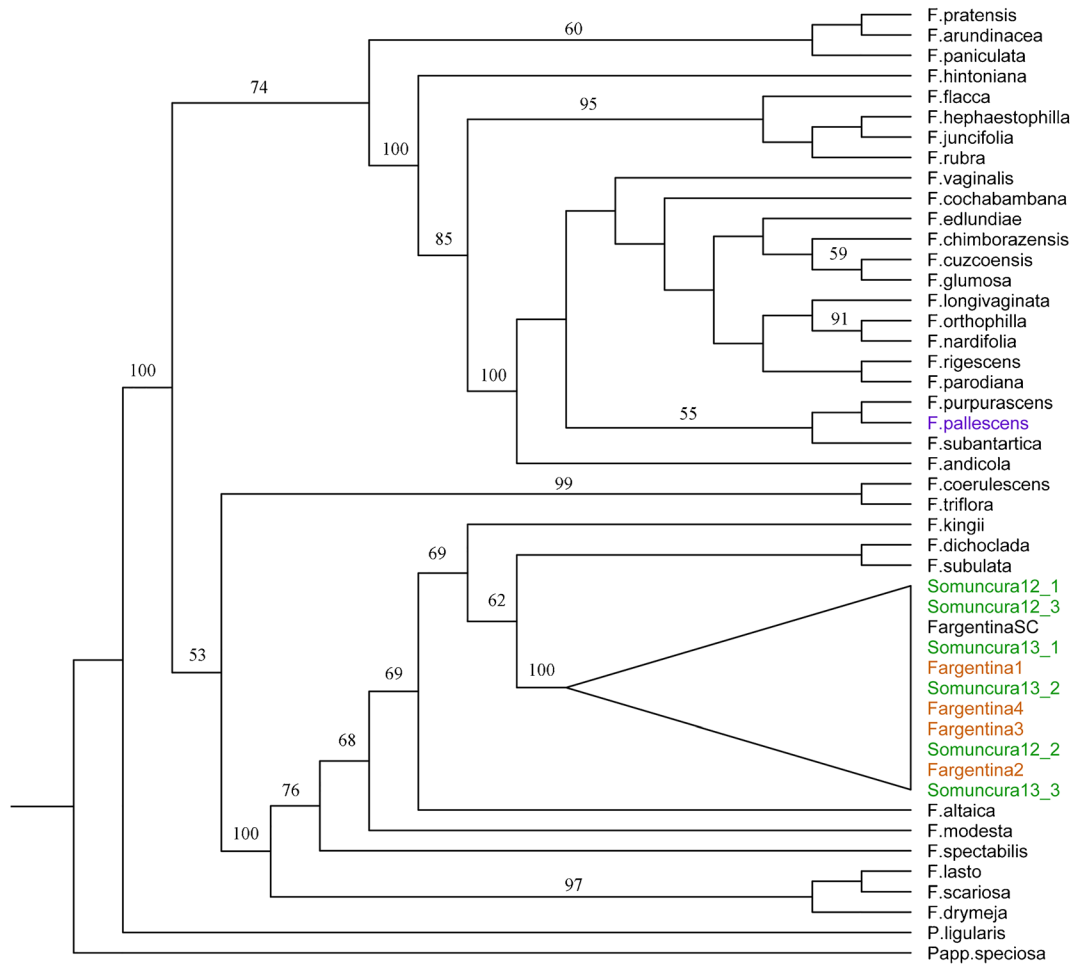


Fig. 2 Bayesian tree based on nuclear (ITS) marker. Studied taxa are dyed with violet (*F. pallescens*), green (Somuncura) and orange (*F. argentina*). Numbers above the branches indicate

posterior probability (PP); posterior probability support values lower than 50% are not shown. *Pappostipa speciosa* var. *speciosa* and *Poa ligularis* were used as outgroups.

F. purpurascens and then it is sister to *F. subantartica*, but the relationships show low support. This clade is closely related to the South-American species (*F. chimborazensis*, *F. rigescens*, *F. vaginalis*, *F. parodiana*, *F. glumosa*, *F. andicola*, *F. cochabambana*, *F. nardifolia*, *F. longivaginata*, *F. orthophylla* and *F. cuzcoensis*) and to a North-American species (*F. edlundiae*; Fig. 2 and Fig. S1b). Maximum Parsimony majority rule consensus tree showed a polytomy that included the three Patagonian species (*F. pallescens*, *F. subantartica* and *F. purpurascens*) with the South-American species mentioned before and one North-American species (Fig. S1a). Samples from Somuncura and *F. argentina* were represented as a polytomy closely related to *F. dichoclada*, *F. subulata*, *F. kingii* and *F. altaica* in all topologies (Fig. 2 and Fig. S1). Pairwise

genetic distances were small between *F. argentina* and Somuncura (ranging from 0 to 0.7%) and considerably larger between Somuncura and *F. pallescens* (between 7.3 and 8.1%).

Notably, even though Somuncura showed most polymorphic sites shared with *F. argentina*, some sites were shared with *F. pallescens*, some were exclusive, and most were heterozygous positions between the two species suggesting introgression (Table S3).

Chloroplast DNA (trnL-F) region

Three haplotypes were identified among the *F. pallescens* populations (HP1, HP2 and HP3), HP1 being the most frequent. Among the Somuncura

individuals, four variants were detected (HP4, HP5, HP6 and HP7; Fig. 1), HP5 being shared with *F. argentina*. The cpDNA (*trnL-F*) dataset included 43 sequences (39 taxa) with 907 aligned positions; 63 (6.94%) variable sites were parsimony informative.

Organelle trees in all analyses showed in general the same topology as the ITS trees. The Bayesian tree showed that haplotypes 5 and 9 of *F. pallescens* were linked and haplotype 1 (the most common haplotype found in *F. pallescens*) was associated to *F. purpurascens* (Patagonia). These taxa were closely related to *F. chimborazensis* (Ecuador), *F. edlundiae* (Canada) and *F. glumosa* (Colombia). In addition, *F. subantarctica* presented the same haplotype as the most common haplotype in *F. pallescens* (see legend

in Fig. 3). The private haplotype of population 13 from Somuncura and the other two haplotypes found in population 12 also from Somuncura were close to *F. amplissima* (México). This clade was sister to *F. argentina*, and then to a clade composed of *F. breviglumis* (México) and *F. dichoclada* (Perú), see Fig. 3. However, PP support values were very low (less than 50%). Pairwise genetic distances were low between *F. argentina* and Somuncura (between 0 and 0.24%) and considerably larger between Somuncura and *F. pallescens* (between 1.9 and 2.03%). The network shows that nineteen mutated positions separate *F. pallescens*5 (HP2) from Somuncura 12_2 (HP4), while haplotypes of *F. pallescens* and Somuncura differed by only one or two mutations to each other,

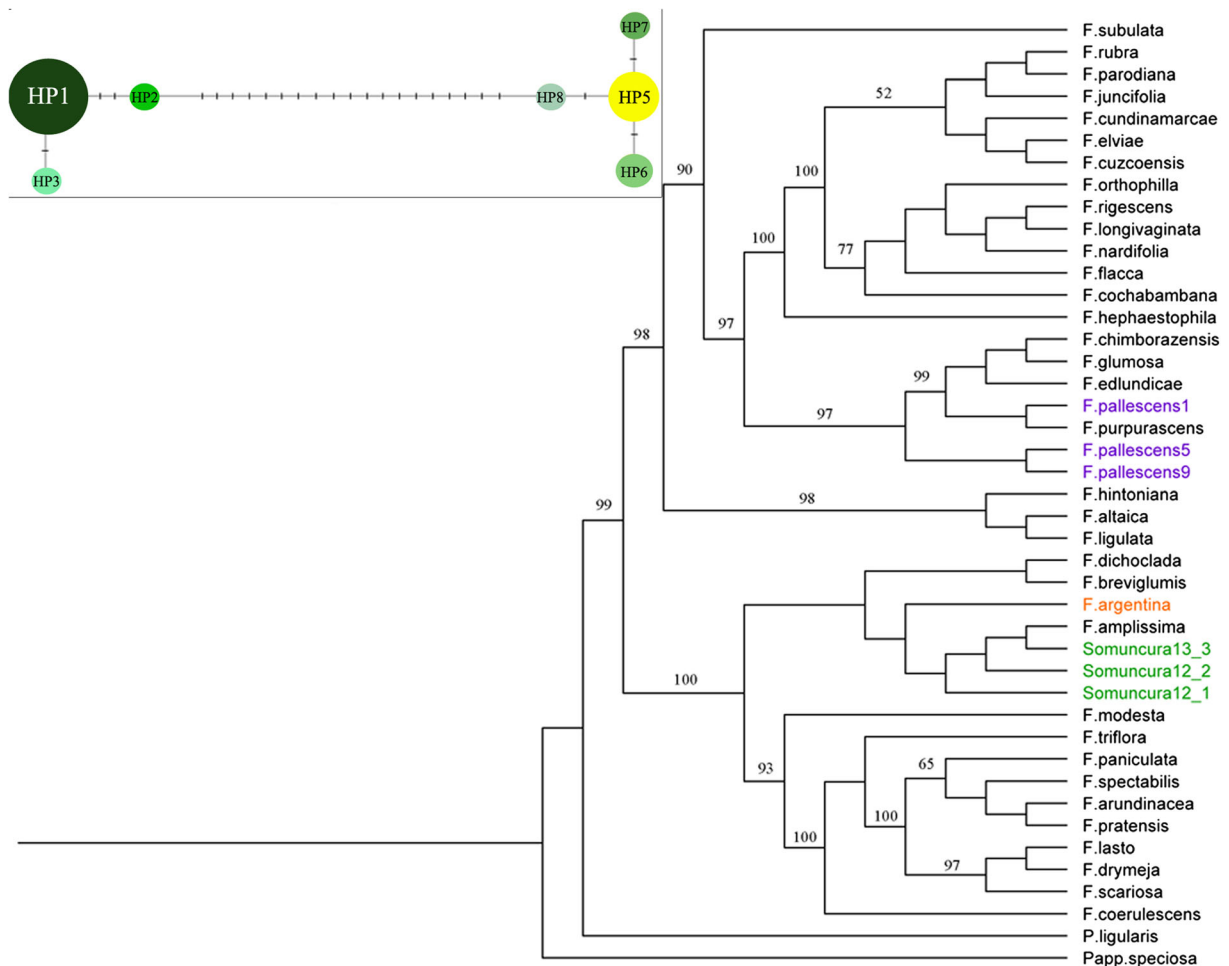


Fig. 3 Bayesian tree based on plastid (*trnL-F*) marker. The taxa under study are coloured violet (*F. pallescens*), green (Somuncura) and orange (*F. argentina*). Support values (posterior probability) are indicated above branches. Posterior probability support values

lower than 50% are not shown. * *Festuca subantarctica* has the same haplotype as *F. pallescens* 1. The **top-left inset** shows the haplotype network.

respectively (inset in Fig. 3). The combined data set (ITS_ *trnL*-F concatenated data) showed a topology similar to the organelle tree (Fig. S3).

Microsatellite loci

All the analyses performed with the microsatellite data set were consistent showing four well-defined groups. Individuals of *Festuca argentina* and *Festuca pallescens* were very different from each other in agreement with phylogenetic analyses. Interestingly, these markers allowed, in addition, the separation of the two populations of Somuncura. Individuals from population

12 were closer to *F. argentina* while individuals from population 13 were situated at an intermediate position between *F. argentina* and *F. pallescens* in both the PCoA and the Neighbour joining tree (Fig. 4).

The clustering performed with Structure detected the best partition at $K = 2$ (according to the method by Evanno et al. 2005) (Fig. S4). However, meanLnK reaches the plateau at $K = 3$ and $K = 4$; therefore, we show the three clustering results (Fig. 4). Clearly the best partition identifies the two species, but also shows admixture in population 13 from Somuncura while population 12 was genetically identical to *F. argentina*. At $K = 3$, populations 13 of Somuncura formed an independent cluster

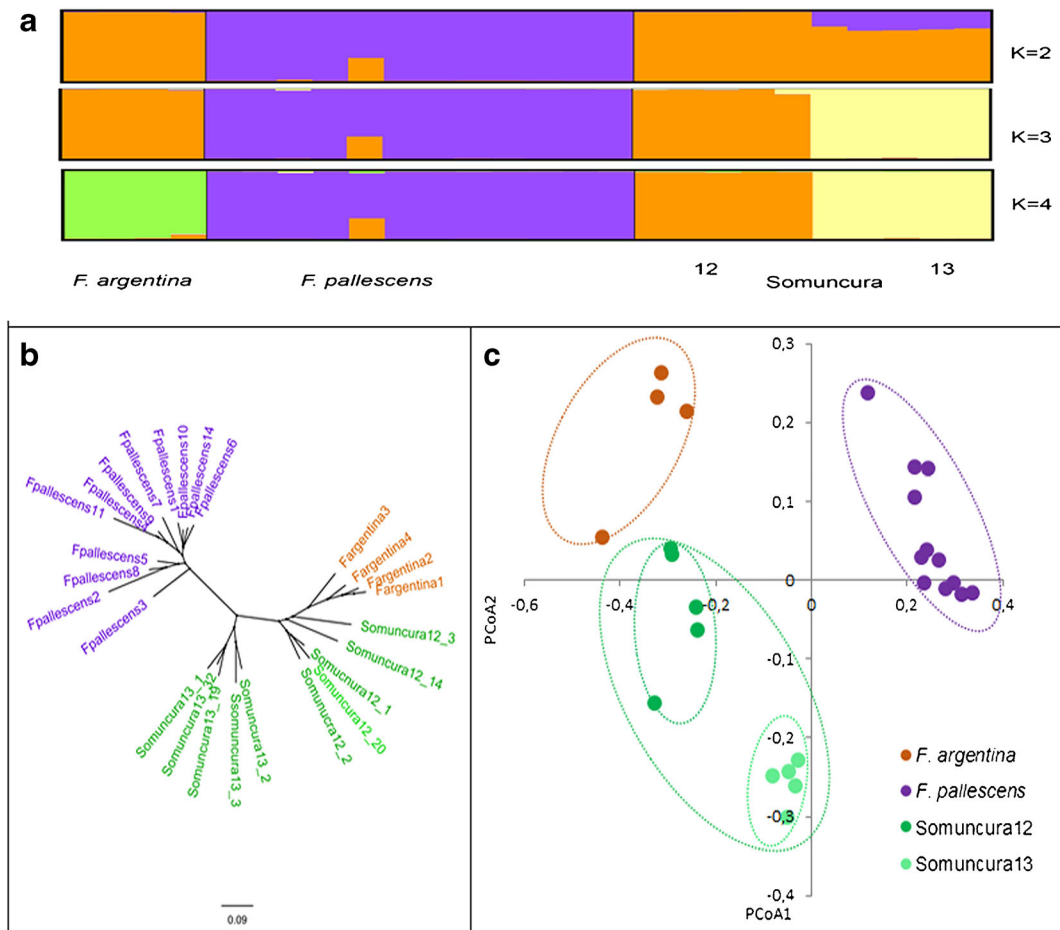


Fig. 4 Analyses with microsatellite loci. **a** – Assignment of the individuals to each of the different clusters ($k = 2$ to $k = 4$) obtained with STRUCTURE; **b** – Radial neighbour-joining tree based in Bruvo distance calculated with the ‘polysat’ package in R; **c** – Principal coordinates analysis based on Bruvo distance for

microsatellite loci. Four groups can be distinguished: Individuals of *F. pallescens* are coloured in violet, *F. argentina* in orange, and Somuncura in dark green (population 12) and light-green (population 13).

whereas population 12 clustered with *F. argentina*. Finally, at $K = 4$ the same four groups as in the PCoA are recovered.

The closeness of population 13 to *F. pallescens* is ought to the presence of a larger proportion of shared alleles (Fig. S4). In general, individuals of Somuncura at some microsatellite loci have at least one allele that was predominant in *F. pallescens* and another that was characteristic of *F. argentina*, indicating possible events of past hybridization between these species. In addition, private alleles were found in both populations of Somuncura.

Discussion

Genetic diversity within peripheral populations

We detected high genetic variation with the three analysed markers within two of the populations sampled at the marginal sites in Somuncura plateau. Peripheral populations usually hold lower levels of genetic diversity (Eckert et al. 2008) because their isolation leads to increasing possibilities of inbreeding and genetic drift. In our study, the conserved ITS region and the plastid marker depicted high levels of variation at these locations, and private alleles were detected with the SSRs. Although concerted evolution is believed to reduce intragenomic variation among copies within the ITS tandem arrays (Liao 1999), some variation still might exist. Therefore, the high level of polymorphism detected among *F. pallescens* from marginal Somuncura populations is outstanding.

Festuca pallescens and *F. argentina* have distinct morphological traits that allow their identification (Catalán and Müller 2012), but they hold large phenotypic variation (Parodi 1953; Nicora 1978; Bertiller et al. 1990; Oliva et al. 1993) that could make them difficult to distinguish. Besides, distinct ecological features characterize each species. *Festuca pallescens* forms large rangelands in Patagonia (e.g. high steppes or grasslands in meadows), reaching high altitudes (0 to 1,800 m asl; Catalán and Müller 2012), while *F. argentina* is generally found in patches within several types of steppes (e.g. shrub-grassy steppes of *Mulinum spinosum* and *Poa ligularis*, or grassy steppes of *F. pallescens* – Bran et al. 2000), usually at altitudes between 270 and 700 m asl (Catalán and Müller 2012). Therefore, the smaller population sizes could contribute to a stronger genetic

drift effect and a higher genetic differentiation in *F. argentina*. In addition, towards the east of the west-east oriented transect, *F. pallescens* populations occur less frequently due to the decline of meadows, being found at high altitudes, where moist conditions prevail (Bertiller et al. 1990; Gaitán et al. 2010). Accordingly, Somuncura populations formed small grass-steppes in these drylands, with scattered individuals within the community that were isolated from other grass steppes.

Phylogenetic relationships and genetic distances indicate that Somuncura populations are closer to the sympatric species *F. argentina* than to other *Festuca pallescens* populations. However, microsatellites allowed a clear distinction from each of the two species as well as between the two populations. Moreover, a considerable degree of admixture was detected in one of the populations, suggesting hybridization (Fig. 4). In addition, morphoanatomical results showed some intermediate traits in the populations of Somuncura together with characters that resemble one of each of the two sympatric species. Furthermore, *F. pallescens* populations from North Patagonia are genetically uniform since a single identical ITS sequence was observed in all samples. On the other hand, Somuncura population are highly variable, showing six ITS sequences among 10 individuals. We also detected a high level of polymorphism in *F. argentina*: Each of the four sampled individuals had a different sequence and we did not find shared chloroplast haplotypes between *F. pallescens* and Somuncura.

In view of the level of differentiation detected in the populations of Somuncura, we might propose three possible alternatives: (a) Somuncura populations are in fact *F. argentina*, (b) they are an ecotype of *F. argentina*, or (c) they are hybrids between *F. pallescens* and *F. argentina* and might be in the process of speciation. Supporting our first hypothesis is the close genetic relationship: all the phylogenetic analyses clustered Somuncura together with *F. argentina* or constituting a polytomy. In addition, the PCoA based on microsatellite data grouped population 12 very closely to *F. argentina* and individuals of Somuncura shared several morphoanatomical traits with *F. argentina*. However, not all the morphoanatomical traits were similar (in fact some resulted intermediate with *F. pallescens*), and we found four haplotypes and a large genetic variation in the nuclear marker among Somuncura individuals. An outstanding difference is the morphology of the lemma: *Festuca argentina* differs from other species of the

genus because of its muticous lemmas (Dubcovsky and Martínez 1988; Catalán and Müller 2012), and Somuncura lemmas had a diminutive awn at lemma apex. This led us to propose our second hypothesis that Somuncura could actually be an ecotype of *F. argentina*, genetically differentiated and morphologically similar to *F. pallescens*. Supporting this alternative hypothesis is the consistent clustering obtained with STRUCTURE, PCoA and Neighbour Joining using the microsatellite loci (Fig. 4) that clearly separated Somuncura populations. Geographically isolated areas lacking competitors could promote the production of adaptive radiations (Simpson 1953, Straud and Losos 2016). In fact, the biogeographic isolation of Somuncura plateau promoted the evolution of different taxa (León et al. 1998; Chebez 2005; Andrade and Monjeau 2014). Therefore, Somuncura populations might be a novel ecotype of *F. argentina* developed in this isolated environment. In order to radiate, a clade should develop ‘key innovations’ (Straud and Losos 2016) that provide the ability to adapt taking advantage of the available resources. As an example, Somuncura populations presented some morphoanatomical traits, such as pulvinus at the base of the lamina and a higher proportion of sclerenchyma under abaxial epidermis than *F. argentina*. Sclerenchyma is a specialized tissue that provides strength and support to leaves, especially in arid conditions with periods of strong water deficit that produce loss of cell turgence, such as the dry, windy environments of Somuncura.

Finally, the presence of shared polymorphic sites between Somuncura and *F. pallescens*, the heterozygous positions between *F. pallescens* and *F. argentina*, the shared alleles at microsatellite loci and the intermediated morphoanatomical traits, suggests a possible hybridization process. The closeness of Somuncura populations to *F. argentina* could be due to a long-lasting backcrossing towards this species. Somuncura populations occur in steppes at 900–1,100 m asl where *F. pallescens* is abundant (Andrade and Monjeau 2014). On the contrary, *F. argentina* is a dominant species in shallow soil steppes at lower elevations (e.g. slopes of the plateau; León et al. 1998; D. Bran, personal communication). Therefore, this difference in altitudinal zonation among the predominant niches of each species might currently create a barrier to reproduction, but in the past their distributions could have overlapped, promoting hybridization and backcrosses between the hybrid and *F. argentina*. In spite of being outcrossing

species, the differences in ploidy levels (*F. pallescens* 6x; *F. argentina* 4x – Dubcovsky and Martínez 1991, 1992) might limit their successful reproduction. Inter-specific hybridization between species with different ploidy levels is uncommon, but possible and it was reported in this genus. For example, *F. arundinacea* (allohexaploid) is the result of the cross between the diploid *F. pratensis* and the allotetraploid *F. jenas* (Inda et al. 2014). In addition, the *Lolium-Festuca* complex, obtained from more distantly related ryegrass and fescue species, proved to be a useful combination of traits and resulted in stable and successful commercial varieties (Thomas and Humphreys 1991). Another example is the pentaploid *Paspalum durifolium*, which shares intermediate morphological and reproductive characters with its tetraploid and hexaploid progenitors, but produces a small amount of seeds, mainly due to genetic instability after irregular meiotic behaviour (Quarín and Caponio 1995).

Phylogenetic analyses do not fully support that *F. pallescens* and *F. argentina* would be the parental species of the putative hybrid, and we cannot discard the existence of other non-sampled potential parental species in Somuncura. Besides, even though *F. pallescens* and *F. argentina* coexists at some locations along their natural distribution ranges, to the best of our knowledge, natural hybridization has never been reported. Cytogenetic studies are necessary to further evaluating the possible hybridization and introgression between the two fescues. Therefore, with the evidence of our data, we suggest that Somuncura populations could be an ecotype of *F. argentina* originated by an ancient hybridization and subsequent introgression, that generally differs exomorphologically in its glaucous leaves, lemmas with short awns and presence of pulvinus in leaf base, in which characters it is similar to *F. pallescens*.

Festuca pallescens and Somuncura Populations within the *Festuca* sp. phylogeny

The genus *Festuca* has been studied for a long time (Torrecilla and Catalán 2002; Torrecilla et al. 2003; Catalán et al. 2004; Inda et al. 2008; Minaya et al. 2017), but knowledge about phylogenetic relationships of Patagonian fescues is scarce (Oliva et al. 1993), and particularly *F. pallescens* was never included in the published phylogenies. Most studies in Patagonian fescues focused on cytogenetics (Dubcovsky and Martínez 1988, 1991, 1992) and physiology (Bertiller et al. 1990;

Bertiller and Defossé 1990). Therefore, our results provide novel information about the genetic relationships of *F. pallescens* with the rest of the studied South American fescues.

The state-of-the-art phylogeny of *Festuca* recognizes 23 clades (Inda et al. 2014). The Patagonian species *F. subantarctica* and *F. purpurascens* belong to America I clade (Inda et al. 2008) as part of the *fine leaved* clade (Catalán et al. 2004). Our results showed that *F. pallescens* is strongly related to these two species as they formed a sister clade in the nuclear Bayesian topology and constituted a polytomy (i.e. high genetic similarity) in MP topology. However, these results are not concordant with phenetic and cytological studies (Dubcovsky and Martínez 1988, 1991) which do not relate *F. pallescens* to *F. purpurascens*. Moreover, the three species have different but overlapping distribution areas: *F. subantarctica* was described in Lago Argentino, Santa Cruz (Inda et al. 2008), *F. purpurascens* is found in the Andes, from Neuquén to Santa Cruz, and *F. pallescens* occurs from Neuquén to Coyle River in Santa Cruz (Nicora 1978). Increasing sampling of Patagonian fescues could help to resolve the polytomy.

On the other hand, the Somuncura-*F. argentina* clade is closely related to the Asian-American clade, specially to North-American fescues, and very distant from currently studied Patagonian and Andean fescues (Inda et al. 2008). Also, Somuncura and *F. argentina* formed a polytomy, which could be due to the genetic similarities between the sequences, the existence of hybridization that triggers adaptive radiation (Seehausen 2004) or the lack of concerted evolution (Bailey et al. 2003). Somuncura and *F. argentina* are more closely related to some North-American fescues (*F. subulata*, *F. dichoclada*, *F. kingii* and *F. altaica*; Fig. 2). They are also associated with *F. breviglumis* and *F. amplissima* (both from Mexico) as well as to *F. modesta* (an Asian fescue; Fig. 3). Moreover, *F. argentina* has been classified as a *broad-leaved* fescue (see Inda et al. 2008 and references within). However, Somuncura and *F. argentina* were also closed to *F. subulata* and *F. altaica*. These fescues were described as *broad-to-fine-leaved* fescues representing a transition between the two main groups. The broad-leaved trait seems to be a plesiomorphic character (Catalán et al. 2007) suggesting either an ancient origin of *Festuca*

argentina or a recent species with an ancestral character. Broad-leaved species undergo multiple radiations from the center of origin that involved differentiation from its ancestors due to climatic changes that occurred 12 My ago (Inda et al. 2008). Arid and semi-arid regions of Argentina are susceptible to climatic fluctuation (Zárate and Tripaldi 2012), and the environmental constraints in Somuncura plateau could have promoted the high genetic variation detected within those populations and triggered a speciation process in the Somuncura-*F. argentina* clade. On the other hand, hybridization and polyploidization events allowed the colonization of newly arid areas during the glacial and interglacials periods of the Pleistocene in the South American hemisphere (Dubcovsky and Martínez 1992; Hewitt 1996). Although, sampling of this work is restricted to North-Patagonia, it could be possible that *F. pallescens* had originated during that geological period in Patagonia, as it has been proposed for the polyploid American clades I and II (Inda et al. 2008).

Conclusion

The high genetic variability observed in two populations within the protected area at Somuncura plateau might be indicating the existence of evolutionary processes that could trigger events of speciation in the Patagonian fescues. In spite of having intermediate morphoanatomical traits and shared alleles with *F. pallescens*, most evidences indicate that Somuncura populations do not correspond to *F. pallescens*. Although more studies are needed to unravel the phylogenetic relationships among the Patagonian fescues, Somuncura populations might be an ancient introgression that lead to a morphologically and genetically differentiated ecotype of *F. argentina* (i.e. a narrow endemism; Kruckeberg and Rabinowitz 1985). Our results also suggest that an incipient speciation process within the genus could be occurring in this isolated biogeographical island. The correct identification of field specimens is clearly mandatory for conservation and management purposes, especially for forage species that are an invaluable resource in natural rangelands of Patagonia. Here we provide a tool to help in the molecular identification of the key species *F. pallescens*.

Acknowledgements We are grateful to H. Moraga and C. Fariña for their invaluable help on fieldwork, F. Umaña for helping with the assembly of Fig. 1 using QGIS, and R. Vidal Russel for helpful discussions on the interpretation of phylogenetic analyses. We specially thank Dr. Cecilia Ezcurra for assisting with the morphoanatomical description of the species and revision of the manuscript. We acknowledge the valuable comments of two anonymous reviewers that greatly improved the first version of this manuscript. This project was financed by PN 1126072 (INTA) and PICT-2012-1392 (Agencia Nacional de Promoción Científica y Técnica). AL was supported by a fellowship from CONICET.

References

- Aguiar MR, León RJ (1985) Sheep grazing causes important disturbances in western Patagonian semi-arid grasslands. *Phytocoenologia* 13:181–196
- Andrade A, Monjeau A (2014) Patterns in community assemblage and species richness of small mammals across an altitudinal gradient in semi-arid Patagonia, Argentina. *J Arid Environm* 106:18–26
- Asner GP, Elmore AJ, Olander LP, Martin RE, Harris AT (2004) Grazing systems, ecosystem responses, and global change. *Annual Rev Environm Res* 29:261–299
- Bailey CD, Carr TG, Harris SA, Hughes CE (2003) Characterization of angiosperm nrDNA polymorphism, paralogy, and pseudogenes. *Molec Phylogen Evol* 29:435–455
- Bandelt HJ, Forster P, Röhl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molec Biol Evol* 16:37–48
- Bertiller MB (1990) Grazing effects on sustainable semiarid rangeands in Patagonia: the state and dynamics of the soil seed bank. *Environm Managem* 20:123–132
- Bertiller MB, Defossé GE (1990) Grazing and plant growth interactions in a semiarid *Festuca pallescens* grassland (Patagonia). *J Range Managem* 43:300–303
- Bertiller MB, Elissalde NO, Rostagno CM, Defossé GE (1993) Environmental patterns and plant distribution along a precipitation gradient in western Patagonia. *J Arid Environm* 29: 85–97
- Bertiller MB, Irisarri MP, Ares JO (1990) Phenology of *Festuca pallescens* in Relation to Topography in North-Western Patagonia. *J Veg Sci* 1:579–584
- Bran D, Ayesa J, López C (2000) *Regiones ecológicas de Río Negro*. Comunicación Técnica N° 59 EEA INTA San Carlos de Bariloche – Río Negro, Argentina
- Breitman MF, Martínez RJN, Avila LJ, Sites JW, Morando M (2015) Phylogeography and morphological variation of the northernmost distributed species of the *Liolaemus lineomaculatus* section (Liolaemini) from Patagonia. *Amphibia-Reptilia* 36:373–387
- Bruvo R, Michiels NK, D'Souza TG, Schulenburg H (2004) A simple method for the calculation of microsatellite genotype distances irrespective of ploidy level. *Molec Ecol* 13:2101–2106
- Busso CA, Bonvissuto GL (2009) Soil seed bank in and between vegetation patches in arid Patagonia, Argentina. *Environm Exp Bot* 67:188–195
- Burkart R, Bárbaro NO, Sánchez RO, Gómez DA (1999) Ecoregiones de la Argentina. *Administración de Parques Nacionales*, Argentina. 43pp
- Catalán P, Müller J (2012) *Festuca* L. In Zuloaga FO, Rugolo ZE, Anton AMR (eds) *Flora de Argentina*, vol 3, (II). CONICET, Buenos Aires, Argentina, pp 219–250
- Catalán P, Torrecilla P, Lopez-Rodriguez JA, Muller J, Stace CA (2007) A systematic approach to subtribe Loliinae (Poaceae: Pooideae) based on phylogenetic evidence. *Aliso: J Syst Evol Bot* 23:380–405
- Catalán P, Torrecilla P, Rodríguez JÁL, Olmstead RG (2004) Phylogeny of the festucoid grasses of subtribe Loliinae and allies (Poeae, Pooideae) inferred from ITS and trnL-F sequences. *Molec Phylogen Evol* 31:517–541
- Cei, J. M. (1969) The patagonian telmatobiid fauna of the volcanic Somuncura Plateau of Argentina. *J Herpetol* 3:1–18.
- Cei JM, Scolaro JA (1981) A new northern subspecies of *Liolaemus kingi* in Argentina. *J Herpetol* 15:207–210
- Chapin III FS (1993) Functional role of growth forms in ecosystem and global processes. *Scaling Physiol. Process Leaf Globe* 287–312.
- Chebez JC (2005) Guía de las reservas Patagonia Norte I, Ed. Albatros
- Clark LV, Jasieniak M (2011) Polysat: an R package for polyploid microsatellite analysis. *Molec Ecol Resources* 11:562–566
- Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature, Meth* 9:772–772
- Davies J, Poulsen L, Schulte-Herbrüggen B, Mackinnon K, Crawhall N, Henwood WD, et al (2012) Conserving Dryland Biodiversity. pp 84
- Dixon CJ (2010) OLFinder - a program which disentangles DNA sequences containing heterozygous indels. *Molec Ecol Resources* 10:335–340
- Doyle J, Doyle J (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* 19:11–15
- Dubcovsky J, Martínez A (1988) Phenetic relationships in the *Festuca* spp. from Patagonia. *Canad J Bot* 66:468–478
- Dubcovsky J, Martínez AJ (1991) Chromosome complement and nucleoli in the *Festuca pallescens* alliance from South America. *Canad J Bot* 69:2756–2761
- Dubcovsky J, Martínez AJ (1992) Cytotaxonomy of the *Festuca* spp. from Patagonia. *Canad J Bot* 70:1134–1140
- Earl DA, vonHoldt BM (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv Genet Resources* 4:359–361
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: the central-marginal hypothesis and beyond. *Molec Ecol* 17:1170–1188
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molec Ecol* 14:2611–2620
- Flint RF, Fidalgo F (1964) Glacial geology of the East flank of the Argentine Andes between Latitude 39°10'S. and Latitude 41°20'S. *Bull Geol Soc Amer* 75:335–352

- Fu YB, Qiu J, Peterson GW, Willms WD, Wilmshurst JF (2006) Characterization of microsatellite markers for rough fescue species (*Festuca* spp.). *Molec Ecol Notes* 6:894–896
- Gaitán JJ, López CR, Bran DE (2010) Vegetation composition and its relationship with the environment in mallines of north Patagonia, Argentina. *Wetlands Ecol Managem* 19:121–130
- Golluscio RA, Deregibus VA, Paruelo JM (1998) Sustainability and range management in the Patagonian steppes. *Ecol Austral* 8:265–284
- Gonzalo-Turpin H, Hazard L (2009) Local adaptation occurs along altitudinal gradient despite the existence of gene flow in the alpine plant species *Festuca eskia*. *J Ecol* 97:742–751
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O (2010) New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic acids symposium series. pp 95–98
- Hewitt GM (1996) Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol J Linn Soc* 58: 247–276
- Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG and Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *Int J Climatol* 25:1965–1978
- Hoffmann AA, Blows MW (1994) Species borders: ecological and evolutionary perspectives. *Trends Ecol Evol* 9:223–227
- Hoffmann AA, Hercus MJ (2000) Environmental stress as an evolutionary force. *BioScience* 50:217
- Inda LA, Sanmartín I, Buerki S, Catalán P (2014) Mediterranean origin and Miocene-Holocene Old World diversification of meadow fescues and ryegrasses (*Festuca* subgenus *Schedonorus* and *Lolium*). *J Biogeogr* 41:600–614
- Inda LA, Segarra-Moragues JG, Müller J, Peterson PM, Catalán P (2008) Dated historical biogeography of the temperate Lolinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Molec Phylogen Evol* 46:932–957
- Jensen LB, Holm PB, Lübberstedt T (2007) Cross-species amplification of 105 *Lolium perenne* SSR loci in 23 species within the Poaceae. *Molec Ecol Notes* 7:1155–1161
- Johansen-Morris AD, Latta RG (2008) Genotype by environment interactions for fitness in hybrid genotypes of *Avena barbata*. *Evol. Int J Organic Evol* 62:573–585
- Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I (2015) Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Molec Ecol Resources* 15:1179–1191
- Kruckeberg AR, Rabinowitz D (1985) Biological aspects of endemism in higher plants. *Annual Rev Ecol Syst* 16:447–479
- Larsson A (2014) AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics* 30: 3276–3278
- Lauvergeat V, Barre P, Bonnet M, Ghesquiere M (2005) Sixty simple sequence repeat markers for use in the *Festuca-Lolium* complex of grasses. *Molec Ecol Notes* 5:401–405
- León RJ, Bran D, Collantes M, Paruelo JM, Soriano A (1998) Grandes unidades de vegetación de la Patagonia extra andina. *Ecol Austral* 8:125–144
- Liao D (1999) Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications. *Amer J Human Genet* 64:24–30
- López A, Siffredi GL, Becker G, López DR, Marchelli P (2015) Assessing genetic diversity in *Festuca pallescens* along a rainfall gradient in Nord Patagonia. In *5th International Congress of Forage Breeding*. October 2015. Buenos Aires, Argentina.
- Maestre FT, Salguero-Gómez R, Quero JL (2012) It is getting hotter in here: determining and projecting the impacts of global environmental change on drylands. *Philos Trans, Ser B* 367:3062–3075
- Malumián N, Nández C (2011) The Late Cretaceous-Cenozoic transgressions in Patagonia and the Fuegian Andes: foraminifera, palaeoecology, and palaeogeography. *Biol J Linn Soc* 103:269–288
- Martínez-Palacios A, Eguiarte LE, Furnier GR (1999) Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *Amer J Bot* 86:1093–1098
- Millennium Ecosystem Assessment Panel (2005) *Ecosystems and human well-being*. Washington DC
- Minaya M, Hackel J, Namaganda M, Brochmann C, Vorontsova MS, Besnard G, Catalán P (2017) Contrasting dispersal histories of broad- and fine-leaved temperate Lolinae grasses: range expansion, founder events, and the roles of distance and barriers *J Biogeogr* 4:1980–1993
- Muzón J, Spinelli GR, Pessacq P, Von Ellenrieder N, Estevez AL, Marino PI, Pérez Goodwyn PJ, Angrisano EB, Díaz F, Fernández LA (2005) Insectos acuáticos de la meseta del Somuncurá, Patagonia, Argentina. Inventario preliminar. *Rev Soc Entomol Argent* 64:47–68
- Nicora, E G (1978) Gramineae In Correa MN (ed.) *Flora patagónica 3*. Colección Científica del INTA, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. ed. Buenos Aires, Argentina
- Oliva G, Martínez A, Collantes M, Dubcovsky J (1993) Phenotypic plasticity and contrasting habitat colonization in *Festuca pallescens*. *Canad J Bot* 71:970–977
- Palazzesi L, Barreda VD, Cuitiño JL, Guler MV, Tellería MC, Ventura Santos R (2014) Fossil pollen records indicate that Patagonian desertification was not solely a consequence of Andean uplift. *Nature, Commun* 5
- Paradis E, Claude J, Strimmer K (2004) APE: Analyses of phylogenetics and evolution in R language. *Bioinformatics* 20: 289–290
- Parodi, L.R. 1953. Las especies de *Festuca* de la Patagonia. *Revista Argent Agron* 20:177–229
- Paruelo J, Bertiller M, Schlichter T, Coronato F (1993) *Secuencias de deterioro en distintos ambientes patagónicos: Su caracterización mediante el modelo de estados y transiciones*. San Carlos de Bariloche: INTA-GTZ Proyecto LUDEPA-SME
- Pastorino MJ, Gallo LA (2002) Quaternary evolutionary history of *Austrocedrus chilensis*, a cypress native to the Andean-Patagonian forest. *J Biogeogr* 29:1167–1178
- Polzin T, Daneschmand SV (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Operat Res Lett* 31:12–20
- Porras-Hurtado L, Ruiz Y, Santos C, Phillips C, Carracedo A, Lareu M (2013) An overview of STRUCTURE: applications, parameter settings, and supporting software. *Frontiers in Genetics*, 4(98). doi:10.3389/fgene.2013.00098

- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Molec Biol Evol* 25:1253–1256
- Premoli AC, Mathiasen P, Acosta MC, Ramos VA (2012) Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be? *New Phytol* 193:261–275
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959
- Quarin CL, Caponio I (1995) Cytogenetics and reproduction of *Paspalum dasypleurum* and its hybrids with *P. urvillei* and *P. dilatatum* ssp. *flavescens*. *Int J Pl Sci* 156:232–235
- Rabassa J (2008) Late Cenozoic Glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego. In J. Rabassa (Ed.), *Developments in Quaternary Sciences*, 11: 151–204
- Rabassa J, Coronato A, Martínez O (2011) Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biol J Linn Soc* 103:316–335
- R Core Team (2013) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available at <http://www.R-project.org>
- Reynolds JF, Smith DMS, Lambin EF, Turner BL, Mortimore M, Batterbury SPJ, et al. (2007) Global desertification: building a science for dryland development. *Science* 316:847–851
- Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, et al (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Syst Biol* 61:539–542
- Sala OE, Stuart Chapin F, Armesto JJ, Berlow E, Bloomfield J, Dirzo R, Huber-Sanwald E, Huenneke LF, Jackson R B, Kinzig A, Leemans R, Lodge DM, Mooney HA, Oesterheld M, Poff N, Sykes MT, Walker BH, Walker M, Wall DH (2000) Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. *Science*, 287 (5459): 1770–1774. doi:[10.1126/science.287.5459.1770](https://doi.org/10.1126/science.287.5459.1770)
- Seehausen O (2004) Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol Evol* 19:198–207
- Simpson GG (1953) *The major features of evolution*. New York: Columbia Univ. Press
- Straud JT and Losos JB (2016) Ecological opportunity and adaptive radiation. *Annual Rev Ecol Evol Syst* 47:507–32
- Stucky BJ (2012) SeqTrace: a graphical tool for rapidly processing DNA sequencing chromatograms. *J Biomolec Technol* 23: 90–93
- Swofford DL (2003) PAUP. Phylogenetic analysis using parsimony (and other methods). Version 4. Sinauer Associates
- Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J (1991) Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Pl Molec Biol* 17:1105–1109
- Thomas H, Humphreys MO (1991) Progress and potential of interspecific hybrids of *Lolium* and *Festuca*. *J Agric Sci* 117:1–8
- Thompson JD, Gaudeul M, Debussche M (2010) Conservation value of sites of hybridization in peripheral populations of rare plant species. *Conservation Biol* 24:236–245
- Torrecilla P, Catalán P (2002) Phylogeny of broad-leaved and fine-leaved *Festuca* lineages (Poaceae) based on nuclear ITS sequences. *Syst Bot* 27:241–251
- Torrecilla P, Rodríguez JAL, Stančík D, Catalán P (2003) Systematics of *Festuca*. *Pl Syst Evol* 239:113–139
- Zárate MA, Tripaldi A (2012) The aeolian system of central Argentina. *Aeolian Res* 3:401–417
- Wright S, Keeling J, Gillman L (2006) The road from Santa Rosalia: a faster tempo of evolution in tropical climates *Proc Natl Acad Sci USA* 103:7718–7722