

## Historia biogeográfica y filogeografía de *Nothofagus antarctica* en Sudamérica austral

MARISOL GLATZEL<sup>1</sup>; PAULA MATHIASSEN<sup>1,2,✉</sup> & ANDREA C. PREMOLI<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Centro Regional Universitario Bariloche (CRUB), Universidad Nacional del Comahue (UNCo). Bariloche, Argentina.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Medioambiente (INIBIOMA, CONICET-UNCo). Bariloche, Argentina.

### RESUMEN

1. La historia geológica y climática del sur de Sudamérica experimentó transformaciones paisajísticas complejas como resultado de procesos que comenzaron hace millones de años y culminaron con los eventos glaciales del Pleistoceno. En consecuencia, los patrones genéticos de la biota antigua de la Patagonia, como los linajes de *Nothofagus*, reflejarán dichos cambios.
2. Realizamos un estudio filogeográfico de *Nothofagus antarctica* a lo largo de su rango geográfico completo en la Argentina y Chile, utilizando ADN del cloroplasto. Analizamos secuencias de 158 individuos recolectados en 112 localidades, utilizando tres regiones no codificantes (trnH-psbA, trnL-trnF y psbB-psbH). Se determinaron los haplotipos y se estimaron parámetros de diversidad. Se evaluó la estructuración genética y se realizó una prueba de Mantel para analizar la relación entre distancia genética y geográfica. Se infirieron las relaciones filogenéticas y se estimaron los tiempos de divergencia entre haplotipos mediante análisis de datación molecular calibrados con fósiles de *Nothofagus*.
3. Los resultados revelaron una estructuración genética significativa latitudinal. Se identificaron tres linajes: Norte, Centro y Sur, cada uno asociado a una región geográfica específica. Los linajes Norte y Centro presentaron mayor diversidad genética, con haplotipos exclusivos de cada región.
4. La divergencia entre linajes y la filogenia datada se alinearon con eventos geológicos ocurridos en la Patagonia durante el Eoceno y el Mioceno.
5. La mayor diversidad genética en las regiones del centro y el norte, junto con la extensa homogeneidad en el sur, se asocia con eventos climáticos más recientes del Plioceno y Pleistoceno. Estos produjeron contracción y persistencia poblacional en refugios glaciares y periglaciares, seguidas por recolonización postglacial y expansiones.
6. Implicancias. El estudio destaca la importancia de comprender la historia evolutiva y la estructura filogeográfica al implementar prácticas de manejo y restauración para evitar la mezcla de individuos provenientes de acervos genéticos divergentes de *N. antarctica*.

[Palabras clave: ADNcp, cuellos de botella, ingresiones marinas, refugios glaciares, vicarianza antigua]

### ABSTRACT. Biogeographic history and phylogeography of *Nothofagus antarctica* in austral South America

1. The geological and climatic history of southern South America has undergone complex landscape transformations as a result of processes that began millions of years ago and culminated in the Pleistocene glacial events. Consequently, the genetic patterns of the ancient biota of Patagonia, such as the *Nothofagus* lineages, reflect these changes.
2. We conducted a phylogeographic study of *Nothofagus antarctica* throughout its entire geographic range in Argentina and Chile, using chloroplast DNA. We analyzed sequences from 158 individuals collected at 112 sites, covering three non-coding regions (trnH-psbA, trnL-trnF and psbB-psbH). Haplotypes were determined, and diversity parameters were estimated. Genetic structuring was evaluated, and a Mantel test was conducted to analyse the relationship between genetic and geographic distances. Phylogenetic relationships were inferred, and divergence times among haplotypes were estimated using molecular dating analyses calibrated with fossil records of *Nothofagus*.
3. The results revealed a significant latitudinal genetic structuring. Three lineages were identified: North, Central and South, each associated with a specific geographic region. The North and Central lineages exhibited greater genetic diversity, with haplotypes exclusive to each region.
4. The divergence between lineages and the dated phylogeny aligned with geological events in Patagonia during the Eocene and Miocene.
5. The greater genetic diversity in the central and northern geographic regions, alongside the extensive homogeneity in the south, is associated with more recent climatic events during the Pliocene and Pleistocene. These events caused population contraction and persistence in glacial and periglacial refuges, followed by postglacial recolonization processes and expansions.
6. Implications. This study underscores the importance of understanding the evolutionary history and phylogeographic structure to implement effective management and restoration practices to avoid mixing individuals from divergent gene pools of *N. antarctica*.

[Key words: ancient vicariance, bottlenecks, cpDNA, glacial refugia, marine ingressions]

## INTRODUCCIÓN

La evolución y la distribución actual de los bosques de la Patagonia están muy vinculadas a la historia geológica y climática de la región, que modelaron la biota a lo largo del tiempo. Los ciclos glaciales-interglaciales desde el Neógeno tardío (Rabassa et al. 2011) influyeron de manera significativa en la conectividad, el tamaño efectivo poblacional y la estructura genética de las especies arbóreas de la Patagonia (Premoli et al. 2010). Las glaciaciones cuaternarias, y en especial la Gran Glaciación Patagónica (GPG) y el último máximo glacial (UMG), jugaron un rol crucial al forzar contracciones poblacionales y la persistencia en refugios glaciares y periglaciares, seguidas por procesos de recolonización postglacial (Premoli et al. 2010; Rabassa et al. 2011). Estos eventos históricos, combinados con la heterogeneidad topográfica y climática de la región, dejaron huellas persistentes en los patrones de diversidad genética y adaptación local de especies dominantes como *Nothofagus* spp. (Mathiasen and Premoli 2010; Premoli et al. 2010; Acosta et al. 2012). Por lo tanto, es esencial integrar una perspectiva paleoambiental y geológica para el manejo y la conservación, ya que permite identificar áreas de alta relevancia evolutiva, interpretar de forma adecuada la variabilidad actual y diseñar estrategias que consideren la dinámica ambiental de largo plazo frente al cambio climático contemporáneo.

La historia geológica y climática de la Región Patagónica en el sur de Sudamérica se caracteriza por transformaciones complejas, resultado de procesos geotectónicos iniciados a lo largo del margen occidental de Gondwana (Upchurch 2008). Al final del Eoceno y el inicio del Oligoceno —hace ~34 Ma—, la apertura de pasaje de Drake entre Sudamérica y la Antártida, junto con la formación de la corriente circumpolar antártica, provocó un cambio climático significativo: los regímenes cálidos (de invernadero) dieron paso a un régimen frío (de iglú) (regímenes de greenhouse y icehouse) (Uber and Nof 2006). Por otro lado, el levantamiento final de la cordillera de los Andes, que comenzó en el Eoceno y continuó hasta el Plioceno temprano (~5 Ma), estuvo marcado por la formación de un sistema de grandes cuencas sedimentarias interiores. A los 43° S en la Patagonia, ya desde el período Jurásico (~150 Ma), se depositaron de manera sucesiva sedimentos marinos, sugiriendo la existencia de paleo-cuencas conectadas con el Océano Pacífico. Esto,

junto con el hecho de que el nivel del mar era más alto que el actual (Miller et al. 2005), hizo que el paisaje estuviera conformado por extensiones de tierra rodeadas por mar. Durante el Paleógeno (hace 32 Ma), nuevas ingresiones marinas afectaron otras regiones de la Patagonia. Hacia el final del Neógeno (~6 Ma), la Cordillera de los Andes alcanzó su máxima elevación, generando una barrera para la circulación atmosférica de los vientos húmedos provenientes del Océano Pacífico, lo que estableció condiciones más secas y frías en el continente sudamericano. Este enfriamiento progresivo dio lugar a las más antiguas glaciaciones cuaternarias conocidas para la Patagonia; en particular, la GPG, que se produjo hace ~1 Ma como un manto de hielo continuo, seguido por una compleja secuencia de avances y retracciones de los hielos durante el Pleistoceno, incluyendo el último máximo glacial (UMG) hace ~25000 años, modelando gran parte del paisaje actual (Rabassa et al. 2011).

La historia evolutiva de la biota patagónica —en especial, los linajes con raíces antiguas del género *Nothofagus*, cuyo origen data del período Cretácico superior (~80 Ma)— se vio muy influenciada por estos cambios geológicos y climáticos. El registro fósil —en particular, el de *Nothofagus*, que es rico y amplio en distribución (Hill 1992)— se utiliza como herramienta para reconstruir las condiciones climáticas pasadas que afectaron la historia biogeográfica de las especies. Los fósiles más antiguos de *Nothofagus* (encontrados en la Antártida y datan del Cretácico) determinan un origen gondwánico para el género (Hill 2001). *Nothofagus*, el único género de la familia Nothofagaceae, en la actualidad comprende cuatro subgéneros: *Lophozonia*, *Fuscospora*, *Brassospora* y *Nothofagus*, cuyas especies se distribuyen solo en el hemisferio sur (Vento et al. 2024). Por ello, en biogeografía se considera que el género *Nothofagus* es clave para comprender el origen, la distribución y la historia de colonización de la biota austral (Romero 1986; Hill 1992).

La filogeografía, que estudia la distribución geográfica de la variación genética considerando las genealogías a nivel intraespecífico (Avice 1987), contribuye a dilucidar la historia evolutiva de especies individuales o grupos de taxones muy relacionados. El uso de marcadores genéticos de ADN plastidial (Emerson and Hewitt 2005) —sobre todo, del cloroplasto (ADNcp) en plantas— permite reconstruir las relaciones

genealógicas entre distintos linajes (e.g., Soltis et al. 1997). Debido a su baja tasa de mutación, estos marcadores son más conservados y útiles para reconstruir los procesos históricos que ocurrieron en la Patagonia (e.g., Acosta and Premoli 2010; Acosta et al. 2014). Los análisis filogenéticos y filogeográficos del subgénero *Nothofagus* realizados por Acosta y Premoli (2010) en el sur de Sudamérica demostraron que mientras el ADN nuclear permite inferir las relaciones filogenéticas entre las especies encontrando variantes exclusivas para cada una de ellas, los haplotipos de ADNcp son específicos de cada región geográfica y son compartidos por las especies de *Nothofagus* que habitan en una misma área. Estudios similares en otros géneros arbóreos (e.g., *Quercus* [Yang et al. 2021] y *Eucalyptus* [Healey et al. 2018]) documentan este mismo fenómeno, en el que las genealogías de plástidos están disociadas de la taxonomía (y en conflicto con las nucleares) y muestran una clara asociación geográfica. El fenómeno de captura del cloroplasto explica la existencia de haplotipos compartidos entre distintas especies en una dada región geográfica como producto de la hibridación y las retrocruzas repetidas en una dirección (introgresión) de un híbrido inicial. Por lo tanto, estudios previos basados en el extenso muestreo de poblaciones y especies proponen que los linajes del cloroplasto reflejan una historia biogeográfica común para el conjunto de las especies del subgénero *Nothofagus*, en relación con la configuración de paisajes antiguos de la Patagonia (Premoli et al. 2012; Acosta et al. 2014). Sin embargo, otros estudios proponen que haplotipos del cloroplasto de *N. antarctica* y *N. pumilio* son evidencia de la historia glaciaria, representando la zona de contacto entre los linajes norte y sur como refugio glaciario (Soliani et al. 2012). De forma similar a los análisis considerando el subgénero *Nothofagus*, al nivel de especie se demostró que los polimorfismos del cloroplasto reflejan una historia antigua asociada a la geografía de la Patagonia para *N. pumilio* (Mathiasen and Premoli 2010) y *N. dombeyi* (Fasanella et al. 2023); resta dilucidar la historia biogeográfica de *N. antarctica* utilizando esos marcadores.

La hipótesis a analizar mediante secuencias de ADNcp es que los linajes son resultado de una paleogeografía fragmentada controlada significativamente por la geología. De manera alternativa, los distintos linajes del cloroplasto serían el resultado de fenómenos más recientes, en relación con el último máximo glacial. El análisis de los polimorfismos del ADNcp permitirá inferir si las poblaciones se

separaron hace mucho o poco tiempo, según hayan acumulado muchas o pocas diferencias. Aunque estas fechas pueden medirse en unidades arbitrarias, se pueden calibrar (utilizando el registro fósil u otra información geológica) para determinar con mayor exactitud las edades aproximadas en años de los eventos de divergencia ocurridos en el pasado. El trabajo de Acosta et al. (2014) aportó a dilucidar la filogeografía del subgénero *Nothofagus* en Sudamérica. Ese estudio integró la historia evolutiva del subgénero *Nothofagus* con factores geoclimáticos, mostrando cómo los eventos geológicos y climáticos influyeron en la diversificación y distribución de los linajes de estas especies en el hemisferio sur. Sin embargo, quedaron abiertas preguntas a nivel de especies particulares y el uso de dataciones moleculares podrá aportar a dilucidar si las diferencias genéticas son antiguas o más recientes.

El objetivo de este trabajo es contribuir a la reconstrucción de la historia biogeográfica mediante un análisis filogeográfico de la especie *Nothofagus antarctica* (G.Forst.) Oerst., utilizando secuencias de ADNcp para identificar la variabilidad genética presente en su rango latitudinal. *Nothofagus antarctica* es la especie de *Nothofagus* sudamericana con mayor amplitud ecológica; ocupa una gran variedad de hábitats (Steinke et al. 2008) y se han descrito distintos morfotipos (Ramírez et al. 1985) y ecotipos (Romero 1986). Además, presenta la más amplia distribución geográfica, abarcando desde los 36.5° S hasta los 56° S a lo largo de la cordillera de los Andes, tanto en Chile como en la Argentina (Donoso 2006). Estas características la convierten en un modelo ideal para estudiar la historia evolutiva de *Nothofagus*, ya que su gran amplitud ecológica sugiere una capacidad de adaptación a diversas condiciones ambientales. Esto puede reflejar la respuesta de la especie a cambios climáticos y geológicos a lo largo del tiempo. La distribución geográfica amplia de *N. antarctica* permite explorar cómo diferentes poblaciones evolucionaron en respuesta a barreras geográficas y cambios en el hábitat (lo cual puede haber influido en la diferenciación genética). En este estudio se incorporan 20 nuevos sitios de colecta de *N. antarctica* que no fueron considerados en estudios previos a nivel de subgénero (Premoli et al. 2012; Acosta et al. 2014) y que corresponden a un área geográfica significativamente afectada por las glaciaciones ocurridas en la Patagonia. La comprensión de la distribución espacial de la diversidad genética de *N. antarctica* puede

informar estrategias de manejo y conservación, especialmente en un contexto de cambio climático, al identificar poblaciones con características genéticas diferenciales que han subsistido localmente a lo largo del tiempo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

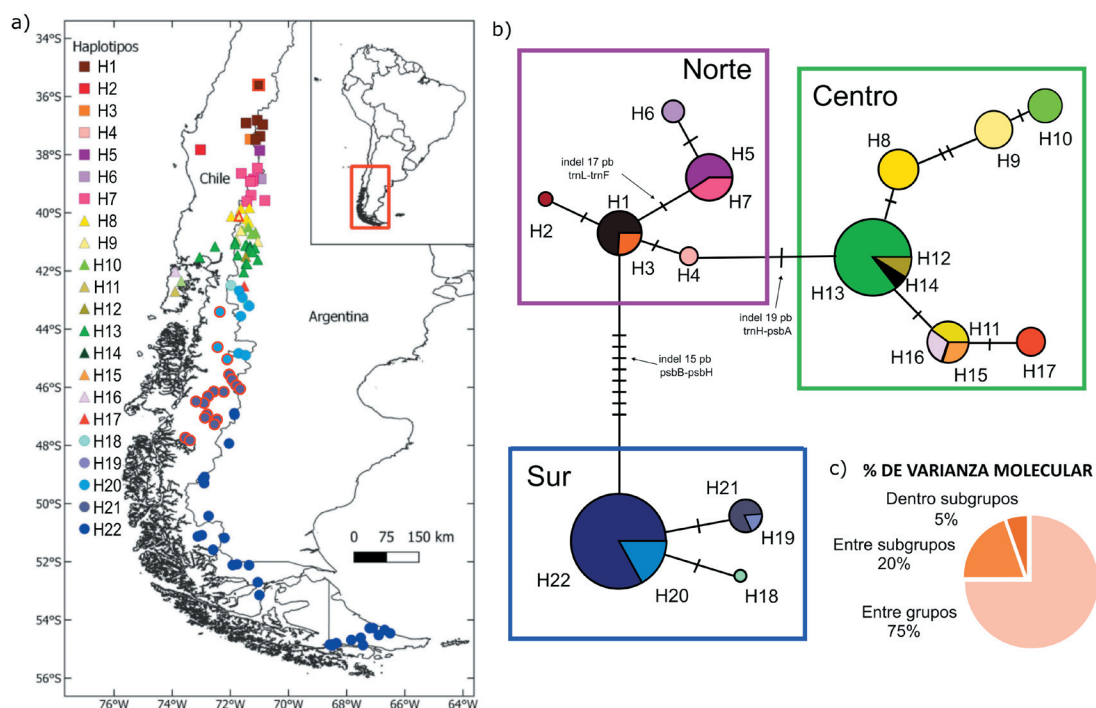
### Recolección y procesamiento de muestras

Utilizamos secuencias de ADNcp de 158 individuos de *N. antarctica*, recolectados en 112 localidades en la Argentina y Chile (Figura 1a): 133 individuos de los 92 sitios que integran la base de datos de todo el subgénero *Nothofagus* analizado en Acosta et al. (2014) y 25 individuos de 20 nuevos sitios de colecta incluidos en este estudio (Tabla 1). Estos nuevos 20 sitios de colecta completan

un vacío de información en la distribución de la especie; en particular, en áreas afectadas por las últimas glaciaciones. En cada sitio recolectamos muestras de tejido fresco (hojas) de pequeñas ramas (de 10 a 15 cm), seleccionando al azar entre 1 y 5 individuos por sitio. Las muestras fueron transportadas al laboratorio del INIBIOMA (CONICET-UNCo Bariloche, Río Negro, Argentina) en heladeras portátiles, conservadas a 4 °C hasta la extracción de ADN.

### Extracción y amplificación de ADN

La extracción y amplificación de ADN siguió los protocolos utilizados previamente en otras especies de *Nothofagus* (Acosta and Premoli 2010; Mathiasen and Premoli 2010; Premoli et al. 2012; Acosta et al. 2014; Mathiasen et



**Figura 1.** a) Distribución geográfica de los 22 haplotipos de ADNcp de *Nothofagus antarctica* en 112 localidades de la Argentina y Chile. Cada color corresponde a un haplotipo diferente. El símbolo indica el linaje al cual pertenece: Norte (cuadrados), Centro (triángulos) y Sur (círculos). Los símbolos de los sitios nuevos colectados para este estudio poseen borde rojo. b) Red de haplotipos que muestra las conexiones entre los 22 haplotipos identificados. El tamaño del círculo es proporcional a la frecuencia del haplotipo. Las líneas perpendiculares indican los cambios en las secuencias de ADN (eventos mutacionales) entre haplotipos. Se indica la ubicación de los indels (inserciones/ deleciones) de más de 10 pb. Los círculos con más de un color representan los haplotipos que fueron colapsados (secuencias similares reemplazadas por una consenso). c) Resultados del análisis de AMOVA donde se muestra el porcentaje de la varianza dentro de los subgrupos, entre subgrupos dentro de cada grupo y entre grupos.

**Figure 1.** a) Geographic distribution of the 22 haplotypes of *Nothofagus antarctica* in 112 locations in Argentina and Chile. Each colour corresponds to a different haplotype. The symbol indicates the geographic region to which it belongs: North (squares), Central (triangles), and South (circles). Symbols of newly collected sites for this study have a red border. b) Haplotype network showing the connections between the 22 identified haplotypes. Circle size is proportional to the frequency of the haplotype. The perpendicular lines indicate changes in DNA sequences (mutational events) between haplotypes. The location of indels (insertions/deletions) of more than 10 bp is indicated. Circles with more than one colour represent the haplotypes that were collapsed (similar sequences replaced by a consensus one). c) Results of the AMOVA analysis showing the percentage of variance within subgroups, among subgroups within each group and between groups.

**Tabla 1.** Localización geográfica de las 20 nuevas localidades analizadas en este estudio, y que completan la distribución geográfica de *Nothofagus antarctica* en el sur de Chile y la Argentina. Se analizaron en total 112 localidades, de las cuales 92 registradas previamente se tomaron de Acosta et al. (2014).

**Table 1.** Geographic location of the new 20 sites analyzed in this study, that complete the geographical distribution of *Nothofagus antarctica* in the south of Chile and Argentina. A total of 112 sites were analyzed, of which 92 previously recorded locations were taken from Acosta et al. (2014).

N°	País, región/provincia, localidad	Latitud (° S)	Longitud (° O)	Altitud (m s. n. m.)
1	Chile, VII Región, Lircay	35.607	71.047	1875
2	Arg., Neuquén, Arroyo Acol	40.133	71.703	664
3	Chile, X Región, Villa Santa Lucia	43.411	72.368	243
4	Chile, XI Región, Bosque Encantado	44.624	72.457	632
5	Chile, XI Región, Lago Verde	45.043	72.104	285
6	Chile, XI Región, Coyhaique	45.547	72.047	359
7	Chile, XI Región, Cruce a Balmaceda I	45.812	71.910	432
8	Chile, XI Región, Cruce a Balmaceda II	45.918	71.835	632
9	Chile, XI Región, Villa Cerro Castillo II	46.135	72.576	547
10	Chile, XI Región, Villa Cerro Castillo I	46.156	72.244	499
11	Chile, XI Región, Río Murta	46.311	72.789	267
12	Chile, XI Región, Glaciar Exploradores	46.500	73.158	196
13	Chile, XI Región, Camping Alacaluf	46.543	72.926	321
14	Chile, XI Región, Glaciar Exploradores	46.546	72.920	276
15	Chile, XI Región, Lago Bertrand	46.935	72.787	225
16	Chile, XI Región, Nacimiento Río Baker	47.024	72.829	228
17	Chile, XI Región, Estancia Chacabuco	47.122	72.475	418
18	Chile, XI Región, RN Tamango	47.246	72.535	176
19	Chile, XI Región, Caleta Tortel	47.801	73.535	18
20	Chile, XI Región, Turbera Río Baker	47.816	73.429	14

al. 2021; Fasanella et al. 2023). Para estimar la concentración de ADN de cada muestra realizamos electroforesis en gel de agarosa 1% p/v con Buffer TAE 1X y comparamos con un marcador de peso molecular de ADN de 1-kb (Fermentas, Burlington, ON, Canadá). Para amplificar el ADN extraído mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), empleamos cebadores universales de tres regiones no codificantes del ADNcp antes usados en la especie (psbB-psbH, trnL-trnF y trnH-psbA) (Acosta et al. 2014). La mezcla de PCR contenía 2 µL de extracto de ADN (~10 ng), 0.625 U de ADN polimerasa GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA), 5 µL de buffer 5X GoTaq® (Promega, Madison, WI, USA), 0.25 mM de cada deoxinucleótido (dNTP) y 0.3 µM de cada iniciador molecular en un volumen total de 25 µL. La PCR consistió en un paso inicial de desnaturalización a 95 °C por 4 minutos, seguido por 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 minuto, anclaje según la temperatura óptima de cada iniciador a 57 °C, 54 °C o 56 °C (para psbB-psbH, trnL-trnF y trnH-psbA, respectivamente) por 1 minuto, y extensión a 72 °C por 1.5 minutos, seguidos por una extensión final a 72 °C por 7 minutos. Todas las reacciones fueron llevadas a cabo en un termociclador Biosystems 2720 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Los productos de amplificación se separaron por electroforesis en gel de agarosa al 1% p/v con Buffer TAE 1X, teñidos con SYBR Safe (Invitrogen, Eugene, OR, USA) y se visualizaron con un transiluminador UV. Los productos de PCR fueron limpiados con exonucleasa I (Fermentas, Burlington, ON, Canadá) y fosfatasa alcalina (USB, Cleveland, OH, USA). Enviamos los productos de PCR al centro de secuenciación masiva de Macrogen (Seúl, Corea). Depositamos las nuevas secuencias obtenidas para cada haplotipo identificado en la base de datos de GenBank (números de acceso para psbB-psbH: PQ296497-PQ296518, trnL-trnF: PQ296453-PQ296474, y trnH-psbA: PQ296475-PQ296496). Analizamos un total de 474 secuencias de ADNcp de las tres regiones amplificadas, de las cuales 75 fueron secuenciadas por primera vez para este estudio y 399 secuencias ya estaban publicadas en Acosta et al. (2014).

#### Diversidad y estructura genética

Usamos el programa Mega11 (Tamura et al. 2021) para concatenar y alinear las 474 secuencias amplificadas de las tres regiones de ADNcp. Codificamos como eventos mutacionales únicos la ausencia de un determinado nucleótido (gap) y las

inserciones/deleciones de un mayor número de nucleótidos (indeles), con el programa SeqState (Müller 2005). Determinamos los haplotipos de ADNcp en base a las sustituciones de nucleótidos e indeles. Para cada linaje identificado, calculamos los siguientes parámetros de diversidad: número de sitios variables (S), número de haplotipos (H) y los índices de diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) y haplotípica (Hd) utilizando el programa DNAsp (Rozas et al. 2017).

Evaluamos la existencia de estructuración genética mediante un análisis de agrupamiento de individuos utilizando inferencia Bayesiana implementada en el programa hierBAPS v6.0 (Cheng et al. 2013; Tonkin-Hill et al. 2018). El número óptimo de grupos genéticos (o clusters, denominados con la letra K) se determinó utilizando un modelo de mezcla (admixture) con una profundidad máxima jerárquica de tres niveles (dada por el número de linajes), a partir de 20 grupos iniciales y 10 réplicas cada uno. El número óptimo de clusters se determinó maximizando la verosimilitud marginal. Evaluamos el grado de diferenciación genética (restricciones al flujo génico) entre grupos mediante un análisis de varianza molecular (AMOVA) utilizando el programa GenAlEx v6.503 (Peakall and Smouse 2012), empleando los niveles jerárquicos implementados en el análisis Bayesiano. Además, evaluamos el grado de divergencia genética entre los individuos de los linajes Norte, Centro y Sur (ver análisis filogenético más abajo). Para analizar la relación entre la distancia genética y geográfica, y así evaluar el aislamiento por distancia, realizamos una prueba de Mantel en GenAlEx. Determinamos la significancia de los parámetros estimados mediante 9999 permutaciones.

#### *Red de haplotipos, análisis filogenéticos y datación molecular*

Para visualizar las relaciones entre los haplotipos, generamos una red utilizando el método de Median-Joining con el programa NETWORK v10.2.0.0 (Bandelt et al. 1999), incluyendo las secuencias concatenadas de los 158 individuos de *N. antarctica*. Dedujimos las relaciones filogenéticas entre haplotipos de ADNcp mediante el método de inferencia Bayesiana (IB), utilizando el programa BEAST v1.10.4 (Suchard et al. 2018). Incluimos como grupo externo secuencias de ADNcp de las tres regiones antes mencionadas, de distintas especies de *Nothofagus* pertenecientes a los

subgéneros *Lophozonia* (*N. cunninghamii*, *N. moorei*, *N. menziesii*, *N. glauca*, *N. obliqua*, *N. nervosa* y *N. macrocarpa*) y *Fuscospora* (*N. alessandrii*, *N. fusca* y *N. solandri*), así como de la especie *Betula pendula* de la familia Betulaceae, grupo hermano de la familia Nothofagaceae. Generamos los archivos de entrada con el programa BEAUti v1.10.4 (proporcionado en el paquete BEAST) usando los siguientes parámetros: el modelo de sustitución fue GTR (del inglés, general time-reversible) con un modelo de heterogeneidad del sitio Gamma de cuatro categorías, e igual proporción de sitios invariantes (modelo GTR+G+I) seleccionado bajo el criterio de información de Akaike (AIC) en jModelTest v2.1.10 (Darriba et al. 2012). Construimos los árboles utilizando un reloj estricto y el proceso de Yule, corriendo  $5 \times 10^7$  generaciones para el método Monte Carlo basado en cadenas de Markov (MCMC) y muestreando cada 1000 ciclos. Generamos el árbol de máxima credibilidad de clados (MCC) descartando un 25% de los 50000 árboles obtenidos, utilizando un límite inferior del 50% de probabilidad posterior para cada nodo y tomando el valor de la mediana con el programa TreeAnnotator v1.10.4 (del paquete BEAST).

Para estimar los tiempos de divergencia entre haplotipos de ADNcp, realizamos un análisis de datación molecular calibrado con fósiles utilizando el programa BEAST. Como puntos de calibración empleamos diferentes restricciones de edad de los fósiles (Tabla 2), recomendadas por Sauquet et al. (2012), que verifican la ubicación filogenética y los datos geocronológicos del registro fósil de *Nothofagus*, siguiendo la metodología empleada en Acosta et al. (2014). Generamos el archivo de entrada en BEAUti configurado según: un modelo de reloj molecular relajado no correlacionado, con una distribución log-normal, y el proceso de especiación de Yule para la distribución de los tiempos de divergencia. Los parámetros de calibración *a priori* consistieron en a) para la restricción de la edad de la raíz del árbol, implementamos una distribución normal (con una media de 85 Ma y un desvío estándar de 5 Ma, de acuerdo con la edad del tipo de polen ancestral de *Nothofagus*), y b) para los nodos internos, implementamos distribuciones uniformes con límites mínimos estrictos (edad del fósil en Ma) y límites máximos arbitrariamente grandes (1000 Ma). Las MCMC corrieron por  $1.5 \times 10^7$  generaciones, tomando muestras cada 1000 ciclos. Para determinar la densidad del núcleo para cada nodo se utilizaron las edades

**Tabla 2.** Detalle de los puntos de calibración empleados en la datación molecular de los diferentes linajes de haplotipos de ADNcp de *Nothofagus antarctica*. Los nombres de los puntos de calibración corresponden a los nodos empleados en Acosta et al. (2014).

**Table 2.** Details of the calibration points used in the molecular dating of the different cpDNA haplotype lineages of *Nothofagus antarctica*. The names of the calibration points correspond to the nodes employed in Acosta et al. (2014).

Punto de calibración	Nodo	Edad (Ma)	Tipo de registro	Referencias
R	Betulaceae/ Nothofagaceae	85	Polen fósil de 'tipo ancestral' <i>Nothofagidites kaitangataensis</i> Te Punga	Romero (1973), Dettman et al. (1990)
LFN	<i>Lophozonia</i> / <i>Fuscospora</i> / <i>Nothofagus</i>	83.5	Polen fósil de <i>Nothofagidites senectus</i> M. E. Dettman y G. Playford	Dettman y Playford (1968), Stover y Partridge (1973), Macphail (2007)
FN	<i>Fuscospora</i> / <i>Nothofagus</i>	65.5-70.6	Polen fósil de <i>Nothofagidites brachyspinulosus</i> (Cookson) W. K. Harris	Harris (1965), Macphail (2007)
L	<i>Lophozonia</i>	31.5-33.9	Hojas fósiles de <i>Nothofagus tasmanica</i> R. S. Hill	Hill (1983)
LAus	<i>Lophozonia</i> Australia	0.8-1.8	Hojas fósiles de <i>Nothofagus cunninghamii</i> (Hook. F.) Oerst	Oersted (1871), Jordan (1999)

de divergencia y los intervalos de credibilidad utilizando Tracer v1.7.1 (Rambaut et al. 2018). Visualizamos el árbol de MCC obtenido con el programa FigTree v1.4.4 (Rambaut 2018).

haplotipos para *N. antarctica* (Figura 1). De estos haplotipos, 21 ya fueron descritos antes (Premoli et al. 2012; Acosta et al. 2014) y se agrega un haplotipo nuevo (haplotipo H21) (Figura 1a).

## RESULTADOS

El análisis de las secuencias alineadas concatenadas de 158 individuos de *N. antarctica* resultó en una matriz de 1700 columnas, de las cuales 791 corresponden a la región psbB-psbH, 437 a trnL-trnF y 472 a trnH-psbA. Identificamos en total 28 sitios variables (Tabla 3), entre sustituciones e indeles. Encontramos 4 indeles de más de 10 pb que fueron considerados como eventos mutacionales únicos: un indel de 15 pb en la región de ADNcp psbB-psbH, uno de 17 pb en la región trnL-trnF y dos de 25 y 19 pb en la región trnH-psbA. En base a la combinación de indeles y sustituciones de las tres regiones concatenadas de ADNcp, identificamos 22

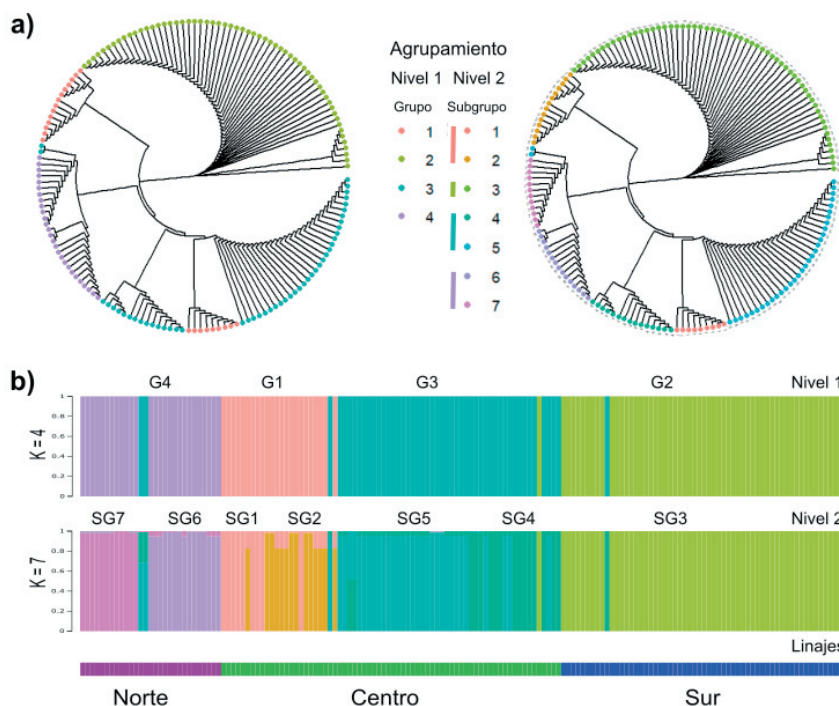
haplotipos del cloroplasto resultaron únicos de una determinada región estructurados latitudinalmente (Figura 1a). El haplotipo nuevo fue encontrado solo en los sitios de Chile incorporados en este estudio, entre los 45° S y 48° S (H21) (Figura 1a). Los haplotipos de cada región geográfica se agruparon según los linajes identificados en el análisis filogenético (ver resultados del árbol filogenético más abajo), con 7 haplotipos pertenecientes al linaje Norte, 10 al linaje Centro y 5 al linaje Sur. La diversidad haplotípica total de la especie fue  $h=0.881$ . La comparación entre los tres linajes mostró que el de mayor diversidad fue el Norte, seguido por el Centro; el de menor diversidad fue el Sur (Tabla 3). La diversidad nucleotídica observada para la especie fue  $\pi=0.0057$ , siendo el linaje Centro el más diverso. Este linaje también presentó el mayor número de haplotipos y de sitios variables, seguido por el linaje Norte y, finalmente, por el Sur (Tabla 3).

**Tabla 3.** Parámetros de diversidad genética de *Nothofagus antarctica* estimados a partir de secuencias de ADNcp para tres linajes genéticos (Norte, Centro y Sur) y para el total de la muestra (especie). N: número de individuos. S: número de sitios variables. H: número de haplotipos.  $\pi$ : diversidad nucleotídica. h: diversidad haplotípica.

**Table 3.** Genetic diversity parameters of *Nothofagus antarctica* estimated from cpDNA sequences for three genetic lineages (North, Central and South) and for the entire sample (species). N: number of individuals. S: number of variable sites. H number of haplotypes.  $\pi$ : nucleotide diversity. h: haplotype diversity.

Linaje	N	S	H	$\pi$	h
Norte	29	6	7	0.00090	0.837
Centro	70	8	10	0.00136	0.775
Sur	59	3	5	0.00032	0.445
Especie	158	28	22	0.00577	0.881

El análisis de estructuración Bayesiano infirió un agrupamiento significativo de los individuos en dos niveles jerárquicos, identificando cuatro grupos genéticos (clusters) distintos (G1 a G4) en el primer nivel jerárquico (Figura 2a), que se subdividieron en siete subgrupos (SG1 a SG7) en el segundo nivel (Figura 2a). Cada grupo genético se correspondió con los diferentes linajes (clados) identificados en el árbol filogenético (Figura 2b). Los individuos de los grupos G1 y G3



**Figura 2.** a) Análisis de agrupamiento de clusters (UPGMA) mostrando los grupos identificados por hierBAPS para dos niveles jerárquicos. b) Gráficos de barras mostrando la asignación de cada individuo a cada grupo según los dos niveles jerárquicos determinados por el análisis de agrupamiento Bayesiano para un número óptimo de clusters de K=4 (grupos G1 a G4) y K=7 (subgrupos SG1 a SG7), indicados con distintos colores.

**Figure 2.** a) Cluster analysis (UPGMA) showing the groups identified by hierBAPS for two hierarchical levels. b) Bar charts showing the assignment of each individual to each group according to the two hierarchical levels determined by the Bayesian clustering analysis for the optimum number of clusters of K=4 (groups G1 to G4) and K=7 (subgrupos SG1 to SG7), indicated with different colours.

pertenecen al linaje Centro, los del grupo G2 al linaje Sur y los del grupo G4 al linaje Norte (Figura 2b). Cada uno de los subgrupos –SG1 a SG7– pertenece al linaje de su grupo correspondiente (Figura 2b).

Los resultados del AMOVA revelaron una estructuración genética significativa en *N. antarctica* (Figura 1c), encontrándose con la mayor diferenciación entre grupos genéticos ( $\phi_{RT}=0.750$ ,  $P=0.001$ ). El análisis de aislamiento por distancia mostró una correlación positiva y significativa ( $r_{xy}=0.419$ ;  $P=0.001$ ) entre las distancias genética y geográfica, lo que indica que los individuos que están más cercanos geográficamente tienden a ser más similares genéticamente. Asimismo, a medida que aumenta la distancia geográfica entre los individuos se observa una mayor diferenciación genética.

La red que incluyó los 22 haplotipos identificados para *N. antarctica* presentó dos reticulaciones internas (o bucles). Para resolver estas reticulaciones, colapsamos los haplotipos ambiguos con los haplotipos más frecuentes, dado que mostraron diferencias de un solo paso

mutacional. En el análisis de la topología de la red identificamos tres grupos de haplotipos estructurados latitudinalmente, los cuales están separados por varios pasos mutacionales (Figura 1b). Los haplotipos del grupo Sur se separaron por un mayor número de pasos mutacionales en comparación con los grupos Norte y Centro. Los haplotipos más frecuentes (círculos de mayor tamaño) se ubicaron en una posición central en la red, de los cuales derivan haplotipos menos frecuentes (círculos de menor tamaño) situados en la periferia. La distribución de los haplotipos más frecuentes mostró una asociación geográfica significativa (filopatría), ya que sólo se encuentran en regiones geográficas determinadas: Norte, Centro y Sur, denominadas según la latitud. Por otro lado, los haplotipos menos frecuentes estuvieron restringidos a áreas particulares. No encontramos ningún haplotipo distribuido a lo largo de toda la extensión geográfica analizada de la especie (Figura 1a).

Las relaciones filogenéticas entre haplotipos –deducidas mediante el método de inferencia Bayesiana (Figura 3) y visualizadas en el árbol de MCC– mostraron una clara separación

inicial en dos grandes clados (pertenecientes a los subgéneros *Fuscospora* y *Nothofagus*), hermanos al clado del subgénero *Lophozonia*. Los 22 haplotipos de *N. antarctica* forman un único clado que se divide en dos subclados: uno que agrupa a los haplotipos del sur de la distribución geográfica de la especie (linaje Sur) y otro que se divide además en otros dos subclados (linajes Norte y Centro). Estos tres grandes clados (denominados linajes Norte, Centro y Sur) corresponden a cada una de las regiones norte, centro y sur de la distribución geográfica de la especie, respectivamente (Figura 1a). El linaje Sur está representado por 5 haplotipos: H18 a H22, mientras que los otros dos linajes (Norte y Centro) incluyen los 17 haplotipos restantes (Figura 3). Además, los distintos linajes se corresponden con los grupos genéticos identificados por hierBAPS (Figura 2b).

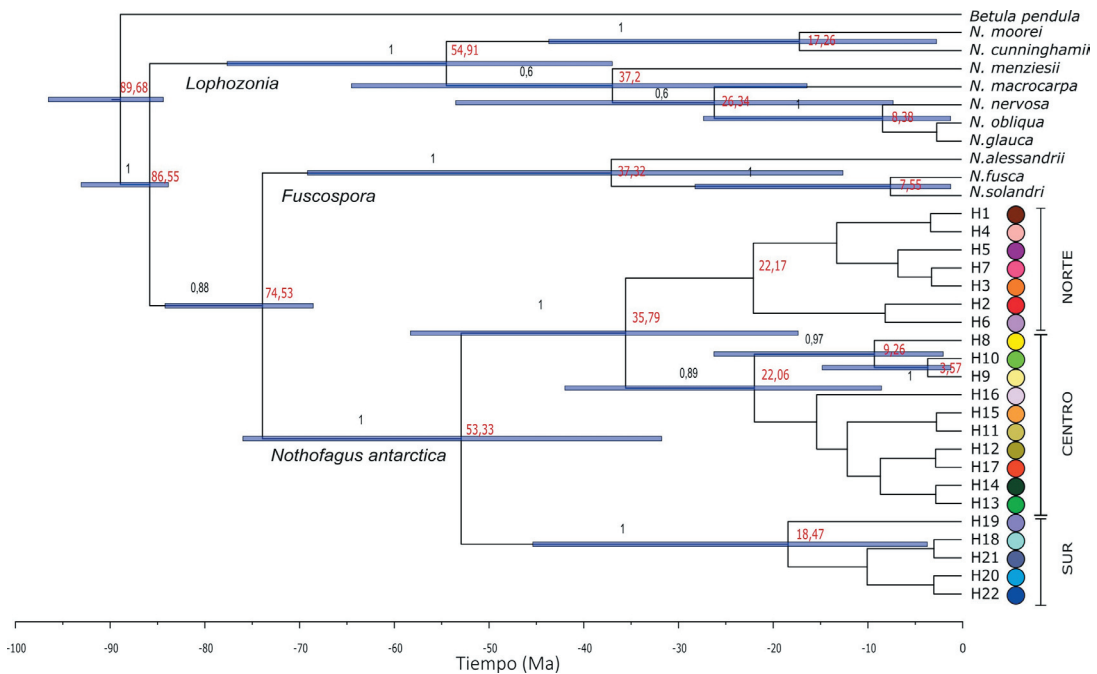
La datación molecular mostró una edad de divergencia de los linajes de ADNcp

de *N. antarctica* de 53.3 Ma (Eoceno) entre los linajes Norte y Sur, mientras que entre los linajes Norte y Centro obtuvimos una edad de divergencia de ~35.8 Ma. Dentro de cada linaje, la diversificación de haplotipos comenzó hace ~22 Ma, siendo el linaje Sur el último en diversificarse, a partir de 18.5 Ma (Figura 3).

## DISCUSIÓN

### *Patrones de diversidad genética e historia demográfica de N. antarctica*

La diversidad de haplotipos en el ADNcp de *N. antarctica* varía con la latitud. Se encontró una mayor diversidad genética en el centro y norte de la distribución y una gran homogeneidad hacia el sur. Este resultado concuerda con lo observado en otras especies de *Nothofagus*, como *N. pumilio*, en las cuales la diversidad de haplotipos disminuye hacia el sur. Este fenómeno se puede explicar por



**Figura 3.** Árbol de MCC obtenido por inferencia Bayesiana con BEAST y datación molecular calibrada con fósiles de la divergencia entre haplotipos de *Nothofagus antarctica*. Los números en color rojo indican la edad de divergencia estimada del nodo (Ma) y los números sobre las ramas indican los valores de probabilidad posterior bayesiana (BPP>0.50). Las barras azules indican el intervalo de 95% de alta densidad posterior para cada nodo (95% HPD). Los círculos de colores indican los distintos haplotipos, que se corresponden con aquellos de la red de haplotipos (Figura 1b). Se indican al sobre artículo las ramas los clados de los subgéneros *Lophozonia* y *Fuscospora* utilizados como grupo externo.

**Figure 3.** MCC tree was obtained through Bayesian inference with BEAST and molecular dating calibrated with fossils of the divergence between haplotypes of *Nothofagus antarctica*. The numbers in red indicate the estimated divergence age of the node (Ma); the numbers above branches indicate the values of Bayesian posterior probability (BPP>0.50). The blue bars indicate the 95% interval of high posterior density for each node (95% HPD). The colored circles indicate the different haplotypes, corresponding to those in the haplotype network (Figure 1b). The clades of subgenera *Lophozonia* and *Fuscospora* used as outgroups are indicated in the branches.

la compleja orogenia en latitudes más bajas, que históricamente aisló a las poblaciones del norte entre sí (Mathiasen and Premoli 2010). Además, durante los períodos glaciarios existió una menor cobertura de hielo en el norte, lo que favoreció la supervivencia en múltiples áreas (i.e., refugios) y conservó una mayor diversidad de haplotipos. Sin embargo, especies tolerantes al frío (como *N. antarctica* y *N. pumilio*) podrían haber sobrevivido a las glaciaciones incluso en altas latitudes (Premoli et al. 2010), conservando variantes antiguas del cloroplasto en el extremo sur de su distribución.

Las poblaciones del Centro del rango latitudinal de *N. antarctica* se distribuyen en una gran variedad de hábitats, incluyendo zonas anegadas, bosques de gran porte en áreas de baja altitud —cerca del límite altitudinal superior del bosque— y en bolsones de frío de fondos de valle. Esto genera una mayor disponibilidad de hábitats propicios para su desarrollo (Ramírez et al. 1985). Esta diversidad de ambientes concuerda con el mayor número de haplotipos y diversidad nucleotídica detectados en esta zona. Además, la zona central posee un marcado gradiente de precipitación oeste-este, lo que favorece el mantenimiento de esta relativamente elevada diversidad. Evidencia previa en poblaciones de *N. pumilio* muestra que hacia el extremo oriental de la región central de la distribución, las consideradas poblaciones marginales constituyen un reservorio de variantes de haplotipos de ADNcp en áreas libres de hielo, utilizando los mismos marcadores aquí analizados (Mathiasen et al. 2021).

#### *Patrones filogeográficos e historia evolutiva de N. antarctica*

Los resultados del análisis de secuencias conservadas de ADNcp indican que el acervo genético de *N. antarctica* refleja una historia filogeográfica y evolutiva anterior a las glaciaciones del Pleistoceno. Este hallazgo es congruente con los análisis filogeográficos de ADNcp realizados en su especie hermana decidua —*Nothofagus pumilio* (Mathiasen and Premoli 2010)— y en la perenne *N. dombeyi* (Fasanella et al. 2023), con las que comparte distintos tipos de bosques a lo largo de sus distribuciones en la Patagonia. El análisis a nivel de todo el subgénero *Nothofagus*, utilizando secuencias y el análisis de plastomas —es decir, genomas del cloroplasto completo de las especies individuales (Juri et

al. 2024)— revela una estructura espacial significativa controlada por la latitud en la Patagonia. La estructura espacial en clados diferenciados latitudinalmente, que determina quiebres filogeográficos, resulta de eventos evolutivos que modelaron el acervo genético de las especies de *Nothofagus* a lo largo de millones de años. Esta estructura coincide con la categoría I filogeográfica propuesta por Avise (2000), definida por clados con una coalescencia profunda (i.e., con divergencias tempranas) y concordantes geográficamente (i.e., que muestran filopatría de los haplotipos). Estudios previos proponen que existieron barreras generalizadas y persistentes al intercambio genético en el subgénero *Nothofagus* (Premoli et al. 2012) que produjeron una divergencia por vicarianza debido a intrusiones marinas ocurridas en latitudes medias de la Patagonia durante el Oligoceno-Mioceno (Ramos 1982). Si bien dichas barreras ocurrieron al menos hace 30 Ma, la marcada diferencia entre linajes persiste en la actualidad. Esta divergencia antigua se mantiene por la acción de la selección natural en ambientes contrastantes al sur y al norte de la barrera, como demuestran técnicas genómicas en la especie cercanamente emparentada *N. dombeyi* (Fasanella et al. 2023).

La datación molecular de haplotipos de *N. antarctica* sugiere que la divergencia entre linajes ocurrió durante el Eoceno. Aunque los intervalos de confianza obtenidos para los nodos datados son amplios, sus límites indican que la gran divergencia norte-sur sería previa al Mioceno (Figura 2). Este resultado refuerza la idea de que las características genéticas de las especies del subgénero *Nothofagus* —analizadas mediante secuencias de ADNcp— indican que son miembros de una flora pre-Pleistocénica cuyos acervos genéticos reflejan procesos evolutivos antiguos (Premoli 1997). La distribución geográfica de los haplotipos de *N. antarctica* consiste en variantes particulares asociadas a cada banda latitudinal (linajes Norte, Centro y Sur). Esto se refleja en el alto soporte de los nodos que definen esos clados y en la longitud de las ramas desde su divergencia, así como en la diversificación observada en los análisis filogenéticos. Además, la red de haplotipos muestra que un mayor número de pasos mutacionales (sin haplotipos intermedios) separa a los haplotipos del sur de la distribución del resto (norte y centro). Por lo tanto, se acumularon mutaciones diferentes en cada grupo latitudinal (Figura 2), que a su

vez se encontraban aislados por vicarianza debido a las ingresiones marinas eocénicas y presencia de cuencas interiores en el Mioceno (Acosta et al. 2014).

La datación molecular del árbol filogenético muestra que el linaje Sur se diversificó más tarde que los linajes Norte y Centro. Una hipótesis es que los haplotipos del linaje Norte reflejan edades más antiguas debido a su ubicación en zonas que permanecieron libres de hielo. En consecuencia, estos haplotipos más antiguos se conservaron a lo largo del tiempo; sobre todo, en relación con las oscilaciones climáticas y las glaciaciones ocurridas desde fines del Mioceno (~6 Ma) en múltiples eventos de variada duración e intensidad (Rabassa et al. 2011). Además, se puede plantear que la zona sur estuvo afectada en gran medida por la extensión de los campos de hielo, produciendo incluso la extinción local de haplotipos. Esto evidencia la antigüedad y la complejidad de los eventos evolutivos a lo largo de la latitud, que resultaron en una marcada estructura filogeográfica. Estudios basados en polen fósil y análisis moleculares en base a marcadores hipervariables, permitieron demostrar que especies tolerantes al frío como *N. antarctica* y *N. pumilio* persistieron en refugios múltiples (Premoli et al. 2024) en áreas microclimatológicamente favorables (Markgraf et al. 1995) en distintas latitudes. La supervivencia a lo largo del tiempo habría conservado polimorfismos antiguos como los del cloroplasto. El nuevo haplotipo (H21) encontrado en este estudio para *N. antarctica*, se distribuye exclusivamente en áreas afectadas significativamente por las glaciaciones del Pleistoceno ocurridas en la Patagonia.

## CONCLUSIONES

La divergencia entre linajes de *N. antarctica* concuerda con eventos geológicos antiguos ocurridos en la Patagonia durante el Eoceno y el Mioceno. La divergencia temprana en clados controlados por la latitud indica la presencia de dos unidades evolutivas significativas (ESU) que deben considerarse al

elegir individuos, semillas o esquejes para ser utilizados con fines de restauración, evitando así la mezcla de individuos provenientes de acervos genéticos divergentes. Sin embargo, para estudiar eventos más recientes se deben utilizar marcadores hipervariables como los microsatélites, empleados antes en *N. antarctica* y en otras especies de *Nothofagus* (Vergara et al. 2014; Soliani et al. 2015; Mathiasen et al. 2020). El estudio de la diversidad genética y la historia demográfica de *N. antarctica* revela patrones que son cruciales para entender cómo los cambios en el clima afectaron a estos linajes.

La variabilidad genética observada en diferentes latitudes sugiere que las poblaciones ubicadas hacia el norte y centro de la distribución han estado históricamente mejor adaptadas a cambios ambientales gracias a su mayor diversidad de haplotipos y a la existencia de diversos refugios durante períodos glaciares. Sin embargo, en la zona centro, la disponibilidad de hábitats propicios podrían verse afectados por los cambios en el clima; sobre todo, en zonas hacia los márgenes orientales de distribución —compartidos con *N. pumilio*— debido a la influencia de sequías extremas y al aumento en la frecuencia de incendios (Mathiasen et al. 2021). Comprender la historia evolutiva y la estructura filogeográfica de los linajes de *N. antarctica* es fundamental para implementar estrategias de manejo y restauración, asegurando que se tomen en cuenta las diferencias genéticas y las adaptaciones locales. La investigación continua en este campo es crucial para anticipar y mitigar los efectos del cambio climático en especies como *N. antarctica* y sus ecosistemas asociados.

AGRADECIMIENTOS. A Parques Nacionales por los permisos de colecta. A la Universidad Nacional del Comahue. Al FONCyT proyecto PICT2019-149; al CONICET proyecto PIP-11220200102500CO; y a la UNCo proyecto 04/B235 que brindaron el financiamiento para el desarrollo de este estudio. PM y ACP son miembros del CONICET.

## REFERENCIAS

- Acosta, M. C., and A. C. Premoli. 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, Nothofagaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 31:235-242. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2009.08.008>.
- Acosta, M. C., P. Mathiasen, and A. C. Premoli. 2012. Predominant regeneration strategy results in species-specific genetic patterns in sympatric *Nothofagus* ss congeners (Nothofagaceae). *Australian Journal of Botany* 60(4):319-327. <https://doi.org/10.1071/BT11277>.
- Acosta, M. C., P. Mathiasen, and A. C. Premoli. 2014. Retracing the evolutionary history of *Nothofagus* in its geo-climatic context: new developments in the emerging field of phylogeology. *Geobiology* 12(6):497-510. <https://doi.org/10.1111/>

- gbi.12098.
- Avise, J. C. 1987. Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18:89-522. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.02421>.
- Avise, J. C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press. <https://doi.org/10.2307/j.ctv1nzfgj7>.
- Bandelt, H. J., P. Forster, and A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16:37-48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>.
- Cheng, L., T. R. Connor, J. Sirén, D. M. Aanensen, and J. Corander. 2013. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. *Molecular biology and evolution* 30(5):1224-1228. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst028>.
- Darriba, D., G. L. Taboada, R. Doallo, and D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods* 9(8):772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- Dettmann, M. E., D. T. Pocknall, E. J. Romero, and M. C. Zamalao. 1990. *Nothofagidites* Erdtman ex Potonié 1960: a catalogue of species with notes on the palaeogeographic distribution of *Nothofagus* Bl (southern beech). New Zealand Geological Survey. *Palaeontological Bulletin* 60:1-79.
- Dettmann, M. E., and G. Playford. 1969. *Stratigraphy and palaeontology: essays in honour of Dorothy Hill*. Pp. 174-210 en K. S. W. Campbell (ed.). *Palynology of the Australian Cretaceous: A review*. Canberra, Australia. Australian National University Press.
- Donoso, C. 2006. Las especies arbóreas de los bosques templados de Chile y Argentina. *Autoecología*. 1a. edición. Marisa Cuneo Ediciones. Valdivia, Chile.
- Emerson, B. C., and G. M. Hewitt. 2005. Phylogeography. *Current biology* 15(10):R367-R371. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.016>.
- Fasanella, M., P. Mathiasen, G. Juri, D. G. Díaz, R. Hasbún, and A. C. Premoli. 2023. Ancient vicariance is reinforced by adaptive divergence in the southern beech: Contributions from geogenomics. *Journal of Biogeography* 50(3):564-575. <https://doi.org/10.1111/jbi.14554>.
- Harris, W. K. 1965. Basal Tertiary microfloras from the Princetown Area, Victoria, Australia. *Paleontographica B* 115: 75-106.
- Healey, A., D. J. Lee, A. Furtado, and R. J. Henry. 2018. Evidence of inter-sectional chloroplast capture in *Corymbia* among sections *Torellianae* and *Maculatae*. *Australian Journal of Botany* 66 (5):369-378. <https://doi.org/10.1071/bt18028>.
- Hill, R. S. 1983. *Nothofagus* macrofossils from the Tertiary of Tasmania. *Alcheringa* 7(3):169-183. <https://doi.org/10.1080/03115518308619616>.
- Hill, R.S. 1992. *Nothofagus*: evolution from a southern perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 7(6):190-194. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(92\)90071-I](https://doi.org/10.1016/0169-5347(92)90071-I).
- Hill, R. S. 2001. Biogeography, evolution and palaeoecology of *Nothofagus* (Nothofagaceae): the contribution of the fossil record. *Australian Journal of Botany* 49(3):321-332. <https://doi.org/10.1071/BT00026>.
- Huber, M., and D. Nof. 2006. The ocean circulation in the southern hemisphere and its climatic impacts in the Eocene. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 231:9-28. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2005.07.037>.
- Jordan, G. 1999. A new Early Pleistocene species of *Nothofagus* and the climatic implications of co-occurring *Nothofagus* fossils. *Australian Systematic Botany* 12:757-76. <https://doi.org/10.1071/SB98025>.
- Juri, G., R. R. Ripa, and A. C. Premoli. 2024. Plastomes of *Nothofagus* reflect a shared biogeographic history in Patagonia. *Journal of Heredity* 115(5):588-599. <https://doi.org/10.1093/jhered/esae032>.
- Macphail, M. K. 2007. Australian Palaeoclimates: Cretaceous to Tertiary. A review of palaeobotanical and related evidence to the year 2000. *CRC-LEME* 151:1-279.
- Markgraf, V., M. McGlone, and G. Hope. 1995. Neogene paleoenvironmental and paleoclimatic change in southern temperate ecosystems—a southern perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 10(4):143-147. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(00\)89023-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(00)89023-0).
- Mathiasen, P., and A. C. Premoli. 2010. Out in the cold: genetic variation of *Nothofagus pumilio* (Nothofagaceae) provides evidence for latitudinally distinct evolutionary histories in austral South America. *Molecular Ecology* 19:371-385. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2009.04456.x>.
- Mathiasen, P., A. Venegas-González, P. Fresia, and A. C. Premoli. 2020. A relic of the past: current genetic patterns of the palaeoendemic tree *Nothofagus macrocarpa* were shaped by climatic oscillations in central Chile. *Annals of Botany* 126(5):891-904. <https://doi.org/10.1093/aob/mcaa111>.
- Mathiasen, P., G. Ignazi, and A. C. Premoli. 2021. Biogeographically marginal: Source of evolutionary novelties and future potential. *Forest Ecology and Management* 499(11):1-12. <https://doi.org/10.1016/j.foreco.2021.119596>.
- Miller, K. G., M. A. Kominz, J. V. Browning, J. D. Wright, G. S. Mountain, M. E. Katz, P. J. Sugarman, B. S. Cramer, N. Christie-Blick, and S. F. Pekar. 2005. The Phanerozoic Record of Global Sea-Level Change. *Science* 310:1293-1298. <https://doi.org/10.1126/science.1116412>.
- Müller, K. 2005. SeqState - primer design and sequence statistics for phylogenetic DNA data sets. *Applied Bioinformatics* 4:65-69. <https://doi.org/10.2165/00822942-200504010-00008>.
- Oersted, S. A. 1871. Bidrag til Kundskab om Egefamilien i Nutid og Fortid. *Kongelige Danske Videnskabernes Selskabs Skrifte* 9:31-538. <https://doi.org/10.5962/bhl.title.15275>.

- Peakall, R., and P. E. Smouse. 2012. GenA1Ex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research -an update. *Bioinformatics* 28(19):2537-2539. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>.
- Premoli, A. C. 1997. Genetic variation in a geographically restricted and two widespread species of South American *Nothofagus*. *Journal of Biogeography* 883-892. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2699.1997.00115.x>.
- Premoli, A. C., P. Mathiasen, and T. Kitzberger. 2010. Southern-most *Nothofagus* trees enduring ice ages: genetic evidence and ecological niche retrodiction reveal high latitude (54°S) glacial refugia. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 298:247-256. <https://doi.org/10.1016/j.palaeo.2010.09.030>.
- Premoli, A. C., P. Mathiasen, M. C. Acosta, and V. A. Ramos. 2012. Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus* s.s. How deep can it be? *New Phytologist* 193:261-275. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03861.x>.
- Premoli, A. C., Mathiasen, P., Acosta, M. C., and R. D. McCulloch. 2024. Two sides of the same coin? Transient hybridization in refugia and rapid postglacial ecological divergence ensure the evolutionary persistence of sister *Nothofagus*. *Journal of Evolutionary Biology* 37(10):1181-1193. <https://doi.org/10.1093/jeb/voae100>.
- Rabassa, J., A. M. Coronato, and O. Martinez. 2011. Late Cenozoic glaciations in Patagonia and Tierra del Fuego: an updated review. *Biological Journal of the Linnean Society* 103(2):316-335. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2011.01681.x>.
- Rambaut, A. 2018. FigTree v1.4.4. Edinburgh, Scotland. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. URL: [tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree).
- Rambaut, A., A. J. Drummond, D. Xie, G. Baele, and M. A. Suchard. 2018. Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. *Systematic Biology* 67(5):901-904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>.
- Ramos, V. A. 1982. Las ingresiones pacíficas del Terciario en el Norte de la Patagonia (Argentina). III Congreso Geológico Chileno (Concepción). Actas I. Pp. 262-288.
- Ramírez, C., M. Correa, H. Figueroa, and J. San Martín. 1985. Variación del hábito y hábitat de *Nothofagus antarctica* en el centro sur de Chile. *Bosque* 6:55-73. <https://doi.org/10.4206/bosque.1985.v6n2-01>.
- Romero, E. J. 1986. Fossil evidence regarding the evolution of *Nothofagus blumei*. *Annals Missouri Botanical Garden* 73(2):276-283. <https://doi.org/10.2307/2399113>.
- Romero, E. J. 1973. Polen fósil de *Nothofagus* (*Nothofagidites*) del Cretácico y Paleoceno de Patagonia. *Revista del Museo de la Plata* 7(47):291-303.
- Rozas, J., A. Ferrer-Mata, J. C. Sánchez-DelBarrio, S. Guirao-Rico, P. Librado, S. E. Ramos-Onsins, and A. Sánchez-Gracia. 2017. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets. *Molecular biology and evolution* 34(12):3299-3302. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248>.
- Sauquet, H., S. Y. W. Ho, M. A. Gandolfo, G. J. Jordan, P. Wilf, D. J. Cantrill, M. J. Bayly, L. Bromham, et al. 2012. Testing the impact of calibration on molecular divergence times using a fossil-rich group: The case of *Nothofagus* (Fagales). *Systematic Biology* 61(2):289-313. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syr116>.
- Soliani, C., Y. Tsuda, F. Bagnoli, L. A. Gallo, G. G. Vendramin, and P. Marchelli. 2015. Halfway encounters: Meeting points of colonization routes among the southern beeches *Nothofagus pumilio* and *N. antarctica*. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 85:197-207. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.01.006>.
- Soltis, D. E., M. A. Gitzendanner, D. D. Streng, and P. S. Soltis. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Systematics and Evolution* 206(1):353-373. <https://doi.org/10.1007/BF00987957>.
- Steinke, L. R., A. C. Premoli, C. P. Souto, and M. Hedrén. 2008. Adaptive and neutral variation of the resprouter *Nothofagus antarctica* growing in distinct habitats in north-western Patagonia. *Silva Fennica* 42(2):177-188. <https://doi.org/10.14214/sf.251>.
- Stover, L. E., and A. D. Partridge. 1973. Tertiary and Late Cretaceous spores and pollen from the Gippsland Basin, southeastern Australia. *Proceedings of The Royal Society of Victoria* 85(2):237-286.
- Suchard, M. A., P. Lemey, G. Baele, D. L. Ayres, A. J. Drummond, and A. Rambaut. 2018. Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. *Virus Evolution* 4(1):vey016. <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>.
- Tamura, K., G. Stecher, and S. Kumar. 2021. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular Biology and Evolution* 38(7):3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>.
- Tonkin-Hill, G., J. A. Lees, S. D. Bentley, S. D. Frost, and J. Corander. 2018. RhierBAPS: an R implementation of the population clustering algorithm hierBAPS. *Wellcome Open Research* 3:93. <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.14694.1>.
- Upchurch, P. 2008. Gondwana break-up: legacies of a lost world? *Trends in Ecology and Evolution* 23:229-236. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.11.006>.
- Vento, B., F. Agrain, and G. Puebla. 2024. Ancient Antarctica: the early evolutionary history of *Nothofagus*. *Historical Biology* 36(1):136-146. <https://doi.org/10.1080/08912963.2022.2150549>.
- Vergara, R., M. A. Gitzendanner, D. E. Soltis, and P. S. Soltis. 2014. Population genetic structure, genetic diversity, and natural history of the South American species of *Nothofagus* subgenus *Lophozonia* (Nothofagaceae) inferred from nuclear microsatellite data. *Ecology and Evolution* 4:2450-2471. <https://doi.org/10.1002/ece3.1108>.
- Yang, Y. Y., X. J. Qu, R. Zhang, G. W. Stull, and T. S. Yi. 2021. Plastid phylogenomic analyses of Fagales reveal signatures of conflict and ancient chloroplast capture. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 163:107232. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2021.107232>.