



Área Biología – Subárea Botánica
Maestría en Ciencias Biológicas

**Análisis biogeográfico de la
variabilidad genética de *Eugenia uniflora* L.
en Uruguay**

por

Gabriela Jolochin Manorani

30 de Mayo de 2016

Presentación

Título Tesis: Análisis biogeográfico de la variabilidad genética de *Eugenia uniflora* L. en Uruguay

Autor: Ing. Agr. Gabriela Jolochin Manorani (gjolochin@fagro.edu.uy)

Director: Ing. Agr. (MSc., PhD.) Pablo Speranza Gastaldi (pasg@fagro.edu.uy)

Palabras clave: distribución, filogeografía, Pitanga, Pleistoceno, refugios, vegetación

Resumen

El entendimiento de la estructura geográfica de la variabilidad genética intraespecífica de un grupo de especies actualmente simpátricas puede ser una herramienta poderosa para interpretar los procesos biogeográficos que han tenido lugar en una región dada, permitiendo realizar hipótesis sobre sus causas, particularmente en referencia a las fluctuaciones climáticas del período Cuaternario, las que muy a menudo son relacionadas con el establecimiento de áreas de refugio de vegetación. Las “áreas calientes” de la dendroflora subtropical de Uruguay son consideradas áreas de refugio actuales e incluyen las zonas de serranías del norte, de las Serranías del Este y la Cuchilla de Haedo, así como el área del Río Uruguay y sus afluentes, coincidiendo con las áreas de refugios pleistocénicos sugeridas para la distribución actual de las especies. Para testear esta hipótesis analizamos la distribución geográfica de la variabilidad genética de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), un árbol nativo de Argentina, Brasil y Uruguay que habita en áreas de vegetación fluvial, quebradas y serranas. Su rango de distribución geográfica natural en Uruguay comprende las áreas principales consideradas como de alta riqueza específica para el país. Analizamos la variabilidad genética de cuatro marcadores neutros cpDNA con PCR-RFLP de 474 individuos en 20 poblaciones. El análisis detectó 18 haplotipos diferentes relacionados en una red con dos clados principales. El AMOVA reveló que la variabilidad se encontraba distribuida 58% dentro y 42% entre poblaciones, y considerando regiones en poblaciones un 18%. Creemos que el síndrome de dispersión zoocórica de la semilla podría contribuir al mantenimiento del flujo génico entre poblaciones, pero los marcadores de herencia materna aún muestran clara estructuración geográfica de las poblaciones. Patrones geográficos de la variabilidad similares han sido encontrado en otras especies filogenéticamente no relacionadas, lo que refuerza la hipótesis de la existencia de áreas de refugio de vegetación Cuaternaria en Uruguay.

Summary

Understanding the geographic structure of intraspecific genetic variability of a group of currently sympatric species can be a powerful tool to interpret the biogeographic processes that have taken place in a given region and hypothesize their causes, particularly in reference to the climatic fluctuations of the Quaternary period which are often related to the establishment of vegetation refuge areas. Subtropical woody species hotspots in Uruguay, considered present refuge areas, include the hilly landscapes of the northern portions of the Eastern *Serranías* and the *Cuchilla de Haedo*, and the Uruguay River and its surroundings, coincidentally with the pleistocenic refugial areas suggested for currently widespread species. To test this hypothesis, we analyzed the geographical distribution of genetic variability in *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae), a tree native to Argentina, Brazil and Uruguay which occurs in riparian communities, ravines and montane forests. Its geographical range in Uruguay comprises the three main hot spots. We analyzed genetic variability by four putatively neutral cpDNA PCR-RFLP markers for 474 individuals from 20 populations. The analysis yielded 18 different haplotypes arranged in a network with two main clades. Analysis of molecular variance revealed that variability is distributed 58% within and 42% between populations, and 18% considering regions. We believe that the zoochoric seed dispersal syndrome of this species may contribute to maintaining gene flow among populations, but maternal markers still show a very clear geographic structure. Similar geographic patterns in the variability of other phylogenetically unrelated species strongly support the hypothesis of the existence of areas of Quaternary vegetation refuge in Uruguay.

Agradecimientos

Durante el desarrollo de esta investigación tuve la oportunidad de compartir una gran cantidad de tiempo con muchas personas que colaboraron en varios aspectos para que finalmente pudiera finalizar esta etapa de mi formación académica.

Primero que nada quisiera agradecer a mi tutor, Pablo Speranza, por escucharme aquel día que llegué a su oficina en busca de un tema interesante con un Orientador que “oriente” y así al aceptar su propuesta me permitió conocer una forma de trabajar y todo un mundo nuevo para mí.

También me gustaría agradecer infinitamente a todas las personas que colaboraron en las salidas de campo en busca de las poblaciones naturales de “Pitanga” (Anita Arruabarrena, Elisa Arana, Silvia González, Rafael Escudero, Danila Balbi, Mauricio Bonifacino, Andrés González, Pablo Hernández, Pablo Speranza, Magdalena Vaio, Ana González, Juan Cabris y algún que otro de mis estudiantes de 4to Forestal).

A todos mis compañeros del LEDP (Laboratorio de Evolución y Domesticación de las Plantas – DBV) que me ayudaron a obtener “mejores” calidades de extracción de ADN y “extraordinariamente sufridas” PCRs (Anita Arruabarrena, Eliana Monteverde, Pablo Sandro, Paula Silva, Magdalena Vaio, Manuela Silveira, Paola Gaiero) o que ayudaron compartiendo técnicas o levantando la moral con alguna que otra charla motivacional (todos los anteriores más, Marianita Andino, Dani Olsson, Estelita Baccino, Coco Scaltritti, Nacho Quintans).

A mis compañeros del Laboratorio de Botánica por su apoyo en todos estos años de trabajo e investigación.

A mis compañeros del Departamento de Producción Forestal y Tecnología de la Madera por su apoyo en todas las actividades relacionadas a esta investigación y en el trabajo cotidiano.

A todos los amigos dispersos por el mundo que mi trabajo en la Universidad me ha permitido cosechar y los que me ayudaron a la distancia a solucionar problemas en el laboratorio los fines de semana infinitos amplificando fragmentos cloroplásticos.

Al PEDECIBA por permitirme realizar la maestría y a la ANII por financiar esta investigación por medio del proyecto concursable del Fondo Clemente Estable (PR_FCE_2009_1_2247).

Al Tribunal por sus comentarios, sugerencias y por aceptar ser parte de esta etapa en mi formación académica.

A mi familia, por todo.

Tabla de contenido

Introducción	1
BIOGEOGRAFÍA Y ÁREAS DE REFUGIO DE VEGETACIÓN RELACIONADAS A OSCILACIONES CLIMÁTICAS.....	1
ÁREAS DE REFUGIO Y PATRONES ESPACIALES DE DISTRIBUCIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA	6
EUGENIA UNIFLORA COMO MODELO	11
Objetivos e hipótesis	15
Materiales y métodos	16
POBLACIONES, ESTRATEGIA DE RECOLECCIÓN Y MATERIAL RECOLECTADO	16
ANÁLISIS MOLECULAR	16
ANÁLISIS DE DATOS	20
Resultados	21
VARIABILIDAD GENÉTICA POBLACIONAL DE FRAGMENTOS CLOROPLÁSTICOS.....	21
HAPLOTIPOS ENCONTRADOS.....	22
PARTICIÓN DE LA VARIABILIDAD INTRA E INTERPOBLACIONAL	22
ESTIMACIONES DE F (Φ) Y NÚMERO DE MIGRANTES (Nm)	23
ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA).....	24
RED HAPLOTÍPICA	24
DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA DE LOS HAPLOTIPOS	26
RELACIÓN ENTRE DISTANCIA GEOGRÁFICA Y DISTANCIA GENÉTICA.....	29
Discusión	30
ALTA VARIABILIDAD INTRAESPECÍFICA.....	30
VARIABILIDAD INTRAPOBLACIONAL	31
ESTRUCTURACIÓN DE LA VARIABILIDAD POBLACIONAL Y PROPUESTA DE ÁREAS DE VEGETACIÓN RELICTUAL	32
BIOGEOGRAFÍA DESDE LA VISIÓN FILOGEOGRÁFICA.....	35
Conclusiones	36
Bibliografía	37

Introducción

Biogeografía y áreas de refugio de vegetación relacionadas a oscilaciones climáticas

Metodologías en biogeografía

Debido a que la biogeografía es un campo de estudio interdisciplinario, existen muchas y muy amplias definiciones acerca de su objetivo de estudio, pero podría definirse como el estudio de la distribución espacial y temporal de los seres vivos y sus atributos (Cox & Moore, 2010). Por lo tanto es muy importante incluir además de la distribución en un área, hacerlo en relación al tiempo, lo que le da una dimensión amplia en sentido de la inclusión de información acerca de la historia de las distribuciones y su variación a través de la vida de la Tierra (Cox & Moore, 2010). Esta combinación de espacio y tiempo de las distribuciones puede ser analizada a niveles más históricos (biogeografía histórica) con una visión de áreas globales, o analizados a niveles más locales y en tiempos más acotados, con un énfasis más ecológico (biogeografía ecológica). Como consecuencia del amplio concepto de la biogeografía, existen varios enfoques, por lo que podemos hablar de biogeografía cladística, biogeografía evolutiva, biogeografía cuantitativa, de análisis de parsimonia, macroecología, panbiogeografía, biogeografía de refugios cuaternarios, hasta la filogeografía intraespecífica, entre otras (Morrone, 2007). En todos los casos, los principales procesos asociados a los patrones de distribución identificados son la dispersión y la vicarianza, además de la extinción (Futuyma, 2003).

Algunos de los enfoques utilizados en biogeografía utilizan las distribuciones actuales de los *taxa* para generar mapas biogeográficos, como la panbiogeografía (Croizat, 1958) y se basan en el dispersalismo y los centros de masa asociados a zonas de alta diversidad, a diferencia de los centros de origen utilizados por los dispersalistas clásicos (Contreras Medina *et al.*, 2001). Los enfoques que utilizan áreas de endemismos y análisis de parsimonia, se basan en la idea vicariancista, ya que las consideran áreas que están delimitadas por barreras naturales, que han sido las causantes de la restricción de *taxa* restringidos a determinadas áreas. En estos enfoques se considera que esas congruencias están relacionadas a un origen filogenético común y en algunos casos a las relaciones de la biota con su hábitat, con una visión ecológica (Morrone, 2004). La biogeografía cladística es un enfoque panbiogeográfico (a través de la distribución de los organismos en patrones) que incluye datos de la sistemática filogenética (a

través de la historia evolutiva de los grupos monofiléticos), por lo que se apoya en el concepto de la distribución por vicarianza. Es por eso que los métodos panbiogeográficos y cladísticos pueden ser vistos como partes complementarias en el análisis de la biogeografía evolutiva, aplicándose como etapas diferentes en un mismo análisis (Morrone, 1997).

Los mapas biogeográficos más utilizados en la región están basados en distribuciones geográficas y las superposiciones de un conjunto de *taxa* definidos. Se apoyan además en el enfoque de parsimonia de endemismos que utiliza trazos y nodos que conectan las áreas de endemismo basados en la presencia/ausencia de dos o más especies en un área determinada (*Parsimony Analysis of Endemicity*, PAE), generalmente asociada a una cuadrícula en el espacio (Morrone, 2007). Los mapas realizados por Cabrera & Willink (1980) sobre las regiones biogeográficas de América Latina son un buen ejemplo de enfoques basados en áreas de endemismos, así como los mapas de regiones dendroflorísticas para Uruguay de Grela (2004), por lo que en estos casos los límites de las regiones se basan en la riqueza específica (diversidad α) como . En otros casos además se toma en cuenta la diversidad entre ambientes (diversidad β) (Cox & Moore, 2010; Kreft & Jetz, 2010).

Cuando a los enfoques biogeográficos se le incluyen datos sobre la diversidad intraespecífica y no sólo los patrones asociados a la riqueza específica en el espacio, entonces las delimitaciones de las regiones biogeográficas incluyen frecuentemente interpretaciones que toman en cuenta los sucesos que habrían ocurrido durante el tiempo y en el espacio, como en la biogeografía de refugios cuaternarios y en la filogeografía (Avice, 2000).

Refugios climáticos asociados a refugios de vegetación relictual

El término “refugios o relictos climáticos” de la biogeografía histórica es aplicable a especies cuyo rango de distribución geográfica se ha contraído recientemente en la historia de la Tierra debido a cambios climáticos (Dobrowski, 2011). La interpretación de los cambios en los rangos de distribución de las especies se pueden utilizar para realizar inferencias acerca de las condiciones ambientales pasadas, por lo que una especie puede ser considerada relictual utilizando su rango de distribución actual y su asociación con hábitats específicos (Hampe & Jump, 2010).

Frecuentemente se relacionan las oscilaciones climáticas del Cuaternario, principalmente del Pleistoceno, con el establecimiento de áreas de refugio de vegetación. Las retracciones de los rangos de distribución a menudo pueden ser incompletas por lo que algunas poblaciones que han persistido *in situ* durante el período de oscilaciones climáticas del Cuaternario en zonas aisladas donde las condiciones ambientales les permitían mantenerse como relictos poblacionales rodeados por un clima adverso, mientras que expandían su rango de distribución en otras regiones (Ab'Sáber, 1977; Prance, 1982; Mayr & O'Hara, 1986; Hampe & Jump, 2010). Se estima que las poblaciones relictuales estables podrían ser en el orden de dos o tres veces más antiguas que cualquiera de las poblaciones del resto del rango ya que han persistido aisladas por un largo tiempo (Hampe & Petit, 2005).

Básicamente existen tres tipos de refugios climáticos (Cox & Moore, 2010): a) Relictos Terciarios debido a las condiciones climáticas cada vez más secas y frías durante el Terciario tardío y el Cuaternario temprano; b) Relictos glaciales ampliamente distribuidos durante los períodos fríos del Cuaternario y que experimentaron un amplio rango de contracciones hasta el Último Máximo Glacial (UMG), y c) relictos postglaciales persistentes en regiones del mundo que experimentaron períodos más cálidos en el Holoceno temprano que los que experimentan hoy.

Ya que las áreas de refugio son consideradas áreas de relictos poblacionales que han podido persistir por largos períodos bajo un ambiente estresante, entonces se considera que los refugios son lugares donde se mantienen poblaciones de relictos climáticos. Este concepto de refugio puede ser aplicado tanto a refugios pasados como a refugios actuales (Hampe & Jump, 2010).

Modelos de refugios sugeridos para Sudamérica y su aplicación en la región

Treinta y dos millones de años atrás (Maa) las temperaturas medias en la Tierra comenzaron a disminuir lentamente. Este proceso se habría acelerado hace 2 Maa hacia los inicios del Pleistoceno. Las glaciaciones en el hemisferio Norte, hace 1,5 Maa, provocaron la expansión de las capas de hielos polares que cubrían la mayor parte del Hemisferio Norte, mientras que en el Hemisferio Sur la cubierta de hielos polares cubría la Antártida y el extremo Sur de Sudamérica. Los cambios climáticos sucedidos durante este período ocasionaron la reducción de los bosques tropicales de todo el mundo, por lo que en la Amazonia el bosque tropical

húmedo podría haberse alterado en grandes áreas (Prance, 1996; Ab'Sáber, 2002). Durante este período las áreas de bosques tropicales de tierras bajas se habrían transformado en sabanas por largos períodos de tiempo, lo que habría generado aislamiento de parches de bosques en los sectores más húmedos a partir de los cuales se cree se expandió gradualmente el bosque hace entre 18.000 y 15.000 años atrás (Ledru *et al.*, 1996; Lavina & Fauth, 2011).

Actualmente existen varias hipótesis sobre cambios climáticos en el UMG en latitudes medias de Sudamérica, retracciones y expansiones sucesivas de la vegetación en dirección SW-NE con cambios en los rangos de distribución de las especies, generando extinciones locales y aislamientos poblacionales por largos períodos de tiempo (Collevatti *et al.*, 2013; Turchetto *et al.*, 2014). Estas oscilaciones podrían generar en las fases áridas, que los *taxa* adaptados a ambientes húmedos y cálidos de biotas tropicales y subtropicales se refugiaran en áreas de depresiones geográficas de las cuchillas y quebradas en áreas dominadas por vegetación herbácea (Ab'Sáber, 1977), pero también posibilitarían la alternancia de oportunidad de expansión de la biota asociada a ambientes más secos (Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2011).

En Sudamérica se han sugerido áreas refugio principalmente para la región Amazónica (Prance, 1996), los Andes meridionales y las regiones subtropicales periamazónicas (Prado & Gibbs, 1993; Pennington *et al.*, 2000; Prado, 2000). La zona templada en Patagonia también ha sido bien estudiada (Premoli, 1998; Allnutt *et al.*, 1999; Premoli *et al.*, 2000; Premoli *et al.*, 2001; Allnutt *et al.*, 2003; Premoli *et al.*, 2003; Marchelli & Gallo, 2006; Mathiasen & Premoli, 2010), sin embargo, la zona subtropical de la región biogeográfica de Pampas ha recibido menor interés, pero autores como Ab'Sáber (1977) e Iriarte (2006) plantean hipótesis similares.

Las oscilaciones climáticas del Cuaternario asociadas a la generación de diversidad podrían también explicar las altas tasas de diversidad en determinadas áreas geográficas. La acumulación de especies o cualquier otro *taxa* en un área puede deberse a mecanismos de dispersión o especiación *in situ* y los puntos calientes (*hot spots*) de biodiversidad a menudo se encuentran ocupando tipos particulares de vegetación. Los cambios geológicos y climáticos que implican fragmentación de ambientes y la subsiguiente expansión de la vegetación podría explicar en parte la gran diversidad encontrada en los puntos calientes, ya que el proceso de vicarianza es muy importante en la generación de la diversidad (Chatrou *et al.*, 2009).

Grela (2004) propuso la existencia de núcleos de alta riqueza de especies leñosas subtropicales considerados dentro de Uruguay como puntos calientes de diversidad. Estas áreas también han sido consideradas como centros de diversidad para otros grupos de plantas (De La Sota, 1967; Crisci *et al.*, 2001). Estas áreas podrían ser consideradas también como áreas de refugio actuales de este tipo de especies en Uruguay, ya que a nivel continental forman parte de un tipo de vegetación considerado relictual (Prado & Gibbs, 1993; Pennington *et al.*, 2000; Prado, 2000). En Uruguay las áreas consideradas como refugios de vegetación corresponden con la mitad norte de las serranías del Este, el norte de la Cuchilla de Haedo (principalmente las quebradas de Tacuarembó y Rivera), y la porción norte del río Uruguay y sus adyacencias (Grela, 2004; Haretche *et al.*, 2012).

Cambios climáticos pasados en la región

Los estudios paleoclimatológicos regionales sugieren que durante las oscilaciones climáticas, principalmente durante el Pleistoceno, la vegetación de bosques tropicales habría tenido una mayor expansión hacia el Sur durante los períodos interglaciales debido al aumento de la temperatura y la humedad propiciando la instalación de un clima subtropical hacia latitudes más altas. Durante los períodos glaciales, la región habría sufrido una disminución de las temperaturas y la humedad generando un clima más árido, desplazando el clima subtropical hacia el norte (Damuth & Fairbridge, 1970; Ab'Sáber, 1977; Iriondo, 1998; Iriondo, 1999). En otros estudios también han sido reportados los cambios en el nivel de mar y su influencia en los cambios en los límites de distribución de la vegetación (Mäder *et al.*, 2013; Ramos-Fregonezi *et al.*, 2015). Según estas hipótesis en la región donde se ubica Uruguay, durante los períodos de clima más favorables para la expansión de la vegetación subtropical, las áreas boscosas podrían haberse expandido hasta el sur del territorio, mientras que en los períodos de contracción de la vegetación boscosa debido al aumento de la aridez se habrían fragmentado las áreas boscosas quedando únicamente restringidas a las áreas de refugio que permitieran mantener las condiciones de temperatura y humedad necesarias para el desarrollo de este tipo de vegetación (**Fig. 1**).

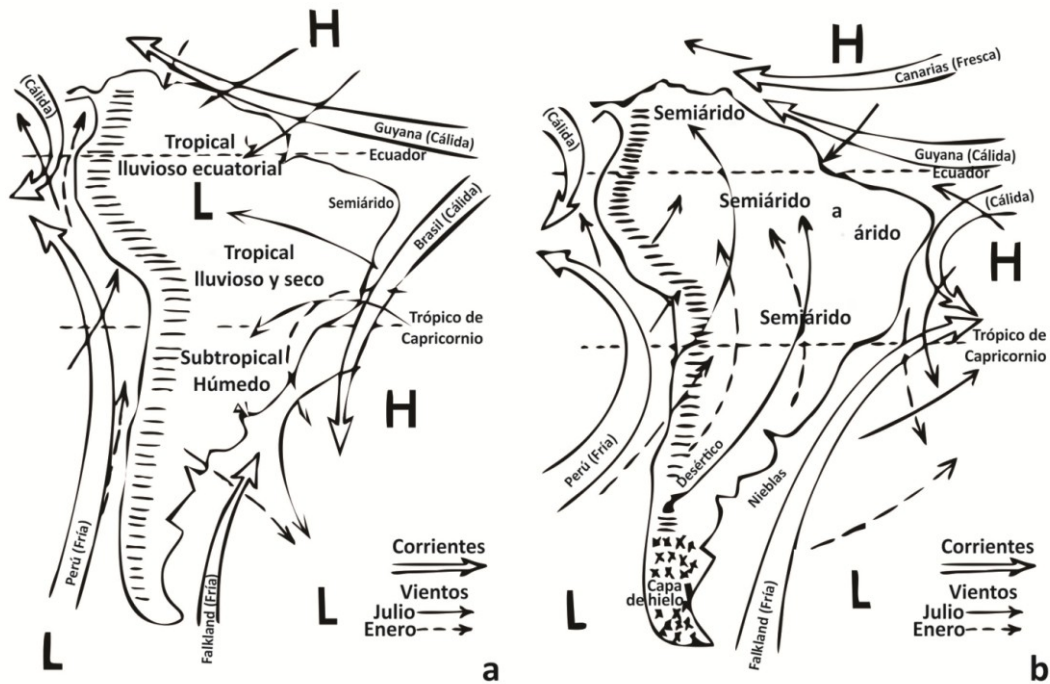


Figura 1. Cambios climáticos sucedidos en las oscilaciones durante el Pleistoceno en Sudamérica y sus tipos climáticos. a) Mapa de sistemas de corrientes oceánicas y vientos durante las fases interglaciales; b) Mapa de sistemas de corrientes oceánicas y vientos durante las fases glaciales. Tomado y modificado de (Damuth & Fairbridge, 1970).

Áreas de refugio y patrones espaciales de distribución de la variabilidad genética

Análisis de la distribución de la variabilidad genética

La variabilidad genética es especialmente indispensable para la adaptación de las especies y poblaciones de árboles a los cambios ambientales debido a su largo ciclo de vida y es asimismo la condición previa de la conservación. La investigación y conservación de estas poblaciones es de gran prioridad en particular para diseñar estrategias exitosas de conservación de la biodiversidad intra e interespecífica bajo un escenario de cambio global anticipado (Hampe & Petit, 2005). La implementación de estrategias de conservación, tanto *in situ* como *ex situ*, sólo será posible si éstas se basan en el conocimiento de los requisitos ambientales y en los tipos de bosques y la variabilidad de sus especies, en combinación con las hipótesis de los cambios climáticos futuros (Wrege *et al.*, 1991).

La divergencia genética entre individuos de diferentes poblaciones puede ser estimada mediante el cálculo de las distancias genéticas y la partición de la varianza entre y dentro de poblaciones usando el F_{ST} o Coeficiente de Diferenciación genética (Wright, 1965) y sus diferentes estimadores derivados como el Φ_{PT} (Excoffier *et al.*, 1992). Los coeficientes de diferenciación génica son estimadores de la divergencia entre pares de poblaciones bajo un modelo donde todas las poblaciones divergen al mismo tiempo y con similares tasas de migración, pero como las tasas de migración usualmente varían con la distancia geográfica, entonces las estimaciones de diferenciación génica pareadas entre poblaciones también lo hacen (Diniz-Filho *et al.*, 2013). El test de Mantel permite correlacionar la divergencia genética a través de una matriz de Φ_{PT} pareados y las distancias geográficas (Mantel, 1967), detectando si las diferencias entre las poblaciones es debida a la disminución del flujo génico es proporcional a la distancia geográfica, lo cual podría estar reflejando que se encuentran estructuradas de otra manera. Cuando la correlación es baja, las diferencias en la variabilidad genética entre las poblaciones no se deberían a la distancia que las separa, sino a otros efectos modeladores de la variabilidad poblacional (Diniz-Filho *et al.*, 2013).

El tamaño efectivo de una población (N_e) y la tasa de migrantes (m) permiten calcular el número de migrantes efectivos entre poblaciones de una especie (Nm) y puede ser estimado por medio de varios métodos (Avise, 2000). El valor de Nm se interpreta como una estimación media por generación del número absoluto de migrantes intercambiados entre las poblaciones que se están analizando, siendo los valores entre 1-4 (valores altos) interpretados como indicadores de que el flujo génico durante un tiempo prolongado ha homogeneizado las poblaciones anulando los efectos de la deriva génica como efecto diversificador. Por lo tanto valores de $Nm < 1$ (valores bajos) sugieren que la deriva génica sería la fuerza que actúa en la diferenciación local de las poblaciones (Birky *et al.*, 1983).

El F_{ST} varía según las características de las especies y las poblaciones y puede ser estimado a través del análisis de marcadores moleculares nucleares, el cual permite realizar comparaciones entre estudios basados en diferentes técnicas (Aguinagalde *et al.*, 2005). Generalmente en especies de árboles presentan valores bajos de F_{ST} , indicando que las poblaciones tienen niveles de estructuración bajos (Loveless & Hamrick, 1984) aunque serían necesarios más análisis de este tipo en especies de árboles tropicales y australes, ya que la mayoría están basados en regiones del Paleártico y Neártico, relativamente pobres en

diversidad específica (Pautasso, 2009). Estas generalizaciones, sin embargo, están basadas en la estimación del flujo génico a través de marcadores nucleares, que en el caso de las plantas, es el resultado conjunto de la dispersión del polen y las semillas (Petit *et al.*, 1993). Los patrones con que se dispersan las semillas y la forma con que se establecen o extinguen las poblaciones son las que afectan a los patrones de variación del ADN cloroplástico (cpDNA) (Aguinagalde *et al.*, 2005), por lo que la estructuración genética de las poblaciones asociada a los marcadores nucleares estaría relacionada al tipo de sistema reproductivo y el modo de dispersión de la semilla a los marcadores de los organelos de herencia materna (Duminil *et al.*, 2007).

Filogeografía

La variabilidad genética y los patrones con que se relacionan formando redes haplotípicas pueden asociarse a su contexto geográfico y así entenderse como filogeografía, una ciencia que estudia los principios y procesos que modelan las distribuciones geográficas de los linajes genealógicos entre y dentro de especies relacionadas (Avice *et al.*, 1987). Los procesos biogeográficos que han tenido lugar en una región determinada y sus causas pueden ser interpretados por medio del conocimiento sobre la estructura geográfica de la variabilidad genética de las especies cuyo rango de distribución natural se encuentra en una determinada área en la actualidad (Avice, 2000; Hewitt, 2004). Se pueden distinguir cuatro aspectos de la concordancia genealógica que toman relevancia filogeográfica (Avice, 2000): I) Concordancia entre caracteres dentro de un gen; II) Concordancia en la significancia de las particiones genealógicas entre varios genes en una especie; III) Concordancia en las particiones de los árboles de genes entre múltiples especies codistribuidas; IV) Concordancia de las particiones de los árboles de genes con los límites espaciales entre las provincias biogeográficas reconocidas tradicionalmente.

Para buscar evidencia específicamente sobre los cambios en la distribución geográfica de las poblaciones de plantas, pueden utilizarse marcadores que permitan observar exclusivamente la dispersión de los individuos y las poblaciones a través de las semillas. La herencia materna de los organelos de herencia citoplasmática (cloroplastos en la mayoría de las Angiospermas y mitocondrias en la mayoría de las Gimnospermas) y su particular polimorfismo intraespecífico, han sido algunos de los principales motivos por los que han tomado especial

valor como marcadores filogenéticos en estudios filogeográficos. Debido a la historia demográfica de las poblaciones, la microevolución puede observarse en la estructura de las genealogías de genes y son parte relevante de los patrones filogeográficos que pueden detectarse en las poblaciones actuales (Avice, 2000).

Los patrones con que se distribuye geográficamente la diversidad genética en las especies leñosas determinan la forma en que sus poblaciones se adaptan al bosque donde habitan y cómo se comportan frente a cambios ambientales (Petit & Hampe, 2006). Debido a las características típicas de las especies leñosas de permanecer por largos períodos de tiempo en un mismo ambiente, cercanos a otros individuos con tamaños poblacionales grandes y un sistema reproductivo principalmente alógamo con un alto nivel de flujo polínico, permite que potencialmente presenten una alta adaptación local, lo que puede verse reflejado en su alto nivel de diversidad dentro de poblaciones con baja diferenciación entre poblaciones (Petit & Hampe, 2006).

Biogeografía de refugios

Hoy en día existe una amplia evidencia de que el cambio climático moderno está modificando la distribución geográfica de las especies en todo el mundo (Aitken *et al.*, 2008). La dinámica con que las poblaciones habitan las regiones marginales del rango de distribución, son las que parecen ser de importancia crítica para algunas respuestas de las especies a los cambios climáticos esperados (Hampe & Petit, 2005). Los cambios climáticos pasados son uno de los principales modeladores de la vegetación y la forma con que estos cambios impactan a las poblaciones de plantas (y toda la vida que interacciona con ella) en una región pueden ser observados en la vegetación actual por medio de los patrones con que se relacionan las poblaciones a pesar de estar en regiones disyuntas y ser muy semejantes, o encontrarse en área muy cercanas geográficamente, pero ser muy disímiles genéticamente (Avice *et al.*, 1987). Es por eso que frecuentemente las zonas de refugio con poblaciones relictuales en zonas ecológicamente marginales son de importancia en la conservación a largo plazo de la diversidad genética, la historia filogenética y la evolución potencial de las especies (Lesica & Allendorf, 1995; Felton *et al.*, 2009). La contracción y expansión de la vegetación modelada por clima y tiempo, genera barreras al flujo génico y a la dispersión mediante barreras físicas o biológicas, por lo que los refugios forman pequeñas áreas que mantienen un determinado

pool génico y se mantienen separadas por un largo período de tiempo (Jansson & Dynesius, 2002).

En una de las regiones mejor estudiadas, Petit *et al.* (2005) encuentran las relaciones entre las condiciones del UMG y la filogeografía de las especies del Mediterráneo, mediante extensas investigaciones de la estructura poblacional de varias familias botánicas, basadas en las relaciones de haplotipos cloroplásticos. McLachlan *et al.* (2008) mediante redes de haplotipos en estudios de variabilidad genética de cpDNA, evaluaron la capacidad de árboles de ajustar su distribución geográfica como consecuencia del rápido cambio climático pasado, para varias especies del Este de Estados Unidos.

La variabilidad genética intraespecífica y sus patrones en Uruguay

Grela (2004) se basa exclusivamente en criterios florísticos en la identificación de las áreas de alto valor de riqueza específica como áreas de refugio de vegetación, por lo que las hipótesis biogeográficas planteadas deben ser corroboradas con estudios moleculares de la variabilidad genética de las especies. Este tipo de estudios son utilizados como herramientas para inferir el comportamiento de las poblaciones y sus rangos de distribución histórica, permitiendo establecer hipótesis acerca de cómo el clima y otros factores son modeladores de las distribuciones actuales (Avice, 1987).

Los patrones de distribución de la variabilidad genética de *Turnera sidoides* (Speranza *et al.*, 2007), *Paspalum dilatatum* (Speranza, 2005), *Paspalum quadrifarium* (Vaio, 2000) y *Petunia axillaris* (Turchetto *et al.*, 2014) para la región, sugieren la existencia de áreas refugio en Uruguay, en las que la fase de retracción de estas especies con alto requerimiento de humedad (durante las épocas de mayor aridez sugeridas por Iriondo, 1998, 1999) habría promovido el aislamiento genético de las poblaciones actuales (Speranza *et al.*, 2007). Para las especies mencionadas las zonas consideradas como áreas de refugio coincidirían con áreas ubicadas en la zona de las serranías del Este (Maldonado, Lavalleja, Treinta y Tres y Cerro Largo) y en el extremo norte de la Cuchilla de Haedo (Salto, Tacuarembó y Rivera).

En base a los modelos propuestos para otras regiones del mundo, se plantea entonces, la posibilidad de que la distribución de la variabilidad genética de ciertas especies en Uruguay está modelada por la existencia de refugios de vegetación generados por cambios climáticos

pasados, principalmente durante el UMG, los cuales coincidirían con las áreas actuales consideradas como de alta riqueza específica, detectándose una alta estructuración genética de las poblaciones. Actualmente en nuestro país existen pocos antecedentes de este tipo de trabajos en plantas (Speranza *et al.*, 2007; Baccino, 2011; Turchetto *et al.*, 2014), aunque existen trabajos en otros grupos, principalmente animales (Wlasiuk *et al.*, 2003; García *et al.*, 2009). Los escasos estudios disponibles para la flora local han sido realizados en especies herbáceas cuya distribución abarca todo el territorio (Speranza *et al.*, 2007; Turchetto *et al.*, 2014) o en pequeñas poblaciones de leñosas que no abarcan el rango completo de distribución geográfica en Uruguay (Baccino, 2011; Cascales *et al.*, 2014). De acuerdo al modelo generalmente propuesto en la literatura de refugios biogeográficos, en especies leñosas cuya distribución abarca los diferentes núcleos de diversidad identificados en base a estudios florísticos en nuestro país, se esperaría encontrar una fuerte divergencia genética entre las poblaciones de cada núcleo. Para poner a prueba esta hipótesis es necesario seleccionar un modelo que cumpla con ciertos requisitos: una distribución geográfica que cubra el rango de las áreas a contrastar y la existencia de variabilidad genética detectable con las tecnologías disponibles.

Eugenia uniflora como modelo

Características de la especie

Eugenia uniflora L. (Myrtaceae) es una especie arbórea originaria de Argentina, Paraguay, Brasil y Uruguay, componente habitual de bosques ribereños, de quebradas y serranos, en los que ocupa los estratos medios del dosel (Brussa & Grela, 2007), siendo un componente típico de la vegetación de los bosques de las provincias biogeográficas Paranaense y Atlántica (**Fig. 2**). Es considerada una especie arbórea de bajo a mediano porte, copa amplia y follaje persistente, aunque puede perder el follaje al inicio de la primavera y comportarse como semi-persistente. Las flores son las típicas de Myrtaceae, hermafroditas, blancas, poliestémonas de características generalistas. La floración ocurre desde fines de agosto a principio de noviembre en Uruguay (Brussa & Grela, 2007), presentando una floración masiva, típica de especies alógamas de polinización entomófila, principalmente visitadas por abejas (da Silva & Pinheiro, 2007; da Silva & Pinheiro, 2009). La fructificación se produce desde diciembre a marzo en Uruguay (Brussa & Grela, 2007), con frutos carnosos tipo bayas, costillados, de

colores anaranjados, rojizos hasta morados, de hasta 1,5 cm de diámetro y 1-2 semillas, siendo frutos típicos de dispersión endozoocórica, principalmente aves generalistas y mamíferos pequeños (Lughadha & Proença, 1996) (**Fig. 3**).

Esta especie es considerada una planta multipropósito por su uso ornamental, frutal y medicinal, y cultivada en numerosas partes del mundo con tales fines (Bezerra *et al.*, 2000; Backes & Irgang, 2002; Franzon, 2008), y tiene como interés adicional servir de base para futuros programas de domesticación y mejoramiento genético, ya que en Uruguay no existen cultivos comerciales y su utilización es principalmente extractiva. Aún cuando en la Facultad de Agronomía se están evaluando materiales provenientes de plantas cultivadas, hasta el momento no hay evaluaciones cuantitativas de su variabilidad ni de las poblaciones naturales incluidas en estas investigaciones (Vignale & Bisio, 2004; Vignale & Bisio, 2005).



Figura 2. Área principal de distribución geográfica natural de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). Tomado y modificado de base de datos INCT - *Herbário Virtual da Flora e dos Fungos* (<http://inct.splink.org.br/>), Brussa & Grela (2007) y Rotman (1995).

Rango de distribución geográfica

Su rango geográfico en Uruguay comprende tres núcleos principales: a) Cerro Largo-Treinta y Tres, b) Tacuarembó-Rivera, y c) márgenes y adyacencias del río Uruguay (Grela, 2004). Estos núcleos resultan coincidentes con el patrón de distribución de la variabilidad genética poblacional (intraespecífica) de algunas especies estudiadas para el país y también con el área de influencia de la provincia biogeográfica Paranaense y los *hot spots* definidos por Grela (2004) en función de los rangos geográficos de 185 especies arbóreas nativas utilizadas por Haretche *et al.* (2012) en mapas de distribución basados en inventarios florísticos. También pueden encontrarse individuos de esta especie fuera del área principal de distribución, pero se cree que corresponden a individuos adventicios provenientes de árboles plantados en áreas cercanas, ya que en general aparecen solitarios que se mapean como de área secundaria de distribución (Brussa & Grela, 2007).

En Brasil la especie se distribuye desde Bahía hasta Rio Grande do Sul donde ocurre en todos los tipos vegetacionales leñosos del estado (Sobral, 2003), en Paraguay aparece en bosques fluviales y en Argentina aparece principalmente en bosques fluviales de Misiones, Corrientes y Entre Ríos (Rotman, 1995).

Variabilidad genética detectable

La morfología de la especie está bien descrita y se considera una especie alógama con un grado variable de autocompatibilidad (da Silva & Pinheiro, 2009). La variabilidad intraespecífica, el comportamiento fenológico y la biología reproductiva no han sido desarrollados en el país. Existen antecedentes en Brasil de estudios de la variabilidad genética de las poblaciones de *E. uniflora* y el desarrollo de programas de domesticación y mejoramiento genético (Margis *et al.*, 2002; Salgueiro *et al.*, 2004) así también como herramientas para estimar la degradación de áreas naturales y su capacidad de sobrevivir frente a los cambios ambientales perturbadores (Margis *et al.*, 2002). En estos estudios queda bien establecido que la especie contiene variabilidad detectable e informativa a nivel de cpDNA. Además de esto, el estudio realizado por Salgueiro *et al.* (2004) caracterizó la estructura de las poblaciones naturales de esta especie en áreas adyacentes en el Brasil, por lo que el estudio de esta especie en Uruguay podría tener mayor potencial informativo.



Figura 3. *Eugenia uniflora* (Myrtaceae) – “Pitanga” – a) Hábito arbóreo; b) Follaje persistente; c) Floración masiva; d) Flores en racimos cortos o fascículos; e) Fruto tipo baya. Fotos: G. Jolochin.

Objetivos e hipótesis

Eugenia uniflora posee características deseables como modelo para observar los patrones de estructuración de la variabilidad genética en el espacio. La determinación de patrones biogeográficos para una especie de estas características permitiría establecer correspondencias con las hipótesis sobre las áreas de refugio encontradas para otras especies. Los patrones que emerjan del análisis conjunto de varias especies permitirán hipotetizar un modelo biogeográfico para el país. La información generada de la distribución geográfica de la variabilidad genética de los polimorfismos moleculares sería de gran utilidad para el diseño de estrategias generales para la conservación de la flora. A su vez la selección de un modelo adecuado generará información de gran importancia de un recurso fitogenético de gran valor para el Uruguay.

Por lo tanto el objetivo general del trabajo es analizar biogeográficamente la variabilidad genética de las poblaciones naturales de *Eugenia uniflora* en Uruguay y los objetivos específicos son: 1) Analizar la estructura de la variabilidad genética de poblaciones naturales de *Eugenia uniflora* utilizando marcadores moleculares neutros y 2) Analizar la distribución geográfica de la variabilidad genética encontrada y su congruencia con los patrones de refugios biogeográficos y de diversidad florística propuestos para el país.

Las hipótesis que se plantean en este trabajo son: 1) Debido a que la variabilidad genética de las especies y los patrones con que se distribuye están explicados por las diferentes proporciones de variabilidad entre y dentro de poblaciones, sería esperable encontrar que existiera diferenciación entre las poblaciones de *E. uniflora* en el país; 2) El rango de distribución de la especie se encuentra en diferentes regiones identificadas como áreas de alta riqueza específica para la dendroflora y consideradas como área de refugio de vegetación relictual asociadas a refugios climáticos, por lo tanto sería esperable que existiera estructuración de las poblaciones de *E. uniflora* y que sus patrones de distribución estuvieran asociados a los patrones de refugio encontrados para otras especies estudiadas en Uruguay.

Materiales y Métodos

Poblaciones, estrategia de recolección y material recolectado

Poblaciones y estrategia de recolección

Se recolectaron hasta 30 individuos de 20 poblaciones del rango de distribución cubriendo las áreas biogeográficas identificadas en el modelo de puntos calientes actuales propuestos para la flora leñosa en Uruguay (Grela, 2004; Haretche *et al.*, 2012): 1) márgenes y adyacencias del Río Uruguay, 2) Serranías de Tacuarembó-Rivera y 3) Serranías de Cerro Largo-Treinta y Tres, tomadas como las diferentes regiones para el análisis (**Tabla 1**; **Fig. 4**). Las salidas de recolección de materiales fueron realizadas entre los años 2009 y 2013.

Material para extracción de ADN

Para cada individuo, en cada una de las 20 poblaciones, se recolectaron hojas totalmente desarrolladas y en buen estado sanitario, siendo guardadas en sobres de papel rotulados. Las accesiones fueron desecadas utilizando gel de sílice y mantenidas en forma hermética hasta la posterior extracción y análisis de ADN. En algunos casos las muestras no fueron desecadas y se mantuvieron frescas hasta llegar al laboratorio para realizar la extracción de ADN a partir de hojas frescas, siendo el restante material desecado y mantenido de la forma anteriormente descrita.

Conservación de material de referencia recolectado

Una muestra por población fue ingresada al Herbario de la Facultad de Agronomía (MVFA) como muestras de herbario de referencia de las accesiones tomadas en las poblaciones muestreadas y fueron identificadas con número de individuo para mantener el registro en la población.

Análisis molecular

Extracción de ADN y procesamiento

La extracción de ADN se realizó con el protocolo estándar (Doyle & Doyle, 1987; Cullings, 1992) modificado según la calidad de las muestras y calidad de ADN obtenido en

extracciones previas observando sus concentraciones. En algunos casos se utilizaron hojas frescas o protocolos modificados sustituyendo la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) por una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico [1:1(24:1)]. La concentración del ADN extraído fue verificado visualmente según la escala O'GeneRuler™ (1 kb *DNA Ladder*, BioGen) directamente sobre la imagen del gel de electroforesis o mediante el uso del espectrofotómetro NanoDrop™ 2000c (*Thermo Fisher Scientific Inc.*).

Tabla 1. Poblaciones muestreadas ordenadas por regiones (R) de análisis indicando ubicación y número de accesiones por población (n) de *Eugenia uniflora* en Uruguay.

R	Poblaciones			n	Coordenadas geográficas		
	Cód.	Localidad	Departamento		Latitud	Longitud	
1	AA	Arroyo Cuaró Grande	Artigas	30	30°25'14,8"S	57°11'16,0"W	
	3A	Las Tres A	Paysandú	30	31°34'09,0"S	57°58'25,9"W	
	LMP	Las Mellizas		30	31°49'45,5"S	58°04'33,5"W	
2	SPR	Sendero de Piria	Rivera	30	31°03'15,4"S	55°45'48,9"W	
	VL	Valle del Lunarejo		30	31°11'26,0"S	55°54'02,9"W	
	CBV	Cerro Buena Vista		30	31°20'37,3"S	55°46'37,7"W	
	CUL	Cuchilla de Laureles	Tacuarembó	30	31°21'41,6"S	55°59'22,2"W	
	LCT	Establecimiento La Corona		19	31°38'22,3"S	55°41'57,6"W	
	GH	Gruta de los Helechos		30	31°38'11,6"S	56°02'07,8"W	
	LRT	Los Rodríguez, A° Tranqueras		30	31°44'38,7"S	56°12'56,8"W	
	VET	Valle Edén, A° Tambores		30	31°49'51,9"S	56°11'58,6"W	
	QCB	Paso Minuano, Río Yaguarón		Cerro Largo	30	32°04'23,6"S	53°48'00,5"W
	SDCL	San Diego, Río Yaguarón			17	31°58'00,1"S	53°54'52,8"W
CYCL	Cuchilla del Yaguarón	16	32°10'22,1"S		53°51'32,9"W		
3	CCL	Camino a Centurión	Tacuarembó	17	32°07'49,6"S	53°49'40,0"W	
	PAT	Paso Aguiar sobre Río Negro		29	32°17'08,6"S	54°49'59,6"W	
	PPCL	Paso Pereira	Cerro Largo	11	32°29'59,0"S	55°06'45,6"W	
	YSCL	A° Yerba Sola		3	32°38'27,0"S	54°22'04,9"W	
	RRCL	Rincón de Contreras		2	32°34'35,0"S	54°26'34,5"W	
	QCA	Quebrada de los Cuervos		Treinta y Tres	30	32°55'27,5"S	54°27'33,3"W
Total	20			474			

Amplificación de fragmentos cloroplásticos

Se utilizaron regiones no codificantes de ADN cloroplástico (cpDNA) con la metodología PCR-RFLP (*Polymerase Chain Reaction – Restriction Fragment Length Polymorphism*) mediante la amplificación de espaciadores intergénicos seleccionados. El análisis se llevó a cabo con un conjunto de doce pares de cebadores previamente descritos: *trnH-trnK* (HK; Demesure *et al.*, 1995); *trnH-psbA* (HA; Hamilton, 1999; Tate & Simpson, 2003); *trnQ-trnS* (QS; Grivet *et al.*, 2000); *trnC-trnD* (CD; Demesure *et al.*, 1995); *trnQ-psbI* (QI; Grivet *et al.*, 2000); *psbK-trnS* (KS; Grivet *et al.*, 2000); *trnC-ycF6r* (CY; Demesure *et al.*, 1995); *trnL(e)-*

trnF(f) (EF; Taberlet *et al.*, 1991); *psbJ-petA* (JA; Shaw *et al.*, 2007); *ndhF* (NF; Kim & Jansen, 1995); *matK* (1KIMf-3KIMr; Ki-Joong Kim, no publicado) . Los cuatro primeros se seleccionaron porque se había reportado variabilidad en la misma especie (Salgueiro *et al.* 2004); QI y KS constituyen subdivisiones del fragmento QS y se utilizaron para facilitar el análisis; el fragmento CY fue reportado como variable en *E. uniflora* por Turchetto *et al.* (2011); y los últimos fragmentos son ampliamente utilizados en estudios filogenéticos y filogeográficos con pares de cebadores universales.

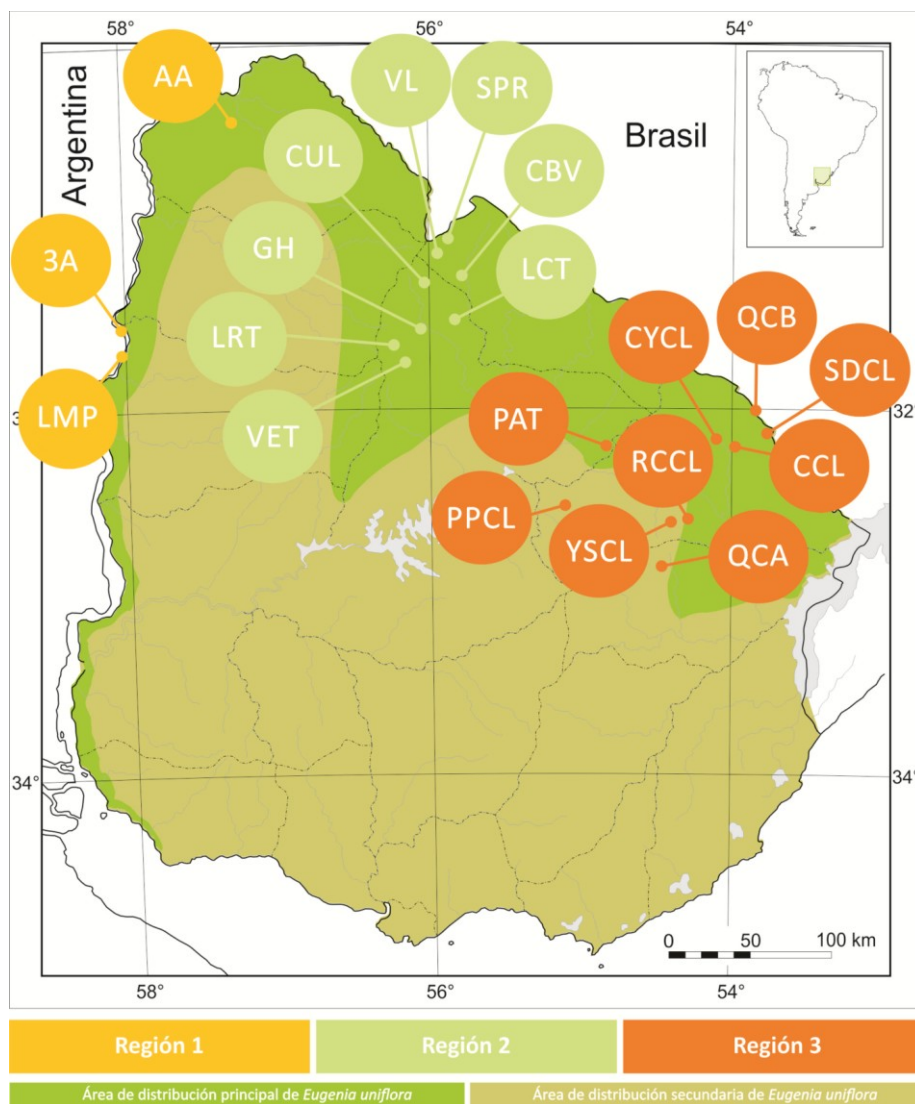


Figura 4. Mapa indicando poblaciones muestreadas de *Eugenia uniflora* según región [tomado y modificado de Grela (2004) y Haretche *et al.* (2012)] indicando rango de distribución de la especie en Uruguay [tomado y modificado de Brussa y Grela (2007)].

La amplificación de los fragmentos de cpDNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase chain Reaction* – PCR) se llevó a cabo en reacciones de 15 μ L, conteniendo cada una *ca.* 15 ng de ADN, 1,5 μ L de solución amortiguadora de Taq polimerasa 10 x, 0,9 μ L de MgCl₂ 25 mM, 0,6 μ L de 5 μ M de cada uno de los pares de cebadores, 0,6 μ L de cada uno de los dNTP a 0,25 μ M, 0,15 μ L de Taq DNA polimerasa, agregando además potenciadores de la reacción como BSA o DMSO 1x y de acuerdo con las condiciones indicadas en la literatura (Salgueiro *et al.*, 2004). Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador Thermo ® con condiciones de ciclado a diferentes temperaturas de *annealing* según el fragmento a amplificar (**Tabla 2**). Los fragmentos amplificados fueron separados en geles de agarosa al 1,5%, teñidos con Bromuro de Etidio y fotografiados con luz ultravioleta en un transiluminador Biotop™ modelo Trans Lum Dual y un sistema de imágenes utilizando una cámara fotográfica Canon Power Shot™ modelo A630.

Digestión de fragmentos con enzima de restricción

La digestión de los productos amplificados, según la técnica PCR-RFLP, se llevó a cabo de acuerdo a Speranza *et al.* (2007) y fueron digeridos mediante las enzimas endonucleasas de restricción *Hinf* I y *Taq* I. Los fragmentos digeridos fueron separados en geles de agarosa al 3%, teñidos con Bromuro de Etidio y fotografiados con luz ultravioleta mediante el mismo sistema descrito para la visualización de los fragmentos amplificados. Se identificaron los patrones de restricción asociados a diferentes haplotipos citoplasmáticos mediante la manipulación de las imágenes utilizando el programa Corel PhotoShop ®.

Se seleccionó la enzima de restricción *Taq* I para su utilización en todos los casos ya que los patrones encontrados en pruebas de ensayo permitían una mejor visualización de los fragmentos digeridos y mostraban ser de igual patrón que *Hinf* I.

Secuenciación de fragmentos variables

Se secuenciaron los haplotipos contrastantes de cada fragmento amplificado (*forward* y *reverse*) y se determinó la presencia/ausencia de sitios de restricción analizables con el programa Sequencher © 5.4.1 (*Gene Codes Corporation*, Ann Arbor, MI - USA <http://www.genecodes.com>) y BioEdit © 7.2.5 Sequence Aligment Editor (Tom Hall, 1997-2013).

Los fragmentos *trnL(e)-trnF(f)* secuenciados fueron detectados como microsatélites cloroplásticos (cpSSR) para la especie y posteriormente se amplificaron y enviaron a analizar al *Institut Pasteur* - Montevideo. Los resultados fueron analizados con el programa Peak Scanner 1.0 © (*Applied Biosystems*, 2006).

Análisis de datos

Para el análisis de la variabilidad intraespecífica se utilizaron los patrones de PCR-RFLP y se generaron matrices de presencia/ausencia de sitios de restricción. Las matrices fueron analizadas mediante el procedimiento AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) y se calcularon los índices de la estructuración poblacional como Phi (estimador análogo de F_{ST} de Wright para datos calculados mediante el procedimiento de AMOVA para herencia uniparental-materna). Ambos análisis fueron implementados por el programa GenAlEx © (Peakall & Smouse, 2012) y permitieron detectar la distribución de la variabilidad genética entre y dentro poblaciones y áreas de refugio propuestas (regiones). Se realizó un análisis de aislamiento por distancia mediante el Test de Mantel implementado por el mismo programa, utilizando las distancias geográficas y las distancias genéticas medidas a través del cálculo de distancias pareadas del estimador Φ_{PT} (análogo de F_{ST}).

Se construyeron redes de haplotipos mediante el programa Network 4.6.1.1© (<http://www.fluxus-engineering.com>) para describir los patrones de relacionamiento entre haplotipos, los que fueron contrastados con su distribución geográfica. Para relacionar la variabilidad entre haplotipos con su distribución entre y dentro de poblaciones, se representaron las poblaciones por medio de un Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) implementado en GenAlEx ©.

Se realizó la secuenciación directa de las combinaciones haplotípicas detectadas por PCR-RFLP. Basados en este análisis se identificó el microsatélite cloroplástico en el fragmento *trnL(e)-trnF(f)*. El análisis de los datos se implementó de acuerdo con los procedimientos habituales descritos por Vaio *et al.* (2005).

Resultados

Variabilidad genética poblacional de fragmentos cloroplásticos

Se probaron once pares de cebadores universales previamente descritos, cinco indicados como polimórficos para poblaciones naturales de Brasil (Salgueiro *et al.*, 2004), los pares CD y CY indicados como polimórficos (Salgueiro *et al.*, 2004; Turchetto-Zolet *et al.*, 2011), fueron monomórficos para haplotipos PCR-RFLP en las poblaciones uruguayas (**Tabla 2**). En secuencias para CY se detectó mutación única en el individuo LMP17 – Citosina (C) por Timina (T) en la posición 128.486 del genoma plastidial para la especie (accesión en GenBank - KR867678.1).

Tabla 2. Descripción de los fragmentos amplificados y polimorfismos de los once pares de cebadores del análisis PCR-RFLP para *Eugenia uniflora* en poblaciones naturales de Uruguay. pb=pares de bases; Ta=temperatura de *annealing*; P=polimórfico; M=monomórfico.

<i>Primer 1 f</i>	Secuencia (5'-3')	<i>Primer 2 r</i>	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)	Ta (°C)	Polimorfismo <i>Taq I</i>
<i>trnH</i>	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT C	<i>psbA</i>	GTT ATG CAT GAA CGT AAT GCT C	600	48	P
<i>trnH</i>	CGC GCA TGG TGG ATT CAC AAT C	<i>trnK</i>	CCG ACT AGT TCC GGG TTC GA	1830	54	P
<i>trnQ</i>	GGG ACG GAA GGA TTC GAA CC	<i>trnS</i>	AGA GTT TGA GAG TAA GCA T	1300	54	P
<i>trnQ</i>	GGG ACG GAA GGA TTC GAA CC	<i>psbI</i>	AGA GTT TGA GAG TAA GCA T	1000	52	P
<i>psbK</i>	TTA GCC TTT GTT TGG CAA G	<i>trnS</i>	GGG AGA GAT GGC TGA GTG GAC	750	52	P
<i>trnL</i>	GGT TCA AGT CCC TCT ATC CC	<i>trnF</i>	ATT TGA ACT GGT GAC ACG AG	300	52	P
<i>trnC</i>	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC	<i>trnD</i>	GGG ATT GTA GTT CAA TTG GT	3200	54	M
<i>trnC</i>	CCA GTT CAA ATC TGG GTG TC	<i>ycF6</i>	ATG GAT ATA GTA AGT CTY GCT TGG GC	950	50	M
<i>psbJ</i>	ATA GGT ACT GTA RCY GGT ATT	<i>petA</i>	AAC ART TYG ARA AGG TTC AAT T	1080	50	M
<i>matK</i> f	ACC CAG TCC ATC TGG AAA TCT TGG TTC	<i>matK</i> r	CGT ACA GTA CTT TTG TGT TTA CGA G	900	50	M
<i>ndhF</i> f	GGA TTA ACY GCA TTT TAT ATG TTT CG	<i>ndhFr</i>	CCC CCT AYA TAT TTG ATA CCT TCT CC	850	50	M




















Haplotipos encontrados

El análisis combinado de las variantes de los fragmentos encontrados mediante la técnica PCR-RFLP permitió encontrar 18 haplotipos cloroplásticos (**Tabla 3**).

Partición de la variabilidad intra e interpoblacional

La partición de la varianza molecular dentro de las poblaciones es mayor que entre poblaciones y en el análisis molecular de la varianza incluyendo como fuente de variación las regiones presupuestas para cada población, el mayor valor de la partición de la varianza aún corresponde a la variación dentro de poblaciones, aunque disminuye un 4% explicada por la partición de la restante variación debida a la variación entre poblaciones seguida de la variación entre regiones (**Fig. 5**).

Tabla 3. Haplotipos cloroplásticos obtenidos para los espaciadores intergénicos analizados mediante PCR-RFLP (*trnH-psbA*, *trnQ-psbI*, *psbK-trnS*; endonucleasa *Taq I*) y microsatélite cpDNA (*trnL-trnF*⁺) de *Eugenia uniflora* en poblaciones naturales de Uruguay. El código de color es el utilizado para cada haplotipo en todas las representaciones gráficas.

	<i>trnH-psbA</i>	<i>trnQ-psbI</i>	<i>psbK-trnS</i>	<i>trnL-trnF</i> ⁺	Haplotipos	Código	
Tamaño de los fragmentos (pb)	160	430	380	274	AAAD		
				275	AAAE		
				274	ABBD		
		170	440	388	275	ABBE	
					276	ABBF	
					417	ABCA	
	180		430	380	270	BBBA	
					273	BBBC	
					275	BBBE	
		180	430	380	277	BBBG	
					270	BBCA	
					273	BAAC	
	180		430	380	274	BAAD	
					275	BAAE	
					270	CAAA	
	180	430	380	272	CAAB		
				273	CAAC		
				274	CADD		
Total	3	2	4	7	18		

⁺Amplificación del fragmento e-f; *trnL*(UAA)^{3'}-*trnF*(GAA) con poli-T.

Estimaciones de índices F (Φ) y número de migrantes (Nm)

El análisis de la matriz de datos de presencia/ausencia de sitios de restricción permitió realizar una comparación de estimadores de la varianza y migrantes para el análisis entre poblaciones y de poblaciones en regiones (**Tabla 4**). El Φ_{PT} es un estimador de los coeficientes de Fijación de Wright y representa el grado de diferenciación genética que existe entre poblaciones y sus diferentes índices pueden ser utilizados para determinar el grado de estructuración entre las poblaciones analizadas. El índice Φ_{PT} indica la proporción de la variabilidad genética entre poblaciones con respecto a la variabilidad total estimada directamente. El mayor valor de Φ_{PT} se observa en el análisis donde se incluyen las regiones (PER), aunque en el análisis sin considerar las regiones (PSR) el valor es similar. Los valores de Φ_{PT} (PER=0,455; PSR=0,421) son considerados valores medios a altos.

El número de migrantes efectivos (Nm) para las poblaciones analizadas tanto en PER como en PSR (calculado en GenAlEx ®), son considerados valores altos aunque se encuentran dentro de los valores esperados para especies arbóreas (< 1) (Wright, 1969).

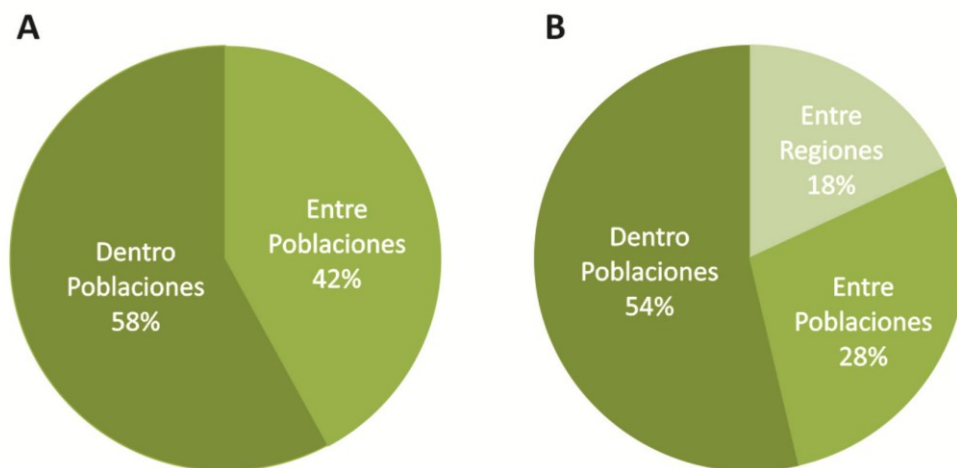


Figura 5. Partición de la varianza molecular de herencia materna mediante AMOVA en poblaciones naturales de *Eugenia uniflora* en Uruguay. A) Análisis dentro y entre poblaciones sin regionalizar. B) Análisis dentro y entre poblaciones y entre regiones, considerando las tres regiones presupuestas para el rango de distribución de la especie en Uruguay.

Tabla 4. Comparación de estimadores de $F(\Phi_{RT}, \Phi_{PR}, \Phi_{PT},$ según corresponda) y número de migrantes efectivos (Nm) de poblaciones naturales de *Eugenia uniflora* para análisis entre poblaciones sin regiones (PSR) y entre poblaciones en regiones (PER). Ne =tamaño poblacional efectivo; m =tasa de migración.

Fuente de variación	PER			PSR		
	Phi	p	Nm (haploide)	Phi	p	Nm (haploide)
Regiones/Total (Φ_{RT})	0,179	0,001		---	---	
Poblaciones/Regiones (Φ_{PR})	0,336	0,001		---	---	
[(Regiones)+Poblaciones]/Total (Φ_{PT})	0,455	0,001		0,421	0,001	
Migrantes efectivos ($Ne*m$)			0,600			0,688

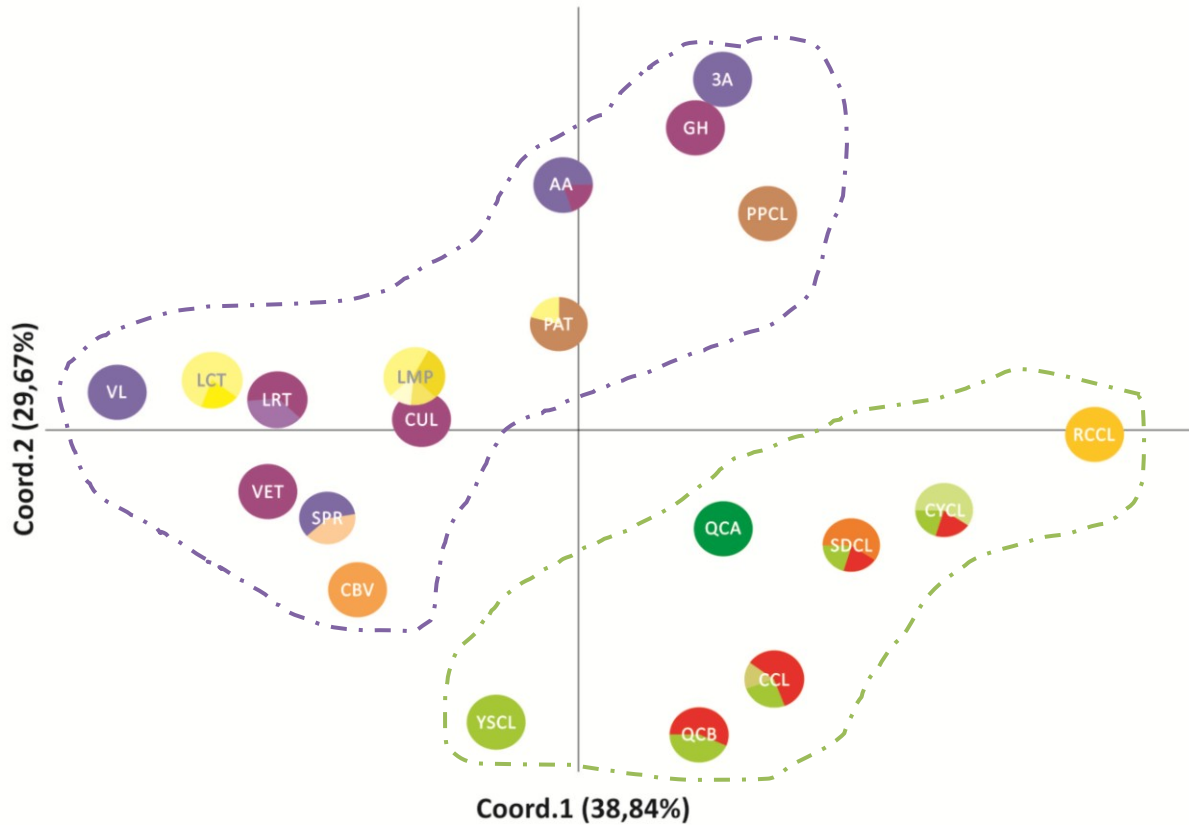
Análisis de coordenadas principales (PCoA)

En el Análisis de Coordenadas Principales (PCoA) los ejes 1-3 acumulan el 79,04%, siendo mejor explicadas por las coordenadas 1 y 2 las cuales acumulan el 68,59% (**Fig. 6**) y explican la distribución de los valores de Φ_{PT} de cada población, donde se pueden observar claramente dos grupos asociados a las regiones previamente delimitadas. Las poblaciones sobre las Sierras del Este sobre la cuenca Este se separan del resto de las poblaciones (Región 3 – indicado como Grupo verde --- - --- -), mientras que las poblaciones del Centro-Norte se pueden observar un grupo bastante definido de las poblaciones del borde de la Cuchilla de Haedo y del centro-Oeste (Regiones 1 y 2 – indicado como Grupo violeta --- - --- -).

Red haplotípica

La red de haplotipos obtenida implementado por el programa Network 4.6.1.1© (<http://www.fluxus-engineering.com>) utilizando el algoritmo *median-joining* (Kim & Jansen, 1995) con la opción de postproceso MP (Polzin & Daneshmand, 2003) muestra cuatro vectores medios (mv) como nodos de conexión con las variantes haplotípicas detectadas mediante los fragmentos y en las poblaciones analizadas en este estudio (**Fig. 7**). Los nodos mv indican la ausencia de un haplotipo intermedio que conecta las poblaciones actuales detectadas. El análisis detecta dos clados bien definidos, separados por el máximo número de cambios (cuatro), los cuales coinciden mayormente con los dos grupos identificados en el PCoA (**Fig. 6**), sólo los haplotipos BAAD y AAAE aparecen asociados a la región 3 en la red, a diferencia de su asociación a las regiones 1 y 2 observado en el PCoA. Los dos principales clados obtenidos pueden identificarse como aquellos correspondientes a los subgrupos de

variantes indicados con colores violetas y amarillos (en adelante clado Oeste) y a los subgrupos de variantes identificados con colores rojos y verdes (en adelante clado Este) (**Fig.**



7).

Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCoA) de Φ_{PT} con los haplotipos detectados en las 20 poblaciones de *Eugenia uniflora* muestreadas para Uruguay. Las poblaciones se indican con el código de letras y las particiones dentro de cada circunferencia corresponden a las proporciones de cada haplotipo encontrado en la población. Grupo verde - - - - asociado a Región 3; Grupo violeta - - - - asociado a Regiones 1 y 2.

Oeste, aunque no aparecieron compartidos entre poblaciones, mientras que las poblaciones de la región 3 comparten haplotipos del clado Este. Para este último clado, el subclado verde sólo se detectó en la población QCA (Treinta y Tres).

El clado Oeste está conformado principalmente por las poblaciones de las regiones 1 y 2 de las variantes violetas y las poblaciones encontradas en parches de vegetación aislados en los márgenes de distribución de la vegetación boscosa y de la distribución natural de la especie asociados a las variantes amarillas. El clado Este incluye los grupos de variantes rojas y verdes, principalmente distribuidos sobre la región 3 y algunas variantes encontradas en poblaciones ubicadas en la región 2 (SPR y CBV, ambas en Rivera).

El clado Oeste está compuesto por los haplotipos del grupo de variantes violetas y el grupo de variantes amarillas. El primer grupo aparece en las poblaciones de Tacuarembó, Rivera, Artigas y Paysandú. En Tacuarembó y Rivera, las poblaciones principalmente se encuentran en los bosques fluviales y de quebradas del este de la Cuchilla de Haedo y en el caso de Artigas y Paysandú son poblaciones en bosques fluviales afluentes del Río Uruguay, pero no forman parte del bosque de galería del Río Uruguay.

El grupo de haplotipos de variantes amarillas se encuentran relacionados a poblaciones dispersas en áreas alejadas geográficamente entre sí y con otras de las poblaciones de las principales áreas boscosas. La población LMP (Paysandú) pertenece a un bosque fluvial de galería del Río Uruguay y está compuesta por cinco haplotipos diferentes, todos correspondientes a este grupo particular, apareciendo como una población muy cercana a CUL (del grupo violeta, el otro grupo del clado Oeste) en el PCoA (**Fig. 6**). La población LCT (Tacuarembó) se encuentra en un pequeño bosque de escarpa, a pesar de estar geográficamente muy cercana a las poblaciones del grupo azul, sólo se detectaron haplotipos del grupo amarillo. Las poblaciones PAT (Tacuarembó) y PPCL (Cerro Largo) aparecen hacia la cabecera de la cuenca del Río Negro, PAT en un bosque fluvial y PPCL en un bosque pantanoso ambos en parches de bosque en la cuenca alta del Río Negro en Uruguay, pero no asociados a sus márgenes, por lo que en principio fueron tratados como parte de la región 3.

Las variantes de este clado detectadas en la población CBV en un bosque de escarpa de Rivera corresponden al subgrupo rojo y en la población SPR en un bosque de quebrada en Rivera, se detectaron individuos correspondientes también a otra variante roja y otros individuos de variantes violetas (compartida con variantes típicas de la mayoría de las poblaciones de la región 1 y 2).

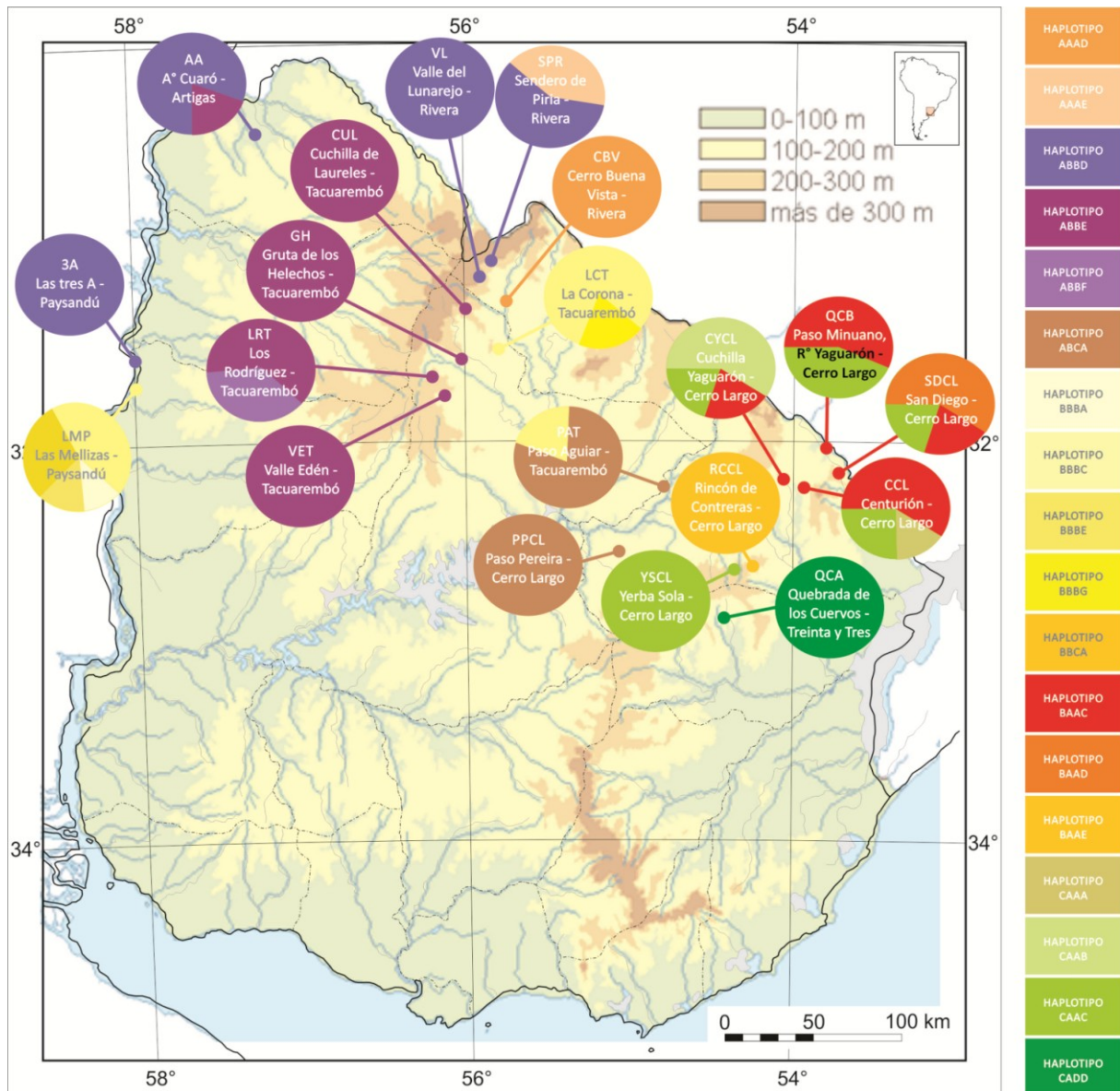


Figura 8. Mapa de poblaciones y haplotipos detectados de *Eugenia uniflora* en Uruguay. El código de colores correspondiente a cada haplotipo se observa a la derecha del mapa. Las particiones en las circunferencias indican la proporción de esa variante en la población. Mapa modificado con topografía.

Relación entre distancia geográfica y distancia genética

Se encontró una correlación baja ($R^2=0,0317$; $P=0,03$) entre las distancias geográficas y genéticas entre las poblaciones cuando se analizan en forma conjunta. Sin embargo, las distancias genéticas entre poblaciones de una misma región tienden a ser menores que cuando se comparan poblaciones de regiones diferentes separadas por distancias geográficas similares (Fig. 9), por lo que, consideradas independientemente, las nubes de puntos resultantes de la comparación entre poblaciones de una misma región o solamente poblaciones de regiones diferentes, no muestran asociación entre la distancia geográfica y genética.

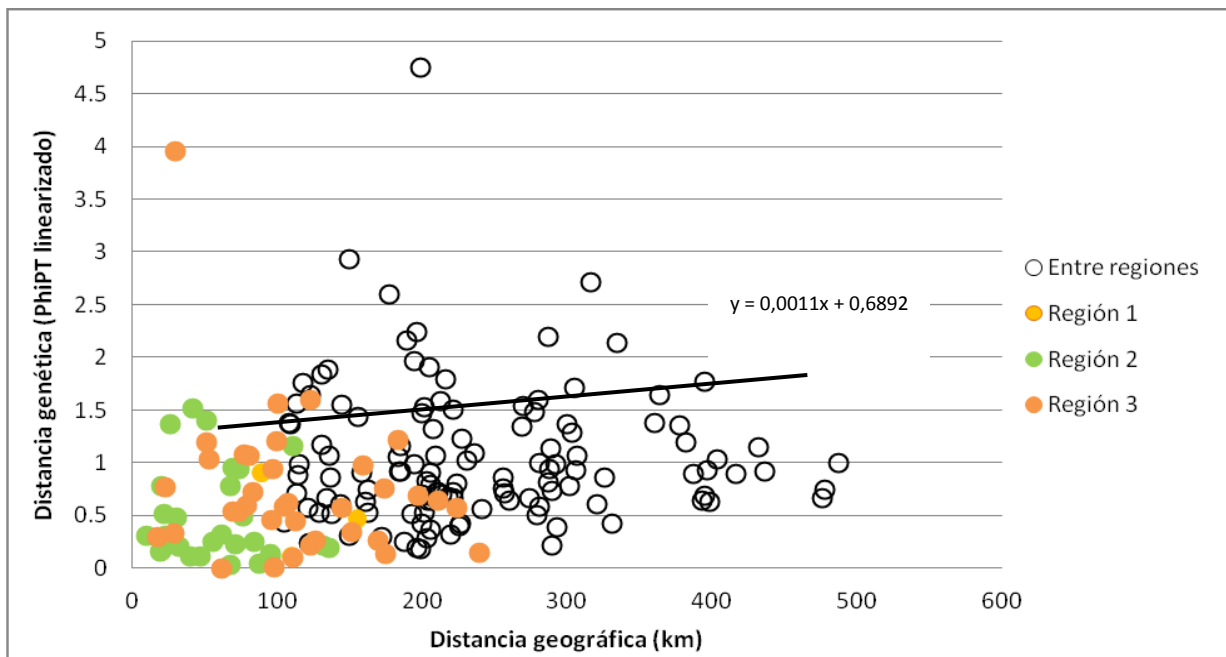


Figura 9. Relación entre distancia geográfica (km) y distancias pareadas de Φ_{PTP} linearizado entre poblaciones de *Eugenia uniflora* en Uruguay. Se indican los puntos correspondientes a comparaciones entre y dentro de regiones.

Discusión

Alta variabilidad intraespecífica

La metodología utilizada para detectar la variabilidad genética de las poblaciones de la especie pudo detectar una alta variabilidad dentro y entre poblaciones en su rango de distribución natural en Uruguay. Análisis similares para poblaciones de *Eugenia uniflora* para Brasil proponían la existencia de alta variabilidad intraespecífica para la especie en análisis de poblaciones aisladas y bajo presión por pérdida de hábitat (Margis *et al.*, 2002; Salgueiro *et al.*, 2004). Para cinco poblaciones del rango de distribución de la especie en el Bosque Atlántico de Brasil detectaron nueve haplotipos PCR-RFLP para una muestra total de 71 individuos, encontrando un aumento en el número de variantes haplotípicas en las poblaciones del Sur (cuatro haplotipos; cuatro fragmentos digeridos con dos endonucleasas *Taq* I y *Hinf* I)(Salgueiro *et al.*, 2004).

Debido a que el tamaño poblacional y el aislamiento espacial son considerados modeladores de la variación genética de las poblaciones, en general se considera que el tamaño poblacional efectivo (N_e) y la tasa de flujo génico (o migración) deberían ser mayores en las áreas centrales de distribución y menores en las áreas marginales, por lo que las poblaciones marginales deberían presentar menor diversidad genética y mayor diferenciación entre poblaciones que las poblaciones centrales (Eckert *et al.*, 2008). A pesar de que las poblaciones marginales de los rangos de distribución natural de las especies tendrían menor diversidad que las que se podrían encontrar en el área central de distribución, estas poblaciones periféricas tenderían a ser genéticamente diferentes debido a la selección natural divergente que ocurre por el aislamiento y el efecto fundador y la deriva génica (Lesica & Allendorf, 1995). En este estudio, con una metodología similar a la utilizada por Salgueiro *et al.*, 2004) se distinguieron 18 haplotipos cloroplásticos. Este nivel de variabilidad en un área geográfica reducida sugiere que los procesos que han operado sobre estas poblaciones a lo largo del tiempo han sido complejos, siendo necesario trabajar con enfoques que permitan calcular el momento de aparición de las variantes y sus relaciones, que permitan asociarlas a eventos específicos derivados de las oscilaciones climáticas en el pasado.

Variabilidad intrapoblacional

AMOVA y Phi: Variabilidad entre regiones y poblaciones y dentro poblaciones

El AMOVA detectó un alto porcentaje de la variabilidad explicada por los individuos dentro de las poblaciones, tanto en el análisis sin considerar o considerando las regiones (**Fig. 5**; 58% y 54%, respectivamente). Los estadísticos F estimados mediante Phi (**Tabla 4**), también evidenciaron altos valores de la variabilidad explicada por los individuos dentro de las poblaciones (Φ_{PT}), considerando o no las regiones ($PER=0,455$ y $PSR=0,421$).

A pesar de que existe una alta variabilidad genética dentro de las poblaciones, también se detectan valores de Phi que indican que las poblaciones están estructuradas, donde un 18% de la variabilidad es explicada por las regiones en el análisis PER (**Fig. 5**), obteniendo valores de Φ_{PR} de 0,336 lo que indicaría que la estructuración no estaría asociada a la distancia geográfica, sino estaría principalmente explicada por la subdivisión de la distribución de la especie en regiones (**Tabla 4, Fig. 9**).

Los valores de Nm obtenidos en el análisis con regiones y sin regiones (**Tabla 4**), generaron valores menores a 1 en ambos casos ($PER=0,600$; $PSR=0,688$), por lo que estos valores también sugieren que el flujo de semillas entre éstas, si bien está presente, es limitado a nivel global en el área analizada. Sin embargo, la misma estimación realizada considerando sólo las poblaciones pertenecientes a cada región, arrojó valores de Nm de 0,986, 1,105 y 0,888 para las regiones 1, 2 y 3 respectivamente (datos no mostrados). Estos resultados, apoyan la interpretación de que el flujo de semillas dentro de cada región es moderadamente alto, pero el intercambio de semillas entre regiones es muy bajo.

Se desconoce el nivel de asimetría entre la dispersión de las semillas y polen en *E. uniflora* y por lo tanto no pueden generalizarse los patrones detectados con marcadores citoplasmáticos al flujo génico mediado por el polen. En un estudio llevado a cabo en Brasil las poblaciones de *E. uniflora* mostraron una fuerte estructuración de las poblaciones, con altos valores de estimadores de la estructuración poblacional pero manteniendo un alto nivel de variación intrapoblacional (Salgueiro *et al.*, 2004). Es posible que las barreras al flujo génico en el caso de *E. uniflora* en las regiones estudiadas sean suficientemente fuertes como para reflejar un

patrón similar en la variabilidad del ADN nuclear como en el caso de *Petunia axillaris* en las mismas áreas (Turchetto *et al.*, 2014).

Distribución de haplotipos entre poblaciones

Las regiones predelimitadas en este trabajo están basadas en Grela (2004) y Haretche *et al.* (2012). Si bien se observa diversidad entre las poblaciones de una misma región, éstas solo comparten haplotipos que se encuentra en un mismo clado (**Fig. 7**); sólo la población SPR comparte haplotipos de dos regiones diferentes, aunque todas las demás poblaciones no comparten haplotipos con otras poblaciones a pesar de estar en la misma región, lo que podría estar relacionado a la diversidad genética de las poblaciones del resto del rango de distribución al otro lado de la frontera con Brasil. Las poblaciones muestreadas en las regiones propuestas como áreas de alta riqueza específica y dendroflorística fueron analizadas tomando en cuenta las regiones o excluyéndolas, para poder observar cuánta variabilidad podría ser debida a la diferenciación entre las regiones. En el AMOVA cuando se realizó el análisis incluyendo las regiones, el 18% de la variabilidad genética de *E. uniflora* fue debida a las regiones donde se encontraban las poblaciones (**Fig. 5**) y las variantes detectadas como haplotipos diferentes se encontraban relacionadas según la red haplotípica (**Fig. 7**). El PCoA indica dos grupos separados bien delimitados coincidentes con los dos grupos con más pasos de diferenciación obtenidos en la red haplotípica, las poblaciones del clado Oeste asociada a las regiones 1, 2 y las poblaciones marginales, y las del clado Este asociado a la región 3 (**Fig. 6**). De este modo, a pesar de la variabilidad intrapoblacional, se mantiene la diferenciación entre regiones ya que los haplotipos presentes en las poblaciones variables se encuentran relacionados.

Estructuración de la variabilidad poblacional y propuesta de áreas de vegetación relictual

Estructuración de las poblaciones

El test de Mantel muestra una correlación entre distancias genéticas y geográficas baja, por lo que, la diferenciación genética de las poblaciones no se debería exclusivamente a que estén más o menos distanciadas, sino que se encuentran estructuradas congruentemente con su pertenencia a las regiones donde se encuentran. Las poblaciones que presentan haplotipos del

clado Oeste, ubicadas en bosques fluviales y quebradas de la Cuchilla de Haedo, parecen estar relacionadas a través de los afluentes al Río Uruguay. Los haplotipos del clado Este se encuentran en los bosques fluviales y de quebradas hacia el Este de la Cuchilla Grande en los departamentos de Treinta y Tres y Cerro Largo, lo que es congruente con la presencia de corredores apropiados para la dispersión zoocórica y la escasez de corredores boscosos que conecten éstas poblaciones con las más cercanas en las regiones fluviales de la cuenca hacia el Oeste de la Cuchilla Grande (Grela, 2004).

Las poblaciones de CBV (Rivera) y SPR (Rivera) tienen la particularidad de encontrarse geográficamente ubicadas en la región 2, aunque en sus poblaciones fueron detectados haplotipos relacionados al clado Este y no al clado Oeste como las demás poblaciones cercanas. Estas poblaciones podrían estar relacionadas a las de la región 3 debido a que podría existir, o haber existido, un corredor boscoso que conectara estas poblaciones a través de la vegetación más al norte en el Sur de Rio Grande do Sul en Brasil.

Las poblaciones relevadas en áreas distantes a las áreas boscosas principales, como un parche de bosque ribereño en Paysandú (LMP), un bosque de escarpa en Tacuarembó (LCT), un bosque ribereño en el inicio del Río Negro en Tacuarembó (PAT) y un bosque pantanoso en Cerro Largo (PPCL), todas pertenecen a las variantes amarillas de uno de los clados principales (clado Oeste) y comparten los haplotipos entre las poblaciones. Debido a que todas representan parches de vegetación aislados de las áreas principales de vegetación boscosa, estas variantes carecerían de corredores boscosos que les permitieran dispersarse en largas distancias y por lo tanto la migración de individuos con potencial para instalarse podría verse disminuida.

Correspondencia entre los patrones de variabilidad en *Eugenia uniflora* y otros modelos

Las áreas de alta riqueza específica identificadas en Uruguay coinciden con las áreas geográficas de estructuración de la variabilidad genética en poblaciones naturales de *E. uniflora* en el país. El clado de la región Oeste está compuesto por dos subgrupos bien diferenciados, el grupo violeta asociado a las poblaciones del rango principal de distribución de la especie y del tipo de vegetación boscosa que habita principalmente en el norte de la Flora Occidental y el Núcleo Secundario Norte de la Flora Oriental, mientras que el grupo amarillo se encuentra asociado a poblaciones aisladas del área principal de vegetación

boscosa en parches rodeados de vegetación principalmente de pastizales. El clado Este está compuesto por dos grupos principales, uno de las variantes rojas y verdes, y el grupo verde oscuro, ambos grupos asociados al área principal de distribución de la vegetación boscosa del Núcleo Secundario Sur de la Flora Oriental. Otras especies con rangos solapados de distribución geográfica natural y diferentes sistemas reproductivos y de dispersión (endozoocórica, anemocórica, barocórica) han sido analizados y los patrones con que la variabilidad genética en esas poblaciones naturales aparecen presentan una diferenciación similar al encontrado en este trabajo, aunque los patrones espaciales no son totalmente coincidentes (Vaio *com pers.*; Speranza *et al.*, 2007; Casalas *et al.* 2014; Turchetto *et al.*, 2014).

Debido a que las zonas donde ocurren las áreas de alta riqueza específica están asociadas frecuentemente a refugios climáticos, este patrón sugiere la presencia de barreras geográficas (climáticas) ocasionadas probablemente debidas a los períodos secos y fríos durante las oscilaciones climáticas, las que podrían haber generado sucesivas expansiones y retracciones de la vegetación durante el Pleistoceno en los períodos del Cuaternario (Ab'Sáber, 1977; Posadas & Ortiz-Jaureguizar, 2011).

Sin embargo, la distribución de los haplotipos observada en *E. uniflora* en que una gran variabilidad fue detectada dentro de la región 3 y mientras que las regiones 1 y 2 comparten haplotipos más relacionados, parece ser diferente a la distribución encontrada para otras especies en el Uruguay. En *Turnera sidoides* (Speranza *et al.*, 2007) y *Petunia axillaris* (Turchetto *et al.*, 2014) detectaron que la distribución de los haplotipos estaba claramente estructurada y que geográficamente se podía visualizar en las variantes a un lado y otro de la Cuchilla de Haedo (tomada aquí como el área de la región 2, coincidente con el Núcleo Secundario Norte de la dendroflora Oriental). Esta diferencia podría ser debido a que las dos especies antes mencionadas tienen dispersión barócora o anemócora, ya que producen frutos secos dehiscentes tipo cápsulas y sus semillas son pequeñas y delgadas, por lo que el radio de dispersión de cada individuo es muy bajo. En *E. uniflora* la dispersión de la semilla es típicamente zoócora y se ha indicado que son dispersados por aves frugívoras generalistas y mamíferos pequeños (Lughadha & Proença, 1996; da Silva & Pinheiro, 2009), por lo que la dispersión de las semillas (detectada mediante las variantes haplotípicas del cloroplasto)

parecería seguir las conexiones de las áreas boscosas asociadas a las redes hídricas, ambientes típicos de alimentación y refugios de las aves.

Biogeografía desde la visión filogeográfica

Típicamente la delimitación de las regiones biogeográficas que han incluido a Uruguay en el análisis, se han realizado basadas en los patrones con que un grupo específico de especies se distribuyen en el espacio. Para realizar estos análisis, básicamente se utilizan datos florísticos y fisionómicos de la vegetación (Cabrera & Willink, 1980) y muchas veces incluyendo algunas características de la geomorfología (Chebataroff, 1942). Más adelante estos análisis han incorporado la metodología el análisis de parsimonia (Grela, 2004). Estos enfoques tienen la particularidad de incluir como elemento biótico principal a las especies, por lo que la riqueza específica y los endemismos que aparecen en las áreas de estudio, son las bases que permiten delimitarlas físicamente (Cox & Moore, 2010). La redefinición de las regiones biogeográficas para Uruguay basadas en los patrones dendroflorísticos permitió identificar regiones asociadas a núcleos de alta riqueza específica, principalmente detectando clados asociados a las influencias de las especies típicas de las provincias biogeográficas con componentes arbóreos, delimitando dos regiones principales con núcleos de alta diversidad específica (Grela, 2004; Haretche *et al.*, 2012). Desde el punto de vista biogeográfico, esas regiones están formadas por un conjunto de especies compartidas, formando áreas muy semejantes florísticamente. Las áreas asociadas a la presencia de la provincia biogeográfica Paranaense, desde el punto de vista filogeográfico, parecerían ser muy diferentes ya que los patrones con que se distribuye la variabilidad genética de *E. uniflora* se encuentra estructurada en regiones, lo que evidenciaría áreas con diferentes historias demográficas, concordando con los resultados de otros trabajos en especies no emparentadas en la región de Uruguay y áreas circundantes (Speranza *et al.*, 2007; Turchetto *et al.*, 2014). La vegetación como la observamos hoy en día sería similar a la del inicio de la Holoceno (12.000 años atrás), por lo que la existencia de estos patrones de estructuración podrían asociarse a que las contracciones de la vegetación durante las oscilaciones pleistocénicas modificaron la vegetación en espacio y tiempo repetidamente, permitiendo la instalación de refugios de vegetación durante las fases de contracción y la expansión de la vegetación en los períodos interglaciales de forma diferencial, como se ha sugerido para el Bosque Atlántico (Ledru *et al.*, 2009) donde *E. uniflora* también es un componente típico. Esta estructuración permite

complementar la interpretación de los patrones biogeográficos clásicos y reforzar la hipótesis de la presencia de refugios climáticos asociados a las oscilaciones de cambios climáticos durante el Pleistoceno en Uruguay.

Conclusiones

La metodología utilizada permitió detectar que la variabilidad genética de las poblaciones naturales de *Eugenia uniflora* en Uruguay se encuentran estructuradas, principalmente en dos clados definidos, los que se encuentran relacionados a las regiones asociadas a las áreas de alta riqueza específica, consideradas refugios de vegetación relictual. La estructuración de la variabilidad de las poblaciones indicaría la existencia de barreras geográficas antiguas, debidas al aislamiento de las poblaciones en microrefugios, que hoy en día no existen, pero aún pueden detectarse como modeladoras de la distribución espacial de la diversidad génica de las poblaciones. Serían necesario estudios sobre el flujo génico por polen a través de la detección de los patrones de variabilidad de marcadores moleculares nucleares que permitan evidenciar la influencia de los mecanismos de deriva génica y adaptación local, ya que en este trabajo sólo se analizaron los patrones de dispersión de la herencia materna. A pesar de que la dispersión de las semillas tiene como vector principal a las aves y las distancias geográficas son cortas, las poblaciones aún hoy en día se encuentran estructuradas. Las barreras geográficas actuales parecerían no ser un impedimento a la dispersión, por lo que se requerirían mayores evidencias sobre cuáles son los vectores específicos de dispersión de las semillas.

Bibliografía

- Ab'Sáber AN** (1977) Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na America do Sul por ocasião dos periodos glaciais quaternarios. *Paleoclimas* **3**: 1–19
- Ab'Sáber AN** (2002) Bases para o estudo dos ecossistemas da Amazônia brasileira. *Estud Avançados* **16**: 5–30
- Aguinagalde I, Hampe a, Mohanty a, Martin JP, Duminil J, Petit RJ** (2005) Effects of life history traits and species distribution on genetic structure at maternally inherited markers in European trees and shrubs. *J Biogeogr* **32**: 329–339
- Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S** (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations. *Evol Appl* **1**: 95–111
- Allnutt TR, Newton A, Lara A, Premoli AC, Armesto JJ, Vergara R, Gardner M** (1999) Genetic variation in *Fitzroya cupressoides* (alerce), a threatened South American conifer. *Mol Ecol* **8**: 975–87
- Allnutt TR, Newton AC, Premoli AC, Lara A** (2003) Genetic variation in the threatened South American conifer *Pilgerodendron uviferum* (Cupressaceae), detected using RAPD markers. *Biol Conserv* **100**: 9–18
- Avise JC** (2000) *Phylogeography: The history and formation of species*. Harvard Univesuty Press, Cambridge & London
- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA, Saunders NC** (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annu Rev Ecol Syst* **18**: 489–522
- Baccino E** (2011) Estructura genética de cuatro poblaciones silvestres de *Acca sellowiana* (Berg) Burret situadas en el noreste de Uruguay. Facultad de Ciencias, Universidad de la República
- Backes P, Irgang B** (2002) *Árvores do Sul. Ecológico*. Instituto Souza Cruz

- Bezerra JEF, Silva Júnior JF, Lenderman IE** (2000) Pitanga (*Eugenia uniflora* L.). Série Frutas Nativ. 1, Funep Jaboticabal, Núcleo Estud. em Frutic. no Cerrado, <http://www.fruticultura.iciag.ufu.br/pitangueira.html>
- Birky CW, Maruyama T, Fuerst P** (1983) An approach to population and evolutionary genetic theory for genes in mitochondria and chloroplasts, and some results. *Genetics* **103**: 513–527
- Brussa CA, Grell IA** (2007) Flora Arbórea del Uruguay con énfasis en las especies de Rivera y Tacuarembó. Mosca. Mosca, Montevideo
- Cabrera AL, Willink W** (1980) Biogeografía de América Latina, 2nd ed. ografías Científicas de la Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos, Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington D.C.
- 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**: 563–573
- Chatrou LW, Couvreur TLP, Richardson JE** (2009) Spatio-temporal dynamism of hotspots enhances plant diversity. *J Biogeogr* **36**: 1628–1629
- Chebataroff J** (1942) La vegetación del Uruguay y sus relaciones fitogeográficas con el resto de América del Sur. *Rev del Inst Panam Geogr e Hist* 49–90
- Collevatti RG, Terribile LC, de Oliveira G, Lima-Ribeiro MS, Nabout JC, Rangel TF, Diniz-Filho JAF** (2013) Drawbacks to palaeodistribution modelling: The case of South American seasonally dry forests. *J Biogeogr* **40**: 345–358
- Contreras Medina R, Luna Vega I, Morrone JJ** (2001) Conceptos biogeográficos. *Elementos* **41**: 33–37
- Cox CB, Moore PD** (2010) *Biogeography: an Ecological and Evolutionary Approach*, 8th ed. John Wiley & Sons, New York, NY
- Crisci JE, Freire SE, Sancho G, Katinas L** (2001) Historical biogeography of the Asteraceae from Tandilia and Ventania mountain ranges (Buenos Aires, Argentina).

Caldasia **23**: 21–41

- Croizat L** (1958) Panbiogeography; or an introductory synthesis of zoogeography, phytogeography, and geology, with notes on evolution, systematics, ecology, anthropology, etc. by Author
- Cullings KW** (1992) Design and testing of a plant-specific PCR primer for ecological and evolutionary studies. *Mol Ecol* **1**: 233–240
- Damuth JE, Fairbridge RW** (1970) Equatorial atlantic deep-sea arkosic sands and ice-age aridity in tropical South America. *Geol Soc Am Bull* **81**: 189–206
- Diniz-Filho JAF, Soares TN, Lima JS, Dobrovolski R, Landeiro VL, de Campost Telles MP, Rangel TF, Bini LM** (2013) Mantel test in population genetics. *Genet Mol Biol* **36**: 475–485
- Dobrowski SZ** (2011) A climatic basis for microrefugia: The influence of terrain on climate. *Glob Chang Biol* **17**: 1022–1035
- Doyle JJ, Doyle JL** (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull* **19**: 15–87
- Duminil J, Fineschi S, Hampe A, Jordano P, Salvini D, Vendramin GG, Petit RJ** (2007) Can Population Genetic Structure Be Predicted from Life.History Traits? *Am Nat* **169**: 662–672
- Eckert CG, Samis KE, Loughheed SC** (2008) Genetic variation across species' geographical ranges: The central-marginal hypothesis and beyond. *Mol Ecol* **17**: 1170–1188
- Excoffier L, Smouse PE, Quattro JM** (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* **131**: 479–491
- Felton A, Fischer J, Lindenmayer DB, Montague-Drake R, Lowe AR, Saunders D, Felton AM, Steffen W, Munro NT, Youngentob K, et al** (2009) Climate change, conservation and management: an assessment of the peer-reviewed scientific journal

literature. *Biodivers Conserv* **18**: 2243–2253

Franzon RC (2008) Propagação vegetativa e modo de reprodução da pitangueira (*Eugenia uniflora* L.). Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas

Futuyma DJ (2003) Principales líneas de estudio en la biología evolutiva contemporánea. *Ciencias* **71**: 16–28

García G, Loureiro M, Berois N, Arezo MJ, Casanova G, Clivio G, Olivera A (2009) Pattern of differentiation in the annual killifish genus *Austrolebias* (Cyprinodontiformes: Rivulidae) from a biosphere reserve site in South America: A multidisciplinary approach. *Biol J Linn Soc* **98**: 620–635

Grela IA (2004) Geografía Florística de las especies arbóreas de Uruguay: Propuesta para la delimitación de Dendrofloras. Universidad de la República

Hampe A, Jump AS (2010) Climatic Relicts: Past, Present, Future. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **42**: 313–333

Hampe A, Petit RJ (2005) Conserving biodiversity under climate change: the rear edge matters. *Ecol Lett* **8**: 461–7

Haretche F, Mai P, Brazeiro A (2012) Woody flora of Uruguay: inventory and implication within the Pampean region. *Acta Bot Brasilica* **26**: 537–552

Hewitt GM (2004) The structure of biodiversity - insights from molecular phylogeography. *Front Zool* **1**: 4

Iriarte J (2006) Vegetation and climate change since 14,810 14C yr B.P. in southeastern Uruguay and implications for the rise of early Formative societies. *Quat Res* **65**: 20–32

Iriondo M (1998) Paleoclimas del hemisferio Sur. Primeros resultados (Conferencia para la IV Reunión de Cuaternario Ibérico). *Cuaternario y Geomorfol* **12**: 95–104

Iriondo M (1999) Climatic changes in the South American plains: Records of a continent-scale oscillation. *Quat Int* **57-58**: 93–112

- Jansson R, Dynesius M** (2002) The fate of clades in a world of recurrent climate change: Milankovitch Oscillations and Evolution. *Annu Rev Ecol Syst* **33**: 741–777
- Kim KJ, Jansen RK** (1995) *ndhF* sequence evolution and the major clades in the sunflower family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**: 10379–10383
- Kreft H, Jetz W** (2010) A framework for delineating biogeographical regions based on species distributions. *J Biogeogr* **37**: 2029–2053
- De La Sota ER** (1967) Composición, origen y vinculaciones de la flora pteridológica de las sierras de Buenos Aires (Argentina). *Boletín la Soc Argentina Botánica* **11**: 105–128
- Lavina EL, Fauth G** (2011) Evolução Geológica da América do Sul nos Últimos 250 Milhões de Anos. *In* CJB de Carvalho, EAB Almeida, eds, *Biogeogr. da América do Sul padrões e Process.* Roca, Sao Paulo, p 306
- Ledru M-P, Braga PI, Soubies F, Fournier M, Martin L, Suguio K, Turcq B** (1996) The last 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* **123**: 239–257
- Ledru MP, Mourguiart P, Riccomini C** (2009) Related changes in biodiversity, insolation and climate in the Atlantic rainforest since the last interglacial. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol* **271**: 140–152
- Lesica P, Allendorf FW** (1995) When Are peripheral valuable populations for conservation? *Conserv Biol* **9**: 753–760
- Loveless MD, Hamrick JL** (1984) Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annu Rev Ecol Syst* **15**: 65–95
- Lughadha EN, Proença C** (1996) A survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae). *Ann Missouri Bot Gard* **83**: 480–503
- Mäder G, Fregonezi JN, Lorenz-Lemke AP, Bonatto SL, Freitas LB** (2013) Geological and climatic changes in quaternary shaped the evolutionary history of *Calibrachoa heterophylla*, an endemic South-Atlantic species of petunia. *BMC Evol Biol* **13**: 178

- Mantel N** (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res* **27**: 209–220
- Marchelli P, Gallo L** (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech of South America as evidenced by chloroplast DNA markers. *Conserv Genet* **7**: 591–603
- Margis R, Felix D, Caldas JF, Salgueiro F, De Araujo DSD, Breyne P, Van Montagu M, De Oliveira D, Margis-Pinheiro M** (2002) Genetic differentiation among three neighboring Brazil-cherry (*Eugenia uniflora* L.) populations within the Brazilian Atlantic rain forest. *Biodivers Conserv* **11**: 149–163
- Mathiasen P, Premoli AC** (2010) Out in the cold: Genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Mol Ecol* **19**: 371–385
- Mayr E, O'Hara RJ** (1986) The biogeographic evidence supporting the pleistocene forest refuge hypothesis. *Evolution (N Y)* **40**: 55–67
- McLachlan JS, Clark JS, Manos PS** (2008) Molecular Indicators of Tree Migration Capacity under Rapid Climate Change. *Ecology* **86**: 2088–2098
- Morrone JJ** (1997) Biogeografía cladística: conceptos básicos. *Arbor* **158**: 373
- Morrone JJ** (2007) Hacia una biogeografía evolutiva. *Rev Chil Hist Nat* **80**: 509–520
- Morrone JJ** (2004) Panbiogeografía, componentes bióticos y zonas de transición. *Rev Bras Entomol* **48**: 149–162
- Pautasso M** (2009) Geographical genetics and the conservation of forest trees. *Perspect Plant Ecol Evol Syst* **11**: 157–189
- Peakall R, Smouse PE** (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. *Bioinformatics* **28**: 2537–2539
- Pennington RT, Prado DE, Pendry CA** (2000) Neotropical Seasonally Dry Forests and Quaternary Vegetation Changes. *J Biogeogr* **27**: 261–273

- Petit RJ, Hampe A** (2006) Some Evolutionary Consequences of Being a Tree. *Annu Rev Ecol Evol Syst* **37**: 187–214
- Petit RJ, Hampe A, Cheddadi R, Petit J** (2005) Climate Changes and Tree Phylogeography in the Mediterranean tree phylogeography in the Mediterranean. *Clim Mediterr phylogeography* **54**: 877–885
- Petit RJ, Kremer A, Wagner DB** (1993) Finite Island Model for Organelle and Nuclear Genes in Plants. *Heredity (Edinb)* **71**: 630–641
- Polzin T, Daneshmand SV** (2003) On Steiner trees and minimum spanning trees in hypergraphs. *Oper Res Lett* **31**: 12–20
- Posadas P, Ortiz-Jaureguizar E** (2011) Avaliação da Região Andina de América do Sul. *Biogeogr. da América do Sul padrões e Process.* Roca, Sao Paulo, p 306
- Prado DE** (2000) Seasonally dry forests of tropical South America: from forgotten ecosystems to a new phylogeographic unit. *Edinburgh J Bot* **57**: 437–461
- Prado DE, Gibbs PE** (1993) Patterns of Species Distributions in the Dry Seasonal Forests of South America. *Ann Missouri Bot Gard* **80**: 902–927
- Prance GT** (1996) Islands in Amazonia. *Philos Trans R Soc B Biol Sci* **351**: 823–833
- Prance GT** (1982) A Review of the Phylogeographic Evidences for Pleistocene Climate Changes in the Neotropics. *Ann Missouri Bot Gard* **69**: 594–624
- Premoli AC** (1998) The use of genetic markers to conserve endangered species and to design protected areas of more widespread species. *Proc. an Int. Work. Recent Adv. Biotechnol. Tree Conserv. Manag.* Santa Catarina, Brazil, Universidade Federal de Santa Catarina, pp 157–171
- Premoli AC, Kitzberger T, Veblen TT** (2000) Isozyme variation and recent biogeographical history of the long-lived conifer *Fitzroya cupressoides*. *J Biogeogr* **27**: 251–260
- Premoli AC, Souto CP, Allnutt TR, Newton AC** (2001) Effects of population disjunction on isozyme variation in the widespread *Pilgerodendron uviferum*. *Heredity (Edinb)* **87**:

- Premoli AC, Vergara A, Souto CP, Lara A, Newton A** (2003) Lowland Valleys Shelter the Ancient Conifer *Fitzroya cupressoides* in the Central Depression of Southern Chile. **33**: 623–631
- Ramos-Fregonezi AM, Fregonezi JN, Cybis GB, Fagundes NJ, Bonatto SL, Freitas LB** (2015) Were sea level changes during the Pleistocene in the South Atlantic Coastal Plain a driver of speciation in *Petunia* (Solanaceae)? *BMC Evol Biol* **15**: 1–11
- Rotman AD** (1995) Las especies argentinas del género *Eugenia* (Myrtaceae). *Boletín la Soc Argentina Botánica* **31**: 69–93
- Salgueiro F, Felix D, Caldas JF, Margis-Pinheiro M, Margis R** (2004) Even population differentiation for maternal and biparental gene markers in *Eugenia uniflora*, a widely distributed species from the Brazilian coastal Atlantic rain forest. *Divers Distrib* **10**: 201–210
- da Silva ALG, Pinheiro MCB** (2007) Biología floral e da polinização de quatro espécies de *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Bot Brasilica* **21**: 235–247
- da Silva ALG, Pinheiro MCB** (2009) Reproductive success of four species of *Eugenia* L. (Myrtaceae). *Acta Bot Brasilica* **23**: 526–534
- Sobral M** (2003) *Myrtaceae no Rio Grande do Sul*. Editora Unisinos, Sao Leopoldo RS Brasil
- Speranza P** (2005) Los desafíos de la exploración de los recursos genéticos en plantas apomícticas: Lecciones del caso de *Paspalum dilatatum*. *Agrociencia* **9**: 73–76
- Speranza PR, Seijo JG, Grela I a., Solís Neffa VG** (2007) Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *J Biogeogr* **34**: 427–436
- Turchetto C, Fagundes NJR, Segatto AL a, Kuhlemeier C, Solís Neffa VG, Speranza PR, Bonatto SL, Freitas LB** (2014) Diversification in the south american pampas: The

- genetic and morphological variation of the widespread *petunia axillaris* complex (solanaceae). *Mol Ecol* **23**: 374–389
- Turchetto-Zolet A, Salgueiro F, Cruz F, Veto N, Margis R** (2011) Chloroplast DNA variation and phylogeography of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) in the Brazilian Atlantic forest. *BMC Proc* **5**: P19
- Vaio M** (2000) Análisis citogenético de ocho accesiones de *Paspalum quadrifarium* Lam. (Gramineae). Facultad de Ciencias, Universidad de la República
- Vaio M, Speranza P, Valls JF, Guerra M, Mazzella C** (2005) Localization of the 5S and 45S rDNA sites and cpDNA sequence analysis in species of the quadrifaria group of *Paspalum* (Poaceae, Paniceae). *Ann Bot* **96**: 191–200
- Vignale B, Bisio L** (2005) Selección de frutales nativos en Uruguay. *Agrociencia* **IX**: 35–39
- Vignale B, Bisio L** (2004) Selección de frutas nativas con potencial comercial en Uruguay. 2º Simp. Nac. Morando y 1er. Encontro Pequenas Frutas e Frutas Nativ. Pelotas, RS, Brasil, pp 246–251
- Wlasiuk G, Garza JC, Lessa EP** (2003) Genetic and Geographic Differentiation in the Rio Negro Tuco-Tuco (*Ctenomys Rionegrensis*): Inferring the Roles of Migration and Drift From Multiple Genetic Markers. *Evolution (N Y)* **57**: 913–926
- Wrege MS, Higa RC V, Britez RM, Cordeiro M** (1991) El cambio climático y la conservación de *Araucaria angustifolia* en Brasil. *Unasyuva - FAO* **231-232**: 8p
- Wright S** (1965) The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution (N Y)* **19**: 395–420
- Wright S** (1969) The theory of gene frequencies: Evolution and the Genetics of Populations (vol.2). University of Chicago