

Universidad Nacional de Córdoba

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

**Estudio Poblacional y Filogenético en *Munroa* (Poaceae, Chloridoideae)**

---

**Lic. Leonardo David Amarilla**

**Tesis para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas**

Directora: Dra. Ana M. Anton

Co-Director: Dr. Jorge O. Chiapella

Asesora de Tesis: Dra. Victoria Sosa

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal

CONICET-UNC

Córdoba, Argentina

2014

**Comisión Asesora de Tesis**

Dra. Ana M. Anton, IMBIV, Córdoba.

Dra. Noemí Gardenal, IDEA, Córdoba.

Dra. Liliana Giussani, IBODA, Buenos Aires.

**Defensa Oral y Pública**

Lugar y Fecha:

Calificación:

**Tribunal evaluador de Tesis**

Firma..... Aclaración.....

Firma..... Aclaración.....

Firma..... Aclaración.....

*“Tengamos ideales elevados y pensemos en alcanzar grandes cosas,  
porque como la vida rebaja siempre y no se logra sino una parte de lo que  
se ansía, soñando muy alto alcanzaremos mucho más”*

Bernardo Alberto Houssay

*A mis padres y hermanas*

Quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mis directores de tesis, la Dra. Ana M. Anton y el Dr. Jorge O. Chiapella, por todo lo que me enseñaron en cuanto a sistemática y taxonomía de gramíneas, por sus consejos, acompañamiento y dedicación. De la misma manera, quiero agradecer a la Dra. Victoria Sosa (INECOL A.C., Veracruz, Xalapa, México) por su acompañamiento y por todo lo que me enseñó en cuando a filogeografía y genética de poblaciones.

Además quiero agradecer...

A mis compañeros de trabajo: Nicolás Nagahama, Raquel Scrivanti, Federico Robbiati, Lucia Castello, Jimena Nores, Marcelo Gritti.

A los curadores y equipo técnico del Museo Botánico de Córdoba.

A la Dra. Reneé Fortunato.

A la Dra. Marcela M. Manifesto.

A la Dra. Andrea Puebla y equipo de trabajo.

A todas las personas que contribuyeron directa o indirectamente a esta tesis: Alejandra Romanutti, Diego Angulo, Leonardo Galetto, Martina Vaz Torres, Luciana Caeiro.

A directivos y personal administrativo y técnico del IMBIV.

A las entidades financieras: CONICET, UNC, MINCyT, Red Latinoamericana de Botánica-The Andrew W. Mellon Foundation, CONACyT (México) y Myndel Botanica Foundation

A mis eternos profesores: la Dra. Lourdes Hirt y el Dr. Aníbal Amat.

A mis hermanos por elección: Gisela Castro, Santiago Benzso, Cristian de Candia, Leandro Gutiérrez y Sergio Villordo.

A los amigos: María Kolman, Juan Urdampilleta, Gabriel Grilli, Ezequiel Saraceno, Laura Stiefkens, Silvana Monteverde, Lucia Acuña, Lorena Poelstra.

Finalmente, quiero agradecer a mi familia...

Natalia, compañera de vida e incondicional sostén.

Mis padres, por la vida y la libertad.

Alicia, por la entrega y por ser mi modelo de fortaleza.

Évelyn, por las alegrías y por ser el motor de mis fuerzas.

---

|   |     |
|---|-----|
| <b>Índice</b> .....   | i   |
| <b>Resumen</b> .....  | ii  |
| <b>Abstract</b> .....   | v   |
| <b>Introducción</b> .....   | 1   |
| <b>Capítulo I: Estudios filogenéticos, cromosómicos y morfológicos en <i>Munroa</i></b> . 13                    |     |
| Antecedentes.....   | 14  |
| Materiales y Métodos.....   | 20  |
| Resultados.....   | 31  |
| Discusión.....  | 39  |
| Conclusiones.....   | 44  |
| <b>Capítulo II: Estudios evolutivos y de biogeografía histórica en <i>Munroa</i></b> .....                      | 51  |
| Antecedentes.....   | 52  |
| Materiales y Métodos.....   | 56  |
| Resultados.....   | 60  |
| Discusión.....  | 64  |
| Conclusiones.....   | 72  |
| <b>Capítulo III: Estudios filogeográficos y de modelado de nicho ecológico en <i>Munroa argentina</i></b> ..... | 74  |
| Antecedentes.....   | 75  |
| Materiales y Métodos.....   | 79  |
| Resultados.....   | 88  |
| Discusión.....  | 101 |
| Conclusiones.....   | 108 |
| <b>Conclusiones generales</b> .....   | 110 |
| <b>Anexos</b> .....   | 114 |
| <b>Bibliografía</b> .....   | 133 |

## Resumen

*Munroa* comprende cinco especies de distribución disyunta en las regiones áridas y semiáridas de las Américas. *Dasyochloa* es un género monotípico común en el oeste de Norteamérica y afín a *Munroa*. La evaluación de los límites genéricos entre *Munroa* y *Dasyochloa* mediante el análisis conjunto de evidencia molecular, citológica y morfológica indicó la pertenencia de *D. pulchella* en *Munroa* y la transferencia incluyó la nueva combinación *Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla. *Munroa*. Este género con dos taxones son norteamericanos (*M. pulchella*, *M. squarrosa*) y cuatro son sudamericanos (*M. andina*, *M. argentina*, *M. decumbens*, *M. mendocina*) forma un clado con dos sinapomorfías morfológicas y todas sus especies son diploides ( $x = 8$ ). *M. pulchella* es el taxón hermano del resto de las especies y ni los taxones norteamericanos ni los sudamericanos resultaron en grupos monofiléticos. *Munroa* se habría comenzado a diversificar hace aprox. 7 millones de años (Ma) en América del Norte. Los estudios de evolución morfológica sugieren que los cambios en atributos tales como el hábito, la sexualidad, la desarticulación de la raquilla y la forma y textura de las glumas, han sido importantes para que estos taxones se dispersaran y establecieran en nuevas áreas. Para explicar su distribución disyunta proponemos dos eventos de dispersión a larga distancia; uno de América del Norte hacia América del Sur, seguido por un segundo en dirección opuesta. El establecimiento y diversificación de *Munroa* en Sudamérica posiblemente fue favorecida por los eventos orogénicos del Mioceno y del Plioceno, como así también por las oscilaciones climáticas del Pleistoceno. En Sudamérica, las especies de *Munroa* son anuales y

crecen en la Zona de Transición Sudamericana (*South American Transition Zone*, SATZ) en tres provincias biogeográficas: la Puna, la Prepuna y el Monte. Se seleccionó a *M. argentina* para explorar acerca de las fuerzas evolutivas que modelan la distribución de sus poblaciones en esta zona. Los estudios filogeográficos recuperan tres haplogrupos (PAB, PrA, MA) que se distribuyen principalmente en cada una de las provincias biogeográficas. Los haplogrupos habitarían la SATZ desde hace aprox. 4 Ma y los estudios de paleomodelado mostraron que, en la actualidad, la distribución “potencial” de *M. argentina* es mayor a la distribución “real”; así mismo estimaron condiciones climáticas favorables en estas áreas durante el Periodo Interglaciario y el Último Máximo Glacial. Las poblaciones de *M. argentina* habrían experimentado, tempranamente un fuerte aislamiento genético debido a barreras intrínsecas como el tiempo de floración, asociadas al gradiente altitudinal y latitudinal en el que habitan. Este aislamiento genético se refleja en una profunda estructura filogeográfica cuyas poblaciones, sin embargo, son morfológica y cromosómicamente indistinguibles, lo que nos lleva a pensar que *M. argentina* ofrece otro ejemplo de especiación críptica.

**Abstract**

*Munroa* comprises five species of disjunct distribution in arid and semi-arid regions of the Americas and *Dasyochloa*, is a monotypic genera common in western North America. The evaluation of generic boundaries between *Dasyochloa* and *Munroa* through phylogenetic analyzes, and morphological and cytological studies showed unequivocally that *D. pulchella* belongs in *Munroa*, and the transference included the new combination *Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla. *Munroa* is a monophyletic group and all species are diploid ( $x = 8$ ) *Munroa* comprises two North American taxa (*M. pulchella*, *M. squarrosa*) and four South American taxa (*M. andina*, *M. argentina*, *M. decumbens*, *M. mendocina*). *M. pulchella* is the sister taxon of the rest species and no taxa occurring in North or South America resulted in monophyletic groups. The crown group of *Munroa* diversified about 7 Ma ago in North America and studies on the evolution morphological traits suggested that changes in attributes such as habit, the the sexuality, the disarticulation of the rachilla, and the shape and texture of the glumes, have been important for these taxa to disperse and colonize new areas. Two events of long-distance dispersal are needed to explain the current distribution, one of North America to South America, followed by a second in the opposite direction. The arrival and establishment of *Munroa* in South America was possibly favored by the orogenetic events of Miocene and Pliocene, such as the climatic oscillations of the Pleistocene. In South America, the species of *Munroa* are annuals and grow in the South American Transition Zone (SATZ) in three biogeographic provinces: the Puna, the Prepuna and Monte. To explore about the

evolutionary forces affecting gene flow and the distribution of their populations in this zone, phylogeographic, population and ecological niche modeling studies were carried out in a species carefully selected of *Munroa*: *M. argentina*. Phylogeographic studies recovered three haplogroups (populations) whose distribution corresponds to the previously identified biogeographic provinces and indicated that these populations inhabit the SATZ about 4 Ma ago. Ecological niche modeling showed favorable climatic conditions in these areas during the Interglacial Period and the Last Maximum Glacial, and currently showing that the "potential" distribution of *M. argentina* is greater than the "real" distribution. *M. argentina* have undergone genetic isolation due to intrinsic barriers such as flowering time. Moreover, our analyses detected a deep intraspecific phylogeographic structure with three major clades. The populations, however, are morphologically and chromosomally indistinguishable, leading us to conclude that *M. argentina* offers another example of cryptic speciation.

## **Introducción**

Las gramíneas (Poaceae) constituyen la quinta familia más diversa dentro de las angiospermas, con aproximadamente 800 géneros y 10.000 especies (Clayton & Renvoize, 1986; Watson & Dallwitz, 1992) y se caracterizan principalmente por tener una fuerte dominancia ecológica, cubriendo aproximadamente un quinto de la superficie del planeta (Shantz, 1954; Bremer, 2002). Las gramíneas son componentes relevantes en variados ecosistemas, ya que juegan un papel importante en la colonización primaria, la provisión de alimentos y como refugio para una amplia variedad de animales (Stebbins, 1974; APG II, 2003, APG III, 2009). Además, no sólo han alcanzado el clímax en la evolución de las plantas con flores, sino que también constituyen la familia de mayor provecho para el hombre, especialmente desde el punto de vista económico (Clayton & Renvoize, 1986; Watson, 1990; Bremer, 2002; Duvall & al., 2007).

La vasta diversidad de la familia, hace de ésta un linaje complejo e interesante para desarrollar estudios evolutivos y ecológicos. En la línea de los estudios evolutivos Poaceae ha sido recuperada como monofilético en numerosos estudios (Linder & Kellogg, 1995; Chase & al, 2000; Bremer, 2002; Davis & al., 2004; Duvall & al., 2007; Givnish & al., 2010) y se caracteriza por la presencia de atributos únicos en la estructura del embrión, del fruto y del polen. El embrión de las gramíneas se encuentra altamente diferenciado, presentando meristemas del ápice y de la radícula, hojas y un sistema vascular bien desarrollado (Kellogg & Linder, 1995; Kellogg, 2000). El fruto (*cariopsis*) es también único, con el tegumento (pericarpio) en general, fusionado a la pared del ovario (Kellogg, 2000). El polen, cómo es típico en todo el orden Poales, es uniaperturado; no obstante la pared del grano de polen se caracteriza por haber perdido los polos (que son

comunes en Restionaceae, Anarthriaceae, Flagellariaceae y Joinvilleaceae) y por presentar canales internos en la cubierta de exina (Linder & Ferguson, 1985). Todos los taxones, a excepción del linaje más basal de Poaceae (Anomochlooideae), poseen flores en inflorescencias reducidas llamadas espiguillas (Kellogg, 2000). Una espiguilla típica consiste en una serie de brácteas dísticas, en donde las dos brácteas basales (glumas) se hallan vacías, mientras que una o más brácteas distales (lemmas) subtienden cada una un eje floral contraído sobre el que nace la pálea, dos a tres lodículas, el androceo y el gineceo (Arber, 1934; Connor, 1981; Soreng & Davis, 1998; Peterson & Kellogg, 2007; Givnish & al., 2010).

Poaceae incluye a 13 subfamilias y entre ellas Anomochlooideae, Pharoideae y Puelioideae han sido identificadas como los linajes de divergencia más temprana (Duvall & al., 2007; Bouchenak-Kelladi & al., 2008, 2010; Givnish & al., 2010). El resto de los pastos actuales se incluyen en dos linajes distintivos, el clado PACCMAD, el cual incluye a las subfamilias Panicoideae, Arundinoideae, Chloridoideae, Centothecoideae, Micraroideae, Aristoideae y Danthonioideae y el clado BEP, el cual incluye a Bambusoideae, Ehrhartoideae y Pooideae (GPWG, 2001; Bouchenak-Kelladi & al., 2008). Los registros fósiles tradicionales parecen ubicar al origen de las gramíneas en el Cretácico tardío (Clayton 1981; Crepet, 2008; Bouchenak-Kelladi & al., 2010), y al ancestro de los grupos modernos (PACCMAD/BEP) entre el Paleoceno/Eoceno (Crepet & Feldman, 1991; Bouchenak-Kelladi & al., 2010). Sin embargo, el registro fósil muestra que los pastos no se volvieron ecológicamente dominantes hasta el Mioceno temprano, con la aparición de los ecosistemas modernos y abiertos dominados por gramíneas, como las sabanas (Strömberg & al., 2007; Christin & al., 2008, 2009;

Strömberg, 2011).

Dentro del clado PACCMAD, la subfamilia Chloridoideae actualmente presenta 140 géneros y aproximadamente 1.420 especies en todo el mundo (Watson & Dallwitz, 1992; Peterson & al., 2010). Se caracteriza por presentar cariopsis con hilo no lineal (punctiformes o pequeños), embriones con entrenudos del mesocótilo alargados, dos lodículas no membranáceas (carnosas), micropelos bicelulares tipo chloridoideo (célula terminal ancha y corta, del mismo grosor que la célula basal) y número cromosómico básico  $x = 10$ . Las hojas presentan anatomía Kranz o  $C_4$  y dos subtipos principales de metabolismo están presentes: NAD-ME (nicotinamida adenina dinucleótido co-factor de la enzima málica) y PCK (fosfoenolpiruvato carboxiquinasa) (Gutiérrez & al., 1974; Brown, 1977; Hattersley & Watson, 1992; Soreng & Davis, 1998;). Chloridoideae resultó monofilético en los análisis moleculares desarrollados hasta la fecha (p. ej., Soreng & Davis, 1998; Hsiao & al., 1999; Hilu & Alice, 2001; Columbus & al., 2007; Soreng & al., 2009; Peterson & al., 2007, 2010), presenta cuatro tribus (Cynodonteae, Zoysieae, Eragrostideae y Triraphideae; Peterson & al., 2010) y habría diversificado hace 30 millones de años (Ma), en el Oligoceno (Christin & al., 2009; Bouchenak-Kelladi & al., 2010).

Chloridoideae en general y Cynodonteae en particular, se caracterizan por tener un gran número de homoplasias morfológicas (Columbus & al., 2007; Peterson & al., 2010). Cynodonteae es la tribu más derivada dentro de Chloridoideae, muestra un amplio rango de variación morfológica y en ella actualmente se reconocen 13 subtribus: Aeluropodinae, Boutelouinae, Eleusininae, Tridentinae, Hilariinae, Monanthochloinae, Muhlenbergiinae, Scleropogoninae, Orcuttiinae, Pappophorinae, Traginae, Triodiinae y Tripogoninae (Peterson & al., 2010).

---

Scleropogoninae ( $x = 7, 8, 10$ ), con un gran número de homoplasias morfológicas (Columbus & al., 2007; Peterson & al., 2010), incluye seis géneros: *Scleropogon* Phil., *Swallenia* Soderstr. & H.F. Decker, *Erioneuron* Nash, *Blepharidachne* Hack., *Dasyochloa* Willd. ex Rydb. y *Munroa* Torr. (Peterson & al., 2010).

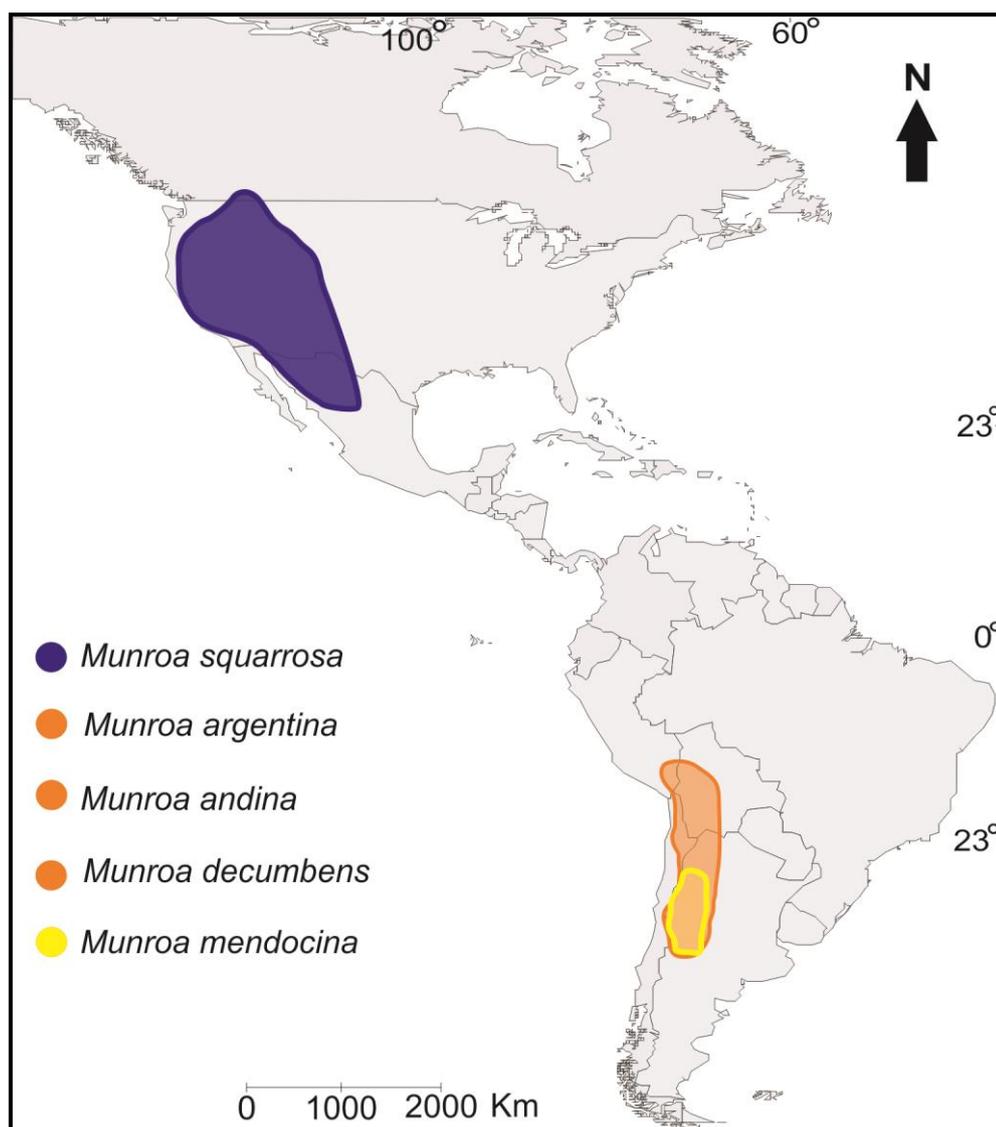
*Munroa* es un género disyunto (Figura 1) que comprende cinco especies americanas (Figura 2) (Anton & Hunziker, 1978): *M. squarrosa* (Nutt.) Torr. en el oeste de EE.UU. y noroeste de México, y *M. andina* Phil., *M. decumbens* Phil., *M. mendocina* Phil. y *M. argentina* Griseb. en el sudoeste de Sudamérica. Anton & Hunziker (1978), al estudiar morfológicamente al género, dividieron a *Munroa* en tres secciones: la sección *Munroa* es monoespecífica y contiene a *M. squarrosa*; *Hemimunroa* (Parodi) Anton & Hunz., incluye a *M. andina* y *M. decumbens* y *Apelytron* (Parodi) Anton & Hunz., a *M. argentina* y *M. mendocina*. Parodi (1934) notó afinidades exo-morfológicas entre *Dasyochloa* (género monotípico norteamericano) y *Munroa*; posteriormente Sánchez (1983, 1984), al desarrollar estudios anatómicos en *Erioneuron*, *Dasyochloa* y *Munroa*, encontró afinidades entre *Dasyochloa* y *Munroa*. Peterson & al. (2010), al estudiar a las Chloridoideae encontraron que *Dasyochloa pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb. es taxón hermano de *Munroa andina* y *M. argentina*. Por último, cabe señalar que a la fecha no se ha verificado la monofilia de *Munroa*, y no se han evaluado las relaciones filogenéticas entre todas sus especies ni de éstas con *D. pulchella*.

América del Sur es una región de topografía compleja, y aunque el levantamiento de los Andes fue uno de los acontecimientos más importantes que han contribuido a las diferencias en los patrones de biodiversidad, el cambio climático, las glaciaciones, la existencia de antiguas cuencas y los cambios costeros resultantes de transgresiones marinas también han tenido un fuerte

impacto en esta área, creando escenarios complejos para la diversificación y distribución de las especies (Antonelli & Sanmartin, 2011; Folguera & al., 2011; Guerrero & al., 2013; Turchetto-Zolet & al., 2013). Por lo tanto, es necesario seguir investigando la historia evolutiva de la biota sudamericana para evaluar la forma en que respondieron a los cambios orogénicos y climáticos del pasado, para comprender cómo se adaptaron a las condiciones actuales (Guerrero & al., 2013; Turchetto-Zolet & al., 2013) y por qué no, para especular sobre posibles respuestas a cambios futuros.

De acuerdo a la clasificación de Raven (1963) y Wen & Ickert-Bond (2009), *Munroa* constituye un claro ejemplo de distribución anfitropical disyunta desértica. Las causas de esta distribución en las Américas se debatió durante los últimos doscientos años y se debate en la actualidad (p. ej., Bray, 1898; Johnston, 1940; Raven, 1963; Solbrig, 1972; Allred 1981; Carlquist, 1983; Peterson & Columbus, 1997; Wen & Ickert-Bond, 2009; Escudero & al., 2010; Jakob & al., 2010; Popp & al., 2011; Moore, & al., 2012; González & al., 2014). Raven (1963) concluyó que la distribución disyunta desértica se habría originado en Sudamérica, arribando a Norte América a través de dispersión a larga distancia; Wen & Ickert-Bond (2009) indicaron que el 65 % de las disyunciones anfitropicales se habrían generado por dispersión a larga distancia en sentido Norte-Sur y los estudios realizados en Poaceae revelaron patrones opuestos (Peterson & Columbus, 1997; Peterson & Morrone, 1997; Peterson & Ortiz-Díaz, 1998).

Actualmente, las hipótesis de vicarianza, evolución paralela y dispersión a larga distancia están siendo testeadas para explicar la distribución disyunta de la flora en las Américas y el mundo (Wen & Ickert-Bond 2009; Escudero & al., 2010; Jakob & al., 2010; Popp & al., 2011; Moore, & al., 2012; González & al., 2014).



**Figura 1:** El mapa muestra la distribución disyunta entre Norte y Sudamérica de las especies de *Munroa*.

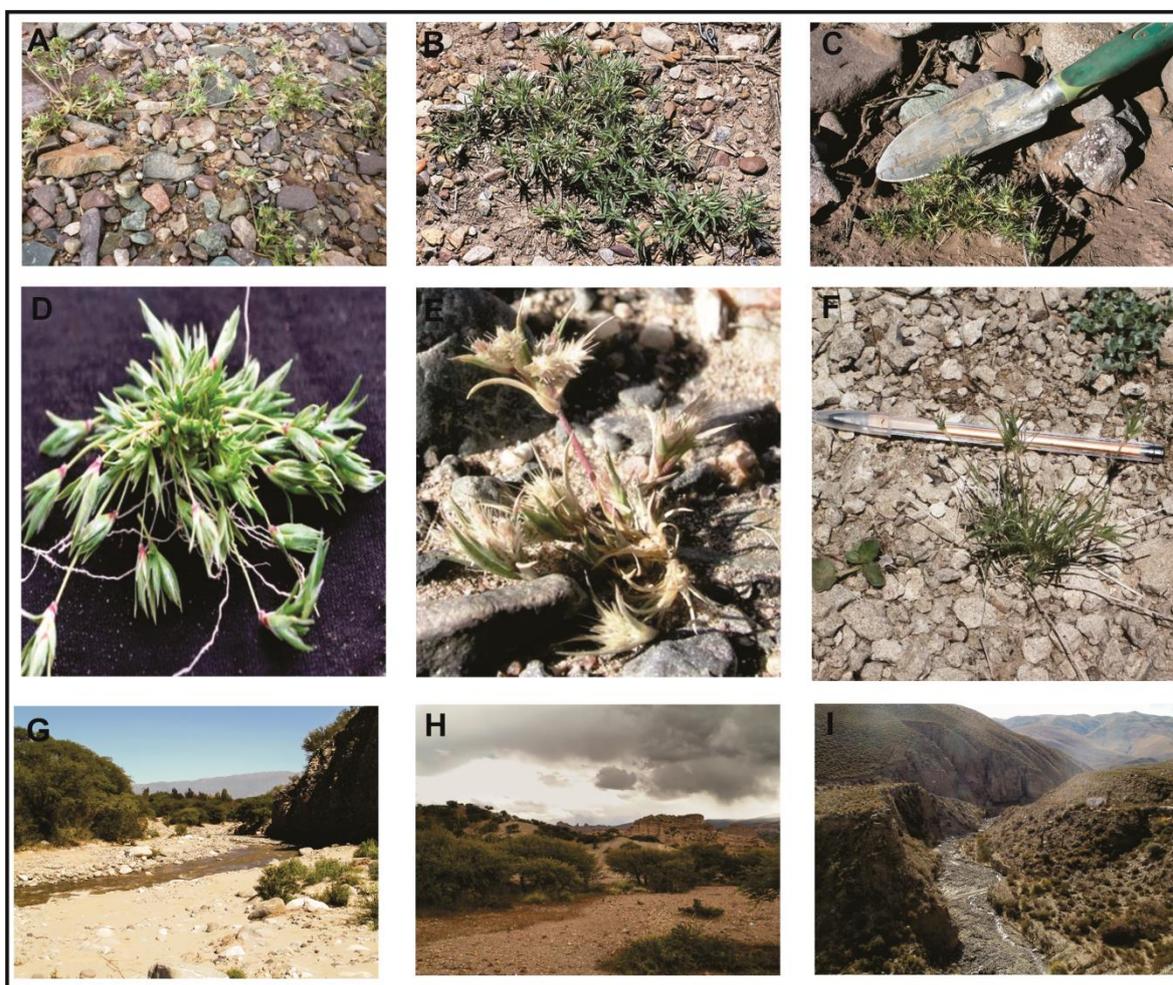
Las plantas sudamericanas que presentan disyunción anfitropical desértica, habitan en tierras áridas y semiáridas al norte y en el centro de la Zona de Transición Sudamericana (SATZ, por sus siglas del inglés *South American Transition Zone*) (Morrone, 2006), una región estrecha con escasas precipitaciones (menos de 300 mm/año) y que comprende a seis provincias biogeográficas; Páramo Norandino, Puna, Costa del Desierto Peruano, Atacama, Prepuna y Monte (Morrone, 2006). La zona de transición reconocida en América del Sur, con composiciones bióticas únicas, aun representa un área pendiente de

estudios, debido a que la interacción de los diferentes componentes bióticos y abióticos ha proporcionado las condiciones, dando lugar a nuevos nichos para la diversificación biótica e interacciones ecológicas interesantes (Morrone, 2006; Guerrero & al., 2013). El levantamiento de los Andes en el Neógeno tuvo un profundo impacto en la historia de América del Sur; las elevaciones más importantes se produjeron durante el Mioceno medio hace 12 Ma de años y al comienzo del Plioceno hace cinco Ma (Ramos & Ghiglione, 2008). Estos fenómenos geológicos que, entre otras cosas, produjeron sombras de lluvia, han afectado en gran medida el clima y la ecología de América del Sur (Le Quesne & al., 2008; Hoorn & al., 2010), incluyendo la formación de la Zona de Transición Sudamericana, allí donde viven las especies sudamericanas de *Munroa*.

Las últimas oscilaciones climáticas del Neógeno y del Cuaternario, con la participación de varios ciclos de glaciación de la edad de hielo, han influido en la distribución de los organismos y de las comunidades en la tierra, y aunque la aridificación de la SATZ ocurrió principalmente durante el Plioceno, las fluctuaciones climáticas durante el Pleistoceno también contribuyeron a la expansión de las regiones áridas y semiáridas en Sudamérica (Viruel & al., 2012; Guerrero & al., 2013). Estos cambios ambientales afectaron sustancialmente la distribución de las especies y los procesos microevolutivos a nivel intra-específico (Guerrero & al., 2013).

Estudios filogenéticos recientes en diversos grupos de plantas y animales han demostrado que el levantamiento de los Andes actuó y actúa como una ruta de dispersión de los linajes y como piloto en la promoción de la diversificación rápida, esto último a través de la especiación alopátrica, la fragmentación del hábitat, o el desplazamiento ecológico (Antonelli & al., 2009; Jakob & al., 2010; Antonelli &

Sanmartin 2011; Guerrero & al., 2013; González & al., 2014). Resulta interesante conocer la evolución espacio-temporal de las especies y poblaciones de las gramíneas que viven en tierras áridas y semiáridas de las Américas, para conocer los factores intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (acontecimientos ecológicos e históricos) que favorecieron la diversificación de los linajes y que dieron forma a la distribución de la flora en estas tierras y poder así, discutirlos en un contexto evolutivo y de conservación.



**Figura 2:** A. *M. argentina* (gentileza Vanesa Pilatti), B. *M. squarrosa*, C. *M. mendocina*, D. *M. andina* (foto IBODA), E. *M. decumbens* y F. *D. pulchella*. G, H e I, ambientes típicos de *Munroa* en Sudamérica (foto B, C, E, F, G, H e I, Leonardo Amarilla). Diseño de figura, gentileza Marcelo Gritti.

Con bases en el marco teórico presentado anteriormente, una serie de preguntas generales han provocado y estructurado este trabajo de tesis, entre ellas;

✓ ¿Es monofilético el género *Munroa*?, ¿Cuál es la relación filogenética entre las especies de *Munroa* y de éstas con *D. pulchella*?

✓ ¿Cuándo se produjo la diversificación de *Munroa* y cómo se originó el patrón de distribución de sus especies?

✓ ¿Qué mecanismos genéticos y/o factores ecológicos e históricos habrían favorecido la diversificación y distribución de sus especies en Sudamérica?

A modo de Hipótesis, anticipo que *Munroa* y *Dasyochloa* constituyen un grupo monofilético, que *Dasyochloa* no debe mantenerse como género independiente, que la diversificación de *Munroa* tuvo lugar a partir del Mioceno medio-tardío y que la distribución actual de sus especies se produjo por dispersión a larga distancia. Por último, pienso que los eventos orogénicos del Neógeno y las oscilaciones climáticas del Plioceno y del Pleistoceno fueron las principales fuerzas que impulsaron la diversificación de estas gramíneas en las zonas áridas y semiáridas de Sudamérica.

Para responder a estas preguntas y poner a prueba las hipótesis me propuse los siguientes **objetivos generales**:

I. Evaluar las relaciones filogenéticas y fenéticas entre las especies de *Munroa* y de éstas con *Dasyochloa* utilizando evidencia molecular, citológica y morfológica.

II. Estimar el tiempo de divergencia entre las especies de *Munroa* y *Dasyochloa* para reconstruir las posibles áreas geográficas ancestrales y evaluar la evolución de los caracteres morfológicos asociados con los

principales síndromes de dispersión.

**III.** Evaluar la estructura y diversidad genética de *Munroa argentina* y desarrollar estudios de paleo distribución y de distribución actual; para dilucidar las fuerzas evolutivas que modelaron la distribución de sus polimorfismos y para detectar posibles relaciones entre, la estructura genética y los eventos de cambio climáticos del pasado y del presente.

Este trabajo de tesis está organizado en una Introducción, tres Capítulos y Conclusiones Generales. Cada capítulo es independiente, con sus correspondientes secciones: Antecedentes, Materiales y Métodos, Discusión y Conclusiones. En el **Capítulo I**, que se denomina **Estudios filogenéticos, cromosómicos y morfológicos en *Munroa***, se estudian la relación filogenética de *Munroa* con el resto de los Scleropogoninae, para poner a prueba su monofilia y evaluar las relaciones de ancestría entre sus especies y de éstas con *Dasyochloa*. Además se analizan las afinidades citológicas y morfológicas entre ellas, para discutir los esquemas taxonómicos actuales. En el **Capítulo II**, **Estudios evolutivos y de biogeografía histórica en *Munroa***, se estiman los tiempos de divergencia entre sus especies y se reconstruyen los cambios de áreas ancestrales para poner a prueba las hipótesis de vicarianza, evolución paralela y dispersión; adicionalmente se reconstruyen cambios morfológicos ancestrales para evaluar asociaciones con posibles eventos de dispersión. En el **Capítulo III**, **Estudios filogeográficos y de modelado de nicho ecológico en *M. argentina***, se evalúan las relaciones entre estructura genética y distribución geográfica en *M. argentina*, para evaluar las fuerzas evolutivas que modelaron la distribución de sus polimorfismos y poner a prueba la hipótesis de fragmentación histórica de hábitat y su posible implicancia en algunos fenómenos de especiación.

De esta manera, este trabajo pretende aportar tanto nuevas evidencias de la evolución de las gramíneas disyuntas en las Américas, como conocimientos sobre los mecanismos intrínsecos (genéticos) y extrínsecos (orogénicos, climáticos y paleo climáticos) que modelaron y modelan la distribución de las especies y poblaciones en tierras áridas y semiáridas de Sudamérica.

## Capítulo I

### Estudios filogenéticos, cromosómicos y morfológicos en *Munroa*

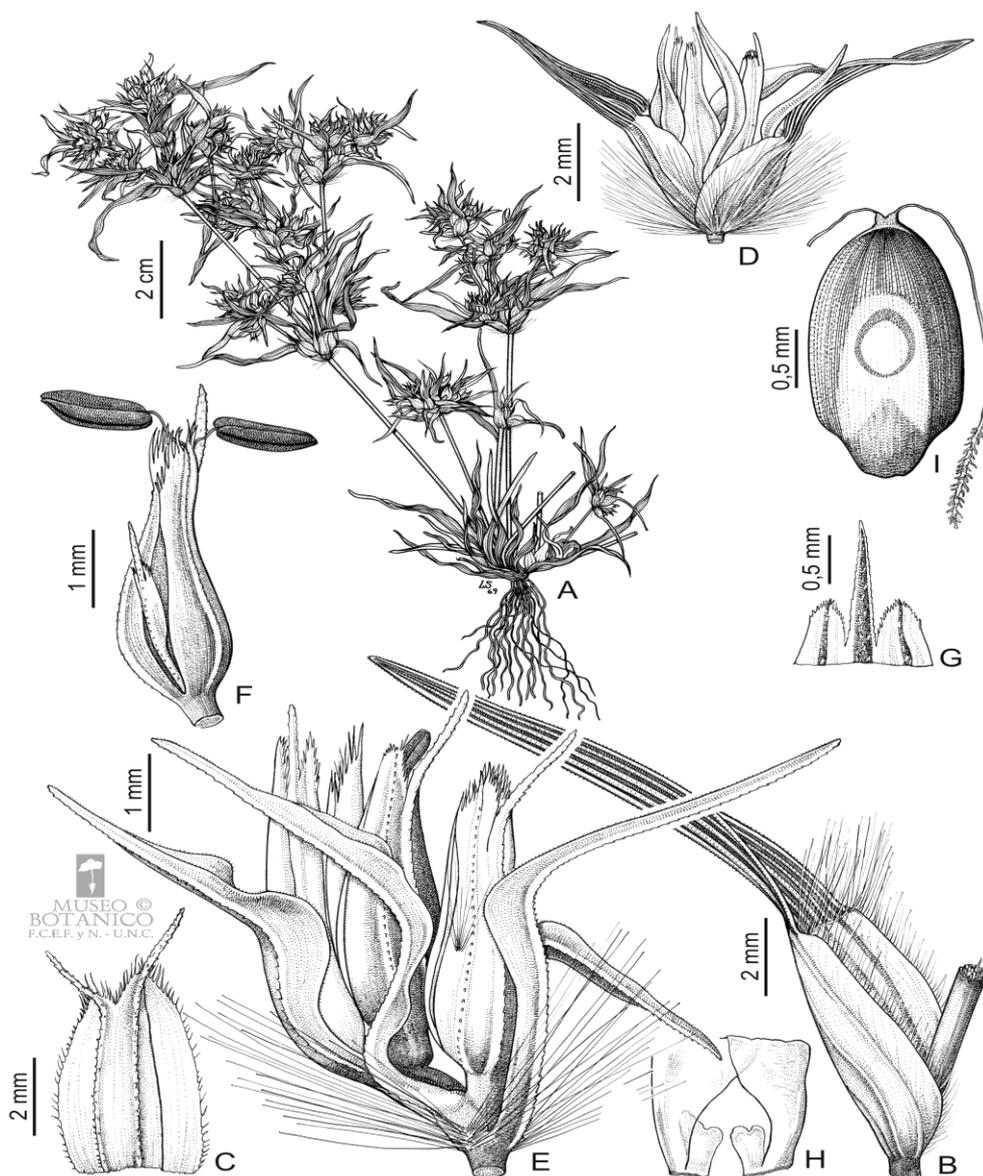
## Antecedentes

*Munroa* Torr. fue descrito por J. Torrey (1857) en base a *Crypsis squarrosa* Nutt. [=*M. squarrosa* (Nutt.) Torr.]. El botánico chileno R. A. Philippi, en 1870, describió el primero taxón sudamericano: *M. mendocina*. Posteriormente Grisebach, en 1879, describió *M. argentina* y finalmente en 1891 Philippi describió otras dos especies: *M. andina* y *M. decumbens*, con lo que el género llegó a comprender cinco taxones. *Munroa* posee distribución disyunta desértica en zonas templadas y semidesérticas de América, en el Hemisferio Norte, en Canadá, Estados Unidos y México y hacia el Hemisferio Sur, en la Argentina, Bolivia, Chile y Perú. Las especies habitan lugares secos con terrenos areno-pedregosos, en ambientes abiertos y montanos a partir de los 1.000 y hasta los 4.200 m s.n.m.

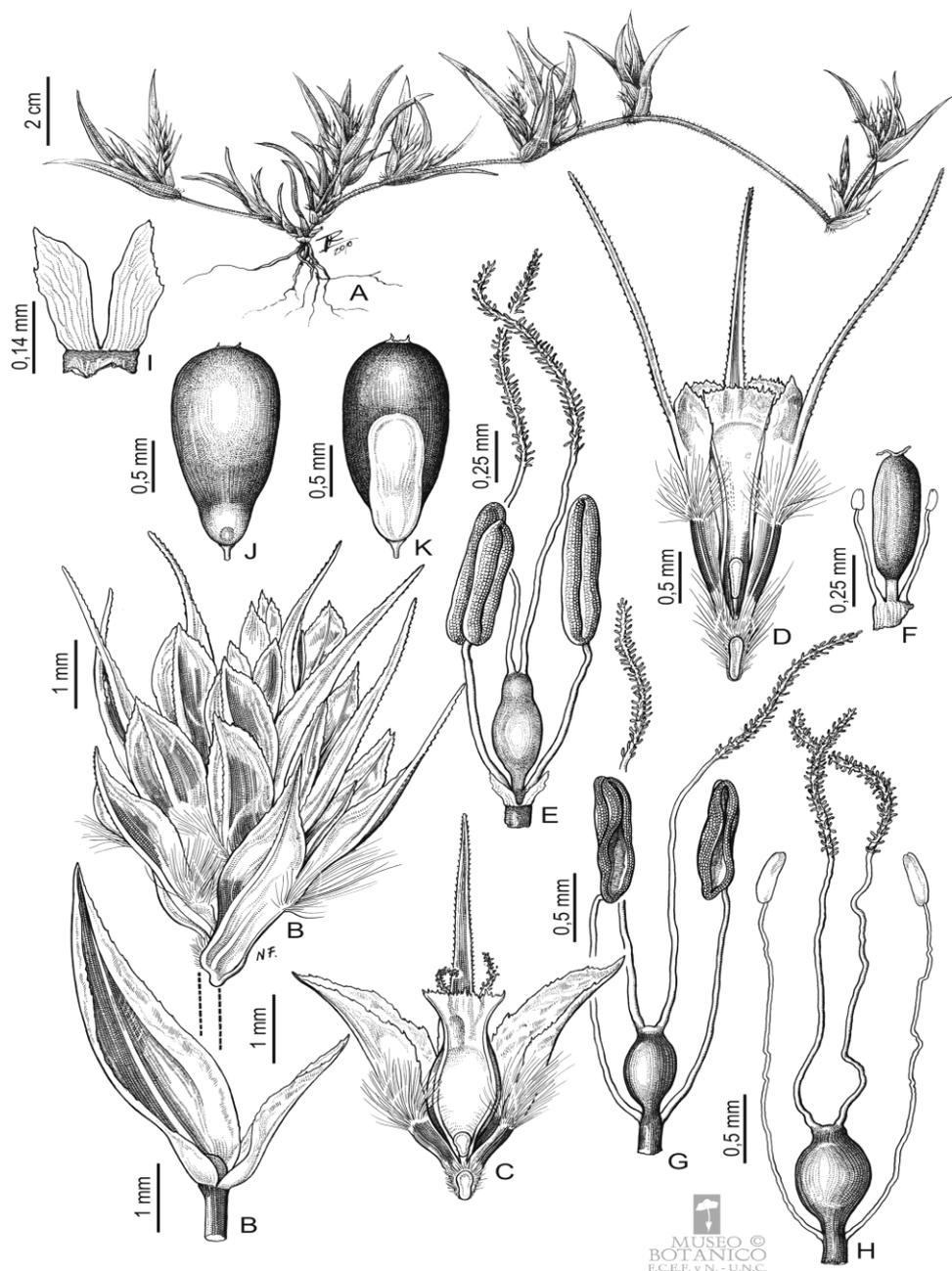
Las especies de *Munroa* son anuales y pueden ser ginomonoicas o monoicas, sus cañas presentan crecimiento heteroblástico (entrenudos largos seguidos por otros más cortos, sobre los que se insertan hojas en cuyas axilas se encierran las inflorescencias); las inflorescencias están protegidas por pseudoverticilos foliares y formadas por espiguillas subsésiles, las espiguillas están protegidas por las vainas de dos hojas distales, son 2-pluri-floras y la raquilla puede ser frágil o tenaz. Las glumas pueden estar presentes o ausentes, cuando presentes pueden ser membranáceas o coriáceas; la lemma, membranácea o coriácea, presenta pelos tanto sobre la superficie como sobre los nervios y la pálea es 2-carinada y envuelve la flor. Las lodículas pueden estar presentes o no, los estambres (3 ó 2), a veces reducidos a estaminodios. Los ovarios con dos largos estilos y estigmas papiloso-pilosos. La cariopsis comprimida dorsi-ventralmente presenta hilo

punctiforme (Anton & Hunziker, 1978) (Figuras 1 y 2). Sobre la base de estudios morfológicos, Anton & Hunziker (1978), dividieron a *Munroa* en tres secciones: Sect. *Munroa* (norteamericana), Sect. *Hemimunroa* y Sect. *Apelytron* (sudamericanas). La sección *Munroa* fue considerada monotípica (*M. squarrosa*), *Hemimunroa* contiene a *M. andina* y *M. decumbens*, y *Apelytron* a *M. argentina* y *M. mendocina*.

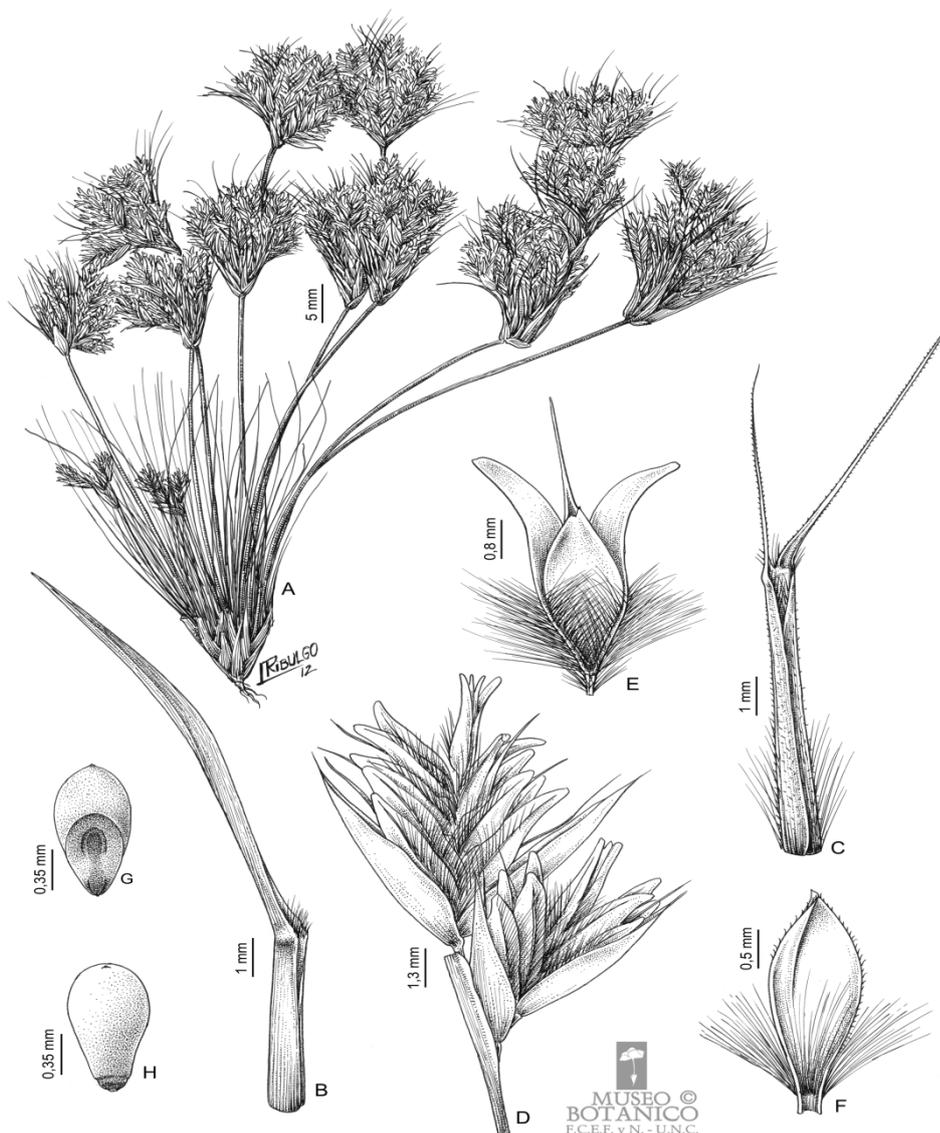
El género monotípico *Dasyochloa* Willd. ex Rydb. fue descrito por Rydberg (1906), basado en *Triodia pulchella* Kunth [=*D. pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb.]. Esta especie vive en América del Norte, en regiones áridas y semiáridas del oeste de EE.UU. y el norte de México y comparte gran parte de su distribución con *M. squarrosa*. La delimitación de *Dasyochloa* como género independiente ha sido cuestionada varias veces desde su establecimiento, ya que ha sido considerado como *Triodia* R. Br. (Kunth, 1815), *Koeleria* Pers. (Sprengel, [1824] 1825), *Uralepis* Nutt. (Kunth, 1829) y *Erioneuron* Nash (Tateoka, 1961) (para una explicación completa de la compleja historia taxonómica de *Dasyochloa*, cfr. Valdés-Reyna & Hatch, 1997). Se trata de plantas perennes y monoicas, con crecimiento heteroblástico; las inflorescencias están protegidas por pseudoverticilos foliares y formadas por espiguillas subsésiles. Las espiguillas están protegidas por las vainas de dos hojas distales, son 2-floras y la raquilla es frágil. Las glumas (2) son membranáceas. La lemma es 3-nervia, aristada, lobulada y pilosa. La pálea es 2-carinada y envuelve la flor. Las lodículas son 2 y los estambres 3. Los ovarios tienen dos largos estilos y estigmas papiloso-pilosos. La cariopsis es comprimida dorsi-ventralmente y presenta hilo punctiforme (Fig. 3).



**Figura 1.** *Munroa argentina*. **A**, planta. **B**, hoja. **C**, perfil. **D**, inflorescencia parcial con dos espiguillas, rodeadas por un par de hojas protectoras. **E**, la misma inflorescencia que en **D**, desprovista de las hojas, mostrando hacia adelante la espiguilla basal, con dos glumas y sólo el antecio inferior fértil; hacia atrás, la espiguilla apical con dos glumas (una asoma parcialmente a la derecha) y dos antecios fértiles. En ambas espiguillas el antecio distal es rudimentario cómo se muestra en **F**. **F**, segundo antecio (fértil) y tercero (estéril) de una espiguilla apical, cuyas glumas y antecio basal fueron separados. **G**, ápice de la lemma de un antecio fértil. **H**, lodículas soldadas a los bordes basales de la pálea (la de la derecha fue desplazada artificialmente). **I**, vista escutelar de la cariopsis. (Ilustrador, Leonor Sánchez, CORD)



**Figura 2.** *Munroa decumbens* (A, B, C, G, H). A, planta. B, espiguilla, las glumas separadas indican que la raquilla está articulada por encima de ellas. C, antecio visto desde la pálea, mostrando las superficies articulares de la raquilla. G, flor perfecta sin lodículas. H, flor pistilada con dos tenues estaminodios. *M. andina*. (D, E, F, I, J, K) D, antecio vista desde la pálea. E, flor perfecta joven con lodícula. F, flor pistilada con ovario en fructificación, con dos estaminodios y sin estilos (las lodículas fueron eliminadas y los estilos se cayeron). I, lodículas. J y K, cariosis en vista escutelar e hilar respectivamente. (Ilustradores, Laura Ribulgo y Nidia Fluri, CORD).



**Figura 3.** *Dasyochloa pulchella*. **A**, planta. **B**, hoja. **C**, perfilo con dos aristas bien desarrolladas. **D**, espiguillas. **E**, antecio vista desde la pálea, la lemma es densamente pilosa en la base y presenta una arista central **F**, pálea, cóncava y con un mechón de pelos en la base. **G** y **H**, cariopsis en vista escutelar e hilar respectivamente (Ilustrador, Laura Ribulgo, CORD).

Parodi (1934) observó afinidades entre *Dasyochloa* y *Munroa*, ya que ambas comparten características tales como el crecimiento heteroblástico, los pseudovercicios foliares en cuyas axilas se esconden las inflorescencias, la lígula densamente pestañosa, los perfilos desarrollados con dos nervaduras prolongadas en aristas, inflorescencias formadas por varios racimos originados

sobre internodios cortos de las extremidades caulinares, espiguillas subsésiles rodeadas por una vaina protectora, la forma de la cariopsis, la forma del estilo y la pilosidad del estigma. Sánchez (1983, 1984) mediante estudios anatómicos en *Erioneuron*, *Dasyochloa* y *Munroa*, encontró afinidades entre los dos últimos ya que ambos presentan la región hipodérmica de los tallos constituida por zonas de parénquima incoloro alternado con clorénquima y hojas con micro pelos con célula distal hemisférica. Valdés-Reyna & Hatch (1995, 1997), utilizando datos morfológicos, anatómicos y proteicos, consideraron a *Dasyochloa* como un género monotípico independiente de *Erioneuron*, aunque nunca incorporaron a *Munroa* en sus análisis. Peterson & al. (2010) realizaron un estudio filogenético para la subfamilia Chloridoideae incluyendo entre los taxones estudiados a dos especies de *Munroa* (*M. argentina* y *M. andina*) y a *D. pulchella*; luego de sus análisis *Munroa* resultó monofilético y *D. pulchella*, el taxón hermano. Los recuentos cromosómicos de Covas (1949) para *M. mendocina* y de Reeder (1977) para *M. squarrosa* y *Erioneuron pulchellum* (Kunth) Tateoka [= *D. pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb.], indicaron  $2n = 16$ .

De acuerdo a lo anteriormente presentado planteé las siguientes preguntas:

- ✓ ¿Es monofilético el género *Munroa*?
- ✓ ¿Cuál es la relación filogenética entre sus especies y de éstas con *D. pulchella*?
- ✓ ¿Existen diferencias cromosómicas y/o morfológicas entre las especies de *Munroa* y de estas con *D. pulchella*?

Pienso que *Munroa* y *Dasyochloa* constituyen un grupo monofilético, que sus especies son cromosómicamente homogéneas, y que los caracteres morfológicos

diagnósticos de *Munroa* y *Dasyochloa* son homoplásicos y que no se justifica mantener a *D. pulchella* como género diferente.

Para responder a estas preguntas me propuse los siguientes **objetivos**:

- I. Estudiar las relaciones filogenéticas entre las especies de *Munroa* y de éstas con *D. pulchella* utilizando marcadores moleculares (regiones de ADN nuclear y del cloroplasto) y caracteres morfológicos, mediante análisis probabilísticos y de máxima parsimonia.
- II. Determinar el número y la morfología cromosómica de *Munroa* y *Dasyochloa*.
- III. Evaluar afinidades morfológicas entre las especies de *Munroa* y *D. pulchella* mediante análisis de estadística multivariada.

## **Materiales y Métodos**

### **Material vegetal y taxones incluidos**

El material correspondiente *Munroa* y *Dasyochloa* fue coleccionado en el Noroeste argentino, Oeste boliviano y Noroeste mexicano en el periodo 2010-2012. Para cada localidad se generaron ejemplares de herbario que se depositaron en CORD y en XAL (Tabla S1) (todos los datos denominados S, se encuentran en la sección **Anexos**). La matriz de datos moleculares incluyó 12 terminales representantes del clado Scleropogoninae (Peterson & al., 2010): *S. brevifolius*, *S. alexandrae*, *B. kingii*, *B. benthamiana*, *E. avenaceum*, *E. nealleyi*, *D. pulchella* y las cinco especies de *Munroa*. *S. brevifolius* fue seleccionado como grupo externo (Peterson & al., 2010), a fin de enraizar los árboles filogenéticos.

### **Extracción de ADN, amplificación y secuenciación**

El ADN total fue extraído de material foliar conservado en gel de sílice y desde material de herbario usando el método CTAB (Doyle & Doyle, 1987). La cuantificación de ADN se realizó por espectrofotometría midiendo la absorbancia a 260nm y el grado de pureza de las extracciones se determinó con el coeficiente de absorbancia 260/280nm. A partir del ADN extraído se amplificaron cuatro regiones del cloroplasto (*ndhF*, *rps16-trnK*, *rpl32-trnL* y el intrón de *ndhA*) y una región nuclear (ITS). Las reacciones de amplificación fueron desarrolladas en un volumen de 25  $\mu$ L de 1.13 ReddyMix™ PCR Master Mix (2.5 mM MgCl<sub>2</sub>) (ABgeneH, Thermo Fisher Scientific Inc., UK) de acuerdo a las instrucciones indicadas por el fabricante utilizando los siguientes cebadores (*primers*); *ndhF*2091R & *ndhF*1311F para *ndhF* (Romaschenko & al., 2010), *rpS16-900F* & *3914PR* para *rps16-trnK* (Peterson & al., 2010), *ndhAx4* & *ndhAx3* para el intrón de *ndhA* (Peterson & al., 2010), *trnL* (UAG) & *rpl32-F* for *rpl32-trnL* (Shaw & al., 2007) e *ITS5a* & *ITS4* para ITS (Stanford & al., 2000; White & al., 1990). Los productos de amplificación (amplicones) fueron visualizados bajo luz UV luego de una electroforesis en TBE-gel de agarosa al 1% p/v teñido con SYBR Safe gel stain (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.). Los amplicones fueron enviados a Macrogen Inc. (Seul, Corea del Sur) para su purificación y posterior secuenciación con el BigDye™ terminator kit y en un equipo ABI 3730XL. Los números de accesos a GenBank de las secuencias generadas para este trabajo, los utilizados desde Peterson & al. (2010) y los datos de colección se detallan en la Tabla S1.

### **Edición de secuencias de ADN y análisis filogenéticos**

Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando Sequencher v4.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.). Posteriormente fueron prealineadas en Mega 5 (Tamura & al., 2011) usando los algoritmos que implementa

Muscle (Edgar, 2004), y finalmente alineadas a ojo. Con cada región amplificada del ADN se construyó una matriz incluyendo los 12 terminales anteriormente mencionados. Para evaluar los niveles de congruencia a través de cada conjunto de dato y su influencia sobre matriz combinada, se desarrolló el test *ILD* (*incongruence test difference*) (Farris & al., 1994, Hipp & al., 2004) con 1.000 permutaciones, utilizando el programa TNT v1.1 (Goloboff & al., 2008) (*ILD.run script*). Debido a que esta prueba puede generar falsos positivos para presencia de incongruencia (Hipp & al., 2004), su resultado sólo se interpretó como medida de incongruencia general entre las particiones y no para identificar incongruencias por taxones o nodos específicos. La prueba de *ILD* no demostró incongruencia significativa ( $P = 0,44$ ); en consecuencia, se combinaron los datos nucleares y de cloroplasto en una única matriz para todos los análisis posteriores. Los caracteres fueron tratados como no ordenados, independientes y de igual peso y los sitios no informativos (no parsimoniosos) fueron eliminados de la matriz. Los gaps fueron tratados como datos perdidos. Los análisis de parsimonia fueron realizados en TNT v1.1 (Goloboff & al., 2008) utilizando búsquedas heurísticas con 1.000 réplicas de adición de secuencias al azar (*RAS, random sequence addition*), intercambio de ramas por TBR (*tree bisection and reconnection*) y guardando 10 árboles por réplica; los árboles óptimos obtenidos fueron entonces sujetos a una nueva ronda de intercambio de ramas por TBR hasta encontrar la topología más parsimoniosa. El valor de soporte de los diferentes nodos fue estimado mediante análisis de *bootstrap* con 1.000 réplicas en TNT.

Los análisis bajo inferencia bayesiana se realizaron para tres conjuntos de datos que consideraron las regiones nucleares (nrADN) y del cloroplasto (cpADN): i) ITS + todas las regiones de cpADN combinadas en una única matriz, ii) todas

las regiones de ADN particionadas en una única matriz y iii) todas las regiones de ADN combinadas en una única matriz (Usaremos el termino combinado para referirnos a una matriz que incluye a diferentes regiones de ADN y un único modelo de sustitución nucleotídica y el termino particionado para referirnos a una matriz que incluye a diferentes regiones de ADN y un modelo de sustitución nucleotídica para cada región). El modelo de sustitución nucleotídica fue calculado en jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008), usando el criterio de información de Akaike con los parámetros que el programa implementa por defecto; estas estimaciones se hicieron para cada marcador por separado. Los mejores modelos de ajuste fueron: GTR+G (intrón de *ndhA*), GTR+G+I (*ndhF*), T92+G (*rpl32-trnL*, *rps16-trnK*), K2+G+I (ITS), GTR (todos los marcadores cpADN) y GTR+G+I (ITS+cpADN). Los análisis bajo inferencia bayesiana fueron desarrollados usando el programa MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Dos análisis simultáneos, iniciados a partir de diferentes árboles al azar y con cuatro cadenas de Markov Monte Carlo, fueron ejecutadas durante 10.000.000 de generaciones, muestreando cada 1.000 generaciones con el fin de asegurar independencia de las muestras sucesivas. El 25% de las primeras muestras fueron descartadas en un proceso de *burn-in*. El tamaño efectivo de muestra (ESS > 200) y la estacionariedad de los parámetros (que se determinó con bases en la convergencia de los valores de verosimilitud) de cada réplica, fueron chequeados en el programa Tracer (Drummond & Rambaut, 2007). Se calculó un árbol consenso de mayoría (50%) y se informan las probabilidades posteriores (PP) asociadas a cada nodo. Con el objetivo de detectar potenciales incongruencias a través los tres conjuntos de datos antes mencionados, se desarrollaron análisis utilizando el factor de Bayes (*Bayes factor*). Estos factores fueron calculados con

los valores de likelihood (*harmonic means likelihood*) de cada partición del conjunto de datos, usando el comando “*sump*” en MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Las decisiones para combinar matrices de datos se basaron en el criterio del  $2\ln$  factor de Bayes ( $B_{10}$ ), en el que un valor de  $\leq 0$  es negativo y  $\geq 10$  es positivo y muy fuerte (Kass & Raftery, 1995).

### **Análisis filogenético con datos moleculares y morfológicos**

*Munroa* es morfológicamente heterogéneo (Anton & Hunziker, 1978), y para detectar sinapomorfías comunes entre *Munroa* y *Dasyochloa* se seleccionaron 18 caracteres morfológicos, con los que se construyó una matriz de datos morfológica que se combinó con la matriz de datos moleculares. Los grupos externos seleccionados son los mismos que se utilizaron en los estudios moleculares. La matriz de datos consistió de 17 caracteres morfológicos tratados como discretos y codificados como binarios, multiestado y polimórficos. Se adicionaron datos citológicos (1) a la matriz. Las observaciones morfológicas se desarrollaron sobre material de herbario (CORD, SI, BAA, BAB, LIL, LPB, XAL, UTC) y corroborados con la literatura (Parodi, 1934; Cáceres, 1950; Anton & Hunziker, 1978; Hunziker & Anton, 1979; Sánchez, 1983, 1984; Valdés-Reyna & Hatch, 1997; Allred, 2003; Peterson, 2003; Nicora & Rúgolo de Agrasar, 2009). La información acerca del material de colección utilizado se detalla en la sección Anexos: **S; Material Vegetal Examinado**. Los detalles de la codificación de caracteres y la matriz resultante se muestran en las Tabla 1 y Tabla S2 respectivamente. A pesar de que el número de caracteres morfológicos es muy pequeño y que no modificaría la topología obtenida por la evidencia molecular, un test de congruencia *ILD* fue implementado en TNT, obteniendo un valor de  $P = 0,4$ , por lo que se decidió combinar el conjunto de datos ya que no resultó

significativamente incongruente. Los análisis filogenéticos se desarrollaron bajo criterios de parsimonia, usando TNT v. 1.1, tal y como se describiera más arriba. La optimización de sinapomorfías se realizó en TNT con los parámetros que el programa implementa por defecto. Se presentan gráficamente sólo las sinapomorfías y autapomorfías recuperadas para los clados *Dasyochloa* y *Munroa*.

**Tabla 1.** Caracteres morfológicos y los correspondientes estados utilizados para construir la matriz de datos morfológica para la optimización de sinapomorfías.

---

Habito: perenne 0, anual 1. Crecimiento heteroblástico: ausente 0, presente 1. Racimo contenido en las vainas de hojas distales; ausente 0, presente 1. Lígula; ausente 0, presente 1. Articulación de la raquilla por encima de las glumas: ausente 0, presente 1. Articulación de la raquilla entre los antecios: ausente 0, presente 1. Glumas en la espiguilla lateral: ausente 0, dos 1. Lemma de las espiguillas laterales: coriáceas 0, membranáceas 1, papiráceas 2. Arista central en la lemma: ausente 0, presente 1. Aristas laterales en la lemma: ausente 0, presente 1. Lemma lobulada: sin lóbulos 0, 2-lobulada 1, 3-lobulada 2, 4-lobulada 3. Lodículas: ausente 0, presente 1. Sexualidad: monoica 0, ginomonoica 1, andromonoica 2. Estambres: tres 0, dos 1. Estigma papiloso-piloso: ausente 0, presente 1. Compresión dorsiventral de la cariopsis: ausente 0, presente 1. Hilo: puntiforme 0, linear 1. Número cromosómico básico:  $x = 7$  0,  $x = 8$  1,  $x = 10$  2.

---

### **Estudios citológicos**

Estos estudios se desarrollaron con la colaboración de la Dra. Natalia C. Moreno, en el laboratorio de Citogenética Vegetal del IMBIV (CONICET-UNC). Los cromosomas mitóticos se examinaron a partir de aplastados (squashes) del ápice (meristemas) de raíces obtenidas a partir de semillas germinadas (5-10

individuos) en cajas de Petri. Los individuos representaron a cuatro poblaciones de cada especie de *Munroa* y de *D. pulchella* (datos de colección en la sección Anexos: Material Vegetal Examinado). Las raicillas fueron sometidas a un protocolo convencional de pre-tratamiento (con 8-hidroxiquinoleína), fijación (Farmer: alcohol etílico: ácido acético glacial, 3:1) y tinción clásica de Feulgen (según Jong, 1997) de acuerdo al protocolo que se detalla en la sección Anexos (S1).

Las placas metafásicas se observaron con microscopio de contraste de fases Zeiss Axiophot y se fotografiaron con la cámara digital Leica DFC300FX. Para el análisis morfométrico se midieron al menos 5 placas metafásicas para cada individuo de cada población y especie. En cada placa se efectuaron mediciones en los cromosomas referidas a la longitud del brazo corto, brazo largo y largo total, calculándose en cada caso la media y el desvío estándar, datos con los que se construyeron los idiogramas respectivos. Las mediciones se realizaron con el programa Image J (Rasband 1997-2012). Los cariotipos se construyeron organizando los cromosomas en grupos de acuerdo al índice braquial ( $r$ ) según Levan & al. (1964).

Las variables analizadas se calcularon como sigue:

- Longitud cromosómica media de cada par cromosómico ( $c$ ): se calculó midiendo el largo total de cada miembro del par y sacando un promedio entre ellos.
- Posición del centrómero: se determinó de acuerdo al índice braquial  $r=l/s$ , donde  $l$ =largo del brazo mayor  $s$ = largo del brazo corto.

- Largo cromosómico promedio (**C**): se calculó sumando la longitud cromosómica media (*c*) de cada par cromosómico y dividiendo por el número de pares cromosómicos.
- Largo total del genoma haploide (**LtH**): se calculó sumando las medias de los largos de cada par cromosómico.
- Índice braquial promedio (**r**): se calculó sumando los índices *r* de cada par y dividiéndolo por el número de pares cromosómicos.
- Razón entre las longitudes del cromosoma de mayor y el de menor tamaño del complemento (**R**).
- Asimetría de los cariotipos: se cuantificó mediante los índices de Romero Zarco (1986):

El índice de asimetría intra-cromosómico se calcula con la siguiente fórmula,  $A_1 = 1 - [(\sum b_i/B_i)/n]$ ; donde:  $b_i$  y  $B_i$  son las medias de los brazos cortos y largos, respectivamente, correspondientes a cada par cromosómico y  $n$  es el número de pares cromosómicos del complemento.  $A_1$  varía de 0 a 1 y tiende a cero cuando los cromosomas son metacéntricos (*m*); este índice no depende del número de cromosomas, ni del tamaño de los mismos. El índice de asimetría intercromosómico, por su parte, se calcula como sigue,  $A_2 = S/X$ , donde **S** es el desvío estándar y **X** es la media de las longitudes cromosómicas del complemento; este índice es independiente del tamaño y del número cromosómico. Los idiogramas se construyeron con los promedios obtenidos de las placas mitóticas utilizando el programa Corel Draw 13.0 (Corel Corporation 2005).

### **Análisis morfológico mediante estadística multivariada**

Se analizaron 72 individuos coleccionados en 40 localidades geográficas diferentes; 60 fueron coleccionados en el Noroeste argentino y el oeste boliviano y el Noroeste mexicano en el periodo 2010-2012. En cada localidad se trazaron líneas al azar de 50 metros cada una y se coleccionaron individuos separados por al menos 10 metros. En todos los casos se confeccionaron etiquetas de herbario que se depositaron en CORD y en XAL (datos de colección en la sección Anexos: **S; Material Vegetal Examinado**). Para cubrir el área de distribución total de las especies y considerar la variabilidad morfológica total de cada especie se agregaron 12 ejemplares de herbario provenientes de SI, BAB, LIL, LPB, XAL, y UTC (datos de colección en la sección Anexos: **S**). A cada individuo se lo consideró como una unidad taxonómica operativa (OTU -*Operational Taxonomic Units*). Los ejemplares se identificaron siguiendo métodos taxonómicos clásicos basados en claves de identificación y descripciones de Anton & Hunziker (1978) y Valdés-Reyna & Hatch (1997); sólo se incluyeron en este estudio aquellos ejemplares que presentaban madurez reproductiva. Se realizaron los siguientes análisis: a) análisis de agrupamiento (AA); b) análisis de componentes principales (ACP) y c) análisis discriminantes (AD) sobre una matriz de 60 caracteres, incluyendo 20 caracteres cuantitativos y 40 cualitativos, utilizando Infostat v. 2010 (Di Rienzo & al., 2010). Los caracteres y su codificación se muestran en la Tabla 2 y la matriz de datos resultante se muestra en Tabla S3. Previo al análisis, la matriz fue estandarizada usando Infostat v. 2010 (Di Rienzo & al., 2010). Luego se calculó la matriz de similaridad/disimilaridad utilizando la distancia promedio de Manhattan, que permite la combinación de datos cuantitativos y cualitativos. Para la visualización de los análisis de AA se generó un fenograma utilizando el

método de agrupamiento UPGMA (Sokal & Michener, 1958). El coeficiente de correlación co-fenética ( $r$ ) (Sokal & Rohlf, 1962) fue calculado para testear el grado de distorsión entre el fenograma resultante y los datos originales. Los análisis de ACP y AD se desarrollaron con bases en una matriz de correlación usando el coeficiente de correlación de Pearson (Michener & Sokal, 1957).

El análisis de PCA se desarrolló para evaluar la disimilaridad fenética a través de los taxones. El agrupamiento resultante de estos análisis fue considerado como agrupamiento a *priori* para los AD. El análisis discriminante se desarrolló para identificar los niveles de certeza de los grupos previamente reconocidos, así como para la selección de caracteres diagnósticos basados en los coeficientes estandarizados de las variables canónicas. Las seis entidades morfológicas reconocidas actualmente fueron superpuestas en los diagramas de dispersión resultantes para comprobar visualmente si los conceptos morfológicos correspondían a diferentes entidades fenéticas.

**Tabla 2.** Caracteres morfológicos cuantitativos y cualitativos utilizados para los estudios estadísticos. Los números representan códigos que luego se utilizan para indicar a los caracteres en la matriz morfológica de datos en la Tabla S3.

---

longitud de la rama fértil (1), longitud del primer entrenudo (2), longitud del estolón (3), longitud de la vaina (4), longitud de lámina (5), ancho de la lámina (6), longitud de la lígula (7), longitud de la inflorescencia (8), ancho de la inflorescencia (9), longitud de la espiguilla (10), longitud de la primer gluma (11), longitud de la segunda gluma (12), longitud de la lemma (13), longitud de la palea (14), longitud de la arista central de la lemma (15), longitud de las anteras (16), longitud de la cariopsis (17), ancho de la cariopsis (18), longitud del escutelo (19), longitud de las lodículas (20), hábito (21), presencia de rizomas (22), crecimiento heteroblástico (23), racimos incluidos en vainas de hojas distales (24), perfiles con dos aristas (25), vainas con superficie adaxial pilosa (26), vainas con pelos en la garganta (27), láminas con superficie pilosa (28), lígulas pestañosas (29), micropelos bicelulares en la superficie abaxial de las hojas (30), micropelos bicelulares con célula distal hemisférica (31), presencia de espiguillas dimórficas (32), número de espiguillas por inflorescencia (33), pedúnculo en las espiguillas (34), número de flores por espiguilla (35), desarticulación de la raquilla (36), presencia de glumas (37), glumas con aristas (38), Número de glumas por espiguilla lateral (39), Relación longitudinal gluma/lemma (40), Número de glumas por espiguilla terminal (41), glumas fusionadas (42), consistencia de la lemma (43), aristas en la lemma (44), posición de aristas en la lemma (45), inserción de las aristas en la lemma (46), vascularización de la lemma (47), lóbulos de la lemma (48), presencia de mechones de pelos sobre la lemma (49), pilosidad de la superficie de la lemma (50), presencia de lodículas (51), vascularización de las lodículas (52), lodículas fusionadas (53), sexualidad de las flores (54), número de estambres (55), presencia de estaminodios (56), pilosidad del estigma (57), compresión de la cariopsis (58), forma del hilo (59), forma de la hoja en transcurso (60).

---

## Resultados

### Estudios filogenéticos

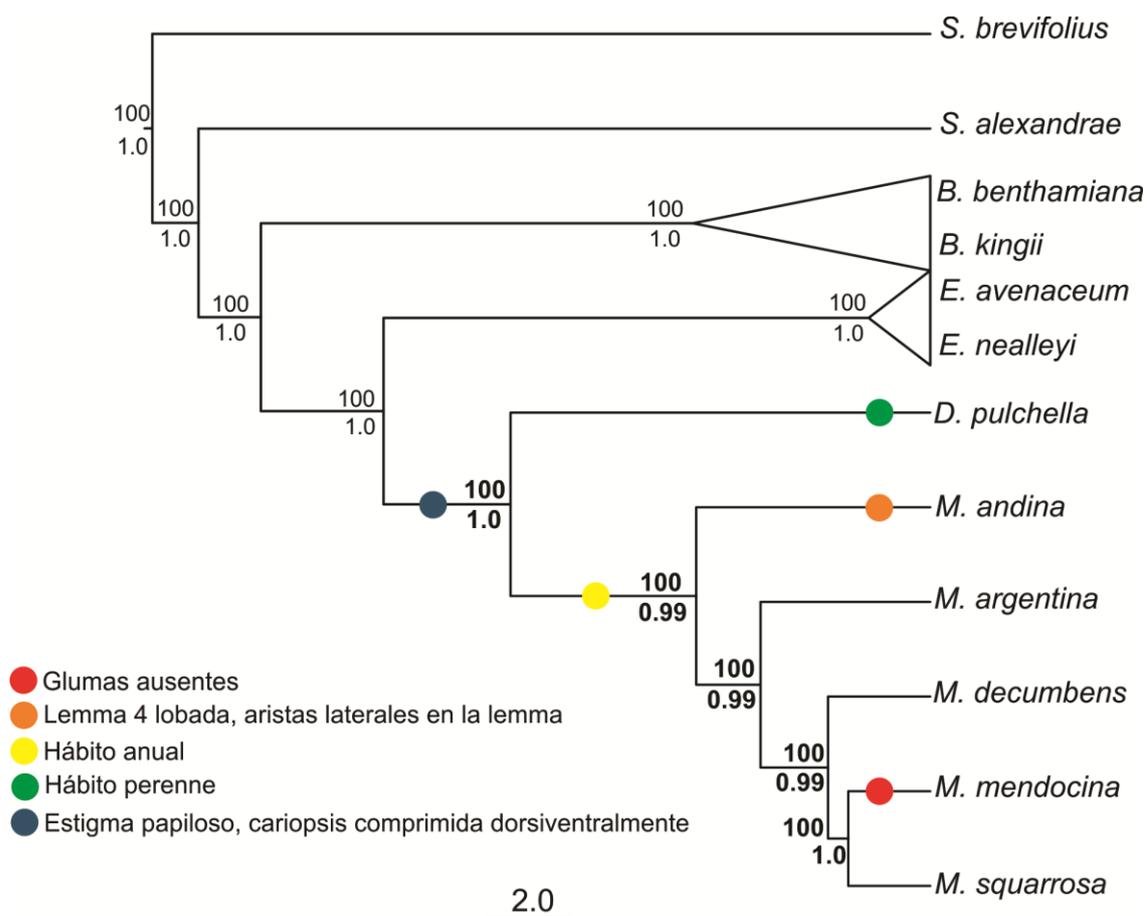
Las hipótesis filogenéticas fueron congruentes a través de las particiones y el valor de ILD indicó incongruencia no significativa ( $P= 0,4$ ). Los resultados de los factores de  $2\ln$  Bayes ( $B_{10}$ ) indicaron soportes positivos para todos los conjuntos de datos; ITS + cpADN combinados (2.5), todas las regiones particionadas (3.0), y todas las regiones combinados (2.8). En base a estos resultados, los estudios de parsimonia incluyeron un único conjunto de datos, en el que todos los marcadores fueron combinados. En cuanto a los estudios desarrollados por inferencia bayesiana, se presentan los resultados provenientes de la matriz con mayor valor de factor de Bayes (3.0). El alineamiento combinado de todas las regiones de ADN y de los 12 terminales resultó en una matriz de 4.150 sitios. Los estadísticos más comunes se presentan en la Tabla 3, entre ellos: número de sitios variables, número de sitios parsimoniosos, etc.

**Tabla 3.** Resumen de la estadística descriptiva de la región nuclear y de las cuatro regiones plastidiales (cpADN) utilizados en esta tesis.

|  | intrón de <i>ndhA</i> | <i>ndhF</i> | <i>rpl32-trnL</i> | <i>rps16-trnK</i> | cpADN | ITS   | cpADN + ITS |
|--|-----------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------|-------|-------------|
| Nº de taxones                              | 10                    | 12          | 11                | 11                | -     | 12    | -           |
| Long. promedio de las secuencias           | 950                   | 725         | 675               | 690               | -     | 650   | -           |
| Long. promedio de las secuencias alineadas | 1058                  | 743         | 796               | 721               | 3318  | 688   | 4006        |
| Nº de caracteres informativos (MP)         | 216                   | 150         | 252               | 115               | 733   | 256   | 989         |
| Long. de los árboles                       | 510                   | 305         | 415               | 230               | 900   | 480   | 1150        |
| Índice de consistencia                     | 72                    | 66          | 71                | 70                | 88    | 69    | 79          |
| Índice de retención                        | 79                    | 75          | 80                | 80                | 91    | 76    | 89          |
| AIC  | GTR+G                 | GTR+G+I     | T92+G             | GTR+G             | GTR   | T92+G | GTR+G+I     |

El único árbol resultante de los análisis de parsimonia mostró la misma topología que el árbol consenso obtenido por regla de mayoría (50 %) después de los análisis de Inferencia Bayesiana. La topología obtenida por parsimonia se muestra en la Figura S1 y los valores de soporte bootstrap se muestran en la Figura 4 (sobre las ramas). Los resultados de Inferencia Bayesiana indican a *D. pulchella* como el taxón hermano de *Munroa*. *D. pulchella* junto a las especies de *Munroa* forman un grupo de divergencia gradual (*grade topology*) donde *M. andina* es el taxón hermano del resto de las especies de *Munroa*. En la Figura 4, se presentan en detalle las relaciones filogenéticas encontradas y sus respectivos valores de soporte (bootstrap y probabilidades posteriores).

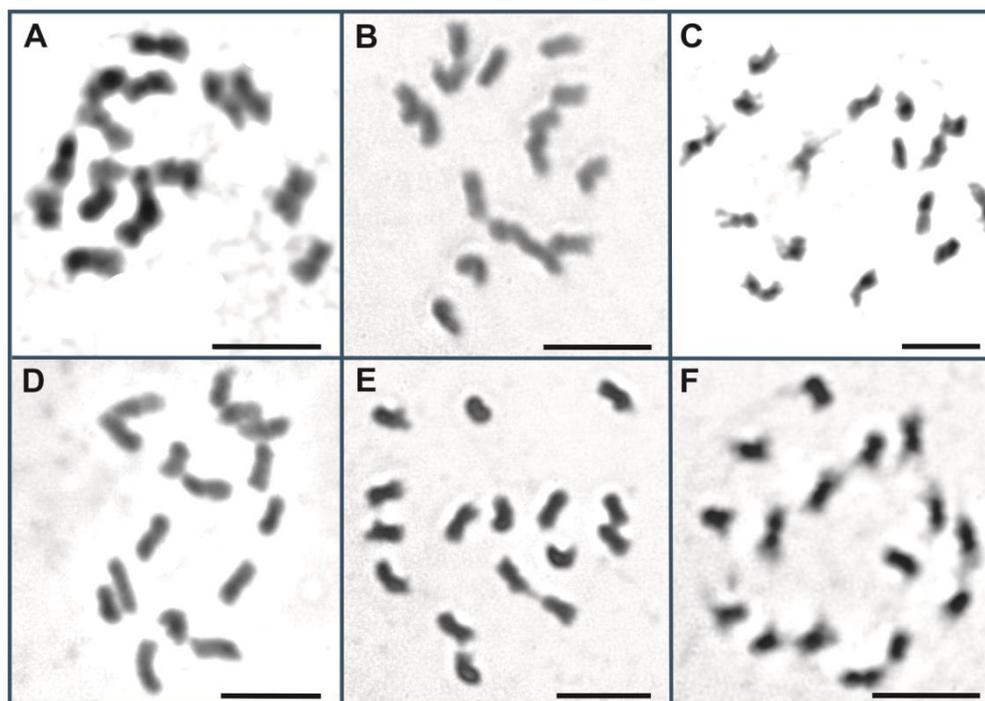
Después de los estudios de evidencia total se recuperaron dos sinapomorfías para el clado *Munroa* + *Dasyochloa*; el estigma papiloso-piloso y la cariopsis comprimida dorsiventralmente. El hábito perenne resultó autapomórfico para *D. pulchella* mientras que el hábito anual resultó sinapomórfico para *Munroa*. La lemma 4-lobada con aristas laterales, resultó autapomórfica para *M. andina*. Para *M. mendocina* se detectó una autapomorfía morfológica: la ausencia de glumas. Estos resultados fueron resumidos en la Figura 4.



**Figura 4.** Hipótesis filogenética obtenida por el consenso de 50% de mayoría obtenido por inferencia Bayesiana. Los valores de soporte bootstrap se indican por encima de las ramas y las probabilidades posteriores por debajo de las mismas. Los símbolos de colores sobre las ramas indican sinapomorfías y autapomorfías obtenidas mediante optimización por parsimonia.

### Estudios citológicos

Todas las especies de *Munroa* resultaron diploides con  $2n = 16$  ( $x = 8$ ) (Figura 5). Los cariotipos fueron uniformes, compuestos por cromosomas metacéntricos de tamaño pequeño con constricciones secundarias no visibles. En general, considerando la posición del centrómero y la variación en el tamaño de los cromosomas, los cariotipos fueron simétricos. Los datos morfométricos de los cromosomas y los idiogramas de cada especie se presentan la Tabla 4 y la Figura S2 respectivamente.



**Figura 5.** Metafases mitóticas de *Munroa* y *Dasyochloa* ( $2n = 16$ ). **A**, *M. argentina*. **B**, *M. mendocina*. **C**, *M. squarrosa*. **D**, *M. andina*. **E**, *M. decumbens*. **F**, *D. pulchella*. Longitud de la barra = 5  $\mu\text{m}$ .

**Tabla 4.** Datos cariotípicos. **FC**, fórmula cariotípica. **2n**, número cromosómico diploide. **LtH**, largo total del genoma haploide. **r**, índice braquial promedio. **C**, largo cromosómico. **R**, razón entre el cromosoma de mayor y menor tamaño. **A1**, índice de asimetría intracromosómica. **A2**, índice de asimetría intercromosómica.

| Especies            | FC  | 2n | LtH ( $\mu\text{m}$ ) | r    | C ( $\mu\text{m}$ ) | R    | A <sub>1</sub> | A <sub>2</sub> |
|---------------------|-----|----|-----------------------|------|---------------------|------|----------------|----------------|
| <i>M. andina</i>    | 8 m | 16 | 14,55                 | 1,26 | 1,82                | 1,60 | 0,20           | 0,13           |
| <i>M. argentina</i> | 8 m | 16 | 17,65                 | 1,23 | 2,21                | 2,63 | 0,18           | 0,22           |
| <i>M. decumbens</i> | 8 m | 16 | 13,45                 | 1,22 | 1,68                | 1,59 | 0,18           | 0,13           |
| <i>M. mendocina</i> | 8 m | 16 | 12,83                 | 1,28 | 1,60                | 2,02 | 0,22           | 0,18           |
| <i>D. pulchella</i> | 8 m | 16 | 10,63                 | 1,24 | 1,33                | 1,97 | 0,19           | 0,18           |
| <i>M. squarrosa</i> | 8 m | 16 | 13,93                 | 1,23 | 1,74                | 2,19 | 0,19           | 0,21           |

## **Afinidades morfológicas entre las especies de *Munroa* y *Dasyochloa***

### **Análisis de agrupamiento (AA) y de componentes principales (ACP)**

El resultado gráfico del análisis de agrupamiento se muestra en la Figura 6A ( $r=0.93$ ). El grupo denominado A contiene a *M. mendocina* (Mm). El grupo B fue dividido en dos subgrupos (C y D), segregando a *Dasyochloa pulchella* (Dp; grupo C) de *M. squarrosa* (Ms), *M. decumbens* (Md), *M. andina* (Ma) y *M. argentina* (Maa). Por su parte, el grupo D comprende dos subgrupos: el E con Md y Ma y el F con Ms y Maa. A su vez, el subgrupo E se dividió en dos: H (Md) y G (Ma), y el subgrupo F en J e I, con Maa y Ms respectivamente. Los resultados gráficos de los análisis de componentes se muestran en la Figura 6B; los tres primeros ejes explican cerca del 70 % de la variación total (28.9%, 23.5% y 15.7%, respectivamente). La Figura 6B1 muestra el diagrama de dispersión con agrupamientos de los puntos que fueron superpuestos con el concepto morfológico, pudiendo observarse la formación de seis grupos definidos con Mm, Dp, Ms, Maa, Md y Ma. La Figura 6B2, muestra el diagrama de dispersión del segundo y tercer eje, mostrando los mismos seis grupos definidos anteriormente (Mm, Dp, Ms, Maa, Md y Ma); en este gráfico *M. mendocina* aparece parcialmente solapada con *D. pulchella*. El gráfico de dispersión del primer y tercer eje resultó en un agrupamiento similar a los anteriores y no se muestra.

### **Análisis Discriminante (AD)**

Sobre la base de los resultados anteriores, se definen seis grupos (grupos que se corresponden con las seis entidades morfológicamente reconocidas a la fecha) para estos análisis. Los tres primeros ejes canónicos explicaron el 96 % de la variación en los datos (79.98%, 9.48 % y 6.57%, respectivamente). Las Figuras 7A y 7B recuperan los seis grupos definidos (equivalentes a *M. mendocina*, *D.*

*pulchella*, *M. squarrosa*, *M. argentina*, *M. decumbens* y *M. andina*); todos los especímenes de los seis grupos definidos fueron correctamente clasificados (Tabla 5).

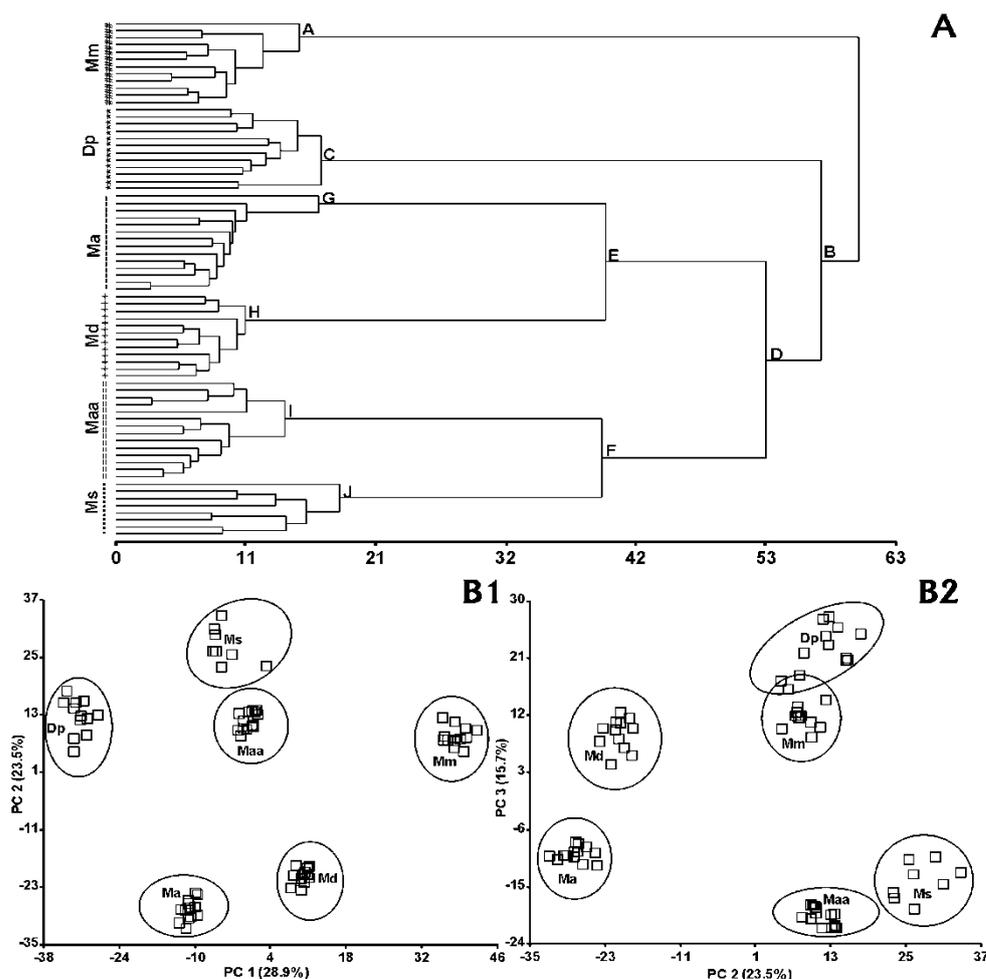
Las variables que más contribuyeron al primer eje canónico fueron: longitud de la lodícula, longitud del escutelo, ancho de la cariopsis, longitud de la arista central de la lemma, ancho de la inflorescencia y longitud de la vaina. Las variables que más contribuyeron al segundo eje fueron la longitud de las anteras y la longitud de la gluma superior. Por su parte, la longitud de la cariopsis, la longitud de la lígula, el ancho de las láminas, el número de estambres y el número de glumas fueron las variables que más contribuyeron al tercer eje canónico (el detalle de los autovectores y autovalores de cada variable métrica para cada eje canónico se muestra en la Tabla 6).

**Tabla 5.** Cuadro de clasificación cruzada obtenida después del análisis de discriminante. Todas las muestras resultaron bien clasificadas de acuerdo a las agrupaciones *a priori*.

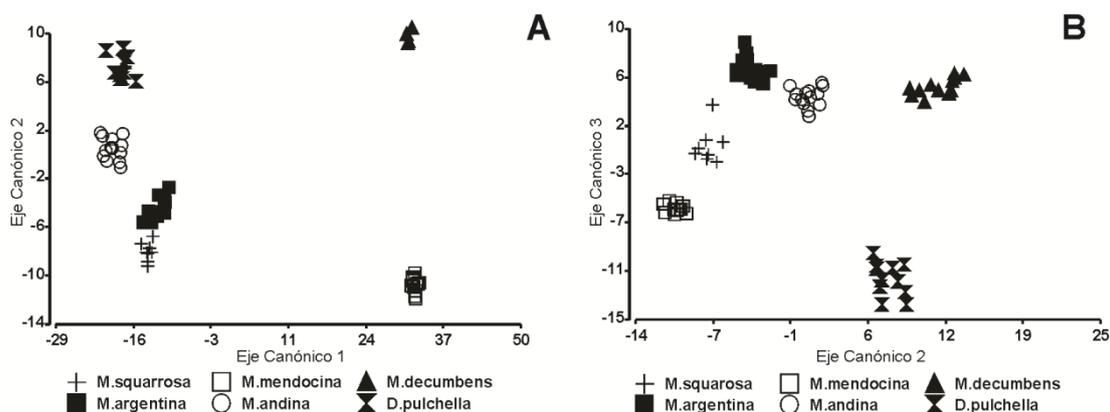
| Grupo | Dp | Ma | Maa | Md | Mm | Ms | Total | Error (%) |
|-------|----|----|-----|----|----|----|-------|-----------|
| Dp    | 15 | -  | -   | -  | -  | -  | 15    | 0         |
| Ma    | -  | 15 | -   | -  | -  | -  | 15    | 0         |
| Maa   | -  | -  | 15  | -  | -  | -  | 15    | 0         |
| Md    | -  | -  | -   | 15 | -  | -  | 15    | 0         |
| Mm    | -  | -  | -   | -  | 15 | -  | 15    | 0         |
| Ms    | -  | -  | -   | -  | -  | 10 | 10    | 0         |
| Total | 15 | 15 | 15  | 15 | 15 | 10 | 72    | 0         |

**Tabla 6:** Detalle de la cantidad de variabilidad que aporta cada variable métrica a cada eje canónico. Los números del 1 al 20 corresponden a los caracteres continuos considerados en los análisis (confrontar con Tabla 3).

| Variables | Auto-vectores |       |         |
|-----------|---------------|-------|---------|
|           | 1             | 2     | 3       |
| 1         | 0.29          | 0.08  | 0.18    |
| 2         | 0.25          | 0.22  | -0.32   |
| 3         | 0.18          | 0.13  | -0.28   |
| 4         | -0.11         | -0.06 | 0.10    |
| 5         | -0.15         | 0.40  | -0.05   |
| 6         | 0.24          | -0.18 | 0.08    |
| 7         | -0.23         | 0.39  | -0.05   |
| 8         | -0.0037       | 0.40  | -0.14   |
| 9         | -0.09         | 0.35  | 0.23    |
| 10        | 0.13          | 0.28  | 0.35    |
| 11        | 0.26          | 0.09  | 0.45    |
| 12        | 0.26          | 0.09  | 0.45    |
| 13        | -0.10         | 0.25  | 0.26    |
| 14        | 0.26          | 0.16  | -0.27   |
| 15        | -0.38         | 0.03  | 0.02    |
| 16        | 0.40          | -0.09 | -0.0025 |
| 17        | 0.22          | 0.06  | 0.03    |
| 18        | 0.29          | 0.19  | -0.03   |
| 19        | 0.01          | -0.25 | 0.17    |
| 20        | 0.20          | 0.10  | 0.04    |



**Figura 6.** Fenograma (A) y gráficos de dispersión (B) obtenidos luego de los análisis estadísticos sobre 72 especímenes y 60 caracteres morfológicos. **A**, en el Fenograma, las letras mayúsculas sobre las ramas indican los grupos diferenciados. **B1**, en el gráfico de dispersión se muestran al primer y segundo eje de las componentes principales: PC1 = 28.9%, PC2 = 23.5%. **B2**, en el gráfico de dispersión se muestran al segundo y tercer eje de las componentes principales: PC2 = 23.5%, PC3 = 15.7%. Los códigos indican a las entidades taxonómicas reconocidas previamente en otros estudios; **Mm** (*M. mendocina*), **Dp** (*D. pulchella*), **Ma** (*M. andina*), **Md** (*M. decumbens*), **Ms** (*M. quarrosa*), y **Maa** (*M. argentina*).



**Figura 7.** Gráficos de dispersión obtenidos luego del análisis discriminante de 72 especímenes clasificados de acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 6. **A** y **B** muestran las gráficas de los ejes canónicos 1x2 y 2x3 respectivamente; en ellos pueden verse que existe una fuerte diferenciación a través de los taxones reconocidos *a priori* y que todos los individuos fueron correctamente clasificados de acuerdo a los agrupamientos.

## Discusión

### Estudios filogenéticos

De acuerdo a los resultados obtenidos, *Munroa* es monofilético y *D. pulchella* es su taxón hermano. Las relaciones entre *Munroa* y *D. pulchella* en particular y las de la tribu Scleropogoninae en general, coinciden con las reportadas por Peterson & al. (2010) en su estudio sobre Chloridoidea. Las hipótesis obtenidas a través de los diferentes análisis filogenéticos, permiten diferenciar a todas las especies de *Munroa* y visualizar que *M. andina* es el taxón hermano de *Munroa*. Sobre la base de estudios morfológicos, Anton & Hunziker (1978), apoyados fundamentalmente en la articulación de la raquilla, dividieron a *Munroa* en tres secciones: Sect. *Munroa* (norteamericana), Sect. *Hemimunroa* y Sect. *Apelytron*

(sudamericanas). Estas secciones no fueron recuperadas en los análisis aquí desarrollados, y la articulación de la raquilla resultó homoplásico.

La optimización de los caracteres morfológicos indicó que los estados de los caracteres cariopsis comprimida dorsiventralmente y estigma papiloso-piloso son sinapomórficos para el nodo *D. pulchella* + *Munroa*, y éstos son los que han sido utilizados como caracteres diagnósticos tanto para *Munroa* como para *Dasyochloa*. Para *Munroa* sólo el hábito anual resultó sinapomórfico. Luego, cuatro estados de caracteres resultaron autapomórficos: el hábito perenne para *D. pulchella*, la lemma 4-lobada con aristas laterales para *M. andina* y la ausencia de glumas para *M. mendocina*. Los restantes 14 caracteres resultaron homoplásicos para *D. pulchella* y *Munroa*; este elevado número de caracteres homoplásicos ha sido reportado por Columbus & al., (2007) para Chloridoideae en general y para Scleropogoninae en particular.

*D. pulchella* presenta hábito perenne, flores hermafroditas, lemma con arista terminal y androceo trímero, caracteres que según Stebbins (1982) son comunes en taxones de divergencia temprana para algunos grupos de gramíneas. Si bien estos estados de caracteres no resultaron sinapomórficos, *D. pulchella* es el taxón más homogéneo morfológicamente y, en términos de Stebbins (1982), reúne las características morfológicas que deberían ser comunes en taxones de divergencia temprana. Se puede contemplar a través de la filogenia, además, un proceso continuo de reducción de órganos desde *D. pulchella* hasta *M. mendocina*, proceso que fue advertido por Parodi (1934) y Anton & Hunziker (1978) para *Dasyochloa* y *Munroa*. Al respecto, cabe destacar que *M. squarrosa* es el taxón más heterogéneo morfológicamente (con dimorfismo en las espiguillas en lo que se refiere a la consistencia y morfología de la lemma y sexualidad -flores

pistiladas en las espiguillas laterales y perfectas en la terminal-); de acuerdo a Stebbins (1982) estas características corresponden a taxones derivados, tal y como se recuperara en este estudio.

*D. pulchella* es perenne, morfológicamente homogénea y vive en simpatria con *M. squarrosa*, originado probablemente desde un ancestro sudamericano que tiene hábito anual y es morfológicamente heterogéneo. Los restantes taxones de *Munroa* son simpátricos en América del Sur, viven en zonas precordilleranas en los Andes de Argentina, Bolivia, Chile y el sur de Perú entre los 1.100 y 4.200 m s.n.m., son anuales, y muestran un grado intermedio entre la variabilidad morfológica de *D. pulchella* y la de *M. squarrosa*. La diferenciación molecular de estos taxones es clara y bien soportada por lo que, probablemente, presenten fuertes mecanismos de aislamiento reproductivo, aunque aún, nada se conoce acerca de los sistemas reproductivos de *Munroa*. Sin embargo, aún presentan un bajo grado de diferenciación morfológica (gran número de caracteres homoplásicos), lo que sugiere que la cantidad de cambio evolutivo en caracteres morfológicos y moleculares tienen ritmos (*timing*) diferentes, como fue propuesto para *Grindelia* (Steyemark, 1937; Moore & al., 2012).

### **Estudios citológicos**

El número cromosómico básico común en Chloridoideae es  $x = 10$  mientras que los números básicos comunes en Scleropogoniane son  $x = 7, 8, \text{ y } 10$  (Peterson & al., 2010). Los resultados que aquí se obtuvieron ( $x = 8$ ) coinciden con los reportados para Scleropogoninae y con los conteos de Covas (1949) para *M. mendocina* y de Reeder (1971) para *M. squarrosa* y *Erioneuron pulchellum* (Kunth) Tateoka (= *D. pulchella*), quienes determinaron  $2n = 16$  para estas especies. Se reporta por primera vez el número cromosómico de todas las

especies y se propone el cariotipo para cada una de ellas (Tabla 4, Figura S2). Debido a que otros miembros de Scleropogoninae presentan número básico  $x = 10$  y  $7$ , probablemente el número cromosómico básico de *Munroa* se haya originado por eventos de aneuploidía, que son comunes en las gramíneas (Hilu, 2004). Los datos cariotípicos indican una pequeña diferenciación cromosómica entre las especies, apenas observable en el largo genómico haploide total y en la asimetría del cariotipo. Esta escasa variación en la morfología cromosómica, relacionada con la escasa diversificación morfológica (gran cantidad de homoplasias) ha sido advertida para Solanáceas por Bonierbale & al. (1988) y Bernardello & al. (2008). Aquí también cabe mencionar que la cantidad de cambio molecular en *Munroa* y *Dasyochloa* no seguiría el mismo ritmo (*timing*) que la cantidad de cambio cromosómico. Estudios de tasas de diversificación cromosómica deberían desarrollarse en *Munroa* y en Scleropogoninae, para poder comprender el significado evolutivo de las características citológicas en el clado.

#### **Afinidades morfológicas entre las especies de *Munroa* y *Dasyochloa pulchella***

Todos los análisis de AC, ACP y AD mostraron una clara diferenciación a través de todos los taxones y recuperaron grupos que representan a los taxones definidos sobre bases morfológicas tradicionales. En los análisis de AC puede observarse que *D. pulchella* presenta gran afinidad morfológica con *Munroa*, ya que demuestran que *M. mendocina* es más afín a *D. pulchella* que a los otros taxones de *Munroa*. El ACP mostró cierta superposición, sobre todo entre *D. pulchella* y *M. mendocina*, que puede ser atribuible a que los caracteres continuos presentan rangos de valores superpuestos. Estos resultados permiten diferenciar

claramente a los taxones (Saarela & al., 2003) y el grado de diferenciación que se recuperó a través de todos los análisis son similares a los encontrados entre otros taxones fuertemente emparentados (Saarela & al., 2003). Los análisis discriminantes confirmaron la identificación de los taxones que fuera realizada en base a sus características morfológicas, por lo que los caracteres recuperados como los que mejor explican la variabilidad morfológica en el análisis, fueron utilizados para elaborar una clave artificial que permite su reconocimiento.

Parodi (1934) fue el primero en poner en evidencia que existen afinidades entre *Dasyochloa* y *Munroa*, sobre la base de que en *D. pulchella* pueden observarse las principales características que definen a *Munroa* (crecimiento heteroblástico, pseudo-verticilios foliares en cuyas axilas se esconden las inflorescencias, lígulas densamente pestañosas, perfiles desarrollados con dos nervaduras prolongadas en aristas, inflorescencias formadas por varios racimos originados en internodios cortos de las extremidades caulinares, espiguillas subsésiles rodeadas por una vaina protectora, la forma de la cariopsis, la forma del estilo y la pilosidad del estigma). Sobre esta base sugiere, si bien no lo concreta, que *Dasyochloa pulchella* debería ser transferida al género *Munroa*. Además, Sánchez (1983, 1984) al desarrollar estudios anatómicos en *Dasyochloa* y *Munroa* encontró fuertes afinidades entre éstas.

## Conclusiones

De acuerdo a los estudios aquí desarrollados se ha verificado que: i) las hipótesis filogenéticas no recuperan una topología que permita segregar a *D. pulchella* de *Munroa*; ii) los estados de caracteres sinapomórficos para *D. pulchella* y *Munroa* son aquellos que tradicionalmente se utilizan como diagnóstico para ambos géneros, iii) el número cromosómico básico es  $x = 8$  y los cariotipos son uniformes y simétricos para *D. pulchella* y todos los miembros de *Munroa*, y iv) los estudios fenéticos no recuperan un agrupamiento diferencial entre los taxones de *Munroa* y *D. pulchella*; todos los taxones se agrupan diferencialmente y los grupos se distribuyen homogéneamente en el espacio euclidiano.

En base a los resultados aquí presentados se propone la transferencia de *Dasyochloa pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb. a *Munroa* y la nueva combinación *Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla. A continuación se presenta el tratamiento taxonómico correspondiente, una enmienda en la diagnosis de *Munroa*, y una clave dicotómica para diferenciar los 6 taxones comprendidos en la nueva delimitación del género. La enmienda consistió en la inclusión de las características propias de *M. pulchella* en la descripción del género *Munroa* y la clave dicotómica se construyó en base a las propuestas por Anton & Hunziker (1978), Valdés-Reyna & Hatch (1997) y con los caracteres analizados en este trabajo de tesis.

### Tratamiento Taxonómico

***Munroa*** Torr., Pacif. Railr. Rep. 4 (5, n° 4) [Whipple]: 158. 1856 [Sep 1857], **nom. et orth. cons., emend.** Amarilla. TIPO: *Munroa squarrosa* (Nutt.) Torr. (= *Crypsis squarrosa* Nutt.), ISOTIPO: USA, Arizona, Peach Springs, August 7, 1884. *M. E. Jones* 4088. US-00132817!.

*Dasyochloa* Willd. ex Rydb., Agric. Exp. Sta. Agric. Coll. Colorado Bull. 100: 18, 37. 1906, **syn. nov.** TIPO: *Dasyochla pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb. (= *Triodia pulchella* Kunth). TIPO: Mexico. In subfrigidis, siccis, aprics reginii Mexicani inter Guanaxuati, Mina de Belgrado et Cubilete, *F. W. H. A. Humboldt & A. J. A. Bonpland s.n.* [HOLOTIPO P cb 00669430; ISOTIPO B-W 2046, US 91469! (fragmento)].

Plantas anuales o perennes; ginomonoicas o monoicas, arrosetadas y muy ramificadas, decumbentes en la base y estoloníferas, de hasta 20 cm de altura. Tallos con crecimiento heteroblástico: entrenudos largos sucedidos por varios cortos, donde se insertan pseudoverticilios de hojas en cuyas axilas se esconden las inflorescencias. Estas hojas son axilantes no sólo para los ejes florales, sino también para ejes vegetativos (macroblastos); a su vez estos últimos, vuelven o no a ramificarse en su ápice, originando así braquiblastos que rematan en inflorescencias o en nuevas ramas en las que la unidad descrita se repite. Todo el conjunto forma un fascículo de hojas, inflorescencia y tallos secundarios, donde la primera hoja de cada rama lateral puede reconocerse como un característico perfil, igual o mayor que la vaina axilante; la porción basal del perfil es membranácea y 2-carinada, terminada en dos fuertes aristas largas y divergentes

a modo de prolongación de las nervaduras carinales. Vainas basales más cortas que los entrenudos, abiertas y de márgenes membranáceos. Lígulas pestañosas. Láminas cortas, planas o conduplicadas, generalmente cubiertas con una secreción algodonosa. Inflorescencias con 1–4 (6) espiguillas subsésiles incluidas formando fascículos con dos hojas terminales, verde claro o teñido de púrpura. Espiguillas sésiles o brevemente pediceladas, dorsiventral- o lateralmente comprimidas, con raquilla frágil o tenaz, a menudo dimórficas en cuanto a la articulación de la raquilla, número, forma, textura y pilosidad de las glumas y sexualidad. Glumas 1–2 o ausentes, iguales o sub-iguales, menores, iguales o superando a la espiguilla, 1-nervadas, membranáceas o coriáceas, a menudo curvadas. Lemma 3–5–7-nervada, membranácea o coriácea, 1–3 aristada con aristas de 0,5–4,5 mm, 2–4-lobuladas, los lóbulos separados por las aristas, con mechones de pelos o completamente pilosas en la base. Pálea más corta que la lemma, 2-carinada, envolviendo la flor, lanceolada, espatulada o en forma de lira. Lodículas 2, o ausentes, membranáceas, libres o soldadas a los márgenes de la pálea. Flores 2–10. Estambres 3 ó 2, exertos, a veces reducidos a estaminodios; androginóforo presente. Ovarios con 2 largos estilos y estigma papiloso-piloso. Cariopsis dorsiventralmente comprimida con escutelo que a veces llega a la mitad de su longitud e hilo punctiforme.  $x = 8$ ,  $2n = 16$ .

**Distribución y hábitat.** Género americano con seis especies y distribución disyunta en las Américas: *M. squarrosa* y *M. pulchella* crecen en América del Norte mientras que las restantes cuatro especies son de América del Sur, distribuidas en la Argentina, Bolivia, Chile y sur del Perú. Habitan en regiones áridas y semiáridas, en áreas abiertas de llanuras y montañas, en suelos modificados, areno-pedregosos y lecho de ríos y arroyos.

***Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla, comb. nov.** *Triodia pulchella* Kunth, Nov. Gen. Sp.1: 155–156. 1815 [1816]. *Koeleria pulchella* (Kunth) Spreng., Syst. Veg. (ed. 16) [Sprengel] 1: 332. 1824 [1825; publ. fines de 1824]. *Uralepis pulchella* (Kunth) Kunth, Révis. Gramin. 1: 108. 1829. *Tricuspis pulchella* (Kunth) Torr., Pacif. Railr. Rep. 4 (5, no. 4) [Whipple]: 156. 1857. *Dasyochloa pulchella* (Kunth) Willd. ex Rydb., Colorado Exp. Sta. Bull. 100: 18, 37. 1906. *Tridens pulchellus* (Kunth) Hitchc., Fl. Calif. [Jepson] 1: 141. 1912. *Erioneuron pulchellum* (Kunth) Tateoka, Amer. J. Bot. 48: 572. 1961. TIPO: Mexico. In subfrigidis, siccis, aprics reginii Mexicani inter Guanaxuati, Mina de Belgrado et Cubilete, *F. W. H. A. Humboldt & A. J. A. Bonpland s.n.* [HOLOTIPO P cb 00669430; ISOTIPO B-W 2046, US 91469! (fragmento)].

*Sieglingia pulchella* (Kunth) Kuntze var. *parviflora* Vasey ex L. H. Dewey, Contr. U.S. Natl. Herb. 2(3): 538. 1894. TIPO: United States of America, Western Texas, *V. Havard* 7 (probable HOLOTIPO US 908213 cb 00141433).

Plantas perennes, monoicas, arrosetadas, menores a 12 (15) cm de altura, estolones de 3–7 cm. Cañas de hasta 10 cm con entrenudos cortos de 2–3,5 cm. Vainas glabras, abiertas, con márgenes membranáceos y pelos en la garganta. Lígulas pestañosas con pelos de 3–5 mm. Láminas acuminadas, de 2–6 cm, a veces curvada, superficie abaxial escabrosa y adaxial escabrusa, Inflorescencias de 2–4 espiguillas cortas de 1–2,5 cm de largo y 1–1,5 cm de ancho. Espiguillas subsésiles o cortamente pediceladas de 6–9 mm, (4)6–10-floras, con la raquilla articulada arriba de las glumas. Glumas 2, subiguales, glabras, acuminadas, 1-nervias, con márgenes membranáceos. Lemma densamente pilosa de 4–5,5 mm, bipartida, 1-aristada, aristas de 2,5–4 mm, 3-

nervadas. Pálea de 2,5–3,5 mm, ciliada en el ápice. Lodículas no vascularizadas. Estambres 3. Anteras de 0,2–0,4 mm. Cariopsis de 1–1,5 mm, translúcido y mácula que no alcanza la mitad del fruto.  $x = 8$ ,  $2n = 16$ .

**Distribución y hábitat.** *Munroa pulchella* crece en el oeste de Estados Unidos (Arizona, California, Nevada, Utah, Colorado, nuevo México, Texas) y en el noroeste de México (Aguas Calientes, norte de Baja California, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Querétaro, México, Nuevo León, San Luis Potosí, Sonora, Tamaulipas y Zacatecas).

**Referencias.** La descripción taxonómica de las otras especies de *Munroa* pueden encontrarse Anton & Hunziker (1978). Parte de estos resultados y esta decisión taxonómica fue previamente publicada: **L.D. Amarilla**, J.O. Chiapella, N. Nagahama & A.M. Anton. 2013. Inclusion of *Dasyochloa* in the amphitropical genus *Munroa* (Poaceae, Chloridoideae) based on morphological evidence. *Darwiniana*, nueva serie. 1(2): 241-252. En esta tesis se sustenta esta decisión taxonómica con evidencia cromosómica y molecular.

**Clave artificial para identificar las especies de *Munroa***

1. Androceo trímero (estambres o estaminodios). Inflorescencias con 2-4 espiguillas. Plantas norteamericanas..... 2
1. Androceo dímero (a veces con estaminodios). Inflorescencias con (1) 2-3 espiguillas. Plantas sudamericanas..... 3
- 2(1). Espiguillas dimórficas: *las laterales* con glumas coriáceas y pilosas, raquilla tenaz y flores pistiladas, *las terminales* con glumas membranáceas y pubescentes, raquilla frágil, desarticulando por encima de las glumas y entre los antecios y flores perfectas. Lemma de 2,5–3,2 mm, 1–aristada, arista de 0,8–1,2 mm. Plantas ginomonoicas..... *M. squarrosa*
2. Espiguillas monomórficas: glumas membranáceas, glabras, con raquilla frágil, desarticulando sobre las glumas y entre los antecios y flores perfectas. Lemma de 4,0–5,8 mm, profundamente hendida con 2 lóbulos separados por una arista central, pilosa sobre los nervios, aristas de 2,0–4,0 mm. Plantas monoicas..... *M. pulchella*
- 3(1) Raquilla tenaz. Antecios 1–4. Glumas, cuando presentes, coriáceas y punzantes, Lemma coriácea, 3-nervada, 1-aristada. Plantas monoicas o ginomonoicas..... 4
3. Raquilla frágil, desarticulando por encima de las glumas y entre los antecios. antecios 6–10. Glumas y lemma membranáceas, 2–hendidas y 4–lobadas, 1 o 3 aristadas. Plantas ginomonoicas..... 5
- 4(3). Inflorescencias con un mechón de pelos blancos en la base, raquis corto con entrenudos evidentes. Espiguillas 2(3). Glumas 2, duras, punzantes y geniculadas.

Antecios 2–3. Lemma 2,5–5,0 mm long., arista de 0,8–1,5 mm long. Plantas monoicas..... *M. argentina*

4. Inflorescencias glabras, raquis extremadamente breve, con entrenudos virtuales. Espiguillas 2–3. Glumas ausentes. Antecios 1–4. Lemma de 4,5–6,0 mm long., arista de 0,4–0,9 mm long. Plantas ginomonoicas..... *M. mendocina*

5(3). Lemma de 2,9–3,8 mm long, 2–hendida, con el nervio central extendido en una arista central de 0,5–1,0 mm long. Pálea en forma de lira..... *M. decumbens*

5. Lemma de 3,0–5,0 mm long., 4–lobada, 3 aristada. Arista de 1,0–4,5 mm long. Pálea en forma de espátula..... *M. andina*

## Capítulo II

### Estudios evolutivos y de biogeografía histórica en *Munroa*

## **Antecedentes**

Durante mucho tiempo, los biogeógrafos han centrado su atención en comprender las causas que subyacen a los patrones de distribución aislada y disyunta de las especies. Existe un importante número de ejemplos de especies y géneros de plantas de América del Norte con distribuciones disyuntas que están aisladas de sus contrapartes en América del Sur (Raven, 1963; Wen & Ickert-Bond, 2009). Varias hipótesis se han postulado acerca del origen de las distribuciones disyuntas en plantas (Johnston, 1940; Raven, 1963; Cruden, 1966; Barbour, 1969; Solbrig, 1972; Williams, 1975; Allred, 1981; Carlquist, 1983; Simpson & Neff, 1985; Peterson & Columbus, 1997; Wen & Ickert-Bond, 2009; Donoghue, 2011; Moore & al., 2012; Masson & Kadereit, 2013; González & al., 2014). Estas hipótesis se pueden resumir en:

1) Hipótesis de migración, que sugiere que las poblaciones ancestrales migraron por distancias cortas a través de zonas tropicales utilizando islas áridas o semiáridas (como corredores de altas montañas), o migraron directamente a través de un antiguo corredor árido o semiárido. Sin embargo algunos autores (Morrell & al., 2000; Moore & al., 2006; Escudero & al., 2010), creen que es poco probable que estos hábitats “adecuados” hayan existido cuando ocurrió la divergencia de la mayoría de los clados disyuntos de plantas de América del Norte y del Sur.

2) Hipótesis de evolución paralela, que postula que los taxones estrechamente relacionados divergieron de ancestros tropicales ampliamente distribuidos donde, luego de desaparecer las poblaciones intermedias, las poblaciones de los

extremos de la distribución global se diferenciaron hasta alcanzar la especiación (Humboldt, 1817; Johnston, 1940; Barbour, 1969; Escudero & al., 2010).

3) Hipótesis de dispersión a larga distancia, que sugiere que una población ancestral pudo haberse dispersado a través de los trópicos, estableciendo poblaciones en áreas muy distantes (Raven, 1963). Esta hipótesis es la más aceptada para explicar la distribución disyunta en plantas de los desiertos del Nuevo Mundo (Simpson & Neff, 1985; Moore & al., 2006; Wen & Ickert-Bond, 2009; Donoghue, 2011; Masson & Kadereit, 2013).

Las disyunciones mejor documentadas para plantas de América del Norte y del Sur son quizás las de *Larrea* (Lia & al., 2001), *Tiquilia* (Moore & Jansen, 2006), *Grindelia* (Moore & al., 2012), *Nitrophila* (Masson & Kadereit, 2013) y *Erioneuron* (Peterson & Ortiz-Díaz, 1998). Se ha sugerido a América del Sur como la zona de origen de estos géneros, que experimentaron una posterior dispersión hacia el norte. Sin embargo, para especies de gramíneas como *Lycurus setosus* (Peterson & Morrone, 1997), *Muehlenbergia torreyi* (Peterson & Ortiz-Díaz, 1998; Peterson, & al., 2007) y *Scleropogon brevifolius* (Peterson & Columbus, 1997), la hipótesis de que las poblaciones se originaron en América del Norte y se dispersaron hacia América del Sur es la más aceptada (Wen & Ickert-Bond 2009; Moore, & al., 2006; Masson & Kadereit, 2013).

Donoghue (2011) indicó que si la vicarianza y la evolución paralela son hipótesis que podrían explicar los patrones de distribución disyunta, entonces los métodos de datación molecular son importantes para establecer una línea de tiempo para la divergencia y para identificar el origen de los eventos (orogénicos o climáticos) que causaron la separación o la extinción de las poblaciones de plantas en ciertas áreas. Además, diversos autores (p. ej. Raven, 1963; Blattner,

2006; Wen & Ickert-Bond 2009; Donoghue, 2011; González & al., 2014) han propuesto que se deben recopilar datos sobre mecanismos de dispersión y aspectos de la biología floral, con el fin de obtener un enfoque integrativo para comprender los patrones de disyunción en diferentes grupos de plantas.

*Munroa* constituye un buen ejemplo para entender las causas de los patrones de distribución disyunta de las gramíneas en las Américas. *Munroa* tiene una distribución anfitropical, ya que dos de sus especies (*M. squarrosa* y *M. pulchella*) habitan en zonas desérticas de Norte América mientras que el resto (*M. andina*, *M. decumbens*, *M. mendocina*, *M. argentina*) viven en las zonas desérticas del centro-oeste de América del Sur (Anton & Hunziker, 1978; Amarilla & al., 2013). Las especies de *Munroa* crecen en áreas abiertas de planicies y montañas, entre altitudes medias (1.000 m s.n.m.) y altas (más de 4.200 m s.n.m.) en suelos aluviales y arenoso-pedregosos, a menudo en lechos de arroyos y ríos secos (Amarilla & al., 2013).

Distintos atributos morfológicos y de la biología reproductiva varían en *Munroa*, y podrían estar asociados tanto a mecanismos de dispersión como al establecimiento de plántulas. Entre los atributos morfológicos se pueden mencionar a los rizomas y estolones elongados, la raquilla frágil o tenaz y a las glumas membranáceas o coriáceas, que cuando coriáceas, son afiladas, aristadas y geniculadas (para su sujeción al pelo o plumaje de animales). En cuanto a los atributos de la biología reproductiva, existen especies monoicas o ginomonoicas y que pueden ser anuales o perennes. La dispersión también se produce por pequeños disemínulos como los antecios (en especies con raquilla frágil) o segmentos de la inflorescencia (en especies con raquilla tenaz) (Anton & Hunziker, 1978).

En base a lo expuesto surgieron las siguientes preguntas:

- ✓ ¿Cuándo se produjo la diversificación de *Munroa*?
- ✓ ¿Cómo y dónde se originó el patrón de distribución actual de sus especies?
- ✓ ¿Cuáles fueron los atributos morfológicos que favorecieron la dispersión y establecimiento de las especies en Norte o Sudamérica?
- ✓ ¿Qué eventos orogénicos o climáticos ocurrían en las Américas durante la diversificación de *Munroa* y cómo pudieron haber contribuido al patrón de distribución actual de sus especies?

Para responder a estas preguntas, me propuse los siguientes **objetivos**:

- I. Reconstruir las relaciones filogenéticas entre las especies de *Munroa* en un contexto filogenético amplio, considerando a Chloridoideae, para estimar el tiempo de divergencia de los linajes.
- II. Estimar la evolución de sus áreas ancestrales.
- III. Estimar la evolución de los caracteres ancestrales asociados a la dispersión.
- IV. Evaluar y discutir los resultados en un contexto de biogeografía histórica.

A modo de hipótesis, anticipo que la diversificación de *Munroa* tuvo lugar a partir del Mioceno medio-tardío, que la distribución actual de sus especies se produjo por dispersión a larga distancia y que atributos tales como la el hábito, la sexualidad y la forma y textura de las glumas fueron claves para la dispersión y establecimiento de *Munroa* en las Américas.

## **Materiales y Métodos**

### **Material vegetal y especies incluidas**

El presente estudio incluyó 167 terminales que representan 163 taxones de la subfamilia Chloridoideae (seis taxones de *Munroa*) y cuatro taxones que fueron considerados grupos externos (*Chasmanthium latifolium* (Michx.) H.O. Yates, *Aristida scribneriana* Hitchc., *Rytidosperma pictum* (Nees & Meyen) Nicora, y *Danthonia compressa* Austin), todos los representantes y las secuencias de ADN (*ndhF*, *rps16-trnK*, *rpl32-trnL* y *ndhA*) de Chloridoideae y extragrupos fueron seleccionados en base al trabajo de Peterson & al. (2010) y se utilizó a *C. latifolium* como grupo externo funcional. En cuanto a *Munroa*, las secuencias de ADN utilizadas son las mismas que en el capítulo 1. Este amplio muestreo fue necesario para incluir los puntos de calibración en los análisis de datación molecular. Los números de acceso de GenBank de las secuencias nuevas (30) y de las tomadas de Peterson & al. (2010), así como de los respectivos datos de colección de los especímenes, se citan en Tabla S1 (ídem Cap. 1).

### **Alineamiento de secuencias de ADN y análisis filogenéticos**

El pre-alineamiento se realizó en Mega 5 (Tamura & al., 2011) utilizando el algoritmo Muscle (Edgar, 2004) y posteriormente se lo optimizó a ojo. Para el análisis de inferencia Bayesiana se usaron tres conjuntos de datos: i) ITS + cpADN combinados, ii) todas las regiones de ADN particionadas, iii) todas las regiones de ADN combinadas. Los modelos de evolución molecular se determinaron en jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008), utilizando el criterio de información Akaike y los valores de búsqueda que vienen por defecto en el

programa, para cada una de las regiones de ADN del cloroplasto y para la región nuclear. Los mejores modelos de sustitución obtenidos se muestran en la Tabla 1. Los análisis de Inferencia Bayesiana se realizaron usando la aplicación Teragrid NSF de MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003) en el portal de internet de CIPRES Science Gateway (Miller & al., 2010). Se corrieron dos cadenas independientes en cada corrida, con tres cadenas calientes y una fría, corriendo 10.000.000 de generaciones, muestreando un árbol cada 1.000 generaciones. La estacionalidad de las cadenas se determinó con base en la convergencia de los valores de verosimilitud, el 25 % de los árboles iniciales se consideraron como *burn-in* y se eliminaron. Las probabilidades posteriores (PP) de los clados se determinaron a partir de un consenso de mayoría (50%) de los árboles retenidos. Para decidir sobre la mejor estrategia de partición se realizaron análisis usando *Bayes factors*. Los factores de Bayes se calculó a partir de las medias armónicas de los valores de verosimilitud estimadas para cada uno de las matrices de datos particionadas, utilizando el comando *sump* en MrBayes v. 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). La decision para seleccionar las matriz de datos se basó en el criterio  $2\ln$  de *Bayes factor* ( $B_{10}$ ), en el cual valores de  $\leq 0$  son negativos y  $\geq 10$  son positivos muy robustos (Kass & Raftery, 1995).

### **Tiempos de divergencia**

Los tiempos de divergencia de *Munroa* se estimaron bajo un enfoque Bayesiano implementado en BEAST v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007) con la misma matriz de datos que la utilizada en los análisis filogenéticos de inferencia Bayesiana. Se constriñeron los nodos de Chloridoideae y *Distichlis* como monofiléticos. Para calibrar Chloridoideae se utilizaron las estimaciones de Bouchenak-Khelladi & al. (2009, 2010), que indican que la radiación de la

subfamilia ocurrió hace aproximadamente 30 (35) Ma. El nodo de Chloridoideae se constriñó usando el *prior* de distribución log-normal (*offset*: 30, Log (media): 0; Log (DE): 1, intervalo 35.18–30.19). El nodo de *Distichlis* se calibró utilizando evidencia fósil de células epidérmicas con cuerpos redondos de sílice y células triangulares subsidiarias de los estomas, encontrados por Dugas & Retallack (1993). Este nodo se constriñó a una edad mínima de 14 Ma y el *prior* de distribución log-normal (*offset*: 14, Log (media): 0; Log (DE): 1, intervalo: 19.18–14.19) (Bouchenak-Khelladi & al., 2010). Los análisis se corrieron bajo el modelo de reloj molecular no correlacionado asumiendo una distribución de log-normal (UCLD). Los modelos de evolución molecular para cada partición fueron los mismos que se usaron para los análisis filogenéticos de Inferencia Bayesiana (GTR+G+I). Se seleccionó el proceso de especiación de Yule como el *prior* del árbol y se aplicó el mismo modelo UCLD para todas las particiones. Se corrieron cuatro análisis MCMC, cada uno con 100 millones de generaciones muestreando cada 10.000 generaciones. Los diagramas de tiempo de todos los parámetros se analizaron en Tracer v. 1.5 (Rambaut & Drummond, 2009) para revisar que los tamaños efectivos de muestreo ( $ESS > 200$ ), la convergencia de los modelos de verosimilitud y los parámetros de cada corrida fueran los adecuados. Los árboles de las diferentes corridas se combinaron en Log Combiner v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007), descartando el 25% de los árboles iniciales de cada corrida MCMC como *burn-in*. Los árboles se resumieron utilizando la opción árbol de clados de máxima credibilidad (MCC) en Tree Annotator v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). El único árbol resultante se visualizó en FigTree v. 1.5.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

### **Reconstrucción de estados de caracteres ancestrales**

La reconstrucción de los estados de caracteres ancestrales se realizó en Mesquite v. 2.75 (Maddison & Maddison, 2011), bajo el criterio de verosimilitud utilizando el modelo Mk1. Las secuencias de ADN utilizadas fueron las mismas de la matriz de datos concatenados (intrón de *ndhA*, *ndhF*, *rpl32-trnL*, *rps16-trnK*, ITS), usando un total de 12 taxones como terminales (el clado Scleropogoninae: *Scleropogon brevifolius*, *Swallenia alexandrae*, *B. kingii*, *B. benthamiana*, *Erioneuron avenaceum*, *E. nealleyi* y todas las especies de *Munroa*). El archivo de entrada para Mesquite consistió en los 7.500 árboles de Inferencia Bayesiana obtenidos en MrBayes después del *burn-in* (GTR). El árbol consenso del 50 % de mayoría se calculó en Mesquite. Los caracteres morfológicos y sus estados de carácter se codificaron a partir de observaciones de especímenes de herbario Tabla S1 y se complementaron con literatura (Anton & Hunziker, 1978; Amarilla & al., 2013). Se codificaron cinco atributos morfológicos como caracteres discretos: Forma de vida (hábito) perenne 0, anual 1; Desarticulación de la raquilla: ausente 0, presente 1; Sexualidad: monoica 0, ginomonoica 1, andromonoica 2; Glumas: ausentes 0, presentes 1; Consistencia de la gluma: membranácea 0, coriácea 1. La matriz resultante se muestra en la Tabla S4.

### **Reconstrucción de áreas ancestrales**

La reconstrucción de áreas ancestrales se realizó en el programa RASP beta 1 (Yu & al., 2010, 2011). Este programa implementa un criterio Binario Bayesiano MCMC (BBM), análisis de curvas de tiempo-eventos, y métodos del análisis de Dispersión-Vicarianza (S-DIVA). Con base en los patrones de distribución de las especies conocidas del clado Scleropogoninae y en la historia geológica, se definieron dos áreas para el análisis biogeográfico, (Taylor, 1991; Gregory-

Wodzicki, 2000; Morrone, 2006). Para identificar las áreas biogeográficas, se siguieron estudios previos en América del Sur (Posadas & al., 1997; Morrone, 2006; Antonelli & al., 2009): A –La región templada de Norte América; B –La Zona de Transición Sudamericana. El número máximo de áreas ancestrales establecido fue dos, permitiendo ancestros ampliamente distribuidos. El archivo de entrada para RASP consistió en los 7.500 árboles obtenidos por Inferencia Bayesiana en MrBayes después del *burn-in* (GTR). Los archivos de los árboles se combinaron en RASP para estimar las probabilidades posteriores  $>0,90$  de cada nodo. Se corrieron las cadenas MCMC simultáneamente para 5.000.000 generaciones y la reconstrucciones de estados fue muestreada cada 1.000 generaciones. Se utilizó el modelo fijo JC + G (Jukes-Cantor + Gamma) para los análisis BBM, con una distribución nula de la raíz.

## Resultados

### Reconstrucción filogenética

Los resultados de  $2\ln$  de *Bayes factors* ( $B_{10}$ ) indicaron soportes positivos para todas las particiones i) ITS + cpADN combinados (2,8), ii) todas las regiones de ADN particionadas (3,1), iii) todas las regiones de ADN combinadas (2,5). Con base en esta prueba, el conjunto de datos seleccionado (por el mayor valor  $B_{10}$ ) para los análisis filogenéticos fue la partición que arrojó el mayor valor de *Bayes factors* (3,1). La matriz final consistió de 167 taxones con 4.794 sitios alineados. Los estadísticos más comunes de matriz de datos se muestran en la Tabla 1. La hipótesis filogenética obtenida se muestra en la Figura 1, junto a los tiempos de divergencia del clado *Munroa*. Scleropogoninae es monofilético (BS = 100, PP =

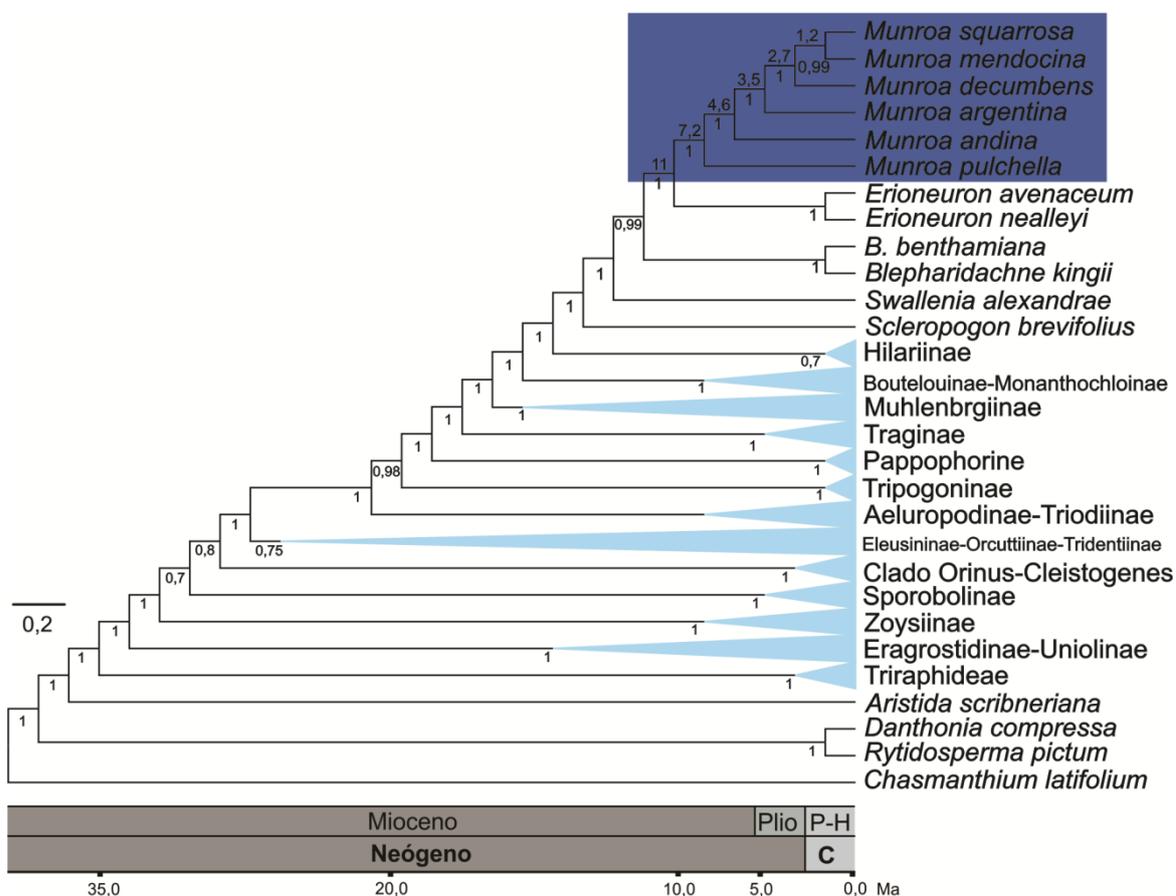
1,0) e incluye a *Munroa*, *Erioneuron*, *Swallenia alexandrae*, *Blepharidachne* y *Scleropogon brevifolius*. *Munroa* resultó monofilético (BS = 100, PP = 1,00) y *M. pulchella* es hermano del resto de los taxones; las relaciones filogenéticas entre los taxones de *Munroa* son idénticas a las descritas en el capítulo 1.

**Tabla 1.** Resumen de las cuatro regiones de ADN del cloroplasto (cpDNA) y nuclear (ITS) usadas en este estudio.

|  | Intrón de <i>ndhA</i> | <i>ndhF</i> | <i>rpl32-trnL</i> | <i>rps16-trnK</i> | cpDNA | ITS    | cpDNA+ITS |
|--|-----------------------|-------------|-------------------|-------------------|-------|--------|-----------|
| Nº de taxones                              | 164                   | 163         | 165               | 166               | -     | 165    | -         |
| Long. promedio de las secuencias           | 950                   | 725         | 675               | 730               | -     | 650    | -         |
| Long. promedio de las secuencias alineadas | 1154                  | 745         | 1199              | 896               | 3994  | 833    | 4794      |
| Nº de caracteres informativos (MP)         | 377                   | 266         | 425               | 311               | 1384  | 477    | 1830      |
| Long. de los árboles                       | 605                   | 520         | 480               | 610               | 3500  | 3083   | 6123      |
| Índice de consistencia                     | 71                    | 67          | 70                | 72                | 87    | 70     | 81        |
| Índice de retención                        | 80                    | 75          | 81                | 82                | 93    | 80     | 90        |
| AIC  | GTR+G                 | GTR+G+I     | T92+G             | T92+G             | GTR   | K2+G+I | GTR+G+I   |

### Tiempos de divergencia

El cronograma de máxima credibilidad de BEAST para Chloridoideae se muestra en la Figura 2. Los resultados indicaron que la diversificación de Scleropogoninae comenzó en el Mioceno temprano-medio, hace aproximadamente 17,5 (19,5–15,5) Ma. *Munroa* divergió desde el ancestro que compartió con el clado *Erioneuron* en el Mioceno medio, hace aproximadamente 11 (13–9,5) Ma. La diversificación del grupo corona de *Munroa* comenzó en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 7,2 (8,2–6,5) Ma. La divergencia entre *M. squarrosa* y *M. mendocina*, ocurrió en el Pleistoceno medio, hace aprox. 1,2 (2–0,8) Ma.



**Figura 1.** Consenso de 50% de mayoría de inferencia Bayesiana de los análisis filogenéticos de Chloridoideae con énfasis en *Munroa*. Las probabilidades posteriores se indican debajo de las ramas. Las edades en millones de años (Ma) calculadas en BEAST se muestran arriba de las ramas. Las ramas condensadas representan todas las subtribus de Chloridoideae incluidas en este estudio.

### Reconstrucción de estados de caracteres morfológicos ancestrales

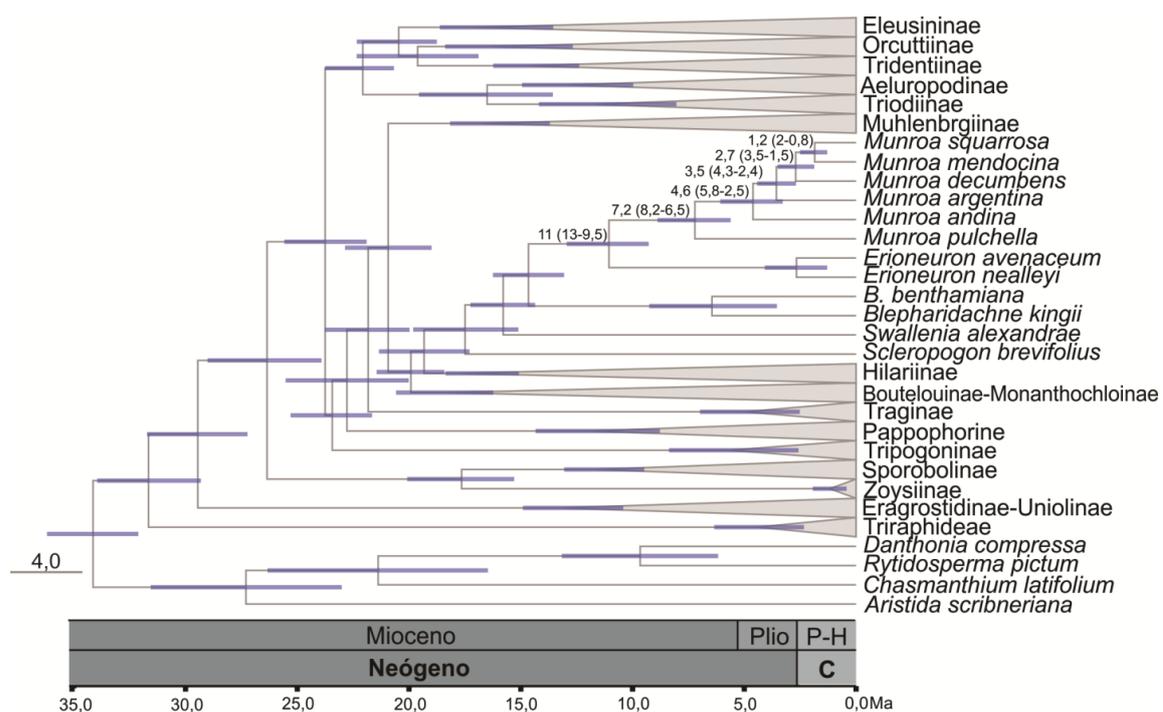
El patrón de evolución de los caracteres morfológicos seleccionados se muestra en la Figura 3. Los ancestros putativos de *Munroa* habrían tenido los siguientes atributos: hábito perenne (PP = 0,92), desarticulación de la raquilla (PP = 0,52), monoicos (PP = 0,70) y glumas membranáceas (PP = 0,99); por otra parte, los ancestros putativos del clado de América del Sur han tenido los siguientes atributos: hábito anual (PP = 0,99), desarticulación de la raquilla (PP = 0,58), ginomonoicos (PP = 0,77) y glumas membranáceas (PP = 0,99). *Munroa pulchella*

presenta un hábito perene, desarticulación de la raquilla, es monoico y sus glumas son membranáceas. Las restantes especies son anuales y ginomonoicas, excepto *M. argentina* (monoico). *M. andina*, *M. decumbens*, y *M. squarrosa* tienen desarticulación de la raquilla y glumas membranáceas. *M. argentina* presenta la raquilla tenaz y sus glumas son coriáceas y *M. mendocina* con raquilla tenaz, carece de glumas.

Dos de los atributos morfológicos de *Munroa* parecen haber evolucionado una vez: la forma de vida anual que evolucionó de la forma de vida perenne y las espiguillas con glumas coriáceas o ausentes que evolucionaron a partir de espiguillas con glumas membranáceas. La raquilla tenaz se habría originado en dos ocasiones a partir de la raquilla frágil. Finalmente, la sexualidad parece haber evolucionado al menos dos veces de monoica a ginomonoica y de ginomonoica a monoica (reversión).

### **Reconstrucción de áreas ancestrales**

El ancestro putativo de *Munroa* se desarrolló en la región Templada de América del Norte (P = 88%); dos eventos de dispersión y uno de vicarianza se recuperaron en este nodo. El área ancestral de todos los ancestros putativos (nodos) restantes de *Munroa* habrían habitado la Zona de Transición Sudamericana (P = 82%). El ancestro común de *M. mendocina* y *M. squarrosa* habría habitado en América del Sur (P = 91%); dos eventos de dispersión y uno de vicarianza se recuperaron en este nodo. En la Figura 4 se presentan los detalles sobre las probabilidades de las áreas ancestrales recuperadas para cada caso.



**Figura 2.** Cronograma obtenido en BEAST con base en los datos de secuencias de ADN de 163 taxones representantes de Chloridoideae. Las edades calculadas en millones de años (Ma) y los intervalos de confianza del 95% se muestran en los nodos. Las ramas condensadas representan todas las subtribus de Chloridoideae incluidas en este estudio.

## Discusión

### Relaciones filogenéticas

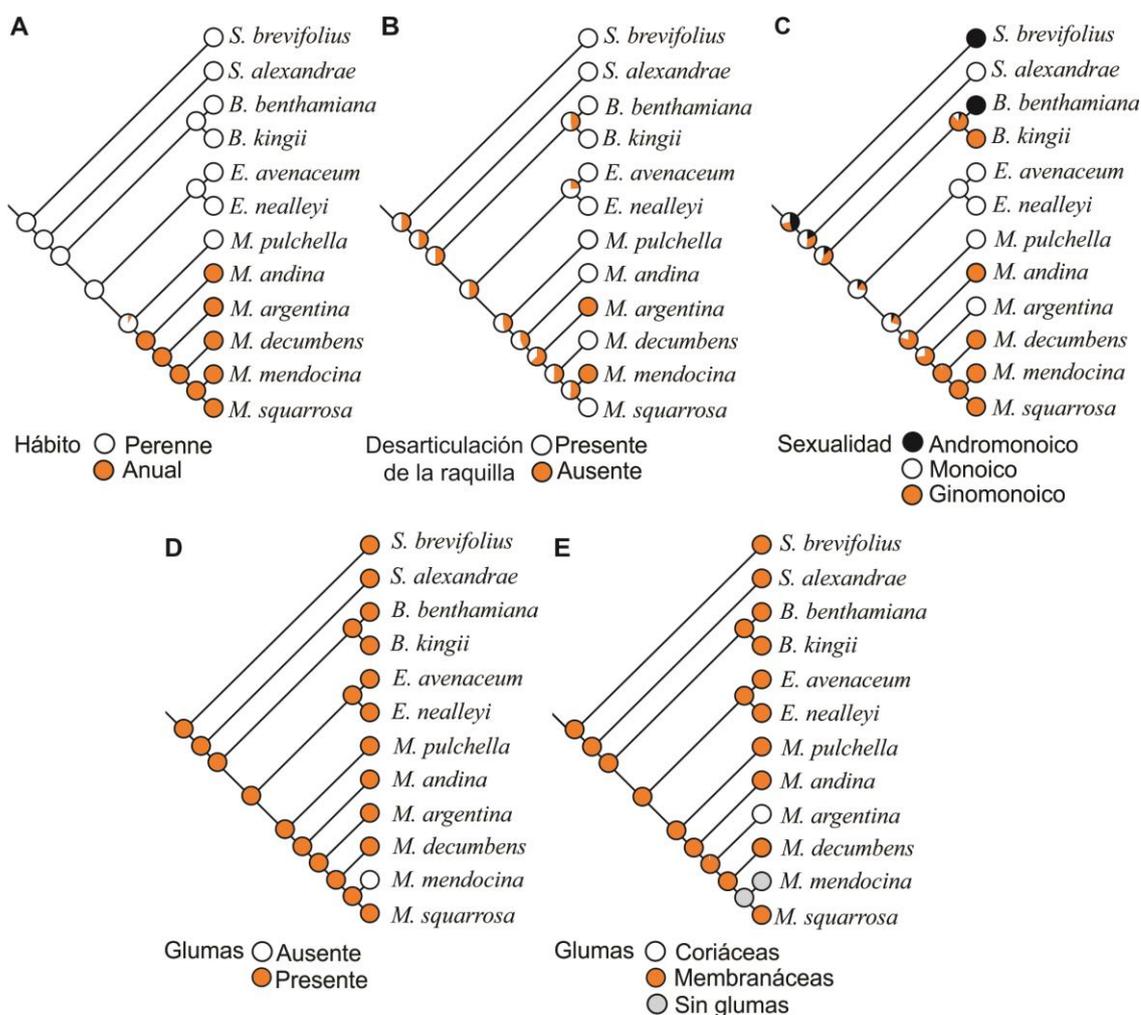
El clado Scleropogoninae es recuperado como monofilético e incluye a *Scleropogon brevifolius*, *Swallenia alexandrae*, *Blepharidachne*, *Erioneuron* y *Munroa*. Este último también fue recuperado como monofilético, comprendiendo los cinco taxones tradicionalmente reconocidos (Anton & Hunziker, 1978) y el recientemente incorporado a partir de la transferencia de *Dasyochloa pulchella* a *Munroa* (Amarilla & al., 2013). Los resultados obtenidos, en general, están de acuerdo con los hallazgos previos de Peterson & al. (2010) al estudiar Chloridpodeae. *M. pulchella* es el taxón hermano de las restantes especies de

*Munroa*, y ni las especies que crecen en América del Norte ni las de América del Sur se recuperaron en clados monofiléticos. *M. pulchella* es perenne, monoica, con raquilla frágil y es morfológicamente menos variable que las otras especies (Parodi, 1934; resultados de esta tesis cfr. Cap. 1). *M. squarrosa*, que fue la última especie en divergir, es anual, ginomonoica, con raquilla frágil y es la especie que presenta mayor variabilidad morfológica (Parodi, 1934; Anton & Hunziker, 1978). El resto de las especies son anuales y presentan un grado intermedio de variación morfológica (Parodi, 1934; Anton & Hunziker, 1978).

La reconstrucción de caracteres ancestrales concuerda con las hipótesis propuestas por Stebbins (1982) para las gramíneas, ya que el hábito perenne y la monoica fueron caracteres ancestrales en *Munroa*. Además, los resultados coinciden con lo propuesto por Stebbins (1982) y Soreng & Davis (1998) quienes expusieron que en los taxones más derivados algunas estructuras se pierden, se reducen o son morfológicamente muy heterogéneos.

### **Tiempos de divergencia y biogeografía histórica**

Los resultados obtenidos son congruentes con el tiempo de origen establecido para Chloridoideae y también con la radiación de gramíneas C<sub>4</sub> en las Américas (Christin & al., 2008, 2009; Vicentini & al., 2008; Osborne & Freckleton, 2009; Edwards & al., 2010; Edwards & Smith 2010). *Munroa* y *Erioneuron* habrían divergido de su ancestro común hace 11 (13-9,5) Ma y la diversificación del grupo corona de *Munroa* habría comenzado en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 7,2 (8,2-6,5) Ma.



**Figura 3.** Reconstrucción de Máxima Verosimilitud de los estados de caracteres ancestrales de *Munroa*. Se consideraron cinco atributos asociados a los síndromes de dispersión. Los gráficos en los nodos indican las probabilidades del estado ancestral para cada carácter seleccionado.

El análisis de reconstrucción de áreas ancestrales muestra la frecuencia relativa más alta para América del Norte como el área ancestral de *Munroa* ( $P = 88\%$ ). La divergencia entre *M. pulchella* de América del Norte y el ancestro común del resto de las especies habría ocurrido (8,2-6,5 Ma) cuando los ambientes áridos y semiáridos estaban disponibles en América del Norte y del Sur para migraciones trans-tropicales (Graham, 1999; Hartley & Chong, 2002; Wen & Ickert-Bond, 2009; Rech & al., 2010; Masson & Kadereit, 2013).



### ¿Vicarianza, evolución paralela o dispersión a larga distancia?

Previo al advenimiento de las técnicas de sistemática molecular, la vicarianza fue la hipótesis más aceptada para explicar las disyunciones entre las plantas de América del Norte y del Sur (Moore & al., 2006), sugiriendo que el área de distribución de los clados actualmente disyuntos se interrumpió por la aparición de barreras ecuatoriales y tropicales para las plantas áridas y polares, eventos que ocurrieron antes del Cenozoico (Du Rietz, 1940; Escudero & al., 2010). Sin embargo, los análisis de datación molecular han encontrado que numerosas disyunciones de plantas se originaron recientemente -como sucede en el caso de *Munroa*-, como para ser explicado por vicarianza. La hipótesis de evolución paralela implica que taxones filogenéticamente muy cercanos y adaptados a la aridez provengan de ancestros tropicales ampliamente distribuidos (ver introducción) (Johnston, 1940; Barbour, 1969). Con respecto a *Munroa*, que resultó anidada en el clado Scleropogoninae, no existen representantes tropicales en este grupo y no se conocen fósiles de Scleropogoninae para las áreas geográficas intermedias. Por lo tanto, la dispersión a larga distancia parece ser la única explicación plausible para la distribución actual de *Munroa*, tal como ha sido sugerido para otras taxones que presentan disyunciones anfitropicales (Xiang & Soltis, 2001; Sanmartín & Ronquist, 2004; de Queiroz, 2005; Renner, 2005; Blattner, 2006; Moore & al., 2006; Escudero & al., 2010; Jakob & al., 2010; Donoghue & al., 2011; Popp & al., 2011; Moore & al., 2012; González & al., 2014).

*Munroa* tiene especies endémicas en América del Norte y del Sur, con un ancestro que se habría originado en las zonas áridas-semiáridas del Hemisferio Norte y más tarde se habría expandido hacia el Hemisferio Sur, como lo propusieran Bell & Donoghue (2005) para algunas Valerianaceae, Moore & al.

(2006 a,b) para algunas especies de *Tiquilia* e Inda & al. (2008) para algunas Loliinae. De acuerdo a nuestros resultados filogenéticos y de biogeografía histórica, en *Munroa* habrían ocurrido dos eventos de dispersión a larga distancia, por lo que constituye un caso adicional al patrón observado para *Lycium/Grabowskia* (Miller, 2002; Levin & Miller, 2005), *Ephedra* (Ickert-Bond & Wojciechowski, 2004; Huang & al., 2005), *Hoffmannseggia* (Simpson & al., 2005) y *Tiquilia* (Moore & al. 2006) o para gramíneas como *Lycurus setosus* (Peterson & Morrone, 1997), *Muehlenbergia torreyi* (Peterson & Ortiz-Díaz, 1998), *Scleropogon brevifolius* (Peterson & Columbus, 1997) y *Hordeum* (Blattner, 2006). El patrón de distribución actual de *Munroa* implica que los dos eventos de dispersión necesarios para explicarla habrían ocurrido en direcciones opuestas, el primero de norte a sur y el segundo de sur a norte. La distribución limitada a Argentina que presenta *M. mendocina* puede ser atribuida a un proceso de diversificación secundario, lo que coincide con los casos de *Ampelopsis* (Nie & al., 2012) y *Ephedra* (Loera & al., 2012).

Bajo la hipótesis de dispersión a larga distancia, es de esperar que los eventos de dispersión responsables de estas disyunciones anfitropicales hayan ocurrido cuando los ambientes áridos y semiáridos ofrecían condiciones adecuadas para albergar a los migrantes transtropicales (desde el Mioceno tardío, 7–5 Ma; Axelrod, 1979; Graham, 1999; Hartley & Chong, 2002; Jakob & al., 2010). La diversificación del grupo corona del clado *Munroa* se inició en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 7,2 (8,2-6,5) Ma, consistente con lo planteado por esta hipótesis. No existen sin embargo fósiles de *Munroa* u otra evidencia para identificar su presencia en áreas intermedias y determinar una migración gradual, por lo que poblaciones ancestrales no se habrían dispersado por distancias cortas

a través de los trópicos cruzando parches de vegetación árida o semiárida, sino que es más probable que hayan migrado directamente por dispersión a larga distancia (Raven, 1963; Solbrig, 1972; Williams, 1975).

### **Caracteres ancestrales involucrados en la dispersión y el establecimiento de plántulas**

En Poaceae, muchos de los atributos asociados a las adaptaciones para la dispersión y el establecimiento de plántulas (por ejemplo, la textura, las aristas y la pubescencia de las glumas, el tamaño y número de antecios por espiguilla, los rizomas y estolones elongados, la desarticulación de la raquilla, la sexualidad, el ciclo de vida anual, etc.) son relativamente propensos a paralelismo, convergencia, e incluso reversión (Barkworth & Everett, 1987; Davidse, 1987; Soreng & Davis, 1998; Soreng & al., 2007). Los caracteres adaptativos más importantes son aquellos que permiten a las gramíneas crecer en tierras áridas abiertas, sobre suelos aluviales, arenosos o pedregosos, y en arroyos o ríos secos, así como los que facilitan la epizocoria e hidrocoria (Blattner, 2006). Los ancestros putativos de *Munroa* y en particular los de *M. pulchella* (norteamericana) fueron perennes y el ancestro de *M. andina* (sudamericana) fue anual; este cambio probablemente aceleró su establecimiento después del proceso de dispersión. *M. squarrosa* es norteamericana y anual y el ancestro compartido con *M. mendocina* (sudamericana) fue anual, rasgo que probablemente favoreció la dispersión y el establecimiento de plántulas de *M. squarrosa* en América del Norte. Un patrón similar ha sido reportado para *Hordeum* (Jakob & al., 2010).

Todas las especies de *Munroa* se dispersan por disemínulos; en las especies con raquis articulados (*M. pulchella*, *M. andina*, *M. decumbens*, *M. squarrosa*),

estos disemínulos son los antecios o espiguillas y que pueden contener hasta 10 semillas, mientras que en las especies con raquis tenaz (*M. argentina*, *M. mendocina*), es la inflorescencia parcial o completa, con al menos 5 semillas, la que se desprende y participa en el proceso de diseminación (Anton & Hunziker, 1978). Las especies con raquis articulado, al “disparar” los disemínulos a diferentes distancias y alejados entre sí, pueden incrementar la probabilidad de la dispersión y el establecimiento de plántulas en nuevos hábitats (Stebbins, 1982). Aunque los resultados obtenidos no son concluyentes como para distinguir si el ancestro putativo de los taxones tenía raquilla frágil o tenaz, los taxones actuales que estuvieron implicados en cada uno de los eventos de dispersión (norte a sur y sur a norte) presentan raquilla frágil, por lo que habrían sido relevantes en el proceso de dispersión y establecimiento de *Munroa*.

En cuanto a las atributos de las glumas, todos los taxones de *Munroa* (excepto *M. mendocina*, con glumas ausentes) y sus ancestros putativos tienen glumas con aristas, rasgo que puede incrementar la probabilidad de dispersión, ya que permitiría la fijación al pelo o plumaje de animales, como se ha reportado para *Hordeum* (Jakob & al., 2010). En relación a esto, *M. argentina* con glumas coriáceas, afiladas y geniculadas, es la más ampliamente distribuida en América del Sur, mientras que *M. mendocina*, que tiene distribución más restringida, carece de glumas.

La movilidad de los disemínulos por el viento (anemocoria), agua (hidrocoria) y aves (epizoocoria) ha sido documentada en especies de *Munroa* (Anton & Hunziker, 1978; Amarilla, obs. pers.) y probablemente fueron los vectores que facilitaron su dispersión a larga distancia; tanto en dirección norte-sur como en dirección sur-norte. Patrones y explicaciones semejantes han sido recientemente

reportados para plantas herbáceas con distribución anfitropical desértica y polar en las Américas (Blattner, 2006; Moore & al., 2006; Escudero & al., 2010; Jakob & al., 2010; Donoghue & al., 2011; Popp & al., 2011; Moore & al., 2012; González & al., 2014). Además, para reforzar la idea de dispersión directa a larga distancia, también se puede especular que los torbellinos locales y transoceánicos pudieron transportar a los pequeños antecios o a las inflorescencias parciales de *Munroa* en ambas direcciones, como se ha propuesto para varias plantas herbáceas con el mismo patrón de distribución de *Munroa* (Raven, 1963; Wen & Ickert-Bond, 2009).

## Conclusiones

*Munroa* comprende dos taxones norteamericanos (*M. pulchella*, *M. squarrosa*) y cuatro sudamericanos (*M. andina*, *M. argentina*, *M. decumbens*, *M. mendocina*). La dispersión a larga distancia y no simultánea es el mejor proceso para explicar la distribución anfitropical disyunta que presenta *Munroa*. Este proceso implicó un evento de dispersión directa desde América del Norte hacia América del Sur, una expansión en su área de distribución hacia el este y oeste de los Andes, y una dispersión a larga distancia desde América del Sur hacia América del Norte.

La divergencia del clado *Munroa* habría ocurrido en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 7 Ma en Norteamérica. La expansión y colonización de nuevos hábitats en América del Sur comenzó hace aproximadamente 4,6 Ma, con el “nacimiento” de *M. andina*. Los eventos de diversificación, dispersión y establecimiento de los linajes de *Munroa* estarían relacionados con las condiciones áridas del Plioceno durante el Neógeno y con las oscilaciones

climáticas del Pleistoceno durante el Cuaternario, condiciones que eran propicias para el arribo y establecimiento de migrantes transtropicales. El cambio en la forma de vida de perenne a anual en *Munroa* y el cambio en algunos caracteres asociados a la dispersión y al establecimiento (tales como el hábito, la sexualidad, la desarticulación de la raquilla y la forma y consistencia de las glumas) han sido importantes para la dispersión de los taxones y establecimiento de sus plántulas en nuevas áreas. Sin duda se requiere un mayor número de trabajos biogeográficos, complementarios a los análisis filogenéticos que incluyan estudios demográficos y de modelado de nicho ecológico para entender los mecanismos físicos que han contribuido en la evolución y distribución de las floras disjuntas en las Américas.

**Referencias.** Con los resultados de este capítulo se elaboró un trabajo científico que ha sido enviado para su publicación en la revista BOTANICAL JOURNAL OF THE LINNEAN SOCIETY. **L.D. Amarilla**, J.O. Chiapella, V. Sosa, N.C. Moreno, A.M. Anton. A tale of North and South America: time and mode of dispersal of the genus amphitropical *Munroa* (Poaceae, Chloridoideae). *Botanical Journal of the Linnean Society*. Enviado.

## Capítulo III

### Estudios filogeográficos y de modelado de nicho ecológico en *M. argentina*

## Antecedentes

La elevación de los Andes durante el Neógeno tuvo un impacto importante en la historia evolutiva de la biota sudamericana. Este evento geomorfológico ocurrió en periodos discretos, progresando de sur a norte y de oeste a este (Taylor, 1991; Hoorn, 1993; Hoorn & al., 1995; Gregory-Wodzicki, 2000; Garziona & al., 2008); una vez formada, esta cadena montañosa se convirtió en la única barrera para la circulación atmosférica en el hemisferio Sur (Hoorn & al., 1995; Garziona & al., 2008). Las elevaciones más importantes ocurrieron en dos eventos que tuvieron lugar durante el Mioceno medio (12 Ma) y a inicios del Plioceno (5 Ma; Ramos & Ghiglione, 2008). Como resultado de estos procesos, se generó el efecto sombra de lluvia (*rain shadow*), que tuvo un profundo efecto sobre el clima (Le Quesne & al., 2008; Hoorn & al., 2010). Se formó, entre otras cosas, una región angosta con escasas precipitaciones (< 300 mm/año) conocida como la Diagonal Árida (Cabrera & Willink, 1980) o Zona de Transición Sudamericana (*South American Transition Zone*, SATZ) (Morrone, 2006). Esta zona aloja una biota particular, en la cual la interacción entre factores bióticos y abióticos promovió la diversificación, interacciones ecológicas singulares y la aparición de nichos ecológicos nuevos (Palma & al., 2005; Morrone, 2006). Sobre la base de los patrones de distribución de grupos determinados de plantas y animales, esta zona ha sido subdivida en seis provincias biogeográficas: Páramo Norandino, Puna, Desierto Costero Peruano, Atacama, Prepuna y Monte (Morrone, 2006). Estudios filogenéticos recientes en plantas (Antonelli & al., 2009, 2011; Guerrero & al., 2013; p. ej. Rubiaceae, *Chaetanthera*, *Malesherbia*) y animales (*Liolaemus*) (Guerrero & al.,

2013) han demostrado que la elevación de los Andes actuó en dos aspectos principales sobre las biotas Sudamericanas; por un lado, creó una ruta de dispersión de linajes y por otro, propició escenarios de diversificaciones rápidas a través de especiación alopátrica, fragmentación de hábitats y desplazamiento ecológico de hábitats. En este último sentido se destaca el desplazamiento de tierras altas a selvas de montaña y el de vegetación árida a semiárida (von Hagen & Kadereit, 2003; Bell & Donoghue, 2005; Winkworth & Donoghue, 2005; Hughes & Eastwood, 2006; Pirie & al., 2006; Jakob & al., 2010; Antonelli & al., 2009; Popp & al., 2010; Guerrero & al., 2013; González & al., 2014).

Las oscilaciones climáticas del Neógeno tardío y del Cuaternario que implicaron varios ciclos de glaciación, influenciaron los modelos de distribución de especies y comunidades en la tierra y, aunque la aridificación sucedió principalmente durante el Plioceno, las fluctuaciones climáticas durante el Pleistoceno también contribuyeron a la expansión de las regiones áridas y semiáridas de Sudamérica (Comes & Kadereit, 1998; Hewitt, 2000; Jackson & Overpeck, 2000; Hartley & Chong, 2002; Williams & al., 2004; Palma & al., 2005; Bouchenak-Khelladi & al., 2010; Edwards & al., 2010; Viruel & al., 2012; Guerrero & al., 2013). Tales cambios ambientales también tuvieron un efecto sobre procesos micro-evolutivos a nivel de especie, influenciando el flujo génico, causando ciclos demográficos de expansión/contracción y cuellos de botella genéticos (Avice, 2000).

Las consecuencias más importantes sobre la historia evolutiva de los organismos de la áreas afectadas y no afectadas directamente por las glaciaciones, tales como la supervivencia en refugios, la variación genética de sus poblaciones, el número y tamaño poblacional y, el *tempo* y *modo* de recolonización, han sido documentadas tanto para taxones norteamericanos (p.

ej., Soltis & al., 1997; Abbott & al., 2000; Kadereit & al., 2004; Koch & al., 2006; Soltis & al., 2006; Alsos & al., 2007) como sudamericanos (p. ej., Jakob & al., 2010; Guerrero & al., 2013; Baranzelli & al., 2014). Es insuficiente, sin embargo, lo que se conoce para especies de plantas que habitan en las regiones áridas y semiáridas del Hemisferio sur (Turchetto-Zolet & al., 2013; Guerrero & al., 2013). Sólo el extremo sur de Sudamérica y Nueva Zelanda se encuentran en situaciones geográficas comparables con las áreas afectadas por las glaciaciones del Hemisferio norte. Aunque los glaciares en el Hemisferio sur estuvieron en su mayoría restringidos a las cadenas montañosas de latitudes altas, en las latitudes bajas y medias, las temperaturas medias más bajas y los regímenes de precipitación variable probablemente influyeron sobre los tipos de vegetación y la distribución de la misma (Hollin & Schilling, 1981; Rabassa & Clapperton, 1990; Hulton & al., 2002; Jakob & al., 2009; Mathiasen & Premoli, 2010; Cosacov & al., 2010; Acosta & Premoli, 2010; Sersic & al., 2011; Premoli & al., 2012; Ossa & al., 2013; Cosacov & al., 2013).

Estudios moleculares filogenéticos y filogeográficos recientes tanto en animales como en plantas, se han enfocado en entender la historia evolutiva en algunas provincias de la SATZ (p. ej. Hollin & Schilling, 1981; Rabassa & Clapperton, 1990; Hulton & al., 2002; Luebert & Wen, 2008; Jakob & al., 2009; Edwards & al., 2010; Schmidt-Jabaily & Sytsma, 2010; Viruel & al., 2012; Guerrero & al., 2013; Ossa & al., 2013; Baranzelli & al., 2014). Estos estudios sugieren que la historia evolutiva de los taxones en cuestión está más vinculada a los procesos de aridificación que originaron las SATZ, y a la elevación final de los Andes del Sur (aprox. 5 Ma), que a las glaciaciones del Cuaternario (1 Ma–15 Ka). De hecho, estos eventos orogénicos y climáticos (elevación de los Andes y aridificación) produjeron

importantes cambios en el paisaje que promovieron la fragmentación de hábitats, cambios en el flujo génico, diferenciación inter- e intra-específica, y reducción/expansión demográfica o cuello de botella genéticos en los diferentes grupos de organismos que habitan la SATZ (Viruel & al., 2012; Baranzelli & al., 2014). Sin embargo, las regiones áridas y semiáridas del hemisferio continúan siendo sitios de interés para estudiar la historia evolutiva de su biota (Guerrero & al., 2013; Turchetto-Zolet & al., 2013).

En base a estos antecedentes se plantearon las siguientes preguntas en relación a las especies sudamericanas de *Munroa*:

- ✓ ¿Existe estructura filogeográfica en las poblaciones?
- ✓ ¿cómo se habría originado?
- ✓ ¿Qué mecanismos genéticos y/o factores ecológicos e históricos habrían modelado la distribución de los polimorfismos genéticos de las poblaciones?

Para responder a estas preguntas seleccioné a *M. argentina* como modelo de estudio para el género *Munroa*. *M. argentina* es el taxón más ampliamente distribuido del género, habita en tres provincias de la SATZ (Puna, Prepuna y Monte) y crece desde el sur de Perú hasta Mendoza (Argentina) entre los 1.000 y 4.200 m s.n.m. Además, de acuerdo a nuestras observaciones (ver detalle en **Material Vegetal Examinado “S”**, sección anexos), *M. argentina* presenta un tiempo de anthesis diferencial que responde a un patrón latitudinal y prefiere suelos aluviales, arenoso-pedregosos, a menudo en lechos secos y a la orilla de cursos de agua. Según nuestros estudios filogenéticos previos, *M. argentina* habría comenzado a divergir hace 3,5 (4,2-2,0) Ma durante la transición del Plioceno tardío al Pleistoceno temprano (ver cap. 2). Por todo esto se consideró a *M. argentina* como un taxón apropiado para responder a las preguntas antes

mencionadas y determinar si las fluctuaciones climáticas post-glaciales en SATZ influenciaron los patrones genéticos de sus poblaciones.

El tiempo de divergencia de *M. argentina* es contemporáneo a grandes eventos orogénicos; como el levantamiento de los Andes, y anterior a los periodos de las grandes glaciaciones; pienso que el rango de distribución de *M. argentina* fue delimitado por el levantamiento de los Andes y las condiciones climáticas que se generaron en consecuencia. Además, pienso que ese rango de distribución ha cambiado a lo largo del tiempo (por expansión o contracción) como consecuencia del cambio durante la última glaciación y la aridificación del periodo post glacial en el Holoceno. De acuerdo a esto, anticipo la existencia de estructura filogeográfica en las poblaciones de *M. argentina* resultante de las contracciones y expansiones de su rango de distribución durante el Último Máximo Glaciar y el periodo Interglaciar.

Para responder las preguntas previamente planteadas me propuse los siguientes **objetivos**:

- I. Evaluar la existencia de estructura filogeográfica en *M. argentina* utilizando regiones de ADN del cloroplasto y marcadores tipo AFLP.
- II. Evaluar posibles relaciones entre la estructura filogeográfica, la paleo distribución y la distribución geográfica actual de *M. argentina*.

## **Materiales y Métodos**

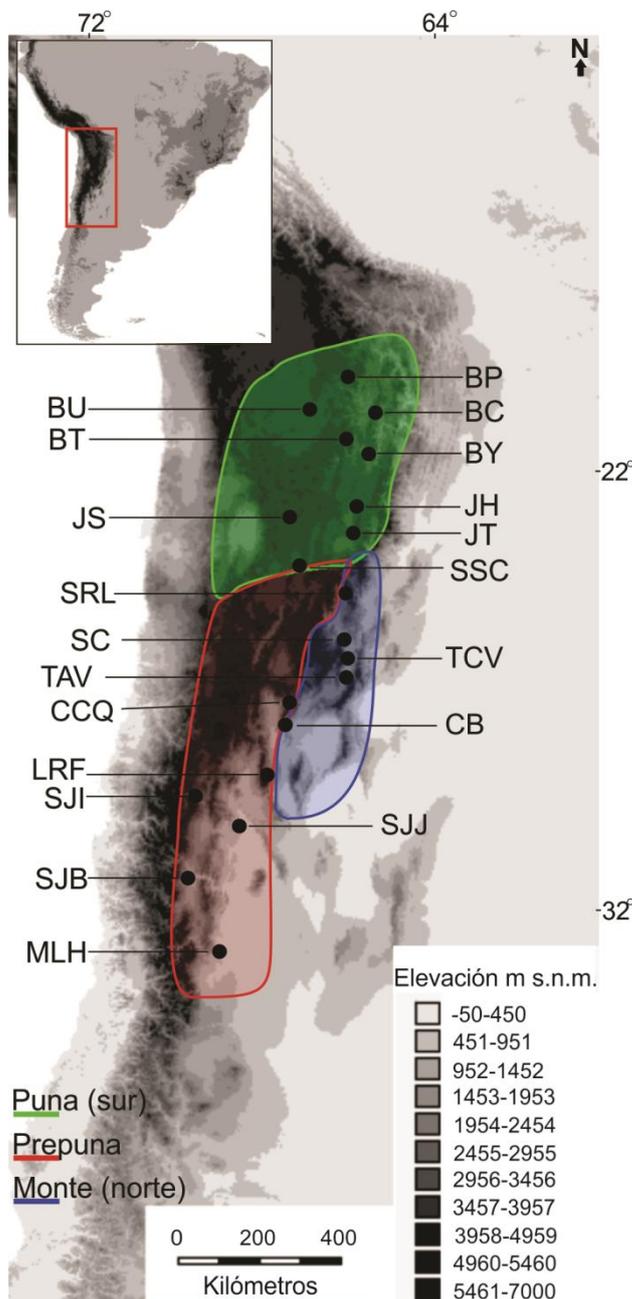
### **Muestreo, extracción de ADN, amplificación y secuenciación**

Un total de 152 individuos de *M. argentina* fueron coleccionados en 20 localidades, abarcando el rango de distribución completo, así como también su

gradiente altitudinal desde 1.000 a 4.200 m (Figura 1). Durante el muestreo se incluyeron entre 4 y 11 individuos, dependiendo de la densidad de la población. El muestreo fue realizado de acuerdo al trazado al azar de transectas de 200 m. Los ejemplares de cada localidad fueron depositados en CORD y, cuando fue necesario, se tomaron muestras de especímenes de herbario (Ver en la sección anexos la Tabla S1 y el **Material Vegetal Examinado**).

El ADN genómico fue aislado a partir de hojas deshidratadas en gel de sílice, usando el protocolo de CTAB (Doyle & Doyle, 1987). Los primers usados en este

estudio fueron: rpS16-900F & 3914PR para *rps16-trnK*, y ndhAx4 & ndhAx3 para el intrón de *ndhA* (Peterson & al., 2010). Un único protocolo de amplificación fue usado para ambas regiones plastidiales siguiendo a Peterson & al. (2010).



**Figura 1.** Distribución geográfica de *M. argentina* en la Prepuna, al sur de la Puna y al norte del Monte. Los puntos negros indican las localidades en donde fueron coleccionados los individuos y las siglas en mayúsculas, los respectivos nombres. El mapa inserto en la figura muestra el área general de trabajo.

Los productos de amplificación fueron visualizados con luz UV luego de una separación mediante electroforesis en gel de agarosa/TBE al 1% teñido con SYBR *Safe gel stain* (Invitrogen, Carlsbad, California, U.S.A.). Los productos amplificados fueron enviados a Macrogen Inc. (Seúl, Korea del Sur) para su purificación y secuenciación con Big Dye™ terminator kit en un secuenciador ABI 3730XL. Las secuencias fueron ensambladas y editadas usando Sequencher v. 4.1 (Gene Codes Corporation, Ann Arbor, Michigan, U.S.A.). Se realizó un pre-alineamiento en Mega 5 (Tamura & al., 2011) usando Muscle (Edgar, 2004) y luego, se optimizó de manera manual. Los números de acceso a GenBank están siendo procesados y corresponden a todos los haplotipos diferentes y extra grupos. La matriz correspondiente será enviada a TreeBase.

#### **Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificado (AFLP)**

Los AFLP (*Amplified fragment length polymorphisms*) fueron amplificados siguiendo el protocolo de Lachmuth & al. (2010). A partir de una evaluación inicial de 12 combinaciones de cebadores (*primers*), se seleccionaron 6 combinaciones para el análisis final: AAT (FAM)-AAA, ACT (FAM)-AAA, AAT (FAM)-AAC, AAA (FAM)-AAA, AAA (FAM)-AAC and ACT (FAM)-AAC. El análisis de los fragmentos fue realizado en el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA, Unidad de Genómica, Instituto de Biotecnología, Castelar, Argentina) utilizando un analizador genético 3130xl *Genetic Analyser* (Applied Biosystems) usando Genescan500(-250)ROX como estándar de tamaño interno. Los fragmentos de entre 50 a 500 bp fueron manualmente clasificados con GeneMapper v. 3.7 (Applied Biosystems). Se excluyeron los *loci* homoplásicos evaluando la frecuencia de la altura de los picos para cada *locus* putativo ajustando un punto de corte umbral para cada uno de ellos. Los marcadores que mostraron una

distribución multimodal en la altura del pico a través de las muestras no fueron considerados, ya que se los consideró como potencialmente homoplásicos. Los análisis preliminares mostraron que en varias poblaciones, todos los individuos, tuvieron el mismo fenotipo *multi/locus* de AFLP para estas 6 combinaciones de cebadores, lo que sugiere una alta reproducibilidad de la técnica y baja tasa de error.

### **Red de haplotipos (RH) y análisis filogenético (AF)**

Se construyó una red de haplotipos utilizando métodos de máxima parsimonia usando TCS ver. 1.2.1 (Clement & al., 2000) con el algoritmo de Templeton & al. (1992). Las ambigüedades fueron resueltas de acuerdo a las reglas propuestas por Pfenninger & Posada (2002). Las relaciones filogenéticas entre los haplotipos de ADN plastidial fueron construidas usando MrBayes 3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003). Se usó jModelTest 0.1.1 (Posada, 2008) para identificar el mejor modelo de evolución molecular (GTR+I) bajo el criterio selección de Akaike (AIC). Se corrieron simultáneamente cuatro cadenas Monte Carlo Markov, iniciando con un árbol al azar, en dos corridas independientes por 10.000.000 de generaciones y se realizaron muestreos de árboles cada 2.000 generaciones. Los árboles muestreados antes de alcanzar el equilibrio (convergencia de los valores de verosimilitud) fueron eliminados (*burn-in* = 25%). Las probabilidades posteriores para los clados fueron determinadas por un consenso de mayoría (50%) entre los árboles retenidos.

### **Tiempos de divergencia**

Para estimar el tiempo de divergencia entre los haplotipos y haplogrupos de *M. argentina* y poder analizarlos en el marco de los eventos ocurridos durante el Plioceno, Pleistoceno, y Holoceno, se realizó una datación molecular usando una

aproximación Bayesiana implementada en BEAST v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007). Los tiempos de divergencia de los haplotipos de *M. argentina* fueron estimados usando la datación obtenida previamente para *Munroa* y *M. argentina* (Amarilla & al., en prensa). *Sohnsia filifolia* (Muhlenbergiinae, clado hermano de Scleropogoninae), *Scleropogon brevifolius*, *Swallenia alexandrae*, *Erioneuron avenaceum*, *Munroa pulchella*, y *Munroa andina* fueron incluidos como grupos externos. El nodo del clado *Munroa* fue calibrado usando una distribución lognormal (offset: 7,2; Log (media): 0; Log (Stdev): 0,5; rango: 8,2–6,5). El nodo del clado *M. argentina* fue calibrado usando una distribución *a priori* lognormal (offset: 3,5; Log (media): 0; Log (Stdev): 0,5; rango: 4,2–2,0). Los análisis fueron realizados usando un modelo de reloj molecular de tasas no correlacionadas, asumiendo una distribución lognormal de tasas (UCLD). Los modelos de evolución de secuencias fueron los mismos que se utilizaron en los análisis con MrBayes (GTR+I) y se seleccionó un modelo coalescente que asume un crecimiento poblacional logístico. Se corrieron dos análisis de MCMC, cada uno con 100 millones de generaciones realizándose muestreos cada 10.000 generaciones. Se analizaron los gráficos de series de tiempo para todos los parámetros en Tracer v.1.5 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>) (Rambaut & Drummond, 2009) para evaluar el adecuado tamaño efectivo de muestreo (ESS > 200) y la convergencia del modelo de máxima verosimilitud. Los árboles obtenidos fueron combinados en Log Combiner v.1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007) y resumidos a través de la opción máxima credibilidad de clado (MCC) en Tree Annotator v. 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007).

### **Análisis espacial y genético**

Los parámetros de diversidad poblacional para los datos plastidiales: número de haplotipos ( $K$ ), diversidad de haplotipos ( $h$ ; Nei, 1987) y diversidad nucleotídica ( $\pi$ ; Nei, 1987) fueron calculados, para cada haplogrupo (poblaciones), usando Arlequin 3.1 (Excoffier & al., 2005). La diferenciación genética entre las poblaciones fue evaluada usando los coeficientes  $G_{ST}$  y  $N_{ST}$  (Pons & Petit, 1996). Ambos estiman la razón entre la diversidad genética media dentro de las poblaciones y la diversidad genética total, pero mientras el índice  $G_{ST}$  usa solo frecuencias alélicas, el  $N_{ST}$  también considera las distancias genéticas entre los haplotipos. Estos índices fueron estadísticamente comparados usando 1.000 permutaciones en PermutCpSSR v. 2.0 (Pons & Petit, 1996). Un mayor valor del índice  $N_{ST}$  indica una mayor relación entre los haplotipos que ocurren en la misma población, indicando estructura filogeográfica. Para conocer los niveles jerárquicos de la estructura de las poblaciones se calcularon valores de  $F_{ST}$  y se realizó un análisis de la varianza molecular (AMOVA) usando Arlequin. Los valores de significancia fueron calculados a través de permutaciones no paramétricas con 10.000 réplicas. Además, para identificar grupos de sitios de máxima diferenciación genética ubicados en áreas de muestreo contiguas se realizó un análisis espacial de varianza molecular (SAMOVA) utilizando el programa SAMOVA v. 1.0 (Dupanloup & al. 2002) basado en 100 simulaciones de pasos de anidamiento e indicadores de máxima diferenciación del ADNcp (valores de  $F_{CT}$ ) fijando el número de grupos desde  $K = 2$  hasta  $K = 5$ . Además se utilizó el programa Alleles in Space (Miller 2005) para realizar gráficos de superficie tridimensionales (Gráficos de Paisaje Genético) que representan la distribución de áreas con elevada distancia genética (eje de coordenadas Z) a lo largo del total del paisaje analizado en este estudio (ejes de coordenadas X e Y). El análisis se

repitió utilizando distintos tamaños de grilla (20 x 20, 50 x 50, 100 x 100) y distintos valores de peso ( $a = 0,5$  hasta  $a = 2$ ) para evitar interpretaciones erróneas de los datos. Con este mismo programa (Alleles in Space) se realizó un test de Mantel (Mantel, 1967) para determinar las posibles barreras genéticas asociadas con cada localidad geográfica y poblaciones usando, para este último caso, el algoritmo de diferencias máximas de Monmonier (Monmonier, 1973).

### **Estudios demográficos**

Considerando a todos los haplotipos como un único grupo y sobre la base de los agrupamientos (haplogrupos) recuperados luego de los análisis RH y AF, se realizaron análisis demográficos para evaluar si el tamaño poblacional aumentó, se redujo o se mantuvo constante a lo largo del tiempo mediante el cálculo de los parámetros  $D$  de Tajima (Tajima, 1989),  $F$  de Fu & Li (Fu & Li, 1993) y  $R2$  de Ramos-Onsins & Rozas (Ramos-Onsins & Rozas, 2002) utilizando el programa DnaSP v. 5.0 (Librado & Rozas, 2009). El nivel de significancia de estos valores se calculó a partir de la simulación de 1.000 re-muestreos utilizando algoritmos coalescentes (Wall & Hudson, 2001). Además se realizaron gráficos de distribución no correspondida de las diferencias entre pares de haplotipos, (mismatch distribution, MMD) de las diferencias observadas y esperadas en DnaSP v. 5.0. Entonces, para distinguir entre los modelos que invocan un crecimiento exponencial pasado respecto de la estasis poblacional histórica, se realizó un MMD en Arlequin y se evaluó la bondad de ajuste de la distribución observada con la esperada bajo un modelo de expansión súbita, para lo que se usó un bootstrapping paramétrico a partir del desvío de la suma de los cuadrados (SSD). Un desvío significativo ( $P \leq 0.05$ ) indica que la población se aleja del modelo nulo de expansión poblacional.

Para describir la historia demográfica de las poblaciones mediante la evaluación de la variación temporal del tamaño efectivo poblacional, se realizó un Gráfico de Horizonte Bayesiano (*Bayesian skyline plots*, BSP; Drummond & al., 2005) en BEAST v. 1.5.4 (Drummond & Rambaut, 2007; Heled & Drummond, 2010). Este análisis se implementó dos veces durante 10 millones de generaciones y los parámetros de partida (*prior*) fueron: modelo GTR de sustitución nucleotídica, frecuencia empírica de bases, modelo de reloj relajado lognormal no correlacionado y un árbol de horizonte bayesiano de tramos constantes coalescentes. Los árboles y parámetros fueron muestreados cada 1.000 interacciones luego de un *burn-in* del 10%. Los ejes de tiempo fueron calibrados usando tasas de 1,0 a  $3,0 \times 10^{-9}$  sustituciones por sitio por año (s/s/y), tasa de sustitución que fuera calculado por Wolfe & al. (1987) para varias angiospermas. Una tasa de s/s/y fue calculada para los loci de cloroplasto de *Munroa* utilizados en esta tesis (ver método la sección **Anexos; S2**), que resultó en  $4,5 \times 10^{-9}$  s/s/y. Los resultados de cada análisis fueron visualizados en Tracer para corroborar que la estacionariedad y convergencia de los parámetros hayan sido alcanzadas (ESS > 200).

### **Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificado (AFLP)**

A partir de la matriz de datos nucleares, se realizó una red filogenética utilizando el programa SplitsTree v. 4.10 (SPT) (Huson & Bryant, 2006); para esto se utilizaron las condiciones por defecto del programa, que implican distancias genéticas “p” no corregidas y el algoritmo NeighborNet. La distancia genética se calculó usando la medida de similaridad de Jaccard; para evaluar el grado de soporte en los puntos de convergencia de las ramas se implementó un análisis bootstrap con 1.000 réplicas. Posteriormente se utilizó una aproximación

bayesiana como la implementada en Structure v. 2.3.1 (Pritchard & al., 2000) para analizar la estructura geográfica de las poblaciones. Este programa utiliza aproximaciones genéticas coalescentes para agrupar genotipos multilocus similares en K grupos, independientemente del origen geográfico de los individuos. Se exploraron valores de  $K = 1-5$  y cada análisis fue desarrollado cinco veces independientemente usando el modelo sin mezcla y frecuencia de alelos correlacionados (Pritchard & Wen, 2004). Los valores óptimos de K fueron calculados siguiendo el método de Evanno & al. (2005). Finalmente se calcularon valores de  $F_{ST}$  y se realizaron estimaciones de AMOVA en Arlequin para investigar los niveles jerárquicos de las estructuras poblacionales recuperados después de los análisis en SPT y Structure.

#### **Modelado de Nicho Ecológico (MNE)**

Los MNE fueron estimados de acuerdo a los registros de presencia de *Munroa argentina* en la SATZ. Escenarios ambientales del presente y del pasado fueron representados por una serie de 19 variables que resumen aspectos climáticos (**S3**). Se incluyeron las 19 variables bioclimáticas para que la conclusión sobre la estabilidad de la distribución sea más conservadora y por lo tanto más fiable. Los datos climáticos fueron obtenidos desde la base de datos WorldClim 1.4 (Hijmans & al., 2005) con una resolución de  $1 \text{ km}^2$ . Un total de 200 puntos de ocurrencia fueron compilados durante los trabajos de campo y desde especímenes de herbario (CORD, BAB, BAA, LP, SI, LIL, y LPB). Tres estimaciones de MNE fueron desarrolladas para identificar i) la distribución potencial actual, ii) la distribución potencial en el pasado durante el último Interglaciario y iii) la distribución potencia en el pasado durante las condiciones extremas del Último Máximo Glaciario (LGM). Para el primer análisis se utilizó la capa (*layer*) actual,

mientras que para el segundo y el tercer análisis, se utilizaron las capas del último periodo Interglaciario (140.000-120.000 años) y del LGM (21.000-18.000 BP) respectivamente. Para los análisis correspondiente al LGM se utilizaron simulaciones de los modelos generales de circulación de acuerdo a: i) el Modelo del Sistema Climático de la Comunidad (CCSM; Collins & al. 2004) y ii) el modelo para las investigaciones interdisciplinarias sobre el Clima (MIROC; Hasumi & Emori, 2004). Todos los modelos fueron analizados en MaxEnt v. 3.3.3 y fueron repetidos para obtener 10 réplicas de cada uno. Para evaluar la calidad del modelo, el conjunto de datos de localidades fue particionado en dos, los de formación y los de pruebas (75% vs 25%, respectivamente). Para medir el grado en que los modelos obtenidos se diferencian de aquellos esperados por azar y obtener una medida de confianza para los MNE, se utilizó el criterio AUC (the area under the receiving operating characteristic curve) (Peterson & al., 2007; Lobo & al., 2008).

## **Resultados**

### **Red de haplotipos (RH) y análisis filogenético (AF)**

La longitud de los dos marcadores plastidiales combinados (*rps16-trnK*, intrón de *ndhA*) fue de 1.704 bp con 43 sitios variables. Cuarenta y un haplotipos fueron identificados a través de los 152 individuos coleccionados en las 20 localidades; la red de haplotipos se muestra en la Figura 2. Se delimitaron tres haplogrupos (poblaciones genéticas; PAB, PrA y MA) que se hallan distribuidos en tres provincias biogeográficas diferentes: la Provincia Puneña (PAB) en Argentina y Bolivia, y las Provincia Prepuneña (PrA) y Provincia del Monte (MA) en Argentina

(Figura 2). En la Tabla 1 se detallan las localidades de colección y sus abreviaturas, el número de individuos coleccionados para cada sitio, los haplotipos recuperados para cada sitio y provincias biogeográficas a las que pertenecen.

En la población de la Puna (PAB), al haplotipo más frecuente es H7 y lo comparten seis localidades: JT, JH, JS, BY, BU y SSC. Al haplotipo H5 lo comparten tres localidades: BY, BP, BT, mientras que el haplotipo H13 es común en JT, JH y JS. Los haplotipos H1 y H4 fueron exclusivos para BP, al igual que H2 y H3 para BC. El haplotipo H6 es exclusivo para BT y los H8, H9, H10 y H11 son únicos de BU. Los haplotipos H16 y H12 se reconocen respectivamente sólo para JS y SSC, mientras que H14 y H15 son únicos en JH. El haplotipo H17 es propio de JT y conecta a PAB con las poblaciones PrA y MA.

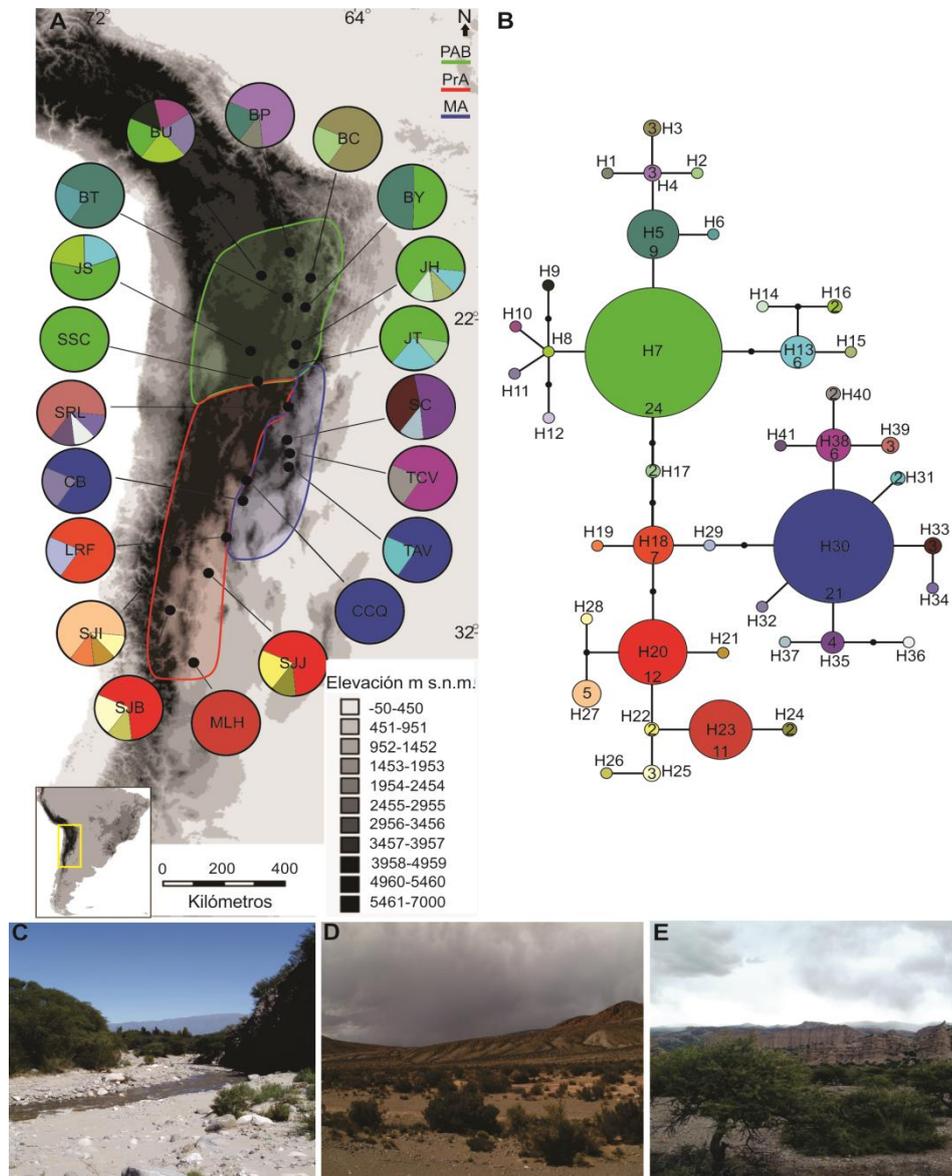
En la población PrA, los haplotipos H20 y H23 fueron los más frecuentes; H20 ocurre en SJJ y SJB, y H23 es único para MLH. El haplotipo H18 es exclusivo para LRF así como H19, H21, H27 y H28 lo son para SJI. Los haplotipos H22 y H24 se encuentran exclusivamente en SJJ, mientras que H25 y H26 son haplotipos únicos para SJB. Las poblaciones PrA y MA están conectadas por los haplotipos H18 y H29 y este último es exclusivo para LRF. En la población MA, H30 es el haplotipo más frecuente, y se encuentra en tres localidades: CCQ, CB y TAV. Los haplotipos H31 y H32 son exclusivos para TAV y CB respectivamente, mientras que H38 y H40 son únicos de TCV. Los haplotipos H33, H35 y H37 son exclusivos para SC mientras que H34, H36, H39 y H41, ocurren únicamente en SRL.

**Tabla 1.** Localidades incluidas en el estudio filogeográfico de *M. argentina*, Abrev., abreviatura de las localidades.  $N_{ind}$ , número de individuos. PB, provincias biogeográficas. Long., longitud. Lat., latitud. H, haplotipos por localidad.

| Localidades                                | Abrev. | $N_{ind}$ | PB            | Long.    | Lat.     | (H)              |
|--|--------|-----------|---------------|----------|----------|------------------|
| Argentina, Mendoza, Las Heras              | MLH    | 11        | Prepuna       | -32,7565 | -68,8483 | 23               |
| Argentina, San Juan, Bella Vista           | SJB    | 10        | Prepuna       | -31,1498 | -69,4499 | 20, 26, 25       |
| Argentina, San Juan, Jachal                | SJJ    | 10        | Prepuna       | -30,2998 | -68,2773 | 20, 24, 22       |
| Argentina, San Juan, Iglesias              | SJI    | 8         | Prepuna       | -29,5732 | -69,4564 | 19, 28, 27, 21   |
| Argentina, La Rioja, Famatina              | LRF    | 8         | Monte/Prepuna | -28,9155 | -67,5164 | 18, 29           |
| Argentina, Catamarca, Corral Quemado       | CCQ    | 7         | Monte         | -27,2281 | -66,9374 | 30               |
| Argentina, Catamarca, Belén                | CB     | 8         | Monte         | -27,6498 | -67,0330 | 30, 32           |
| Argentina, Tucumán, Amaicha del Valle      | TAV    | 9         | Monte         | -26,5902 | -65,9181 | 30, 31           |
| Argentina, Tucumán, Colalao del Valle      | TCV    | 8         | Monte         | -26,3644 | -65,9470 | 38, 40           |
| Argentina, Salta, Cafayate                 | SC     | 8         | Monte         | -26,0722 | -65,9698 | 33, 35, 37       |
| Argentina, Salta, Rosario de Lerma         | SRL    | 6         | Monte         | -24,9882 | -65,5718 | 34, 36, 39, 41   |
| Argentina, Salta, S. Antonio de los Cobres | SSC    | 4         | Prepuna/Puna  | -24,2100 | -66,3230 | 7                |
| Argentina, Jujuy, Tilcara                  | JT     | 11        | Prepuna/Puna  | -23,5788 | -65,3963 | 7, 17, 13        |
| Argentina, Jujuy, Humahuaca                | JH     | 9         | Prepuna/Puna  | -23,2097 | -65,3512 | 7, 13, 14, 15    |
| Argentina, Jujuy, Susques                  | JS     | 9         | Prepuna/Puna  | -23,4166 | -66,4833 | 7, 13, 16        |
| Bolivia, Camargo                           | BC     | 4         | Puna          | -20,6416 | -65,2093 | 2, 3             |
| Bolivia, Potosí                            | BP     | 6         | Puna          | -19,6148 | -65,7646 | 1, 4, 5          |
| Bolivia, Uyuni                             | BU     | 5         | Puna          | -20,4607 | -66,8273 | 8, 9, 10, 11, 12 |
| Bolivia, Tupiza                            | BT     | 5         | Puna          | -21,4433 | -65,7188 | 5, 6             |
| Bolivia, Yunchara                          | BY     | 6         | Puna          | -21,8236 | -65,2364 | 5, 7             |

Luego de los análisis filogenéticos, el consenso de mayoría (50%) recuperó a todos los haplotipos de *M. argentina* en un clado monofilético (PP = 1,00) donde se observan tres filogrupos. La topología de este filograma resultó idéntica al cronograma obtenido con BEAST, la relación filogenética entre los haplotipos, el valor de soporte de los nodos y los tiempos de divergencia se observan en la Figura 3. En estos tres filogrupos, el primero está formado por todos los

representantes de la población PAB, el segundo por los haplotipos de la población PrA y finalmente, el tercero reúne a los haplotipos de la población MA.



**Figura 2.** A, distribución geográfica de los haplotipos de *M. argentina* en la SATZ. B, red de haplotipos, obtenida por parsimonia. Se definieron tres poblaciones: PAB (Puna), PrA (Prepuna) y MA (Monte). Los gráficos circulares (gc) representan los haplotipos encontrados en cada localidad. El tamaño de la sección en los gc es proporcional al número de individuos con ese haplotipo. El código alfanumérico (e.g.H1) es el nombre de cada haplotipo. Los números dentro de cada gc indican el número de individuos que comparten ese haplotipo. C, D y E, hábitats donde crece *Munroa*: Tucumán (Argentina), San Juan (Argentina) y Potosí (Bolivia), respectivamente

### **Tiempo de divergencia**

Según las estimaciones obtenidas, la diversificación de las poblaciones de *M. argentina* comenzaron en el Plioceno medio–Pleistoceno tardío, aprox. hace 3,2 (4,0–1,5) Ma. PAB es el clado que diverge primero del ancestro que compartió con PrA–MA. La divergencia entre PrA y MA ocurrió aprox. hace 2,1 (3,0–0,9) Ma durante el Pleistoceno. La divergencia de la mayoría de las poblaciones comenzó hace 1,5 (1,9–0,5) Ma en el Pleistoceno medio (Figura 3).

### **Análisis genético**

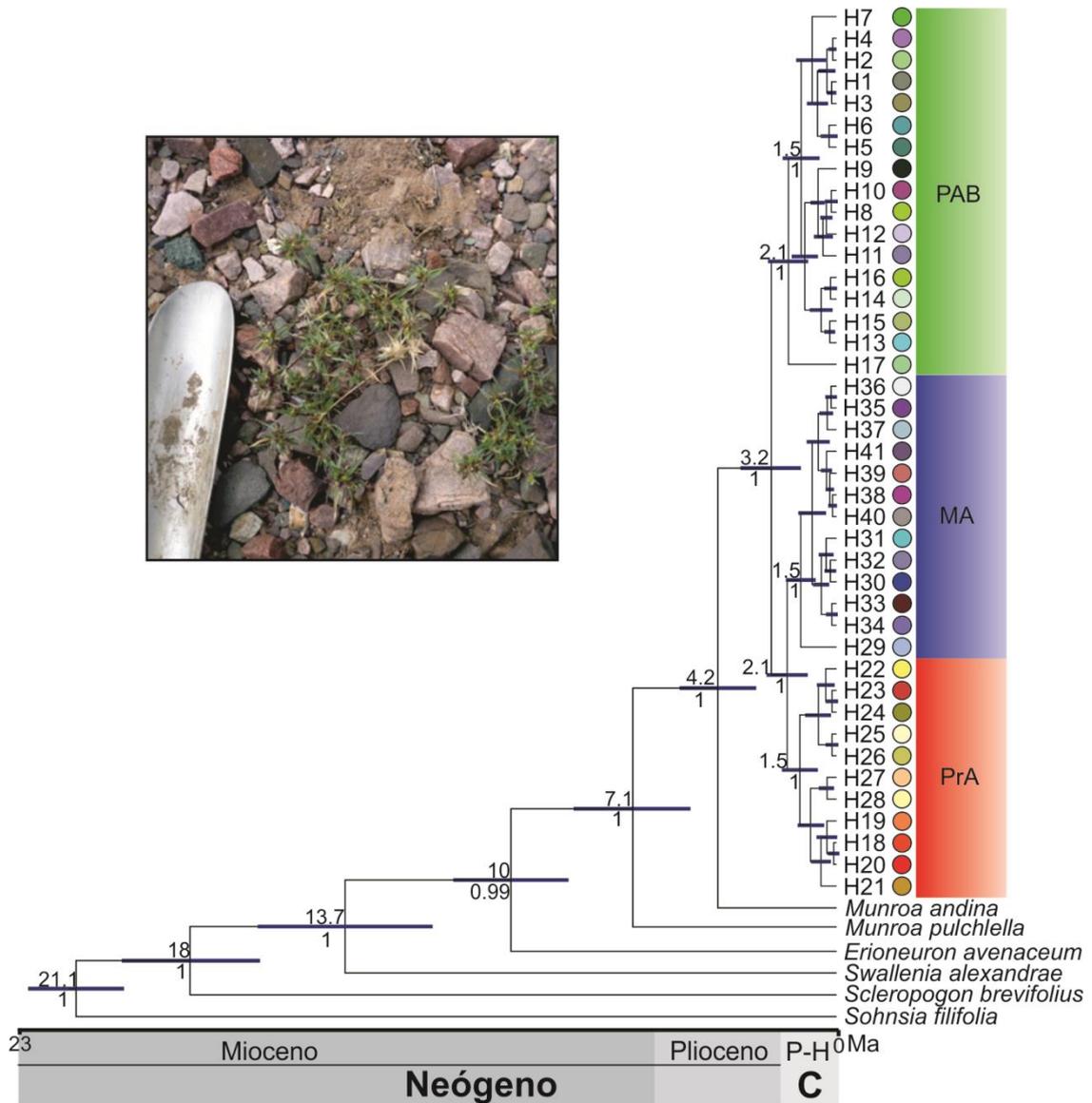
La diversidad haplotídica ( $h$ ) varió desde 0,0 a 0,90, mientras que la diversidad nucleotídica ( $\pi$ ) varió desde 0,0008 a 0,0012. La mayor diversidad de haplotipos se encontró en la población PrA (LRF, SJI, SJB, MLH y SJJ), mientras que una diversidad haplotídica media fue recuperada en la población PAB (JT, JH, JS, SSC, BY, BT, BU, BP y BC). Finalmente, la población que exhibió la más baja diversidad de haplotipos fue MA (SRL, CB, CCQ, TAV, TCV y SC) (Tabla S5). El coeficiente de diferenciación  $N_{ST}$  (0,80) fue alto y significativamente superior que  $G_{ST}$  (0,75) ( $P = 0,04$ ); indicando la existencia de una estructuración filogeográfica.

Los AMOVAs de los haplogrupos reconocidos en la RH y AF detectaron que el 73,67% ( $P < 0,0001$ ) de la variación se explica por diferencias entre las PrA, PAB y MA. El valor  $F_{ST}$  de 0,7467 ( $P < 0,001$ ) indica una cantidad significativa de estructura genética entre las tres poblaciones (Tabla 2). El test de Mantel ( $r = 0,51$ ;  $P = 0,001$ ) sostiene la hipótesis de aislamiento por distancia. El SAMOVA indicó un  $F_{ST} = 0,63$  la estructura de un grupo con tres poblaciones (Tabla 2). Asimismo, el algoritmo de Monmonier reveló una fuerte diferenciación entre las poblaciones; se identificaron dos barreras genéticas, una entre PAB-PrA y MA de norte a sur y otra entre PAB y PrA-MA de este a oeste (Figura 4). Los resultados

obtenidos luego de los estudios de paisaje genético también mostraron tres zonas de máxima diferenciación; la primera, en el extremo norte, estaba formada por localidades de PAB; la segunda por localidades de PrA y la tercera por las localidades de MA (Figura 4).

### **Historia demográfica y análisis especial**

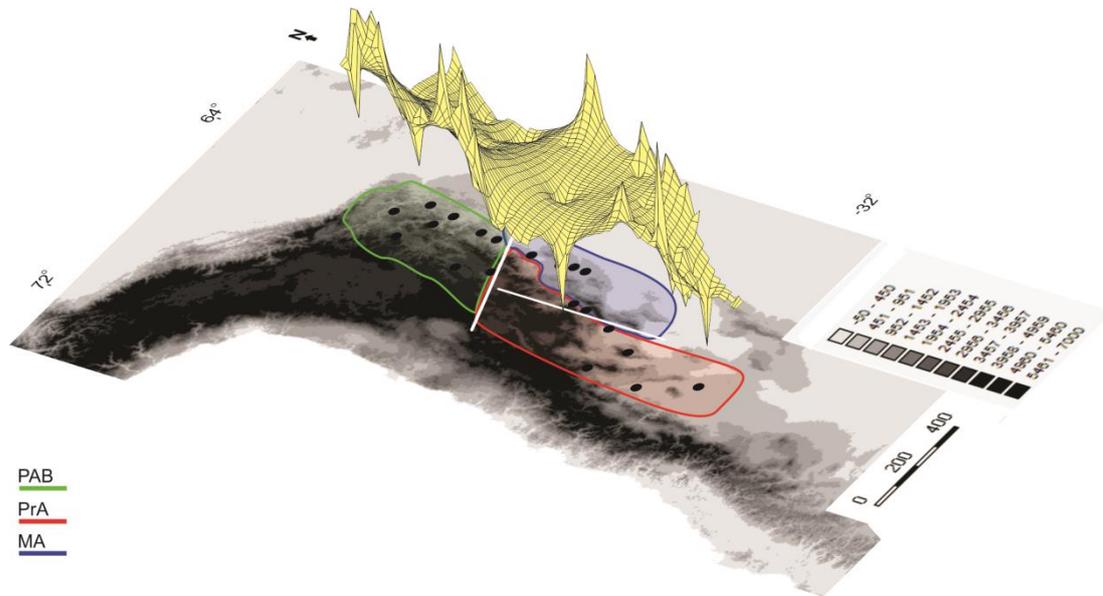
Bajo un modelo de expansión poblacional súbita, los análisis de MMD mostraron una distribución unimodal para PAB y MA ( $P > 0,05$ ), lo que sugiere que las poblaciones experimentaron un cuello de botella seguido de una expansión poblacional; para PrA, la distribución resultó bimodal indicando que esta población podría estar subdividida en dos, y que éstas estuvieron históricamente aisladas entre sí. Cuando se incluyeron todos los haplotipos en un único análisis, se observa una distribución unimodal (Figura 5). Los valores de  $F$ ,  $D$ ,  $R2$  y  $SSD$  fueron negativos y significativamente diferentes de cero, lo que indica un aumento en el tamaño poblacional (Tabla S5). Los gráficos de BSP para las tres poblaciones develaron historias demográficas similares (Figura 5); la población PAB experimentó un incremento poblacional hace aprox. 90.000 años, la población PrA muestra un tamaño estable desde los últimos 60.000 años y la población MA aumentó el tamaño poblacional hace aprox. 85.000 años. Empero, podría ser que las mayores varianzas que se registran en PrA y MA se deba al menor número de muestras consideradas. Al analizar a PrA+MA el BSP indicó que estas poblaciones incrementaron su tamaño hace aprox. 80.000 años (Fig. 5).



**Figura 3.** Cronograma obtenido para los haplotipos de *M. argentina* y otras Chloridoideae basado en el árbol consenso recuperado luego de las estimaciones de tiempos de divergencia. En todos los nodos se indican, en barras azules, los intervalos del 95% de alta densidad posterior (HPD). Todos los nodos tienen un valor de soporte de 0,99–1,0 (probabilidad posterior, debajo de las ramas). Los colores indican los mayores clados de interés; los nombre de los haplotipos son los que se usaron en la Figura 2. Foto, *M. argentina* en San Antonio de los Cobres, Salta, Argentina. PAB (Puna), PrA (Prepuna) y MA (Monte).

**Tabla 2.** Resultados de los análisis de AMOVA y SAMOVA de los distintos agrupamientos de acuerdo a los haplogrupos recuperados después de los estudios filogenéticos (RH, AF) y poblacionales (SPT, Structure) y de acuerdo con agrupamientos alternativos artificiales. PAB (Puna), PrA (Prepuna) y MA (Monte).

| Fuente de variación  | g.l. | SSD       | VC       | % Var. | estadístico-F  |
|--|------|-----------|----------|--------|--|
| <b>AMOVA (Cloroplasto).</b>  |      |           |          |        |  |
| a) un grupo con tres poblaciones (PAB, para, MA)   |      |           |          |        | $F_{ST} = 0,746^{***}$   |
| Entre las poblaciones  | 2    | 292.732   | 2.888    | 73.67  |  |
| Dentro de las poblaciones  | 149  | 153.781   | 1.032    | 26.33  |  |
| total  | 151  | 446.513   | 39201    |        |  |
| b) dos grupos PAB/para vs. MA  |      |           |          |        | $F_{CT} = 0,07^{***}$<br>$F_{SC} = 0,72^{***}$<br>$F_{ST} = 0,74^{***}$  |
| Entre los grupos   | 1    | 152.419   | 0.300    | 7.46   |  |
| Entre las poblaciones  | 1    | 140.313   | 2.694    | 66.91  |  |
| Dentro de las poblaciones  | 149  | 153.781   | 1.032    | 25.63  |  |
| total  | 151  | 446.513   | 4.026    |        |  |
| c) dos grupos PAB/MA vs. para  |      |           |          |        | $F_{CT} = -0,27^{***}$<br>$F_{SC} = 0,77^{***}$<br>$F_{ST} = 0,71^{***}$ |
| Entre los grupos   | 1    | 107.780   | -0.9838  | -27.61 |  |
| Entre las poblaciones  | 1    | 184.952   | 3.5152   | 98.65  |  |
| Dentro de las poblaciones  | 149  | 153.513   | 1.0320   | 28.96  |  |
| total  | 151  | 446.513   | 3.563    |        |  |
| d) dos grupos PAB vs. MA/PrA   |      |           |          |        | $F_{CT} = 0,18^{***}$<br>$F_{SC} = 0,69^{***}$<br>$F_{ST} = 0,74^{***}$  |
| Entre los grupos   | 1    | 183.512   | 0.7822   | 18.89  |  |
| Entre las poblaciones  | 1    | 109.220   | 2.3268   | 56.19  |  |
| Dentro de las poblaciones  | 149  | 153.781   | 1.0320   | 24.92  |  |
| total  | 151  | 446.513   | 4.1412   |        |  |
| <b>SAMOVA (Cloroplasto)</b>  |      |           |          |        |  |
| a) un grupo con tres poblaciones (PAB, PrA, MA)  |      |           |          |        | $F_{CT} = 0,64^{***}$<br>$F_{SC} = 0,17^{***}$<br>$F_{ST} = 0,70^{***}$  |
| Entre los grupos   | 2    | 96.130    | 2.844    | 64.46  |  |
| Entre las poblaciones  | 13   | 27.444    | 0.2800   | 6.35   |  |
| Dentro de las poblaciones  | 34   | 43.786    | 1.2878   | 29.19  |  |
| total  | 49   | 167.360   | 4.4119   |        |  |
| <b>AMOVA (AFLPs)</b>   |      |           |          |        |  |
| a) un grupo con tres poblaciones (PAB, PrA, MA)  |      |           |          |        | $F_{ST} = 0,52^{***}$  |
| Entre los grupos   | 2    | 5428.724  | 51.22037 | 26.43  |  |
| Entre las poblaciones  | 149  | 21241.519 | 142.5605 | 73.57  |  |
| Dentro de las poblaciones  | 151  | 26670.243 | 193.7809 |        |  |
| g.l., grados de libertad; $F_{CT}$ , diferenciación entre grupos dentro de una especie; $F_{SC}$ , diferenciación entre poblaciones dentro de un grupo; $F_{ST}$ , diferenciación entre poblaciones dentro de la especie. *** $P < 0.0001$ |      |           |          |        |  |



**Figura 4.** Gráfico multidimensional obtenido luego del análisis de paisaje genético. En él se muestra las distancias genéticas entre los haplotipos a través de las localidades consideradas en este estudio. Las barras blancas indican las barreras filogeográficas identificadas mediante los análisis con el algoritmo de Monmonier. Se identificaron tres poblaciones: PAB (Puna), PrA (Prepuna) y MA (Monte).

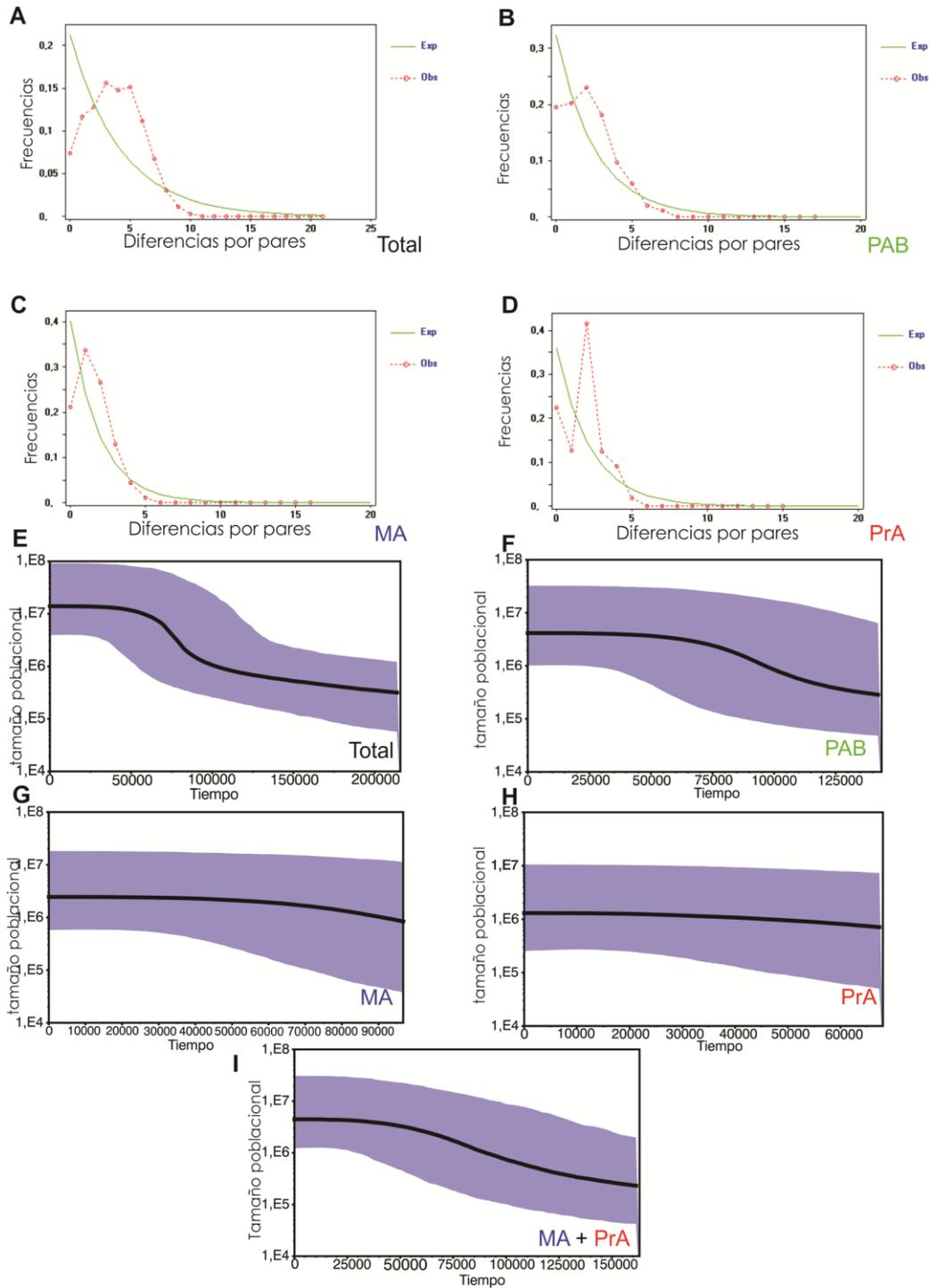
## AFLP

En las 20 localidades y 152 individuos estudiados y a través de seis combinaciones de *primers* se registraron 1.104 loci, de los que un importante porcentaje (97%), 1.075 en total, resultaron polimórficos. La red de genotipos mostró una división genética entre tres grupos, con un alto grado de soporte (Bootstrap = 87–100). Estos tres fueron idénticos a los reconocidos por medio de los análisis filogenéticos (RH, AF) desarrollados con los datos de secuencias plastidiales (PAB, PrA y MA) (Figura 6A). El análisis de agrupamiento Bayesiano implementado en Structure, corroboró la estructura poblacional y los resultados de  $\Delta K$  indicaron que los valores de  $K = 3$  y  $K = 4$  son los que mejor se ajustan al conjunto de datos (Figura 6B y C, respectivamente). Con  $K = 3$ , todos los grupos y todos los individuos fueron idénticos a los grupos reconocidos por los análisis

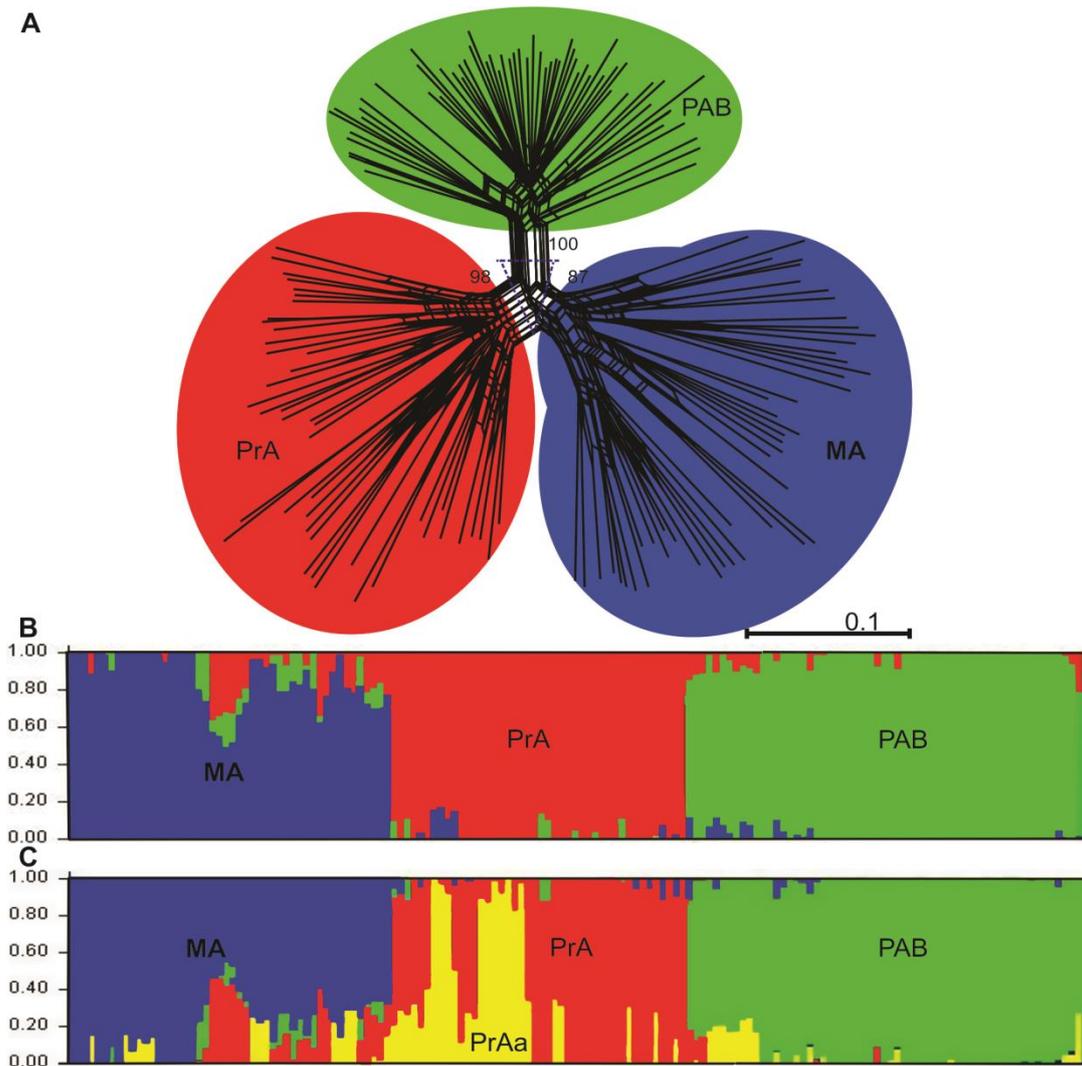
antes mencionado (RH, AF, SPT, etc). Con  $K = 4$ , la estructura de las tres poblaciones se mantiene y un subgrupo (PrAa) se diferencia en la población PrA, siendo “puros” sólo cuatro individuos para el “cuarto” genoma y proceden de dos localidades de la población PrA. El AMOVA con las tres poblaciones reconocidas mediante el SPT y el Structure ( $K = 3$ ) detectaron que el 70% ( $P < 0,0001$ ) de la variación se explica por diferencias entre las poblaciones (Tabla 3). El valor  $F_{ST}$  de 0,5 ( $P < 0,001$ ) indica alto grado de estructuración entre las tres poblaciones (Tabla 2).

### **Modelado de Nicho Ecológico (MNE)**

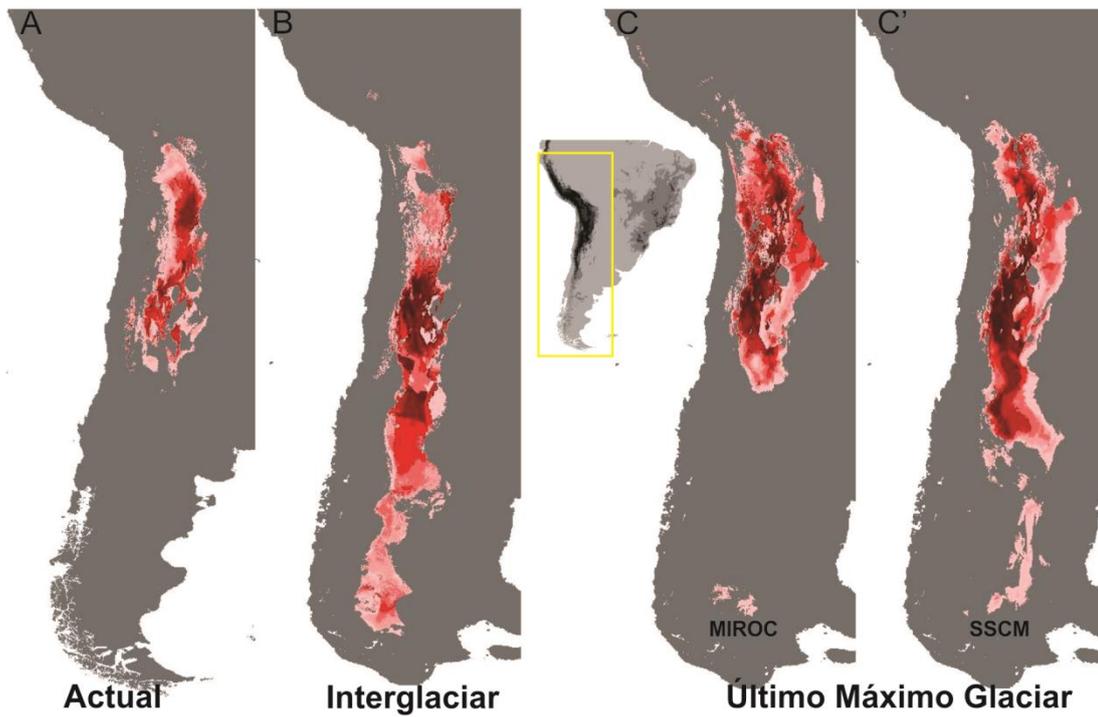
El valor de las AUC fue superior a 0,95 para todos los análisis. El MNE para las condiciones climáticas actuales predijo la distribución geográfica actual de *Munroa argentina* (Figura 7) y sobre-estimó (*over-predicted*) la distribución geográfica en el extremo norte y sureste de la distribución actual donde *M. argentina* nunca ha sido registrada hasta el momento (Figura 7A). Las variables que más contribuyeron a la explicación y estabilización del conjunto de datos fueron: la Isotermalidad (BIO 3), la Precipitación en el mes más húmedo (BIO 13) y la Precipitación anual (BIO 12). El modelo para la distribución potencial durante el último período Interglaciario mostró un área más extensa y continua de hábitats adecuados desde el extremo norte de la provincia Prepuneña hasta la Subregión Patagónica (Región Andina) (Figura 7B). Los modelos del Último Máximo Glaciario demostraron que los hábitats adecuados eran más extensos que los actuales (y menores que los recuperados para el Interglaciario) y sobre-predijeron la distribución geográfica más al sureste (Figura 7 C y C').



**Figura 5.** A-D, Gráficos de distribución no correspondida (*Mismatch distributions*) de las diferencias entre pares de secuencias (haplotipos) para las tres poblaciones de *Munroa argentina* definidas en este estudio. Las líneas solidas representan la distribución de las frecuencias observadas, las líneas de puntos representan la distribución de las frecuencias esperadas bajo un modelo de expansión súbita. E-I, Gráficos de horizontes bayesianos (*Bayesian skyline semilog plots*) mostrando las medianas de las tendencias demográficas históricas de las poblaciones *M. argentina*. PAB (Puna), PrA (Prepuna) y MA (Monte)



**Figura 6.** **A**, Red (NeighborNet) de fenotipos AFLP de *M. argentina*. El área coloreada corresponde a las áreas geográficas de las poblaciones indicadas en la Figura 1. Los valores en la base de los mayores grupos corresponden a valores de soporte bootstrap **B** y **C**, muestran la estructura genética obtenida después de los análisis bayesianos en Structure. Asignación de las probabilidades a posteriori de los individuos de *M. argentina* con un valor óptimo de  $K=3$  (**B**) y  $K=4$  (**C**). Cada individuo fue representado por una línea vertical coloreada. Cuando una línea presenta más de un color, significa que ese individuo tiene más de un genotipo y las líneas con un solo color indican que ese individuo presenta un único genotipo. PAB (Puna), PrA (Prepuna) y MA (Monte).



**Figura 7.** Modelado de Nicho Ecológico para *M. argentina* obtenido en MaxEnt. **A**, Predicción de la distribución potencial actual. **B**, Predicción de la distribución potencial durante el Periodo Interglaciari. **C**, Predicción de la distribución potencial durante el Último Máximo Glaciari, con los modelos MIROC (**C**) y CCSM (**C'**).

## Discusión

### Filogeografía

Estudios geológicos, climáticos y genéticos sugieren que la Zona de Transición Sudamericana (*South American Transition Zone*, SATZ) surgió entre el Mioceno Medio y el Plioceno Tardío (Hartley & Chong, 2002; Le Quesne & al., 2008; Hoorn & al., 2010; Viruel & al., 2012; Guerrero & al., 2013) e indican la persistencia de un clima semiárido desde los 8 Ma y hasta los 3 Ma atrás, el que alcanzó su máximo nivel de aridez hace 6 Ma (Hartley & Chong, 2002); la divergencia de *M. argentina* desde el ancestro que compartió con *M. andina* habría sucedido hace 3,3 (4,9–2,0) Ma en el Mioceno Tardío-Plioceno Tardío en el Neógeno, coincidiendo con los cambios climáticos antes descritos.

Los análisis de secuencias de cpADN y de AFLP recuperan tres linajes altamente divergentes para *M. argentina*. La separación de estas poblaciones se sitúa en el Plioceno tardío y principalmente en el Pleistoceno. Estos resultados sugieren que la historia evolutiva de *M. argentina* está estrechamente ligada a los procesos de aridificación que dieron origen a la SATZ (2,6–5,3 Ma; Placzek & al., 2009), a la elevación final de los Andes centrales y del sur (aprox. 5 Ma) y a las glaciaciones del Cuaternario (1 Ma–15 Ka) (Hartley & Chong, 2002; Hoorn & al., 2010; Guerrero & al., 2013; Baranzelli & al., 2014). De hecho, la interrelación de estos eventos geológicos y climáticos produjeron notables cambios en el clima y en el paisaje, los que promovieron fragmentaciones en el hábitat y diferenciaciones inter- e intra- específicas, como fuera informado previamente para diferentes grupos de plantas y animales (Méndez & al., 2004; Jakob & al.,

2009, 2010; Viruel & al., 2012; Turchetto-Zolet & al., 2013; Gerrero & al., 2013; Baranzelli & al., 2014).

Probablemente una población antigua, de distribución continua y en la que no existía estructura genética se diferenció (estructuró) debido a la expansión de la SATZ y las oscilaciones del clima en el Pleistoceno. Estos eventos, habrían permitido la diferenciación de las poblaciones PAB, PrA y MA vía una barrera efectiva que impactó el flujo génico. Estas tres poblaciones no comparten ningún haplotipo y los análisis filogenéticos basados en secuencia de cpADN recuperan los mismos filogrupos que se identifican mediante análisis de AFLP. Estos resultados son consistentes con los resultados recientemente reportados para otras especies vegetales que habitan en el centro de la Patagonia y Atacama (Jakob & al., 2009; Mathiasen & Premoli, 2010; Cosacov & al., 2010; Acosta & Premoli, 2010; Sersic & al., 2011; Premoli & al., 2012; Ossa & al., 2013; Cosacov & al., 2013; Baranzelli & al., 2014). Esto permite proponer que la fragmentación de hábitats explica la diferenciación de las tres poblaciones (PAB, PrA y MA) de *M. argentina* en sus respectivas áreas de distribución: Puna, Prepuna y Monte.

Existen estudios que han utilizado las variaciones del ADN en ciertas áreas para identificar refugios putativos del Pleistoceno, áreas recolonizadas, hábitats fragmentados o corredores biológicos, para reconstruir la historia evolutiva de un buen número de taxones (p. ej., Soltis & al., 1997; Koch & al., 2006; Jakob & al., 2007; 2009; 2010; Guerrero & al., 2013; Turchetto-Zolet & al., 2013; Baranzelli & al., 2014). Se ha propuesto que aquellas áreas donde las poblaciones actualmente exhiben altos niveles de variación génica, actuaron como refugios glaciares de poblaciones relativamente grandes (Widmer & Lexer, 2001). A la par, se interpreta que áreas donde las poblaciones actualmente exhiben bajos niveles

de variación génica han sido recientemente colonizadas o bien que han albergado a pequeñas poblaciones relicto (Soltis & al., 1997; Koch & al., 2006; Jakob & al., 2009). En *Munroa argentina* se encontraron altos niveles de variación genética dentro y entre las poblaciones (PAB, PrA y MA) en las tres áreas donde se encuentran (Puna, Prepuna y Monte). Por lo tanto, se sugiere que estas áreas fueron habitadas por *M. argentina* desde el momento en que divergió del ancestro que compartió con *M. andina* y diversificó en una única población; en ésta se restringiría luego el flujo génico y originaría a las tres poblaciones que se observan en la actualidad.

Los resultados obtenidos muestran una significativa estructura filogeográfica en estas poblaciones a través de la SATZ (alto  $G_{ST} = 0,75$  y  $N_{ST} > G_{ST}$ ), estructura que se hace evidente en la red de haplotipos y la que fue corroborada mediante análisis de AMOVA y SAMOVA. Las poblaciones de *M. argentina* actualmente muestran una distribución casi continua en todo su rango de distribución ocupando un rango latitudinal y altitudinal relativamente amplio. Hua & Wiens (2010; 2013) pusieron de relieve el efecto de zonaciones climáticas en la diversificación genética de las poblaciones debido al aislamiento causado por la discontinuidad de los hábitats. Este tipo de aislamiento, producido por zonación climática, también fue propuesto para explicar la estructuración filogeográfica que actualmente presentan varias especies de *Hordeum* (Poaceae) en la SATZ y Patagonia (Jakob & al., 2007, 2009, 2010). Todos los resultados aquí obtenidos indican la existencia de un flujo génico restringido entre las poblaciones de *M. argentina*, por lo que el aislamiento precigótico, dado por diferencias en el tiempo de floración a lo largo del gradiente latitudinal y altitudinal (obs.pers.), pudo haber

reforzado el aislamiento causado por discontinuidades ambientales en sus respectivos hábitats: la Puna, la Prepuna y el Monte.

Si se tienen en cuenta las tres áreas, la mayor diversidad genética estimada fue para la población PrA en la Prepuna. La Prepuna es el límite austral de la distribución, lo que sugiere que es probablemente éste el hábitat más antiguo o primeramente colonizado por *M. argentina*. Los parámetros demográficos, los valores negativos de  $F$  y  $D$  y los análisis de MMD, aportan evidencias a favor del aumento del tamaño de las poblaciones de *M. argentina*. Según estas evidencias, es posible sugerir que las poblaciones extendieron su rango de distribución hacia el norte y el oeste en las provincias de la Puna y el Monte. En consecuencia, las poblaciones debieron tener una distribución continua, hasta que se fragmentaron debido a las oscilaciones climáticas del Plioceno-Pleistoceno. En este sentido, los datos moleculares muestran polimorfismos ancestrales en secuencias de DNA que perduran luego de la fragmentación del hábitat (cfr. poblaciones PrA y sus haplotipos HT20 y HT23). Los resultados obtenidos con AFLP corroboran la hipótesis de que existe bajo flujo génico entre los tres las poblaciones. Luego de la diversificación de los tres filogrupos (PAB, PrA y MA) una evolución independiente (o paralela) y rápida (y reciente) tuvo lugar en la diferenciación de PAB y MA. Esto se pone en evidencia cuando se observa la estructura en forma de estrella que forman haplotipos de PAB y MA en la Red de Haplotipos.

### **Áreas de distribución en el Pleistoceno y el Presente**

El modelado de nicho ecológico ha sido utilizado para explicar mecanismos de especiación (Swenson, 2006), extinción, evolución de nicho (Jakob & al., 2007; 2009; 2010) y paleodistribución e interpretar más integralmente algunas inferencias filogeográficas (Carstens & Richards, 2007). Los datos moleculares

obtenidos, tanto con AFLP como con cpADN, sugieren que las poblaciones de *M. argentina* se expandieron hacia el norte, a áreas más cálidas, durante los últimos ciclos fríos del Pleistoceno, sobreviviendo *in situ* dentro de su actual área de distribución. Sólo se ha encontrado evidencia de que existió una reducción en la distribución más austral de la población PrA, pero no se evidenciaron reducciones en las poblaciones PBA y MA, lo que indicaría un pequeño desplazamiento de nicho, probablemente por ciclos fríos del Pleistoceno.

El modelado con variables climáticas actuales encontró áreas con hábitats adecuados al sudeste de la distribución actual y también al este de la provincia del Monte, sitios donde *Munroa argentina* no ha sido aún coleccionada. Esta región ofrece mayores condiciones de humedad que la zona del Monte y la Prepuna en donde habita actualmente y la vegetación se compone de pastos robustos y altos que no facilitarían la colonización por *M. argentina*. Jakob & al. (2009) informan resultados semejantes para *Hordeum*.

Los estudios de paleomodelado (Interglaciario y LGM) indicaron la existencia de hábitats adecuados durante los períodos de glaciación e interglaciario. La extensión del área habitable durante el LGM fue similar a la actual para *M. argentina* y los modelos pronosticaron, aunque pequeña, una mayor distribución potencial hacia el norte, el sur y el este, respecto de la distribución actual. A la par, el paleomodelo hacia el Interglaciario predice una expansión del área de distribución hacia el sur, que llegaría al centro de la Subregión Patagónica. Los resultados de paleomodelos son congruentes con un probable crecimiento poblacional durante el último millón de años, ya que ellos muestran que al menos las condiciones climáticas durante el Interglaciario y el LGM no impidieron la expansión de *M. argentina* en la porción oriental de la SATZ. También estos datos apoyan la

hipótesis del impacto que pudo tener la fragmentación del hábitat sobre las poblaciones (PrA, PAB, MA), dado que la disponibilidad de grandes áreas con condiciones similares y adecuadas son necesarias para que las poblaciones se subdividan sin que se reduzca la diversidad genética, como se observa en las poblaciones de *M. argentina*. Resultados parecidos se han registrado para *Hordeum* (Jacobs & al., 2009).

Los estudios desarrollados en este capítulo incluyeron dos enfoques independientes para reconstruir la historia evolutiva de *M. argentina*. El enfoque filogeográfico indica claramente la supervivencia de *M. argentina* dentro de su área de distribución existente por lo menos durante el último ciclo de glaciaciones. Estos resultados fueron corroborados por la reconstrucción de los modelos de distribución del Pleistoceno, que indican que las condiciones climáticas eran adecuadas para *M. argentina* en estas zonas, y nos permiten suponer estabilidad de nicho para esta especie por lo menos desde el LMG hasta la actualidad. Los resultados sugieren que, en lo que respecta al clima, *M. argentina* tiene el potencial para colonizar otros hábitats y sobre todo al sureste de la distribución actual. Esto sugiere un significativo tiempo de retraso evolutivo (*evolutionary lag time*) para que estos ambientes puedan ser colonizados, como ha sido descrito para otros grupos de plantas y animales que habitan la SATZ (Guerrero & al., 2013). El concepto de "tiempo de retraso evolutivo" implica que transcurre un determinado periodo de tiempo entre el surgimiento de nuevas condiciones ambientales en una región y la colonización efectiva de ese hábitat por un clado dado. Tiempos de retardo evolutivos son comunes en otros sistemas, y pueden ser importantes para la comprensión de los patrones de distribución, tales como

las diferencias en la biodiversidad entre los hábitats y la respuesta de los organismos al cambio climático (Guerrero & al., 2013).

En este trabajo se ha demostrado que *M. argentina* ha sido capaz de persistir en la SATZ desde hace 4 Ma aproximadamente, a pesar de los cambios orogénicos y climáticos, y que sus poblaciones han experimentado una fuerte fragmentación genética. Por otra parte, los análisis detectaron una profunda estructura filogeográfica intraespecífica con múltiples linajes. Estas poblaciones sin embargo, son morfológicamente y cromosómicamente indistinguibles (ver cap.1), lo que nos lleva a concluir que *M. argentina* podría constituir otro ejemplo de especiación críptica como fuera propuesto para otros grupos de plantas (p. ej. Bickfor & al., 2007; Morando & al., 2007; García & al., 2011; Piggott & al., 2011). Se necesitan estudios de especiación mediante abordajes coalescentes considerando la historia demográfica de los linajes para probar esta hipótesis, la que debe ser considerada además en diferentes escenarios ecológicos como los considerados bajo modelos de nicho divergente o de nicho conservado.

## Conclusiones

En Sudamérica, *M. argentina* ha sido capaz de persistir en la Zona de Transición Sudamericana (*South American Transition Zone*, SATZ) desde hace 4 Ma aproximadamente, a pesar de los cambios orogénicos y climáticos del Plioceno y el Pleistoceno. Los estudios filogeográficos y poblacionales recuperaron tres haplogrupos (poblaciones) denominados PAB, PrA y MA que se distribuyen en la Puna, Prepuna y el Monte respectivamente.

Las tres poblaciones de *M. argentina* presentan una profunda estructura filogeográfica intraespecífica con múltiples linajes, estructura que se generó por un fuerte aislamiento del flujo genético, probablemente porque estas poblaciones viven a lo largo y a lo ancho de un gradiente latitudinal y altitudinal que generan diferencias en el tiempo de floración de los individuos. Estas poblaciones sin embargo, son morfológicamente y cromosómicamente indistinguibles, lo que nos lleva a concluir que *M. argentina* podría significar otro ejemplo de especiación críptica.

De acuerdo al modelado de nicho ecológico, estas poblaciones han tenido y tienen el potencial para colonizar hábitats más australes. Sin embargo, aún no lo han hecho, lo que sugiere que *M. argentina* estaría evolucionando en un contexto de conservadurismo de nicho ecológico y experimenta un significativo tiempo de retraso evolutivo (*evolutionary lag time*) que le impide colonizar estos ambientes. Evolución en bajo conservadurismo de nicho y tiempos de retardo evolutivos son comunes en otros sistemas y son importantes para la comprensión de los

patrones de distribución, las diferencias en la biodiversidad entre los hábitats y la respuesta de los organismos al cambio climático.

**Referencias.** Con los resultados presentados en este capítulo se elaboró un trabajo científico que fue enviado para su evaluación a la revista Plos One. **L.D. Amarilla**, A.M. Anton, J.O. Chiapella, M.M. Manifesto, DF Angulo, V. Sosa. *Munroa argentina*, a grass of the South American Transition Zone, survived the Andean uplift, aridification and glaciations of the Quaternary. *Plos One*. Enviado.

## **Conclusiones Generales**

*Munroa* comprende seis especies de distribución disyunta en las regiones áridas y semiáridas de las Américas, incluyendo *M. pulchella* (= *Dasyochloa pulchella*). Esta última era la única especie del género *Dasyochloa*, común en el oeste de Norteamérica, con una historia taxonómica compleja y afín a *Munroa*. La evaluación de los límites genéricos entre *Munroa* y *Dasyochloa* mediante análisis filogenéticos, estudios citológicos y morfológicos indicó inequívocamente la pertenencia de *D. pulchella* en *Munroa* y la transferencia incluyó la nueva combinación *Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla.

*Munroa*, en su nueva delimitación ampliada, es un grupo con dos sinapomorfías morfológicas, el estigma papiloso-piloso y la cariopsis comprimida dorsiventralmente. Todas sus especies presentan un número cromosómico básico  $x = 8$  y son diploides  $2n = 16$ . Todos sus cromosomas son metacéntricos y de tamaños semejantes. Las variables métricas y discretas asociadas a la lodícula, el escutelo, la cariopsis, la arista de la lemma, la inflorescencia y las anteras, son las variables que mejor explican las diferencias entre los taxones.

*Munroa* comprende dos taxones norteamericanos (*M. pulchella*, *M. squarrosa*) y cuatro sudamericanos (*M. andina*, *M. argentina*, *M. decumbens*, *M. mendocina*). La dispersión a larga distancia y no simultánea es el mejor proceso para explicar la distribución anfitropical disyunta que presenta *Munroa*. Este proceso implicó un evento de dispersión desde América del Norte hacia América del Sur, una expansión en su área de distribución hacia el este y oeste de los Andes, y una dispersión, mucho más reciente, desde América del Sur hacia América del Norte.

La divergencia del clado *Munroa* habría ocurrido en el Mioceno tardío, hace aproximadamente 7 Ma en Norteamérica. La expansión y colonización de nuevos hábitats en América del Sur, habría comenzado hace aproximadamente 5 Ma con

el surgimiento de *M. andina*. Esta radiación y la última dispersión (sur a norte) habría ocurrido durante el Plioceno y el Pleistoceno temprano.

Los eventos de diversificación, dispersión y establecimiento de los linajes de *Munroa* estarían relacionados con las condiciones áridas del Plioceno durante el Neógeno y con las oscilaciones climáticas del Pleistoceno durante el Cuaternario, condiciones que eran propicias para el arribo y establecimiento de migrantes transtropicales. El cambio en la forma de vida de perenne a anual en *Munroa* y el cambio en algunos caracteres asociados a la diseminación (tales como la desarticulación de la raquilla y la forma y consistencia de las glumas) han sido importantes para la dispersión de los taxones y el establecimiento de sus plántulas.

En Sudamérica, *M. argentina* ha sido capaz de persistir en la Zona de Transición Sudamericana (*South American Transition Zone*, SATZ) desde hace 4 Ma aproximadamente, a pesar de los cambios orogénicos y climáticos del Plioceno y el Pleistoceno. Los estudios filogeográficos y poblacionales recuperaron tres haplogrupos (poblaciones) denominados PAB, PrA y MA que se distribuyen en la Puna, Prepuna y el Monte respectivamente.

Las tres poblaciones de *M. argentina* presentan una profunda estructura filogeográfica intraespecífica con múltiples linajes, estructura que se habría generado por un fuerte aislamiento reproductivo, probablemente porque estas poblaciones viven a lo largo y a lo ancho de un gradiente latitudinal y altitudinal que generan diferencias en el tiempo de floración de los individuos. Estas poblaciones sin embargo, son morfológicamente y cromosómicamente indistinguibles lo que nos lleva a concluir que *M. argentina* podría ser otro ejemplo de especiación críptica.

De acuerdo al modelado de nicho ecológico, estas poblaciones han tenido y tienen el potencial para colonizar hábitats más australes. Sin embargo, aún no lo han hecho, lo que sugiere que *M. argentina* estaría evolucionando en un contexto de conservadurismo de nicho ecológico y presenta un significativo tiempo de retraso evolutivo (*evolutionary lag time*) que le impide colonizar estos ambientes. La evolución bajo conservadurismo de nicho y con tiempo de retardo evolutivo es común en otros sistemas y resulta importante para la comprensión de los patrones de distribución, las diferencias en la biodiversidad entre los hábitats y la respuesta de los organismos al cambio climático.

## **Anexos**

**Tabla S1.** Muestras incluidas en los análisis filogenéticos, información de colección; colector, número de colección y herbario donde fue depositado (esta información se brinda solamente para los taxones a partir de los que se generaron nuevas secuencias). Números de acceso de GenBank (los primeros ITS, el segundo intrón de *ndhA*, la tercera *ndhF*, el cuarto *rpl32-trnL*, el quinto *rps16-trnK*). El \* indican las secuencias generadas para este estudio y el – indica secuencia ausente.

---

*Aegopogon cenchroides* Humb. & Bonpl. ex Willd., GU359259, GU359403, GU359613, GU360011, GU360578; *Aegopogon tenellus* (DC.) Trin., GU359260, GU359392, GU359592, GU360012, GU360577; *Aeluropus lagopoides* (L.) Trin. ex Thwaites, GU359261, GU359391, GU359591, GU360013, GU360576; *Aeluropus littoralis* (Gouan) Parl., GU359262, GU359390, GU359590, GU360018, GU360575; *Aeluropus pungens* (M. Bieb.) K. Koch, GU359263, GU359389, GU359589, GU360014, GU360574; *Aristida scribneriana* Hitchc., GU359268, GU359412, - , GU360010, GU360569; *Astrebla lappacea* (Lindl.) Domin, GU359270, GU359395, GU359586, GU360009, GU360568; *Astrebla pectinata* (Lindl.) F. Muell. ex Benth., GU359286, GU359421, GU359585, GU359861, GU360567; *Austrochloris dichanthioides* (Everist) Lazarides, GU359272, GU359420, GU359584, GU359860, GU360566; *Blepharidachne benthamiana* (Hack.) Hitchc., GU359275, - , GU359582, GU359857, GU360579; *Blepharidachne kingii* (S. Watson) Hack., GU359276, - , - , GU359855, GU360561; *Blepharoneuron shepherdii* (Vasey) P.M. Peterson & Annable, GU359277, GU359419, GU359580, GU359854, GU360560; *Bouteloua aristidoides* (Kunth) Griseb., GU359279, GU359417, GU359570, GU359852, GU360558; *Bouteloua dactyloides* (Nutt.) Columbus, GU359282, GU359404, GU359569, GU359851, GU360555; *Bouteloua repens* (Kunth) Scribn., GU359271, GU359407, GU359568, GU359850, GU360608; *Bouteloua simplex* Lag., GU359231, GU359406, GU359571, GU359834, GU360607; *Bouteloua uniflora* Vasey, GU359232, GU359383, GU359567, GU359848, GU360606; *Brachyachne convergens* (F. Muell.) Stapf, GU359252, GU359349, GU359714, GU359885, GU360586; *Brachyachne fibrosa*, C.E. Hubb. GU359253, GU359348, - , GU359884, GU360585; *Brachyachne patentiflora* (Stent & Rattray) C.E. Hubb., GU359254, GU359374, GU359708, GU359883, GU360584; *Brachyachne tenella* (R. Br.) C.E. Hubb., GU359255, GU359376, GU359715, GU359882, GU360583; *Brachychloa schiemaniana* (Schweick.) S.M. Phillips, GU359256, GU359776, GU359881, GU360582; *Calamovilfa longifolia* (Hook.) Hack. ex Scribn. & Southw., GU359300, GU359357, GU359716, GU359880, GU360548; *Chaboissaea atacamensis* (Parodi) P.M. Peterson & Annable, GU359344, GU359382,

---

---

GU359729, GU359879, GU360595; *Chaboissaea ligulata* E. Fourn., GU359273, GU359381, GU359718, GU359863, GU360551; *Chaboissaea subbiflora* (Hitchc.) Reeder & C. Reeder, GU359318, GU359428, GU359707, GU359877, GU360518; *Chasmanthium latifolium* (Michx.) H.O. Yates, GU359319, GU359379, GU359720, GU359891, GU360517; *Chloris barbata* Sw., GU359320, GU359377, GU359723, GU359873, GU360514; *Chloris radiata* (L.) Sw., GU359321, GU359366, GU359724, GU359872, GU360513; *Chloris submutica* Kunth, GU359322, GU359375, GU359725, GU359871, GU360512; *Chloris virgata* Sw., GU359323, GU359384, GU359726, GU359870, GU360511; *Chrysochloa hindsii* C.E. Hubb., GU359325, GU359728, GU359868, GU360509; *Cleistogenes mucronata* Keng ex P.C. Keng & L. Liu, GU359234, GU359422, GU359696, GU359846, GU360604; *Cleistogenes squarrosa* (Trinius) Keng, GU359235, GU359393, GU359566, GU359845, GU360603; *Cynodon arcuatus* J. Presl, GU359257, GU359360, GU359578, GU359837, GU360596; *Cynodon dactylon* (L.) Pers., GU359243, GU359359, GU359603, GU359836, GU360580; *Cynodon hirsutus* Stent, GU359229, GU359358, GU359751, GU359876, GU360594; *Cynodon incompletus* Nees, GU359245, GU359347, GU359593, GU359847, GU360609; *Cynodon maritimus* Kunth, GU359248, GU359365, GU359710, GU359889, GU360591; *Cynodon pascuus* Nees, GU359249, GU359354, GU359711, GU359888, GU360590; *Cynodon transvaalensis* Burtt Davy, GU359250, GU359352, GU359712, GU359887, GU360588; *Dactyloctenium aegyptium* (L.) Willd., GU359251, GU359351, GU359713, GU359886, GU360587; *Dactyloctenium bogdanii* S.M. Phillips, GU359327, GU359371, GU359717, GU359867, GU360507; *Danthonia compressa* Austin, GU359345, GU359370, GU359688, GU359865, GU360521; *Dinebra retroflexa* (Vahl) Panz., GU359332, GU359355, GU359692, GU359778, GU360503; *Distichlis humilis* Phil., GU359333, GU359430, GU359693, GU359835, GU360502; *Distichlis scoparia* (Nees ex Kunth) Arechav., GU359334, GU359480, GU359694, GU359803, GU360501; *Distichlis spicata* (L.) Greene, GU359335, GU359479, GU359706, GU359802, GU360500; *Ectrosia leporina* R. Br., GU359336, GU359484, GU359685, GU359800, GU360498; *Ectrosia scabrida* C.E. Hubb., GU359317, GU359476, GU359697, GU359799, GU360497; *Eleusine indica* (L.) Gaetrn., GU359338, GU359473, GU359698, GU359797, GU360496; *Enteropogon macrostachyus* (Hochst. ex A.Rich.) Munro ex Benth., GU359340, GU359472, GU359700, GU359795, GU360494; *Enteropogon ramosus* B.K. Simon, GU359341, GU359470, GU359701, GU359794, GU360493; *Entoplocamia aristulata* (Hack. & Rendle) Stapf, GU359342, GU359469, GU359702, GU359793, GU360492; *Eragrostiella leioptera* (Stapf) Bor, GU359305, GU359486, GU359769, GU359827, GU360529; *Eragrostis barrelieri* Daveau, GU359295, GU359496, GU359759, GU359781, GU360539;

---

---

*Eragrostis cilianensis* (Bellardi) Vignolo ex Janch., GU359296, GU359495, GU359760, GU359780, GU360538; *Eragrostis desertorum* Domin, GU359289, GU359471, GU359719, GU359787, GU360545; *Eragrostis dielsii* Pilg., GU359297, GU359494, GU359761, GU359779, GU360537; *Eragrostis eriopoda* Benth., GU359290, GU359485, GU359754, GU359786, GU360544; *Eragrostis intermedia* Hitchc., GU359298, GU359501, GU359762, GU359818, GU360536; *Eragrostis lanicaulis* Lazarides, GU359292, GU359499, GU359756, GU359784, GU360542; *Eragrostis lugens* Nees, GU359302, GU359467, GU359704, GU359791, GU360535; *Eragrostis lurida* J. Presl subsp. *Lurida*, GU359294, GU359492, GU359758, GU359782, GU360540; *Eragrostis mexicana* (Hornem.) Link, GU359307, GU359483, GU359770, GU359825, GU360528; *Eragrostis minor* Host, GU359308, GU359475, GU359771, GU359824, GU360527; *Eragrostis pastoensis* (Kunth) Trin., GU359315, GU359490, GU359764, GU359792, GU360534; *Eragrostis pectinacea* (Michx.) Nees, GU359301, GU359489, GU359753, GU359832, GU360549; *Eragrostis pergracilis* S.T.Blake, GU359329, GU359465, GU359731, GU359789, GU360547; *Eragrostis pilgeri* subsp. *ancashensis* (P.M. Peterson, Refulio & Tovar) P.M. Peterson & Sánchez Vega, GU359288, GU359464, GU359686, GU359788, GU360546; *Eragrostis reptans* (Michx.) Nees, GU359309, GU359432, GU359772, GU359823, GU360526; *Eragrostis soratensis* Jedwabn., GU359287, GU359488, GU359766, GU359831, GU360532; *Eragrostis tenuifolia* (A. Rich.) Hochst. ex Steud., GU359303, GU359487, GU359767, GU359830, GU360531, *Eragrostis weberbaueri* Pilg., GU359304, GU359482, GU359768, GU359829, GU360530; *Erioneuron avenaceum* (Kunth) Tateoka, GU359310, GU359441, GU359773, GU359822, GU360525; *Erioneuron nealleyi* (Vasey) Tateoka, GU359311, - , GU359774, GU359821, GU360524; *Eustachys paspaloides* (Vahl) Lanza & Mattei, GU359312, GU359439, GU359740, GU359819, GU360522; *Gouinia paraguayensis* (Kuntze) Parodi, GU359314, GU359437, GU359732, GU359817, GU360504; *Gymnopogon grandiflorus* Roseng., B.R. Arill. & Izag., GU359200, GU359436, GU359733, GU359816, GU360581; *Harpachne harpachnoides* (Hack.) B.S. Sun & S. Wang, GU359113, GU359435, GU359734, GU359815, GU360611; *Hilaria cenchroides* Kunth, GU359143, GU359424, GU359736, GU359813, GU360697; *Leptochloa dubia* (Kunth) Nees, GU359145, GU359442, GU359738, GU359811, GU360695; *Leptochloa viscida* (Scribn.) Beal, GU359148, GU359429, GU359752, GU359808, GU360693; *Leptochloa univervia* (J. Presl) Hitchc. & Chase, GU359147, GU359461, GU359739 GU359809, GU360694; *Lepturus repens* R. Br., GU359150, GU359427, GU359730, GU359893, GU360691; *Lintonia nutans* Stapf, GU359151, GU359426, GU359743, GU359980, GU360690; *Lycurus setosus* (Nutt.) C. Reeder, GU359153, GU359451, GU359745, GU359975, GU360687; *Microchloa caffra*

---

---

Nees, GU359155, GU359453, GU359746, GU359972, GU360670; *Microchloa kunthii* Desv., GU359141, GU359434, GU359747, GU359971, GU360684; *Monanthochloe littoralis* Engelm., GU359157, GU359460, GU359748, GU359970, GU360699; *Monelytrum luederitzianum*, Hack. GU359158, GU359459, GU359749, GU359969, GU360682; *Mosdenia phleoides* (Hack.) Stent, GU359159, GU359458, GU359750, GU359967, GU360681; *Muhlenbergia montana* (Nutt.) Hitchc., GU359162, GU359455, GU359705, GU359964, GU360678; *Muhlenbergia ramulosa* (Kunth) Swallen, GU359115, GU359444, GU359627, GU359953, GU360717; *Muhlenbergia reverchonii*, HM143111.1, HM143414.1, HM143504.1, HM143213.1, HM143597.1; *Muhlenbergia himalayensis*, HM143075.1, HM143383.1, HM1434701, HM143177.1, HM143662.1; *Muhlenbergia argentea*, HM143044.1, HM143352.1, HM143441.1, HM143145.1, HM1436301.1; *Muhlenbergia virescens*, HM143134.1, HM143432.1, HM143525.1, HM143277.1, HM143621.1; *Muhlenbergia utilis*, HM143131.1, HM143430.1, HM143522.1, HM143233.1, HM143617.1; *Muhlenbergia thurberi*, HM143129.1, HM143428.1, HM143520.1, HM143231.1, HM143715.1; *Muhlenbergia subaristata*, HM143123.1, HM143424.1, HM143515.1, HM143225.1, HM143609.1; *Muhlenbergia quadridentata*, HM143107.1, HM143410.1, HM143500.1, HM143209.1, HM143694.1; *Muhlenbergia pectinata*, HM143100.1, HM143404.1, HM143493.1, HM143202.1, HM143608.1; *Muhlenbergia mexicana*, HM143091.1, HM143395.1, HM143486.1, HM143193.1, HM143678.1; *Muhlenbergia majalcensis*, HM143088.1, HM143394.1, HM143483.1, HM143190.1, HM143675.1; *Muhlenbergia japonica*, HM143081.1, HM143388.1, HM143746.1, HM143183.1, HM143571.1; *Muhlenbergia durangensis*, HM143060.1, HM143368.1, HM143456.1, HM143162.1, HM143641.1; *Muhlenbergia tenuifolia*, HM143227.1, HM143427.1, HM143519.1, HM143229.1, HM143613.1; *Muhlenbergia richardsonis* (Trin.) Rydb., GU359163, GU359454, GU359617, GU359978, GU360677; *Muhlenbergia schreberi* J.F. Gmel., GU359161, GU359456, GU359765, GU359950, GU360679; *Munroa andina* Phil. Argentina, Jujuy, Abra Pampa, ruta 71 camino a Cochinoca, 19 Feb 2011, Amarilla & Moreno 17 (CORD), #\*, #\*, #\*, #\*, #\*; *Munroa argentina* Griseb. Argentina, San Miguel del Tucumán, Amaicha del Valle, Colalao del Valle, ruta 307 alrededores del museo Pachamama, 16 Mar 2011, Amarilla 11, (CORD), #\*, #\*, #\*, #\*, #\*; *Munroa decumbens* Phil. Argentina, La Rioja, Rosario Vera Peñaloza, Chepes, frente al cementerio, 20 Mar 2010, Chiapella & Amarilla 2576b (CORD), #\*, #\*, #\*, #\*, #\*; *Munroa mendocina* Phil. Argentina, Catamarca, Tinogasta, ruta provincial 3, a un Km del límite con La Rioja, 24 Mar 2010. Chiapella & Amarilla 2618 (CORD), #\*, #\*, #\*, #\*, #\*; *Munroa squarrosa* (Nuttal) Torr. México, Chihuahua, Juan Aldama, Ruta 16 pasando Juan Aldama camino a Ojinaga, 10 Sep 2011, Angulo & Amarilla 392 (XAL), #\*,

---

---

#\*, #\*, #\*, #\*; *Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla. México, Durango, Gómez Palacio, Ruta 45 hacia el norte, 40 Km antes de Torreón, 6 Sep 2011, *Anglo & Amarilla* 369 (XAL), #\*, #\*, #\*, #\*, #\*; *Neesiochloa barbata* (Nees) Pilg., GU359122, - , GU359634, GU360005, GU360724; *Neobouteloua lophostachya* (Griseb.) Gould, GU359123, GU359396, GU359635, GU360004, GU360725; *Neyraudia reynaudiana* (Kunth) Keng ex Hitchcock, GU359124, GU359397, GU359636, GU360003; *Orinus kokonorica* (K. S. Hao) Keng ex X. L. Yang, GU359140, GU359399, GU359628, GU359999, GU360728; *Orinus thoroldii* (Stapf ex Hemsely) Bor, GU359126, GU359400, GU359626, GU359998, GU360721; *Pappophorum pappiferum* (Lam.) Kuntze, GU359128, GU359402, GU359596, GU359996, GU360700; *Pereilema beyrichianum* (Kunth) Hitchc., GU359129, GU359493, GU359597, GU359995, GU360712; *Pereilema ciliatum* E. Fourn., GU359130, GU359516, GU359598, GU359979, GU360719; *Perotis hordeiformis* Nees, GU359132, GU359520, GU359600, GU359991, GU360708; *Perotis indica* (L.) Kuntze, GU359133, GU359521, GU359990, GU360707; *Psammagrostis wiseana* C.A. Gardner & C.E. Hubb., GU359137, GU359533, GU359615, GU359986, GU360703; *Redfieldia flexuosa* (Thurb. ex A. Gray) Vasey, GU359138, GU359525, GU359604, GU359985, GU360702; *Rytidosperma pictum* (Nees & Meyen) Nicora var. *Pictum*, GU359227, GU359527, GU359607, GU359983, GU360655; *Saugetia fasciculata* Hitchc. & Chase, GU359156, GU359528, GU359608, GU359982, GU360638; *Schedonnardus paniculatus* (Nutt.) Trel., GU359201, GU359529, GU359609, GU359936, GU360673; *Scleropogon brevifolius* Phil., GU359203, GU359530, GU359611, GU359919, GU360635; *Sohnsia filifolia* (E. Fourn.) Airy Shaw, GU359204, GU359531, GU359612, GU359918, GU360634; *Spartina densiflora* Brongn., GU359206, - , GU359510, GU359640, GU359916; *Sporobolus cryptandrus* (Torr.) A. Gray, GU359208, GU359524, GU359674, GU359914, GU360631; *Sporobolus indicus* (L.) R. Br., GU359209, GU359504, GU359637, GU359913, GU360630; *Sporobolus rigens* (Trin.) Desv., GU359213, GU359517, GU359666, GU359909, GU360627; *Sporobolus wrightii* Munro ex Scribn., GU359216, GU359511, GU359668, GU359906, GU360624; *Swallenia alexandrae* (Swallen) Soderstr. & H.F. Decker, GU359217, GU359512, GU359669, GU359920, GU360639; *Tetrapogon villosus* Desf., GU359221, GU359514, GU359684, GU359901, GU360619; *Tragus australianus* S.T. Blake, GU359222, GU359515, GU359673, GU359900, GU360618; *Tragus berteronianus* Schult., GU359223, GU359535, GU359662, GU359899, GU360617; *Tragus berteronianus* Schult., GU359224, GU359503, GU359675, GU359898, GU360616; *Tragus heptaneuron* W.D. Clayton, GU359225, GU359526, GU359676, GU359897, GU360615; *Tragus koelerioides* Asch., GU359226, GU359551, GU359677, GU359896, GU360614; *Tragus pedunculatus* Pilg., GU359185, GU359552, GU359678, GU359895,

---

---

GU360613; *Trichloris crinita* (Lag.) Parodi, GU359171, GU359555, GU359907, GU360625; *Trichloris pluriflora* E. Fourn., GU359214, GU359553, GU359679, GU359934, GU360653; *Trichoneura eleusinoides* (Rendle) Ekman, GU359135, GU359522, GU359601, GU359988, GU360705; *Tetrapogon villosus* Desf., GU359221, GU359514, GU359684, GU359901, GU360619; *Tragus australianus* S.T. Blake, GU359222, GU359515, GU359673, GU359900, GU360618; *Tragus berteronianus* Schult., GU359223, GU359535, GU359662, GU359899, GU360617; *Tragus berteronianus* Schult., GU359224, GU359503, GU359675, GU359898, GU360616; *Tragus heptaneuron* W.D. Clayton, GU359225, GU359526, GU359676, GU359897, GU360615; *Tragus koelerioides* Asch., GU359226, GU359551, GU359677, GU359896, GU360614; *Tragus pedunculatus* Pilg., GU359185, GU359552, GU359678, GU359895, GU360613; *Trichloris crinita* (Lag.) Parodi, GU359171, GU359555, GU359907, GU360625; *Trichloris pluriflora* E. Fourn., GU359214, GU359553, GU359679, GU359934, GU360653; *Trichoneura eleusinoides* (Rendle) Ekman, GU359135, GU359522, GU359601, GU359988, GU360705; *Trichoneura weberbaueri* Pilg., GU359172, GU359565, GU359681, GU359948, GU360668; *Tridens muticus* (Torr.) Nash, GU359173, GU359557, GU359682, GU359947, GU360667; *Triodia basedowii* Pritz., GU359174, GU359550, GU359683, GU359946, GU360666; *Triodia bynoei* (C.E. Hubb.) Lazarides, GU359176, GU359560, GU359649, GU359944, GU360664; *Triodia desertorum* (C.E. Hubb.) Lazarides, GU359177, GU359561, GU359672, GU359943, GU360663; *Triodia intermedia* Cheel, GU359179, GU359563, GU359642, GU359941, GU360661; *Triodia melvillei* (C.E. Hubb.) Lazarides, GU359181, GU359542, GU359644, GU359939, GU360659; *Triodia pungens* R. Br., GU359182, GU359540, GU359645, GU359938, GU360658; *Triodia rigidissima* (Pilg.) Lazarides, GU359198, GU359556, GU359646, GU359937, GU360657; *Triplasis purpurea* (Walter) Chapm., GU359184, GU359536, GU359647, GU359921, GU360656; *Tripogon spicatus* (Nees) Ekman, GU359170, GU359537, GU359648, GU359935, GU360640; *Triraphis mollis* R. Br., GU359187, GU359539, GU359650, GU359933, GU360669; *Triraphis ramosissima* Hack., GU359188, GU359541, GU359652, GU359931, GU360651; *Uniola condensata* Hitchc., GU359191, GU359534, GU359654, GU359927, GU360649; *Uniola paniculata* L., GU359192, GU359543, GU359655, GU359926, GU360648; *Vaseyochloa multinervosa* (Vasey) Hitchc., GU359193, GU359544, GU359656, GU359925, GU360646; *Willkommia sarmentosa* Hack., GU359194, GU359545, GU359657, GU359924, GU360645; *Zoysia japonica* Steud., GU359196, GU359547, GU359658, GU359923, GU360643; *Zoysia macrantha* Desv., GU359142, GU359558, GU359660, GU360017, GU360641.

---

---

**S. Material Vegetal Examinado:** Se detalla la información de etiquetas de herbario de cada localidad incluida en los estudios. El nombre de las localidades que se muestran subrayadas representa el material que se utilizó en los estudios citológicos

*Munroa argentina* Griseb.

ARGENTINA. **Catamarca.** Depto. Andalgalá, Las Minas, 6-III-1916, *Jørgensen 1696 p.p.* (BAA, LIL 45082) (ejemplares en flor y fruto). Depto. Tinogasta, Vallecito a Agua Negra, 2400 m, 7-II-1930, *Schreiter 6308* (LIL 1992). **Jujuy.** Depto. Humahuaca, Humahuaca, 3050 m, 16-II-1931, *Parodi 9703* (BAA) (ejemplares con flores inmaduras y algunas pocas maduras). **La Rioja.** Depto. Famatina, Las Gredas, 1700 m, II-1907, *Kurtz 14387* (CORD) (ejemplares en flor y fruto). **Mendoza.** Depto. Las Heras, entre Uspallata y Ciénagas de Yalguaraz, 16-XII-1956, *Ruiz Leal & Roig 18372* (BAA) (ejemplares en fruto). **Salta.** Depto. Cafayate, Cafayate, Ruta 40, lecho del río Chuscha, 28-III-2010, *Chiapella & Amarilla 2712* (CORD) (ejemplares en flor). Depto. Rosario de Lerma, Puerta Tastil, 24-II-1972, *Cabrera et al. 22421* (BAA) (ejemplares en flor). **San Juan.** Depto. Jáchal, al norte de la escuela Entre Ríos, 22-III-2010, *Chiapella & Amarilla 2596* (CORD) (ejemplares en fruto). **Tucumán.** Depto. Tafí del Valle, río Tafí del Valle entre el Molle y Carapunco, 28-III-2010, *Chiapella & Amarilla 2728* (CORD) (ejemplares en flor y fruto); Amaicha del Valle, Colalao del Valle, ruta 307 alrededores del museo Pachamama, 16-III-2011, *Amarilla 11* (CORD) (ejemplares en flor y fruto).

BOLIVIA. **Chuquisaca.** Prov. Nor Sinti, 1 km al sur de Camargo, 26-II-1995, *Wood 9498* (LPB) (ejemplares en flor). **Potosí.** Prov. Nor Chichas, 2-IV-1999, *López 522* (LPB) (ejemplares en flor).

*Munroa andina* Phil.

ARGENTINA. **Catamarca**. Depto. Belén, “El Potrero” Laguna Blanca, 3500 m, 25-II-1934, *Peirano 299* (LIL 29802). **Jujuy**. Depto. Tilcara, Huacalera, Pampa Corral, 4000 m, 2-I-1955, *Cabrera 12108* (BAA); Abra Pampa, ruta 71 camino a Cochinoca, 19-II-2011, *Amarilla & Moreno 17* (CORD). **La Rioja**. Depto. Vinchina, Valle del Río Bonete cercanías de Las Cuevitas, 4-IV-1950, *Hunziker & Caso 4189* (BAB). **Salta**. Depto. San Antonio de los Cobres, *Cabrera 8699* (LP). **Tucumán**: Depto. Tafí del Valle, Lara, 3200 m, 16-II-1912, *Rodríguez 335* (LIL 11190).

CHILE. **I Región Tarapacá**. Prov. El Tamarugal, 6 km SW of Colchane on HWY towards Huará, 27-III-2001, *Peterson 15666* (CORD). **II Región Antofagasta**. Prov. Antofagasta, km 29,5 East from San Pedro de Atacama, 16-III-2001, *Peterson 15504* (CORD).

BOLIVIA. **Oruro**. Prov. Ladislao Cabrera, 11-III-2008, *Acho 53* (LPB). **Potosí**. Prov. Daniel Campos, 15-III-2008, *Acho 97* (LPB). **La Paz**. Prov. Gualberto Villarroel, 17-II-1992, *Beck 21006A* (LPB).

*Munroa decumbens* Phil.

ARGENTINA. **Catamarca**. Depto. Tinogasta, Entre Cazadero Grande y El Quemado, 3550 m, 21-III-1951, *Voorst 3188* (BAA, LIL 364811). **Jujuy**. Depto. Rinconada, Mina Piriquitas, 4300 m, 1-III-1964, *Schwabe 816* (BAA). **La Rioja**. Depto. Vinchina, Las Cortaderas, entre El Peñón y El Jagüel, 27-II-1879, *Hieronymus & Niederlein 237* (CORD); Rosario Vera Peñaloza, Chepes, frente al cementerio, 20-III-2010, *Chiapella & Amarilla 2576b* (CORD). **Salta**. Depto. Los Andes, entre San Antonio y Cangrejillos, 3850 m, 25-II-1972, *Cabrera et al. 22432* (BAA). **San Juan**. Depto. Iglesia, Punta del Cerro de Los Médanos, 3040 m, 4-III-1962, *Ruiz Leal 22154* (BAA). **Tucumán**. Depto. Tafí del Valle, El Molle, 3000 m, 3-II-1933, *Parodi 10998* (BAA).

BOLIVIA. **Oruro**. Prov. Avaroa. S. Paqador, 8-III-1993, *Peterson 12764* (LPB). **Potosí**. Prov. Quijarro, 26-III-1992, *Peterson 13092* (LPB).

PERÚ. **Arequipa**. Prov. Arequipa, 28-III-1949, *Vargas 1981* (LIL).

*Munroa mendocina* Phil.

ARGENTINA. **Catamarca**. Depto. Belén, Belén, lecho del río Belén, 25-III-2010, *Chiapella & Amarilla 2656* (CORD). Depto. Tinogasta, Tinogasta, ruta provincial 3, a 1 km del límite con La Rioja, 24-III-2010, *Chiapella & Amarilla 2618* (CORD). **La Rioja**. Depto. Chilecito, ruta 40 entre Soñogasta y Villa Unión, 11-IV-2012, *Nagahama 128* (CORD); General Lavalle, ruta 40 entre Soñogasta y Villa Unión, 11-IV-2012, *Nagahama 129* (CORD). **Mendoza**. Depto. San Rafael, Los Pocitos, desde escuela Parlamentos hacia Sosneado (ruta 144), 9-III-2011, *Fortunato 10001* (BAB). **San Juan**. Depto. Jáchal, Ruta 40 entre Jáchal y Tucunuco, 8-III-2011, *Fortunato 9960* (BAB).

*Munroa pulchella* (Kunth) Amarilla

MEXICO. **Coahuila**. Munic. Sacramento, Ruta 30 entre Sacramento y Cuatro Ciénegas, 7-IX- 2011, *Angulo & Amarilla 380* (XAL). **Chihuahua**. Munic. Ciudad Jiménez, Ruta 80D a 10 km de ruta 16, 10-IX-2011, *Angulo & Amarilla 391* (XAL); Munic. Ciudad Jiménez, Ruta 45, llegando a Ciudad Jiménez, 10-IX-2011, *Angulo & Amarilla 389* (XAL). **Durango**. Munic. Gómez Palacio, Ruta 45 hacia el norte, 40 km antes de Torreón, 6-IX-2011, *Angulo & Amarilla 369* (XAL). **Tamaulipas**. Munic. Ciudad de Maíz, Ruta 101 llegando a la frontera con San Luis Potosí, 13-IX-2011, *Angulo & Amarilla 400* (XAL).

*Munroa squarrosa* (Nutt.) Torr.

MÉXICO. **Chihuahua**. Munic. Juan Aldama, Ruta 16 pasando Juan Aldama camino a Ojinaga, 10-IX-2011, *Angulo & Amarilla 392* (XAL).

ESTADOS UNIDOS DE NORTE AMÉRICA. **Colorado**. Nathrop co., Chaffe Country, 30-VIII-1913, *Hitchcock s.n.* (LIL 412388). **New Mexico**. Quay, 10 millas SE Logan, 13-VIII-1939, *E. Williams s.n.* (LIL 140306). **Texas**. Sine locus, 10-VII-1950, *Thornton s.n.* (LIL 388355). ). **Utah**. Kane co., Colorado plateau, 27-VIII-2008, *Fertig 24313* (UTC);

White Cliffs, 2-IX-2005, *Fertig 22317* (UTC). **Wyoming**. Johnson co., Fork Powder River, 1901, *Leslie 256* (CORD); Thernopolis co., 28- VII-1937, *Weotherwax 2212* (LIL).

**Tabla S2.** Matriz morfológica de datos utilizada en el análisis filogenético. **A-**Habito, **B-**Crecimiento heteroblástico, **C-**Racimo contenido en las vainas, **D-**Lígulas, **E-**Desarticulación de la raquilla por encima de las glumas, **F-**Desarticulación de la raquilla entre los antecios, **G-**Glumas en la espiguilla lateral, **H-**Lemma de las espiguillas laterales), **I-**Arista central en la lemma, **J-**Arista lateral en la lemma, **K-**Lemma lobulada, **L-**Lodículas, **M-**Sexualidad, **N-**Estambres, **O-**Estigma papiloso-piloso, **P-**Compresión dorsiventral de la cariopsis, **Q-**Hilo, **R-**Número cromosómico básico

|                       | A | B | C | D | E     | F | G | H | I | J | K | L | M | N | O | P | Q | R |
|-----------------------|---|---|---|---|-------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| <i>S. brevifolius</i> | 0 | 0 | 0 | 1 | 1     | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| <i>S. alexandrae</i>  | 0 | 0 | 0 | 1 | 1     | 0 | 1 | 2 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 2 |
| <i>B. benthamiana</i> | 0 | 1 | 1 | 0 | 1     | 0 | 1 | 2 | 1 | 0 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>B. kingii</i>      | 0 | 1 | 1 | 0 | 1     | 0 | 1 | 2 | 1 | 1 | 2 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| <i>E. avenaceum</i>   | 0 | 0 | 0 | 1 | 1     | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>E. nealleyi</i>    | 0 | 0 | 0 | 1 | 1     | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| <i>D. pulchella</i>   | 0 | 1 | 1 | 1 | 1     | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| <i>M. squarrosa</i>   | 1 | 1 | 1 | 1 | [0,1] | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 2 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| <i>M. argentina</i>   | 1 | 1 | 1 | 1 | 0     | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| <i>M. mendocina</i>   | 1 | 1 | 1 | 1 | 0     | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| <i>M. decumbens</i>   | 1 | 1 | 1 | 1 | 1     | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |
| <i>M. andina</i>      | 1 | 1 | 1 | 1 | 1     | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 3 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 |

**S1. Técnica de tinción clásica con Feulgen**

Para la observación de los cromosomas mitóticos y su análisis morfométrico se empleó la tinción de Feulgen según Jong (1997) como sigue:

- a) Lavar las raicillas fijadas en agua destilada por 10 minutos.
- b) Incubar en ácido clorhídrico 5N a temperatura ambiente por 30 a 90 minutos dependiendo de la especie a tratar.
- c) Enjuagar en agua destilada 5 minutos.
- d) Secar las raicillas en papel de filtro.
- e) Colorear con reactivo de Schiff (fucsina leucobásica) en oscuridad por 60 minutos a temperatura ambiente.
- f) Aplastar los meristemas con una gota de ácido acético 45%.
- g) Los preparados se hicieron permanentes removiendo el cubreobjetos por congelamiento con aire líquido y montado con bálsamo Entellan (Merk, USA).

---

**S2.** Para estimar la tasa de sustitución nucleotídica de las regiones de ADN del cloroplasto en *M. argentina*, se utilizaron las tasas de sustitución de  $1,0 \times 10^{-9}$  y  $3,0 \times 10^{-9}$  s/s/y (Wolfe et al. 1987) y con estas tasas se calculó el cambio de tamaño efectivo poblacional ( $N_e$ ) de cada grupo genético con el programa DNAsp y la corrección de Jukes y Cantor. La tasa de sustitución específica para los loci cpDNA se calculó como la divergencia de secuencia dividido por dos linajes y por dos veces el tiempo de divergencia (3,5 Ma) entre las poblaciones de *M. argentina*. El cálculo de estas tasas de sustitución específica para *M. argentina* era necesario para poder comparar el cambio del tamaño efectivo de las poblaciones en el tiempo utilizando estas estimaciones con las obtenidas por Wolfe & al. (1987). Wolfe K.H., Li W.H. & Sharp P.M. (1987) Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. Proc Natl Acad Sci USA 84: 9054–9058.

---

**S3.** Las 19 variables bioclimáticas utilizadas en los estudios de modelado de Nicho Ecológico.

BIO 1 = Temperatura Media Anual

BIO 2 = Rango promedio de temperaturas diarias (Tmax-Tmin)

BIO 3 = Isotermalidad  $(\text{BIO2}/\text{BIO7}) \times 100$

BIO 4 = Estacionalidad de la temperatura (Desv. estand.  $\times 100$ )

BIO 5 = Temperatura máxima del mes más cálido

BIO 6 = Temperatura mínima del mes más frío

BIO 7 = Rango anual de la temperatura (BIO5–BIO6)

BIO 8 = Temperatura media del trimestre más húmedo

BIO 9 = Temperatura media del trimestre más seco

BIO 10 = Temperatura media del trimestre más cálido

BIO 11 = Temperatura media del trimestre más frío

BIO 12 = Precipitación anual

BIO 13 = Precipitación del mes más húmedo

BIO 14 = Precipitación del mes más seco

BIO 15 = Estacionalidad de la precipitación

BIO 16 = Precipitación del trimestre más húmedo

BIO 17 = Precipitación del trimestre más seco

BIO 18 = Precipitación del trimestre más cálido

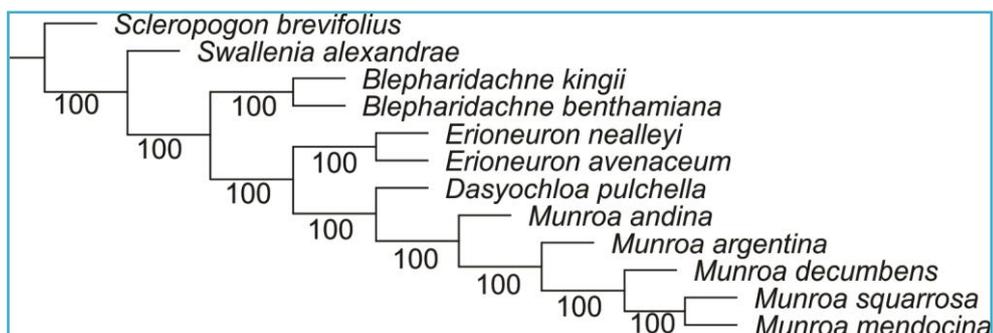
BIO 19 = Precipitación del trimestre más frío

**Tabla S3.** Matriz básica de datos utilizada en los análisis estadísticos. **S3:** Números del 1–20 indican los caracteres morfológicos métricos y medidos en milímetros. Los valores “99” indican dato no aplicable. **S3’:** los números del 21–60 representan los caracteres morfológicos discretos. Los valores 0, 1, 2 y 3 indican, ausencia, presencia, o estados múltiples. En ambas tablas, las letras en mayúsculas indican a los taxones: *Munroa squarrosa* (A), *M. argentina* (B), *M. mendocina* (C), *M. decumbens* (D), *M. andina* (E) and *M. pulchella* (F).

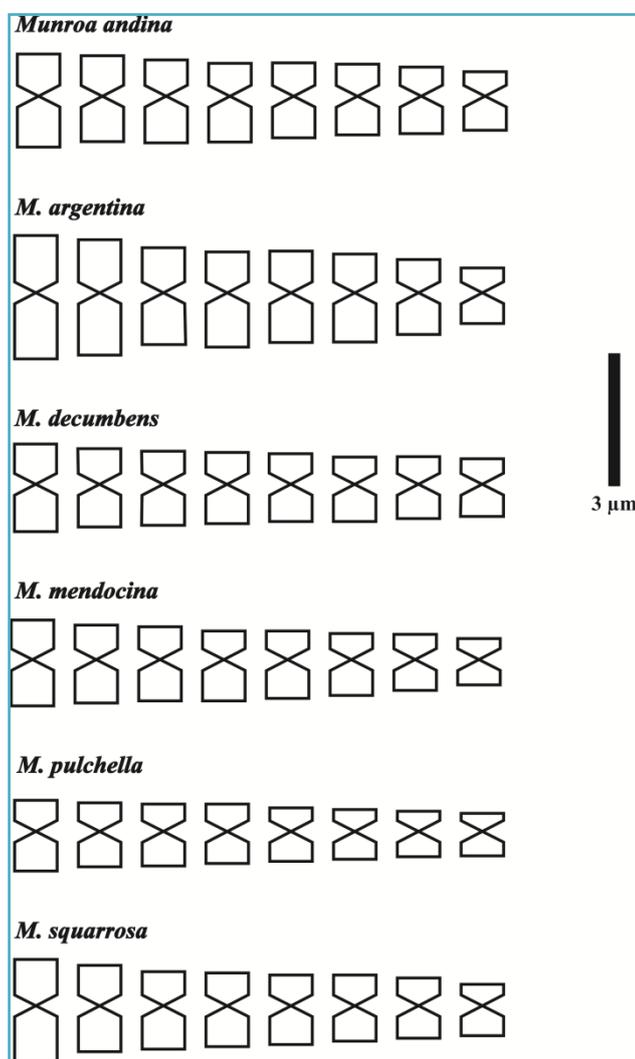
| S3 | 1   | 2   | 3  | 4   | 5    | 6   | 7    | 8  | 9   | 10  | 11  | 12  | 13  | 14   | 15   | 16   | 17  | 18  | 19   | 20   |
|----|-----|-----|----|-----|------|-----|------|----|-----|-----|-----|-----|-----|------|------|------|-----|-----|------|------|
| A  | 120 | 90  | 70 | 3   | 9    | 2   | 0,5  | 10 | 10  | 6   | 3   | 2,5 | 3   | 3    | 1,2  | 1    | 1,2 | 1   | 0,4  | 0,3  |
| A  | 95  | 80  | 90 | 3   | 10   | 2   | 0,8  | 12 | 11  | 8   | 4   | 3,8 | 3,2 | 3    | 0,9  | 1    | 1,5 | 1   | 0,5  | 0,27 |
| A  | 150 | 130 | 80 | 3   | 8,5  | 1,5 | 1    | 20 | 15  | 8   | 4   | 4   | 2,5 | 3,5  | 1    | 1,2  | 1,5 | 1,1 | 0,5  | 0,3  |
| A  | 150 | 120 | 78 | 3,5 | 9    | 1,6 | 1    | 22 | 12  | 7   | 4,2 | 4   | 2,8 | 3,5  | 0,9  | 1,5  | 1,3 | 1   | 0,4  | 0,27 |
| A  | 80  | 60  | 60 | 4   | 9    | 1,4 | 0,9  | 25 | 14  | 10  | 3   | 2,6 | 3   | 3,2  | 0,8  | 1,3  | 1,2 | 1   | 0,4  | 0,3  |
| A  | 75  | 55  | 55 | 5   | 10   | 2   | 0,6  | 25 | 10  | 8   | 3,5 | 3,2 | 2   | 4    | 1    | 1    | 1,2 | 1,1 | 0,4  | 0,3  |
| A  | 90  | 75  | 60 | 6   | 10   | 1,9 | 0,5  | 20 | 10  | 6   | 4   | 3,8 | 2,5 | 4,5  | 0,9  | 1,5  | 1,2 | 1   | 0,35 | 0,27 |
| B  | 78  | 70  | 65 | 4,5 | 9    | 2   | 1    | 16 | 10  | 8   | 4,2 | 4   | 3   | 3    | 0,8  | 1,3  | 1,5 | 1   | 0,4  | 0,28 |
| B  | 80  | 75  | 50 | 3   | 9    | 1   | 1    | 10 | 6   | 6   | 5   | 4,8 | 3   | 3    | 1    | 1    | 1,2 | 1   | 0,7  | 0,3  |
| B  | 120 | 80  | 55 | 3   | 9    | 1   | 1    | 10 | 6   | 6   | 5,1 | 5   | 3   | 3    | 0,9  | 1,2  | 1,5 | 1   | 0,9  | 0,25 |
| B  | 90  | 70  | 60 | 3,5 | 9    | 1,5 | 0,8  | 11 | 6   | 5,5 | 5,2 | 5   | 2,5 | 3    | 0,9  | 1,1  | 1,4 | 1   | 0,7  | 0,3  |
| B  | 110 | 80  | 55 | 3,2 | 8    | 1,3 | 1    | 9  | 5   | 8   | 5   | 4,9 | 3   | 3    | 0,8  | 1,3  | 1,2 | 1,2 | 0,7  | 0,27 |
| B  | 150 | 60  | 52 | 4,5 | 9,5  | 1   | 1,2  | 10 | 6,5 | 6   | 4,8 | 4,5 | 3,5 | 4    | 1,2  | 1    | 1,6 | 1   | 0,95 | 0,33 |
| B  | 95  | 55  | 80 | 3   | 9    | 1   | 0,8  | 11 | 6,5 | 5,5 | 5   | 4,7 | 3   | 3    | 0,9  | 1    | 1,5 | 1,1 | 0,8  | 0,31 |
| B  | 100 | 65  | 60 | 3   | 8,5  | 1   | 0,9  | 10 | 6   | 5,8 | 5   | 4,5 | 4   | 4,5  | 1    | 1,5  | 1   | 1   | 0,6  | 0,27 |
| B  | 130 | 80  | 90 | 4   | 10   | 1,3 | 0,85 | 13 | 7   | 6   | 4,8 | 4,6 | 4,5 | 4,5  | 1,3  | 1,2  | 1,5 | 1   | 0,8  | 0,25 |
| B  | 115 | 75  | 90 | 5   | 11   | 1,4 | 1    | 14 | 7,5 | 6   | 5   | 5   | 4   | 4    | 1,3  | 1,3  | 1,5 | 1,3 | 0,8  | 0,3  |
| B  | 87  | 55  | 55 | 3   | 9    | 1   | 0,8  | 11 | 6   | 5   | 5,1 | 5,2 | 3   | 3    | 0,9  | 1,4  | 1,2 | 1   | 0,7  | 0,3  |
| B  | 93  | 60  | 60 | 3,5 | 9    | 1   | 1    | 10 | 6   | 5   | 5   | 4,5 | 3,5 | 3    | 0,8  | 1,25 | 1   | 0,9 | 0,8  | 0,3  |
| B  | 82  | 78  | 75 | 3   | 8,5  | 1   | 0,9  | 10 | 6,5 | 5,6 | 4,9 | 4,7 | 4   | 4    | 0,8  | 1,2  | 1   | 1   | 0,8  | 0,28 |
| B  | 130 | 80  | 90 | 4   | 10   | 1,3 | 0,9  | 13 | 6,5 | 6   | 5   | 4,9 | 5   | 4,5  | 1,3  | 1    | 1,6 | 1   | 0,9  | 0,31 |
| C  | 115 | 75  | 85 | 5   | 9    | 1   | 0,5  | 10 | 10  | 8   | 5   | 4,9 | 5   | 4,5  | 1,3  | 1,2  | 1,6 | 1   | 1    | 0,3  |
| C  | 65  | 56  | 50 | 3   | 7,1  | 1   | 0,6  | 11 | 10  | 9   | 99  | 99  | 5   | 3,2  | 0,4  | 1,5  | 1,5 | 1   | 0,8  | 99   |
| C  | 140 | 70  | 80 | 5   | 10,5 | 1,5 | 0,6  | 12 | 10  | 9   | 99  | 99  | 5,5 | 3,2  | 0,8  | 1,5  | 1,3 | 1   | 0,68 | 99   |
| C  | 62  | 55  | 50 | 3   | 7    | 2   | 0,5  | 10 | 12  | 8   | 99  | 99  | 4,2 | 3,2  | 0,7  | 1,4  | 1,5 | 1,1 | 0,8  | 99   |
| C  | 130 | 65  | 50 | 4,5 | 10   | 2   | 0,8  | 12 | 10  | 9   | 99  | 99  | 5,5 | 2,8  | 0,8  | 1,3  | 1,5 | 1,2 | 0,8  | 99   |
| C  | 115 | 60  | 55 | 4   | 9,5  | 1,5 | 0,7  | 13 | 11  | 9   | 99  | 99  | 5   | 2,85 | 0,9  | 1,3  | 1,4 | 1   | 0,8  | 99   |
| C  | 90  | 45  | 40 | 4   | 8    | 1,5 | 0,6  | 14 | 12  | 10  | 99  | 99  | 5,2 | 2,5  | 0,5  | 1,1  | 1,5 | 1,1 | 0,8  | 99   |
| C  | 84  | 45  | 40 | 3,5 | 8    | 1   | 0,8  | 13 | 12  | 8   | 99  | 99  | 4   | 3    | 0,66 | 1,5  | 1,4 | 1,1 | 0,8  | 99   |
| C  | 70  | 55  | 50 | 3   | 7    | 1   | 0,8  | 15 | 13  | 9   | 99  | 99  | 4,2 | 3,5  | 0,5  | 1,5  | 1,3 | 1,1 | 0,7  | 99   |
| C  | 120 | 65  | 90 | 5,5 | 11   | 2   | 0,6  | 12 | 10  | 8   | 99  | 99  | 4,3 | 3    | 0,9  | 1,4  | 1,3 | 1,2 | 0,7  | 99   |
| C  | 60  | 40  | 55 | 3   | 7    | 2   | 0,7  | 11 | 11  | 9   | 99  | 99  | 3,2 | 3    | 0,4  | 1,3  | 1,1 | 1   | 0,6  | 99   |
| C  | 70  | 40  | 60 | 3   | 8    | 2   | 0,5  | 10 | 10  | 8   | 99  | 99  | 3,5 | 2,8  | 0,4  | 1,2  | 1,5 | 1,1 | 0,8  | 99   |
| D  | 180 | 80  | 70 | 7   | 1,5  | 1,7 | 0,5  | 12 | 12  | 9   | 99  | 99  | 6   | 3,8  | 0,9  | 1    | 1,5 | 1   | 0,8  | 99   |
| D  | 58  | 35  | 45 | 3   | 4    | 2   | 0,5  | 10 | 10  | 5   | 4,5 | 9   | 3   | 3    | 1    | 0,9  | 1,5 | 1   | 0,75 | 99   |
| D  | 45  | 30  | 30 | 4,5 | 4    | 2   | 0,8  | 12 | 11  | 6   | 5   | 9   | 3   | 2,8  | 0,5  | 0,8  | 1,5 | 1   | 0,75 | 99   |
| D  | 41  | 35  | 33 | 3   | 4,5  | 2   | 0,6  | 10 | 9   | 8   | 6   | 8   | 3   | 2,8  | 0,9  | 0,9  | 1,5 | 0,9 | 0,75 | 99   |
| D  | 60  | 40  | 35 | 4,8 | 4    | 2   | 0,5  | 11 | 11  | 6,5 | 5,2 | 10  | 3   | 2,5  | 0,7  | 0,9  | 1,2 | 0,8 | 0,6  | 99   |
| D  | 65  | 30  | 54 | 4   | 4    | 1,5 | 1    | 10 | 10  | 5,5 | 5,5 | 9   | 3,5 | 2,6  | 0,8  | 0,9  | 1,3 | 1   | 0,75 | 99   |
| D  | 78  | 40  | 43 | 3   | 4,2  | 1,7 | 0,6  | 10 | 9   | 8   | 6,2 | 9   | 3,8 | 2,9  | 0,7  | 0,8  | 1,5 | 1   | 0,8  | 99   |
| D  | 80  | 45  | 65 | 3,5 | 3    | 1,7 | 0,8  | 11 | 10  | 7,2 | 6   | 9,5 | 3   | 3    | 0,8  | 0,7  | 1,4 | 0,9 | 0,75 | 99   |
| D  | 100 | 50  | 88 | 3   | 3    | 1,8 | 0,6  | 9  | 9   | 5,6 | 5   | 9,6 | 2,9 | 2,5  | 0,9  | 0,8  | 1,6 | 0,8 | 0,8  | 99   |
| D  | 120 | 45  | 80 | 3,5 | 4    | 2   | 0,6  | 11 | 10  | 6   | 5,5 | 8   | 3   | 2,9  | 1    | 0,8  | 1,7 | 1   | 0,85 | 99   |
| D  | 40  | 30  | 30 | 5   | 4,5  | 2   | 0,8  | 10 | 10  | 6   | 5   | 8   | 3,5 | 3    | 1    | 0,9  | 1,5 | 0,8 | 0,8  | 99   |
| D  | 150 | 35  | 30 | 4,5 | 4    | 2   | 1    | 10 | 9   | 8   | 6,5 | 8,3 | 3   | 2,5  | 0,9  | 0,7  | 1,5 | 1   | 0,8  | 99   |







**Figura S1.** Único árbol obtenido luego de los análisis de parsimonia. Los valores por debajo de las ramas indican soporte bootstrap



**Figura S2.** Idiogramas obtenidos para de las especies de *Munroa*. *M. pulchella* = *D. pulchella*

**Tabla S4.** Matriz de morfológica de datos utilizada en la reconstrucción de caracteres ancestrales. El – indica dato no aplicable.

|                       | Habito | Desarticulación de la raquilla | Sexualidad | Gluma | Consistencia de la gluma |
|-----------------------|--------|--------------------------------|------------|-------|--------------------------|
| <i>S. brevifolius</i> | 0      | 0                              | 2          | 1     | 1                        |
| <i>S. alexandrae</i>  | 0      | 0                              | 0          | 1     | 1                        |
| <i>B. benthamiana</i> | 0      | 0                              | 1          | 1     | 1                        |
| <i>B. kingii</i>      | 0      | 0                              | 1          | 1     | 1                        |
| <i>E. avenaceum</i>   | 0      | 0                              | 0          | 1     | 1                        |
| <i>E. nealleyi</i>    | 0      | 0                              | 0          | 1     | 1                        |
| <i>M. pulchella</i>   | 0      | 0                              | 0          | 1     | 1                        |
| <i>M. andina</i>      | 1      | 0                              | 1          | 1     | 1                        |
| <i>M. argentina</i>   | 1      | 1                              | 0          | 1     | 0                        |
| <i>M. decumbens</i>   | 1      | 0                              | 1          | 1     | 1                        |
| <i>M. mendocina</i>   | 1      | 1                              | 1          | 0     | -                        |
| <i>M. squarrosa</i>   | 1      | 0                              | 1          | 1     | 1                        |

**Tabla S5.** La tabla resume los resultados de los análisis genéticos y demográficos realizados para las poblaciones de *Munroa argentina*. Diversidad haplotídica ( $h$ ), diversidad nucleotídica ( $\pi$ ),  $F_s$  de Fu ( $F_s$ ),  $D$  de Tajima ( $D_T$ ),  $R_2$  de Ramos-Onsins y Rozas' ( $R_2$ ), y las desviaciones de las sumas de cuadrado (SSD).

| Pob.  | n   | Prob. | K  | $h (\pm SD)$             | $\pi (\pm SD)$              | $F_s/D_T$   | Prob.( $ D_T  > 0/P$ ) | $R_2/P/k$       | SSD     |
|-------|-----|-------|----|--------------------------|-----------------------------|-------------|------------------------|-----------------|---------|
| PAB   | 59  | 0,96  | 17 | 0,804<br>( $\pm 0,044$ ) | 0,0012<br>( $\pm 0,00077$ ) | -8,19/-1,59 | -1,59 /0,03            | 0,049/0,018/2,1 | 0,00277 |
| PrA   | 47  | 0,95  | 12 | 0,848<br>( $\pm 0,028$ ) | 0,0010<br>( $\pm 0,00067$ ) | -1,75/-0,40 | -0,4 /0,4              | 0,095/0,36/1,78 | 0,02329 |
| MA    | 46  | 0,95  | 12 | 0,778<br>( $\pm 0,056$ ) | 0,0008<br>( $\pm 0,00057$ ) | -7,51/-1,59 | -1,59 /0,03            | 0,05/0,012/1,5  | 0,00132 |
| Total | 152 | 0,98  | 41 | 0,92<br>( $\pm 0,010$ )  | 0,0021<br>( $\pm 0,0001$ )  | -8,3 /-1,55 | -1,55 /0,02            | 0,041/0,021/3,7 | 0,00235 |

## **Bibliografía**

- Abbott, R.J., Smith, L.C., Milne, R.I., Crawford, R.M.M, Wolff, K. & Balfour, J. 2000. Molecular analysis of plant migration and refugia in the Arctic. *Science* 289: 1343–1346.
- Acosta, C.M. & Premoli, A.C. 2010. Evidence of chloroplast capture in South American *Nothofagus* (subgenus *Nothofagus*, *Nothofagaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 54(1): 235-242.
- Allred, K.W. 1981. Cousins to the south: amphitropical disjunctions in southwestern grasses. *Desert Pl.* 3: 98–106.
- Allred, K. W. 2003. *Aristida*, in M. E. Barkworth, K. M. Capels, S. Long & M. B. Piep (eds.), *Flora of North America 25: Magnoliophyta: Commelinidae (in part): Poaceae*, part 2, pp. 315-342. New York: Oxford University Press.
- Alsos, I.G., Eidesen, P.B., Ehrich, D., Skrede, I., Westergaard, K., Jacobsen, G.H., Landvik, J.Y., Taberlet, P. & Brochmann, C. 2007. Frequent long-distance plant colonization in the changing Arctic. *Science*. 316: 1606–1609.
- Amarilla, L.D., Chiapella, J.O., Nagahama, N. & Anton, A.M. 2013. Inclusion of *Dasyochloa* in the Amphitropical Genus *Munroa* (Poaceae, Chloridoideae) based on morphological evidence. *Darwiniana, nueva serie* 1(2): 241–252.
- Anton, A.M. & Hunziker, A.T. 1978. El género *Munroa* (Poaceae): Sinopsis morfológica y taxonómica. *Boletín de la Academia de Ciencias (Córdoba, Argentina)* 52: 229–252.
- Antonelli, A., Nylander, J.A.A., Persson C. & Sanmartín I. 2009. Tracing the impact of the Andean uplift on Neotropical plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106 (24): 9749–9754.
- Antonelli, A. & Sanmartin, I. 2011. Why are there so many plant species in the Neotropics? *Taxon* 60: 403–414.
- APG II. 2003. "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants". *Bot. J. Linn. Soc.* 141: 399-436.
- Arber, A. 1934. The Gramineae. *Cambridge University Press*. Cambridge. Pp. 480.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge.

- Axelrod, D.I. 1979. Age and origin of Sonoran Desert vegetation. *Occasional Papers of the California Academy of Sciences* 132: 1–74.
- Baranzelli, M.C., Johnson, L.A., Cosacov, A., Alicia, N. & Sérsic, A.N. 2014. Historical and ecological divergence among populations of *Monttea chilensis* (Plantaginaceae), an endemic endangered shrub bordering the Atacama Desert, Chile. *Evol. Ecol.* 28 (4): 751-774.
- Barbour, M. 1969. Patterns of genetic similarity between *Larrea divaricata* of North and South America. *American Midland Naturalist* 81: 54–67.
- Barkworth, M.E. & Everett, J. 1987. Evolution in Stipeae: Identification and relationship of its monophyletic taxa. Pp. 251–264 in: Soderstrom, T.R., Hilu, K.W., Campbell, C.S. & Barkworth, M.E (eds.), *Grass systematics and evolution*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Press.
- Bell, C.D. & Donoghue, M.J. 2005. Phylogeny and biogeography of Valerianaceae (Dipsacales) with special reference to the South American valerians. *Organisms Divers. Evol.* 5: 147–159.
- Bernardello, L.M., Stiefkens, L. & Las Peñas, M.L. 2008. Karyotype studies in *Grabowskia* and *Phrodus* (Solanaceae). *Pl. Syst. Evol.* 275 (3-4): 265-269.
- Bickford, D., Lohman, D.J. & Sodhi, N.S. 2007. Cryptic species as a window on diversity and conservation. *Trends. Ecol Evol.* 22: 148–155.
- Blattner, F.R. 2004. Phylogeny of *Hordeum* (Poaceae) as inferred by nuclear rDNA ITS sequences. *Molec. Phylogen. Evol.* 33: 289–299.
- Blattner, F.R. 2006. Multiple intercontinental dispersals shaped the distribution area of *Hordeum* (Poaceae). *New Phytologist* 169: 603–614
- Bonierbale, M.W., Plaisted, R.L. & Tanksley, S.D. 1988. RFLP maps based on a common set of clones reveal modes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120: 1095–1103.
- Bouchenak-khelladi, Y., Verboom, G.A., Hodkinson, T.R., Salamin, N., Francois, O., Chonghaile, G.N. & Savolainen, V. 2009. The origins and diversification of C<sub>4</sub> grasses and savanna-adapted ungulates. *Glob. Ch. Biol.* 15: 2397–2417.

- Bouchenak-Khelladi, Y., Verboom, G.A., Savolainen, V. & Hodkinson, T.R. 2010. Biogeography of the grasses (Poaceae): a phylogenetic approach to reveal evolutionary history in geographical space and geological time. *Bot. J. Linn. Soc.* 162: 543–557.
- Bray, W.L. 1898. On the relation of the flora of the lower Sonoran zone in North America to the flora of the arid zones of Chili and Argentine. *Botanical Gazette* 121-147.
- Bremer, K. 2002. Gondwanan evolution of the grass alliance of families (Poales). *Evolution*, 56(7):1374-1387.
- Bremer, B., Bremer, K., Chase, M., Fay, M., Reveal, J., Soltis, D., & Stevens, P. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society*.
- Brown, W.V. 1977. The Kranz syndrome and its subtypes in grass systematics. *Mem. Torrey Bot. Club* 23(3): 1-97.
- Cáceres, M.R. 1950. Los caracteres anatómicos foliares de *Munroa mendocina* y *Blepharidachne benthiana*. *Revista Argentina de Agronomía* 17: 233-240.
- Cabrera, A.L. & Willink, A. 1980. Biogeografía de América Latina. O.E.A. Serie de Biología, Monografía 13. Ed. 2, corr. Washington, DC: General Secretariat of the Organization of American States.
- Carlquist, S.C. 1983. Intercontinental dispersal. *Sonderb. Naturwiss. Vereins in Hamburg* 7: 37–47.
- Carstens, B.C. & Richards, C.L. 2007. Integrating coalescent and ecological niche modeling in comparative phylogeography. *Evolution* 61: 1439–1454.
- Christin, A.P., Salamin, N., Muasya, A.M., Roalson, E.H., Russier, F. & Besnard, G. 2008. Evolutionary switch and genetic convergence on rbcL following the evolution of C4 photosynthesis. *Mol. Biol. Evol.* 25: 2361–2368.
- Christin, A.P., Salamin, N., Kellogg, E., Vicentini, A. & Besnard, G. 2009. Integrating phylogeny into studies of C<sub>4</sub> variation in the grass. *Pl. Physiol.* 149: 82–87.

- Chase, M.W., & al. 2000. Higher-level systematics of the monocotyledons: an assessment of current knowledge and a new classification. *Monocots: Systematics and Evolution: Systematics and Evolution*. 7.
- Clement, M., Posada, D. & Crandall, K.A. 2000. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. *Mol. Ecol.* 9: 1657–1659.
- Clayton, W. D. 1981. Evolution and distribution of grasses. *Annals of the Missouri Botanical Garden*. 5-14.
- Clayton, W. D., & Renvoize, S. A. 1986. Genera graminum. Grasses of the world. *Kew bulletin additional series*. 13.
- Columbus, J.T., Cerros-Tlatilpa, R., Kinney, M.S., Siqueiros-Delgado, M.E., Bell, H.L., Griffith, M.P. & Refulio-Rodriguez, N.F. 2007. Phylogenetics of Chloridoideae (Gramineae): a preliminary study based on nuclear ribosomal internal transcribed spacer and chloroplast trnL-F sequences. *Aliso* 23: 565–579.
- Collins, W.D., Blackmon, M., Bitz, C., Bonan, G., Bretherton, C.S., *et al.* 2004. The community climate system model: CCSM3. *Journal of Climate* 19: 2122–2143.
- Collins, W.D., Blackmon, M., Bitz, C., Bonan, G., Bretherton, C.S., Carton, J.A., Chang, P., Doney, S.C., Hack, J.J., Henderson, T.B., Kiehl, J.T., Large, W.G., McKenna, D.S., Santer, B.D. & Smith, R.D. 2006. The community climate system model: CCSM3. *Journal of Climate* 19: 2122–2143.
- Comes, H.P. & Kadereit, J.W. 1998. The effect of Quaternary climatic changes on plant distribution and evolution. *Trends Plant. Sci.* 3: 432–438.
- Connor, H.E. 1981. Evolution of reproductive systems in the Gramineae. *Annals of the Missouri botanical garden*. 48-74.
- Cosacov, A., Sérsic, A.N., Sosa, V., Johnson, L.A., & Cocucci, A.A. 2010. Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography*. 37(8): 1463-1477.
- Cosacov, A., Johnson, L.A., Paiaro, V., Cocucci, A.A., Córdoba, F.E., & Sérsic, A.N. 2013. Precipitation rather than temperature influenced the phylogeography

- of the endemic shrub *Anarthrophyllum desideratum* in the Patagonian steppe. *Journal of Biogeography* 40(1): 168-182.
- Covas, G. 1949. Estudios cariologicos en antofitas. III. *Darwiniana* 9: 158.
- Crepet, W.L. 2008. The Fossil Record of Angiosperms: Requiem or Renaissance? 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 95(1): 3-33.
- Cruden, R.W. 1966. Birds as agents of long-distance dispersal for disjunct plant groups of the temperate Western Hemisphere. *Evolution* 20: 517–532.
- Davidse, G. 1987. Fruit dispersal in the Poaceae. Pp. 143–155 in: Soderstrom, T.R., Hilu, K.W., Campbell, C.S. & Barkworth, M.E. (eds.), *Grass systematics and evolution*. Washington, D.C. Smithsonian Institution Press.
- Davis, J.I., Stevenson, D.W., Petersen, G., Seberg, O., Campbell, L.M., Freudenstein, J.V., Goldman, D.H., & al. 2004. A phylogeny of the monocots, as inferred from *rbcL* and *atpA* sequence variation, and a comparison of methods for calculating jackknife and bootstrap values. *Systematic Botany*. 29(3): 467-510.
- de Queiroz, A. 2005. The resurrection of oceanic dispersal in historical biogeography. *Trends. Ecol Evol.* 20: 68–73.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzales, L., Tablada, M. & Robledo, C.W. 2010. InfoStat versión 2010. InfoStat Group, *Facultad de Ciencias Agrarias*, pp. 334 Argentina. Universidad Nacional de Córdoba.
- Donoghue, M.J. 2011. Bipolar biogeography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 108(16): 6341–6342
- Doyle, J.J. & Doyle, J.A. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15.
- Drummond, A.J., Rambaut, A., Shapiro, B. & Pybus, O.G. 2005. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1185–1192.
- Drummond, A.J. & Rambaut, A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol. Biol.* 7: 214.

- Dugas, D.P. & Retallack, G.J. 1993. Middle Miocene fossil grasses from Fort Ternan, Kenya. *Journal of Paleontology*. 67: 113–128.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. 2002. A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Mol. Ecol.* 11: 2571–2581.
- Du Rietz, G.E. 1940. Problems of the bipolar plant distribution. *Acta Phytogeogr. Suecica* 13: 215–282.
- Duvall, M.R., Peterson, P.M., Christensen, A.H. 1994. Alliances of *Muhlenbergia* within the New World Eragrostideae are identified by phylogenetic analysis of mapped restriction sites from plastid DNA's. *Amer. J. Bot.* 81: 622–629.
- Duvall, M.R., Davis, J.I., Clark, L.G., Noll, J.D., Goldman, D.H., & Sánchez-Ken, J.G. 2007. Phylogeny of the grasses (Poaceae) revisited. *Aliso: A Journal of Systematic and Evolutionary Botany*, 23(1): 237-247.
- Edgar, R.C. 2004. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC bioinformatics*. 5(1): 113.
- Edwards, E.J., Osborne, C.P., Strömberg, C.A.E. & Smith, S.A. 2010. The Origins of C<sub>4</sub> Grasslands: Integrating Evolutionary and Ecosystem. *Science* 328: 587–591.
- Edwards, E.J. & Smith, S.A. 2010. Phylogenetic analyses reveal the shady history of C<sub>4</sub> grasses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 107: 2532–2537.
- Escudero, M., Valcarcel, V., Vargas, P. & Luceno, M. 2010. Bipolar disjunctions in *Carex*: Long-distance dispersal, vicariance, or parallel evolution? *Flora*. 205: 118–127.
- Evanno, G., Regnaut, S. & Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.* 8: 2611–2620.
- Excoffier, L., Laval, G. & Schneider, S. 2005. Arlequin ver 3.01. An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47–60.
- Farris, J.S., Källersjö, M., Kluge, A.G. & Bult, C. 1994. Testing significance of incongruence. *Cladistics* 10: 315–319.

- Folguera, A., Orts, D., & Spagnuolo, M.I. 2011. A review of Late Cretaceous to Quaternary palaeogeography of the southern Andes. *Biological Journal of the Linnean Society* 103: 250–268
- Fu, Y.X., & Li, W.H. 1993. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133(3): 693-709.
- Fu, X.Y. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 147: 915–925.
- Garcia, M.G., Silva, R.S., Carniello, M.A., Veldman, J.W., Rossi, A.A. & de Oliveira, L.O. 2011. Molecular evidence of cryptic speciation, historical range expansion, and recent intraspecific hybridization in the Neotropical seasonal forest tree *Cedrela fissilis* (Meliaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 61: 639–649.
- Garzione, C.N., Hoke, G.D., Libarkin, J.C., Withers, S., MacFadden, B., Eiler, J., Ghosh, P. & Mulch, A. 2008. Rise of the Andes. *Science* 320: 1304–1307.
- Givnish, T.J., Ames, M., McNeal, J.R., McKain, M.R., Steele, P.R., dePamphilis, C.W., Graham, S.W. & al. 2010. Assembling the tree of the monocotyledons: plastome sequence phylogeny and evolution of Poales 1. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 97 (4): 584-616.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S., Källersjö, M., Oxelman, B., Ramírez, M.J. & Szumik, C.A. 2003. Improvements to resampling measures of group support. *Cladistics* 19: 324-332.
- Goloboff, P.A., Farris, J.S. & Nixon, K.C. 2008. TNT a free program for phylogenetic analysis. *Cladistics* 24: 774-786.
- González, F., Wagner, S.T., Salomo, K., Symmank, L., Samain, M., Isnard, S., Rowe, N.P., Neinhuis, C. & Wanke, S. 2014. Present trans-Pacific disjunct distribution of *Aristolochia* subgenus *Isotrema* (Aristolochiaceae) was shaped by dispersal, vicariance and extinction. *J. Biogeogr.* 41: 380–391.
- GPWG (Grass Phylogeny Working Group). 2001. Phylogeny and subfamilial classification of the grasses (Poaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 88: 373-457.
- Graham, A. 1999. Late Cretaceous and Cenozoic history of North American vegetation. New York, USA: Oxford University Press.

- Gregory-Wodzicki, K.M. 2000. Uplift history of the central and northern Andes: A review. *Geol. Soc. Amer. Bull.* 112: 1091–1105.
- Grisebach, A. 1879. Symbolae ad Floram argentinam. *Abhandlungen der Königlichen Gesellschaft der Wissenschaften zu Göttingen* 24: 300.
- Guerrero, P.C., Rosas, M., Arroyo, M.T.K., Wiens, J.J. 2013. Evolutionary lag times and recent origin of the biota of an ancient desert (Atacama–Sechura). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 110 (28): 11469–11474
- Gutierrez, M., Gracén, V.E., & Edwards, G.E. 1974. Biochemical and cytological relationships in C<sub>4</sub> plants. *Planta* 119(4): 279-300.
- Hartley, A.J. & Chong, G. 2002. Late Pliocene age for the Atacama Desert: implications for the desertification of western South America. *Geology* 30: 43–46.
- Hasumi, H. & Emori, S. 2004. K-1 coupled GCM (MIROC) description. Tokyo: Center for Climate System Research, University of Tokyo.
- Hattersley, P.W., & Watson, L. 1992. Diversification of photosynthesis. *Grass evolution and domestication* 38: 116.
- Heled, J. & Drummond, A.J. 2010. Bayesian inference of species trees from multilocus data. *Mol. Biol. Evol.* 27: 570–580.
- Hewitt, G.M. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405: 907–913.
- Hijmans, R.J., Cameron, S.E., Parra, J. L., Jones, P.G. & Jarvis, A. 2005. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. *International Journal of Climatology* 25: 1965–1978.
- Hilu, K.W., & Alice, L.A. 2001. A phylogeny of Chloridoideae (Poaceae) based on matK sequences. *Systematic Botany*. 26(2): 386-405.
- Hilu, K.W. 2004. Phylogenetics and chromosomal evolution in the Poaceae (grasses). *Amer. J. Bot.* 52:13–22
- Hipp, A.L., Hall, J.C., & Sytsma, K.J. 2004. Congruence versus phylogenetic accuracy: revisiting the incongruence length difference test. *Systematic Biology* 53(1): 81-89.

- Hollin, J.T. & Schilling, D.H. 1981. Late Wisconsin–Weichselian mountain glaciers and small ice caps. In: Denton GH, Hughes TJ, editors. In: The last great ice sheets. New York: John Wiley and Sons. p. 179–206.
- Horn, C. 1993 Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: Results of a palynostratigraphic study. *Palaeogeogr. Palaeocl.* 105: 267–309.
- Horn, C., Guerrero, J., Sarmiento, G.A. & Lorente, M.A. 1995. Andean tectonics as a cause of changing drainage patterns in Miocene northern South America. *Geology* 23: 237–240.
- Horn, C., Wesselingh, F.P., ter Steege, H., Bermudez, M.A., Mora, A., Sevink, J., Sanmartín, I., Sanchez-Meseguer, A., Anderson, C.L., Figueiredo, J.P., Jaramillo, C., Riff, D., Negri, F.R., Hooghiemstra, H., Lundberg, J., Stadler, T., Särkinen, T. & Antonelli, A. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution and biodiversity. *Science* 330: 927–993
- Hua, X. & Wiens, J.J. 2010. Latitudinal variation in speciation mechanisms in frogs. *Evolution* 64: 429–443.
- Hua, X. & Wiens, J.J. 2013. How Does Climate Influence Speciation?. *The American Naturalist* 182(1): 1-12.
- Huang, J., Giannasi, D.E. & Price, R.A. 2005. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Ephedraceae) inferred from chloroplast and nuclear DNA sequences. *Mol. Phylogen. Evol.* 35: 48–59.
- Huelsenbeck, J.P. & Ronquist, F. 2001. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- Hulton, N.R.J., Purves, R.S., McCulloch, R.D., Sugden, D.E. & Bentley, M.J. 2002. The last glacial maximum and deglaciation in southern South America. *Quat. Sci. Rev.* 21: 233–241.
- Hughes, C. & Eastwood, R. 2006. Island radiation on a continental scale: Exceptional rates of plant diversification after uplift of the Andes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 10334–10339.
- Huson, D.H. & Bryant, D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254–267.

- Hunziker, A.T. & Anton, A. M. 1979. A synoptical revision of *Blepharidachne* (Poaceae). *Brittonia* 31(4): 446-453.
- Humboldt, F.W.H.A. 1817. De Distributione Geographica Platarum Secundum Coeli Temperiem et Altitudem Montium, Prolegomena. Paris: *Libraria graeco-latino-germanica*.
- Hsiao, C., Jacobs, S.W. L., Chatterton, N.J., & Asay, K.H. 1999. A molecular phylogeny of the grass family (Poaceae) based on the sequences of nuclear ribosomal DNA (ITS). *Australian Systematic Botany* 11(6): 667-688.
- Ickert-Bond, S.M., & Wojciechowski, M.F. 2004. Phylogenetic relationships in *Ephedra* (Gnetales): evidence from nuclear and chloroplast DNA sequence data. *Syst. Bot.* 29: 834–849.
- Inda, L.A., Segarra-Moragues, J.G., Müller, J., Peterson, P.M. & Catalán, P. 2008. Dated historical biogeography of the temperate Loliinae (Poaceae, Pooideae) grasses in the northern and southern hemispheres. *Mol. Phylogen. Evol.* 46: 932–957.
- Jackson, S.T. & Overpeck, J.T. 2000. Responses of plant populations and communities to environmental changes of the late Quaternary. *Paleobiology* 26: 194–220.
- Jakob, S.S., Ihlow, A. & Blattner, F.R. 2007. Combined ecological niche modeling and molecular phylogeography revealed the evolutionary history of *Hordeum marinum* (Poaceae) – niche differentiation, loss of genetic diversity, and speciation in Mediterranean Quaternary refugia. *Mol Ecol.* 16: 1713–1724.
- Jakob, S.S., Martinez-Meyer, E., Blattner, F.R. 2009. Phylogeographic Analyses and Paleodistribution Modeling Indicate Pleistocene In Situ Survival of *Hordeum* Species (Poaceae) in Southern Patagonia without Genetic or Spatial Restriction. *Mol. Biol. Evol.* 26(4): 907–923.
- Jakob, S.S, Heibl, C., Rödder, D. & Blattner, F.R. 2010. Population demography influences climatic niche evolution: evidence from diploid American *Hordeum* species (Poaceae). *Mol. Ecol.* 19: 1423–1438.
- Jong J. 1997 Laboratory Manual of plant Cytological. *Techniques*. Royal Botanical Garden, Edinburgh.

- Johnston, I.M. 1940. The floristic significance of shrubs common to North and South American deserts. *J. Arnold Arboretum* 21: 356–363.
- Kadereit, J.W., Griebeler, E.M. & Comes, H.P. 2004. Quaternary diversification in European alpine plants: pattern and process. *Phil. Trans. Roy. Soc. Lond. Ser. B.* 359: 265–274.
- Kass, R.E. & Raftery, A.E. 1995. Bayes factors. *J. Amer. Statist. Assoc.* 90: 773–795.
- Kellogg, E.A. 2001. Evolutionary history of the grasses. *Plant physiology* 125(3): 1198-1205.
- Koch, M.A., Kiefer, C., Ehrich, D., Vogel, J., Brochmann, C. & Mummenhoff, K. 2006. Three times out of Asia Minor: the phylogeography of *Arabis alpina* L. (Brassicaceae). *Mol. Ecol.* 15: 825–839.
- Kluge, A.G. & Farris J.S. 1969. Quantitative phyletics and the evolution of anurans. *Syst. Biol.* 18(1): 1-32. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/sysbio/18.1.1>.
- Kunth, K.S. 1815. *Triodia*, in F.W.H.A. von Humboldt, A. J. A. Bonpland & K. S. Kunth (eds.), *Nova Genera et Species Plantarum*, vol. 1, pp. 155-156. Paris: Librariæ Græco-Latino-Germanicæ.
- Kunth, K.S. 1829. *Uralespis*, in F. W. H. A. von Humboldt, A. J. A. Bonpland & K. S. Kunth (eds.), *Révision des Graminées*, vol. 6, pp. 108. Paris: Botanique, Gide fils, rue Saint-Marc-Feyedeu.
- Lachmuth, S., Durka, W. & Schurr, F. 2010. The making of a rapid plant invader: genetic diversity and differentiation in the native and invaded range of *Senecio inaequidens*. *Mol. Ecol.* 19: 3952–3967.
- Levin, R.A. & Miller, J.S. 2005. Relationships within tribe Lycieae (Solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism. *Amer. J. Bot.* 92: 2044–2053.
- Levan, A., Fredga, K. & Sandberg, A. 1964. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas* 52: 201–220.
- Le Quesne, C., Acuna, C., Boninsegna, J.A., Rivera, A. & Barichivich, J. 2008. Long-term glacier variations in the Central Andes of Argentina and Chile,

- inferred from historical records and tree-ring reconstructed precipitation. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 281: 334–344.
- Lia, V.V., Confalonieri, V.A., Comas, C.I. & Hunziker, J.H. 2001. Molecular phylogeny of *Larrea* and its allies (Zygophyllaceae): Reticulate evolution and the probable time of creosote bush arrival to North America. *Mol. Phylogen. Evol.* 21: 309–320.
- Librado, P. & Rozas, J. 2009. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451–1452.
- Linder, H.P., & Kellogg, E.A. 1995. Phylogenetic patterns in the commelinid clade. *Monocotyledons: systematics and evolution* 2: 473-496.
- Lobo, J.M., Jiménez-Valverde, A. & Real, R. 2008. AUC: a misleading measure of the performance of predictive distribution models. *Global Ecology and Biogeography* 17: 145–151.
- Loera, I., Victoria, S. & Ickert-Bond, S.M. 2012. Diversification in North American arid lands: Niche conservatism, divergence and expansion of habitat explain speciation in the genus *Ephedra*. *Mol. Phylogen. Evol.* 65: 437–450.
- Luebert, F. & Wen, J. 2008. Phylogenetic analysis and evolutionary diversification of *Heliotropium* sect. *Cochranea* (Heliotropiaceae) in the Atacama Desert. *Syst. Bot.* 33: 390–402.
- Maddison, W.P. & Maddison, D.R. 2011. Mesquite: A modular system for evolutionary analysis, version 2.75. <http://mesquite project.org>.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27: 209–220.
- Masson, R. & Kadereit, G. 2013. Phylogeny of Polycnemoideae (Amaranthaceae): Implications for biogeography, character evolution and taxonomy. *Taxon* 62: 100–111.
- Mathiasen, P., & Premoli, A.C. 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(2): 371-385.

- Méndez, M.A., Soto, E.R., Correa, C., Veloso, A., Vergara, E., Sallaberry, M. & Iturra, P. 2004. Morphological and genetic differentiation among Chilean populations of *Bufo spinulosus* (Anura: Bufonidae). *Rev. Chi. Hist. Nat.* 77: 559–567.
- Michener, C.D. & Sokal R.R. 1957. A quantitative approach to a problem in classification. *Evolution* 11: 130–162.
- Masson, R. & Kadereit, G. 2013. Phylogeny of Polycnemoideae (Amaranthaceae): Implications for biogeography, character evolution and taxonomy. *Taxon* 62: 100–111.
- Miller, J.S. 2002. Phylogenetic relationships and the evolution of gender dimorphism in *Lycium* (Solanaceae). *Syst. Bot.* 27: 416–428.
- Miller, M.P. 2005. Alleles in Space: computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Heredity* 96: 722–724.
- Miller, M.A., Pfeiffer, W. & Schwartz, T. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees, pp. 1–8 in: *Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*. New Orleans: IEEE.
- Monmonier, M.S. 1973. Maximum-Difference Barriers: An Alternative Numerical Regionalization Method. *Geographical Analysis*. 5(3): 245-261.
- Morando, M., Avila, L.J., Turner, C.R. & Sites, J.W. 2007. Molecular evidence for a species complex in the patagonian lizard *Liolaemus bibronii* and phylogeography of the closely related *Liolaemus gracilis* (Squamata: Liolaemini). *Mol. Phylogen. Evol.* 43: 952–973.
- Morrell, P.L., Porter, J.M. & Friar, E.A. 2000. Intercontinental dispersal: The origin of the widespread South American plant species *Gilia laciniata* (Polemoniaceae) from a rare California and Oregon coastal endemic. *Pl. Syst. Evol.* 224: 13–32.
- Moore, M.J. & Jansen, R.K. 2006. Molecular evidence for the age, origin, and evolutionary history of the American desert plant genus *Tiquilia* (Boraginaceae). *Mol. Phylogen. Evol.* 39: 668–687.
- Moore, M.J., Tye, A. & Jansen, R.K. 2006. Patterns of long-distance dispersal in *Tiquilia* subg. *Tiquilia* (Boraginaceae): Implications for the origins of

- amphitropical disjuncts and Galápagos Islands endemics. *Amer. J. Bot.* 93: 1163–1177.
- Moore, A.J., Bartoli, A., Tortosa, R. D. & Baldwin, B.G. 2012. Phylogeny, biogeography, and chromosome evolution of the anphitropical genus *Grindelia* (Asteraceae) inferred from nuclear ribosomal and chloroplast sequence data. *Taxon* 61(1): 211–230.
- Morrell, P.L., Porter, J.M. & Friar, E.A. 2000. Intercontinental dispersal: The origin of the widespread South American plant species *Gilia laciniata* (Polemoniaceae) from a rare California and Oregon coastal endemic. *Pl. Syst. Evol.* 224: 13–32.
- Morrone, J.J. 2006. Biogeographic areas and the transition zone of Latin America and the Caribbean Islands based on panbiogeographic and cladistics analyses of the entomofauna. *Annual Review of Entomology* 51: 467–494.
- Nei, M. 1987. Molecular evolutionary genetics. New York: Columbia University Press.
- Nie, Z., Sun, H., Manchester, S.R., Meng, Y., Luke, Q. & Wen, J. 2012. Evolution of the intercontinental disjunctions in six continents in the *Ampelopsis* clade of the grape family (Vitaceae). *BMC Evolutionary Biology*. 12: 17
- Nicora, E.G. & Rúgolo de Agrasar, Z. E. 2009. *Munroa*, In R. Kiesling. *Flora de San Juan* 4: 218–220. Monocotiledóneas. Argentina: Fundación Universidad Nacional de San Juan.
- Osborne, C.P. & Freckleton, R.P. 2009. Ecological selection pressures for C4 photosynthesis in the grasses. *Proc. R. Soc. B.* 276(1663): 1753–1760.
- Ossa, P.G., Perez, F. & Arnesto, J.J. 2013. Phylogeography of two closely related species of *Nolana* from the coastal Atacama Desert of Chile: post-glacial population expansions in response to climate fluctuations. *J. Biogeogr.* 40: 2191–2203.
- Palma, R.E., Marquet, P.A. & Boric-Bargetto, D. 2005. Inter- and intraspecific phylogeography of small mammals in the Atacama Desert and adjacent areas of northern Chile. *J. Biogeogr.* 32: 1931–1941.

- Parodi, L.R. 1934. Contribuciones al estudio de las Gramíneas del género *Munroa*. *Revista del Museo de la Plata* 34: 171–193.
- Preston, J.C. & Kellogg, E.A. 2007. Conservation and divergence of APETALA1/FRUITFULL-like gene function in grasses: evidence from gene expression analyses. *The Plant Journal* 52(1), 69-81.
- Peterson, P.M. & Morrone, O. 1997. Allelic variation in the amphotropical disjunct *Lycurus setosus* (Poaceae: Muhlenbergiinae). *Madroño* 44: 334–346.
- Peterson, P.M. & Columbus, J.T. 1997. Allelic variation in the amphotropical disjunct *Scleropogon brevifolius* (Poaceae: Eragrostideae). *Biollania*, 6: 473-490.
- Peterson, P.M. & Ortíz-Díaz, J.J. 1998. Allelic variation in the amphotropical disjunct *Muhlenbergia torreyi* (Poaceae: Muhlenbergiinae). *Brittonia* 50: 381–391.
- Peterson, P.M. 2003. *Muhlenbergia*, in M. E. Barkworth, K. M. Capels, S. Long & M. B. Piep (eds.), *Flora of North America 25: Magnoliophyta: Commelinidae (in part): Poaceae*, part 2, pp. 145-200. New York: Oxford University Press.
- Peterson, A.T., Papes, M. & Eaton, M. 2007. Transferability and model evaluation in ecological niche modeling: a comparison of GARP and Maxent. *Ecography* 30: 550–560
- Peterson, P.M., Columbus, J.T. & Pennington, S.J. 2007. Classification and biogeography of New World grasses: Chloridoideae. *Aliso* 23: 580–594.
- Peterson, P.M., Romaschenko, K. & Johnson, G. 2010. A classification of the Chloridoideae (Poaceae) based on multi-gene phylogenetic trees. *Mol. Phylogen. Evol.* 55: 580–598.
- Pfenninger, M. & Posada, D. 2002. Phylogeographic history of the land snail *Candidula unifasciata* (Helicellinae, Stylommatophora): fragmentation, corridor migration, and secondary contact. *Evolution* 56: 1776–1788.
- Philippi, R.A. 1891. *Munroa andina*, *Munroa decumbens*. Catalogus Praevius Plantarum in Itinere ad Tarapacá a Federico Philippi Lectarum. *Anales del Museo Nacional de Santiago de Chile* 1: 90.

- Philippi, R.A. 1870. Sertum Mendocinum alternum; ó sea, catálogo de las plantas recogidas cerca de Mendoza y en los caminos que conducen de Chile a esa ciudad. *Anales de la Universidad de Chile* 36: 159-212.
- Piggott, M.P., Chao, N.L. & Beheregaray, L.B. 2011. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. *Biological Journal of the Linnean Society* 102: 391–40359.
- Pirie, M.D., Chatrou, L.W., Mols, J.B., Erkens, R.H.J. & Oosterhof, J. 2006. Andean-centred genera in the short-branch clade of Annonaceae: Testing biogeographical hypothesis using phylogeny reconstruction and molecular dating. *J. Biogeogr.* 33: 31–46.
- Placzek C, Quade J, Betancourt JL, Patchett PJ, Rech JA, Latorre C, Matmon A, Holmgren C, English NB (2009) Climate in the dry central Andes over geologic, millennial, and interannual timescales. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 96: 386–397.
- Pons, O. & Petit, R.J. 1996. Measuring and testing genetic differentiation with ordered versus unordered alleles. *Genetics* 144: 1237–1245.
- Popp, M., Mirré, V. & Brochmann, C. 2011. A single mid-Pleistocene long-distance dispersal by a bird can explain the extreme bipolar disjunction in crowberries (*Empetrum*). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108: 6520–6525.
- Posadas, P.E., Estévez J.M. & Morrone, J.J. 1997. Distributional patterns and endemism areas of vascular plants in the Andean subregion. *Fontqueria* 48: 1–9.
- Posada, D. 2008. jModel Test: Phylogenetic Model Averaging. *Mol. Biol. Evol.* 25: 1253–1256.
- Premoli, A.C., Mathiasen, P., Cristina Acosta, M., & Ramos, V.A. 2012. Phylogeographically concordant chloroplast DNA divergence in sympatric *Nothofagus*, How deep can it be?. *New Phytologist*, 193(1): 261-275.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.
- Pritchard, J.K. & Wen, W. 2004. Documentation for STRUCTURE 2.0. Available from: <<http://pritch.bsd.uchicago.edu>>.

- 
- Rabassa, J. & Clapperton, C.M. (1990). Quaternary glaciations of the southern Andes. *Quat. Sci. Rev.* 9: 153–174.
- Rambaut, A. & Drummond, A.J. 2009. Tracer, version 1.5. <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- Ramos-Onsins, S.E. & Rozas, J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against population growth. *Mol. Biol. Evol.* 19: 2092–2100.
- Ramos, V.A. & Ghiglione, M.C. 2008. Tectonic evolution of the Patagonian Andes. The late Cenozoic of Patagonia and Tierra del Fuego. In: J. Rabassa (ed.), pp. 205–226. Elsevier, Oxford
- Rasband, W. S. 1997–2009. ImageJ. Bethesda, Maryland, USA: US National Institutes of Health.
- Raven, P.H. 1963. Amphotropical relationships in the floras of North and South America. *Quart. Rev. Biol.* 38: 151–177.
- Rech, J.A., Currie, B.S., Shullenberger, E.D., Dunagan, S.P., Jordan, T.E., Blanco, N., Tomlinson, A.J., Rowe, H.D. & Houston, J. 2010. Evidence for the development of the Andean rain shadow from a Neogene isotopic record in the Atacama Desert, Chile. *Earth Planet. Sci. Lett.* 292: 371–382.
- Reeder, J.R. 1977. Chromosome numbers in western grasses. *Amer. J. Bot.* 64: 102–110.
- Renner, S.S. 2005. Relaxed molecular clocks for dating historical plant dispersal events. *Trends in Plant Science* 10: 550–558.
- Romaschenko, K., Peterson, P.M., Soreng, R.J., Gracia-Jacas, N. & Susanna, A. 2010. Phylogenetics of Stipeae (Poaceae, Pooideae) based on plastid and nuclear DNA sequences. In: Seberg, O., Petersen, G., Barfod, A.S., and Davis, J.I. (Eds.), Diversity, Phylogeny, and Evolution in the Monocotyledons – Proceedings of the Fourth International Conference on the Comparative Biology of the Monocotyledons and the Fifth International Symposium on Grass Systematics and Evolution. Aarhus: Aarhus University Press.
- Romero Zarco, C. 1986. A new method for estimating karyotype asymmetry. *Taxon* 35: 526–530.

- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Rydberg, P. A. 1906. Flora of Colorado. *Colorado Agricultural Experiment Station Bulletin* 100: 18-37.
- Saarela, J.M., Peterson, P.M., Soreng, R.J., & Chapman, R.E. 2003. A taxonomic revision of the eastern North American and eastern Asian disjunct genus *Brachyelytrum* (Poaceae): evidence from morphology, phytogeography and AFLPs. *Systematic Botany*, 28(4): 674-692.
- Sánchez, E. 1983. *Dasyochloa* Willdenow ex Rydberg (Poaceae), género monotípico de Norteamérica. *Lilloa* 36: 131-138.
- Sánchez, E. 1984. Estudios anatómicos en el género *Munroa* (Poaceae: Chloridoideae: Eragrosidae). *Darwiniana* 25: 43-57.
- Sanmartín, I. & Ronquist, F. 2004. Southern hemisphere biogeography inferred by event-based models: plant versus animal patterns. *Syst. Biol.* 53: 216–243.
- Schmidt-Jabaily, R. & Sytsma, K.J. 2010. Phylogenetics of *Puya* (Bromeliaceae): placement, major lineages, and evolution of chilean species. *Amer. J. Bot.* 97: 337–356.
- Shantz, H.L. 1954. The place of grasslands in the Earth's cover. *Ecology*, 143-145.
- Shaw, J., Lickey, E.B., Schilling, E.E. & Small, R.L. 2007. Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in Angiosperms: the tortoise and the hare III. *Amer. J. Bot.* 94: 275–288.
- Sersic, A.N., Cosacov, A., Cocucci, A.A., Johnson, L.A., Pozner, R., Avila, L.J., & Morando, M. 2011. Emerging phylogeographical patterns of plants and terrestrial vertebrates from Patagonia. *Biological Journal of the Linnean Society* 103(2): 475-494.
- Simpson, B.B., & Neff, J.L. 1985. Plants, their pollinating bees, and the Great American Interchange. in: F. G. Stehli and S. D. Webb [eds.], *The Great American Biotic Interchange*, pp. 427–452. New York, USA: Plenum.

- Simpson, B.B., Tate, J.A. & Weeks, A. 2005. The biogeography of *Hoffmannseggia* (Leguminosae, Caesalpinioideae, Caesalpinieae): a tale of many travels. *J. Biogeogr.* 32: 15–27.
- Solbrig, O.T. 1972. The floristic disjunctions between the “Monte” in Argentina and the “Sonoran Desert” in Mexico and the United States. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 59: 218–223.
- Sokal, R.R. & Michener, C.D. 1958. A Statistical Methods for Evaluating Systematic Relationships. *Univ. Kans. Sci. Bull.* 38: 1409–1438.
- Sokal, R.R. & Rohlf F.H. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33–40.
- Soltis, D.E., Gitzendanner, M.A., Strenge, D.D. & Soltis, P.S. 1997. Chloroplast DNA intraspecific phylogeography of plants from the Pacific Northwest of North America. *Plant Syst. Evol.* 206: 353–373.
- Soltis, D.E., Morris, A.B., McLachlan, J.S., Manos, P.S. & Soltis, P.S. 2006. Comparative phylogeography of unglaciated eastern North America. *Mol. Ecol.* 15: 4261–4293.
- Soreng, R.J. & Davis, J.I. 1998. Phylogenetics and character evolution in the grass family (Poaceae): simultaneous analysis of morphological and chloroplast DNA restriction site character sets. *Bot. Rev.* 64: 1–85
- Soreng, R.J., Davis, J.I. & Voionmaa, M.A. 2007. A phylogenetic analysis of Poaceae tribe Poeae *sensu lato* based on morphological characters and sequence data from three plastid-encoded genes: Evidence for reticulation, and a new classification for the tribe. *Kew Bull.* 62: 425–454.
- Soreng, R.J., Davidse, G., Peterson, P.M., Zuloaga, F.O., Judziewicz, E.J., Filgueiras, T.S., Morrone, O. 2009. Classification of New World Grasses.
- Sprengel, K.P.J. [1824] 1825. *Kölera*, in K. P. J. Sprengel, *Systema vegetabilium, editio 16*, part 1, p. 332. Gottingen: Librariae Dieterichianae.
- Stanford, A.M., Harden, R. & Parks, C.R. 2000. Phylogeny and biogeography of *Juglans* (Juglandaceae) based on matK and ITS sequence data. *Amer. J. Bot.* 87: 872–882.

- Stebbins, G.L. 1974. Flowering plants: evolution above the species level. *London: Arnold xviii*, 399p. Illustrations General (KR, 197500089).
- Stebbins, G.L. 1982. Major trends of evolution in the Poaceae and their possible significance, Pp. 3–36, in J.R. Estes, R.J. Tyrl, J.N. Brunken [eds.] *Grasses and grasslands: systematics and ecology*. Norman (USA): University of Oklahoma Press.
- Steyermark, J.A. 1937. Studies in *Grindelia*. III. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 24: 225–262.
- Strömberg, C.A., Werdelin, L., Friis, E.M., & Saraç, G. 2007. The spread of grass-dominated habitats in Turkey and surrounding areas during the Cenozoic: phytolith evidence. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology* 250(1): 18-49.
- Strömberg, C.A.E. & McInerney, F.A. 2011. The Neogene transition from C3 to C4 grasslands in North America: assemblage analysis of fossil phytoliths. *Paleobiology* 37(1): 50–71.
- Strömberg, C.A. 2011. Evolution of grasses and grassland ecosystems. *Annual Review of Earth and Planetary Sciences* 39: 517-544.
- Swenson, N.G. 2006. GIS-based niche models reveal unifying climatic mechanisms that maintain the location of avian hybrid zones in a North American suture zone. *J. Evol. Biol.* 19: 717–725.
- Tajima, F. 1989. The effect of change in population size on DNA polymorphism. *Genetics* 123: 598–601.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. & Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molec. Biol. Evol.* 28: 2731–2739.
- Tateoka, T. 1961. A biosystematics Study of *Tridens* (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 48: 572.
- Taylor, D.W. 1991. Paleobiogeographic relationships of Andean angiosperms of Cretaceous to Pliocene age. *Palaeogeogr. Palaeoclimatol. Palaeoecol.* 88: 69–84.

- Templeton, A.R, Crandall, K.A. & Sing, C.F. 1992. A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* 132: 619–633.
- Templeton, A.R. 1998. Nested clade analyses of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. *Mol Ecol.* 7: 381–397.
- Torrey, J. 1857. Report on the Botany of the expedition: Description of the general botanical collections, in War Department (ed.), *Explorations and surveys for a railroad route from the Mississippi River to the Pacific Ocean [A. W. Whipple, vol. 4, part 5, pp. 5[61]-105[161].* Washington, D. C.: Government Printing Office.
- Turchetto-Zolet, A.C., Pinheiro, F., Salgueiro, F., Palma-Silva, C. 2013. Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Mol. Ecol.* 22: 1193–1213.
- Valdés-Reyna, J. & Hatch, S.L. 1995. Anatomical study of *Erioneuron* and *Dasyochloa* (Poaceae: Chloridoideae: Eragrosidae) in North America. *Sida* 16: 413-427.
- Valdés-Reyna, J. & Hatch, S.L. 1997. A revision of *Erioneuron* and *Dasyochloa* (Poaceae: Eragrosidae). *Sida* 17: 645-666.
- Vicentini, A., Barber, J.C., Alisconi, S.S., Giussani, L.M. & Kellogg, E.A. 2008. The age of the grasses and cluster of origins of C<sub>4</sub> photosynthesis. *Glob. Chan. Biol.* 14: 2963–2977.
- Viruel, J., Catalán, P. & Segarra-Moragues, J.G. 2012. Disrupted phylogeographical microsatellite and chloroplast DNA patterns indicate a vicariance rather than long-distance dispersal origin for the disjuncts distribution of the chilean endemic *Dioscorea biloba* (Dioscoreaceae) around the Atacama Desert. *J. Biogeogr.* 39: 1073–1085.
- von Hagen, K.B. & Kadereit, J.W. 2003. The diversification of *Halenia* (Gentianaceae): Ecological opportunity versus key innovation. *Evolution (Lawrence, Kans)* 57: 2507–2518.

- Wall, J.D. & Hudson, R.R. 2001. Coalescent simulations and statistical tests of neutrality. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1134–1135.
- Watson, L. 1990. The grass family, Poaceae. *Reproductive versatility in the grasses* 1-31.
- Watson, L., & Dallwitz, M.J. 1992. *The grass genera of the world*. CAB international.
- Wen, J. & Ickert-Bond, S.M. 2009. Evolution of the Madrean–Tethyan disjunctions and the North and South American amphitropical disjunctions in plants. *J. Syst. Evol.* 47: 331–348.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. & Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (Eds.), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, pp. 315– 322. San Diego, California: Academic Press.
- Widmer, A. & Lexer, C. 2001. Glacial refugia: sanctuaries for allelic richness, but not for gene diversity. *Trends Ecol. Evol.* 16: 267–269.
- Williams, D.L. 1975. *Piptochaetium* (Gramineae) and associated taxa: evidence for the Tertiary migration of plants between North and South America. *J. Biogeogr.* 2: 75–85.
- Williams, J.W., Shuman, B.N., Webb, T., III, Bartlein, P.J. & Leduc, P.L. 2004. Late-Quaternary vegetation dynamics in North America: scaling from taxa to biomes. *Ecological Monographs* 74: 309–334.
- Winkworth, R.C., Donoghue, M.J. 2005. *Viburnum* phylogeny based on combined molecular data: Implications for taxonomy and biogeography. *Amer. J. Bot.* 92: 653–666.
- Wolfe, K.H., Li, W.H. & Sharp, P.M. 1987. Rates of nucleotide substitution vary greatly among plant mitochondrial, chloroplast, and nuclear DNAs. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 84: 9054–9058.
- Xiang, Q.Y. & Soltis, D.E. 2001. Dispersal–vicariance analyses of intercontinental disjuncts: historical biogeographical implications for angiosperms in the Northern Hemisphere. *Int. J. Plant Sci.* 162: S29–S39.

Yu, Y., Harris, A.J. & He, X.J. 2010. S-DIVA (Statistical Dispersal- Vicariance Analysis): A tool for inferring biogeographic histories. *Molec. Phylogen. Evol.* 56: 848–850.

Yu, Y., Harris, A.J. & He, X.J. 2011. RASP (Reconstruct Ancestral State in Phylogenies), version 2.0.1.0. <http://mnh.scu.edu.cn/soft/blog/RASP>.

