

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**ESTRUCTURACIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD  
GENÉTICA DE *ILEX PARAGUARIENSIS* St. Hil. EN EL  
URUGUAY**

**por**

**Pablo Andrés HERNÁNDEZ OLVEYRA**

TESIS presentada como uno de los  
requisitos para obtener el título de  
*Magister* en Ciencias Agrarias  
opción Ciencias Vegetales

MONTEVIDEO

URUGUAY

octubre de 2019

Tesis aprobada por el tribunal integrado por la Dra. Alexandra Gottlieb, el Dr. Arley Camargo y el Dr. Alejandro Brazeiro \_\_\_\_ de octubre de 2019.

Autor: Ing. Agr. Pablo Hernández.

Director Dr. Pablo Speranza. \_\_\_\_\_.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo de investigación fue apoyado por el Departamento de Biología Vegetal de la Facultad de Agronomía de la Universidad de la República (Udelar).

Y quisiera expresar mi más profundo agradecimiento:

A la Ing. Agr. Gabriela Jolochin, el Ing. Agr. Andrés Berrutti, el Ing. Agr. Andrés Gonzales, el Ing. Agr. Iván Grela, el Ing. Agr. Eduardo Marchesi, el Ing. Agr. Joaquín Garrido y al Sr. Alberto Demicheli por su conocimiento y colaboración en las salidas de campo para la búsqueda de las poblaciones naturales de “Yerba mate”. También, al Ing. Agr. Pablo Sandro, la Dra. Magdalena Vaio y al personal del Laboratorio de Evolución y Domesticación de Plantas de la Facultad de Agronomía - Udelar por el apoyo permanente.

A la Dra. Alexandra Gottlieb, al Dr. Arley Camargo, Dr. Alejandro Brazeiro y la Dra. Paola Gaiero, por sus comentarios, sugerencias y por aceptar ser parte en esta etapa en mi formación académica.

Al Ing. Agr. Dr. Pablo Speranza, por su guía incondicional y enseñanzas durante el transcurso de este trabajo.

A Wilson, Álvaro y Ton, por todo lo demás.

## TABLA DE CONTENIDO

<b><u>AGRADECIMIENTOS</u></b> .....	<b>III</b>
<b><u>RESUMEN</u></b> .....	<b>VI</b>
<b><u>SUMMARY</u></b> .....	<b>VII</b>
<b><u>1. INTRODUCCIÓN</u></b> .....	<b>1</b>
1.1 RESEÑA HISTÓRICA SOBRE LA YERBA MATE.....	1
1.2 USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA, SOCIAL Y CULTURAL DE <i>ILEX</i> <i>PARAGUARIENSIS</i> .....	2
1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE <i>ILEX PARAGUARIENSIS</i> A. ST.-HIL.....	4
1.4 EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA YERBA MATE .....	5
1.5 DESCRIPCIÓN DEL GERMOPLASMA DE <i>I. PARAGUARIENSIS</i> ST. HIL. UTILIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DE YERBA MATE .....	7
1.6 PERSPECTIVAS .....	9
1.7 HIPÓTESIS PLANTEADAS.....	10
1.8 OBJETIVOS .....	10
<b><u>2. ESTRUCTURACIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA</u></b> <b><u>DE ILEX PARAGUARIENSIS ST. HIL. EN EL URUGUAY</u></b> .....	<b>11</b>
2.1 RESUMEN .....	11
2.2 SUMMARY .....	12
2.3 INTRODUCCIÓN .....	14
2.4 MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
2.4.1 <u>Material vegetal</u> .....	19
2.4.2 <u>Prospección y colecta de las poblaciones</u> .....	19
2.4.3 <u>Amplificación, secuenciación y etiquetado de los microsatélites</u> <u>cloroplásticos</u> .....	21
2.4.4 <u>Procesamiento y análisis de los datos</u> .....	22
2.5 RESULTADOS.....	24
2.5.1 <u>Haplotipos encontrados y sus frecuencias para las poblaciones</u> <u>colectadas</u> .....	24

2.5.2	<u>Grupos detectados utilizando GENELAND .....</u>	<u>26</u>
2.5.3	<u>Haplotipos observados en las poblaciones de Uruguay son divergentes .....</u>	<u>27</u>
2.6	<u>DISCUSIÓN .....</u>	<u>30</u>
2.6.1	<u>Variabilidad registrada en este trabajo para las poblaciones de <i>I. paraguariensis</i> en el Uruguay.....</u>	<u>30</u>
2.6.2	<u>Estructuración geográfica de la variabilidad de <i>I. paraguariensis</i> a lo largo de su distribución natural.....</u>	<u>31</u>
2.6.3	<u>Ausencia de migración de semilla entre poblaciones cercanas e implicancias .....</u>	<u>33</u>
2.7	<u>CONCLUSIONES .....</u>	<u>35</u>
2.8	<u>REFERENCIAS.....</u>	<u>37</u>
<b>3.</b>	<b><u>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES .....</u></b>	<b><u>43</u></b>
<b>4.</b>	<b><u>BIBLIOGRAFÍA .....</u></b>	<b><u>48</u></b>

## RESUMEN

*Ilex paraguariensis* St. Hil. es una planta subtropical perteneciente a la familia Aquifoliaceae, posee follaje siempre verde, porte arborescente y es longeva. Su distribución natural abarca los territorios de Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. Es una especie de gran interés social, cultural y comercial porque con sus hojas se elabora la yerba, principal ingrediente del “Mate” o “Tereré”. En Uruguay las poblaciones naturales de *I. paraguariensis* representan el límite sur de la distribución de la especie, localizándose en áreas de refugio o “Hot Spots” ubicadas en el norte y este del país. Se tiene escasa información sobre el número, localización y tamaño de las poblaciones uruguayas, así como de su diversidad genética, pero se cree que pueden aportar variantes de interés para el mejoramiento y conservación de la especie. Es el propósito de este trabajo relevar y georeferenciar las poblaciones de *I. paraguariensis* en el territorio uruguayo, evaluar la estructuración geográfica de la variabilidad haplotípica en dicho territorio y analizar la diferenciación entre las posibles poblaciones bajo la hipótesis de que es alta comparada con la encontrada en el resto de su distribución natural. Para ello, se procedió a obtener el ADN de 273 individuos georeferenciados distribuidos a lo largo de 14 sitios de colecta en bosques relictuales de Uruguay, agregando 4 muestras de Argentina, Brasil y Paraguay. Se seleccionó marcadores informativos para las poblaciones colectadas a partir de un conjunto de 30 microsatélites cloroplásticos y se correlacionó la información obtenida con la ubicación geográfica. Las poblaciones uruguayas aparecen altamente estructuradas y diferenciadas de las muestras obtenidas de poblaciones de Paraguay, Argentina y Brasil. Este trabajo ha obtenido información nueva que valoriza el germoplasma existente en las poblaciones de yerba mate nativas de Uruguay. Los resultados obtenidos permiten inferir diferenciación genética significativa y ausencia de flujo de semillas entre poblaciones con importantes implicancias para la conservación y exploración del germoplasma y suman evidencia acerca del panorama que se viene conformando sobre la biogeografía de la región en la que se encuentra Uruguay.

**Palabras clave:** Yerba mate, mejoramiento forestal, biogeografía, genética del paisaje, conservación.

## SUMMARY

### **Geographic structuring of genetic variation of *Ilex paraguariensis* St. Hil. in Uruguay**

*Ilex paraguariensis* St. Hil. is an evergreen, long-lived tree, belonging to the family Aquifoliaceae. Its natural distribution comprises humid-subtropical areas of Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay. It is a species of major social, cultural and economic value because its ground leaves are used to prepare traditional beverages like "Mate" or "Tereré. Uruguayan natural populations of *I. paraguariensis* are located in refuge areas or "Hot Spots" in the north and east of the country. They represent the southern limit of the species distribution. There is scarce information about the number, location and size of Uruguayan populations, as well as their genetic diversity, but it is believed that they can provide variants of interest for the improvement and conservation of the species. The objectives of this work are to locate and georeference *I. paraguariensis* populations in the Uruguayan territory, to prove that there is geographical structure of the haplotypic variability across Uruguay and to show that differentiation among those populations is high compared to that found in the rest of its natural distribution. To test these hypotheses, we obtained DNA of 273 georeferenced individuals from 14 collection sites in relict forests of Uruguay, adding 4 samples from Argentina, Brazil and Paraguay. A set of 30 chloroplastic microsatellites were screened to obtain informative markers for the sampled populations and the information obtained was correlated with the geographical location. Results showed Uruguayan populations were highly structured and differentiated from the samples obtained from populations of Paraguay, Argentina and Brazil. This work represents new information that valorizes existing germplasm in the native yerba mate populations of Uruguay. The results strongly suggest clear genetic differentiation and absence of seed flow among populations with important implications for the conservation and exploration of germplasm. This work introduces novel information that valorizes existing germplasm in the native yerba mate populations of Uruguay and adds evidence towards a modern perspective about the biogeography of the region in which Uruguay is located.

**Keywords:** Yerba mate, forest improvement, biogeography, landscape genetics, conservation

## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1 RESEÑA HISTÓRICA SOBRE LA YERBA MATE

Aunque no existe registros arqueológicos del consumo de mate en tiempos precolombinos, se entiende que quienes traspasaron su consumo a los primeros colonos españoles fueron los nativos guaraníes, lo que se deduce del hecho de que los primeros registros que se tiene del cultivo de yerba mate son por parte de los jesuitas en las misiones hacia el año 1670. Además, con el transcurso del tiempo la producción de yerba mate se convirtió en una de las principales fuentes de ingreso de las misiones. Con la expulsión de los jesuitas de los dominios españoles en el año 1767, la yerba mate dejó de ser cultivada y su aprovechamiento pasó a hacerse casi exclusivamente de forma extractiva a partir de los yerbales del monte nativo hasta las primeras décadas del siglo XX. En el año 1897 se reiniciaron con éxito las plantaciones de yerba mate en las localidades de Nueva Germania, en Paraguay, y Santa Ana, en Argentina por causa de la demanda generada por los habitantes de la región. Durante este largo período la plantación de la yerba mate no desapareció completamente. Durante el resto del período colonial, el consumo de yerba mate estaba muy extendido y se mantuvo en otras regiones como la del Virreinato del Perú. Durante este período, se comprobó que el tráfico de la yerba mate se mantuvo, y que su empleo en lo que es en la actualidad territorio de Perú y Ecuador era habitual. Pero finalmente, tras la independencia de las colonias españolas y la adopción del libre comercio en esa región, el consumo de mate terminó por desaparecer tras la entrada del té de la china que se puso de moda. Hacia 1820, los yerbales entraron en decadencia por causa de la devastación generada por guerras entre la corona española y portuguesa, las guerras de independencia, y la instauración de una política de aislamiento y control del comercio internacional mantenida por el primer gobernante del Paraguay independiente, favoreciendo entonces el comienzo de la explotación de los yerbales naturales en Brasil. En esas fechas, la yerba brasileña comenzó a distribuirse en los mercados como yerba de Paranaguá, teniendo mejor aceptación que la yerba de Paraguay porque se suponía de mejor calidad; esto sumado a la devastación generada

por la guerra de la Triple Alianza en Paraguay hacia 1870, llevó a que el producto brasilero terminara por sustituir al paraguayo por completo. Finalmente hacia fines del siglo XIX, a causa de la merma en la calidad y cantidad de producto generada por la explotación exhaustiva de los yerbaes nativos, se comienza nuevamente a realizar plantaciones de *I. paraguariensis*, en los territorios de Brasil, Paraguay y sobre todo de Argentina (Giberti, 1992).

## 1.2 USOS E IMPORTANCIA ECONÓMICA, SOCIAL Y CULTURAL DE *Ilex paraguariensis*

*Ilex paraguariensis* es la especie sudamericana del género *Ilex* que tiene mayor importancia económica ya sea considerada como explotada o cultivada, porque suministra la materia prima para la elaboración de la bebida vigorizante extremadamente popular en Sudamérica llamada “mate” o “tereré,” según se prepare con agua caliente o fría. Esta bebida se prepara por infusión de las hojas molidas con agua y tiene un porcentaje de cafeína que va de 0.5 a 2.0 del peso seco (Giberti, 1979). Si bien el uso más antiguamente documentado de *I. paraguariensis* es para la elaboración del “mate” (González Torres, 1992), también tuvo históricamente otra multiplicidad de usos al ser empleada como analgésico, diurético, antiulceroso, antirreumático, digestivo y como materia prima para la elaboración de tinturas (Martínez Crovetto, 1980). Las formas más populares de preparar la bebida energizante a partir de las hojas de *I. paraguariensis* son la infusión y el cocimiento. La infusión o “mate cebado” se prepara en un recipiente especial (una calabaza) denominado “mate” donde la yerba mate se macera con agua caliente y luego se sorbe utilizando una bombilla. El cocimiento se denomina “mate cocido” y consiste en una infusión de “yerba mate” con agua a temperatura cercana a la ebullición de forma similar a como se prepara el té de la India. En algunas regiones de Paraguay y de Misiones, se prepara una infusión llamada “tereré”, donde la yerba mate se deja macerar en agua fría (Bracesco *et al.*, 2011). Junto con su uso para la elaboración de bebidas tradicionales, a principios del siglo XXI, *I. paraguariensis* adquiere gran cantidad de usos nuevos como la fabricación de alimentos, productos farmacéuticos y cosméticos (Vieira *et al.*, 2008). Desde comienzos de este siglo ha surgido gran

cantidad de bibliografía citando múltiples beneficios de la yerba mate para la salud entre los que se destacan, la reducción de la presión arterial, la restauración del adecuado metabolismo lipídico, propiedades antiglicémicas y la reducción del apetito (Bastos *et al.*, 2007; Heck y de Mejia, 2007). Finalmente cabe destacar que *I. paraguariensis* fue utilizada como materia prima para la obtención industrial de cafeína hasta la mitad del siglo XX, la cual era extraída por arrastre con vapor de agua de los brotes tiernos de la planta (Martinez Crovetto, 1980).

Los principales consumidores mundiales de la yerba mate se encuentran en la zona de distribución geográfica natural de la especie, siendo Uruguay el principal país consumidor (RAU, 2000). El comercio de yerba mate es muy importante en América del Sur, siendo Argentina el primer exportador mundial de yerba mate, mientras que Uruguay es el país que tiene el mayor consumo de yerba mate per cápita, con un consumo de 6 a 8 kg de yerba/habitante/año, seguido por Argentina con un consumo de 5 kg de yerba/habitante/año, mientras que Brasil tiene un consumo mucho menor dado que solo en tres estados se consume yerba mate, aunque más del 70% de la población masculina de los estados de Rio Grande do Sul, Santa Catarina y Paraná beben mate diariamente (Bracesco *et al.*, 2011). Uruguay es el único país de la región donde no existen plantaciones comerciales. A partir de estudios preliminares realizados por Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), la yerba mate surge como una especie nativa de interés para la investigación dado su potencial productivo en nuestro país (Bennadji *et al.* 2007).

El mate además, tiene un rol social muy importante, el acto de compartirlo tiene connotaciones similares a las que tiene la tradicional ceremonia del té en las culturas de Asia oriental. Por otra lado, la producción de la yerba mate, que frecuentemente se hace en predios medianos y pequeños de conformación familiar, ya sea mediante el manejo del monte nativo como a partir de plantaciones, es una actividad de gran valor económico y social porque, proporciona una renta segura a partir de una baja inversión inicial y tiene una función de reserva de valor y estabilización de las unidades familiares, representando para los productores una actividad placentera ligada a la tradición y a la conservación de las costumbres locales (Marques 2014). Además, el

manejo del monte nativo para la producción de yerba mate en predios familiares tiene un enorme valor medioambiental porque contribuye a la conservación de relictos forestales y especies amenazadas, aumenta la conectividad entre fragmentos forestales y proporciona diversos servicios ecosistémicos (Marques 2014). Por otro lado, debido a que el cultivo comercial de *I. paraguariensis* sufre muy poco las oscilaciones climáticas comparado con la mayoría de los cultivos hortícolas y a que la práctica representa una actividad valorada socialmente, es que cumple un rol fundamental en la fijación de la población rural (Vidor *et al.*, 2002).

### 1.3 DESCRIPCIÓN DE LA ESPECIE *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil

*Ilex paraguariensis*, es una planta de la familia Aquifoliaceae, descrita por primera vez en 1822 por Auguste C. de Saint Hilaire (Brotonegoro *et al*, 2000; Giberti 2011). Es una especie diploide con  $2n = 40$  (Greizerstein, 2004). En condiciones naturales es generalmente un árbol, raramente un arbusto, presenta follaje perenne y alturas de hasta 30 m. Desde el punto de vista de la morfología botánica presenta hojas coriáceas de limbo obovado, a veces oblanceolado, elíptico u oblongo, de 50 - 100 (máximo 250) mm de largo por 25 - 50 (máximo 100) mm de ancho, margen generalmente aserrado, ápice obtuso-retuso, zona apical plana cerca de la nervadura media (Giberti, 1979). Las flores son unisexuales y se distribuyen en distintos individuos por tratarse de una especie dioica (Giberti y Gurni, 2008), están dispuestas en fascículos corimboides axilares, las masculinas 1-11 floras y las femeninas 1-3 floras, son pequeñas, pediceladas, cáliz cuadrilobado persistente, corola de cuatro pétalos blanquecinos; flores masculinas con cuatro estambres, flores femeninas de ovario súpero, cuadrilocular, con dos óvulos por lóculo. Los frutos tienen forma de drupa globular, de color rojo o morado al madurar, de 5 a 8 mm de diámetro, con cuatro pirenos cada uno conteniendo una semilla (Brotonegoro *et al*, 2000). La floración ocurre en primavera, de octubre a noviembre y las flores son de polinización entomófila, principalmente por dípteros e himenópteros. Los frutos maduran entre los meses de marzo y junio, y su diseminación es realizada por aves que de ellos se alimentan (Giberti, 1992). Las semillas son de germinación epigea (Brotonegoro *et al*, 2000) y presentan dos tipos de dormancia simultánea, una causada por la resistencia mecánica

del tegumento y la otra asociada a un embrión inmaduro (Cuquel *et al.*, 1994).

La distribución natural de *I. paraguariensis* abarca las mesetas y bosques de Araucarias del sur de Brasil y el este de Paraguay, así como las sierras de las provincias de Corrientes y Misiones en el noreste argentino. También se la encuentra en zonas de menor cota en el este de Paraguay y en el norte de la provincia de Corrientes, mientras que el límite sur de su rango de distribución lo conforman poblaciones limitadas a áreas de refugio climático de vegetación que se encuentran en el territorio de Uruguay (Giberti 1979; Grela 2004).

A grandes rasgos, las condiciones ecológicas existentes en el área natural de distribución de la especie (exceptuando a las poblaciones de Uruguay) son precipitaciones medias de al menos 1200 mm anuales, sin periodos de déficit hídrico, temperaturas medias anuales de alrededor de 20 a 21 °C y temperaturas mínimas absolutas no menores a 6°C, aunque pueden sobrellevar sin problema nevadas puntuales que ocurren anualmente en mesetas y serranías del sur de Brasil y en Misiones (Giberti, 1992) o soportar temperaturas de algo más de 40°C si la disponibilidad de agua en el suelo no es limitante (Brotonegoro *et al.*, 2000). Las poblaciones silvestres de *I. paraguariensis* dentro del área central de su distribución, se encuentran creciendo en bosques húmedos, generalmente cerca de cursos de agua, bajo condiciones subtropicales a latitudes de entre 18° y 25 ° S. Los suelos sobre los que se dan estas poblaciones son del tipo oxisol, con texturas de entre medias hasta finas y pH ligeramente ácido (de entre 5,8 y 6,8), no tolerando suelos ricos en carbonatos o con mal drenaje. Es importante destacar que la escasez de agua es la mayor limitante que se menciona para la supervivencia de las poblaciones dentro del área central de distribución (Brotonegoro *et al.*, 2000).

#### 1.4 EL PROCESO DE PRODUCCIÓN DE LA YERBA MATE

La yerba mate se produce a lo largo de una superficie muy amplia y variada y a causa de ello los sistemas de producción que se emplean también son muy variados en cuanto a la tecnología utilizada, los costos de producción y los rendimientos, sin embargo se

pueden distinguir de forma general tres sistemas clásicos. Primero, el “ sistema de explotación extractiva del bosque nativo”, que es el sistema más utilizado en Brasil y que se caracteriza por no usar tecnologías en cuanto a cuidados culturales ni poda, la cosecha es manual, los rendimientos bajos y la calidad del producto es variable. Segundo, el “sistema mixto o de enriquecimiento del bosque nativo”, también muy utilizado en Brasil, caracterizado por incrementar la densidad de árboles de yerba del bosque y reponer aquellos que murieron, además el sistema incorpora otras técnicas que aumentan el rendimiento como algunos cuidados culturales y el uso de poda. Finalmente, el sistema de “yerbales cultivados”, que es el más utilizado en Argentina, en la que los árboles se mantienen hasta alturas de unos 3 m mediante podas de formación para estimular el rendimiento y facilitar la cosecha. Este último sistema incorpora técnicas de diseño de plantación como las curvas a nivel o las cubiertas vegetales, cuidados culturales como fertilización o manejo de malezas, diferentes tipos de poda y distintas técnicas de cosecha manual o mecanizada. Este sistema es el que tiene los mayores costos, pero permite alcanzar una calidad mayor y más estable del producto obtenido, y producir rendimientos por hectárea entre dos y tres veces mayores que los otros sistemas (Giberti, 1992; Brotonegoro *et al.*, 2000).

La multiplicación de las plantas de yerba se puede hacer de forma sexual por semillas (pirenos) o asexual mediante injertos, acodos, esquejes y miniestacas. La propagación mediante semillas es la más utilizada, a pesar de que las semillas tienen un periodo de viabilidad muy corto (máximo de 11 meses conservadas a 5°C) y una tasa de germinación muy baja generada por embriones inmaduros, mecanismos de inhibición de la germinación y problemas fitosanitarios (Brotonegoro *et al.*, 2000), lo que ha sido una de las principales dificultades para la expansión del cultivo a otros continentes (Giberti, 1992). Además, la multiplicación tradicional mediante semillas tiene la desventaja de ser genéticamente heterogénea en cuanto a rendimiento, calidad comercial y tolerancia a plagas y enfermedades (Prat Kricun, 2010). Respecto de la reproducción asexual, la reproducción mediante acodos o injertos es posible pero no ha despertado interés, la multiplicación por esquejes es dificultosa y requiere más investigación y no ha habido demasiados avances hasta la fecha en cuanto a la

propagación “in vitro” (Giberti, 1992; Brotonegoro *et al.*, 2000). Por otro lado, estudios sobre la propagación asexual de clones comerciales de *I. paraguariensis* puestos a enraizar en ambiente controlado obtuvieron resultados porcentuales muy superiores a los obtenidos con otras técnicas (Prat Kricun, 2010). Otros autores encontraron que la multiplicación por miniestacas es una técnica muy eficiente para la propagación comercial de clones de *I. paraguariensis* y es recomendada junto con la fertilización nitrogenada para mejorar la productividad del cultivo (Santin *et al.*, 2014; Wendling *et al.*, 2007).

### 1.5 DESCRIPCIÓN DEL GERMOPLASMA DE *I. paraguariensis* St. Hil. UTILIZADO PARA LA PRODUCCIÓN DE YERBA MATE

Las variedades hortícolas que se cultivan en los países productores de yerba mate de la región se conocen bajo diversos nombres algunas de las cuales se citan a continuación: “Erva de talo roxo”, “Erva de talo branco”, “Erva piriquita” (Brasil); “Caá verá”, “Caá mandubí”, “Caá panambí”, “Caá cuatí”, “Cali Caá eté”, “Caá mi”, “Caa chacra”, “Caa-je he-ni” (Paraguay); “Yerba colorada”, “Yerba señorita”, “Caá mini” (Argentina), etc.. Sin embargo no es clara la correspondencia entre estas variedades hortícolas y las variedades biológicas dentro de la especie *I. paraguariensis*, así como tampoco lo son su conformación genética ni características productivas (Giberti, 1992). Además, el sistema de producción de yerba mate extractivo clásico brasileiro, fue muy afectado por la reducción del bosque nativo ocasionado por el avance de la producción agrícola y ganadera hacia fines del siglo XX, lo que llevó a que la especie pasara a ser cultivada en cultivos puros o en asociación. Para la última década del siglo XX, se estimaba que alrededor de quince millones de plantines se producían anualmente para plantaciones en la región sur de Brasil a partir de semilla obtenida de yerbales nativos o implantados pero sin aplicar criterios de selección y como consecuencia produjeron yerbales con alta tasa de mortalidad, productividad heterogénea y producción de baja calidad (Belingheri y Prat Kricun, 1992). En respuesta al panorama existente a fines del siglo XX en la producción de yerba mate en la región, es que se comienza con el mejoramiento del cultivo, primero en Argentina a partir del año 1974 y luego en Brasil a partir del año

1990. Estos programas se enfocan fundamentalmente en optimizar características silviculturales como, adaptación al cultivo, producción de biomasa verde, resistencia a plagas y enfermedades, deshojamiento y arquitectura de la planta (Sturion y de Resende, 2001).

Los tres principales programas de mejoramiento de yerba mate en la región son: 1) el programa que lleva adelante el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Argentina (Belingheri y Prat Kricun, 1997; Prat Kricun, 2010); 2) el de la Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) (Floss, 1997); 3) el programa de la Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa) (Sturion y de Resende, 1997). El origen de la variabilidad genética del germoplasma de *I. paraguariensis* utilizado en estos programas fue el siguiente, en primer lugar, el programa de INTA, estableció ensayos comparativos evaluando rendimiento, calidad y tolerancia a plagas y enfermedades para seleccionar clones comerciales y madres para producción de semillas de origen policlonal y biclonal a partir de 205 accesiones de diferentes especies de *Ilex* colectadas a lo largo de Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay, seis de las cuales son accesiones de *I. paraguariensis* colectadas de las poblaciones nativas de Uruguay (Belingheri y Prat Kricun, 1997; Prat Kricun, 2010); segundo, el programa de EPAGRI, que evaluó altura de planta, diámetro de copa, densidad foliar, sobrevivencia y rebrote en 400 progenies pertenecientes a 22 procedencias de *I. paraguariensis* (8 de Paraná, 7 de Rio Grande do Sul, 6 de Santa Catarina y 1 de provincia de Misiones, Argentina) (Vidor *et al.*, 2002, Floss 1997); finalmente, el programa de mejoramiento coordinado por Embrapa (Promegem/Embrapa), que buscó aumentar el rendimiento de yerba mate por hectárea evaluando 14 procedencias colectadas a lo largo del territorio de Brasil y Argentina (de Resende *et al.*, 2000).

## 1.6 PERSPECTIVAS

El éxito de un programa de mejoramiento de especies vegetales longevas como *I. paraguariensis* se basa en el conocimiento exhaustivo de las siguientes cuatro áreas; 1) el producto final de interés; 2) el germoplasma disponible para la obtención de dicho producto; 3) las metodologías para la estimación de los parámetros genéticos y de selección; 4) los factores ambientales que afectan la expresión fenotípica (de Resende *et al.*, 2000). El estudio de la biogeografía de una especie es un conocimiento básico para su uso y conservación, siendo crucial a la hora de evaluar el germoplasma a coleccionar porque permite tener un panorama completo de la variabilidad total de la especie y su distribución en el espacio, así como identificar y localizar variantes raras (Frankel, 1984; Rao y Hodgkin, 2002). Actualmente las poblaciones naturales de *I. paraguariensis* en los países de la región se han vuelto marginales, principalmente debido a la disminución del área boscosa y el aumento de las áreas destinadas a cultivos y ganadería extensiva. A partir de estudios preliminares realizados por INIA, la yerba mate surge como una especie nativa de interés para la investigación de su potencial productivo en nuestro país (Bennadji *et al.* 2007).

Las poblaciones de *I. paraguariensis* nativas de Uruguay son particularmente importantes por su ubicación geográfica y por poseer una combinación de alelos no presentes en otras poblaciones del área de distribución, características que las convierten en una fuente de germoplasma muy valioso para el mejoramiento del cultivo (Cascales *et al.*, 2014). Sin embargo, pese a que la variabilidad genotípica de *I. paraguariensis* utilizada por los principales programas de mejoramiento en la región es extensiva, ninguno de ellos ha utilizado germoplasma obtenido de las poblaciones uruguayas, a excepción de algunas pocas accesiones incorporadas al programa de INTA en el año 2006 (Prat Kricun, 2010). El estudio de la estructuración geográfica de la variabilidad haplotípica de las poblaciones de *I. paraguariensis* en el Uruguay, complementará la información existente sobre la distribución de la variabilidad geográfica de la especie y será de utilidad para la identificación de las poblaciones de

mayor valor para el uso y conservación de la especie.

## 1.7 HIPÓTESIS PLANTEADAS

En base a los antecedentes presentados, las hipótesis que se presentarán en esta tesis son las siguientes:

- 1) Existe estructuración geográfica de la variabilidad de los *marcadores microsatélites cloroplastidiales* cpSSRs de *I. paraguariensis* en el territorio uruguayo.
- 2) La estructuración de la variabilidad genética de *I. paraguariensis* es similar a la de otras especies leñosas con distribución geográfica similar.
- 3) Los haplotipos cloroplásticos de *I. paraguariensis* de Uruguay son exclusivos con respecto a los detectados en el resto de la distribución natural de la especie.

## 1.8 OBJETIVOS

Considerando las hipótesis anteriores, el objetivo general de este trabajo es caracterizar la estructura geográfica de la variabilidad genética cloroplastídica de *Ilex paraguariensis* en Uruguay para establecer prioridades de conservación y uso del recurso genético.

Los objetivos específicos de este trabajo son:

- 1) Determinar si existe estructuración geográfica de la variabilidad genética de *I. paraguariensis* en Uruguay.
- 2) Identificar las poblaciones donde ocurren los haplotipos más divergentes y por ende de mayor interés para la conservación y utilización.
- 3) Comparar la estructuración geográfica de la variabilidad genética de *I. paraguariensis* con otras especies de similar distribución.

## 2. ESTRUCTURACIÓN GEOGRÁFICA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE ILEX PARAGUARIENSIS ST. HIL. EN EL URUGUAY

Pablo Hernández.1; Alexandra M. Gottlieb. 2; Arley Camargo. 3; Magdalena Vaio.1; Pablo Speranza.1

<sup>1</sup> Facultad de Agronomía, Universidad de la República – Av. E. Garzón, 780, Montevideo, 12900, Uruguay – pablohernandez27@gmail.com

<sup>2</sup> Universidad de Buenos Aires, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales – Ciudad Universitaria, Departamento de Ecología, Genética y Evolución, Lab. 62, C1428EHA, Buenos Aires, Argentina.

<sup>3</sup> Centro Universitario de Rivera, Universidad de la República – Ituzaingó 667, Rivera, Uruguay.

**Corresponding Author:** Pablo Speranza, pablosperanza@gmail.com

Telephone: (+598) 23553503

Fax: (+598 2) 3590436

Revista de publicación: Agrociencia

### 2.1 RESUMEN

*Ilex paraguariensis* St. Hil. es una planta subtropical perteneciente a la familia Aquifoliaceae, posee follaje siempre verde, porte arborescente y es longeva. Su distribución natural abarca los territorios de Brasil, Argentina, Paraguay y Uruguay. Es una especie de gran interés socio-cultural y comercial porque con sus hojas se produce la yerba mate, principal ingrediente del “Mate” o “Tereré”. En Uruguay las poblaciones naturales de *I. paraguariensis* representan el límite sur de la distribución de la especie, localizándose en áreas de refugio o “Hot Spots” ubicadas en el norte,

este y sur-este del país. Se tiene escasa información sobre las poblaciones uruguayas, pero se cree que pueden aportar variantes de interés para el mejoramiento y conservación de la especie. Este trabajo se dispone evaluar la existencia de estructuración geográfica de la variabilidad haplotípica de *I. paraguariensis* en el territorio uruguayo y que la diversidad entre dichas poblaciones es alta comparada con la encontrada en el resto de su distribución. Para poner a prueba esta hipótesis se obtuvo el ADN de 273 individuos georreferenciados, distribuidos a lo largo de 17 sitios de colecta en bosques relictuales y se analizó la información conjunta obtenida de la amplificación del ADN con 30 marcadores microsatélites cloroplásticos. Las poblaciones uruguayas aparecen altamente estructuradas y diferenciadas de las muestras de Paraguay, Argentina y Brasil. Se observa una fuerte diferenciación genética clara y ausencia de flujo de semillas entre poblaciones, con importantes implicancias para la conservación y exploración del germoplasma.

**Palabras claves:** yerba mate, mejoramiento genético forestal, biogeografía, genética del paisaje, conservación.

## 2.2 SUMMARY

*Ilex paraguariensis* St. Hil. is an evergreen long-lived tree belonging to the family Aquifoliaceae. Its natural distribution comprises humid subtropical areas of Brazil, Argentina, Paraguay and Uruguay. It is a species of great social, cultural and economic value because its ground leaves are used to prepare traditional beverages like "Mate" or "Tereré. Uruguayan natural populations of *I. paraguariensis* at the southern limit of the species distribution are located in refuge areas or "Hot Spots" in the north and east of the country. They represent the southern limit of the species distribution. There is scarce information on Uruguayan populations but it is believed that they can provide unknown variants for the improvement and conservation of the species. The aim of this work is to detect geographic structure of the haplotypic variability of *I. paraguariensis* in Uruguayan populations. Our hypothesis is that the diversity between these populations is greater than that found in the rest of its natural distribution. To test this hypothesis, we isolated DNA from 273 georeferenced individuals distributed

along 18 locations in relictual forests from Uruguay, including four populations from Paraguay, Argentina and Brazil. We screened these samples with 30 microsatellite chloroplast markers. We correlated the haplotype variability found across three loci to the geographic distribution of the individuals. The Uruguayan populations appear highly structured and differentiated from the samples obtained from populations of Paraguay, Argentina and Brazil. Our results show high interpopulation genetic diversity, clear genetic differentiation and absence of seed flow between populations. This divergence has important implications for the conservation and exploration of the species germplasm.

Keywords: Yerba mate, forest improvement, biogeography, landscape genetics, conservation

### 2.3 INTRODUCCIÓN

Entender cómo el paisaje estructura la diversidad genética de las poblaciones es necesario para comprender los procesos y patrones de flujo de genes y adaptación local que la gobiernan, conocimiento indispensable para el manejo, uso y conservación de las especies (Manel *et al.*, 2003). Los principales procesos que modelan la distribución de las especies en el tiempo y el espacio son la dispersión, la vicarianza y la extinción (Futuyma, 2003), procesos que son a la vez regulados por el ambiente y las características biológicas y reproductivas de las especies (Avise, 2000). La biogeografía estudia cómo se distribuyen los seres vivos a través del espacio y el tiempo, reconoce patrones de distribución y propone un sistema de regionalización biótica del planeta e hipótesis sobre cuáles fueron las causas que ocasionaron dichos patrones de distribución (Nelson, 1985). La genética del paisaje, es un enfoque surgido dentro de la biogeografía que investiga cómo aspectos geográficos y ambientales estructuran la diversidad genética de las especies a una escala fina de tiempo y espacio (Smouse y Peakall, 1999). El cambio climático moderno está produciendo cambios latitudinales dentro del rango de distribución de numerosos taxa, comunidades y ecosistemas, afectando sobre todo a las poblaciones de la periferia. Estos cambios no son migraciones que ocurren a lo largo del rango, sino que considerando la hipótesis de “frente-centro-retaguardia”, son el resultado del establecimiento de nuevas poblaciones sobre el frente de avance y de extinción de poblaciones en la retaguardia, por lo cual, incluso especies que no sufren retracción de su rango de distribución, sí pasan por un intenso proceso de rotación y extinción de poblaciones (Hampe y Petit, 2005). A lo largo de la historia de la Tierra, el cambio climático ha modelando el rango de distribución de las especies en forma recurrente. Durante periodos de clima adverso, sucede que las retracciones en la retaguardia del rango de distribución de una especie no son totales y algunas poblaciones sobreviven en enclaves del paisaje con clima más benigno conocidos como refugios, a modo de poblaciones relictuales (Hampe y Jump, 2011). Las poblaciones relictuales normalmente presentan altos niveles de diferenciación genética entre sí (Hampe y Petit, 2005, Petit *et al.*, 2003). Los refugios climáticos son áreas del paisaje con características particulares de topografía, de

irregularidades del terreno de pequeña escala (cascadas, manantiales, humedales, grandes rocas, etc.), de edafología o de estructura de la vegetación donde una especie puede sustentar poblaciones durante periodos de estrés ambiental luego de un cambio climático desfavorable (Dobrowski, 2011). Desde el punto de vista de la biogeografía se considera relictos a poblaciones que subsistieron en determinadas posiciones del paisaje donde el clima más benigno les permitió sobrevivir oscilaciones climáticas ocurridas desde fines del Terciario, desde el último máximo glacial o desde el Holoceno, según se clasifiquen en relictos terciarios, glaciales o pos-glaciales, respectivamente (Cox *et al.*, 1998). Las poblaciones relictuales son de gran importancia para la sobrevivencia y evolución de las especies porque normalmente presentan altos niveles de diferenciación genética (Comps *et al.*, 2001; Hampe *et al.*, 2003; Petit *et al.*, 2003; Martin y McKay, 2004), han sido expuestas a selección por eventos climáticos de mayor intensidad y duración que el resto de las poblaciones dentro del rango de distribución resultando en adaptación local (Jansson y Dynesius, 2002). A causa de estas características peculiares, las poblaciones relictuales pueden servir como laboratorios naturales para investigar cómo las poblaciones pueden reaccionar frente al cambio climático actual o futuro (Davis *et al.*, 2005; Hampe y Petit 2005).

Existe evidencia de que las oscilaciones climáticas ocurridas durante el Pleistoceno afectaron de manera diferente a las poblaciones de una misma especie que se encontraban a lo largo de un gradiente de latitud, determinado que la variabilidad de la especie no se distribuya de forma homogénea a lo largo de su rango de distribución (Hewitt, 2004). Por otra parte, la distribución de la variabilidad de una especie en el espacio y el tiempo puede ser modelada, y en este sentido, el rango de distribución de una especie en un momento dado se puede dividir en tres regiones características, el frente de colonización, el centro del rango y la retaguardia. Estas regiones se pueden caracterizar desde el punto de vista de la distribución de la variabilidad de la siguiente manera: el frente de colonización, conformado por poblaciones con baja diversidad inter e intra-poblacional; el centro de la distribución, que presenta poblaciones con alta variabilidad intra-poblacional pero baja variabilidad inter-poblacional; y la

retaguardia, con poblaciones que presentan baja diversidad intra-poblacional pero alta diversidad inter-poblacional (Hampe y Petit, 2005).

La particular distribución geográfica y el hecho de persistir en condiciones cercanas al límite de tolerancia climática para una especie, tiene ciertas implicancias sobre la demografía y genética de las poblaciones relictuales. Las especies que tendrán más chances de sobrevivir en estas condiciones poseen varias de las siguientes características. Habilidad para escapar de condiciones ambientales desfavorables (en vegetales, mediante bancos de semillas), resistir (adaptaciones morfológicas y fisiológicas) o recuperarse luego de episodios de estrés extremo (crecimiento indefinido y órganos de reserva). Estas especies también poseen un ciclo de vida largo caracterizado por alta sobrevivencia, longevidad y fertilidad de los adultos o propagación asexual. Además presentan habilidades para sobrevivir en poblaciones aisladas en sitios con baja capacidad de carga como mecanismos para asegurar la reproducción sexual (auto-compatibilidad, alta fecundidad) y alta conectividad de las parejas (flujo de polen direccional) (Hampe y Jump, 2011; Kawecki, 2008).

Desde el punto de vista biológico, *Ilex paraguariensis* A. St. Hil, es una planta de follaje siempre verde, de porte arborescente, longeva, dioica, de polinización entomófila y de frutos carnosos dispersados por animales. *I. paraguariensis* es una especie de la flora subtropical que crece mayormente en regiones con temperaturas medias anuales de entre 21 a 22 °C, y precipitaciones no menores a 1200 mm anuales, y su distribución natural abarca desde el sureste de Brasil, este de Paraguay, nordeste de Argentina y nordeste y este de Uruguay (Giberti, 2001; Giberti 1997), siendo el límite sur de su distribución las sierras del Departamento de Maldonado en Uruguay (Giberti, 1979). En Uruguay, sus poblaciones naturales se encuentran localizadas en áreas que podrían llegar a ser consideradas refugio de la flora subtropical (Speranza *et al.*, 2007; Grela, 2004; Ab'Sáber, 1977 ), donde es posible en las fases frías de los ciclos glaciares del Cuaternario, cuando el clima era más seco hayan encontrado condiciones benévolas para sobrevivir por lo que podrían ser consideradas poblaciones de “retaguardia” del rango de distribución, teniendo en cuenta la hipótesis de “frente-centro-retaguardia” presentado por Hampe y Petit (2005).

En teoría, los periodos áridos ocurridos durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario, provocaron la extinción de la mayor parte de las poblaciones de numerosos taxa adaptados a ambientes húmedos y cálidos de las biotas tropicales y subtropicales en la región sur-este de América del Sur, exceptuando aquellas que se encontraban en determinadas posiciones del paisaje como laderas de sierras y quebradas donde el clima se mantuvo más benigno (Ab'Sáber, 1977). Se sugiere, en lo que respecta a la región biogeográfica de Pampas, que las áreas del paisaje donde se encuentra especies de las floras tropicales y subtropicales rodeadas de áreas de vegetación herbácea puedan ser consideradas refugios del Cuaternario (Ab'Sáber, 1977; Grell, 2004; Iriarte, 2006). Un trabajo realizado en *Eugenia uniflora*, una especie arbórea, longeva, subtropical, de frutos dispersados por animales y con un rango de distribución muy similar a *I. paraguariensis*, encontró un aumento de la diversidad regional haplotípica y nucleotídica hacia el límite sur de su rango de distribución, es decir hacia el territorio uruguayo y una fuerte estructuración geográfica de la diversidad a lo largo de su rango de distribución (Turchetto-Zolet *et al.*, 2016). Otros estudios realizados en *Epidendrum fulgens* y *Vriesea gigantea*, dos plantas herbáceas, perennes, subtropicales y de distribución similar a *I. paraguariensis*, descubrieron una fuerte estructuración geográfica de la variabilidad y un aumento de la diversidad regional haplotípica y nucleotídica hacia el límite sur de su rango de distribución (Pinheiro *et al.*, 2011; Palma-Silva *et al.*, 2009). Dos trabajos recientes en dos complejos de especies herbáceas, longevas, subtropicales y cuyas distribuciones abarcan la totalidad del territorio de Uruguay, *Turnera sidoides* y *Petunia axilaris*, encontraron estructuración geográfica de los haplotipos cloroplásticos para las poblaciones del territorio uruguayo (Speranza *et al.*, 2007; Turchetto *et al.*, 2014). Un estudio previo sobre la variabilidad genética de *I. paraguariensis* a lo largo de toda su área de distribución usando marcadores moleculares nucleares y cloroplásticos encontró que la diversidad dentro de las poblaciones de yerba mate disminuye hacia el suroeste, es decir, hacia el territorio uruguayo, a la vez que la diversidad genética regional aumenta en el mismo sentido, siendo las poblaciones de Uruguay las que más difieren de todas las demás. Sin embargo estos autores no pudieron encontrar variabilidad suficiente en el haplotipo cloroplástico, con el muestreo y marcadores

microsatélites heterólogos cpSSRs utilizados, como para hacer generalizaciones sobre la estructuración geográfica de la especie (Cascales *et al.*, 2014). Como es frecuente observar estructuración geográfica haplotípica y nucleotídica en especies que en Uruguay presentan poblaciones asociadas a áreas de refugio climático donde también existen poblaciones de *I. paraguariensis*, y por tener esta especie muchas de las características biológicas y demográficas que caracterizan a las poblaciones relictuales, se esperaría también observar estructuración geográfica para las poblaciones de *I. paraguariensis* dentro del territorio uruguayo.

Considerando las características biológicas y reproductivas de la especie, su distribución actual y que el estudio de la genética del paisaje tiene el foco adecuado para discriminar la información obtenida a la escala de tiempo y espacio de interés, las hipótesis de este trabajo son que existe estructuración geográfica de la variabilidad haplotípica de *I. paraguariensis* en Uruguay, y que los haplotipos cloroplásticos de las poblaciones de Uruguay son muy divergentes respecto a los encontrados en el resto del rango de distribución natural de la especie. Asimismo se espera encontrar menor diversidad intrapoblacional de los haplotipos cloroplásticos según la teoría y los resultados previos.

Asumiendo que la diversidad genética de las poblaciones naturales de *I. paraguariensis* en Uruguay es detectable a través del estudio de cpSSRs disponibles y que el patrón de distribución de la diversidad genética de la especie a lo largo de la geografía puede describirse a través de la partición de la varianza entre y dentro de las poblaciones, el objetivo de este trabajo es determinar la estructuración geográfica de la variabilidad haplotípica de *I. paraguariensis* en Uruguay a través de cpSSRs e identificar las poblaciones donde ocurren los haplotipos más divergentes y por ende de mayor interés para la conservación y/o eventual uso en mejoramiento.

## 2.4 MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.4.1 Material vegetal

Se tomaron muestras de 18 localidades dentro del área de distribución de *I. paraguariensis*, 14 de ellas correspondientes a las poblaciones discontinuas y relictuales dentro del territorio uruguayo y una muestra de referencia compuesta por colectas de cuatro poblaciones dentro del área continua del centro de distribución (poblaciones 15, 16, 17 y 18), en los territorios de Argentina, Brasil y Paraguay (Cuadro 3, Figura 1). Se colectó un total de 273 individuos a lo largo de las 18 localidades, todas ellas correspondientes a poblaciones naturales. Entre 1 y 34 individuos fueron colectados por localidad en función de los individuos descubiertos durante las visitas (Cuadro 3, Figura 1). Para la colecta de la muestra se prestó especial precaución de tomar hojas completamente desarrolladas y sin ningún signo de afectación por plaga o enfermedad. A partir de las muestras se confeccionó una colección del ADN. La distancia entre mínima y máxima entre las localidades visitadas fue de entre 2,5 y 1034 km, correspondiendo respectivamente a las distancias entre las localidades 6 y 7 y las localidades 14 y 15 respectivamente (Cuadro 1, Figura 1).

### 2.4.2 Prospección y colecta de las poblaciones

Para la prospección de la variabilidad de *I. paraguariensis* dentro del territorio uruguayo, primero se inventariaron los sitios donde se tenía información proveniente de colectas de herbario o por comunicación de expertos de la ocurrencia posible o verificada de la especie. Luego, según el número de individuos observados por sitio en un muestreo preliminar se procedió a la toma de muestra de hoja para el posterior estudio de la variabilidad existente. El muestreo consistió en tomar 5 o 6 hojas adultas, y en buen estado por individuo.

**Cuadro 1.** Microsatélites cloroplásticos diseñados para *I. dumosa* e *I. paraguariensis* por Cascales (2014) y alelos resultantes de su amplificación obtenidos en este trabajo de Tesis.

Localización del cpSSR	Cebador	Sentido	Tm (c)	Secuencia repetida	Tamaño (pb)	Alelos observados
rps16-	ATAGACGGCTCATTGGGATAGA	F	72.9	(A)n	467	1
rps16	GAAAGGATTAAGAAGCACCGAA	R	53.4			
trnS(UGA)-	AGGTGTGAATATACTGGGCGAT	F	72.9	(A)n	263	1
psbZ	AATCCTCCAAGCTACCAACAAA	R	53.4			
trnV(UAC)-	CGATGAACCAACCAGTCAGTTA	F	72.9	(T)n	390	1
trnV(UAC)	CTAGTCCAGAGGCAGACCTACG	R	60.9			
ycf4-	TCTGTCTTGTGTTTGCCACTCAT	F	71.9	(A)n	352	1
cemA	TGATTTGGTGGTTAGTCCTTGA	R	53.4			
rps18-	AAGAATCGGGGAAGAAGAAATC	F	71.9	(T)n	351	1
rpl20	TGTGGATCACTCGAATAAATGC	R	53.4			
trnR(UCU)-	CGACTATAACCCCTAGCCTTCC	F	74.9	(AT)n	462	1
atpA	AATCAAGCGTTCCGATTCA	R	49.3			
ndhH-	TTCTGTAGCTGGTGCAGTCAT	F	72.9	(A)n	153	1
rps15	TTGGTCAGTTGGATATTCGAGA	R	53.4			
atpH-	CGTTCTTCCATTCTTTGTTC	F	71.9	(TA)n	304	1
atpI	CTCAACTCTTGTGGATGTTTCG	R	55.3			
psbM-	CGCTCATTTCATTAAGACGC	F	71.9	(T)n	420	1
trnD(GUC)	CCCATTTGGATTCCGGTATG	R	51.4			
psbI-	GCACTTCATTTCTGGTGTCAA	F	71.9	(T)n	351	2
trnS(GCU)	AATCCCTCTCTTTCCGTTTCC	R	54.4			
trnP(UGG)-	CCACATCGTTATTTCCCTCCATT	F	71.9	(T)n	428	1
psaJ	CCTGCTAAAGACCCAAACCATA	R	55.3			
accD-	ATTATTTCAAGTCCACGCTTTC	F	71.9	(T)n	381	2
psaI	CTAGTCAAAAATGGGATTTCTCGG	R	55.3			
rpl14-	CATACCGTTGTCACGTTGAGT	F	72.9	(T)n	447	2
rpl16	TGAAATGGGTGGAGTAACAGAA	R	53.4			
infA-	AACTACGTCGGATCTTCTCTGA	F	72.9	(T)n	351	1
rps8	CGGGATAGGGATTGTAATTCTG	R	55.3			
trnH(GUG)-	TGCCTTGATCCACTTGGCTA	F	72.9	(T)n	177	1
psbA	AGTATCGTGCTTTTCGTTAGGT	R	52.4			
rps16-	TGGTTCAGTCGGTACATAGACA	F	72.9	(A)n	237	1
trnQ(UUG)	TCAAAGAAATGGGAGCTGGGT	R	54.4			
trnG(UCC)-	CAATGACAGATTCGAGGAACAA	F	71.9	(A)n	305	1
trnG(UCC)	GTTTCCACCGACTAAAACAAA	R	53.4			
psbC-	CCTGTTCTTTCCATGACTCCTC	F	73.9	(A)n	447	1
trnS(UGA)	ATCGCCAGTATATTCACACCT	R	55.3			
trnG(GCC)-	GTTGGCCGTGATAGTGTAGTGA	F	73.9	(A)n	413	1
trnM(CAU)	TACTTCGTGAAATGGTTCATGC	R	53.4			
ycf3-	TGCCTCTTTTTCTCTGAAGT	F	71.9	(A)n	305	1
trnS(GGA)	AGGATGAAATCGAATCGGGTT	R	52.4			
trnM(CAU)-	TTGCTTTCATACGGCGGGAG	F	73.9	(T)n	307	1
atpE	TCTCCGACGAGCTAGGACAC	R	57.5			
psaI-	TTTAGTTCGACATTCCTTGTGC	F	71.9	(T)n	487	1
ycf4	TTTTATGTTCCGGTGGAAAGCC	R	51.4			
rps12-	TTCTCGATCAATCCCTTTGC	F	71.8	(T)n	224	1
trnV(GAC)	ATTTTCGTACCCTTCGCTCAA	R	51.4			
rm5-	CTGCGGAAAAATAGCTCGAC	F	72.9	(A)n	214	1
trnR(ACG)	CAGCCATTCGGGTTAAGAA	R	51.4			
trnK(UUU)-	GACTTGTGTTGGATTGGCACTA	F	72.9	(A)n	158	1
rps16	GGAACTCTTAACAACCGAGGAA	R	55.3			
trnG(UCC)-	TAGCTCGGTGGAAACAAAATTC	F	71.9	(T)n	320	1
trnG(UCC)	GGAAGGCTAGGGGTTATAGTCG	R	59.0			
atpA-	CTAATTCGTCGGCTCGAAT	F	71.8	(A)n	221	1
atpF	ACAACGGGTTTCCAACAAG	R	51.4			
trnM(CAU)-	GGATKAGTTGCGTTTGGTTTTC	F	71.9	(T)n	362	1
atpE	CTAGGACACGAGTAGAGGCCAT	R	59.0			

clpP b-	TCAAATTACCACCCTTCCTTTC	F	71.9	(T)n	467	1
clpP b	TACCAAACGTCTAGCATTCCCT	R	55.3			
trnR(UCU)-	ATCGGAATGAAAAGCGTCCA	F	71.8	(TA)n	176	1
atpA	GGGAATCAAGCGTTCCGAT	R	53.4			

### 2.4.3 Amplificación, secuenciación y etiquetado de los microsatélites cloroplásticos

Para todos los individuos colectados se extrajo el ADN a partir de hojas frescas u hojas secas en sílica de acuerdo con el protocolo de Doyle y Doyle (1987). Los ADNs fueron conservados en freezer para su posterior uso. De esta colección de ADN se seleccionaron representantes de cada una de las poblaciones colectadas para poner a punto un conjunto de 30 marcadores cloroplásticos de tipo microsatelite (cpSSRs) previamente desarrollados in silico para *I. dumosa* e *I. paraguayensis* por el equipo de la Dr. Alexandra Gottlieb en la Facultad de Ciencias Exactas de la UBA. Los cebadores fueron sintetizados en la empresa Macrogen de manera que a la secuencia de los cebadores en sentido directo se les agregó la secuencia del M13 (5'-CACGACGTTGTAAAACGAC-3'), marcada con FAM y HEX (Beckman Coulter).

Todas las reacciones de amplificación de PCR se hicieron en un volumen total de 10  $\mu$ l, conteniendo 0.2 unidades de Taq polimerasa (Thermo Scientific, USA), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,15  $\mu$  M del cebador marcado con M13, 0,01  $\mu$  M del cebador reverso, 0.1 mM de cada dNTP del buffer.

El programa de amplificación de PCR consistió en un tiempo inicial de 5 minutos a 95°C, 40 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a una temperatura de annealing de 53°C, y 30 segundos a 72 °C, esto fue seguido de 10 ciclos adicionales de 30 segundos a 94 ° C, 30 segundos a una temperatura de annealing de 50° C, y 30 segundos a 72 ° C, el paso de elongación final fue de 5 minutos a 72°C.

Luego los productos de la amplificación de PCR fueron verificados en gel de agarosa a 1,5x, los positivos se acondicionaron disponiendo 2  $\mu$ l de producto con 8  $\mu$ l de formamida y se enviaron para el análisis de los fragmentos a un servicio comercial de secuenciado (DNA Analysis Facility en Science Hill, Yale University, New Haven,

CT). Los cromatogramas recibidos del servicio comercial se analizaron manualmente con el programa PeakScanner 1.0 © (Applied Biosystems, 2006). A partir de estos análisis preliminares se seleccionaron tres marcadores (psbI-trnS, rpl14-rpl16 y accD-psaI) en base a polimorfismos detectado en los individuos analizados. Estos tres marcadores fueron utilizados para realizar el análisis en todos los individuos de las poblaciones en estudio.

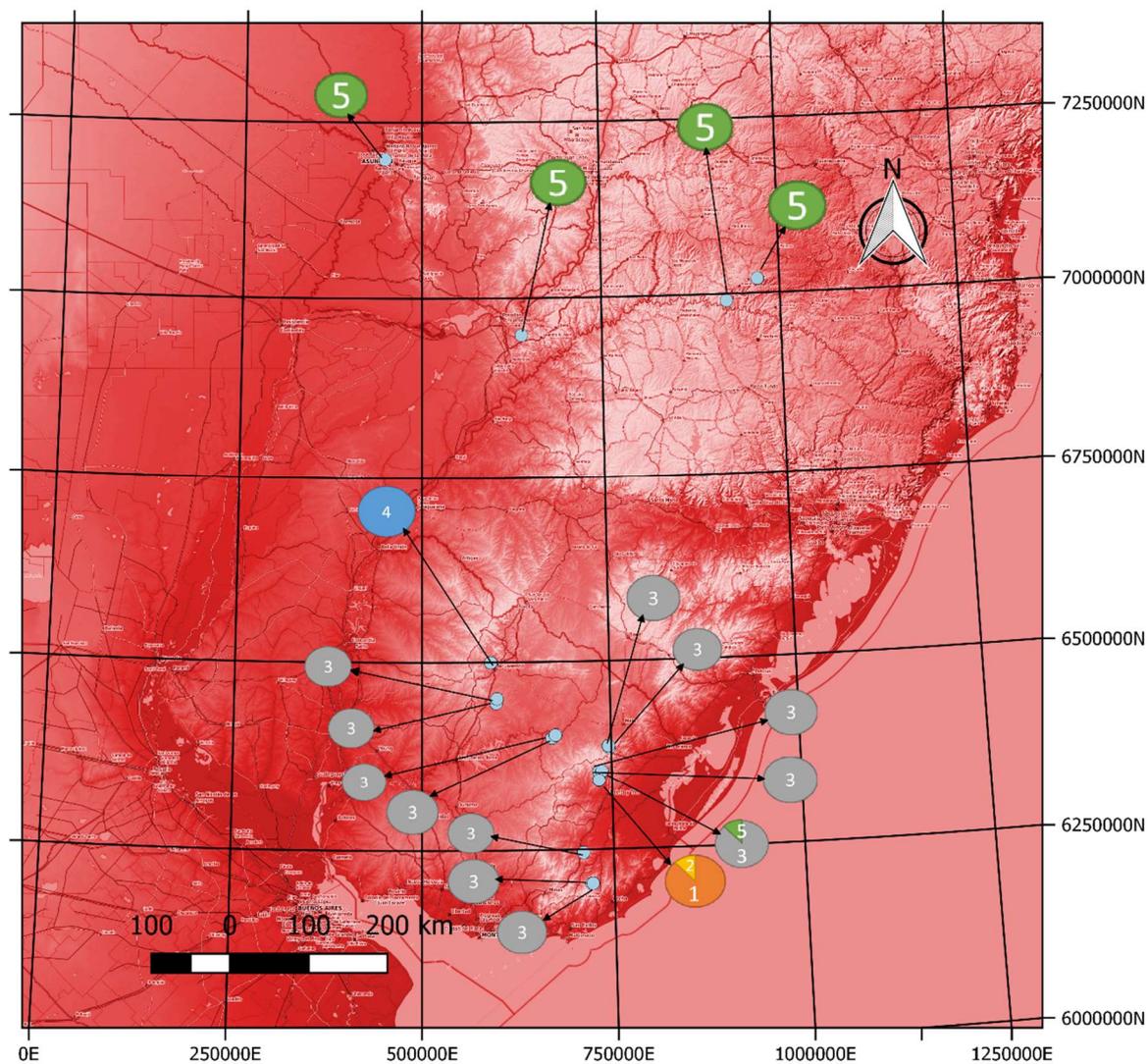
#### 2.4.4 Procesamiento y análisis de los datos

Se analizó la información genética obtenida con los marcadores para cada uno de los individuos conjuntamente con los datos de ubicación georeferenciada con el paquete de R, Geneland (Guillot *et al.*, 2005) para estimar el número de poblaciones diferentes y asignar los individuos a dichas poblaciones.

Geneland (Guillot *et al.*, 2005), es un programa que utiliza un modelo estadístico espacial con la técnica de cadenas de Markov Monte Carlo para estimar número de poblaciones, asignar individuos a poblaciones de origen, mapear límites entre las poblaciones y detectar/mapear individuos migrantes. El programa se puede operar usando una computadora personal estándar cargándose como paquete en R, que es un software estadístico de uso libre con variadas funciones gráficas y estadísticas (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/>).

Previo al análisis de los datos con Geneland, se procesó la información genética y la información espacial en archivos de texto separados utilizando el editor de texto y código de fuente libre Notepad++ .

Finalmente, los mapas de probabilidad posterior de pertenencia a las poblaciones inferidas producidos por la interface gráfica de Geneland georreferenciados, fueron superpuestos como capa raster a un mapa topográfico libre (Kartendaten: © OpenStreetMap-Mitwirkende, SRTM | Kartendarstellung: © OpenTopoMap (CC-BY-SA) utilizando el software libre QGIS (QGIS, 2019).



**Figura 1.** Distribución de los haplotipos plastidiales (círculos coloreados) entre las localidades colectadas (círculos blancos) de *I. paraguariensis*. Cada color representa un haplotipo distinto (secciones de diferente color dentro de un círculo también representan diferentes haplotipos para una misma localidad).

## 2.5 RESULTADOS

### 2.5.1 Haplotipos encontrados y sus frecuencias para las poblaciones colectadas

A partir del análisis de la secuenciación de marcadores cloroplásticos polimórficos marcados con M13 psbI-trnS, rpl14-rpl16 y accD-psaI, se identificaron cinco haplotipos citoplasmáticos (Cuadro 2). Los niveles de polimorfismo intra-poblacional para los haplotipos estudiados fueron muy bajos. La mayoría de las poblaciones estudiadas presentaba un único polimorfismo a excepción de las poblaciones 9 y 10 que presentaron dos haplotipos distintos cada una (Cuadro 3). El haplotipo 3 fue el más frecuente encontrándose en 12 de las 17 poblaciones estudiadas; el haplotipo 5 se encontró en 5 poblaciones. Los haplotipos 1, 2 y 4 solo se encontraron en una única población cada uno. Los haplotipos 1, 2, 3 y 4 solo se encontraron en poblaciones del territorio uruguayo, mientras que el haplotipo 5 es el único observado en las poblaciones estudiadas en Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay.

**Cuadro 2.** Longitud de secuencias amplificadas y haplotipos cloroplásticos detectados para las poblaciones estudiadas de *I. paraguariensis* con los marcadores polimórficos disponibles.

Haplotipo	Longitud de secuencia amplificadas por cebador		
	psbI-trnS	rpl14-rpl16	accD-psaI
1	369	395	467
2	370	395	467
3	369	395	468
4	370	395	468
5	369	396	468

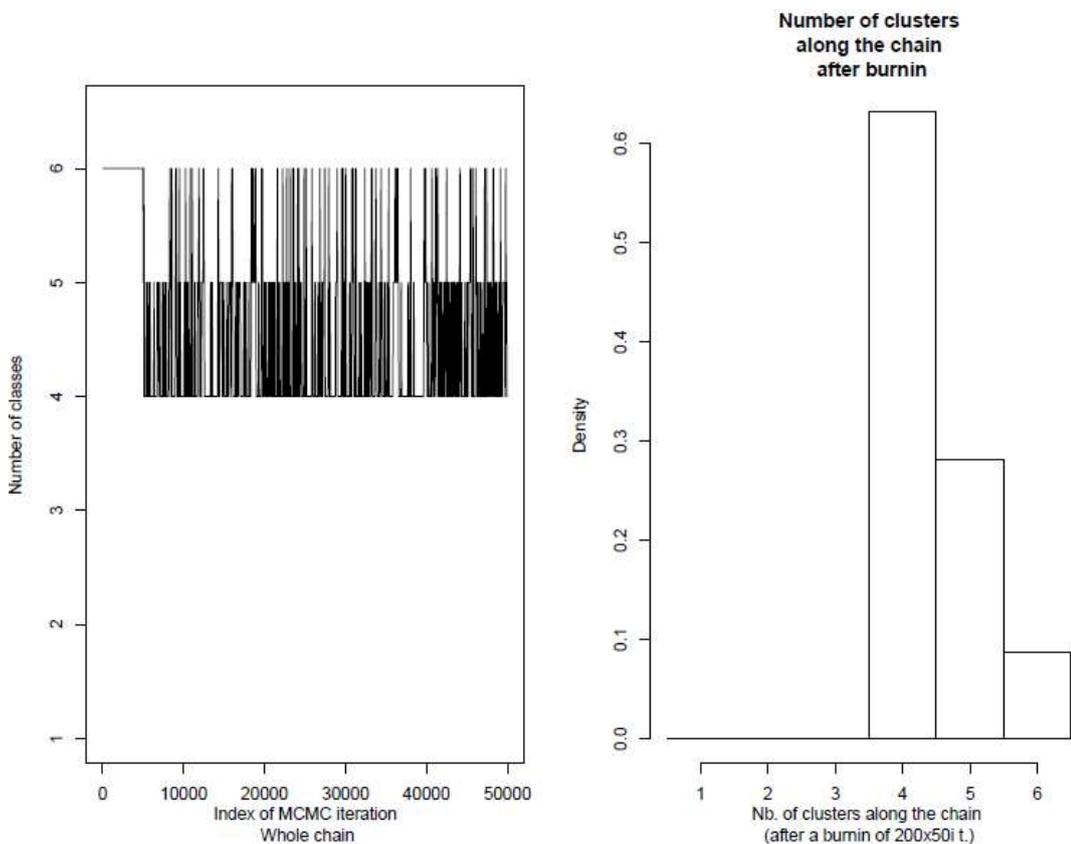
**Cuadro 3.** Orígenes, regiones dendroflorísticas y frecuencias haplotípicas plastidiales de 18 poblaciones de *I. paraguariensis*

Origen geográfico de las localidades colectadas	Lat-Long (S-O)	Región dendroflorística: Grela (2004); *Cabrera y Willink (1973)	N	Haplotipos				
				1	2	3	4	5
1) Gruta de los Helechos, Tacuarembó, Uruguay	31°38'S-56°01'O	Flora oriental, Núcleo primario, Cuchilla de Haedo	40	0	0	0	1	0
2) La Aruera, Tacuarembó, Uruguay	32°04'S-55°56'O	Flora oriental, Área principal, Cuchilla de Haedo	18	0	0	1	0	0
3) Est. Misericordia, Tacuarembó, Uruguay	32°07'S-55°57'O	Flora oriental, Área principal, Cuchilla de Haedo	2	0	0	1	0	0
4) Est. Buena Vista, (Arévalo), Cerro Largo, Uruguay	32°30'S-55°07'O	Flora oriental. Fuera del rango, Cuchilla de Haedo	31	0	0	1	0	0
5) Est. Peña Flor (Arévalo), Cerro Largo, Uruguay	32°32'S-55°10'O	Flora oriental, Fuera del rango. Cuchilla de Haedo	15	0	0	1	0	0
6) A°. Parao, Cerro Largo, Uruguay	32°37'S-54°22'O	Flora oriental. Núcleo primario. Cuchilla Grande	31	0	0	1	0	0
7) A°. Tacuarí, Cerro Largo, Uruguay	32°39'S-54°22'O	Flora oriental. Núcleo primario Cuchilla Grande	1	0	0	1	0	0
8) Paso Pereira, Cerro Largo, Uruguay	32°29'S-55°06'O	Flora oriental, Fuera del rango. Cuchilla de Haedo	11	0	0	1	0	0
9) Tapera de Ayala, TyT, Uruguay	33°02'S-54°30'O	Flora oriental. Área principal. Cuchilla Grande	28	<b>0.964</b>	<b>0.036</b>	0	0	0
10) A°. Yerbal. TyT, Uruguay	32°56'S-54°28'O	Flora oriental. Núcleo Primario. Cuchilla Grande	23	0	0	<b>0.956</b>	0	<b>0.044</b>
11) A°. de la Abuelita, TyT, Uruguay.	32°56'S-54°30'O	Flora oriental. Núcleo Primario. Cuchilla Grande	30	0	0	1	0	0
12) A°. de la Lorencita, Lavalleja, Uruguay	33°54'S-54°43'O	Flora oriental. Área Principal. Cuchilla Grande	5	0	0	1	0	0
13) Aiguá, Maldonado, Uruguay	34°15'S-54°35'O	Flora oriental. Área Principal. Cuchilla Grande	21	0	0	1	0	0
14) Sierra del Este, Maldonado, Uruguay	34°16'S-54°36'O	Flora oriental. Área Principal. Cuchilla Grande	6	0	0	1	0	0
15) UNA, San Lorenzo, Gran Asunción, Paraguay	25°20'S-57°31'O	Prov. Biogeográfica Paranaense.*	2	0	0	0	0	1
16) S/L, Misiones, Argentina	27°09'S-54°58'O	Prov. Biogeográfica Paranaense.*	2	0	0	0	0	1
17) Chapecó, SC, Brasil	27°08'S-52°42'O	Prov. Biogeográfica Paranaense.*	2	0	0	0	0	1
18) Faxinal dos Guedes, SC, Brasil	26°51'S-52°16'O	Prov. Biogeográfica Paranaense.*	5	0	0	0	0	1

\*Tomado de Cabrera y Willink (1973).

### 2.5.2 Grupos detectados utilizando GENELAND

El análisis realizado con Geneland generó cuatro grupos a partir de los individuos de las 18 localidades muestreadas en todas las corridas realizadas. La corrida de MCMC con mayor probabilidad posterior promedio de pertenencia asignó las poblaciones a esos cuatro grupos o clusters con una frecuencia de 62.5 % (Figura 2). Los clusters generados por Geneland a partir del análisis fueron los siguientes: 1) localidad 1; 2) localidades 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 11, 12, 13 y 14; 3) localidades 15, 16, 17 y 18; 4) localidad 9 (Cuadro 1, Figuras 3 y 4).

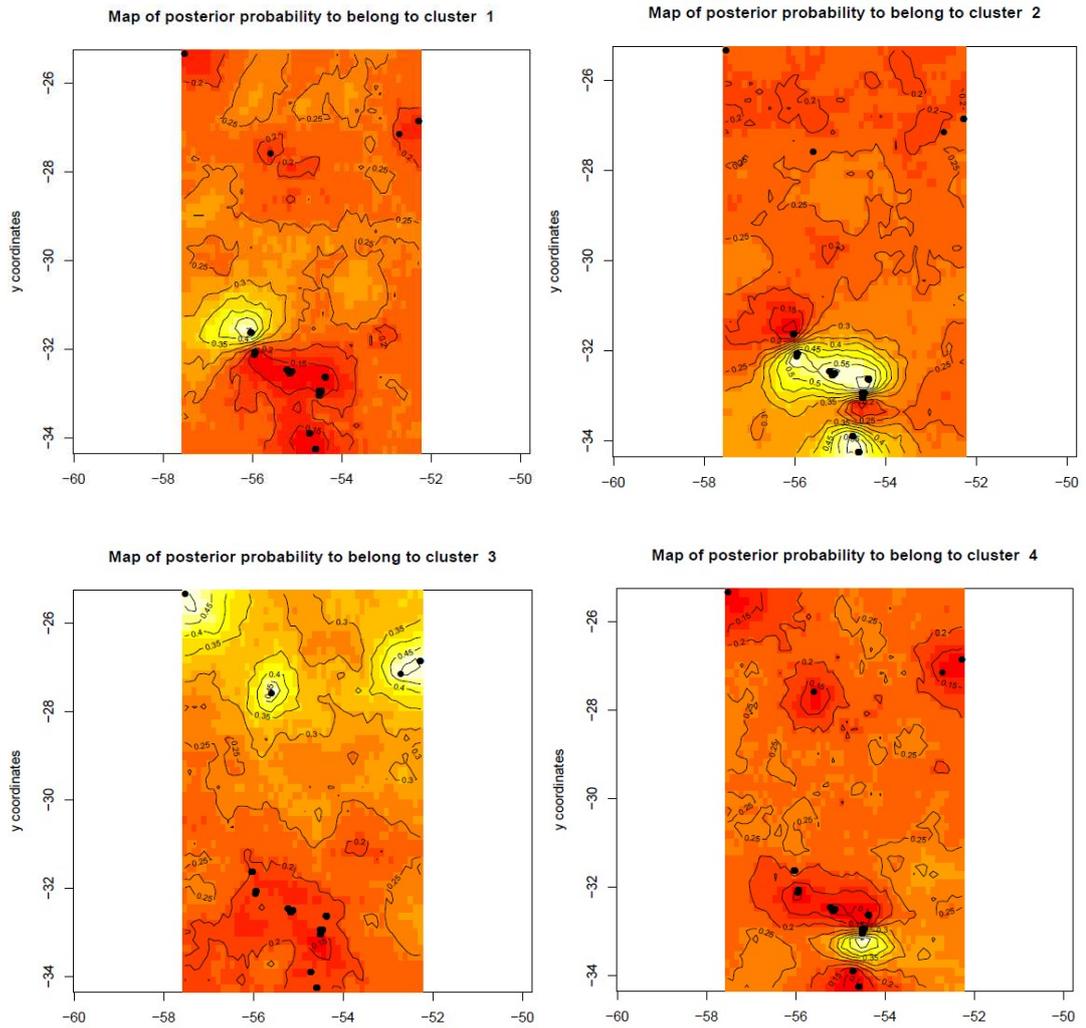


**Figura 2.** Registro del número de poblaciones a lo largo de la corrida de MCMC con número variable de poblaciones e histograma de frecuencias con los valores simulados.

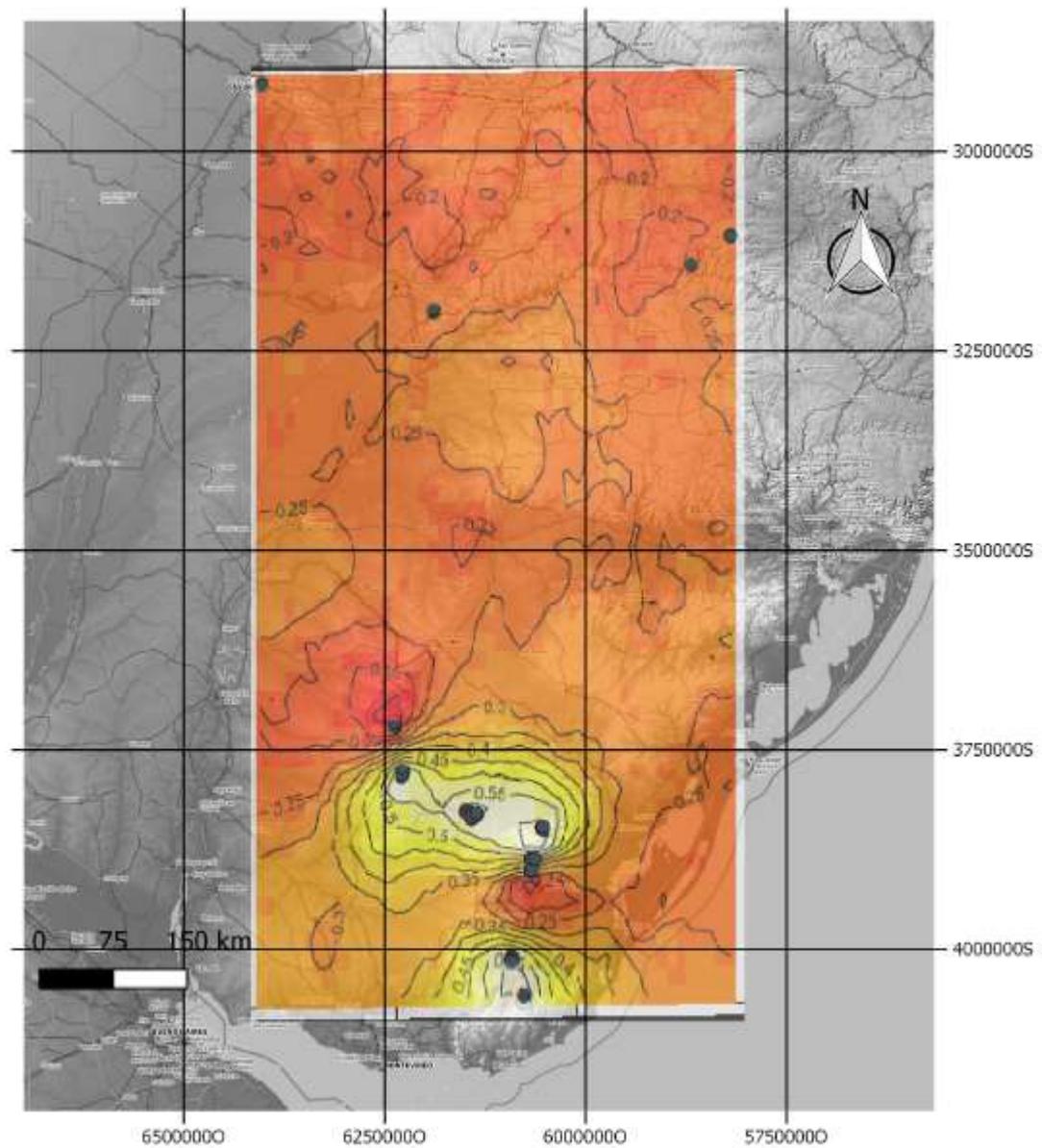
### 2.5.3 Haplotipos observados en las poblaciones de Uruguay son divergentes

De los 5 haplotipos cloroplásticos detectados en este estudio 4 se encuentran exclusivamente en las localidades colectadas dentro del territorio de Uruguay (Cuadro 1, Figura 1). Se ha encontrado 3 haplotipos endémicos de para dos de las localidades colectadas dentro del territorio de Uruguay. No existe prácticamente ningún haplotipo compartido entre las localidades muestreadas dentro del territorio uruguayo y las localidades del área central de distribución de *I. paraguariensis*.

Entonces se puede decir que las localidades colectadas dentro del territorio de Uruguay presentan haplotipos cloroplásticos de *I. paraguariensis* que no se encuentran en ninguna otra de las localidades estudiadas del rango de distribución de la especie.



**Figura 3.** Mapas de probabilidad posterior de pertenencia a cada cluster generado agrupando localidades de *I. paraguariensis* estudiadas (círculos negros).



**Figura 4.** Mapa de probabilidad posterior de pertenencia al cluster 2 de poblaciones de *I. paraguariensis* superpuesto a mapa topográfico de la región ubicando las localidades estudiadas (círculos negros).

## 2.6 DISCUSIÓN

### 2.6.1 Variabilidad registrada en este trabajo para las poblaciones de *I. paraguariensis* en el Uruguay

En este trabajo se relevaron las poblaciones de *I. paraguariensis* a lo largo de su distribución natural con énfasis particular en las poblaciones del territorio uruguayo, y se estudió la variabilidad haplotípica mediante microsatélites cloroplásticos. A partir del análisis de las secuencias obtenidas con los microsatélites se pudieron detectar cinco haplotipos diferentes.

Respecto a la variabilidad de los microsatélites para el genoma cloroplástico en especies vegetales se ha reportado baja variabilidad (Kaundun y Matsumoto, 2002). En el caso particular de la variabilidad detectada con microsatélites cloroplásticos en especies arbóreas la información disponible es escasa y variable, por ejemplo, se reporta altos niveles de polimorfismo en un estudio realizado con un relevamiento profundo del área de distribución natural en robles europeos (Streiff *et al.*, 1998), pero otros autores trabajando con una especie euroasiática del género *Ilex*, *I. aquifolium* y realizando también un muestro exhaustivo a lo largo de todo su rango de distribución solo encontraron ocho haplotipos diferentes (Rendell y Ennos, 2003). Respecto de *I. paraguariensis*, en un trabajo previo sobre la variabilidad de las poblaciones silvestres a lo largo de su rango de distribución, se encontró únicamente dos haplotipos cloroplásticos (Cascales *et al.*, 2014).

Los resultados obtenidos respecto de la variabilidad haplotípica en este trabajo son de gran valor para el estudio de la especie y representan la información más completa obtenida hasta el momento sobre las poblaciones del territorio uruguayo. Sin embargo, como la naturaleza mononucleotídica de los cpSSR no es óptima para detectar variación, la información obtenida en este trabajo debería ser covalidada con un análisis de la variación genómica para obtener conclusiones más contundentes.

### 2.6.2 Estructuración geográfica de la variabilidad de *I. paraguariensis* a lo largo de su distribución natural

Con el muestreo y los marcadores utilizados en este trabajo se pudo identificar 5 haplotipos distintos distribuidos a lo largo de las 18 poblaciones estudiadas. De estos haplotipos, 4 se encuentran únicamente en las 14 poblaciones de Uruguay, no existiendo prácticamente ningún haplotipo compartido entre las poblaciones del Uruguay y la muestra de referencia. De la agrupación de la variabilidad se obtuvieron 4 posibles agrupamientos que agregan a las poblaciones del territorio uruguayo en tres grupos y en un grupo restante a las de fuera del país.

Considerando los resultados obtenidos a una escala regional, se puede decir que concuerdan con las características y distribución de la denominada flora insular descrita dentro de una propuesta para la clasificación de las floras del sur-este de América del Sur (Rambo, 1954). Según esta propuesta, la flora insular se compone en parte por géneros y especies endémicas de la región montañosa riograndense, de las sierras de Uruguay, de las sierras del sur de Buenos Aires y de Córdoba en Argentina, que se habrían originado en condiciones de aislamiento durante las oscilaciones climáticas del cuaternario cuando áreas elevadas de la topografía habrían permitido que se mantuviera un microclima aceptable para la sobrevivencia de especies vegetales de origen subtropical a modo de islas rodeadas de valles áridos (Rambo, 1954). Estos patrones descritos para la flora insular además se pueden explicar en base a la geomorfología de la región y a eventos climáticos extremos ocurridos durante el Cuaternario, siendo que las formaciones que conforman el sistema de sierras del norte y este de Uruguay pudieron generar áreas de clima más benévolo donde pudo sobrevivir la vegetación subtropical durante las oscilaciones climáticas del Cuaternario (Bossi y Navarro, 1991; Veroslavsky, 2006).

Los resultados de este trabajo también coinciden con lo observado a escala regional en otros estudios realizados sobre la distribución de la diversidad de especies vegetales con características biológicas y rangos de distribución similares a *I. paraguariensis*. En estos trabajos se observó que el rango de distribución es discontinuo en sentido

latitudinal y que la distribución de la variabilidad entre las poblaciones del norte y del sur es diferente. Las poblaciones del núcleo localizadas hacia el noreste del rango de distribución, presentan una mayor diversidad dentro de las poblaciones, mientras que las poblaciones localizadas hacia el suroeste del rango, hacia el territorio uruguayo, presentan una distribución fragmentada a lo largo de áreas de refugio, exhiben una mayor variabilidad interpoblacional y presentan haplotipos únicos (Fregonezi *et al.*, 2012; Pinheiro *et al.*, 2011; Turchetto-Zolett *et al.*, 2016). Estas observaciones concuerdan con los resultados presentados en un trabajo previo sobre la distribución de la variabilidad de *I. paraguariensis* a lo largo de su rango de distribución (Cascales *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta la propuesta sobre la flora insular de Rambo (1954), los antecedentes observados en otras especies de amplia distribución a lo largo de un gradiente latitudinal y distribución geográfica similar y considerando el modelo propuesto por Hampe y Petit (2005), podemos interpretar que en el rango de distribución actual de *I. paraguariensis* y para el área estudiada se puede identificar dos regiones; una región de distribución continua o centro del rango, en el noreste del rango de distribución, donde la diversidad intra-poblacional es máxima mientras que la diversidad inter-poblacional es mínima y otra región compuesta por varias poblaciones diferentes, donde la diversidad intra-poblacional es muy baja y la diversidad inter-poblacional es máxima correspondiendo al área de retaguardia.

Al analizar la estructuración de la variabilidad obtenida en *I. paraguariensis* dentro del territorio uruguayo en este trabajo, observamos dos grupos distintos, uno conformado por las poblaciones de las quebradas de la cuchilla de Haedo al norte del río Negro y otro por las poblaciones de la cuchilla Grande al sureste del Uruguay. Esta misma estructuración se puede observar también en otras especies con similares características biológicas y distribución dentro del territorio uruguayo. Por ejemplo, un estudio sobre la estructuración geográfica de la variación de los haplotipos cloroplásticos del complejo *Turnera sidoides*, encontró que el rango de distribución espacial de la especie es discontinuo y que existen áreas de refugio climático asociadas a los accidentes orográficos de la región, específicamente en la regiones mencionadas,

donde se conserva una parte significativa de la variabilidad de la especie (Speranza et al, 2007). En un trabajo posterior se encontraron cuatro clados a partir del análisis de haplotipos del territorio uruguayo, sin embargo dos estaban asociados a las sierras de la Cuchilla Grande y los otros a la cuchilla de Haedo (Moreno et al, 2018). En otro trabajo realizado con subespecies del género *Petunia* dentro del territorio uruguayo se encontró otros resultados. Si bien *P. axilaris ssp axilaris* está distribuida al sur del río Negro y *P. axilaris ssp parodii* al norte, y ambas subespecies se diferencian morfológica y genéticamente, sin embargo comparten haplotipo citoplasmático. Esta distribución común del haplotipo citoplasmático podría ser la consecuencia de una reciente especiación o haber sido causada por hibridación introgresiva del polen debido a que el haplotipo citoplasmático es de herencia materna y que la especie posee limitaciones para su dispersión mediante semillas (Turchetto et al., 2014).

### 2.6.3 Ausencia de migración de semilla entre poblaciones cercanas e implicancias

El análisis de los haplotipos en este trabajo reveló la existencia de localidades muy próximas presentando haplotipos propios de cada una de ellas. Estas localidades situadas en la zona de “Quebrada de los cuervos”, distan entre si unos 12 km en línea recta y los haplotipos de los 51 individuos analizados se reparten en dos grupos, uno para los 28 individuos de Tapera de Ayala y otro para los 23 individuos de Arroyo Yermal. Por otro lado, si bien la cantidad de estudios sobre la distribución geográfica de la variabilidad haplotípica en especies arbóreas no es extensa, no se cita en la bibliografía ejemplos similares con tal grado de fijación haplotípica en distancias tan cortas (Pautasso, 2009). Sin embargo, trabajos anteriores sobre la estructuración de la variabilidad en especies vegetales en Sudamérica, encuentran que es más frecuente encontrar estructuración geográfica de la variabilidad en marcadores de herencia uniparental que de herencia biparental, lo que se puede explicar por: diferencias entre los índices de dispersión de polen y semilla (Caetano et al. 2008; Palma-Silva et al. 2009; Pinheiro et al. 2011); diferentes índices de evolución entre los marcadores nucleares y citoplasmáticos (Cabanne et al. 2008; Tellier et al. 2009); o hibridación introgresiva de los marcadores citoplasmáticos (Acosta y Premoli 2010; Palma-Silva et al. 2009). En el caso de la estructuración de la variabilidad haplotípica encontrada

en este trabajo para las poblaciones uruguayas de *I. paraguariensis*, la fijación haplotípica podría explicarse por una baja dispersión de los frutos debido a la ausencia de organismos dispersores o por una baja tasa de reclutamiento de renuevos originada por alguna de las siguientes causas: escasa producción de frutos debido al pequeño tamaño de las poblaciones y a que la especie es dioica; baja tasa de germinación y corta viabilidad de la semilla; o una alta mortalidad de los renuevos (Brotonegoro *et al.*, 2000; Giberti 2001; Giberti, 1997).

Si asumimos una muy baja movilidad de frutos o semillas a causa de escasos dispersores, tenemos en cuenta que la especie es dioica y las poblaciones naturales son mayormente pequeñas y aisladas, es posible que exista el “riesgo” de introgresión por polen entre poblaciones cercanas, donde el citoplasma de una pequeña población o grupo de individuos en una localidad particular pueda ser capturado por el polen de una población vecina que esté en expansión (Potts y Reid, 1988). Las implicancias prácticas para la conformación de unidades de conservación de poblaciones pequeñas como las relictuales que tiene la introgresión por polen son importantes. Pero la conformación de unidades para la conservación no es una tarea simple, sobre todos si consideramos que para definir una unidad de conservación significativamente evolutiva, se requiere monofilia recíproca para el haplotipo citoplasmático y divergencia significativa de las frecuencias alélicas nucleares, o para definir una unidad de manejo para la conservación, se requiere divergencia significativa tanto en frecuencias nucleares como citoplasmáticas (Moritz, 1994; Palsbøll *et al.*, 2007). Desde un punto de vista práctico, las unidades para la conservación, uso y adaptación al cambio climático de una especie podrían ser definidas de una manera menos costosa y más eficiente en base al conocimiento de cómo se distribuye la variabilidad de una especie a lo largo de todo su rango de distribución. Para conocer cómo se distribuye la variabilidad es importante tener en cuenta cómo muestrearla o colectarla, por ejemplo, cuando una especie presenta poblaciones fragmentadas, con alta variabilidad entre poblaciones y baja variabilidad dentro de poblaciones, debería considerarse algunos individuos de tantas poblaciones distintas como sea posible, por otra parte si se trata de especies con baja variabilidad entre poblaciones y alta variabilidad dentro de las

poblaciones se debería considerar muchos individuos de solo algunas poblaciones (Pautasso, 2009). Cuando la variabilidad de una especie a lo largo de su rango de distribución es máxima entre poblaciones y mínima dentro de cada población, como es el caso que se vislumbra a partir de las evidencia que suma este trabajo respecto del haplotipo cloroplástico de *I. paraguariensis* en las poblaciones del territorio Uruguayo, sería recomendable considerar tantas poblaciones como sea posible para el uso y conservación, y manejar la variabilidad de cada población por separado para prevenir cualquier pérdida de la riqueza genética local entre tanto no exista más información sobre la diversidad de la especie. Entonces, si tenemos en consideración, la evidencia que este trabajo suma sobre la existencia de estructuración geográfica de la variabilidad del haplotipo citoplasmático en las poblaciones uruguayas de *I. paraguariensis*, el descubrimiento de algunas variantes cloroplásticas únicas que dan indicio de la existencia de variantes genéticas o haplotípicas únicas y de gran interés para el uso y conservación de la especie, proponemos tener un manejo cuidadoso de las poblaciones uruguayas para prevenir la pérdida de un posible patrimonio genético (Ellstrand, 1992; Newton *et al.*, 1999; Pautasso, 2009).

## 2.7 CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo suman evidencia sobre la existencia de estructuración geográfica de la variabilidad de *I. paraguariensis* dentro de las poblaciones del territorio uruguayo porque: Primero, se detectó cinco haplotipos cloroplásticos, cuatro de los cuales solo se encuentran en poblaciones uruguayas. Segundo, existe estructuración geográfica de la variabilidad genética de los haplotipos citoplasmáticos cpSSR utilizados para las poblaciones de *I. paraguariensis* del territorio uruguayo. Finalmente, las poblaciones uruguayas son potencialmente únicas (haplotipos únicos) y es importante considerarlas para su uso manejo y conservación.

Finalmente, podemos concluir que los hábitats que constituyen áreas de refugio cuaternario para *I. paraguariensis* en el territorio uruguayo son potencialmente de gran valor para la conservación y uso de otras especies de plantas con características biológicas y reproductivas similares de las que también sobreviven poblaciones

relictuales y que la conservación de estos hábitats es vital para la conservación y uso de estas otras especies también.

## 2.8 REFERENCIAS

Ab'Sáber AN. Space occupied by the expansion of dry climates in South America during the Quaternary glacial periods. *Paleoclimas* 1977; 3(1): 1-19.

Acosta MC, Premoli AC. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Mol. Phylogenet. Evol.* 2010; 54(1): 235-242.

Avice JC. *Phylogeography: the history and formation of species*. 3rd ed. Cambridge: Harvard University Press; 2000. 447p.

Bossi JC, Navarro R. *Geología del Uruguay*. Montevideo: Departamento de Publicaciones, Universidad de la República; 1991. 2 vol.

Cabanne GS, d'Horta FM, Sari EH, Santos FR, Miyaki CY. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: Dendrocolaptidae): Biogeography and systematics implications. *Mol. Phylogenet. Evol.* 2008; 49(3): 760-773.

Cabrera AL, Willink W. *Biogeografía de América Latina*. 2nd ed. Washington: Monografías Científicas de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico; 1973. 117p.

Caetano S, Prado D, Pennington RT, Beck S, Oliveira - Filho A, Spichiger R, Naciri Y. The history of seasonally dry tropical forests in eastern South America: inferences from the genetic structure of the tree *Astronium urundeuva* (Anacardiaceae). *Mol Ecol.* 2008; 17(13): 3147-3159.

Cascales J, Bracco M, Poggio L, Gottlieb AM. Genetic diversity of wild germplasm of «yerba mate» (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. *Genetica*. 2014; 142 (6): 563-73.

Comps B, Gömöry D, Letouzey J, Thiébaud B, Petit RJ. Diverging trends between heterozygosity and allelic richness during postglacial colonization in the European beech. *Genetics*. 2001; 157 (1): 389-397.

Cox CB, Moore PD, Ladle R. *Biogeography: An ecological and evolutionary approach*. 5th ed. Oxford; Blackwell Science Ltd.: 1998. 326 p.

Davis MB, Shaw RG, Etterson JR. Evolutionary responses to changing climate. *Ecology*. 2005; 86 (7): 1704-1714.

Dobrowski SZ. A climatic basis for microrefugia: the influence of terrain on climate. *Global change boil*. 2011; 17 (2): 1022-1035.

Doyle JJ y Doyle JL. DNA protocols for plants—CTAB total DNA isolation. En: Hewitt GM, Johnston A. *Molecular Techniques in Taxonomy*, pp. 283–293. Berlin; Springer: 1987.

Ellstrand NC. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos*. 1992; 63 (1): 77-86.

Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL, Freitas LB. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (Solanaceae) in the Neotropical Pampas grassland. *Botanical J Linnean Soc*. 2012; 171 (1): 140-153.

Futuyma DJ. Principales líneas de estudio en la biología evolutiva contemporánea. *Ciencias*. 2003; 071(1): 16-28.

Giberti GC. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). *Darwiniana*. 1979; 22 (1): 217-240.

Giberti GC. Recursos fitogenéticos relacionados con el cultivo y explotación de la yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil., *Aquifoliáceas*) en el cono sur de América. *Acta Hort*. 1997; 500:137-144.

Giberti GC. Diferentes aspectos del género *Ilex* (*Aquifoliaceae*). *Corología*,

arquitectura floral, posición sistemática (Tesis Doctoral). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires; 2001. 154 p.

Grela I. Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras (Tesis de maestría). Montevideo: Universidad de la República; 2004. 97 p.

Guillot G, Estoup A, Mortier F, Cosson JF. A spatial statistical model for landscape genetics. *Genetics*. 2005; 170 (3): 1261–1280.

Hampe A, Arroyo J, Jordano P, Petit RJ. Rangewide phylogeography of a bird - dispersed Eurasian shrub: contrasting Mediterranean and temperate glacial refugia. *Mol Ecol*. 2003; 12(12): 3415-3426.

Hampe A, Jump AS. Climate relicts: past, present, future. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2011; 42: 313-333.

Hampe A, Petit RJ. Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett*. 2005; 8 (5): 461-467.

Hewitt GM. The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography. *Front Zool (Internet)*. 2004 (citado el 22 de Julio de 2019); 1 (1): 4. Disponible en: <https://frontiersinzoology.biomedcentral.com/articles/10.1186/1742-9994-1-4>

Iriarte J. Vegetation and climate change since 14,810 14 C yr BP in south-eastern Uruguay and implications for the rise of early Formative societies. *Quat Res*. 2006; 65 (1): 20-32.

Jansson R, Dynesius M. The fate of clades in a world of recurrent climatic change: Milankovitch oscillations and evolution. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2002; 33 (1): 741-777.

Kaundun SS, Matsumoto S. Heterologous nuclear and chloroplast microsatellite amplification and variation in tea, *Camellia sinensis*. *Genome*. 2002; 45 (6): 1041-

1048.

Kawecki TJ. Adaptation to marginal habitats. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2008; 39: 321-342.

Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends Ecol Evol.* 2003; 18 (4): 189-197.

Martin PR, McKay JK. Latitudinal variation in genetic divergence of populations and the potential for future speciation. *Evolution* 2004; 58 (5): 938-945.

Moreno ES, de Freitas, LB, Speranza PR, Solís Neffa VG. Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants: insights from the phylogeography of *Turnera sidoides* complex (*Passifloraceae*, *Turneroideae*). *Bot J Linn Soc.* 2018; 188 (4): 377-390.

Moritz C. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. *Trends Ecol Evol.* 1994; 9 (10): 373-375.

Nelson G. A decade of challenge the future of biogeography. *Earth Sci Hist.* 1985; 4 (2): 187-196.

Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends Ecol Evol.* 1999; 14 (4): 140-145.

Palsbøll PJ, Berube M, Allendorf FW. Identification of management units using population genetic data. *Trends Ecol Evol.* 2007; 22 (1): 11-16.

Pautasso M. Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspect. Plant Ecol Evol Syst.* 2009; 11: 157–189.

Palma-Silva C, Lexer C, Paggi GM, Barbará T, Bered F, Bodanese-Zanettini MH. Range-wide patterns of nuclear and chloroplast DNA diversity in *Vriesea gigantea* (*Bromeliaceae*), a neotropical forest species. *Heredity.* 2009; 103 (6): 503-512.

- Petit RJ, Aguinagalde I, de Beaulieu JL, Bittkau C, Brewer S, Cheddadi R, Mohanty A. Glacial refugia: hotspots but not melting pots of genetic diversity. *Science*. 2003; 300 (5625): 1563-1565.
- Pinheiro F, de Barros F, Palma-Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *J Biogeogr*. 2011; 38 (10): 1923-1935.
- Potts BM, Reid JB. Hybridization as a dispersal mechanism. *Evolution*. 1988; 42 (6): 1245-1255.
- QGIS. Equipo de Desarrollo. Sistema de Información Geográfica QGIS. Proyecto de Fundación Geoespacial de código abierto. 2019. Descargado de: <http://qgis.osgeo.org>
- Rambo B. Análise histórica da flora de Porto Alegre. *Sellowia*. 1954; 6: 9-111.
- Rendell S, Ennos RA. Chloroplast DNA diversity of the dioecious European tree *Ilex aquifolium* L. (English holly). *Mol Ecol*. 2003; 12 (10): 2681-2688.
- Smouse PE, Peakall R. Spatial autocorrelation analysis of individual multiallele and multilocus genetic structure. *Heredity*. 1999; 82 (5): 561-573.
- Speranza PR, Seijo JG, Grela IA, Solis Neffa VG. Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (*Turneraceae*): biogeographical implications. *J Biogeogr*. 2007; 34 (3): 427-436.
- Streiff R, Labbé T, Bacilieri R, Steinkellner H, Glössl J, Kremer A. Within - population genetic structure in *Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. assessed with isozymes and microsatellites. *Mol Ecol*. 1998; 7 (3): 317-328.
- Tellier F, Meynard AP, Correa JA, Faugeron S, Valero M. Phylogeographic analyses of the 30° S south-east Pacific biogeographic transition zone establish the occurrence of a sharp genetic discontinuity in the kelp *Lessonia nigrescens*: Vicariance or

parapatry? Mol Phylogenet Evol. 2009; 53 (3): 679-693.

Turchetto, C., Fagundes, N. J., Segatto, A. L., Kuhlemeier, C., Solis Neffa, V. G., Speranza PR, Freitas LB. Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (*Solanaceae*). Mol Ecol. 2014; 23 (2): 374-389.

Turchetto-Zolet AC, Salgueiro F, Turchetto C, Cruz F, Veto NM, Barros MJ, Margis R. Phylogeography and ecological niche modelling in *Eugenia uniflora* (*Myrtaceae*) suggest distinct vegetational responses to climate change between the southern and the northern Atlantic Forest Bot J Linn. Soc. 2016; 182 (3): 670-688.

Veroslavsky G, Ubilla M, Martínez S. Cuencas sedimentarias de Uruguay: Geología, paleontología y recursos naturales. Paleozoico. Montevideo: División Relaciones y Actividades Culturales de Facultad de Ciencias; 2006. 326 p.

### 3. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES GENERALES

En el presente trabajo se identificaron 14 poblaciones de *I. paraguariensis* dentro del territorio uruguayo. Se registró la ubicación y extensión de cada una de las poblaciones, permitiendo ver que, en general, son de escasa extensión, están conformadas por pocos individuos y ocupan posiciones topográficas de difícil acceso. Los resultados de este trabajo aportan información nueva, objetiva y fundamental para la conservación del patrimonio fitogenético nacional, y nos permiten comprender, la rareza, el valor y la vulnerabilidad de las poblaciones de yerba mate nativas de Uruguay. Previo a este trabajo, la información existente sobre el tamaño y ubicación de las poblaciones de *I. paraguariensis* dentro del territorio de Uruguay era escasa y dispersa. Un trabajo de tesis sobre la geografía florística de las especies arbóreas del Uruguay indica la existencia de 9 poblaciones silvestres aunque no las geo-referencia (Grela, 2004). Existe también, una publicación del instituto INIA de Uruguay, que designa a *I. paraguariensis* de forma preliminar junto a otras especies, como prioritarias para el estudio, pero en la que no se detalla ni el número ni la ubicación de las poblaciones o individuos considerados (Bennadji, 2007).

Respecto de la protección del germoplasma nativo de *I. paraguariensis* en el Uruguay todavía no existen publicaciones específicas, pero si algunos documentos elaborados para el uso y conservación del bosque nativo o la protección de la biodiversidad del Uruguay de los que forma parte, entre los más relevantes se puede mencionar: La Ley Forestal, ley 15.939 del 28/12/1987 y sus decretos reglamentarios, que regulan todo lo relativo a forestación y bosques nativos. Explícitamente, el artículo 24, prohíbe la corta y cualquier operación que atente contra la supervivencia del bosque nativo, con la excepción de que la corta sea para uso doméstico del establecimiento, o cuando medie autorización de la DGF (Dirección General Forestal) del MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) (Uruguay, Poder Legislativo, 1987). Segundo, la “Estrategia Nacional para la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica del Uruguay 2016 – 2020”, del MVOTMA (Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente), que tiene como misión “conservar y promover la utilización sostenible de la biodiversidad del Uruguay salvaguardando sus

componentes y procesos, y asegurar el acceso y la repartición equitativa de los beneficios que de ella se derivan para maximizar la calidad de vida de todos los habitantes de las generaciones actuales y futuras” (MVOTMA, 2016). Por último, la Estrategia Nacional del Bosque Nativo, de la DGF del MGAP, que tiene como objetivos específicos, “mejorar el marco legal y política financiera relacionada a la gestión del bosque nativo para incrementar los beneficios, ampliar las capacidades institucionales y técnicas de la DGF para fortalecer el sistema de información y monitoreo, mejorar la gestión de los bosques con el fin de mantener e incrementar los servicios ecosistémicos provenientes de los mismos, promover sistemas productivos mejorados estableciendo incentivos a los propietarios a partir de la valorización económica de bosque, promover la protección y restauración de bosques nativos a través de la DGF, en coordinación con los gobiernos departamentales, otras instituciones y los propietarios de los bosques, mejorar los procesos de diálogo y participación de la sociedad civil involucrada así como fortalecer la educación y difusión de la importancia del bosque nativo” (MGAP-DGF, 2018).

La producción de yerba mate en Uruguay, ésta sería posible en algunas zonas de Uruguay donde convergen las condiciones de clima y suelo adecuadas para su cultivo. Ya a mediados del siglo pasado Chaves (1961) recomendaba ensayar plantaciones en sitios con suelos arenosos de los departamentos de Artigas, Salto, Rivera y Tacuarembó y proyectaba plantaciones de 5000 hectáreas para abastecer el mercado interno de la época, generar puestos de trabajo rurales, desarrollar la industria nacional y fomentar la cultura agraria. En la actualidad se vienen desarrollando algunas experiencias a pequeña escala, impulsadas por los Ing. Agr. Andrés Berrutti, Ing. Agr. Raúl Nin y el Sr. Alberto Demicheli sobre el cultivo y producción de yerba mate de germoplasma nativo en sistemas que integran el manejo del bosque nativo y la producción familiar (Ing. Agr. Andrés Berrutti, comunicación personal, 10 de abril de 2019). Sin embargo a pesar de las perspectivas promisorias, a la fecha el país no cuenta con cultivos comerciales en su territorio (RAU, 2000). Para asegurar la conservación del germoplasma nativo de *I. paraguariensis*, sería recomendable: Comenzar trabajos que reúnan diferentes actores de los Ministerios, Universidad y pequeños productores

para generar información sobre las comunidades vegetales en las que se integra la especie en nuestros bosques, sus necesidades ambientales y su fenología enfocándose en mejorar el manejo de los bosques. Inventariar la variabilidad genética del germoplasma de cada una de las poblaciones identificadas en este trabajo para poder valorar con más precisión el recurso. Proyectar alternativas de uso del bosque o plantaciones y de producción rentables que aseguren la conservación del recurso, complementando con diferentes actividades como por ejemplo el turismo. Potenciar la utilización sustentable del recurso incorporando técnicas de manejo y producción desarrolladas en países vecinos. Por último, crear conciencia en los pequeños productores y en la población del valor que podría perderse si no se protegen nuestras poblaciones nativas.

Los resultados obtenidos en este trabajo suman evidencia a cerca del panorama que se viene conformando sobre la filogeografía de las poblaciones vegetales en Uruguay. De la interpretación de los patrones que surgen del análisis de la distribución de la variabilidad haplotípica de las poblaciones de *I. paraguariensis* del territorio uruguayo se puede inferir concordancia genealógica con otras especies de plantas con las que comparte su distribución geográfica actual, aportando nueva información para la interpretación de los procesos biogeográficos que pudieron haber ocurrido en la región. La interpretación que hacemos a partir del análisis de los resultados obtenidos en este trabajo, *I. paraguariensis* concuerda con los de otros anteriores, realizados en los complejos *Petunia axilaris* , *Turnera sp* y *Eugenia uniflora*. En estos trabajos se observó que el rango de distribución es discontinuo en sentido latitudinal, que la distribución de la variabilidad entre las poblaciones del norte y del sur es diferente, que existe una región continua al noreste del territorio de Uruguay donde la diversidad dentro de las poblaciones es mayor y otra hacia el suroeste o hacia el territorio uruguayo con poblaciones de distribución fragmentada a lo largo de áreas de refugio con mayor variabilidad inter-poblacional y haplotipos únicos (Fregonezi *et al.*, 2012; Jolochin, 2016; Turchetto *et al.*, 2014). Interpretación que complementa análisis de los patrones obtenidos en un trabajo anterior sobre la distribución de la variabilidad de *I. paraguariensis* (Cascales *et al.*, 2014).

Este trabajo presenta información nueva que valoriza el germoplasma de las poblaciones de yerba mate nativas de Uruguay. La información aquí generada a partir del análisis del haplotipo cloroplástico nos permite conocer que: existe una fuerte estructuración de la variabilidad haplotípica a lo largo de las poblaciones del territorio uruguayo; las poblaciones uruguayas poseen haplotipos únicos que no se encuentran en otras poblaciones estudiadas fuera del territorio de Uruguay; el flujo génico entre poblaciones cercanas es aparentemente muy reducido.

Los resultados obtenidos en este trabajo son un avance significativo en el conocimiento existente sobre el germoplasma de las poblaciones de yerba mate de Uruguay y aportan información muy valiosa para generar planes de uso y conservación de dicha riqueza. Teniendo en cuenta la evidencia que suma este trabajo sobre que las poblaciones uruguayas de *I. paraguariensis* son fragmentadas, que poseerían alta variabilidad entre poblaciones y baja variabilidad dentro de cada población, sería recomendable a la hora de realizar un muestreo cualquiera sea el fin, que se considerase individuos de tantas poblaciones distintas como sea posible para obtener una buena representación de la variabilidad (Pautasso, 2009).

Además de la información generada en este trabajo a partir del estudio del haplotipo cloroplástico, se pudo hacer varias observaciones personales respecto de las poblaciones de *I. paraguariensis* de Uruguay que las hacen peculiares y que condicionan su manejo y conservación: Se confirmó que las poblaciones dentro del territorio uruguayo son pequeñas, aisladas y se encuentran confinadas a lugares particulares del paisaje conocidas como áreas de refugio climático del Cuaternario. Segundo, casi no se observó renuevos en las poblaciones relevadas (exceptuando a las poblaciones 1, 9, 10 y 11). Finalmente, qué mientras no se tenga más información sobre la variabilidad genética de las poblaciones de Uruguay, la evidencia haplotípica obtenida por el momento muestra un flujo génico aparentemente muy reducido. Teniendo en cuenta estas características, debería evitarse la introducción de renuevos producidos a partir de semilla colectada en otras poblaciones con el fin de repoblar, y

la variabilidad de cada población debería manejarse por separado para prevenir cualquier pérdida de la riqueza genética local entre tanto no exista más información sobre la diversidad existente en las poblaciones uruguayas de *I. paraguariensis* (Ellstrand, 1992; Newton *et al.*, 1999; Pautasso, 2009).

#### 4. BIBLIOGRAFÍA

- Bastos DHM, Oliveira DD, Matsumoto RT, Carvalho PDO, Ribeiro ML. 2007. Yerba mate: pharmacological properties, research and biotechnology. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1 (1): 37-46.
- Belingheri LD, Prat Kricun SD. 1997. Programa de mejoramiento genético de la yerba mate en el INTA. En: Congreso Sulamericano da Erva Mate (1° , 1997, Curitiba, Santa Catalina, Brasil). Anais. Colombo, Paraná, Brasil. Embrapa-Cnpf. 267- 278.
- Belingheri LD, Prat Kricun SD. 1992 a. Evaluación preliminar de clones y progenies policlonales de yerba mate en San Vicent, Misiones, Argentina. En: Reunião Técnica do Cone Sul sobre a Cultura da Erva-Mate (1°, 1992, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil). Resumos. Porto Alegre. UFRGS. 1-45.
- Bennadji Z, Fagúndez C, Puppo M, Núñez P, Alfonso M, Rodríguez F. 2007. Identificación y caracterización de especies arbóreas nativas y exóticas para la implementación del Mecanismo de Desarrollo Limpio (MDL) en el Uruguay: Algunos resultados preliminares. En: Junta Directiva Nacional Unidad de Comunicación y Transferencia de Tecnología. Revista INIA N°12. Montevideo, Uruguay. Editorial Antuña Yarza. 30-33.
- Bracesco N, Sanchez AG, Contreras V, Menini T, Gugliucci A. 2011. Recent advances on *Ilex paraguariensis* research: Minireview. *Journal of ethnopharmacology*, 136 (3): 378– 384.
- Brotonegoro S, del Campo Girena M, Giberti GC. 2000. *Ilex paraguariensis* A. St.-Hil. En: van der Vossen HAM, Wessel M. 2000. Plant Resources of South-East Asia. Stimulants. Netherlands. Backhuys Publishers. 83- 86.
- Cascales J, Bracco M, Poggio L, Gottlieb AM. 2014. Genetic diversity of wild germplasm of “yerba mate” (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) from Uruguay. *Genetica*, 142 (6): 563-573.

- Chaves E. 1961. Yerba mate: posibilidades de su cultivo en el país. En: Equipo editor del Banco de Seguros del Estado. Montevideo, Uruguay. 47° Almanaque del Banco de Seguros del Estado. 229-232.
- Cuquel FL, De Carvalho MLM, Chamma HMCP. 1994. Avaliação de métodos de estratificação para a quebra de dormência de sementes de erva-mate. *Scientia Agricola*, 51 (3): 415-421.
- de Resende MDV, Sturion JA, de Carvalho AP, Simeão RM, Fernandes JSC. 2000. Programa de melhoramento da erva-mate coordenado pela Embrapa: resultados da avaliação genética de populações, progênies, indivíduos e clones. Embrapa Florestas-Circular Técnica 43. 66.
- Ellstrand NC. 1992. Gene flow by pollen: implications for plant conservation genetics. *Oikos*, 63: 77-86.
- Floss PA. 1997. Programa de melhoramento genético da erva-mate na EPAGRI. En: Congresso Sul-Americano da Erva-Mate (1°, 1997, Curitiba, Santa Catarina, Brasil). Anais. Colombo, Paraná, Brasil. Embrapa-Cnpq. 279-284.
- Frankel OH. 1984. Genetic perspectives of germplasm conservation. Genetic manipulation: impact on man and society. Cambridge, Reino Unido. Cambridge University Press, 61 (3): 161-170.
- Fregonezi JN, Turchetto C, Bonatto SL, Freitas LB. 2012. Biogeographical history and diversification of *Petunia* and *Calibrachoa* (*Solanaceae*) in the Neo-tropical Pampas grassland. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(1): 140-153.
- Giberti GC. 1979. Las especies argentinas del género *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*). *Darwiniana*, 22 (1-3): 217-240.
- Giberti GC. 1992. Yerba mate (*Ilex paraguariensis*). En: Hernandez Bermejo JE, León J. Cultivos marginados otra perspectiva de 1492. Colección FAO: Producción y protección vegetal N° 26. Roma, Italia: Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Publicado en colaboración con el Jardín

- Botánico de Córdoba (España) en desarrollo del Programa Etnobotánica 92 (Andalucía 92). 245-252.
- Giberti GC, Gurni AA. 2008. Anatomía floral comparada de once especies sudamericanas de *Ilex* L. (*Aquifoliaceae*) relacionadas con la yerba mate. *Dominguezia*, 24 (2): 77-94.
- Giberti GC. 2011. La “yerba mate” (*Ilex paraguariensis*, *Aquifoliaceae*) en tempranos escritos rioplatenses de Bonpland y su real distribución geográfica en Sudamérica austral. *Bonplandia*, 20 (2): 203-212.
- Greizerstein EJ, Giberti GC, Poggio L. 2004. Cytogenetic studies of Southern South-American *Ilex*. *Caryologia*: 57 (1): 19-23.
- Grela I. 2004. Geografía florística de las especies arbóreas de Uruguay: propuesta para la delimitación de dendrofloras. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, programa PDECIBA. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. 103 p.
- Heck CI, de Mejia EG. 2007. Yerba Mate Tea (*Ilex paraguariensis*): a comprehensive review on chemistry, health implications, and technological considerations. *Journal of food science*, 72 (9): 138-151.
- Jolochin G. 2016. Análisis biogeográfico de la variabilidad genética de *Eugenia uniflora* L. en Uruguay. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, programa PDECIBA. Montevideo, Uruguay. Universidad de la República. 50 p.
- Marques ADC. 2014. As paisagens do mate e a conservação socioambiental: um estudo junto aos agricultores familiares do Planalto Norte Catarinense. Tese Doutorado em Meio Ambiente e Desenvolvimento. Curitiba, Brasil. Universidade Federal do Paraná, 434 p.
- Martinez Crovetto R. 1980. Yerba mate: usos no tradicionales y posibilidades. *Participar*. 2 (12): 58-61.

- MGAP-DGF (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca- Dirección General Forestal). 2018. Estrategia Nacional de Bosque Nativo. Montevideo, Uruguay. MGAP-DGF. 50p.
- MVOTMA (Ministerio de Vivienda Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente). 2016. Estrategia Nacional para la Conservación y Uso Sostenible de la Diversidad Biológica del Uruguay 2016 - 2020. Montevideo, Uruguay. MVOTMA. 60p.
- Newton AC, Allnutt TR, Gillies ACM, Lowe AJ, Ennos RA. 1999. Molecular phylogeography, intraspecific variation and the conservation of tree species. *Trends in ecology & evolution*. 14 (4): 140-145.
- Pautasso M. 2009. Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*. 11 (1): 157–189.
- Pinheiro F, de Barros F, Palma - Silva C, Fay MF, Lexer C, Cozzolino S. 2011. Phylogeography and genetic differentiation along the distributional range of the orchid *Epidendrum fulgens*: a Neotropical coastal species not restricted to glacial refugia. *Journal of Biogeography*. 38 (10): 1923-1935.
- Prat Kricun SD. 2010. Mejoramiento genético sustentable de yerba mate y té. En: Mariotti JA. *Cultivos Industriales, avances 2006-2009: Informe del Programa Nacional de Cultivos Industriales del INTA*. Buenos Aires, Argentina. Ediciones INTA. 69-71.
- Rao VR, Hodgkin T. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant cell, tissue and organ culture*: 68 (1): 1-19.
- RAU (Red Académica Uruguaya). 2000. El mate (En línea). 25 mayo 2019. <http://www.rau.edu.uy/uruguay/cultura/mate.htm>
- Santin D, Wendling I, Benedetti EL, Nagaoka RE. 2014. Fontes de ni-trogênio e técnicas de propagação de mudas atuam na produtividade de erva-mate. En: *Con-*

- greso Sudamericano de Yerva Mate (6°, 2014, Montevideo, Uruguay). Memorias. Montevideo, Uruguay. Grupo Interdisciplinario de Yerba Mate y Salud. 46-54.
- Sturion JA, de Resende MDV. 1997. Programa de melhoramento genético da erva-mate no Centro Nacional de Pesquisa de Florestas da Embrapa. En: Congresso Sul-Americano da Erva-Mate (1°, 1997, Curitiba, Santa Catarina, Brasil) Anais. Colombo, Paraná, Brasil. Embrapa-Cnpf. 285-298.
- Sturion JA, de Resende MDV. 2001. Melhoramento genético da erva-mate. En: de Resende MDV. Workshop Sobre Melhoramento de Espécies Florestais e Palmáceas no Brasil. Colombo, Paraná, Brasil. Embrapa Florestas. 51-60.
- Turchetto C, Fagundes NJ, Segatto AL, Kuhlemeier C, Solis Neffa VG, Speranza PR, Freitas LB. 2014. Diversification in the South American Pampas: the genetic and morphological variation of the widespread *Petunia axillaris* complex (Solanaceae). *Molecular Ecology*. 23 (2): 374-389.
- Uruguay. Poder Legislativo. 1987. Ley N° 15.939/1987. Ley Forestal (En línea). Consultado 9 abril 2019. Disponible en: <https://legislativo.parlamento.gub.uy/temporales/leytemp3999023.htm>
- Wendling I, Santin D, Roveda LF, Orrutéa AG. 2007. Ambiente de enraizamento e substratos na miniestaquia de erva-mate. *Scientia Agraria*. 8 (3): 257-267.
- Vidor MA, Ruiz CP, Moreno SV, Floss PA. 2002. Genetic variability in a trial of erva-mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) progenies. *Ciência Rural*. 32 (4): 583-587.
- Vieira MA, Rovaris AA, Maraschin M, De Simas KN, Pagliosa CM, Podestá R, Amante ER. 2008. Chemical characterization of candy made of erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St. Hil.) residue. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56 (12): 4637-4642.