

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales - UNC

Tesina de grado para optar por el título de Bióloga

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y DE NICHOS
ECOLÓGICO EN VARIETADES DE *Nierembergia linariifolia*
Graham (Solanaceae)**

Alumna: María Soledad Chiabrando

Firma:

Directora: María Cristina Acosta

Firma:

Co-Directora: Alicia Noemí Sérsic

Firma:

Instituto Multidisciplinario de Biología Vegetal (IMBIV)

FECHA: 22/06/2023

Tesina de grado para optar por el título de Bióloga

**ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y DE NICHOS
ECOLÓGICO EN VARIEDADES DE *Nierembergia linariifolia*
Graham (Solanaceae)**

Alumna: María Soledad Chiabrando

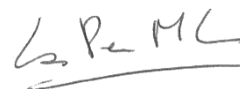
Directora: María Cristina Acosta

Co-Directora: Alicia Noemí Sérsic

Tribunal Examinador

Nombre y Apellido: Dra. Las Peñas, María Laura

Firma:



Nombre y Apellido: Dra. Marisel A. Scaldaferro

Firma:



Nombre y Apellido: Dra. Carolina Carrizo García

Firma:



Calificación: 10 (diez)

Fecha: 22/06/2023

AGRADECIMIENTOS

- A mi directora, Cristina Acosta y codirectora, Alicia Sérsic, que siempre me recibieron, guiaron, ayudaron y brindaron sus conocimientos con mucha paciencia y dedicación y nunca me faltaron sus palabras de aliento a lo largo de este proceso.
- A las Dras. María Laura Las Peñas, Marisel Scaldaferrro y Carolina Carrizo, integrantes del tribunal, por sus valiosas sugerencias.
- A todos los integrantes del laboratorio de Biología Floral, por recibirme siempre con una sonrisa, por hacerme sentir una más entre ellos cada vez que iba al laboratorio, por acompañarme y estar siempre dispuestos a ayudarme en lo que necesitara. Agradecerles también por ayudarme a coleccionar las muestras y en cada etapa de la tesina. Principalmente agradecer el tiempo brindado, la compañía y enseñanza de Andrea Cocucci cuando teníamos que buscar muestras o ir a revisarlas a los herbarios.
- A la UNC, a la Facultad y al IMBIV, por brindarme los espacios y materiales para poder estudiar y principalmente por darme la oportunidad desde el primer día de crecer profesionalmente junto a personas tan preparadas como cada uno de los profesores con los que compartí a lo largo de mi carrera.
- A mis amigos y amigas de “la facu”, que sin ellos la experiencia de estudiar, cursar y aprender hubiese sido totalmente distinta. A cada amigo y amiga que esas aulas y pasillos me regalaron, las horas de biblioteca, de mates, charlas y mucho estudio. A Noe, Jor, Nadi, Dai, Lu, Eleo, Gon, Barbi, Jesi, Juan... y la lista es enorme para nombrarlos a todos, pero de cada uno tengo un millón de cosas para decir y recordar. Pero lo más lindo es que son personas, biólogos y biólogas, amigos y amigas, con quienes seguiré compartiendo profesión y vida muchos años más.
- A mis amigos y amigas que, sin ser parte de la facultad, me han acompañado y alentado a seguir en cada momento.
- Por último y no menos importante, quiero agradecer a mi familia, por acompañarme siempre e impulsarme a seguir mis sueños. A través de ellos aprendí desde chiquita a amar la ciencia, la naturaleza, pero especialmente me enseñaron a hacer con amor a cada actividad que emprendía. Gracias a ellos porque siempre estuvieron y están cerca.

INDICE

AGRADECIMIENTOS	3
RESUMEN	5
PALABRAS CLAVES	5
INTRODUCCIÓN	7
HIPÓTESIS	9
OBJETIVO GENERAL	9
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
<i>Sistema de estudio</i>	<i>10</i>
<i>Muestreo de poblaciones naturales.....</i>	<i>11</i>
<i>Extracción, amplificación y secuenciación del ADN de cloroplastos</i>	<i>13</i>
<i>Análisis genéticos.....</i>	<i>14</i>
<i>Análisis de modelado de nicho ecológico.....</i>	<i>15</i>
RESULTADOS.....	17
<i>Genealogía de haplotipos y distribución geográfica.....</i>	<i>17</i>
<i>Estimación de los tiempos de divergencia</i>	<i>19</i>
<i>Modelado de nicho ecológico</i>	<i>20</i>
DISCUSIÓN.....	23
<i>Variedades morfológicas y diversidad genética</i>	<i>23</i>
<i>Variedades morfológicas y su respuesta a los cambios climáticos del pasado.....</i>	<i>23</i>
<i>Diversidad genética y patrones de distribución geográfica.....</i>	<i>25</i>
CONCLUSIONES FINALES	26
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	27
ANEXO	32

RESUMEN

Nierembergia linariifolia Graham es la especie de mayor distribución y con mayor variabilidad fenotípica dentro del género *Nierembergia*. Según sus caracteres morfológicos se han descrito cuatro variedades: *linariifolia*, *glabriuscula*, *pampeana* y *pinifolioides*. El objetivo del presente trabajo es indagar sobre los procesos de diversificación morfológica ocurridos en *N. linariifolia*. Para analizar la diversidad genética, se analizó el fragmento de ADN cloroplastidial *trnQ-rps16* en individuos procedentes de 36 localidades pertenecientes a las 4 variedades de *N. linariifolia*. Se reconstruyeron las relaciones genealógicas entre los haplotipos obtenidos y se estimaron los tiempos de divergencias. Se identificaron 4 haplotipos: H1 fue el más frecuente y estuvo presente en las 4 variedades, H2 solo se encontró en las variedades *linariifolia pampeana*, mientras que H3 y H4 fueron exclusivos de la var. *linariifolia*. La diversificación de los haplotipos habría ocurrido en el Pleistoceno. Además, se realizó el modelo de distribución espacial actual de cada variedad en el presente y se proyectó a períodos glaciarios e interglaciarios del pasado. Se observó una respuesta diferencial de las distintas variedades a los cambios climáticos ocurridos. Se concluye que, las variedades descritas en *N. linariifolia* no serían el resultado de una separación de linajes genéticos dentro de la especie, sino que la diversidad genética observada se habría originado en el ancestro común, previo a la diferenciación de las variedades. Los procesos de diversificación morfológicos podrían haber ocurrido en épocas más recientes, producto de adaptaciones locales a las variaciones climáticas de los ambientes donde crecen, revelando así un posible proceso de especiación incipiente.

PALABRAS CLAVES: ADN DE CLOROPLASTO, CHACO SERRANO, ESPECIACIÓN, ESPINAL, FILOGEOGRAFÍA

SUMMARY:

Nierembergia linariifolia Graham is the species with the widest distribution and the greatest phenotypic variability within the *Nierembergia* genus. Based on its morphological characteristics, four varieties have been described: *linariifolia*, *glabriuscula*, *pampeana*, and *pinifolioides*. The objective of this study is to investigate the processes of morphological diversification that have taken place in *N. linariifolia*. A fragment of chloroplast DNA (*trnQ-rps16*) was examined in individuals from 36 locations belonging to the four varieties of *N. linariifolia* to analyze its genetic diversity. The genealogical relationships between the

obtained haplotypes were reconstructed and divergence times were estimated. Four haplotypes were identified: H1 was the most frequent and present in all four varieties, H2 was found in var. *linariifolia* and var. *pampeana*, and H3 and H4 were exclusive to var. *linariifolia*. Haplotype diversification likely occurred during the Pleistocene. Additionally, the current spatial distribution model of each variety was established and projected onto past glacial and interglacial periods. Different varieties showed a distinct response to climate changes. It can be concluded that the varieties described in *N. linariifolia* are not the result of genetic lineage separation within the species, but rather the observed genetic diversity likely originated from a common ancestor prior to the differentiation of the varieties. The processes of morphological diversification may have occurred more recently as a result of local adaptations to the climatic variations in their respective environments, indicating a possible incipient speciation process.

KEY WORDS: CHACO SERRANO, CHLOROPLAST DNA, ESPINAL, PHYLOGEOGRAPHY, SPECIATION.

INTRODUCCIÓN

La identificación de los factores por los cuales las especies surgen y se diversifican es un problema fundamental en la biología evolutiva (Matute & Cooper 2021). Éstos pueden ser extrínsecos, es decir, las condiciones climáticas y geológicas en las que la especiación ocurre; o intrínsecos, debido a cambios genéticos, ecológicos, etológicos y reproductivos que caracterizan y mantienen aisladas a las nuevas especies (Morrone 2000). En algunos casos, los factores extrínsecos juegan el papel fundamental (como en la especiación alopátrica), mientras que en otros serán los intrínsecos los más importantes (como en la especiación simpátrica). La disposición espacial de poblaciones genéticamente divergentes es importante en la diversificación alopátrica, ya que implica la separación geográfica de una metapoblación previamente continua, por causas geológicas o climáticas, o por un evento fundador resultante de la dispersión a larga distancia. La falta de flujo genético, deriva génica y adaptación secundaria a las condiciones ambientales locales entre poblaciones geográficamente separadas puede eventualmente resultar en linajes morfológica y genéticamente distintos. Por otro lado, la variación morfológica puede representar genomas plásticos que interactúan con diferentes entornos sin ninguna diferenciación genética subyacente relevante (Turchetto *et al.* 2014 y los trabajos allí citados).

La familia Solanaceae, aunque cosmopolita, presenta la mayor concentración de géneros y especies en Sudamérica, donde se habría originado (Hunziker 1979, Olmstead & Palmer 1992, Dupin *et al.* 2017). Esta familia tiene gran interés ya que incluye especies económicamente importantes por su valor como alimentos (por ej. ajíes, papa, tomate), estimulantes (tabaco), medicinales (espina colorada) y ornamentales (jazmín del Paraguay); comprende también plantas tóxicas (chamico) y malezas (Hawkes 1999, Smartt & Simmonds 1995). Dentro de esta familia, el género *Nierembergia* Ruiz et Pav. es exclusivo del continente americano; se compone de 21 especies que presentan un patrón de distribución disyunto, 20 se encuentran en América del Sur y solo una en América del Norte (Cocucci & Hunziker 1995). Varios representantes de este género son de gran interés, ya que, por ejemplo, algunas especies tienen valor ornamental e incluso algunas han sido utilizadas en experimentos de transformación habiéndose obtenido plantas transgénicas fértiles (Godo *et al.* 1997, Shizukawa & Mii 1997,). Otras tienen valor farmacológico, como es el caso de *N. aristata* D. Don que posee cardenólidos con actividad anticancerígena (Gil *et al.* 1995). Finalmente, algunas especies son altamente tóxicas, incluso letales para el ganado por contener alcaloides, como fue observado en *N. browallioides* Griseb., *N. graveolens* A. St.-

Hil., *N. linariifolia* Graham, *N. pulchella* Gillies ex Miers, *N. repens* Ruiz & Pav., *N. rigida* Miers. (Millán 1941, González 1982, Cocucci AA, datos no publicados).

Estudios filogenéticos realizados en *Nierembergia* revelan que en el género se distinguen dos grandes clados que habrían divergido durante el Mioceno tardío (ca. 8 millones de años): un grupo de especies que habita en regiones montañosas y otro grupo en tierras bajas (Tate *et al.* 2009, Acosta *et al.* 2016). Esta divergencia en dos grandes clados es coherente con datos morfológicos y citogenéticos. Acosta y colaboradores (2016) postulan que, la ingresión marina proveniente del océano Atlántico, llamada "Mar Paranense", probablemente obligó a los antepasados de estas especies a buscar refugio en áreas no inundadas. Algunas de las especies pertenecientes al clado de las regiones montañosas parecen haber conquistado nuevamente las zonas bajas, por lo que es un sistema propicio para indagar sobre el rol de los procesos geológicos en la diversificación de las especies y su nicho climático.

Nierembergia linariifolia (nombre vulgar: "chuscho"), perteneciente al clado montañoso (Acosta *et al.* 2016), es la especie de mayor distribución dentro del género, ya que se extiende desde el sur de Brasil hasta la Patagonia en Argentina y habita tanto regiones altas como llanuras (Cocucci & Hunziker 1995). Se han descrito cuatro variedades según sus caracteres morfológicos (var. *linariifolia*, var. *glabriuscula* (Dun.) Andr. Cocucci & Hunz., var. *pampeana* (Millán) Andr. Cocucci & Hunz. y var. *pinifolioides* (Millán) Andr. Cocucci & Hunz.), algunas de las cuales están asociadas a distintos sistemas orográficos de la región (Fig. 1). *Nierembergia linariifolia* var. *linariifolia* es la variedad de mayor distribución, crece en terrenos abiertos de los bosques de las provincias biogeográficas Chaqueña y Espinal de Argentina, Brasil, Uruguay y Paraguay. *Nierembergia linariifolia* var. *glabriuscula* está presente en la Sierra de Ambato (Prov. de Catamarca), cumbres y faldeos orientales de las Sierras Grandes y Sierras de Comechingones (Prov. de Córdoba y San Luis) y en el cerro El Morro (Prov. San Luis) (Cocucci AA, datos no publicados). *Nierembergia linariifolia* var. *pampeana* es la entidad de distribución más austral con límites geográficos mejor definidos (Cocucci & Hunziker 1995), encontrándose principalmente en afloramientos rocosos de las provincias de La Pampa y San Luis (Cocucci AA, datos no publicados). Por último, *N. linariifolia* var. *pinifolioides* habita en las Sierras Chicas y afloramientos aislados de las llanuras de Córdoba y San Luis (cerro El Leoncito y cerro El Morro) (Cocucci AA, datos no publicados).

En el presente trabajo se propone analizar la diversidad genética y de nicho ecológico de *N. linariifolia* a fin de interpretar los eventos históricos que han favorecido su diversificación morfológica. Además, se busca definir si las variedades descritas corresponden a linajes genealógicos diferentes y/o se trata de polimorfismo intraespecífico atribuibles a adaptación local bajo distintas condiciones ecológicas.

Hipótesis Las variedades morfológicas descritas en *N. linariifolia* son el resultado de una separación geográfica de las poblaciones, reducción del tamaño poblacional y procesos como la deriva génica que resultan en linajes genéticos distintos. Además, las variedades morfológicas habrían desarrollado adaptaciones al lugar geográfico que habitan. Para poner a prueba esta hipótesis se predice que cada variedad morfológica tendrá un linaje genético distinto y una respuesta a los cambios climáticos del pasado diferente.

OBJETIVO GENERAL Indagar sobre los procesos de diversificación morfológica ocurridos en *Nierembergia linariifolia*.

Objetivos específicos

1. Analizar la diversidad genética de las variedades morfológicas de *N. linariifolia*.
2. Analizar si las variedades morfológicas descritas corresponden a linajes genealógicos diferentes.
3. Realizar el modelo de distribución espacial de cada una de las variedades en el presente y en el pasado.
4. Inferir los posibles procesos históricos que han influenciado su historia evolutiva.

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de estudio

N. linariifolia var. *linariifolia*: plantas laxas de 10 a 30 cm de altura, siempre muy ramificadas desde la base, con brotes erectos no radicales; hojas dispuestas laxamente. Flores con pedicelo de 1,6-16 mm; lacinias calicinales foliáceas, agudas u obtusas; corola con limbo de 8,6-27 mm de latitud (lat.). Habita en terrenos abiertos de bosques de las provincias fitogeográficas Chaqueña y del Espinal (Cocucci & Hunziker 1995) (Fig. 1 A)

N. linariifolia var. *glabriuscula*: plantas erectas de hasta 30 (37) cm de altura, formando matas globulares densas cuando plenamente desarrolladas, cuello basal leñoso muy notable, brotes tendidos en la parte basal con raíces adventicias; hojas dispuestas laxamente. Las flores con pedicelo de 3,6-6 mm de longitud (long.), cáliz de 7,4-11 mm de long. y lacinias de 2,3-3,6 mm de long., corola con limbo de 8,4-19 mm de lat. y tubo de 7,6-15,6 mm de long. Habita regiones montañosas (1200 a 1400 msm) en las sierras de Catamarca, Córdoba y San Luis (Cocucci & Hunziker 1995). (Fig. 1 B)

N. linariifolia var. *pampeana*: plantas altas, erectas de hasta 54 cm de altura, con brotes principales erectos, cada uno muy leñoso en la base y ramificado en el ápice, sin tallo principal perenne; las flores con pedicelos de ± 3 mm de long., cáliz de 8-11 mm de long., lacinias de 3,7-6,8 mm de long, corola con limbo de 12-19 mm de lat. y tubo de 11-12 mm de long. Habita una franja árida desde el oeste de Mendoza hasta el sur de la provincia de Buenos Aires, principalmente en la provincia de La Pampa (Cocucci & Hunziker 1995) (Fig. 1 C).

N. linariifolia var. *pinifolioides*: plantas erectas de hasta 23 cm de altura, hojas no claramente diferenciadas en inferiores y superiores; tallos a veces rojizos o purpúreos en la base; tallos densamente cubiertos con hojas angostas (menos de 1 mm de ancho y adpresas al tallo; flores con pedicelo de 2-4,5 mm de long., cáliz de 7-9,5 mm de long. con lacinias de 3- 4,5 mm de long., corola con limbo de 19-25 mm de lat. y tubo de 12-15,3 mm de long. Habita principalmente en las Sierras Chicas de Córdoba y en afloramientos aislados del mismo sistema orográfico en Santiago del Estero y San Luis, a alturas de 500 a 1200 msm (Cocucci & Hunziker 1995) (Fig. 1 D).

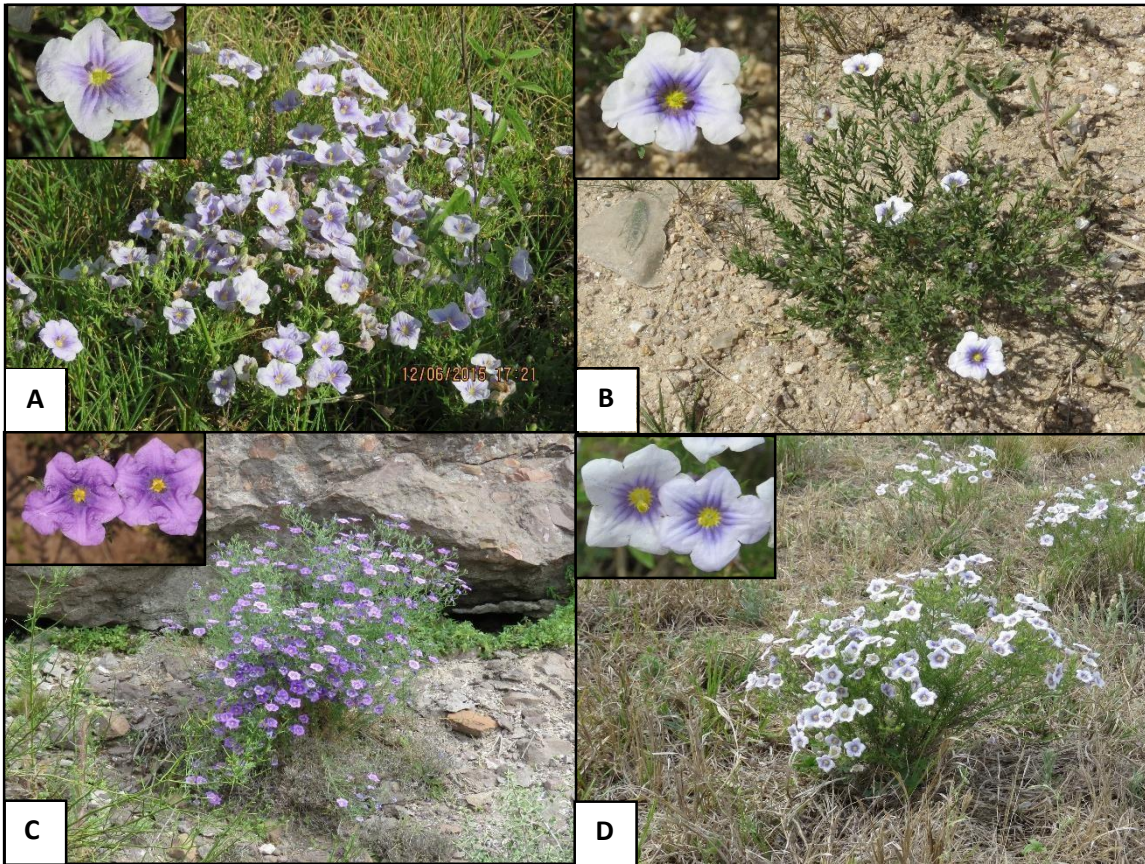


Figura 1: *Nierembergia linariifolia* y sus variedades: A) var. *linariifolia* (población ICVQ), B) var. *glabriuscula* (población gLGI), C) var. *pampeana* (población aPLC), D) var. *pinifolioides* (población pCCB). En cada foto se observa la planta y luego un detalle de las flores.

Muestreo de poblaciones naturales

Para el presente trabajo se muestrearon 16 localidades de *N. linariifolia* var. *linariifolia*, 4 de var. *glabriuscula*, 10 de var. *pinifolioides*, y 6 de var. *pampeana* (Tabla 1). Es de destacar que el muestreo cubrió el rango completo de distribución geográfica de tres de las variedades, a excepción de la var. *linariifolia* donde no se incluyeron localidades del Norte de su distribución. En cada una de las localidades, se colectó material vegetal de 5 individuos que fue secado con gel de sílica. Además, se recolectaron individuos de una localidad perteneciente a *Nierembergia scoparia* Sendtn., para ser utilizados como grupo externo.

Tabla 1. Lista de los taxones y muestras estudiados de *Nierembergia linariifolia*, número de ejemplar de herbario y procedencia. Se muestra la localización de cada población, con geolocalización y altura a la que se encuentran. Se indican los haplotipos encontrados.

Especie	Variedad	Ubicación	Siglas	Lat. (dec.)	Long (dec.)	Altura (msm)	H
<i>N. linariifolia</i>	<i>var. glabriuscula</i>	Córdoba, Cerro Los Linderos. <i>s/v</i>	gCLL-1	-32,05	-64,90	2244	H1
		Córdoba, Los Gigantes, AAC 6013	gLGI-3	-31,38	-64,77	1750	H1
		Córdoba, Pampa de Achala, N. antena. <i>s/v</i>	gPAC-1	-31,61	-64,78	2165	H1
		Córdoba, Yatán. <i>s/v</i>	gCYA-4	-31,83	-64,76	1794	H1
	<i>var. linariifolia</i>	Catamarca, Cuesta del Portezuelo. <i>s/v</i>	ICCP-1	-28,49	-65,62	1419	H1
		Córdoba, Cabalango. <i>s/v</i>	ICCA-2	-31,40	-64,54	709	H1
		Córdoba, Ciudad Universitaria. <i>s/v</i>	ICCU-1	-31,44	-64,19	457	H1
		Córdoba, Concepción del tío, AAC <i>et al.</i> 6040	ICCT-1	-31,32	-62,81	123	H2
		Córdoba, Diego de Rojas, AAC <i>et al.</i> 6034	ICDR-1	-31,03	-63,34	153	H2
		Córdoba, El Talar. <i>s/v</i>	ITAL-1	-31,25	-64,27	578	H1
		Córdoba, entre Río I y Santa Rosa del Río I, AAC <i>et al.</i> 6031	IRPS-4	-31,22	-63,49	221	H2
		Córdoba, La Calera, Camino a San Fernando. <i>s/v</i>	ILCA-1	-31,32	-64,37	591	H1
		Córdoba, Los Poleo. <i>s/v s</i>	ICLP-5	-32,47	-64,29	634	H2
		Córdoba, pasando La Puerta, AAC <i>et al.</i> 6035	ICPU-1	-30,90	-63,14	109	H1
		Córdoba, Rincón, AAC <i>et al.</i> 6041	IRIN-1	-31,59	-63,61	231	H2
		Córdoba, Río Tercero. <i>s/v</i>	ICRT-4	-32,15	-64,13	376	H2
		Córdoba, Santa Rosa del Río I. <i>s/v</i>	ISRP-1	-31,16	-63,41	183	H2
		Córdoba, Va del Dique. <i>s/v</i>	ICVQ-2	-32,19	-64,46	556	H1
		Corrientes, Curuzu Cuatiá. <i>s/v</i>	ICCC-1	-30,34	-57,95	63	H4
		Entre Ríos, Chajarí. <i>s/v</i>	ICCH-1	-30,72	-58,04	62	H3
	<i>var. pinifolioides</i>	Córdoba, Camino a Chancaní. <i>s/v</i>	pCHA-5	-31,85	-65,25	799	H1
		Córdoba, camino a Luti sitio 2. <i>s/v</i>	pCLU-1	-32,31	-64,66	653	H2
		Córdoba, Cerro Uritorco, Estacionamiento La Toma. <i>s/v</i>	pCLT-1	-30,86	-64,49	935	H1
		Córdoba, Charbonier. <i>s/v</i>	pCCB-1	-30,75	-64,57	914	H1
		Córdoba, Deán Funes. <i>s/v</i>	pCDF-5	-30,43	-64,34	502,2	H1
		Córdoba, La Higuera. <i>s/v</i>	pCLH-3	-31,06	-65,10	1010	H1
		Córdoba, Salto del Tigre, Achiras. <i>s/v</i>	pCST-2	-33,18	-64,99	1033	H1
Córdoba, Va. Dolores. <i>s/v</i>		pCVD-5	-31,99	-65,26	948	H1	

Especie	Variedad	Ubicación	Siglas	Lat. (dec.)	Long (dec.)	Altura (msm)	H
<i>N. linariifolia</i>	var. <i>pinifoloides</i>	Córdoba, vado Chocolate, AAC <i>et al.</i> 6012	pVCH-1	-31,85	-65,25	1045	H1
		Santiago del Estero, 4.4km al N de Ojo de Agua. <i>s/v</i>	pSOA-h	-29,46	-63,70	1517	H1
	var. <i>pampeana</i>	Córdoba, Cerro El Leoncito. <i>s/v</i>	aCEL-1	-33,55	-65,01	525	H1
		La Pampa, cerca de Lihuel Calel. <i>s/v</i>	aPLC-1	-37,87	-65,46	266	H2
		La Pampa, cerca de Lihuel Calel 2. <i>s/v</i>	aPLH-1	-37,78	-65,38	226	H2
		La Pampa, El Durazno. <i>s/v</i>	aPED-1	-36,74	-65,29	366	H2
		La Pampa, entre Chacharramendi y el Cruce. <i>s/v</i>	aPCH-1	-37,42	-65,36	284	H2
		La Pampa, Parque Pedro Luro. <i>s/v</i>	aPPL-5	-36,91	-64,26	134	H2
<i>N. scoparia</i>	Entre Ríos, Campichuelo, <i>s/v</i>	sCER-1				H5	

Abreviaturas= Lat: latitud; Long: longitud; H: Haplotipo; *s/v*= sin voucher; msm: metros sobre el nivel del mar.

Extracción, amplificación y secuenciación del ADN de cloroplastos

Se extrajo el ADN de 37 individuos a partir de 60 miligramos de peso seco de material vegetal, por medio del kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit (Quiagen Inc.) o con el método de extracción CTAB (Doyle & Doyle 1987). Se realizó un análisis exploratorio previo para evaluar la variabilidad de diversas regiones no codificantes del ADN de cloroplasto y nuclear, que han sido utilizadas en la filogenia del género (Tate *et al.* 2009) y otras que han demostrado ser adecuadas para este tipo de estudio en otras especies de Solanáceas (Tabla 2). Se eligió el fragmento de ADN de cloroplastos *trnQ-rps16*, el cual presentó la mayor variabilidad genética. Para la amplificación de la región de ADN seleccionada, se llevó a cabo la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en un termociclador Eppendorf Mastercycler. El volumen final de reacción fue de 25 μ l con la siguiente composición de reactivos: 2 μ l de ADN, 0,125 U de Taq ADN polimerasa (Invitrogen), 2,5 μ l de buffer de reacción, 1,5 μ l de Cloruro de Magnesio, 2 μ l de la solución de dNTP (10 μ M) y 1 μ l de cada cebador (10 μ M). Las condiciones de la PCR fueron: desnaturalización a 80°C por 5 minutos seguidos de 30 ciclos de desnaturalización a 95°C por 1 minuto, hibridación del cebador a 50°C por 1 minuto, seguido de una rampa de 0,3°C por segundo hasta 65°C, luego extensión del cebador a 65°C por 4 minutos y por último una extensión final por 5 minutos a 65°C (Shaw *et al.* 2007). Los resultados de la amplificación fueron controlados en geles de agarosa al 1% (p/v) y se visualizaron utilizando luz UV. Los

fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados por el servicio ofrecido por Macrogen Inc. Las secuencias obtenidas fueron editadas y alineadas con el programa MEGA versión 10.0.5 (Kumar *et al.* 2004).

Tabla 2 Regiones no codificantes de ADN de cloroplasto y nuclear amplificados y secuenciados en *N. linariifolia*.

CEBADOR	SECUENCIA	SENTIDO	AUTOR	UBICACIÓN	SITIO VARIABLE
ITS17SE	ATGGTCCGGTGAAGTGTTTCG	F	Sun <i>et al.</i> (1994)	N	1
ITS4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	R	White (1990)		
F71	GCTATGCTTAGTGTGTGACTCGTTG	F	Tate <i>et al.</i> (2009)	C	0
R1516	CCCTTCATTCTTCCTCTATGTTG	R			
rpL32-F	CAGTTCCAAAAAACGTACTTC	F	Shaw <i>et al.</i> (2007)	C	0
trnL (UAG)	CTGCTTCCTAAGAGCAGCGT	R			
ndhF	GAAAGGTATKATCCAYGMATATT	F	Shaw <i>et al.</i> (2007)	C	1
rpL32-R	CCAATATCCCTTYTTTCCAA	R			
psbA	GTTATGCATGAACGTAATGCTC	F	Sang <i>et al.</i> (1997) Tate & Simpson (2003)	C	1
trnH2	CGCGCATGGTGGATTCAACAATCC	R			
trnQ	GCGTGGCCAAGYGGTAAGGC	F	Shaw <i>et al.</i> , (2007)	C	3
rps16	GGTGCTTTYTACCACATCGTTT	R			
trnL	CGAAATCGGTAGACGCTACG	F	Taberlet <i>et al.</i> (1991)	C	1
TrnF	ATTTGAACTGGTGACACGAG	R			
TrnS	GCCGCTTTAGTCCACTCAGC	F	Levin <i>et al.</i> (2006)	C	2
TrnG	GAACGAATCACACTTTTACCAC	R			

Abreviaturas= F: forward; R: reverse; N: ADN nuclear; C: ADN de cloroplasto

Análisis genéticos

Los haplotipos fueron definidos en el programa DnaSP v6. (Rozas *et al.* 2017) a partir de las 37 secuencias de la matriz final. Las relaciones genealógicas entre haplotipos fueron reconstruidas utilizando el algoritmo Median-Joining implementado en el programa Network v. 10.2.010 (Bandelt *et al.* 1999). La distribución geográfica de los haplotipos por localidad se realizó con el programa QGIS v.3.26.2 (QGIS Development Team, 2022). Para conocer las relaciones filogenéticas entre los haplotipos se realizó una reconstrucción filogenética bayesiana utilizando el programa MrBayes v. 3.1.2 (Huelsenbeck & Ronquist 2001). Se utilizó el modelo de evolución molecular F81 seleccionado en MrModelTest 2.1.9

(Nylander 2004). Se corrieron 2 millones de generaciones, tomando muestras cada 100 para obtener un total de 20000 árboles, de los que se desecharon los primeros 2000 (burn-in del 10 %). Para estimar los tiempos de divergencia de los linajes se calibró un modelo de reloj molecular relajado (LRC: lognormal relaxed clock) en el programa BEAST v. 1.7.5 (Drummond & Rambaut 2007), utilizando un prior con distribución uniforme para la tasa de mutación de cloroplastos entre 0,01 y 0,001 mutación/sitio por millón de años (valor inicial=0,001; Alsos *et al.* 2005) y las edades de calibración obtenidas previamente para el género (Acosta *et al.* 2016). Así, se estableció un valor de 3,57 millones de años (Desvío estándar (de) = 1, inicial = 4,57), la edad de divergencia entre *N. scoparia* y *N. linariifolia*, como edad de la raíz del árbol y de 0,92 millones de años (de = 0,9) como edad de divergencia de la especie. Se utilizó el modelo de especiación de Yule. Se corrieron 10 millones de iteraciones de la MCMC tomando muestras cada 1000 para obtener un total de 10000 árboles. Se descartó el 10% de las corridas (burn-in). La convergencia de parámetros y el tamaño poblacional efectivo (ESS>200) se verificaron con el programa Tracer v.1.5 (Rambaut *et al.* 2014). Las topologías de los árboles obtenidos fueron reconstruidas mediante el programa TreeAnnotator v.1.7.5 (Rambaut & Drummond 2012) y visualizadas en FigTree v.1.6.1 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Análisis de modelado de nicho ecológico

Para identificar el área de distribución potencial y las preferencias climáticas de *N. linariifolia* se realizó el modelado de nicho ecológico (MNE) para cada una de las variedades. Posteriormente, se realizaron modelos de paleodistribución, para ello, el modelado de nicho ecológico se proyectó sobre un mapa con información paleoclimática y se obtuvo una estimación del rango histórico del organismo focal. Para esto se prepararon dos matrices de datos: 1) las coordenadas geográficas de todos los sitios en los que la especie ha sido registrada y 2) capas bioclimáticas (actuales y pasadas) que puedan ser utilizadas en sistemas de información geográfica (GIS). Así, se generó una base de datos con información georreferenciadas de poblaciones pertenecientes a las distintas variedades obtenidas en los viajes de campo, de información proveniente de diversos herbarios (CORD, CTES, SI, SRFA) y datos inéditos del Dr. Andrea A. Cocucci. El conjunto final de datos georreferenciados para cada variedad abarca toda el área de distribución de la especie (ANEXO-Tabla S1).

Para la var. *linariifolia* se obtuvieron un total de 40 puntos georreferenciados, de los cuales se seleccionaron 25 puntos para calibrar y 15 para validar los modelos. Para las variedades *glabriuscula* y *pampeana*, se obtuvo un total de 15 puntos georreferenciados para cada una, de los cuales se seleccionaron 11 para calibrar y 4 y 5 puntos para validar, respectivamente. Por último, para la var. *pinifolioides* se obtuvieron 20 puntos, de los cuales 13 y 7 se usaron para calibrar y validar, respectivamente.

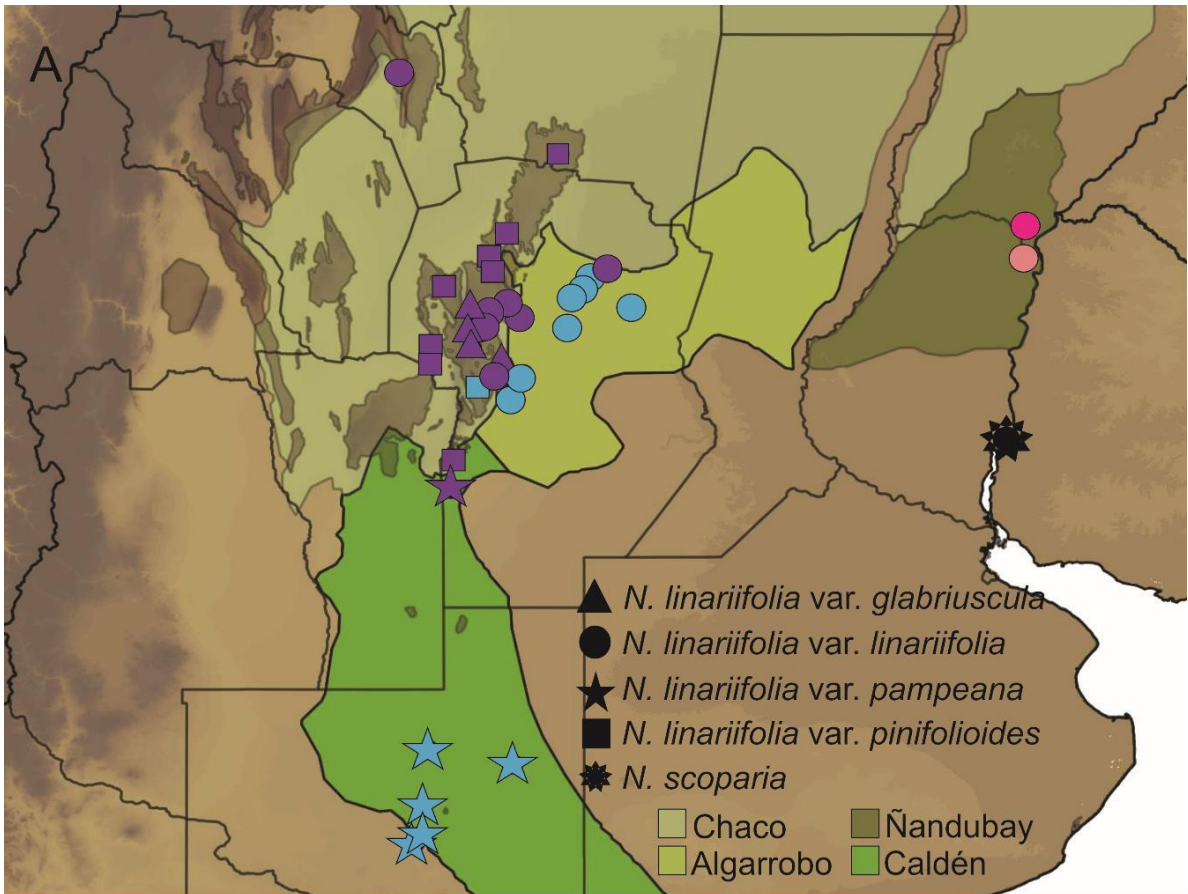
Los datos climáticos actuales y del pasado fueron reconstruidos utilizando 19 parámetros considerados “bioclimáticos” por su posible efecto en sistemas biológicos. Estas variables incluyen tendencias climáticas anuales (ej. temperatura media anual), estacionalidad (ej. rango anual de temperatura) y condiciones ambientales extremas (ej. temperatura del mes más frío y del mes más cálido). La información bioclimática se obtuvo de la base mundial PaleoClim dataset (<http://www.paleoclim.org/>; 2.5 arcmin. CHELSA) la cual es generada a partir de la interpolación de datos climáticos globales que abarcan registros para el presente (~1979 – 2013), el Último Máximo Glacial (LGM; ~21 Kya) y el Último Máximo Interglacial (LIG; ~116–130 Kya). La distribución geográfica potencial (actual y pasada) fue predicha mediante el modelado de nicho ecológico utilizando el programa MaxEnt 3.4.4 (Phillips *et al.* 2006), que utiliza el algoritmo de máxima entropía junto con el programa QGIS versión 2.8 (<http://www.qgis.org/>).

Para determinar el área M de movilidad de cada variedad, se trazó un polígono escogiendo las ecorregiones argentinas (Olson *et al.*, 2001) que coinciden con la ubicación de todos los puntos de distribución registrados para cada una y un área buffer de aproximadamente 200 km. De las 19 capas bioclimáticas se eliminaron aquellas que estaban altamente correlacionadas (r de Pearson $> 0,90$). Con esta selección de variables se procedió a optimizar la complejidad de cada modelo con el paquete de R “ENMval”, obteniendo un total de 48 modelos, de los cuales se seleccionaron los tres mejores de acuerdo al valor de delta AICc. A partir de los valores de validación se seleccionaron los mejores modelos para cada una de las variedades. Una vez definidos los parámetros óptimos de los distintos modelos, se realizaron los modelados de nicho ecológico finales de cada especie. Finalmente, para construir el mapa de probabilidad de presencia se utilizó el umbral mínimo del 10% para cada variedad. Las proyecciones paleoclimáticas permitieron inferir las contracciones y expansiones de cada variedad según los cambios climáticos del pasado.

RESULTADOS

Genealogía de haplotipos y distribución geográfica

A partir de la amplificación de la región *trnQ-rps16* del genoma cloroplastial en 36 individuos pertenecientes a las 4 variedades de *N. linariifolia* más un individuo de *N. scoparia*, se obtuvo una matriz de 528 pares de bases (pb) con 7 sitios polimórficos. Todos corresponden a mutaciones puntuales. En *N. linariifolia* se identificaron 4 haplotipos separados entre sí por un solo paso mutacional (Figs. 2 y 3). El haplotipo H1 fue el más frecuente, presente en 21 localidades pertenecientes a las 4 variedades de *N. linariifolia* (33% var. *linariifolia*, 19% var. *glabriuscula*, 4,8% a la var. *pampeana* y 42,9% var. *pinifolioides*), distribuidas en la provincia fitogeográfica del Chaco y asociadas a las Sierras Pampeanas de Córdoba y Catamarca. El haplotipo H2, se encontró en 13 localidades, en su mayoría de las var. *linariifolia* (53,8%) y var. *pampeana* (38,5%), distribuidas en el Espinal distrito Algarrobal y distrito Caldén (*sensu* Cabrera 1971), respectivamente. Además, el haplotipo H2 se encontró en una sola localidad de var. *pinifolioides* (7,7%), cercana a la localidad de Luti (Córdoba). Los haplotipos H3 y H4 fueron exclusivos de dos poblaciones de la var. *linariifolia* en Entre Ríos y Corrientes, respectivamente, que pertenecen al Espinal, distrito Ñandubay. La relación de los haplotipos encontrados en *N. linariifolia* con el H5 perteneciente a *N. scoparia* indica una posición central del H1, que podría ser considerado ancestral (Fig. 2 B).



B

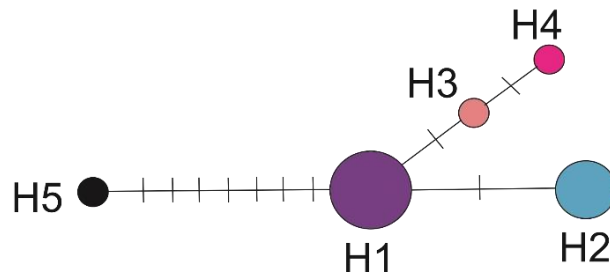


Figura 2. A. Mapa parcial de la República Argentina que muestra la distribución geográfica de las localidades muestreadas y los haplotipos encontrados en *N. linariifolia*. En verde se delimitan las regiones biogeográficas del Chaco y del Espinal (distritos Caldén, Algarrobo y Ñandubay) según Olson *et al.* (2001). Las zonas sombreadas delimitan las áreas de altura de las Sierras Pampeanas. Los diferentes símbolos indican las distintas variedades morfológicas pertenecientes a *N. linariifolia* (referencias en la imagen). Los diferentes colores de los símbolos señalan los haplotipos encontrados de acuerdo a la red de la Fig. 2 B.

B. Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas de los haplotipos encontrados en *N. linariifolia*. Los distintos colores indican los distintos haplotipos encontrados. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos. Las barras perpendiculares indican el número de pasos mutacionales que separan cada haplotipo.

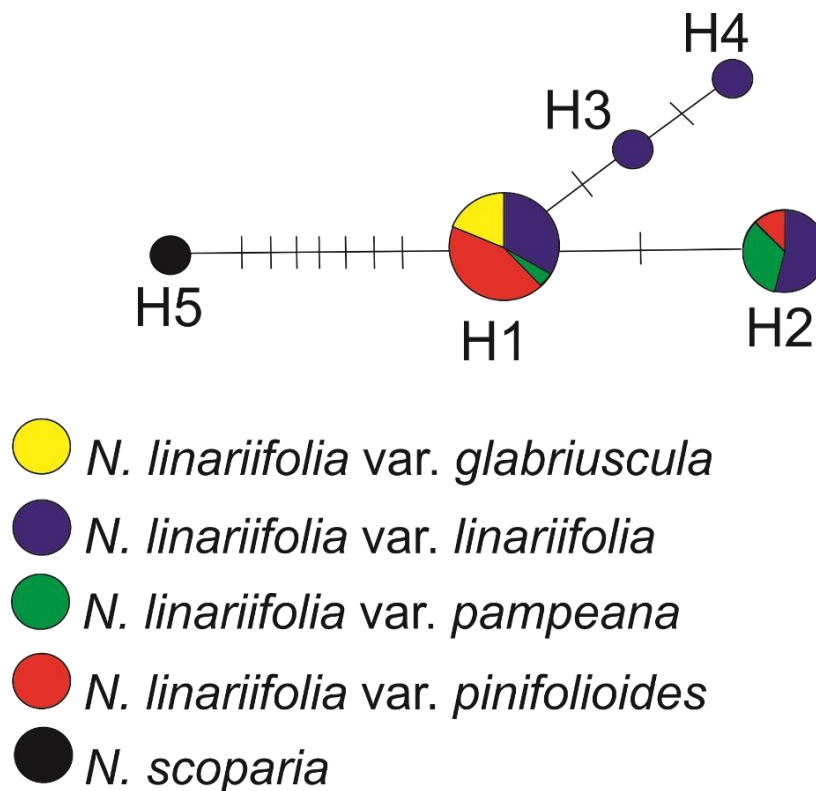


Figura 3. Red de haplotipos que muestra las relaciones genealógicas y frecuencia de los haplotipos encontrados en cada una de las variedades morfológicas de *N. linariifolia*. Los distintos colores indican las distintas variedades de *N. linariifolia*. El área de los círculos es proporcional a la frecuencia de los haplotipos. Las barras perpendiculares indican el número de pasos mutacionales que separan cada haplotipo

Estimación de los tiempos de divergencia

El árbol filogenético obtenido mediante el análisis de las secuencias cloroplastidiales y datado mediante la calibración de un reloj molecular (Fig. 4) recupera a *N. linariifolia* como grupo monofilético con un alto valor de soporte (Probabilidad Posterior Bayesiana: PPB=1). La datación del árbol filogenético indica que *N. linariifolia* podría haber divergido de su especie hermana *N. scoparia* hace aproximadamente unos 2,48 millones de años (intervalo de confianza del 95% (IC): 3,73-0,70 Ma). Dentro del clado correspondiente a *N. linariifolia*, la diversificación habría comenzado hace unos 790 mil años atrás (IC: 2,02-0,40 Ma), separándose los haplotipos localizados en las Sierras Pampeanas y el Espinal distrito Algarrobal y Caldén (H1 y H2) de los haplotipos (H3 y H4) pertenecientes al Espinal distrito Ñandubay. Estos últimos habrían divergido hace 240 mil años atrás (IC: 1,05-0,12 Ma).

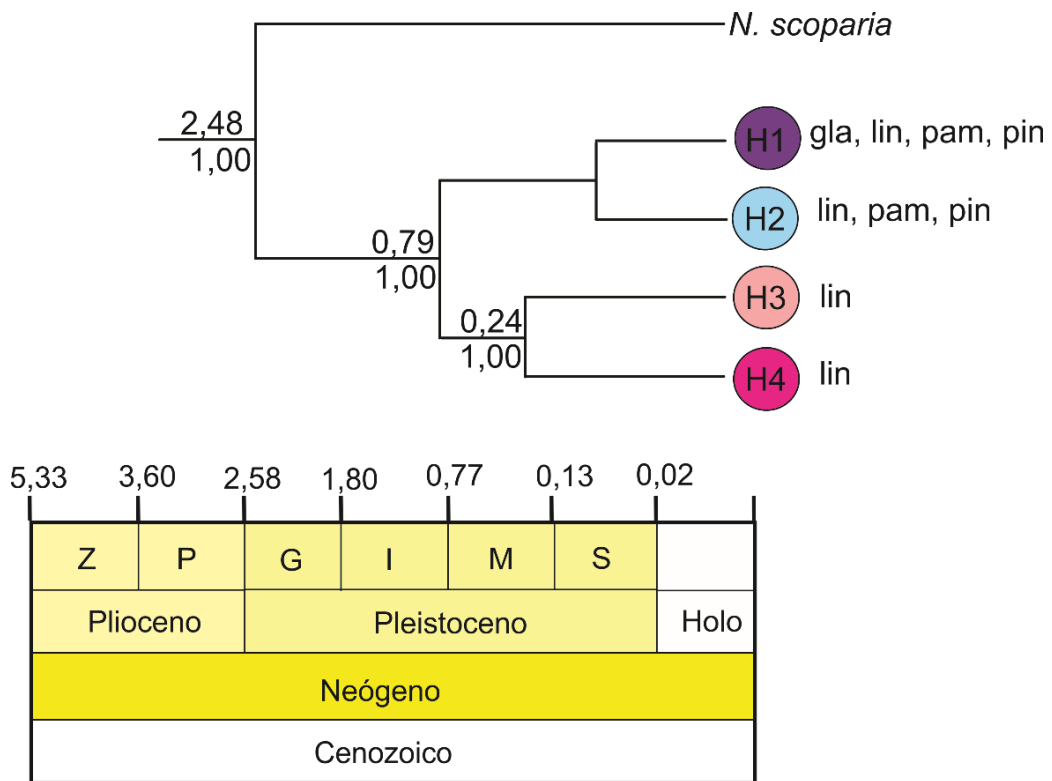


Figura 4. Cronograma que muestra las relaciones filogenéticas de los haplotipos encontrados en *N. linariifolia* y sus edades de divergencia. El color de los círculos representa el haplotipo de acuerdo a la Fig. 2. A continuación del haplotipo, se enumera el nombre de las variedades de *N. linariifolia* en donde fue encontrado. Abreviaturas= gla: variedad *glabriuscula*; lin: variedad *linariifolia*; pam: variedad *pampeana*; pin: variedad *pinifolioides*. Al final de la figura se representa parte de la Tabla Cronoestratigráfica Internacional (<https://stratigraphy.org/ICSchart/ChronostratChart2021-05Spanish.pdf>).

Modelado de nicho ecológico

El modelado de nicho (Fig. 5) permitió estimar la distribución potencial de las variedades de *N. linariifolia* para el presente, la época del último máximo glacial (LGM) y el periodo del último máximo interglaciar (LIG). Las variables no correlacionadas que más contribuyeron al modelo para cada variedad se muestran en la Tabla 3. En general, los modelados de la distribución potencial en el presente de las cuatro variedades se ajustan a la distribución que tienen en la actualidad, evidenciándose, además, en las var. *linariifolia*, *glabriuscula* y *pinifolioides*, otras áreas climáticamente favorables en donde no han sido registradas (Fig. 5 C, F, I, L). En el caso de la var. *linariifolia* (Fig. 5 F), que es la de mayor distribución, se evidencia que las áreas de probabilidad de presencia se extienden hacia el este argentino (en las provincias de Santa Fe y Buenos Aires). Las variedades *glabriuscula* y *pinifolioides* son los taxones que representan una distribución más restringida. Sin embargo, el modelado de su distribución actual se proyecta hacia zonas puntuales de las provincias de Catamarca y La Rioja (Fig. 5 C y 4 I). Finalmente, se recupera cierta

probabilidad de ocurrencia actual de la var. *pampeana* hacia el sur de La Pampa y norte de Río Negro (Fig. 5 L).

Las proyecciones paleoclimáticas de la distribución de las variedades, permite inferir las posibles respuestas de cada una a los cambios climáticos del pasado. Durante el periodo interglaciar, *N. linariifolia* var. *linariifolia* se habría desplazado hacia el oeste, con mayor probabilidad de ocurrencia en las provincias de San Luis, San Juan y Córdoba (Fig. 5 D). Por otro lado, las variedades *glabriuscula* y *pampeana* habrían sido más afectadas durante este período, ya que se observa una distribución restringida o casi nula (Fig. 5 A y J). En el caso de *N. linariifolia* var. *pinifolioides*, se puede observar que durante el período interglaciar amplió su rango de distribución hacia el sudoeste, en las provincias de San Luis, Mendoza y San Juan (Fig. 5 G).

Las proyecciones de distribución presentan algunas diferencias para el período LGM. En la variedad *linariifolia* se evidencia un desplazamiento hacia el Noreste, alcanzando las provincias de Santiago del Estero y Chaco (Fig. 5 E). En la variedad *glabriuscula* se observa un pequeño aumento del área de distribución (Fig. 5 B), mientras que la var. *pampeana* habría ampliado su rango de distribución hacia el Este de la distribución actual, alcanzando el sur de la provincia de Buenos Aires (Fig. 5 K). *Nierembergia linariifolia* var. *pinifolioides* habría sido ampliamente afectada por este período, observándose en el modelo un desplazamiento hacia el norte, en las provincias de La Rioja y Santiago del Estero, y hacia el oeste en Mendoza, donde actualmente no se registra, por lo que se infiere que podría haber desaparecido de su actual distribución o su origen sería posterior (Fig. 5 H).

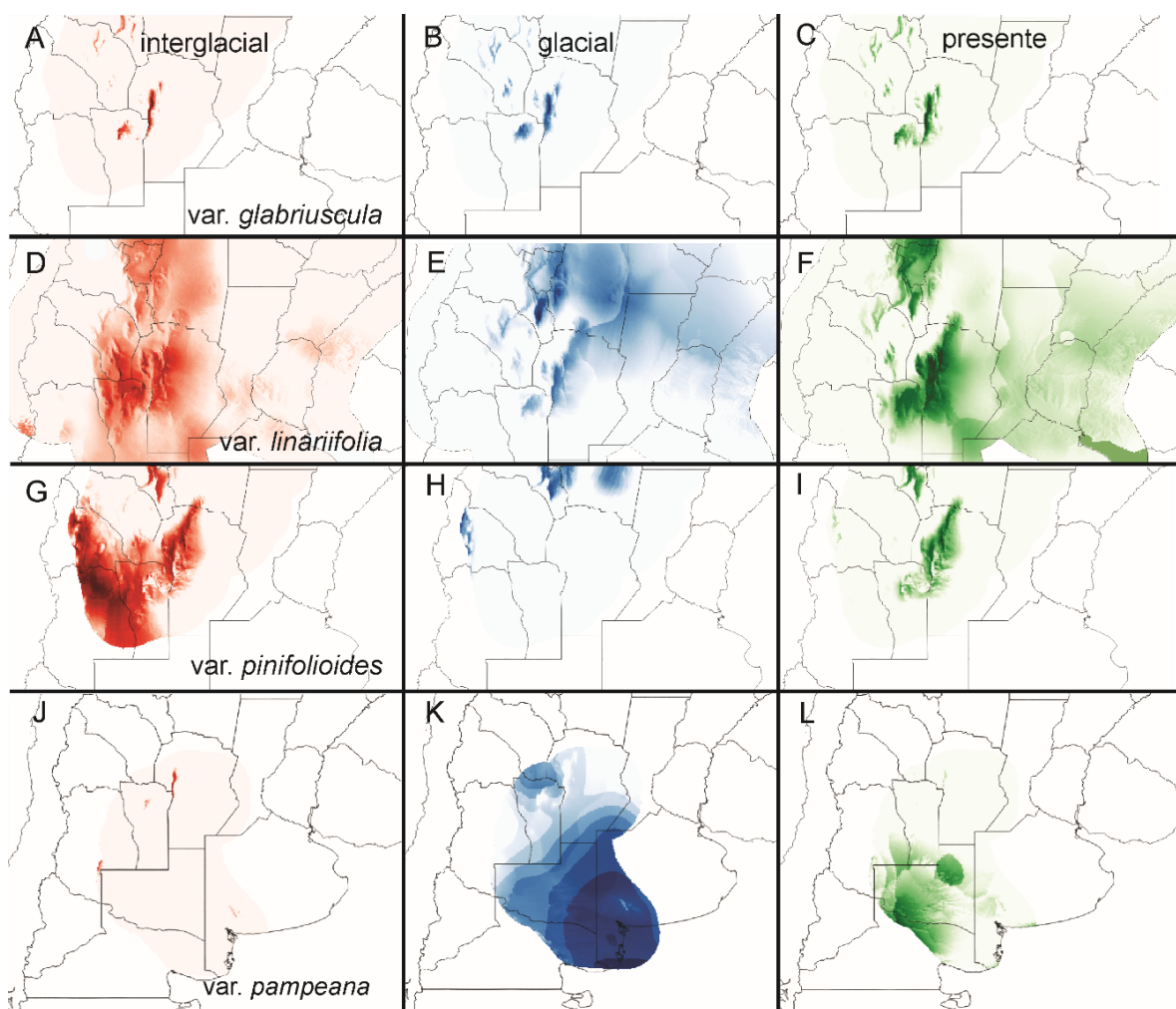


Figura 5 Modelos de distribución de las variedades de *N. linariifolia* en escenarios climáticos actuales y pleistocénicos. **A, D, G, J.** Último Máximo Interglacial (ca. 116-130 Kya). **B, E, H, K.** Último Máximo Glacial (LGM, ca. 21 Kya). **C, F, I, L.** Condiciones actuales. **A, B, C** variedad *glabriuscula*. **D, E, F** variedad *linariifolia*. **G, H, I** variedad *pinifolioides*. **J, K, L** variedad *pampeana*.

Tabla 3 Variables bioclimáticas obtenidas de PaleoClim dataset, que más contribuyeron al modelo de cada variedad de *N. linariifolia*.

TAXÓN	VARIABLES BIOCLIMÁTICAS
<i>var. linariifolia</i>	BIO 1, BIO 2, BIO 4, BIO 8, BIO 12, BIO 13, BIO 19
<i>var. glabriuscula</i>	BIO 2, BIO 3, BIO 9, BIO 13, BIO 15, BIO 19
<i>var. pampeana</i>	BIO 3, BIO 4, BIO 6, BIO 8, BIO 9, BIO 10, BIO 19
<i>var. pinifolioides</i>	BIO 4, BIO 6, BIO 15, BIO 19

Abreviaturas: BIO 1: temperatura media anual; BIO 2: rango medio de temperatura durante el día; BIO 3: isoterma; BIO 4: estacionalidad de la temperatura; BIO 6: temperatura mínima diurna del mes más frío; BIO 8: temperatura diurna media del cuatrimestre más húmedo; BIO 9: temperatura diurna media del cuatrimestre más seco; BIO 10: temperatura media del cuatrimestre más cálido; BIO 12: precipitación anual; BIO 13: precipitación del mes más húmedo; BIO 15: estacionalidad de la precipitación; BIO 19: media de la precipitación mensual del cuatrimestre más frío.

DISCUSIÓN

Variedades morfológicas y diversidad genética

En el presente trabajo se analizó la distribución de los haplotipos obtenidos por medio de la secuenciación del fragmento de ADN cloroplastidial *trnQ-rps16* en individuos pertenecientes a las 4 variedades descritas de *N. linariifolia*. El análisis de la distribución de la diversidad genética con este marcador, mostró que no existiría evidencia de una estructura genética asociada a la variabilidad morfológica. Los resultados obtenidos muestran que las variedades morfológicas comparten haplotipos, por lo que la divergencia fenotípica observada podría responder a factores distintos a los genéticos. Esto difiere de lo observado en *Turnera sidoides* L. y *Petunia axillaris* (Lam.) Britton, Stern & Poggenb., en donde existe una clara diferenciación genética que responde a las distintas variedades taxonómicas (Speranza *et al.* 2007, Moreno *et al.* 2018, Turchetto *et al.* 2014). La falta de estructura genética dentro de las variedades estudiadas es más evidente en la var. *linariifolia*, la cual presentó, a lo largo de las localidades estudiadas, los 4 haplotipos observados en el presente estudio. Esta falta de correspondencia entre la variación genética y el fenotipo fue también registrada en *Calceolaria polyrrhiza* Cav. (Cosacov *et al.* 2010). En esta especie, estudios filogeográficos y morfológicos combinados mostraron que tres de sus morfotipos descritos (*polyrrhiza*, *lanceolata* y *prichardii*) comparten el mismo haplotipo ancestral del complejo, pero difieren en caracteres florales, lo que indicaría la ocurrencia de un proceso de especiación incipiente (Cosacov *et al.* 2010, Strelin *et al.* 2013, Mermoud *et al.* 2021). Así, la distribución de la diversidad genética en *N. linariifolia* respondería a la diversidad genética presente en el ancestro común, y las variedades morfológicas podrían deberse a procesos de especiación más recientes, es decir, posteriores a la divergencia genética observada. Para corroborar el patrón observado, se necesitaría ampliar el muestreo a todo el rango de distribución de *N. linariifolia* y emplear marcadores moleculares con mayor nivel de polimorfismo genético.

Variedades morfológicas y su respuesta a los cambios climáticos del pasado

En el Pleistoceno se produjeron varios cambios significativos en el clima y en la biodiversidad de nuestro planeta (Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006). Este período se caracteriza por la ocurrencia periódica de eventos glaciares, en donde el clima se volvió más frío y seco y grandes extensiones de la superficie terrestre se cubrieron de hielo. Las

glaciaciones fueron seguidas por períodos interglaciarios, caracterizados por ser más cálidos y más húmedos. Este patrón cíclico de cambios climáticos, habría influido en la dinámica de la biodiversidad, alterando drásticamente el paisaje y produciendo el “provincialismo” fitogeográfico que ha caracterizado a la biota sudamericana desde el Pleistoceno temprano hasta el presente (Ortiz-Jaureguizar & Cladera 2006, Turchetto-Zolet *et al.* 2013;). El centro de Argentina, particularmente las regiones biogeográficas del Chaco y Espinal, no fue cubierto por extensas capas de hielo (Speranza *et al.* 2007), sin embargo, se produjeron alteraciones en la distribución de la precipitación, favoreciendo la evolución de climas áridos en la región (Iriondo 1992). Tanto la datación molecular del árbol filogenético obtenido como los patrones de distribución de las variedades morfológicas en el pasado, reflejan que las oscilaciones climáticas del Pleistoceno habrían propiciado la diversificación dentro de *N. linariifolia*.

Particularmente, la confección de los modelados de distribución actual en *N. linariifolia* y su proyección al pasado permitió observar una respuesta diferencial de las distintas variedades a los cambios climáticos ocurridos. En la variedad *linariifolia*, las variaciones climáticas habrían generado un cambio en su rango de distribución. El desplazamiento hacia el Noreste es congruente con los movimientos sugeridos para la región chaqueña durante los períodos glaciarios (Ab'saber 2000, Speranza *et al.* 2007, Scaldaferrro *et al.* 2018). Los resultados del presente trabajo permiten inferir que las localidades que actualmente habitan el Espinal distrito Ñandubay (Corrientes y Entre Ríos) habrían alcanzado esta distribución durante los períodos glaciarios, mientras que durante los períodos interglaciarios podrían haber divergido los nuevos haplotipos. La variedad *glabriuscula*, si bien reduce su rango geográfico en el LIG y se observa una leve expansión de su distribución en los períodos glaciarios, es la variedad más estable a las variaciones climáticas, ocupando la Pampa de Achala tanto en época glaciario como interglaciario. La variedad *pampeana* habría sido favorecida en condiciones climáticas frías, ampliando su rango de distribución hacia el este en épocas glaciarias, mientras que su rango de distribución se habría reducido durante las altas temperaturas. Finalmente, la var. *pinifolioides* parece haber sido gravemente afectada por los períodos fríos, lo que sugiere un origen más reciente, post-glaciario, de esta variedad, originada posiblemente a partir de las variedades *glabriuscula* o *linariifolia*, ya que comparten el mismo haplotipo.

Así, se evidencia una respuesta diferencial a las condiciones climáticas de cada una de las variedades de *N. linariifolia* analizadas, por lo que la variación morfológica observada

podría representar adaptaciones locales en respuesta a las variaciones climáticas. Sin embargo, estudios complementarios como los análisis multivariados para la caracterización del nicho climático de cada variedad, así como los análisis de solapamiento de nicho serán útiles para comprender si estos procesos ecológicos han influido en la diferenciación de sus caracteres morfológicos.

En cuanto a otros factores ecológicos que podrían estar involucrados en la diversificación morfológica, Maubecin y colaboradores (2022), describieron los ensambles de polinizadores y su relación con la morfología de las flores del género *Nierembergia*. Los autores observaron que existen 9 especies de polinizadores asociados a la especie *N. linariifolia*, pero que a nivel infraespecífico estos difieren tanto entre las variedades como entre sitios de una misma variedad. Concluyen que la composición de ensambles estaría más asociada a la localización geográfica de los taxones que a la morfología floral o a las relaciones filogenéticas entre ellos.

Diversidad genética y patrones de distribución geográfica

El estudio de la distribución de la diversidad genética en *N. linariifolia* realizado en el presente trabajo permite contribuir al conocimiento de las relaciones entre las regiones biogeográficas presentes en nuestro país. De acuerdo a la red de haplotipos obtenida, el H1 presente en las Sierras Pampeanas de Córdoba y Catamarca, sería un haplotipo ancestral en *N. linariifolia*, del cual derivan los haplotipos localizados en tierras bajas, aquí representado por el Espinal. Esto concuerda con lo sugerido en Acosta *et al.* (2016), donde se postula que esta especie se habría originado en zonas montañosas.

Es de destacar, que el presente estudio permite inferir las relaciones evolutivas entre los tres distritos del Espinal descritos por Cabrera (1971). Bajo esta clasificación, la provincia fitogeográfica del Espinal, se divide en los distritos del Caldén, Algarrobo y Ñandubay, de acuerdo a la especie de *Neltuma* Raf. predominante en cada uno. La distribución de los haplotipos de *N. linariifolia* encontrada en el presente trabajo, permite inferir que el distrito del Ñandubay (haplotipos 3 y 4) tiene un origen independiente a los distritos Caldén y Algarrobal, y que éstos últimos serían evolutivamente más cercanos, compartiendo parte de una historia en común más reciente.

Conclusiones finales

Las características morfológicas que diferencian a las variedades descritas en *N. linariifolia*, a diferencia de lo propuesto en la hipótesis, no serían el resultado de una separación de linajes genéticos dentro de la especie. De acuerdo a la evidencia obtenida en el presente trabajo, la diversidad genética observada habría ocurrido en el ancestro común, previo a la diferenciación de las variedades. Así, los procesos de diversificación morfológicos habrían ocurrido en épocas más recientes, producto de adaptaciones locales a las variaciones climáticas de los ambientes donde crecen, revelando así, un posible proceso de especiación incipiente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA M.C., E.A. MOSCONE & A.A. COCUCCHI (2016) Using chromosomal data in the phylogenetic and molecular dating framework: karyotype evolution and diversification in *Nierembergia* (Solanaceae) influenced by historical changes in sea level. *Plant Biology* 18: 514–526.
- AB'SABER A.N. (2000) Spaces occupied by the expansion of dry climates in South America during the Quaternary ice ages. *Revista do Instituto Geologico* 21: 71–78.
- ALSOS I.G., T. ENGELSKJØN, L. GIELLY, P. TABERLET, C. BROCHMANN (2005) Impact of ice ages on circumpolar molecular diversity: insights from an ecological key species. *Molecular Ecology* 14: 2739–2753.
- BANDEL T H.J., P. FORSTER & A. RÖHL (1999) Median-Joining Networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution* 16: 37–48.
- CABRERA A.L. (1971) Fitogeografía de la República Argentina. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 14: 1–55.
- COCUCCHI A.A. & A.T. HUNZIKER (1995) *Nierembergia*. En: Hunziker A.T. (Ed.). Flora fanerogámica argentina. 256 Solanaceae, parte 1. Subtr. VIIb. Nierembergiinae. Fsc. 15: 3–14.
- COSACOV A., A.N. SÉRSIC, V. SOSA, L.A. JOHNSON & A.A. COCUCCHI (2010) Multiple periglacial refugia in the Patagonian steppe and post-glacial colonization of the Andes: the phylogeography of *Calceolaria polyrhiza*. *Journal of Biogeography* 37: 1463–1477.
- DOYLE J. J. & J. L. DOYLE (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical bulletin* 19: 11-15.
- DRUMMOND A.J. & A. RAMBAUT (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evolutionary Biology* 7: 214
- DUPIN J., N.J. MATZKE, T. SÄRKINEN, S. KNAPP, R.G. OLMSTEAD, L. BOHS & S.D. SMITH (2017) Bayesian estimation of the global biogeographical history of the Solanaceae. *Journal of Biogeography* 44: 887-899.
- GIL R.R., L.-Z. LIN, H.-B. CHAI, J.M. PEZZUTO & G.A. CORDELL (1995) Cardenolides from *Nierembergia aristata*. *Journal of Natural Products* 58: 848-856.
- GODO T., O. TSUJII, K. ISHIKAWA & M. MII (1997) Fertile transgenic plants of *Nierembergia scoparia* Sendtner obtained by a mikimopine type strain of *Agrobacterium rhizogenes*. *Scientia Horticulturae* 68: 101–111.

- GONZÁLEZ M. (1982) Estudio químico de *Nierembergia hippomanica* Miers. Tesis Fac. Cs. Ex. y Nat., Buenos Aires. (Inédita).
- HAWKES J.G. (1999) The economic importance of the family Solanaceae. En: M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester, J. P. Jessop (Eds.). *Solanaceae IV*, pp. 1-8. Royal Botanic Gardens, Kew.
- HUELSENBECK J.P. & F. RONQUIST (2001) MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17: 754–755.
- HUNZIKER A.T. (1979) South American Solanaceae: a synoptic survey. En: J.G. Hawkes, R.N. Lester, A.D. Skelding (Eds.). *The biology and taxonomy of the Solanaceae. – Linnean Society Symposium*, ser. 7: 49–85.
- IRIONDO M.H. (1992) El Chaco. *Holoceno* 1: 50–63.
- KUMAR S., K. TAMURA & M. NEI (2004) MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150–163.
- LEVIN R.A., N.R. MYERS & L. BOHS (2006) Phylogenetic relationships among the “spiny solanums” (*Solanum* subgenus *Leptostemonum*, *Solanaceae*). *American Journal of Botany* 93: 157-169.
- MATUTE D.R. & B.S. COOPER (2021) Comparative studies on speciation: 30 years since Coyne and Orr. *Evolution* 75: 764–778.
- MAUBECIN C.C., M.N. AUGUSTO & A.N. SÉRSIC (2022) Variación interespecífica de ensambles de polinizadores en *Nierembergia* (*Solanaceae*) en relación con la localización geográfica y la variación fenotípica de las flores. *Ecologia Austral* 32: 930-944.
- MERMOUD S., A. COSACOV, A. SÉRSIC & M. C. ACOSTA (2021) Incipient speciation in *Calceolaria polyrhiza* complex (*Calceolariaceae*): cytogenetic analysis supports molecular and morphological data. *Plant Biosystems* 155: 1203-1212.
- MILLÁN R. (1941) Revisión de las especies de *Nierembergia* (*Solanaceae*). *Darwiniana* 5: 487-547.
- MORENO E.M.S., L. BRANDÃO DE FREITAS, P.R. SPERANZA & V.G. SOLÍS NEFFA (2018) Impact of Pleistocene geoclimatic events on the genetic structure in mid-latitude South American plants: insights from the phylogeography of *Turnera sidoides* complex (*Passifloraceae*, *Turneroideae*). *Botanical Journal of the Linnean Society* 188: 377–390.

- MORRONE J.J. (2000) Sistemática, Biogeografía, Evolución. UNAM.
- NYLANDER J.A. (2004) *MrModelTest*. Program distributed by the author. Uppsala: Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- OLMSTEAD R.G. & R.G. PALMER (1992) A chloroplast DNA phylogeny of the Solanaceae: subfamilial relationships and character evolution. *Annals of Missouri Botanical Garden* 79: 346–360.
- OLSON D.M., E. DINERSTEIN & E.D. WIKRAMANAYAKE (2001) Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth: A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience* 51: 933–938.
- ORTIZ-JAUREGUIZAR E. & G.A. CLADERA (2006) Paleoenvironmental evolution of southern South America during the Cenozoic. *Journal of Arid Environments* 66: 498–532.
- PHILLIPS S.J., R.P. ANDERSON & R.E. SCHAPIRE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distributions. *Ecological Modelling* 190: 231–259.
- RAMBAUT A. & DRUMMOND A.J. (2012) FigTree: tree figure drawing tool, v1.4.2. Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>.
- RAMBAUT A., SUCHARD M.A., XIE D. & DRUMMOND A.J. (2014) Tracer v1.6. Available at: <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>.
- ROZAS J., A. FERRER-MATA, J.C SÁNCHEZ-DELBARRIO, S. GUIRAO-RICO, P. LIBRADO, S.E. RAMOS-ONSINS & A. SÁNCHEZ-GRACIA (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. *Molecular Biology and Evolution* 34: 3299-3302.
- SANG T., D.J. CRAWFORD & T.F. STUESSY (1997) Chloroplast DNA phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). *American Journal of Botany* 84: 1120-1136.
- SCALDAFERRO M.A., G.E. BARBOZA & M.C. ACOSTA (2018) Evolutionary history of the chili pepper *Capsicum baccatum* L. (Solanaceae): domestication in South America and natural diversification in the Seasonally Dry Tropical Forests. *Biological Journal of the Linnean Society* 124: 466–478.
- SHAW J., E.B. LICKY, E.E. SCHILLING & R.L. SMALL (2007) Comparison of whole chloroplast genome sequences to choose noncoding regions for phylogenetic studies in angiosperms: the tortoise and the hare III. *American Journal of Botany* 94: 275-288.

- SHIZUKAWA Y. & M. MII (1997) A simple and efficient plant regeneration system for leaf protoplasts of *Nierembergia repens* by inducing single shoots on the microcolonies. *Plant Cell Reports* 16: 545–549.
- SMARTT J. & N.W. SIMMONDS (1995) (Eds.). Evolution of crop plants. Longman Group, Essex.
- SPERANZA P.R., J.G. SEIJO, I.A GRELA & V.G. SOLIS NEFFA (2007) Chloroplast DNA variation in the *Turnera sidoides* L. complex (Turneraceae): biogeographical implications. *Journal of Biogeography* 34: 427–436.
- STRELIN M.M., A. COSACOV, M. DILLER & A.N. SÉRSIC (2013) Study of the polymorphism of the Patagonian *Calceolaria polyrhiza* (Calceolariaceae) using decision tree and sequential covering rule induction. *Botanical Journal of the Linnean Society* 173: 487–500.
- SUN Y., D.Z SKINNER, G.H. LIANG & S.H. HULBERT (1994) Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA. *Theoretical and Applied Genetics* 89: 26-32.
- TABERLET P., L. GIELLY, G. PATOU, & J. BOUVET (1991) Universal primers for amplification of three noncoding regions of chloroplast DNA. *Plant Molecular Biology* 17: 1105-1109.
- TATE, J. A. & B.B. SIMPSON (2003) Paraphyly of *Tarasa* (Malvaceae) and diverse origins of the polyploid species. *Systematic Botany* 28: 723-737.
- TATE J.A., M.C. ACOSTA, J. MCDILL, E.A. MOSCONE, B.B. SIMPSON & A.A. COCUCCI (2009) Phylogeny and character evolution in *Nierembergia* (Solanaceae): molecular, morphological, and cytogenetic evidence. *Systematic Botany* 34: 198–206.
- TURCHETTO C., A.L.A SEGATTO, M.P.C. TELLES, L.B. DINIZ-FILHO & J.A.F FREITAS (2014) Intraspecific classification reflects genetic differentiation in the widespread *Petunia axillaris* complex: a comparison among morphological, ecological, and genetic patterns of geographic variation. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 16: 75–82.
- TURCHETTO-ZOLET A.C., F. PINHEIRO, F. SALGUEIRO & C. PALMA-SILVA (2013) Phylogeographical patterns shed light on evolutionary process in South America. *Molecular Ecology* 22: 1193–1213.

WHITE T. J., T. BRUNS, S.J.W.T LEE & J. TAYLOR (1990) Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications*. 18: 315-322.

ANEXO

Tabla S1. Localidades georreferenciadas de *N. linariifolia* utilizadas en el modelado de nicho ecológico.

Especie	Variedad	Ubicación	Lat (dec)	Long (dec)	Altura (msm)	Origen del dato
<i>N. linariifolia</i>	<i>var glabriuscula</i>	Córdoba, Cerro de La Huerta, Mina de Wolfran "Virgilio"	-32,63	-64,84	1703	Base de datos Iris
		Córdoba, Cerro Los Linderos	-32,05	-64,90	2244	Presente estudio
		Córdoba, Copina - 1km antes	-31,57	-64,65	1195	Base de datos Iris
		Córdoba, Copina - pasando el 5° puente	-31,57	-64,71	1654	Base de datos Iris
		Córdoba, El Condor	-31,61	-64,76	2126	Base de datos Iris
		Córdoba, La Paisanita	-31,71	-64,50	733	Monografía
		Córdoba, Los Gigantes, AAC 6013	-31,38	-64,77	1750	Presente estudio
		Córdoba, Pampa de Achala	-31,68	-64,84	2079	Base de datos Iris
		Córdoba, Pampa de Achala, N. antena	-31,61	-64,78	2165	Presente estudio
		Córdoba, Repartidora de Telecom	-31,61	-64,78	2169	Monografía
		Córdoba, San Alberto, Altautina	-31,76	-65,13	1000	Base de datos Iris
		Córdoba, Sierra Grande (Falda Este): Atos Pampa (Río Reartes)	-31,96	-64,71	1047	Base de datos Iris
		Córdoba, Yatán	-31,83	-64,76	1794	Presente estudio
		San Luis, General Pedernera, Estancia la Morena - Cerro el Morro	-33,19	-65,42	1220	Base de datos Iris
		San Luis, La Carolina	-32,86	-66,11	1585	Monografía
		San Luis, Junín, el Rincón	-32,35	-65,95	1218	Base de datos Iris
	<i>var linariifolia</i>	Catamarca, Alto de las Juntas	-27,45	-66,01	1500	Monografía
		Catamarca, Andalgalá, Ruta 63 - cuesta de la Negrilla	-27,37	-66,38	3200	Base de datos Iris
		Catamarca, Cerca de La Merced	-28,15	-65,65	943	Presente estudio
		Catamarca, Cuesta del Portezuelo	-28,49	-65,62	1419	Presente estudio
		Catamarca, hacia mina Capillitas	-27,46	-66,40	2575	Monografía
		Catamarca, Paclin, Cuesta del Totoral	-28,12	-65,64	1166	Base de datos Iris
		Córdoba, Autopista 9, Entre Laguna Larga y Pilar	-31,72	-63,80	308	Presente estudio
		Córdoba, Cabalango	-31,40	-64,54	709	Presente estudio
		Córdoba, Cassafouth	-31,36	-64,45	763	Presente estudio
		Córdoba, cerca de Rio Cuarto	-33,36	-64,54	446	Base de datos Iris
Córdoba, cerca de Rio Segundo	-31,70	-63,53	252	Base de datos Iris		
Córdoba, Ciudad Universitaria	-31,44	-64,19	457	Presente estudio		
Córdoba, Concepción del tío, AAC <i>et al.</i> 6040	-31,32	-62,81	123	Presente estudio		

	Córdoba, Diego de Rojas, AAC <i>et al.</i> 6034	-31,03	-63,34	153	Presente estudio
	Córdoba, El Talar	-31,25	-64,27	578	Presente estudio
	Córdoba, entre Río I y Santa Rosa del Río I, AAC <i>et al.</i> 6031	-31,22	-63,49	221	Presente estudio
	Córdoba, Estancia San Teodoro, Río Primero	-31,39	-63,70	281	Base de datos Iris
	Córdoba, La Calera, Camino a San Fernando	-31,32	-64,37	591	Presente estudio
	Córdoba, La Calera, s/v	-31,33	-64,35	520	Presente estudio
	Córdoba, Los Poleos	-32,47	-64,29	634	Presente estudio
	Córdoba, pasando La Puerta, AAC <i>et al.</i> 6035	-30,90	-63,14	109	Presente estudio
	Córdoba, Rincón, AAC <i>et al.</i> 6041	-31,59	-63,61	231	Presente estudio
	Córdoba, Río Tercero	-32,15	-64,13	376.	Presente estudio
	Córdoba, Salsipuedes	-31,15	-64,29	738	Presente estudio
	Córdoba, Santa Rosa del Río I	-31,16	-63,41	183	Presente estudio
	Córdoba, Va del Dique	-32,19	-64,46	556	Presente estudio
	Corrientes, Capital, rumbo al Riachuelo	-27,55	-58,75	48	Base de datos Iris
	Corrientes, Curuzu Cuatiá	-30,34	-57,95	63	Presente estudio
	Corrientes, hacia Parada Pucheta	-29,98	-57,69	46	Monografía
	Corrinetes, Camino a Rincon de Ambrosio	-28,27	-58,73	67	Monografía
	Entre Ríos, Chajarí	-30,72	-58,04	62 .	Presente estudio
	Entre Ríos, Federación, cerca de San Jaime de la Frontera	-30,52	-58,23	69	Base de datos Iris
	Entre Ríos, Federación, Colonia Florida	-30,72	-58,04	56	Base de datos Iris
	Jujuy, Sierra de Calilegua	-23,73	-64,85	700	Monografía
	Misiones, 9km del Arrollo, ruta hacia concepción	-28,02	-55,64	113	Monografía
	Misiones, Candelaria, Arrollo Mártires	-27,42	-55,42	115	Base de datos Iris
	Misiones, San Ignacio, Arroyo Ñacanguazú (km 1421)	-27,12	-55,37	113	Base de datos Iris
	Salta, Guachipas,	-25,65	-65,49	1759	Base de datos Iris
	Salta, Talapampa, hacia Alemania	-25,56	-65,58	1157	Monografía
	Tucuman, Capital - Ruta de San Javier a Raco	-26,69	-65,38	1218	Base de datos Iris
var. <i>pinifolioides</i>	Córdoba, Camino a Chancaní	-31,85	-65,25	799 .	Presente estudio
	Córdoba, camino a Luti	-32,31	-64,66	495 .	Presente estudio
	Córdoba, camino a Luti sitio 2	-32,31	-64,66	653	Presente estudio
	Córdoba, Capilla del Monte, cerca del el zapato	-30,85	-64,57	498	Presente estudio
	Córdoba, Capilla del Monte, La Toma	-30,87	-64,49	510	Presente estudio
	Córdoba, Capilla del monte, Los terrones	-30,78	-64,49	700 .	Presente estudio
	Córdoba, Cerro Uritorco, Estacionamiento La Toma	-30,86	-64,49	935	Presente estudio
	Córdoba, Charbonier	-30,75	-64,57	914	Presente estudio

		Córdoba, Cruce ruta 38 y San Marcos Sierra	-30,70	-64,70	821	Presente estudio
		Córdoba, Deán Funes	-30,43	-64,34	502,2	Presente estudio
		Córdoba, entre Dean Funes y Sauce Punco	-30,37	-64,66	1077	Presente estudio
		Córdoba, Ischilín	-30,58	-64,36	894	Base de datos Iris
		Córdoba, La Higuera	-31,06	-65,10	1010	Base de datos Iris
		Córdoba, Ruta 17, entre Capilla del Monte y Ongamira	-30,77	-64,49	398	Base de datos Iris
		Córdoba, Salto del Tigre, Achiras	-33,18	-64,99	1033	Base de datos Iris
		Córdoba, Va. Dolores	-31,99	-65,26	948	Base de datos Iris
		Córdoba, vado Chocolate, AAC et al. 6012	-31,85	-65,25	1045	Base de datos Iris
		San Luis, Arroyo Papagayos	-32,68	-64,98	1119	Base de datos Iris
		San Luis, Ruta 5, hacia Mirador los Cóndores	-32,36	-64,94	600	Base de datos Iris
		Santiago del Estero, 4.4km al N de Ojo de Agua	-29,46	-63,70	1517	Base de datos Iris
	<i>var. pampeana</i>	Córdoba, Cerro El Leoncito	-33,55	-65,01	525	Presente estudio
		La Pampa, 35km de Villa Alba	-38,31	-63,61	50	Monografía
		La Pampa, cerca de Lihuel Calel	-37,87	-65,46	266	Presente estudio
		La Pampa, cerca de Lihuel Calel 2	-37,78	-65,38	226	Presente estudio
		La Pampa, dpto Conhelo,	-36,22	-64,57	227	Herbario SRFA
		La Pampa, dpto Rancul, Caleufú	-35,59	-64,56	206	Herbario SRFA
		La Pampa, El Durazno	-36,74	-65,29	366	Presente estudio
		La Pampa, entre Chacherramendi y el Cruce	-37,42	-65,36	284	Presente estudio
		La Pampa, Localidad de Chacharramendi	-37,32	-65,11	379	Base de datos Iris
		La Pampa, Parque Pedro Luro	-36,91	-64,26	134	Presente estudio
		La Pampa, Ruta nº 152 km 118	-37,87	-65,46	271	Base de datos Iris
		Mendoza, ruta 188, entre Los Huarpes y Las Moras	-35,01	-67,24	426	Monografía
		Rio Negro, Cnel del busto	-38,95	-64,26	99	Monografía
		Rio Negro, Rio Colorado	-38,99	-64,10	92	Monografía
		San Luis Junín el Rincón	-32,35	-65,95	582	Base de datos Iris
		San Luis, Ruta 8, límite con Cba	-33,61	-65,18	566	Base de datos Iris